

Université de Montréal

**Destins des S-RNases et interactions moléculaires dans
le tube pollinique dans le cadre de l'auto-incompatibilité
gamétophytique chez *Solanum chacoense***

par

Jonathan Soulard

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en Sciences biologiques

Janvier 2014

© Jonathan Soulard, 2014

Résumé

L'auto-incompatibilité (AI) est une barrière reproductive prézygotique qui permet aux pistils d'une fleur de rejeter leur propre pollen. Les systèmes d'AI peuvent prévenir l'autofertilisation et ainsi limiter l'*inbreeding*. Dans l'AI gamétophytique, le génotype du pollen détermine son propre phénotype d'incompatibilité, et dans ce système, les déterminants mâles et femelles de l'AI sont codés par un locus multigénique et multi-allélique désigné le locus *S*. Chez les *Solanaceae*, le déterminant femelle de l'AI est une glycoprotéine styloïde extracellulaire fortement polymorphique possédant une activité ribonucléase et désignée S-RNase. Les S-RNases montrent un patron caractéristique de deux régions hypervariables (HVA et HVb), responsables de leur détermination allélique, et cinq régions hautement conservées (C1 à C5) impliquées dans l'activité catalytique ou la stabilisation structurelle de ces protéines. Dans ce travail, nous avons investigué plusieurs caractéristiques des S-RNases et identifié un nouveau ligand potentiel aux S-RNases chez *Solanum chacoense*.

L'objectif de notre première étude était l'élucidation du rôle de la région C4 des S-RNases. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la région C4 serait impliquée dans le repliement ou la stabilité des S-RNases, nous avons généré un mutant dans lequel les quatre résidus chargés présents en région C4 furent remplacés par des résidus glycine. Cette protéine mutante ne s'accumulant pas à des niveaux détectables, la région C4 semble bien avoir un rôle structurel. Afin de vérifier si C4 est impliquée dans une liaison avec une autre protéine, nous avons généré le mutant R115G, dans lequel un acide aminé chargé fût éliminé afin de réduire les affinités de liaison dans cette région. Ce mutant n'affectant pas le phénotype de rejet pollinique, il est peu probable que la région C4 soit impliquée dans la liaison des S-RNases avec un ligand ou leur pénétration à l'intérieur des tubes polliniques. Enfin, le mutant K113R, dans lequel le seul résidu lysine conservé parmi toutes les S-RNases fût remplacé par un résidu arginine, fût généré afin de vérifier si cette lysine était un site potentiel d'ubiquitination des S-RNases. Toutefois, la dégradation des S-RNases ne fût pas inhibée. Ces résultats indiquent que C4 joue probablement un rôle structurel de stabilisation des S-RNases.

Dans une seconde étude, nous avons analysé le rôle de la glycosylation des S-RNases, dont un site, en région C2, est conservé parmi toutes les S-RNases. Afin d'évaluer la

possibilité que les sucres conjugués constituent une cible potentielle d'ubiquitination, nous avons généré une S_{11} -RNase dont l'unique site de glycosylation en C2 fût éliminé. Ce mutant se comporte de manière semblable à une S_{11} -RNase de type sauvage, démontrant que l'absence de glycosylation ne confère pas un phénotype de rejet constitutif du pollen. Afin de déterminer si l'introduction d'un sucre dans la région HVa de la S_{11} -RNase pourrait affecter le rejet pollinique, nous avons généré un second mutant comportant un site additionnel de glycosylation dans la région HVa et une troisième construction qui comporte elle aussi ce nouveau site mais dont le site en région C2 fût éliminé. Le mutant comportant deux sites de glycosylation se comporte de manière semblable à une S_{11} -RNase de type sauvage mais, de manière surprenante, le mutant uniquement glycosylé en région HVa peut aussi rejeter le pollen d'haplogroupe S_{13} . Nous proposons que la forme non glycosylée de ce mutant constitue un allèle à double spécificité, semblable à un autre allèle à double spécificité préalablement décrit. Il est intéressant de noter que puisque ce phénotype n'est pas observé dans le mutant comportant deux sites de glycosylation, cela suggère que les S-RNases ne sont pas déglycosylées à l'intérieur du pollen.

Dans la dernière étude, nous avons réalisé plusieurs expériences d'interactions protéine-protéine afin d'identifier de potentiels interactants polliniques avec les S-RNases. Nous avons démontré que eEF1A, un composant de la machinerie de traduction chez les eucaryotes, peut lier une S_{11} -RNase immobilisée sur résine concanavaleine A. Des analyses de type *pull-down* utilisant la protéine eEF1A de *S. chacoense* étiquetée avec GST confirment cette interaction. Nous avons aussi montré que la liaison, préalablement constatée, entre eEF1A et l'actine est stimulée en présence de la S_{11} -RNase, bien que cette dernière ne puisse directement lier l'actine. Enfin, nous avons constaté que dans les tubes polliniques incompatibles, l'actine adopte une structure agrégée qui co-localise avec les S-RNases. Ces résultats suggèrent que la liaison entre eEF1A et les S-RNases pourrait constituer un potentiel lien fonctionnel entre les S-RNases et l'altération du cytosquelette d'actine observée lors des réactions d'AI. Par ailleurs, si cette liaison est en mesure de titrer les S-RNases disponibles à l'intérieur du tube pollinique, ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi des quantités minimales ou « seuils » de S-RNases sont nécessaires au déclenchement des réactions d'AI.

Mots-clés : Auto-incompatibilité gamétophytique, *Solanum chacoense*, S-RNase, région conservée C4, glycosylation, reconnaissance allélique, double spécificité, eEF1A, actine, valeur seuil.

Abstract

Self-incompatibility (SI) is a prezygotic reproductive barrier that allows the pistil of a flower to specifically reject their own (self-) pollen. SI systems can help prevent self-fertilization and avoid inbreeding. In gametophytic SI (GSI), the genotype of the pollen determines its breeding behaviour and in this system both female and male specificity determinants of SI are under the control of a multigenic and multiallelic locus called the *S*-locus. In *Solanaceae*, the female determinant of SI is a highly polymorphic stilar-expressed extracellular glycoprotein with RNase activity called the S-RNase. S-RNases show a distinct pattern of two hypervariable (HV_a and HV_b) regions, responsible for their allelic specificity, and five highly conserved regions (C1 to C5) thought to be involved in either the catalytic activity or the structural stabilization of the protein. In this work, we analyzed and characterized several conserved features of the S-RNases and also identified a potential novel S-RNase interactant in *Solanum chacoense*.

The aim of our first study was to investigate the role of the C4 region of S-RNases. To test the hypothesis that the C4 region may be involved in S-RNase folding or stability, we examined a mutant in which the four charged residues in the C4 region were replaced with glycine. This mutant did not accumulate to detectable levels in styles, supporting a structural role for C4. To test the possibility that C4 might be involved in binding another protein, we prepared an R115G mutant, in which a charged amino acid was eliminated to reduce any potential binding to this region. This mutant had no effect on the pollen rejection phenotype of the protein, and thus C4 is likely not involved in either ligand binding or S-RNase entry inside pollen tubes. Finally, a K113R mutant, in which the only conserved lysine residue in all the S-RNases was replaced with arginine, was generated to test if this residue was an S-RNase ubiquitination site. However, S-RNase degradation was not disrupted in this mutant. Taken together, these results indicate that the C4 region likely plays a structural role.

In a second study, we analyzed the role of S-RNase glycosylation. All S-RNases share a conserved glycosylation site in the C2 region. To test the possibility that the sugar residues might be a target for ubiquitination, a transgenic *S*₁₁-RNase lacking its single glycosylation site was examined. This construct behaved similarly to a wild type *S*₁₁-RNase, demonstrating

that the lack of glycosylation does not confer constitutive pollen rejection. To determine if the introduction of an N-linked glycan in the HVa region would affect pollen rejection, a construct containing a second N-glycosylation site inside the HVa region of the S_{11} -RNase and a construct containing only that N-glycosylation site inside the HVa region were prepared. The first construct rejected S_{11} pollen normally, but surprisingly, plants expressing the construct lacking the C2 glycosylation site rejected both S_{11} and S_{13} pollen. We propose that the non-glycosylated form is a dual specific allele, similar to a previously described dual-specific allele that also had amino acid replacements in the HV regions. Interestingly, this phenotype is not observed in the mutant containing two glycosylation sites, which suggests that the sugar residues are not removed during S-RNase entry into the pollen.

In the final study, S-RNase-binding assays were performed with pollen extracts to detect potential interacting proteins. We found that concanavalin A-immobilized S_{11} -RNase bound eEF1A, a component of the eukaryotic translational machinery. This interaction was validated by pull-down experiments using a GST-tagged *S. chacoense* eEF1A. We also found that a previously documented actin binding to eEF1A was markedly increased in the presence of S-RNases, although S-RNases alone do not bind actin. Lastly, we observed that actin in incompatible pollen tubes has an unusual aggregated form which also co-labels with S-RNases. This suggests that binding between S-RNases and eEF1A could provide a potential functional link between the S-RNase and the alteration of the actin cytoskeleton that occurs during the SI reaction. Furthermore, if eEF1A binding to S-RNases acted to titrate the amount of free S-RNase in the pollen tube, this binding may help explain the threshold phenomenon, where a minimum quantity of S-RNase in the style is required to trigger the SI reaction.

Keywords : Gametophytic self-incompatibility, *Solanum chacoense*, S-RNase, C4 conserved region, glycosylation, allelic recognition, dual specificity, eEF1A, actin, threshold.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Chapitre I. Systèmes d’auto-incompatibilité et auto-incompatibilité basée sur les S-RNases	1
1. Introduction générale.....	1
2. Les végétaux utilisent plusieurs stratégies pour prévenir l’auto-fécondation.....	3
3. Les systèmes d’auto-incompatibilité.....	3
3.1. Introduction aux systèmes d’auto-incompatibilité.....	3
3.2. L’auto-incompatibilité sporophytique de type <i>Brassica</i>	5
3.3. L’auto-incompatibilité gamétophytique de type <i>Papaver</i>	8
3.4. L’auto-incompatibilité gamétophytique de type <i>Solanaceae</i>	10
3.4.1. Introduction et caractéristiques.....	10
3.4.2. Le déterminant stylaire de l’auto-incompatibilité de type <i>Solanaceae</i> est une S-ribonucléase : la S-RNase.....	12
3.4.2.1. Identification de la S-RNase.....	12
3.4.2.2. Caractéristiques des S-RNases.....	13
3.4.2.3. Structure tridimensionnelle des S-RNases.....	16

3.4.2.4. Les S-RNases exercent une fonction cytotoxique dans les tubes polliniques incompatibles	17
3.4.2.5. Des fonctions indépendantes des S-RNases semblent aussi impliquées dans les réponses d'auto-incompatibilité	18
3.4.2.6. Localisation et transport des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques	20
3.4.2.7. Les éléments structuraux déterminant la spécificité allélique des S-RNases	22
3.4.2.8. Des ribonucléases similaires aux S-RNases ne sont pas ou plus impliquées dans l'auto-incompatibilité.....	27
3.4.3. Le déterminant pollinique de l'auto-incompatibilité de type <i>Solanaceae</i> est une protéine F-box.....	28
3.4.3.1. À la recherche de pollen <i>S</i>	28
3.4.3.2. Le pollen S-hétéroallélique cause une perte de l'AI	29
3.4.3.3. Les anciens modèles d'auto-incompatibilité attribuaient à pollen <i>S</i> des fonctions différentes.....	30
3.4.3.4. Pollen <i>S</i> est une protéine F-box.....	34
3.4.3.5. Rôles des protéines F-box et implications pour l'auto-incompatibilité	36
3.4.3.6. Caractéristiques des protéines F-box impliquées dans l'auto-incompatibilité.....	37
3.4.3.7. Fonction des protéines F-box impliquées dans l'auto-incompatibilité .	39
3.4.3.7.1. Pollen <i>S</i> contrôle la dégradation des S-RNases dans les croisements compatibles	39
3.4.3.7.2. La dégradation des S-RNases est ubiquitine-dépendante.....	40
3.4.3.7.3. Les interactions entre pollen <i>S</i> et les S-RNases déterminent leur stabilité dans le pollen.....	41

3.4.3.8. Structures déterminant la spécificité allélique de pollen <i>S</i>	42
3.4.4. De nouveaux modèles d'auto-incompatibilité basés sur la dégradation des S-RNases.....	43
3.4.4.1. Modèle simple de dégradation par un unique pollen <i>S</i>	43
3.4.4.2. Modèle de dégradation par un pollen <i>S</i> multipartite	46
3.4.5. Des divergences chez les <i>Prunoideae</i> suggèrent un modèle alternatif.....	50
3.4.6. D'autres molécules sont aussi impliquées dans les mécanismes d'auto-incompatibilité de type <i>Solanaceae</i>	51
3.4.7. Un modèle d'auto-incompatibilité basé sur la séquestration des S-RNases.	56
4. Démarche scientifique et objectifs du projet de recherche	60
Chapitre II. Molecular analysis of the conserved C4 region of the <i>S</i> ₁₁ -RNase of <i>Solanum chacoense</i>	65
Publication :	65
Attribution des travaux :.....	65
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Materials and methods	70
Plant materials.....	70
Transgenic plants and mutagenesis.....	71
RNA and protein analysis	72
Genetic crosses.....	72
Results.....	72
Discussion	74
Acknowledgements.....	77

Figure legends	80
Chapitre III. A new dual-specificity incompatibility allele revealed by absence of glycosylation in the conserved C2 site of a <i>Solanum chacoense</i> S-RNase.....	88
Publication :	88
Attribution des travaux :	88
Abstract	90
Introduction.....	91
Materials and methods	93
Plant material	93
Mutagenesis of the S_{11} -RNase glycosylation sites and plant transformation.....	93
Crosses and pollen observation.....	95
Western-Blot analyses and deglycosylation of S-RNases	95
Results.....	96
Glc ^{C2/HVa} transgenic plants.....	96
Glc ^{HVa} transgenic plants	97
NoGlc transgenic plants	98
Discussion	99
Acknowledgements.....	103
Figure legends	105
Chapitre IV. eEF1A is an S-RNase binding factor in self-incompatible <i>Solanum chacoense</i>	113
Publication :	113
Attribution des travaux :	113
Summary	115

Introduction	116
Results	118
Discussion	120
Materials and Methods	123
Plant material	123
Protein extraction and purification	124
Cloning and recombinant protein expression	125
GST pull-down experiments	126
Immunoblotting analyses	127
Immunoelectron microscopy	127
Acknowledgements	127
Figure legends	128
Supplementary figure legends	136
Chapitre V. Discussion et perspectives	140
1. Impact des travaux	140
1.1. La région C4 a une fonction structurale	140
1.2. Le rôle de la glycosylation des S-RNases reste incertain	142
1.2.1. Aucune fonction pour la glycosylation des S-RNases ?	142
1.2.2. Les S-RNases restent glycosylées dans les tubes polliniques	143
1.2.3. La glycosylation pourrait moduler la spécificité allélique	144
1.3. eEF1A : un nouvel élément de la réaction d'AI ?	145
2. Quelles futures approches permettront de résoudre les questions qui restent quant au fonctionnement de l'AI ?	146
2.1. Les mécanismes de l'AI sont encore largement indéterminés	146

2.2.	L'impact des S-RNases sur les tubes polliniques reste à éclaircir	147
2.3.	Les mécanismes de pollen <i>S</i> restent incertains	149
2.3.1.	Les bases biochimiques des interactions SLF/S-RNases devront être précisées	149
2.3.2.	Les particularités de l'AI chez les <i>Prunoideae</i> devront être investiguées....	150
2.4.	Le rôle de nombreuses autres protéines reste à expliquer.....	151
2.5.	Les applications agricoles de l'AI nécessiteront une meilleure compréhension de ses mécanismes	153
	Bibliographie.....	156

Liste des tableaux

Table II.I : Phenotypes of transgenic R115G plants.....	78
Table II.II : Phenotypes of transgenic K113R plants.....	79
Table III.I : Sequence comparison of the Glc^{HVa} and the previously described dual specific HVapb-RNase.....	104
Supplementary table IV.I : Proteins interacting with a crude S-RNase preparation.	138
Supplementary table IV.II : List of peptides sequenced from proteins interacting with an immobilized highly purified S-RNase.	139

Liste des figures

Figure I.1 : Auto-incompatibilité sporophytique.	6
Figure I.2 : Auto-incompatibilité gamétophytique de type <i>Solanaceae</i>.	11
Figure I.3 : Régions caractéristiques des S-RNases et structure tridimensionnelle prédite de la S_{11}-RNase de <i>Solanum chacoense</i>.	15
Figure I.4 : Rejet du pollen diploïde hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ par une S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} chez <i>Solanum chacoense</i>.	24
Figure I.5 : Modèle du récepteur.	31
Figure I.6 : Modèle de l'inhibiteur.	33
Figure I.7 : Modèle de dégradation basé sur un unique pollen <i>S</i>.	44
Figure I.8 : Modèle de dégradation basé sur un pollen <i>S</i> codé par plusieurs SLF.	48
Figure I.9 : Modèle de séquestration des S-RNases.	57
Figure II.1 : Three-dimensional structure of the C4 domain in the S_{11}-RNase.	80
Figure II.2 : Expression of the GGGG transgene at the protein and RNA levels.	82
Figure II.3 : Expression of the R115G transgene and correlation of phenotype with protein levels.	84
Figure II.4 : Expression of the K113R transgene and correlation of phenotype with protein levels.	86
Figure III.1 : Plants expressing a diglycosylated S_{11}-RNase have a normal <i>S</i>-phenotype.	105
Figure III.2 : Plants expressing the Glc^{HVa} RNase have an unusual dual specificity incompatibility phenotype.	107
Figure III.3 : Plants expressing the NoGlc S-RNase have a normal <i>S</i>-phenotype.	109
Figure III.4 : Model for the different S-RNases produced by Glc^{C2HV_a} and Glc^{HVa} transgenic lines.	111

Figure IV.1 : Protein purification schema and proteins identified in the final eluate....	128
Figure IV.2 : GST pull-down of <i>S</i>₁₁-RNase by eEF1A.	130
Figure IV.3 : eEF1A binding to actin is increased by <i>S</i>₁₁-RNase.	132
Figure IV.4 : Regions of intense actin staining in incompatible pollen tubes also stain with <i>S</i>₁₁-RNase.....	134
Supplementary figure IV.1 : <i>S</i>₁₁-RNase-enriched preparations by ConA chromatography do not contain actin.....	136

Liste des abréviations

ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
AGP	:	ArabinoGalactan Proteins
AI	:	Auto-Incompatibilité
ARC1	:	Armadillo Repeat-Containing protein 1
ARN	:	Acide RiboNucléique
ARNm	:	ARN messenger
ARNr	:	ARN ribosomal
BAC	:	Bacterial Artificial Chromosome
bp	:	Base pair(s)
ConA	:	Concanavalline A
Co-IP	:	Co-ImmunoPrécipitation
CUL1	:	Cullin 1
DNA	:	DeoxyriboNucleic Acid
cDNA	:	Complementary DNA
DTT	:	DiThioThréitol
EDTA	:	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
eEF1A	:	Eukaryotic Elongation Factor 1A
ER	:	Endoplasmic Reticulum
EXOC7	:	EXOCyst complex Component 7
BnExo70A1	:	<i>Brassica napus</i> Exo70A1
FQRNT	:	Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies

FRET	:	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GSI	:	Gametophytic Self-Incompatibility
GST	:	Glutathione S-Transferase
HRP	:	HorseRadish Peroxidase
HTL	:	HT-like
HT-M	:	HT-Mijikai
HV	:	HyperVariable
IEX	:	Ion EXchange chromatography
IPTG	:	IsoPropyl- β -D-ThioGalactoside
IRBV	:	Institut de Recherche en Biologie Végétale
IRIC	:	Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
kb	:	kilobase(s)
KAPP	:	Kinase-Associated Protein Phosphatase
LC-MS/MS	:	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
MCP	:	Mort Cellulaire Programmée
MEC	:	Matrice ExtraCellulaire
MLPK	:	M-Locus Protein Kinase
MW	:	Molecular Weight
NO	:	Nitric Oxyde
NSERC	:	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PELPIII	:	Pistil-specific Extensin-Like Protein III
NaPELPIII	:	<i>Nicotiana alata</i> Pistil-specific Extensin-Like Protein III

PGPS/D3	:	<i>Petunia</i> Germinating Pollen S/D3
ZmPK1	:	<i>Zea mays</i> putative receptor Protein Kinase 1
PMSF	:	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PNGase F	:	Peptide-N-Glycosidase F
sPPases	:	soluble inorganic PyroPhosphatases
PrsS	:	<i>Papaver rhoeas</i> style S protein
PrpS	:	<i>Papaver rhoeas</i> pollen S protein
PS	:	Peptide Signal
RBX1	:	RING-BoX protein 1
RC4	:	<i>Rosaceae</i> C4
RHV	:	<i>Rosaceae</i> HV
RING	:	Really Interesting New Gene
RING-HC	:	Domaine RING de type HC (C ₃ HC ₄)
RNA	:	RiboNucleic Acid
RNase	:	RiboNucléase
ROS	:	Reactive Oxygen Species
SBP1	:	S-RNase-Binding Protein 1
S	:	Svedberg(s)
S	:	Self-sterility
SC	:	Self-Compatibility ou Self-Compatible
SCF	:	S-phase kinase-associated protein – Cullin - F-box
SCR	:	S-locus Cysteine-Rich protein
SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SFB	:	S-locus F-Box

SFBB	:	S-locus F-Box Brothers
SI	:	Self-Incompatibility ou Self-Incompatible
SKP1	:	S-phase Kinase-associated Protein 1
SLF	:	S-Locus F-box
SLG	:	S-Locus Glycoprotein
SP11	:	S-locus Protein 11
SRK	:	S-Locus Receptor Kinase
S-RNases	:	S-RiboNucléases
NaSteP	:	<i>Nicotiana alata</i> Stigma-expressed Protein
THL	:	Thioredoxin H-Like protein
NaTrxh	:	<i>Nicotiana alata</i> Thioredoxin h (Subgroup II)
TTS	:	Transmitting Tract Specific
NaTTS	:	<i>Nicotiana alata</i> Transmitting Tract Specific protein
Y2H	:	Yeast-two-Hybrid

Remerciements

Je souhaite en tout premier lieu remercier mon directeur de recherche, le professeur Mario Cappadocia, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il a su guider ce travail à travers les hauts et les bas de ce projet et assuré un soutien et des encouragements constants, même à travers les périodes de doutes. Ce travail n'aurait simplement pas pu être complété sans son aide et je lui suis reconnaissant d'avoir toujours entretenu avec moi une relation amicale. Je le remercie par ailleurs pour les nombreux intermèdes musicaux, scientifiques, historiques et culinaires qu'il a partagés avec nous.

Ces remerciements s'étendent naturellement à mon co-directeur de recherche, le professeur David Morse, qui a sans broncher patiemment supporté de multiples sièges de son bureau afin de répondre à d'innombrables questions. Je lui suis particulièrement reconnaissant d'avoir partagé avec moi ses vastes connaissances en biologie moléculaire et je souhaite souligner l'originalité de sa pensée qui, dans bien des cas, a permis la résolution de problèmes à priori impossibles et alimenté de nombreuses discussions stimulantes.

Je remercie par ailleurs les professeurs de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale qui ont tous, à plusieurs niveaux, assisté à l'accomplissement de ce projet de recherche, que ce soit par le prêt de matériel, l'accès à leurs appareils ou encore le simple partage de leur expertise. Je remercie en particulier le professeur Daniel Matton pour nous avoir généreusement donné accès à plusieurs de ses résultats de séquençages non publiés.

De nombreux professionnels de recherche, stagiaires postdoctoraux et techniciens m'ont aussi généreusement accordé leur aide et librement partagé leurs connaissances. Parmi ceux là, je souhaite spécialement remercier les docteurs Xike Qin, Badea Kerkeb et Bolin Liu qui ont assuré l'essentiel de ma formation aux techniques de laboratoire. Je remercie aussi le docteur Geneviève Laublin pour avoir assuré la transformation, la régénération et l'entretien de la plupart des plantes transgéniques générées lors de ce projet de recherche. Je souhaite aussi mentionner la permanente et inconditionnelle bienveillance du docteur Sonia Dorion qui m'a, toujours avec le sourire, souvent servi de personne ressource lors de mes pérégrinations dans le domaine de la purification protéique.

Je désire ensuite remercier l'ensemble des étudiants de l'Institut de Recherche en Biologie Végétale, anciens comme nouvellement arrivés, pour avoir fait de cet institut un environnement de travail si agréable. Il serait trop long de mentionner l'ensemble des étudiants qui m'ont, à un moment ou un autre, accordé leur aide mais je souhaite souligner la contribution du docteur Thierry Bertomeu qui, avec le professeur Morse, a subi l'essentiel de mes questions à mon arrivée à l'institut et toujours su y répondre avec une exhaustivité toute caractéristique. Je souhaite également remercier les membres du laboratoire du professeur Morse, en particulier Steve Dagenais Bellefeuille, Philippe Daoust, Sugata Roy et Mathieu Beauchemin que je considère comme des amis en même temps que des collègues.

Je souhaite aussi mentionner les nombreux étudiants de premier cycle que j'ai eu le plaisir de superviser dans le cadre de stages. Je leur exprime particulièrement ma reconnaissance pour leur providentielle assistance dans le cadre des récoltes en serres, ayant moi-même rapidement développé une allergie à notre organisme modèle au cours de ce projet.

Je désire ensuite remercier les nombreux agents administratifs et personnels de soutien qui m'ont assisté au cours de ce travail, notamment Louise Pelletier qui a indirectement participé à nombre de mes projets de recherche en assistant ou réalisant de nombreuses analyses microscopiques, et ce toujours avec la même patience et la même gentillesse

Mes remerciements les plus particuliers vont à ma mère, Nathalie Ferens ainsi qu'à Hien Thong Nguyen Thanh pour leur amour et leur soutien pendant toutes les années consacrées à ce projet.

Les recherches présentées dans ce travail et les nombreux autres projets entrepris dans notre laboratoire n'auraient pas pu être réalisées sans le soutien financier de plusieurs organismes. Je souhaite donc remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour m'avoir octroyé une bourse d'études supérieures. Je souhaite aussi mentionner le soutien financier accordé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) ainsi que par le Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FQRNT) à mes deux directeurs de recherche.

Je désire finalement remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour l'attention qu'ils ont accepté d'accorder à ce manuscrit.

Chapitre I. Systèmes d'auto-incompatibilité et auto-incompatibilité basée sur les S-RNases

1. Introduction générale

La dépression endogamique, conséquence de la consanguinité ou «*inbreeding*¹», est un phénomène biologique qui cause une diminution de la valeur sélective des individus issus de croisements apparentés (Charlesworth and Willis, 2009). Pour en prévenir les effets délétères, de nombreuses espèces ont développé plusieurs mécanismes et stratégies reproductives qui visent à promouvoir la diversité génétique. Si l'homme s'est doté de lois afin d'éviter les conséquences néfastes de la consanguinité (Bittles and Neel, 1994), dont des exemples illustres existent pourtant (Alvarez *et al.*, 2009), le règne végétal a aussi adopté au cours de l'évolution plusieurs mécanismes qui permettent la sélection de partenaires reproductifs aptes à favoriser la diversité génétique des populations (Franklin-Tong, 2008).

Les angiospermes, le groupe le plus large et diversifié des plantes terrestres, présentent généralement des fleurs qui comprennent les organes sexuels mâles et femelles à proximité l'un de l'autre. Cette proximité favorise l'autopollinisation et augmente donc les risques d'*inbreeding*. Bien que plusieurs espèces, dites autogames, soient bien en mesure de se reproduire par autofécondation, de nombreuses autres se sont dotées de systèmes qui préviennent l'autofécondation. De tels systèmes vont promouvoir les croisements entre individus non-apparentés et ainsi prévenir les risques d'*inbreeding*.

Une des stratégies de prévention de l'*inbreeding* les plus utilisées par les plantes à fleurs est l'auto-incompatibilité (AI). Ce mécanisme de reconnaissance pollen/pistil vise à empêcher la fécondation par un pollen génétiquement apparenté, par la prévention de sa germination ou par l'inhibition de la croissance du tube pollinique. Dans la plupart des systèmes d'AI, ce rejet du pollen est contrôlé au niveau génétique par un unique locus qui

¹Le mot français courant « consanguinité » étant peu approprié aux plantes, le terme anglais «*inbreeding*», au sens plus large, sera utilisé dans ce texte quant ce concept s'appliquera au règne végétal.

confère aux individus diverses spécificités et prévient les croisements entre individus de spécificités identiques. Ceci a pour effet de diviser une population en plusieurs sous-groupes qui sont inter-fertiles mais dans lesquels les pollinisations entre membres d'un même groupe sont activement rejetées, favorisant ainsi la diversité génétique. Contrairement à d'autres systèmes de reconnaissance moléculaire, comme le système immunitaire animal, l'AI se distingue donc par une élimination active du « soi » plutôt qu'un rejet du « non-soi ». Cette stratégie est considérée comme un facteur majeur du succès évolutif des angiospermes (Goldberg *et al.*, 2010; Igc *et al.*, 2008; Rea and Nasrallah, 2008).

Décrits formellement et étudiés dès l'époque de Darwin (Darwin, 1876), les systèmes d'AI ont éveillé l'intérêt des scientifiques tout au long du XX^{ème} siècle. Plus récemment, les avancées en biologie moléculaire ont permis l'identification et la caractérisation de nombreux facteurs impliqués dans l'AI et ces études sont facilitées de nos jours par l'utilisation de techniques de criblages et de séquençages à haut débit. Cependant, plusieurs questions quant aux mécanismes impliqués dans l'AI restent encore sans réponse et plusieurs découvertes récentes révèlent une complexité sous-jacente aux réactions d'AI jusque là insoupçonnée.

Les applications des études sur l'AI sont nombreuses, surtout dans le domaine de l'amélioration des plantes d'intérêt économique. L'AI, qui est présente chez plusieurs espèces cultivées, peut chez ces dernières compliquer les programmes d'amélioration, par prévention de croisements désirés. Au niveau de la production fruitière, l'AI est aussi un obstacle qui nécessite la plantation d'individus donneurs de pollen ou des pollinisations manuelles. Les études sur l'AI peuvent donc aider à déterminer des cibles dans le but d'altérer les mécanismes d'AI chez ces espèces ou encore permettre des analyses de génotypage afin de faciliter les programmes de croisements. Inversement, la possibilité d'un transfert de l'AI chez certaines espèces auto-compatibles faciliterait la génération de graines hybrides, particulièrement désirables dans le domaine agricole, évitant ainsi la nécessité de manipulations coûteuses comme la castration manuelle. Les études sur l'AI permettent aussi l'acquisition de connaissances fondamentales dans de multiples domaines des sciences biologiques.

2. Les végétaux utilisent plusieurs stratégies pour prévenir l'auto-fécondation

En dehors des trois mécanismes d'AI les plus étudiés, qui seront présentés plus en détail dans les sections suivantes, une large diversité de stratégies visant à limiter les risques d'*inbreeding* a été décrite chez les plantes à fleurs (de Nettancourt, 2001).

Des modifications à la morphologie ou à la physiologie florale peuvent par exemple contribuer à limiter les risques d'*inbreeding*. Ainsi, chez les espèces présentant une herkogamie, la localisation du stigmate à une position supérieure ou inférieure à l'ouverture des anthères peut contribuer à prévenir l'autopollinisation (Webb and Lloyd, 1986). Une autre stratégie, désignée dichogamie ou hermaphrodisme successif, limite aussi les interférences entre les organes sexuels d'une même fleur en assurant la séparation temporelle de la maturation ou de la réceptivité des organes de chaque sexe (Bertin and Newman, 1993; Lloyd and Webb, 1986). Ces stratégies peuvent aussi bien être retrouvées chez des plantes auto-compatibles que des plantes auto-incompatibles (Bertin, 1993; Li *et al.*, 2013).

En effet, chez certaines espèces, comme *Primula vulgaris*, l'herkogamie est renforcée par la liaison génétique des loci associés à la morphologie florale avec les loci contrôlant un type d'AI dit « hétéromorphique » (Barrett, 2002). Chez ces espèces, chaque individu présente exclusivement un type morphologique parmi deux (distylie) ou trois (tristylie) types désignés morphes, qui diffèrent au niveau de la longueur des étamines et des styles (Darwin, 1877). Les fleurs d'un morphe particulier sont incompatibles entre elles mais compatibles avec les fleurs d'un morphe distinct (Barrett and Shore, 2008; Ganders, 1979; Santos-Gally *et al.*, 2013).

3. Les systèmes d'auto-incompatibilité

3.1. Introduction aux systèmes d'auto-incompatibilité

L'auto-incompatibilité se définit comme l'incapacité génétiquement déterminée d'une plante hermaphrodite fertile à produire des zygotes après autopollinisation (ou pollinisation par une plante génétiquement proche) (de Nettancourt, 1977). Elle se manifeste par un arrêt

sélectif de la germination du pollen ou de la croissance des tubes polliniques reconnus comme incompatibles dans la région stigmatique ou stylaire.

Les systèmes d'AI sont largement répandus dans le règne végétal, une proportion estimée à environ la moitié des genres d'angiospermes comportant des espèces auto-incompatibles (Darlington and Mather, 1949; Iqbal and Kohn, 2001). Si en raison des pressions de sélections artificielles ayant mené à leur développement les espèces agricoles sont souvent auto-compatibles, l'AI est pourtant encore présente chez plusieurs plantes d'importance économique comme le chou, le tournesol, la betterave, le seigle et de nombreux arbres fruitiers, dont de nombreuses variétés de pommiers et cerisiers.

Les systèmes d'AI sont classifiés par leurs distinctions au niveau du moment d'action, du site d'action, du nombre de loci impliqués et enfin à leur éventuelle association au polymorphisme floral (de Nettancourt, 1977). Les systèmes d'AI les plus étudiés sont généralement présents au niveau d'espèces à fleurs homomorphiques et se divisent en deux groupes majeurs : les systèmes sporophytiques et gamétophytiques.

Dans les systèmes sporophytiques, le(s) déterminant(s) pollinique(s) de l'AI est (sont) produit(s) au niveau des tissus diploïdes de la plante-mère (qui font partie du sporophyte), et du pollen lui-même (qui constitue le gamétophyte), puis déposé(s) à la surface des grains de pollen en maturation. Le site de rejet pollinique est le stigmate, généralement sec dans les espèces présentant ce type d'AI, et ce rejet se manifeste par une inhibition de l'hydratation et de la germination pollinique, par des mécanismes décrits en section suivante.

Dans les systèmes gamétophytiques, le déterminant pollinique de l'AI est produit exclusivement par le propre génome du pollen. Le site de rejet pollinique est le stigmate, généralement humide, ou le style. Deux mécanismes de rejet pollinique biochimiquement distincts sont particulièrement étudiés dans le cadre de l'AI gamétophytique et décrits aux sections 3.3 et 3.4.

Le contrôle génétique dans la plupart de ces systèmes se fait au niveau d'un unique locus désigné « *S* » (pour *self-sterility* ou auto-incompatibilité). Le locus *S* est un complexe multigénique et multiallélique qui ségrège et est transmis génétiquement comme un unique locus. Les différentes formes « alléliques » du locus *S* sont désignées « haplotypes *S* ». Chaque

haplotype code les déterminants mâles et femelles d'allèles correspondants, bien que le concept « d'allèle » puisse, dans certains cas particuliers discutés plus bas, être difficile à appliquer. Les styles d'une plante exprimant un haplotype particulier rejettent ainsi tout pollen présentant un haplotype identique. Les tubes polliniques possiblement issus de ce pollen incompatible ne peuvent atteindre l'ovaire mais ceux issus du pollen compatible, d'haplotypes différents, peuvent accomplir la fécondation. Bien que le terme « locus *S* » soit globalement utilisé dans toutes les études sur l'AI chez différents systèmes, la structure du locus *S* et la nature biochimique des déterminants de l'AI sont fondamentalement distincts entre les différents systèmes d'AI décrits à ce jour.

3.2.L'auto-incompatibilité sporophytique de type *Brassica*

Plusieurs familles d'angiospermes présentant des fleurs homomorphiques incluent des espèces présentant une auto-incompatibilité de type sporophytique, comme les familles des *Asteraceae*, *Betulaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Convolvulaceae* et *Polemoniaceae* (Hiscock and Tabah, 2003). Il n'est toutefois pas encore déterminé si toutes ces familles présentent des systèmes d'AI biochimiquement distincts ou si certaines partagent un système d'AI identique. En effet, la seule famille chez laquelle un système d'AI sporophytique a été décrit au niveau biochimique est la famille des *Brassicaceae* chez laquelle la presque totalité des données moléculaires relatives à l'auto-incompatibilité sporophytique ont été obtenues, chez des espèces comme *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica campestris* ou *Brassica rapa* (Franklin-Tong, 2008). Ce système se distingue par une inhibition de la germination du pollen sur les papilles stigmatiques par l'action de mécanismes visant à interférer avec les processus normaux d'acceptation du pollen, notamment son hydratation (Hiscock and McInnis, 2003). Cette réponse est basée sur une interaction entre un ligand pollinique et un récepteur stigmatique dont l'activation cause le rejet pollinique. Ce ligand est sécrété par le tapetum diploïde des anthères de la plante mère et par le pollen lui-même puis déposé au niveau du manteau pollinique lors de la microgamétogenèse (Bateman, 1955). La spécificité de rejet du pollen est donc non seulement conditionnée par son propre génotype, qui dérive évidemment du génotype de la plante mère, mais aussi par les possibles spécificités additionnelles portées par le génome diploïde de cette dernière (Fig. I.1).

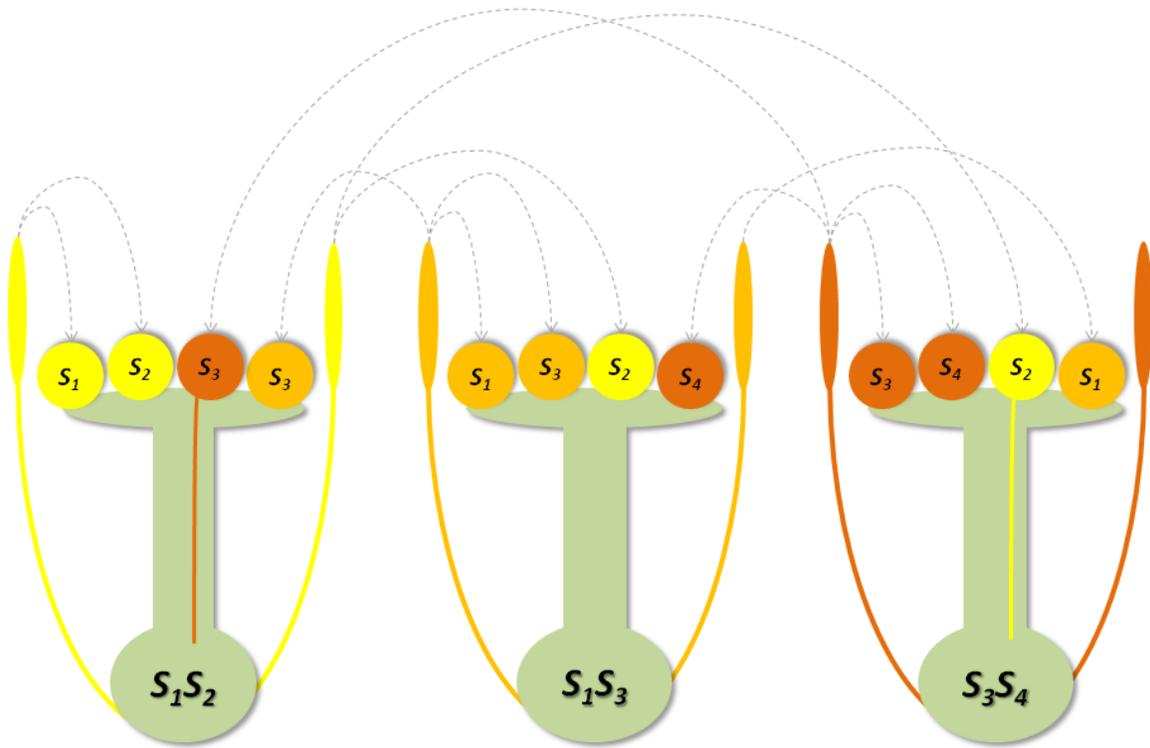


Figure I.1 : Auto-incompatibilité sporophytique.

Dans l'auto-incompatibilité sporophytique, les déterminants polliniques sont exprimés au niveau des tissus diploïdes du tapetum des anthères de la plante mère et du pollen lui-même, puis déposés à la surface du pollen. La spécificité de rejet du pollen est donc non seulement conditionnée par son propre génotype mais aussi par les possibles spécificités additionnelles portées par le génome diploïde de la plante mère. Les grains de pollen présentant au moins un déterminant pollinique d'une spécificité identique à celles portées par les styles pollinisés sont rejetés, et les croisements entre plantes comportant au moins un allèle S en commun sont donc incompatibles. Si la spécificité des déterminants polliniques est différente de celles portées par les styles, le pollen peut germer et croître normalement, comme lors des croisements entre plantes ne partageant aucun allèle S.

Une analyse des protéines du stigmate par gel bidimensionnel a initialement révélé la présence d'une glycoprotéine polymorphe (Nishio and Hinata, 1982) désignée SLG (*S*-Locus Glycoprotein). Si le rôle exact de SLG dans l'AI est encore indéterminé (Watanabe *et al.*, 2012), sa découverte a facilité l'identification du véritable déterminant stylaire de l'AI chez *Brassica*, désigné SRK (*S*-Locus Receptor Kinase). SRK est un récepteur transmembranaire stigmatique qui comporte un domaine extracellulaire similaire à SLG et un domaine kinase (Stein *et al.*, 1991). Sa similarité avec un récepteur du maïs, ZmPK1 (*Zea mays* putativereceptor Protein Kinase 1) (Walker and Zhang, 1990) a suggéré une fonction de récepteur d'un ligand pollinique dont l'activation déclencherait l'AI (Stein *et al.*, 1991). Ce rôle a été confirmé par l'observation de la perte de l'AI lors de sa suppression (Shiba *et al.*, 1995) et de l'acquisition de la capacité de rejet allèle-spécifique lors de son expression dans une plante transgénique d'haplotype différent (Takasaki *et al.*, 2000). Par utilisation d'un système qui permet de dupliquer *in vitro* les réactions d'AI chez *Brassica* (Stephenson *et al.*, 1997), il a été possible d'isoler le déterminant pollinique de ce type d'AI, qui est une petite protéine sécrétée riche en résidus cystéines désignée SCR/SP11 (*S*-locus Cysteine-Rich protein / *S*-locus Protein 11) (Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2000). L'interaction allèle-spécifique entre SCR/SP11 et un récepteur dimérique SRK (Kachroo *et al.*, 2001) déclenche une cascade de signalisation menant au rejet spécifique du pollen incompatible.

Cette cascade, dont tous les éléments ne sont pas connus, déclenche des mécanismes qui vont interférer avec les processus normaux de pollinisation au niveau de la capture (Luu *et al.*, 1997), l'hydratation (Luu *et al.*, 1999), la germination et la pénétration des papilles stigmatiques par le pollen (Zuberi and Dickinson, 1985). Plusieurs protéines pouvant interagir avec SRK modulent ces réponses. La liaison avec deux thiorédoxines THL1/2 (Thioredoxin H-Like protein 1/2) (Bower *et al.*, 1996) régule négativement SRK et limite son autophosphorylation en absence de ligand (Cabrilac *et al.*, 2001; Haffani *et al.*, 2004). MLPK (*M*-Locus Protein Kinase), une kinase membranaire cytoplasmique, est nécessaire à l'AI et est phosphorylée par SRK (Kakita *et al.*, 2007), ce qui suggère un rôle de médiation du signal en aval de SRK. Une phosphatase, KAPP (Kinase-Associated Protein Phosphatase) (Stone *et al.*, 1994), lie SRK sous sa forme phosphorylée et cause probablement un retour à l'état inactif du

récepteur (Vanoosthuysse *et al.*, 2003). Enfin, ARC1 (Armadillo Repeat-Containing protein 1), une E3-ubiquitine ligase, peut interagir avec SRK et d'autres substrats (Gu *et al.*, 1998). ARC1 est nécessaire à l'AI (Indriolo *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 1999), ce qui suggère l'implication des processus de dégradation ubiquitine-dépendants dans le rejet pollinique (Stone *et al.*, 2003). Parmi les substrats d'ARC1 se trouve un homologue de la protéine EXOC7 (Exocyst complex Component 7), désigné BnEXO70A1, une sous-unité d'un complexe multiprotéique impliqué dans la polarisation du trafic vésiculaire intracellulaire et nécessaire à la croissance du pollen compatible (Samuel *et al.*, 2009). La régulation négative de ce facteur lors de la réponse d'AI chez *Brassica* pourrait ainsi contribuer au rejet du pollen incompatible. Les autres éléments qui, en aval de cette cascade de signalisation, mènent ultimement au rejet pollinique et les mécanismes biochimiques associés restent toutefois encore peu décrits (Franklin-Tong, 2008)

3.3.L'auto-incompatibilité gamétophytique de type *Papaver*

Un des deux systèmes d'AI de type gamétophytique décrits au niveau moléculaire a été identifié chez *Papaver rhoeas* (Lawrence, 1975) et n'a à ce jour jamais été rapporté chez une autre espèce. Il n'est toutefois pas encore déterminé si ce système est spécifique aux *Papaveraceae*, auquel cas ce système n'aurait évolué qu'une seule fois, ou s'il pourrait représenter un stade ancestral de l'AI chez les eucotylédones (Franklin-Tong, 2008). Bien que les croisements chez *Papaver rhoeas* suggèrent un comportement génétique similaire à l'AI gamétophytique de type *Solanaceae*, décrite en section suivante, l'identité des facteurs et les mécanismes biochimiques impliqués dans l'AI chez *Papaver* sont différents. Comme chez *Brassica* (voir section 3.2), la réaction d'AI chez *Papaver* se déclenche en réponse à une interaction allèle-spécifique entre un ligand et un récepteur et cause une l'inhibition de la germination ou de la croissance du pollen et l'étude de ce système est facilitée par la possibilité de répliquer les réactions d'AI *in vitro* (Franklin-Tong *et al.*, 1988).

Chez *P. rhoeas*, le déterminant stylaire de l'AI, PrsS (*Papaver rhoeas* style S protein), est une protéine hydrophile d'environ 15 kDa sécrétée dans les tissus stylaires et capable d'induire les réactions d'AI sur du pollen *in vitro* (Foote *et al.*, 1994). Les caractéristiques de PrsS ont suggéré une fonction de ligand pour un récepteur pollinique (Kakeda *et al.*, 1998), et

de fait, PrpS (*Papaver rhoeas* pollen S protein), le déterminant pollinique de l'AI chez *Papaver*, est un récepteur transmembranaire de 20 kDa qui présente un degré de polymorphisme similaire à celui de PrsS et lie PrsS de manière allèle-spécifique (Wheeler *et al.*, 2009). La suppression de PrpS prévient cette interaction et rend le pollen transgénique constitutivement auto-compatible (Wheeler *et al.*, 2009).

Les interactions spécifiques PrpS/PrsS déclenchent une cascade de signalisation menant à la mort du pollen par l'activation du processus de mort cellulaire programmée (MCP) (Thomas and Franklin-Tong, 2004). L'activation de PrpS entraîne une hausse de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}) (Franklin-Tong *et al.*, 2002; Franklin-Tong *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2011) qui agit comme messager secondaire dans la cascade et déclenche plusieurs autres mécanismes. On compte parmi ces mécanismes la phosphorylation et l'inhibition de l'activité enzymatique de pyrophosphatases inorganiques, les sPPases (soluble inorganic PyroPhosphatases), ce qui limite le taux général de biosynthèse dans la cellule et contribue possiblement au rejet pollinique (de Graaf *et al.*, 2006). On observe également une altération rapide et importante du cytosquelette d'actine (Geitmann *et al.*, 2000). La structure des microfilaments étant critique à une croissance normale du pollen (Cheung *et al.*, 2008), cette désorganisation contribue au rejet pollinique (Snowman *et al.*, 2002; Staiger and Franklin-Tong, 2003). La déstabilisation de l'actine entraîne aussi une altération comparable des microtubules (Poulter *et al.*, 2008), et cette déstabilisation généralisée du cytosquelette semble liée à l'entraînement de la cellule dans les voies de la MCP (Thomas and Franklin-Tong, 2004). En effet, plusieurs critères spécifiques de la mort cellulaire programmée sont observés lors des réactions d'AI chez *Papaver*, comme la relâche du cytochrome C des mitochondries au cytosol, la fragmentation de l'ADN génomique ainsi que l'activation de plusieurs protéases similaires aux caspases (Bosch and Franklin-Tong, 2007; Thomas and Franklin-Tong, 2004). Une altération des niveaux d'espèces réactives d'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) et d'oxyde nitrique (NO : Nitric Oxyde) dans le pollen incompatible (Wilkins *et al.*, 2011) contribuent aussi probablement aux voies de signalisation qui mènent le pollen à la MCP.

3.4.L'auto-incompatibilité gamétophytique de type *Solanaceae*

3.4.1. Introduction et caractéristiques

Le second type d'AI gamétophytique décrit au niveau moléculaire, dit de type « *Solanaceae* » est étudié particulièrement chez les familles des *Solanaceae*, *Rosaceae* et *Plantaginaceae* (Franklin-Tong, 2008). Comme chez *Papaver*, ce type d'AI (Fig. I.2) repose sur un système contrôlé par un unique locus *S* multigénique et multiallélique. La nature des déterminants stylaires et polliniques, ainsi que des mécanismes biochimiques qui causent ici le rejet pollinique sont toutefois différents de ceux présents chez *Papaver*.

Dans ce type d'AI, le tissu de transmission stylaire constitue le site du rejet du pollen. Ce rejet se manifeste par le ralentissement et l'arrêt de la croissance des tubes polliniques incompatibles (Lush and Clarke, 1997). Cet arrêt est souvent associé à un élargissement ou une rupture de l'extrémité apicale des tubes polliniques, ainsi qu'à un dépôt important de callose dans leur région sub-apicale (Herrero and Dickinson, 1981; Shivanna, 1979). Le rejet pollinique est basé sur l'action cytotoxique de ribonucléases stylaires (Huang *et al.*, 1994; McClure *et al.*, 1990; McClure *et al.*, 1989) bien que d'autres mécanismes semblent aussi impliqués dans ce phénomène et que d'autres molécules soient nécessaires à l'établissement des réactions d'AI, tel que décrit plus bas.

Ce type d'AI est considéré comme ayant la plus forte distribution phylogénétique et aurait été présent chez un ancêtre commun à 75% des dicotylédones (Igic and Kohn, 2001). L'AI représente ainsi la condition ancestrale, l'auto-compatibilité présente dans les genres actuels étant donc une caractéristique dérivée. Par exemple, chez la tomate cultivée, auto-compatible, la perte par mutations du système d'AI (Kondo *et al.*, 2002a) s'est conjuguée à une autre mutation ayant causé une réduction de la distance entre le stigmate et les anthères (Chen *et al.*, 2007), favorisant ainsi l'autogamie.

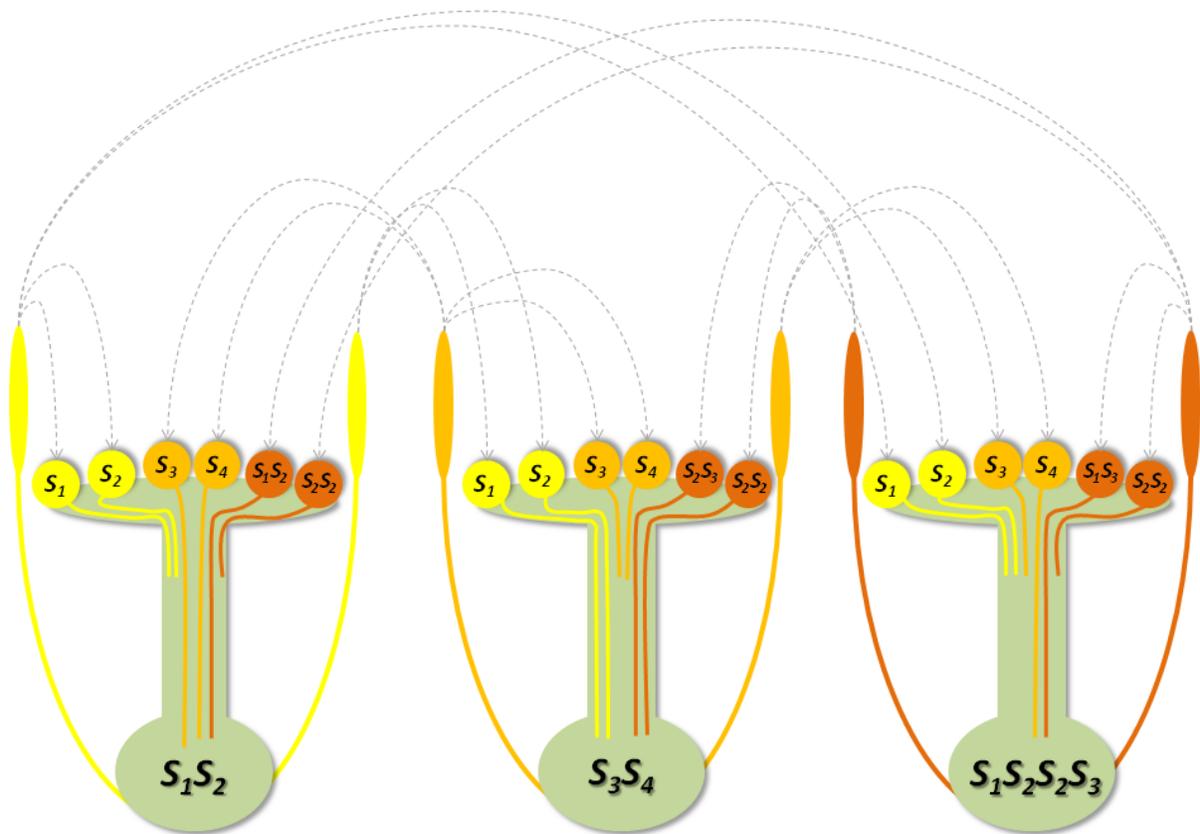


Figure I.2 : Auto-incompatibilité gamétophytique de type *Solanaceae*.

Dans l'auto-incompatibilité gamétophytique, les déterminants polliniques sont exprimés au niveau du pollen. La spécificité de rejet du pollen est donc uniquement déterminée par son génome haploïde. Les grains de pollen portant un haplotype identique à au moins un des haplotypes stylaires sont rejetés et les tubes polliniques ne peuvent parvenir à l'ovaire. La croissance du pollen portant un haplotype distinct de ceux portés par le style reste inversement normale. Un tube pollinique exprimant deux haplotypes distincts (comme le pollen diploïde produit par une plante tétraploïde) sera par contre constitutivement compatible sur tout style, indépendamment de l'haplotype stylaire, en conséquence d'un phénomène désigné « effet hétéroallélique » ou « interaction compétitive », absent chez les *Prunoideae* (voir sections 3.4.3.2 et 3.4.5).

3.4.2. Le déterminant stylaire de l'auto-incompatibilité de type

***Solanaceae* est une S-ribonucléase : la S-RNase**

3.4.2.1. Identification de la S-RNase

Tout candidat au rôle de déterminant stylaire de l'AI de type *Solanaceae* doit répondre à trois critères majeurs : la localisation au locus *S*, l'expression au niveau stylaire ainsi qu'un polymorphisme entre allèles *S* afin de pouvoir coder plusieurs spécificités. Bien que sa nature soit longtemps restée inconnue, il est désormais établi que le déterminant stylaire de l'AI de type *Solanaceae* est une ribonucléase désignée S-RNase (McClure *et al.*, 1989).

La découverte de glycoprotéines polymorphiques co-ségrégant avec les allèles *S*, et montrant donc des profils de migrations différents entre individus d'haplotypes distincts dans des gels d'électrophorèse bidimensionnelle (Bredemeyer and Blaas, 1981; Clarke *et al.*, 1985) ainsi que le séquençage N-terminal d'une de ces protéines ont permis le premier clonage d'un ADN complémentaire de *Nicotiana glauca* codant pour une glycoprotéine de 32 kDa ségrégant avec l'allèle *S*₂ (Anderson *et al.*, 1986). Des stratégies similaires ont permis l'identification de protéines semblables chez les autres familles présentant ce type d'AI (Broothaerts *et al.*, 1991; Broothaerts *et al.*, 1990; Sassa *et al.*, 1993; Sassa *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1990a; Xu *et al.*, 1990b; Xue *et al.*, 1996).

L'analyse de ces protéines et la mise en évidence de leur similarité avec les ribonucléases fongiques T2 et Rh (Kawata *et al.*, 1988; Kurihara *et al.*, 1989; McClure *et al.*, 1989; Tomoyeda *et al.*, 1969), a suggéré un mécanisme de rejet pollinique basé sur l'activité cytotoxique des ribonucléases causant la dégradation de l'ARN à l'intérieur des tubes polliniques (McClure *et al.*, 1989). Cet effet fût mis en évidence par une expérience de traitement de tubes polliniques, dont l'ARN était marqué radio-activement, par des S-RNases compatibles et incompatibles (McClure *et al.*, 1990). Ces expériences ont démontré une dégradation de l'ARN ribosomal dans les tubes polliniques incompatibles, même s'il est difficile de déterminer si cette dégradation est bien la cause et non une conséquence des réactions d'AI. Le lien entre l'activité ribonucléase et l'AI fût par la suite analysé et confirmé par plusieurs études chez différentes espèces (Broothaerts *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1994; Kowiyama *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1991) (voir section 3.4.2.4).

3.4.2.2. Caractéristiques des S-RNases

Les S-RNases (McClure *et al.*, 1989) sont des glycoprotéines secrétées dans la matrice extracellulaire (MEC) du tissu de transmission stylaire (Cornish *et al.*, 1987), où elles s'accumulent en grandes quantités jusqu'à des concentrations pouvant atteindre l'ordre du milligramme par style (Qin *et al.*, 2006). Leur concentration est maximale au niveau du tiers supérieur des styles, site principal du rejet du pollen incompatible (Ai *et al.*, 1990). L'analyse de l'expression des S-RNases montre une accumulation graduelle des niveaux d'ARN messagers (ARNm) et de protéines lors du développement floral, avec un pic d'expression à l'anthèse (Clark *et al.*, 1990; Cornish *et al.*, 1987).

Les S-RNases, généralement basiques, ont des points isoélectriques variant de 6.2 à 9.5 (Cappadocia, 2003) et une masse moléculaire variant de 20 à 40 kDa, une différence expliquée par différents niveaux de glycosylation (Parry *et al.*, 1997b). L'identité de séquences entre allèles *S* varie de 38% (Tsai *et al.*, 1992) à 95% (Saba-El-Leil *et al.*, 1994). Les S-RNases montrent plusieurs caractéristiques communes (Ioerger *et al.*, 1991) (Fig. I.3.A) incluant :

- un peptide signal, dont la taille varie entre espèces, composé en moyenne de 22 acides aminés chez les *Solanaceae* (Singh *et al.*, 1991), 26 chez les *Rosaceae* (Sassa *et al.*, 1996) et 32 chez les *Plantaginaceae* (Xue *et al.*, 1996).
- plusieurs résidus cystéines conservés, impliqués dans la formation de ponts disulfures (Ishimizu *et al.*, 1996a; Oxley and Bacic, 1996), dont plusieurs sont partagés avec les RNases fongiques.
- cinq régions conservées, désignées de C1 à C5 (Ioerger *et al.*, 1991). Les régions hydrophobes C1 et C5 sont considérées comme impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la protéine (Ioerger *et al.*, 1991). Les régions C2 et C3 sont semblables au site catalytique des RNases fongiques T2 et Rh (Kawata *et al.*, 1988) et sont responsables de l'activité ribonucléase des S-RNases (Ishimizu *et al.*, 1995; Ishimizu *et al.*, 1996a; McClure *et al.*, 1989). Deux résidus histidines conservés, un dans chacune de ces régions, sont essentiels à l'activité des S-RNases (Royo *et al.*, 1994) tel que mis en évidence

par des expériences de modifications chimiques (Parry *et al.*, 1997a) et de transgénèse (Huang *et al.*, 1994). La région C4, analysée dans ce travail (Qin *et al.*, 2005), joue peut être aussi un rôle dans la stabilisation de la protéine (voir chapitre II). Chez les S-RNases de *Rosaceae* et *Plantaginaceae*, cette région est substituée par une région désignée RC4 (*Rosaceae* C4), de composition et de taille distinctes (Ushijima *et al.*, 1998; Xue *et al.*, 1996).

- au moins un, mais jusqu'à six, sites de N-Glycosylation (Ishimizu *et al.*, 1996b; Ishimizu *et al.*, 1998b) dont le rôle a aussi été investigué dans ce travail (Soulard *et al.*, 2013). Un de ces sites, conservé en région C2, est présent, à une seule possible exception (Clark *et al.*, 1990), chez la totalité des S-RNases. Les fonctions possibles de la glycosylation des S-RNases sont discutées plus en détail à la section 3.4.2.7 ainsi qu'au chapitre III.
- deux régions désignées « hypervariables » (HV), HVa et HVb, riches en résidus hydrophiles, montrent le plus fort taux de variation entre séquences de S-RNases (Ioerger *et al.*, 1991). Ces régions déterminent certainement la spécificité allélique des S-RNases (Matton *et al.*, 1999; Matton *et al.*, 1997; Matton *et al.*, 1998) et seraient donc impliquées dans leur interaction avec pollen *S*, le déterminant pollinique de l'AI. Chez les *Rosaceae*, une seule région HV, désignée RHV (*Rosaceae* HyperVariable), est présente (Ushijima *et al.*, 1998). Le rôle des régions HV dans la détermination allélique des S-RNases est discuté en section 3.4.2.7.
- un intron, conservé chez toutes les séquences de S-RNases connues, est positionné au niveau de la région HVa chez les *Solanaceae* et *Plantaginaceae* ou de la région RHV chez les *Rosaceae*. Les séquences de S-RNases du genre *Prunus* de la famille des *Rosaceae* contiennent aussi un intron additionnel conservé au niveau du peptide signal (Igic and Kohn, 2001).

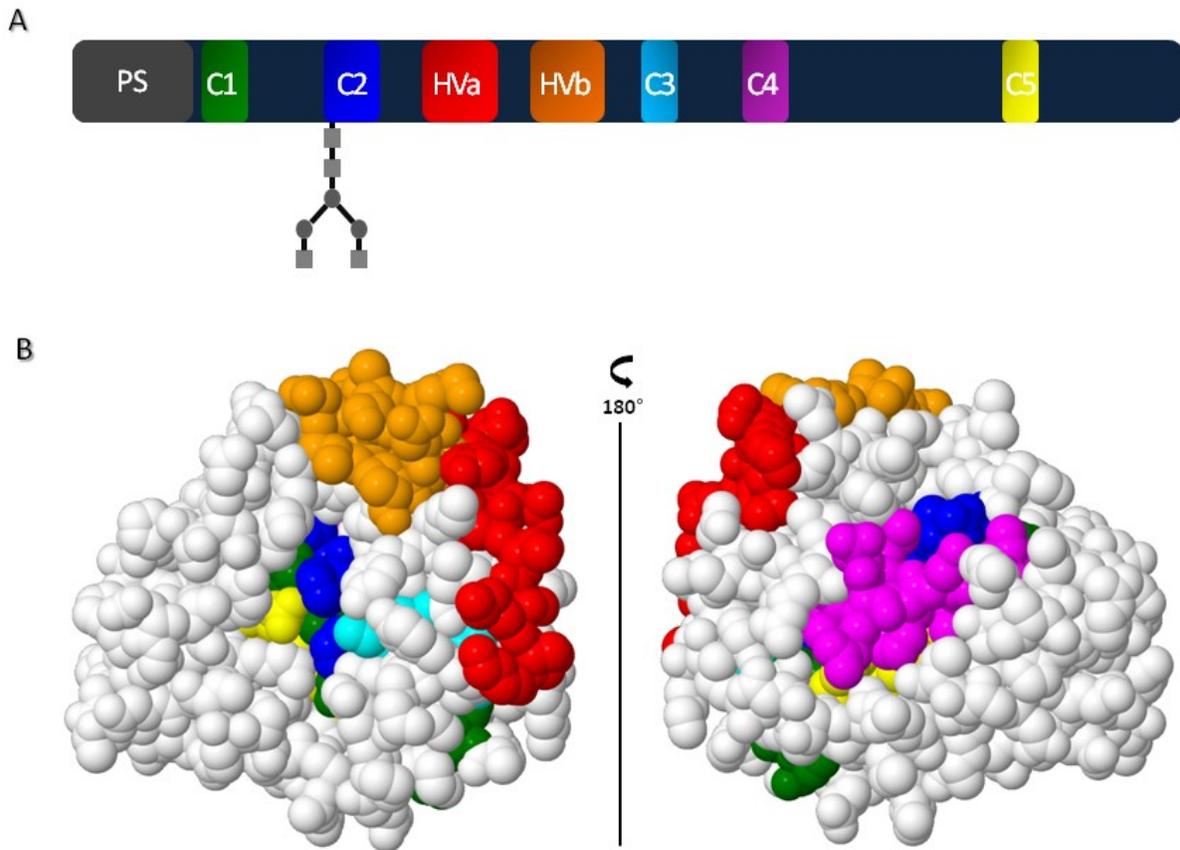


Figure I.3 : Régions caractéristiques des S-RNases et structure tridimensionnelle prédite de la S_{11} -RNase de *Solanum chacoense*.

(A) Les S-RNases des *Solanaceae* se caractérisent par la présence de 5 régions conservées (C1 à C5) et 2 régions hypervariables (HVa et HVb), ainsi que par la présence d'un peptide signal N-terminal (PS) responsable de la sécrétion des S-RNases vers la matrice extracellulaire du tissu de transmission stylaire, ainsi que d'un site de glycosylation conservé au niveau de la région C2. (B) Dans la structure tridimensionnelle prédite de la S_{11} -RNase de *Solanum chacoense*, les régions HVa, HVb et C4 sont exposées en surface de la protéine. Le site catalytique, composé des régions C2 et C3 dans lesquelles se trouvent deux résidus histidines essentiels à l'activité enzymatique, forme une fissure proche des régions C1 et C5. Cette structure a été obtenue par SWISS-MODEL, un logiciel de modélisation par homologie, tel que décrit au chapitre II.

3.4.2.3. Structure tridimensionnelle des S-RNases

Les S-RNases pour lesquelles des analyses tridimensionnelles par cristallographie ont été rapportées partagent toutes une structure tertiaire similaire à la RNase Rh (Kurihara *et al.*, 1992; Kurihara *et al.*, 1996). Si cette dernière est formée de six hélices alpha et sept feuillets beta (Kurihara *et al.*, 1992), la S_3 -RNase de *Pyrus pirifolia* (Matsuura *et al.*, 2001) et la SF_{11} -RNase de *Nicotiana alata* (Ida *et al.*, 2001a; Ida *et al.*, 2001b) en comportent respectivement sept et huit. La conservation de la position des résidus cystéines supporte aussi l'hypothèse d'une structure commune aux S-RNases (Fig. I.3.B) (Ishimizu *et al.*, 1996a).

Les régions C2 et C3 qui composent le site actif chez les S-RNases forment une fissure au cœur de la structure de la protéine (Ida *et al.*, 2001a; Matsuura *et al.*, 2001), tel qu'attendu en raison de la nature hydrophobe des résidus qui les composent. Au contraire, en raison de l'interaction allèle-spécifique attendue entre les S-RNases et le déterminant pollinique de l'AI, il est raisonnable de penser que les structures responsables de ces interactions soient exposées en surface de la protéine. De fait, les régions HVa et HVb de la SF_{11} -RNase, qui sont séparées par neuf acides aminés au niveau de la séquence primaire, sont physiquement proches au niveau de la structure tertiaire et forment une unique surface hydrophile exposée sur la protéine (Ida *et al.*, 2001a). Chez *P. pirifolia*, la région RHV est aussi exposée de manière équivalente, tout comme les autres régions possiblement impliquées dans la spécificité allélique chez cette espèce (Ishimizu *et al.*, 1998a; Matsuura *et al.*, 2001) (voir section 3.4.2.7). La région C4 semble aussi être exposée en surface de la protéine, ce qui a suggéré pour cette région un potentiel rôle non-structurel (Qin *et al.*, 2005) (voir chapitre II).

Les S-RNases étudiées à ce jour par des analyses de cristallographie ne comportent qu'un ou deux sites de glycosylation, car la présence de sucres conjugués complique les analyses de structure tridimensionnelle. Dans les cas où leur structure a été déterminée, il semble qu'elles soient éloignées à la fois du site actif et des régions HV. Pour cette raison et parce qu'elles sont exposées en surface de la protéine (Ida *et al.*, 2001b), il reste toujours possible qu'elles soient impliquées dans la liaison avec un ligand (Ishimizu *et al.*, 1999), tel que mentionné en section 3.4.2.7.

La structure du cristal généré pour l'étude de la SF₁₁-RNase indiquait la présence de deux molécules de S-RNases associées par interactions électrostatiques (Ida *et al.*, 2001b). De plus, des expériences d'interaction indiquent que les S-RNases peuvent interagir entre elles (Cruz-Garcia *et al.*, 2005). Toutefois, des analyses par centrifugation analytique indiquent que les S-RNases existent en solution sous forme de monomères (Ida *et al.*, 2001b). Il est donc probable que la formation de structures quaternaires par les S-RNases ne soit pas impliquée dans les mécanismes de l'AI.

3.4.2.4. Les S-RNases exercent une fonction cytotoxique dans les tubes polliniques incompatibles

La démonstration que les S-RNases sont nécessaires à l'établissement des réactions d'AI dans les styles fût établie par plusieurs expériences de transgénèse. Ainsi, l'expression, sous le contrôle d'un promoteur style-spécifique, de la S₃-RNase dans des lignées de *Petunia inflata* d'haplotype S₁S₂ confère aux plantes transgéniques la capacité de rejet du pollen d'haplotype S₃ (Lee *et al.*, 1994). De même, l'introduction de la SA₂-RNase de *Nicotiana glauca* dans un hybride auto-incompatible *N. glauca* x *N. langsdorffii* lui confère la capacité de rejet du pollen SA₂. (Murfett *et al.*, 1994). Inversement, la suppression de l'expression de la S₂-RNase dans une plante de *P. inflata* d'haplotype S₂S₃ par introduction de son ARN messenger en antisens cause la perte de la capacité de rejet du pollen S₂ (Lee *et al.*, 1994). La suppression de l'expression de la SA₂-RNase de *N. glauca* (Murfett *et al.*, 1995) ou la co-suppression de la S₃-RNase chez *Malus domestica* (Broothaerts *et al.*, 2004) entraînent des phénotypes équivalents. Par ailleurs, la délétion du gène de la S₄-RNase chez une lignée naturelle de *Pyrus serotina* cause son auto-compatibilité (Sassa *et al.*, 1997).

La dépendance de l'AI à l'activité catalytique des S-RNases fût aussi démontrée par une approche similaire. L'expression, dans une plante de *P. inflata* d'haplotype S₁S₂, d'une S₃-RNase modifiée par mutagenèse dirigée afin de convertir un des résidus histidine localisés au site catalytique en un résidu asparagine ne confère pas la capacité de rejet du pollen S₃, contrairement à la protéine de type sauvage (Huang *et al.*, 1994). Le transgène obtenu n'étant pas enzymatiquement actif, ce résultat implique l'activité ribonucléase des S-RNases dans le rejet du pollen. Ces résultats furent supportés par la découverte d'une lignée naturelle de

Solanum lycopersicum, auto-compatible, qui exprime une S-RNase mutée au niveau d'un des résidus histidine du site catalytique (Royo *et al.*, 1994).

Pourtant, l'activité ribonucléase n'est pas suffisante à conférer elle seule la capacité de rejet pollinique. En effet, l'expression transgénique chez *Nicotiana plumbaginifolia* d'une RNase I bactérienne n'est pas en mesure de causer le rejet du pollen (Beecher *et al.*, 1998), pas plus que certaines S-RNases altérées par mutagenèse dirigée au niveau des régions HV qui, bien que catalytiquement actives, ne peuvent causer l'AI (voir section 3.4.2.7). Deux fonctions critiques de la S-RNase, soient l'activité catalytique cytotoxique ainsi que son rôle dans la reconnaissance haplotype-spécifique, sont donc essentielles à l'AI.

Par ailleurs, l'expression de S-RNases transgéniques dans certaines lignées auto-compatibles d'espèces auto-incompatibles ne confère pas toujours la capacité de rejet spécifique du pollen. La S-RNase est donc effectivement nécessaire mais non suffisante à l'AI et d'autres facteurs sont donc requis (Beecher and McClure, 2001; McClure *et al.*, 2011; Murfett and McClure, 1998) (voir section 3.4.6). De plus, des résultats récents suggèrent que les S-RNases jouent un rôle potentiellement indépendant de leur activité enzymatique dans l'inhibition de la croissance des tubes polliniques (Roldan *et al.*, 2012; Wang and Zhang, 2011), comme discuté en section suivante.

3.4.2.5. Des fonctions indépendantes des S-RNases semblent aussi impliquées dans les réponses d'auto-incompatibilité

Les analyses par transgénèse décrites plus haut ont démontré que l'activité enzymatique des S-RNases était nécessaire, bien que non suffisante, au rejet du pollen (Beecher *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1994; Murfett and McClure, 1998). De plus, la dégradation de l'ARN pollinique dans les croisements incompatibles a aussi été démontrée, non seulement pour des ARNr marqués radioactivement *in vitro* chez *Nicotiana alata* (McClure *et al.*, 1990) mais aussi *in vivo* pour des ARNm pollen-spécifiques chez *Solanum chacoense* (Liu *et al.*, 2009). Pourtant, l'observation par microscopie électronique de tubes polliniques incompatibles en croissance dans le style chez *N. alata* n'a pas permis de mettre en évidence une diminution du nombre de ribosomes au niveau du réticulum endoplasmique (Wallis and Han, 1998). De plus, les S-RNases ne montrent pas de spécificité à un substrat particulier *in vitro* (Singh *et al.*,

1991). Ceci pourrait impliquer que les ARNr ne sont pas la cible principale des S-RNases et que leur dégradation serait une conséquence de la réaction d'AI plutôt que sa cause directe. Les S-RNases pourraient donc avoir d'autres fonctions non caractérisées dans le cadre de l'AI et un effet sur le pollen plus complexe et subtil qu'attendu.

Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus lors d'expériences de greffage chez *N. alata* dans lesquelles la partie supérieure de styles pollinisés avec du pollen incompatible fût greffée sur la partie inférieure de styles eux-mêmes compatibles avec ce pollen. Ces expériences démontrent que la croissance des tubes polliniques, bien que lente, a tout de même lieu à l'intérieur des tissus stylaires incompatibles et peut par la suite reprendre à une vitesse normale à l'intérieur de tissus stylaires compatibles (Lush and Clarke, 1997). Cette faible croissance du pollen incompatible dans les tissus stylaires pourrait indiquer que l'AI ne semble pas avoir d'effet létal généralisé. Cette hypothèse est indirectement supportée par la possibilité chez certaines espèces de contourner l'AI par l'application d'auxine au niveau de la zone de déhiscence florale, afin de retarder l'abscission. Ce traitement permet parfois l'obtention d'autofécondations lors de croisements normalement auto-incompatibles (de Nettancourt *et al.*, 1971). Ces résultats pourraient donc suggérer que les réactions d'AI ont pour fonction de limiter la croissance des tubes polliniques incompatibles afin de prévenir toute fécondation avant l'abscission florale, qui bloque définitivement tout développement de fruit. Bien que plusieurs observations suggèrent l'incapacité pour les tubes polliniques de synthétiser plusieurs protéines et ARNs *de novo* (Liu *et al.*, 2012; Mascarenhas, 1975, 1993; McClure *et al.*, 1990; Willing *et al.*, 1988), l'observation de la reprise de croissance pollinique après un passage dans une section de style incompatible semble indiquer le contraire (Lush and Clarke, 1997). L'impact effectif des S-RNases sur les tubes polliniques est donc encore peu défini.

D'autres mécanismes semblent par ailleurs capables de contribuer au rejet pollinique. De fait, des observations récentes suggèrent un rôle grandissant du cytosquelette d'actine dans les réactions d'AI. En effet, l'observation par microscopie confocale de la croissance *in vitro* de tubes polliniques de *Pyrus pyrifolia* en présence de S-RNases compatibles et incompatibles révèle une forte altération du cytosquelette d'actine dans les tubes polliniques incompatibles (Liu *et al.*, 2007), et ce phénomène est visible avant même l'arrêt de leur croissance.

L'organisation du cytosquelette d'actine est un élément critique à la croissance polaire des tubes polliniques (Cheung *et al.*, 2008) et sa déstabilisation pourrait donc contribuer à l'arrêt des tubes polliniques incompatibles (voir aussi chapitre IV). De plus, cette déstabilisation semble précéder la libération des S-RNases du compartiment vacuolaire dans lequel elles semblent initialement séquestrées (Goldraj *et al.*, 2006; Roldan *et al.*, 2012), tel que développé en section suivante et en section 3.4.7. Ceci suggère l'implication de mécanismes indépendants de leur activité enzymatique dans l'AI, les S-RNases étant alors évidemment isolées de leur substrat prédit.

Enfin, plusieurs résultats récents mettent en évidence une implication possible de mécanismes caractéristiques de la mort cellulaire programmée dans le rejet pollinique (Wang and Zhang, 2011). En présence de S-RNases incompatibles, il est possible d'observer au niveau de tubes polliniques de *P. pirifolia* la libération du cytochrome C des mitochondries vers le cytosol et la dégradation de leur ADN génomique (Wang *et al.*, 2009) ainsi qu'une altération des niveaux et de la distribution des ROS (Wang *et al.*, 2010). Ces observations soulèvent l'hypothèse de l'implication du processus de MCP dans l'AI (Wang and Zhang, 2011) même si les mécanismes par lesquels les S-RNases induisent ces processus ne sont pas encore caractérisés.

3.4.2.6. Localisation et transport des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques

Pour être en mesure d'exercer une éventuelle fonction cytotoxique, les S-RNases doivent nécessairement pénétrer dans le cytoplasme des tubes polliniques, où est localisé l'ARN. La pénétration des S-RNases dans les tubes polliniques se fait de manière non-S-spécifique, tel que démontré chez *Solanum chacoense* où il est possible de détecter, par immunolocalisation sur des coupes microscopiques de styles pollinisés, la S_{11} -RNase à l'intérieur du cytoplasme de tous les tubes polliniques en croissance, indépendamment de leur haplotype (Luu *et al.*, 2000).

Bien que ces expériences suggèrent une accumulation des S-RNases au niveau cytoplasmique (Luu *et al.*, 2000), d'autres observations par microscopie confocale chez *Nicotiana glauca* indiquent une localisation plus restreinte des S-RNases à l'intérieur des tubes

polliniques (Goldraij *et al.*, 2006). Ces observations mettent en effet en évidence une séquestration initiale des S-RNases au niveau d'un compartiment, possiblement vacuolaire, lors de leur pénétration dans les tubes polliniques (Goldraij *et al.*, 2006). Ces S-RNases restent séquestrées dans les croisements compatibles, alors que dans les croisements incompatibles le contenu vacuolaire est subséquemment libéré. Cette association initiale des S-RNases avec le système endomembranaire des tubes polliniques est à la base d'un modèle récent d'AI basé sur l'isolement spatial de la S-RNase et de son substrat (Goldraij *et al.*, 2006; McClure, 2006, 2008; McClure *et al.*, 2011; McClure and Franklin-Tong, 2006), développé en section 3.4.7.

Curieusement, l'expression ectopique des S-RNases au niveau du pollen chez *Solanum lycopersicum* n'altère pas le phénotype de rejet ou la viabilité de ce dernier (Dodds *et al.*, 1993; Dodds *et al.*, 1999), possiblement en raison de la séquestration de ces S-RNases dans un compartiment vacuolaire, tel qu'observé chez *Petunia inflata* (Meng *et al.*, 2009). Toutefois, notamment en raison de l'absence d'effet de ces S-RNases lors des croisements, il est peu probable que ce compartiment soit le même que celui observé chez *Nicotiana* (Goldraij *et al.*, 2006). La séquestration de ces S-RNases ectopiques pourrait donc plutôt être la conséquence d'un mécanisme de détoxification cellulaire à l'intérieur du pollen (Meng *et al.*, 2009).

Le mécanisme biochimique par lequel les S-RNases accèdent à l'intérieur du pollen reste encore indéterminé. Il est improbable que les S-RNases accèdent aux tubes polliniques par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique car elles pénètrent à l'intérieur des tubes polliniques de manière non-S-spécifique (Luu *et al.*, 2000) et aucun mutant auto-compatible déficient à ce niveau n'a été rapporté à ce jour (Qin *et al.*, 2005). La mise en évidence de l'association des S-RNases avec le système endomembranaire des tubes polliniques (Goldraij *et al.*, 2006) a souligné l'importance de l'étude des aspects dynamiques de la localisation subcellulaire des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques et permis de suggérer plusieurs mécanismes d'entrée, dont le plus probable est l'endocytose (Chen *et al.*, 2010). Un parallèle a d'ailleurs été suggéré avec la ricine, une cytotoxine qui gagne accès à la cellule par endocytose. Une large proportion de la ricine transportée est ciblée vers un compartiment vacuolaire mais une petite quantité est capable, par transport rétrograde, d'avoir accès au cytosol (Goldraij *et al.*, 2006; Wesche, 2002). Il est toutefois encore indéterminé si les S-RNases adoptent un mode d'action similaire. Il a aussi en parallèle été suggéré que les S-

RNases soient incorporées aux tubes polliniques par transport conjoint avec d'autres protéines avec lesquelles elles peuvent entrer en interaction (Cruz-Garcia *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009) mais aucun résultat supportant cette hypothèse n'a été rapporté à ce jour.

3.4.2.7. Les éléments structuraux déterminant la spécificité allélique des S-RNases

Les réactions d'AI sont basées sur un mécanisme de reconnaissance entre déterminants stylaires et polliniques de l'AI. Cette reconnaissance doit impliquer une interaction allèle-spécifique afin de déterminer le phénotype de rejet du pollen. L'étude des S-RNases a mis en évidence deux facteurs possiblement responsables de leur détermination allélique, soient les régions HV ou les chaînes de sucres conjuguées issues de la N-glycosylation des S-RNases (Ioerger *et al.*, 1991).

Afin de vérifier si les régions hypervariables déterminent la spécificité allélique des S-RNases, plusieurs expériences basées sur l'échange par mutagenèse dirigée des régions HV entre allèles ont été rapportées. Cependant, lorsqu'on exprime, chez *Petunia inflata*, une S_3 -RNase portant les régions HVa et HVb (ou HVb seulement) de la S_1 -RNase, le transgène obtenu ne confère ni la capacité de rejeter le pollen S_3 , ni la capacité de rejeter le pollen S_1 (Kao and McCubbin, 1996). Des expériences similaires chez *Nicotiana glauca*, basées sur neuf constructions chimériques entre les SA_2 - et SC_{10} -RNases, ont donné des résultats similaires, aucune S-RNase chimérique ne conférant de capacité de rejet (Zurek *et al.*, 1997). Ces résultats ont mené à la conclusion que la spécificité allélique est codée de manière dispersée sur la séquence primaire des S-RNases et non au niveau des régions HV. Chez *Solanum chacoense*, par contre, lorsque les régions HVa et HVb de la S_{11} -RNase ont été remplacées par les régions correspondantes de la S_{13} -RNase, le transgène obtenu a conféré la capacité de rejet du pollen S_{13} mais pas du pollen S_{11} (Matton *et al.*, 1997; Matton *et al.*, 1998). Ceci a constitué la première démonstration *in vivo* de changement de spécificité et, contrairement aux résultats précédents, a suggéré que les régions HV sont à la fois nécessaires et suffisantes pour déterminer la spécificité allélique des S-RNases. Il est à noter, toutefois, que la divergence de séquence entre les S_1 - et S_3 -RNases de *P. inflata* est beaucoup plus importante qu'entre les S_{11} - et S_{13} -RNases de *S. chacoense*, ces dernières étant similaires à 95% et ne différencient que par

quatre acides aminés au niveau de leurs régions HV, trois dans la région HVa et un dans la région HVb (Saba-El-Leil *et al.*, 1994). Il est donc possible que d'autres régions, similaires ou identiques chez les S_{11} - et S_{13} -RNases de *S. chacoense*, soient effectivement impliquées dans la spécificité allélique. La forte similarité entre les S_6 - et S_9 -RNases chez *P. inflata*, notamment au niveau des régions HV, supporte une telle hypothèse (Wang *et al.*, 2001). Dans cette logique, les transferts des régions HV au complet chez *Petunia* et *Nicotiana* génèrent des S-RNases chimériques dont la fonctionnalité dans l'AI est altérée, justement en raison des larges divergences au niveau de ces autres régions entre les différents allèles.

De manière plus surprenante, la génération chez *S. chacoense* d'une S-RNase avec une région HV où seulement trois des quatre acides aminés qui diffèrent entre la S_{13} -RNase et la S_{11} -RNase ont été changés, produit une S-RNase à double spécificité (Matton *et al.*, 1999) capable de rejeter non seulement les pollens haploïdes d'haplotypes S_{11} ou S_{13} mais aussi le pollen diploïde hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ (Luu *et al.*, 2001), normalement constitutivement compatible (Fig. I.4) (voir section 3.4.3.2). Ces résultats supportent donc également l'implication des régions HV dans la détermination de la spécificité allélique des S-RNases.

Les S-RNases de *Rosaceae* ne comportent qu'une seule région HV, désignée RHV (Ushijima *et al.*, 1998). Si RHV est probablement responsable de la détermination de la spécificité allélique, d'autres régions semblent aussi impliquées. En effet, deux allèles génétiquement distincts mais ayant une région RHV identique ont été identifiés chez *Pyrus communis* (Zisovich *et al.*, 2004) et *Prunus avium* (Wunsch and Hormaza, 2004). Afin d'identifier les autres régions impliquées dans leur spécificité allélique, des analyses ont été réalisées sur des alignements de séquences de S-RNases de *Rosaceae* pour trouver des sites où le nombre de substitutions non-synonymes excède le nombre de substitutions synonymes. Ces analyses ont mis en évidence quatre régions sous une telle sélection positive, désignées PS1, PS2, PS3 et PS4 (Ishimizu *et al.*, 1998a). La région PS1 inclut RHV et montre le taux de substitution le plus élevé parmi les régions PS, qui sont toutes exposées en surface de la protéine (Matsuura *et al.*, 2001) et déterminent possiblement la spécificité allélique de manière conjointe (Ishimizu *et al.*, 1998a; Ishimizu *et al.*, 1998b). Des analyses similaires ont permis de mettre en évidence la présence de régions sous sélection positive sur les S-RNases de

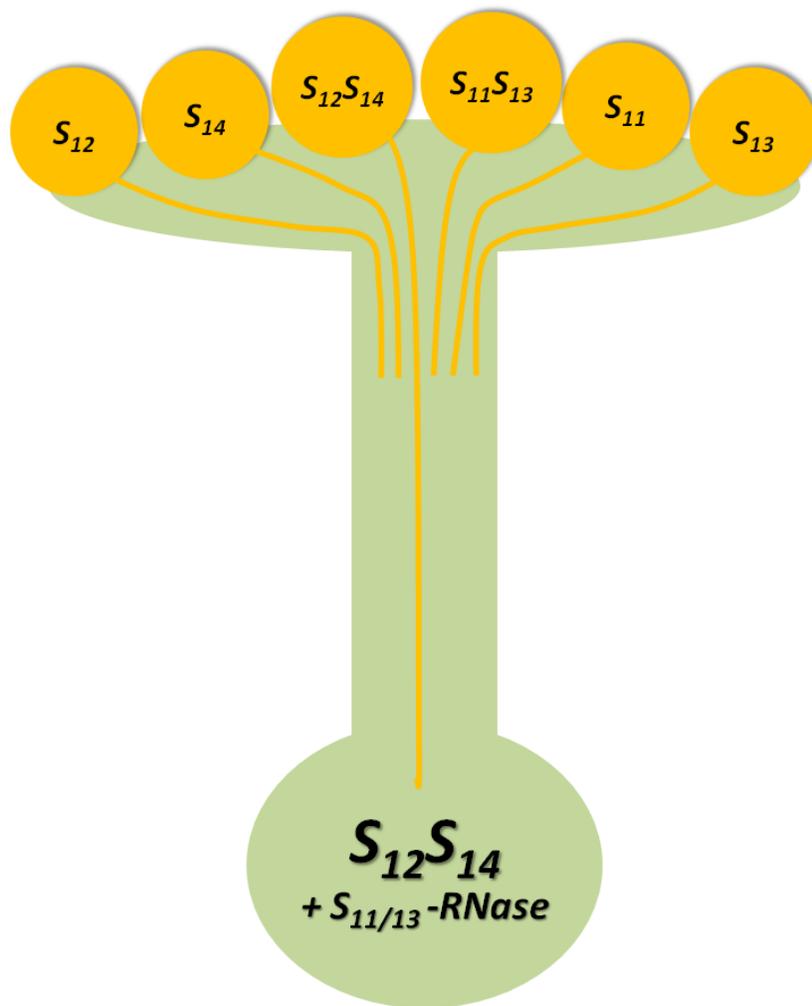


Figure I.4 : Rejet du pollen diploïde hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ par une S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} chez *Solanum chacoense*.

Une S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} exprimée dans une plante d'haplotype $S_{12}S_{14}$ est capable de rejeter le pollen haploïde S_{11} ou S_{13} ainsi que le pollen diploïde hétéroallélique $S_{11}S_{13}$, normalement constitutivement compatible. La fonction stytaire et la fertilité ovarienne ne sont pas affectées par l'expression de cette S-RNase, le pollen diploïde hétéroallélique $S_{12}S_{14}$ étant bien capable de croître, féconder les ovules et entraîner la formation de fruits.

Solanaceae (Ortega *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007) mais le rôle de ces sites n'a pas encore été testé expérimentalement. Il est donc, en conclusion, généralement accepté que les régions HV soient les principales régions responsables de la détermination allélique des S-RNases, bien que d'autres régions et résidus puissent possiblement participer à cette spécificité. Deux allèles phénotypiquement distincts pouvant être extrêmement similaires (Saba-El-Leil *et al.*, 1994), il est ainsi possible que relativement peu de résidus additionnels soient impliqués dans la détermination de la spécificité allélique des deux allèles de S-RNases comportant une région RHV identique chez *P. communis* (Zisovich *et al.*, 2004).

En raison du rôle important de la glycosylation dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire chez les animaux (Gu *et al.*, 2012; Moremen *et al.*, 2012; Ohtsubo and Marth, 2006; Yoshida, 2007), il a été suggéré que la spécificité allélique des S-RNases pouvait aussi être codée au niveau de leurs chaînes de sucres (Woodward *et al.*, 1992). En effet, toutes les S-RNases séquencées à ce jour contiennent au moins un site conservé de N-glycosylation au niveau de la région C2 (Singh and Kao, 1992). Les S-RNases de *S. chacoense* étudiées contiennent au moins un, et jusqu'à quatre sites de N-glycosylation (Liu *et al.*, 2008). Les S-RNases de *N. alata* contiennent au moins un et jusqu'à cinq sites de N-glycosylation (Oxley and Bacic, 1995; Oxley *et al.*, 1996, 1998), bien que certains de ces sites puissent dans certains cas ne pas être occupés *in vivo*.

Le rôle de la glycosylation chez les S-RNases a été testé initialement par la génération d'une S_3 -RNase de *P. inflata* dont l'unique site de N-glycosylation a été supprimé par mutagenèse dirigée. L'introduction de ce transgène dans une plante d'haplotype S_1S_2 lui confère la capacité de rejet du pollen S_3 de manière similaire à un transgène S_3 -RNase de type sauvage (Karunanandaa *et al.*, 1994). La déglycosylation des S-RNases n'affectant pas non plus leur activité spécifique (Broothaerts *et al.*, 1991), ces résultats furent interprétés comme invalidant l'hypothèse de l'implication de la glycosylation dans les réactions d'AI. Il a toutefois été suggéré quelques années plus tard (Oxley *et al.*, 1996) que l'absence de glycosylation dans ce mutant aurait potentiellement généré une S-RNase capable de rejeter tout pollen de manière constitutive. Selon cette hypothèse, les sucres présents en surface des S-RNases suite à leur glycosylation constitueraient un site de reconnaissance pour pollen S sous la forme d'un inhibiteur, et par conséquent l'absence de glycosylation préviendrait toute

interaction avec ce dernier, permettant à une telle S-RNase un rejet constitutif de tout pollen. Or, si l'étude initiale (Karunanandaa *et al.*, 1994) démontrait la capacité d'une protéine S_3 -RNase transgénique dépourvue de site de glycosylation à rejeter le pollen S_3 , la possibilité pour cette dernière d'accepter un pollen d'haplotype distinct n'avait pas été rapportée et n'avait pas été testée jusqu'à maintenant. Cette hypothèse a donc été testée et invalidée au cours de ce travail (Soulard *et al.*, 2013), qui montre que la glycosylation ne semble en effet pas contribuer directement au rejet du pollen par les S-RNases (voir chapitre III).

Toute absence de fonction pour la glycosylation dans l'AI serait toutefois surprenante car, comme mentionné, toutes les séquences de S-RNases contiennent un site de glycosylation conservé (Oxley *et al.*, 1998) alors que des protéines similaires, les S-like RNases, non-impliquées dans l'AI, en sont dépourvues (Bariola and Green, 1997; Green, 1994) (voir section suivante). La conservation évolutive d'une structure non fonctionnelle est inattendue et la mise en évidence de sites de glycosylation au niveau des sites déterminant la spécificité allélique chez sept S-RNases de *P. pirifolia* pourrait ainsi suggérer un rôle des chaînes de sucres dans cette espèce, possiblement impliquées dans des interactions avec un ligand (Ishimizu *et al.*, 1999).

Le comportement des S-RNases dans un essai de dégradation *in vitro* suggère par ailleurs un rôle de la N-glycosylation dans la stabilité des S-RNases (Hua and Kao, 2006). Lors d'un test de dégradation des S-RNases de *P. inflata* par l'action d'extraits de tubes polliniques (voir section 3.4.3.7), il a été observé que les S-RNases natives glycosylées n'étaient pas dégradées, contrairement aux S-RNases préalablement dé-glycosylées enzymatiquement (Hua and Kao, 2006). La glycosylation pourrait ainsi contribuer à la stabilité des S-RNases dans le pollen en retardant leur dégradation. Toutefois, il semble que la déglycosylation ne fasse pas partie intégrante des mécanismes d'AI (Soulard *et al.*, 2013) (voir chapitre III), ce qui semble paradoxal considérant que la dé-glycosylation des S-RNases semble requise à leur dégradation par l'action d'extraits de tubes polliniques (Hua and Kao, 2006). Les modalités des mécanismes qui mènent à la dégradation des S-RNases restent donc encore à éclaircir. Par ailleurs, si le degré de glycosylation des S-RNases est corrélé avec la stabilité des S-RNases, on s'attendrait à ce que les quantités minimales ou « seuil » de S-RNases requises au rejet du pollen pour des allèles de S-RNases non- ou faiblement

glycosylées soient supérieures aux quantités requises pour des S-RNases comportant de multiples sites de glycosylation, ces dernières étant alors théoriquement plus stables à l'intérieur du pollen. Or, l'évaluation *in vivo* des quantités « seuils » pour des allèles de S-RNases chez *S. chacoense* suggère au contraire une corrélation négative entre ces valeurs et le degré de glycosylation des S-RNases (Liu *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2006) (voir aussi chapitre IV). Le rôle de la glycosylation des S-RNases dans l'AI reste donc encore indéterminé (Meng *et al.*, 2011b).

3.4.2.8. Des ribonucléases similaires aux S-RNases ne sont pas ou plus impliquées dans l'auto-incompatibilité

L'analyse phylogénétique des S-RNases de *Solanaceae* (Ioerger *et al.*, 1991), *Rosaceae* (Sassa *et al.*, 1996) et *Plantaginaceae* (Xue *et al.*, 1996) démontre que certaines séquences de S-RNases sont plus proches au niveau interspécifique qu'intraspécifique. Ceci suggère que ces allèles de S-RNases sont anciens et que leur polymorphisme précède la spéciation. L'AI représenterait donc la condition ancestrale dans ces familles (Igic and Kohn, 2001; Ioerger *et al.*, 1991). Il est ainsi possible que les S-RNases soient dérivées d'une ribonucléase styleaire préexistante, recrutée ensuite dans l'AI (Read *et al.*, 1995).

Cette hypothèse est supportée par l'existence de plusieurs *S-like* RNases, des protéines similaires aux S-RNases mais non codées par le locus *S* et dépourvues de fonction dans l'AI. Ces protéines ont été retrouvées dans de nombreux organismes comme *Solanum lycopersicum* (Jost *et al.*, 1991; Löffler *et al.*, 1992; Löffler *et al.*, 1993), *Nicotiana glauca* (Dodds *et al.*, 1996a), *Arabidopsis thaliana* (Taylor *et al.*, 1993), *Prunus dulcis* (Van Nerum *et al.*, 2000), *Momordica charantia* (Ide *et al.*, 1991), *Nicotiana glutinosa* (Kurata *et al.*, 2002) et *Pyrus pirifolia* (Norioka *et al.*, 1996; Norioka *et al.*, 2007). Elles semblent être impliquées dans de nombreux processus comme la réponse aux carences en phosphate (Kock *et al.*, 2006), la sénescence (Van Nerum *et al.*, 2000), la pathogénèse (Galiana *et al.*, 1997; Hillwig *et al.*, 2010; Hugot *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1992) ou encore le développement (Kothke and Kock, 2011; Ye and Droste, 1996). Bien que ces protéines montrent plusieurs similarités avec les S-RNases, elles forment un clade séparé dans les analyses phylogénétiques (Golz *et al.*, 1998). D'autres caractéristiques distinguent aussi ces protéines, comme leur nature généralement

acide (Yamane *et al.*, 2003b), une variabilité au niveau du nombre et des séquences d'introns (Kothke and Kock, 2011) ou encore l'absence dans leurs séquences de sites de glycosylation (Norioka *et al.*, 2007).

Une autre catégorie de protéines similaires aux S-RNases, désignées « reliques », sont plus proche des S-RNases que des *S*-like-RNases mais ne sont pas ou plus impliquées dans l'AI (Golz *et al.*, 1998). Les S-RNases reliques forment, avec les S-RNases, un clade unique séparé des *S*-like-RNases (Golz *et al.*, 1998), suggérant qu'elles dérivent des S-RNases plutôt que d'un ancêtre commun (Liang *et al.*, 2002). Ainsi, chez un cultivar auto-compatible de *Petunia hybrida*, une S-RNase enzymatiquement active désignée S_0 présente toutes les caractéristiques associées aux S-RNases mais ne cause pas le rejet du pollen (Ai *et al.*, 1992). Chez *Petunia inflata*, une RNase désignée X2, non impliquée dans l'AI, présente aussi toutes les caractéristiques attendues d'une S-RNase hormis une association au locus *S* (Lee *et al.*, 1992). Une analyse comparative des niveaux d'activité ribonucléase présents au niveau des styles chez plusieurs espèces de *Nicotiana* a aussi permis de montrer la présence chez une lignée de *Nicotiana sylvestris*, espèce auto-compatible, d'une S-RNase relique présentant des niveaux d'activité similaires à ceux présents dans les espèces auto-incompatibles mais ne causant pas le rejet pollinique (Golz *et al.*, 1998). Curieusement, cette S-RNase relique porte un site de glycosylation au niveau de la région HVa. Il a donc été suggéré que la présence de glycosylation dans cette région pourrait causer l'auto-compatibilité en altérant les interactions possibles avec d'autres composants impliqués dans l'AI (Golz *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été testée dans ce travail (Soulard *et al.*, 2013) (voir chapitre III).

3.4.3. Le déterminant pollinique de l'auto-incompatibilité de type *Solanaceae* est une protéine F-box

3.4.3.1. À la recherche de pollen *S*

Suite à la caractérisation des S-RNases, les recherches se sont orientées vers l'identification du déterminant pollinique de l'AI, désigné pollen *S*. Tout candidat à la fonction pollen *S* doit respecter trois critères majeurs soit la localisation au locus *S*, une expression pollinique ainsi qu'un polymorphisme entre allèles *S* afin de coder diverses spécificités

alléliques. En toute logique, on s'attendait par ailleurs à des niveaux de variabilité entre allèles pollen *S* semblables à ceux observés entre allèles de S-RNases (Kao and McCubbin, 1996).

Initialement, la S-RNase elle-même a été envisagée comme responsable des deux fonctions polliniques et stylaires de l'AI, principalement en raison de l'observation de son expression dans le pollen, bien qu'en quantités limitées (Clark and Sims, 1994; Dodds *et al.*, 1993). Toutefois, l'expression ectopique des S-RNases au niveau du pollen n'altère pas la spécificité de ce dernier chez *Solanum lycopersicum* (Dodds *et al.*, 1999) ou *Solanum tuberosum* (Kirch *et al.*, 1995), pas plus que la suppression de leur expression chez *Petunia inflata* (Lee *et al.*, 1994), ou *Pyrus serotina* (Sassa *et al.*, 1997). Les S-RNases ne sont donc pas impliquées dans la détermination de la spécificité pollinique.

La nature de pollen *S*, longtemps restée inconnue, fut enfin élucidée suite au séquençage du locus *S* chez plusieurs espèces, ce qui permit l'identification de plusieurs candidats pollen *S* (voir section 3.4.3.4). Leur fonction fût ensuite testée et validée par l'exploitation du phénomène de compatibilité du pollen hétéroallélique, caractéristique de l'AI chez les *Solanaceae* et certaines *Rosaceae* (voir section suivante). Ces études ont établi que les protéines qui constituent pollen *S* sont des protéines de type F-Box (Craig and Tyers, 1999) qui, comme telles, seraient impliquées dans la dégradation allèle-spécifique et ubiquitine-dépendante des S-RNases (voir section 3.4.3.5), bien qu'une démonstration directe de cette hypothèse reste à établir (McClure *et al.*, 2011)(voir aussi section 3.4.7).

3.4.3.2. Le pollen S-hétéroallélique cause une perte de l'AI

Chez les *Solanaceae* et plusieurs *Rosaceae*, la polyplœdie provoque la perte de l'AI (Crane and Thomas, 1939; Stout and Chandler, 1941). La fonction stytaire n'est pas affectée par la polyplœidisation (Golz *et al.*, 2000; Golz *et al.*, 1999), des tissus stylaires tétraploïdes $S_1S_1S_2S_2$ rejetant le pollen de manière identique à des tissus stylaires diploïdes d'haplotype S_1S_2 . La perte d'AI dérive donc de l'expression, dans un pollen non-haploïde, de deux copies distinctes du locus *S* (Breuer, 1961; Chawla *et al.*, 1997; de Nettancourt, 1977; Entani *et al.*, 1999). Par exemple, une plante diploïde d'haplotype S_1S_2 génère du pollen haploïde d'haplotype S_1 ou S_2 et ce pollen est auto-incompatible. Par contre, une plante tétraploïde d'haplotype $S_1S_1S_2S_2$ génère du pollen diploïde de trois haplotypes distincts, S_1S_1 ou S_2S_2 ou

S_1S_2 . Le pollen homoallélique S_1S_1 ou S_2S_2 est auto-incompatible mais le pollen hétéroallélique S_1S_2 devient quant à lui constitutivement auto-compatible sur tout style, indépendamment de l'haplotype de ce dernier. La polyplœidie n'affectant pas la fonction des S-RNases, c'est donc l'expression, au niveau d'un même tube pollinique, de deux copies distinctes de pollen S qui cause sa compatibilité constitutive (Fig. I.2).

Ce phénomène d'auto-compatibilité du pollen hétéroallélique, aussi appelé interaction compétitive, est donc un outil qui peut être exploité pour valider l'identité de pollen S , car un vrai pollen S causera une perte d'AI lorsque introduit par transgénèse et exprimé au niveau d'un pollen d'haplotype distinct. Ce phénomène a permis de confirmer pour la première fois l'identité de pollen S chez *Petunia inflata* (Sijacic *et al.*, 2004) (voir section 3.4.3.4). Chez les membres de la sous-famille *Prunoideae* des *Rosaceae*, le pollen hétéroallélique reste par contre auto-incompatible (Tao and Iezzoni, 2010). Ceci suggère dans ce groupe des divergences de fonction pour pollen S , dont l'identification formelle devra donc être accomplie par une stratégie différente (voir section 3.4.5).

3.4.3.3. Les anciens modèles d'auto-incompatibilité attribuaient à pollen S des fonctions différentes

Avant la caractérisation de pollen S (Sijacic *et al.*, 2004), plusieurs hypothèses avaient été proposées quant aux mécanismes responsables du rejet du pollen incompatible. Il a ainsi été suggéré que la spécificité des réponses d'AI pouvait être basée sur une pénétration différentielle des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques (modèle du récepteur), ou bien sur la modulation spécifique de leur activité à l'intérieur des tubes polliniques (modèle de l'inhibiteur). Ces modèles prédisaient donc des fonctions différentes pour pollen S .

Le modèle du récepteur (Fig. I.5) postulait que pollen S , sous la forme d'un récepteur ou transporteur transmembranaire, reconnaissait et assurait une pénétration exclusive des S-RNases de même haplotype dans les tubes polliniques (de Nettancourt, 1977). Un tel mécanisme fournit une explication simple à la spécificité de la réponse d'AI, mais ne peut expliquer la compatibilité du pollen hétéroallélique. En effet, la présence de deux transporteurs de S-RNases distincts devrait favoriser l'AI et non entraîner l'auto-compatibilité comme

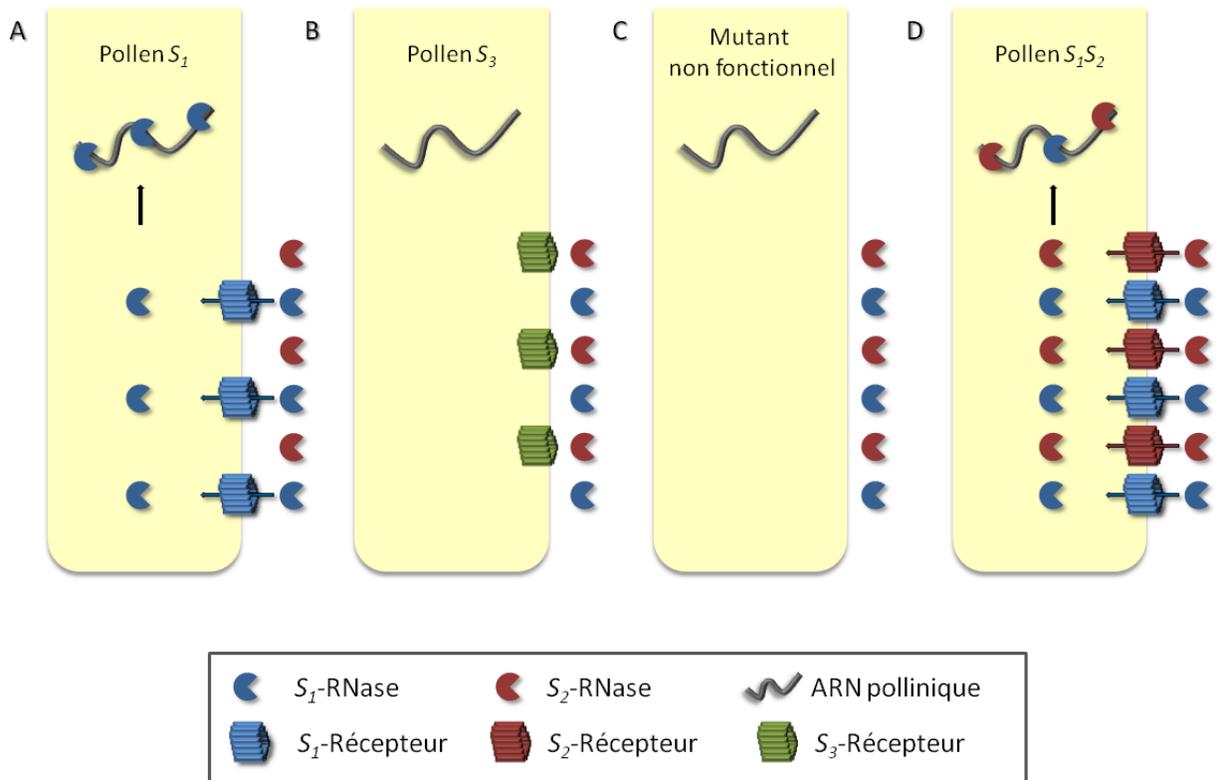


Figure I.5 : Modèle du récepteur.

Dans le modèle du récepteur, pollen S est un récepteur ou transporteur transmembranaire qui reconnaît et assure la pénétration exclusive des S-RNases de même haplotype dans les tubes polliniques. Lors d'un croisement incompatible (A), pollen S assure la pénétration exclusive des S-RNases d'haplotype correspondant à l'intérieur des tubes polliniques où leur activité cytotoxique cause le rejet pollinique. Dans un croisement compatible (B), les S-RNases stylaires ne sont pas en mesure de pénétrer les tubes polliniques en absence de transporteur spécifique. Une mutation causant la perte de fonction pollen S (C) entraînerait donc une compatibilité constitutive tandis que le pollen hétéroallélique (D) devrait, contrairement à ce qui est observé, rester auto-incompatible.

observé (voir section précédente). Une modification de ce modèle a donc suggéré que pollen *S* était actif sous forme d'homopolymères, la formation d'hétéropolymères inactifs dans le pollen hétéroallélique causant sa compatibilité en prévenant la pénétration de toute S-RNase (Golz *et al.*, 2000). Dans un tel modèle, la perte de fonction pollen *S* entrainerait la compatibilité, car aucune S-RNase ne pourrait alors pénétrer dans les tubes polliniques, en absence de transporteur fonctionnel. Peu de résultats expérimentaux ont supporté ce modèle (McCubbin *et al.*, 1997), qui a été définitivement invalidé par la démonstration que la pénétration des S-RNases dans les tubes polliniques se fait de manière haplotype-indépendante (Luu *et al.*, 2000) (voir section 3.4.2.6).

Le modèle de l'inhibiteur (Fig. I.6) postulait quant à lui une entrée de toutes les S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques, la spécificité de la réponse d'AI étant basée sur une inhibition allèle-spécifique de leur activité (de Nettancourt, 1977). Dans ce modèle, pollen *S* joue le rôle d'une molécule qui inhibe l'activité de toutes les S-RNases, hormis celle d'haplotype identique au sien, qui peut alors exercer son effet cytotoxique lors d'un croisement auto-incompatible. Ce modèle peut expliquer la compatibilité du pollen hétéroallélique, la présence de deux inhibiteurs distincts dans un même tube pollinique causant l'inhibition de toute S-RNase. La perte de fonction pollen *S*, dans ce modèle, causerait au contraire une incompatibilité constitutive du pollen, ce dernier n'étant plus en mesure d'inhiber aucune S-RNase. Cependant, les caractéristiques de liaison entre pollen *S* et les S-RNases sont contre-intuitives dans ce modèle, car il implique que les interactions entre pollen *S* et la S-RNase de même haplotype soient défavorisées par rapport aux interactions avec toute autre S-RNase. Pour pallier à ces difficultés, plusieurs modifications ont donc été apportées au modèle de l'inhibiteur. Ainsi, afin de fournir une base biochimique à une telle spécificité inversée de pollen *S* pour les S-RNases d'haplotypes distincts, une première modification a proposé l'existence de deux domaines fonctionnels chez pollen *S*, le premier assurant l'inhibition générale de toute S-RNase et l'autre assurant la protection spécifique des S-RNases de même haplotype, la liaison à ce dernier étant thermodynamiquement favorisée (Kao and McCubbin, 1997; Wang *et al.*, 2003b). Toutefois, une telle modification impliquerait que le pollen hétéroallélique reste auto-incompatible, car la présence simultanée de deux

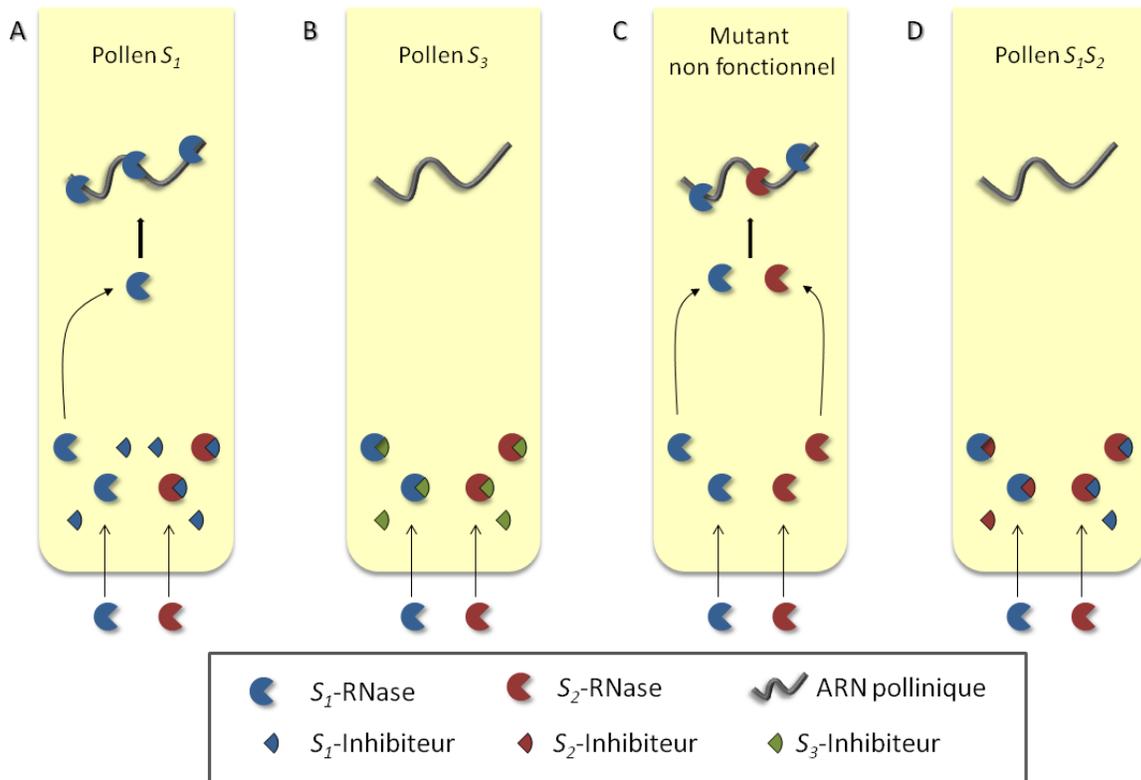


Figure I.6 : Modèle de l'inhibiteur.

Dans le modèle de l'inhibiteur, pollen S est un inhibiteur S -spécifique des S-RNases. Lors d'un croisement incompatible (A), pollen S inhibe toutes les S-RNases hormis celles du même haplotype. Dans un croisement compatible (B), pollen S assure l'inhibition de toutes les S-RNases présentes et prévient donc le rejet pollinique. Une mutation causant la perte de fonction pollen S (C) entrainerait donc une incompatibilité constitutive tandis que le pollen hétéroallélique (D) devrait, conformément à ce qui est observé, devenir constitutivement auto-compatible.

inhibiteurs distincts devrait entraîner la protection de deux types de S-RNases et donc l'auto-incompatibilité. Cette modification a donc dû être amendée à son tour par l'hypothèse que pollen *S* était actif sous forme d'homotétramère, la présence de deux pollen *S* d'allèles distincts dans le pollen hétéroallélique formant des hétéropolymères inactifs, d'où la compatibilité (Luu *et al.*, 2001). Enfin, en partie afin d'expliquer la compatibilité de certaines plantes mutées au niveau de candidats pollen *S* (Sonneveld *et al.*, 2005), il a été proposé que les deux fonctions de pollen *S* étaient séparées sur deux molécules, un inhibiteur général inactivant toutes les S-RNases, et un vrai pollen *S* responsable de la liaison aux S-RNases de même haplotype, ce dernier empêchant leur liaison avec l'inhibiteur général et permettant donc l'auto-incompatibilité (Luu *et al.*, 2001). Plusieurs de ces hypothèses ont été intégrées aux modèles récents d'AI bien que certaines interrogations quant au fonctionnement de pollen *S* dans le modèle de l'inhibiteur restent encore problématiques dans les modèles d'AI les plus récents.

3.4.3.4. Pollen *S* est une protéine F-box

L'identité exacte de pollen *S* fut suggérée pour la première fois par le séquençage des régions génomiques du locus *S* chez *Antirrhinum hispanicum*. Le séquençage d'un chromosome artificiel bactérien (BAC) de 63.7kb comprenant la séquence de la *S*₂-RNase a démontré la présence d'un gène codant pour une protéine de type F-box, nommé AhSLF-*S*₂ (*Antirrhinum hispanicum* S-Locus-F-box *S*₂), localisé 9kb en aval de la *S*₂-RNase. AhSLF-*S*₂ est exprimé de façon spécifique dans le pollen et ne peut être amplifié par PCR que dans les plantes d'haplotype *S*₂ (Lai *et al.*, 2002). Les protéines F-box étant impliquées dans les processus de dégradation ubiquitine-dépendante des protéines (Smalle and Vierstra, 2004), l'implication possible d'une protéine F-box dans l'AI a suggéré un nouveau modèle d'AI basé sur la dégradation haplotype-spécifique des S-RNases (voir section suivante et 3.4.4.1).

Des analyses semblables chez plusieurs espèces de *Rosaceae* ont renforcé cette hypothèse. Le séquençage, chez *Prunus mume*, de deux cosmides contenant les séquences des *S*₁- et *S*₇-RNases a permis d'identifier plusieurs gènes codant pour des protéines F-box, dont un, alors désigné PmSLF, montre suffisamment de variabilité entre haplotypes pour assumer la fonction pollen *S* (81% d'identité entre acides aminés pour les allèles *S*₁ et *S*₇). En raison de

l'absence de variabilité entre haplotypes, les autres séquences identifiées furent classifiées comme *SLF-like*, supposément non-impliquées dans l'AI, (Entani *et al.*, 2003) Chez *Prunus dulcis*, l'analyse d'environ 70 kb de séquence associée au locus *S* a aussi permis d'identifier plusieurs gènes codant pour des protéines F-box dont une classe, désignée SFB (*S*-haplotype-specific-F-Box), montre une variabilité entre quatre allèles (68.4% à 76.4% d'identité entre allèles) similaire à la variabilité entre les séquences de S-RNases correspondantes (54.2% à 76.2%) (Ushijima *et al.*, 2003). De plus, les allèles SFB co-ségrègent avec les allèles des S-RNases correspondantes et l'expression de SFB est pollen-spécifique, suggérant un rôle possible de SFB comme pollen *S* chez cette espèce (Ushijima *et al.*, 2003). Dans toutes ces espèces, les analyses par séquençage furent facilitées par la taille réduite de leur génome et par la faible distance entre les gènes des S-RNases et SLFs/SFBs, qui varie de 1.6kb à 10kb chez *P. dulcis* (Ushijima *et al.*, 2003).

Chez les *Solanaceae*, la localisation subcentromérique et la taille importante du locus *S*, estimée à plus de 4.4Mb (Wang *et al.*, 2004b), rendent difficiles les analyses à l'échelle génomique. C'est pourtant chez *Petunia inflata* que la preuve du rôle de SLF/SFB comme déterminant mâle de l'AI fût établie (Sijacic *et al.*, 2004). Près de cinquante clones contenant le gène de la *S*₂-RNase ou d'autres marqueurs du locus *S* ont été isolés d'une librairie de BACs issue d'une lignée de *P. inflata* d'haplotype *S*₂*S*₂ (McCubbin *et al.*, 2000a; McCubbin *et al.*, 2000b), et plusieurs gènes de type F-box ont été trouvés dans un contig couvrant une région de 263kb. Tous ces gènes furent initialement rejetés comme candidats pollen *S* en raison de leur faible variabilité allélique (Wang *et al.*, 2003a) et furent par la suite désignés *SLF-like* et initialement considérés comme n'ayant pas de fonction dans l'AI (voir sections 3.4.3.8 et 3.4.4.2). Une analyse subséquente, à plus grande échelle, a établi 10 contigs couvrant une région de 4.4Mb, dont une région de 328kb fût séquencée en totalité (Wang *et al.*, 2004b). 76% de cette région est formée de séquences répétées et de transposons et seul un nouveau gène de type F-box, exprimé spécifiquement au niveau du pollen et désigné PiSLF₂ (*Petunia inflata* S-Locus-F-box *S*₂), fût identifié 161kb en aval de la *S*₂-RNase.

La fonction de PiSLF en tant que pollen *S* fût démontrée par des expériences de transgénése en exploitant le phénomène de compatibilité du pollen hétéroallélique, qui prédit l'auto-compatibilité d'une plante exprimant un second allèle pollen *S* distinct de sa copie

endogène (voir section 3.4.3.2). De fait, l'introduction d'un fragment de 4.3kb contenant la séquence PiSLF₂ dans des lignées de *P. inflata* d'haplotypes *S*₁*S*₁, *S*₁*S*₂ et *S*₂*S*₃ les rend auto-compatibles (Sijacic *et al.*, 2004). L'analyse des progénitures a confirmé la présence du transgène PiSLF₂ et démontré que seuls les pollens *S*₁ et *S*₃ portant une copie du transgène PiSLF₂ étaient compatibles (Sijacic *et al.*, 2004). De manière surprenante, l'expression pollen-spécifique de AhSLF-*S*₂ chez *Petunia hybrida* cause un phénotype similaire (Qiao *et al.*, 2004a), suggérant un mécanisme d'AI commun et des déterminants pollen *S* phylogénétiquement proches chez ces deux espèces. L'identité de pollen *S* chez les *Rosaceae* n'a pas encore été confirmée formellement, principalement en raison des difficultés techniques associées à leur transformation. De plus, chez plusieurs d'entre elles, le pollen hétéroallélique n'est pas auto-compatible, ce qui prévient l'utilisation de la stratégie de validation décrite chez *Petunia*. Toutefois, des analyses de lignées naturelles mutantes pour SFB chez les *Prunoideae* supportent un rôle de ce dernier comme déterminant pollen *S* chez les espèces de cette sous-famille (Ushijima *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent aussi des particularités dans le fonctionnement de pollen *S* chez les *Prunoideae* (voir section 3.4.5).

3.4.3.5. Rôles des protéines F-box et implications pour l'auto-incompatibilité

Les protéines F-box doivent leur nom à la présence d'un domaine d'interaction protéine-protéine, le domaine F-box (Bai *et al.*, 1996), impliqué dans l'ubiquitination et la dégradation de protéines ciblées par le protéasome 26S (Craig and Tyers, 1999; Kipreos and Pagano, 2000; Smalle and Vierstra, 2004). Le domaine F-box, d'environ cinquante acides aminés est le plus souvent présent dans la partie N-terminale des protéines F-box, qui contiennent aussi généralement d'autres motifs d'interactions qui définissent l'affinité des protéines F-box pour leur cible et permettent leur classification (Kipreos and Pagano, 2000). Les protéines F-box font normalement partie d'un complexe ubiquitine ligase (désigné E3) dont le type le plus connu est désigné SCF (S-phase kinase-associated protein, Cullin, F-box). Conjointement avec l'enzyme de conjugaison d'ubiquitine (désignée E2), les complexes E3 catalysent la liaison de l'ubiquitine sur des résidus lysine des protéines ciblées (Ardley and Robinson, 2005). Un complexe SCF typique est formé de la protéine SKP1 (S-phase Kinase-

associated Protein 1) qui s'associe au domaine F-box une fois la protéine F-box associée à sa cible, de la protéine CUL1 (Cullin 1) qui forme un échafaud et assure une liaison entre SKP1 et la protéine RBX1 (RING-BoX protein 1), qui s'associe elle-même avec E2 et permet le transfert de l'ubiquitine activée au niveau d'un résidu lysine de la cible (Cardozo and Pagano, 2004). Une cible polyubiquitinée est généralement reconnue par le protéasome 26S puis dégradée (Craig and Tyers, 1999; Smalle and Vierstra, 2004).

La présence au locus *S* de protéines F-Box présentant des spécificités alléliques a suggéré un nouveau modèle d'AI basé sur le contrôle de la dégradation des S-RNases (Entani *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2002; Ushijima *et al.*, 2003) (voir section 3.4.4.1). Pourtant, s'il est bien confirmé que pollen *S* est une protéine F-box (Sijacic *et al.*, 2004), le détail des processus biochimiques qui contrôlent le rejet pollinique, ainsi que la réelle fonction de pollen *S*, sont encore flous (McClure *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011b; Tao and Iezzoni, 2010). Il est toutefois confirmé que la présence du domaine F-box sur pollen *S* est nécessaire à sa fonction, un mutant PiSLF-*S*₂ tronqué, dépourvu de son domaine F-Box, n'étant pas en mesure de causer d'effet hétéroallélique, à l'inverse d'un PiSLF-*S*₂ de type sauvage (Meng *et al.*, 2011a).

3.4.3.6. Caractéristiques des protéines F-box impliquées dans l'auto-incompatibilité

L'analyse des séquences de SLF/SFB présentes au locus *S* a permis l'isolement subséquent de nombreux allèles de SLF/SFB ainsi que l'identification de protéines similaires chez plusieurs autres espèces (Entani *et al.*, 2003; Minamikawa *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2004; Tsukamoto *et al.*, 2005; Ushijima *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2004b; Wheeler and Newbigin, 2007; Yamane *et al.*, 2003c; Zhou *et al.*, 2003). Leur analyse phylogénétique suggère que les séquences SLF/SFB forment un clade monophylétique, comme le font les séquences de S-RNases (Igic and Kohn, 2001), ce qui supporte l'hypothèse d'une origine commune des systèmes d'AI basés sur les S-RNases (Ikeda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004a). De manière surprenante, les gènes codant pour les composantes mâles (SLF/SFB) et femelles (S-RNases) de l'AI ne partagent apparemment pas une histoire évolutive commune, alors qu'une coévolution entre ces deux déterminants, sous l'effet d'une sélection fréquence-dépendante, serait plutôt attendue (Newbigin *et al.*, 2008).

De plus, des différences dans les séquences et le fonctionnement des gènes SFB de *Rosaceae* et SLF de *Solanaceae* et *Plantaginaceae* (Newbigin *et al.*, 2008; Tao and Iezzoni, 2010) pourraient indiquer une divergence dans le fonctionnement de l'AI dans ces familles (voir section 3.4.5).

Les gènes SLF de *Solanaceae* et *Plantaginaceae* ne montrent pas des niveaux de variabilité allélique comparables à ceux des S-RNases associées. La similarité entre allèles SLF est élevée, de l'ordre de 97% pour les allèles AhSLF, alors que la similarité entre les allèles des S-RNases correspondantes ne dépasse pas 51% (Zhou *et al.*, 2003). De plus, cette faible variabilité entre allèles semble dispersée sur la protéine plutôt que localisée au niveau de régions variables véritablement distinctes (Newbigin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004a), ce qui complique l'identification des sites codant la spécificité allélique. Inversement, les allèles SFB de *Prunus* montrent des niveaux de variabilité semblables à ceux des S-RNases, bien que leurs relations évolutives ne permettent pas de démontrer de coévolution (Ikeda *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2009). Cependant, les allèles SFB chez *Prunus* montrent quant à eux cinq régions variables distinctes qui pourraient potentiellement coder la spécificité allélique (Ikeda *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2006). Toutefois, aucune confirmation expérimentale de ce rôle potentiel n'a été rapportée à ce jour.

Le domaine F-box étant seulement responsable de la liaison des protéines F-box avec Skp1 (Cardozo and Pagano, 2004), d'autres domaines d'interaction protéine-protéine sont généralement présents sur les protéines F-box et responsables de l'affinité de ces protéines pour leurs cibles (Kipreos and Pagano, 2000). Curieusement, l'analyse bioinformatique des protéines SLF/SFB ne révèle généralement aucune homologie avec de tels domaines d'interaction connus (Kao and Tsukamoto, 2004). Toutefois, l'étude de protéines PiSLF chimériques chez *Petunia inflata* suggère l'existence de trois régions possiblement impliquées dans les interactions avec les S-RNases (Fields *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2007) (voir section 3.4.3.8).

Les ARNm codant pour les protéines SLF des *Solanaceae* et *Plantaginaceae* ne contiennent pas d'intron. Les ARNm des SFB des *Rosaceae* contiennent par contre, dans la région 5' non traduite, un intron dont la séquence varie entre allèles (Vaughan *et al.*, 2006).

Finalement, des analyses de localisation subcellulaire chez *Antirrhinum hispanicum* et *Petunia inflata* indiquent que AhSLF- S_2 est présent majoritairement au niveau cytoplasmique (Sun and Kao, 2013; Wang and Xue, 2005). Des analyses récentes chez *P. inflata* semblent par ailleurs indiquer que l'expression des SLF n'est active qu'au niveau du noyau génératif des tubes polliniques en croissance (Sun and Kao, 2013).

3.4.3.7. Fonction des protéines F-box impliquées dans l'auto-incompatibilité

3.4.3.7.1. Pollen *S* contrôle la dégradation des S-RNases dans les croisements compatibles

L'implication potentielle de pollen *S* dans la dégradation des S-RNases suggère que la quantité des S-RNases devrait baisser dans des styles pollinisés avec du pollen compatible, cette dégradation constituant alors un mécanisme de prévention de leur activité cytotoxique. Toutefois, les très larges quantités de S-RNases au niveau des tissus stylaires (Qin *et al.*, 2006) compliquent de telles analyses quantitatives *in vivo*. Chez *Antirrhinum hispanicum*, les premiers essais d'immuno-quantification des S-RNases au niveau de styles pollinisés ont suggéré une décroissance des niveaux de S-RNases dans les croisements compatibles (Qiao *et al.*, 2004b) mais une analyse similaire chez *Nicotiana glauca* n'a permis de détecter aucune différence entre croisements (Goldraij *et al.*, 2006). De même, une S_2 -RNase de *N. glauca* marquée radioactivement et ajoutée au milieu de croissance *in vitro* de tubes polliniques compatibles et incompatibles n'avait pas montré de signes de dégradation lors de l'autoradiographie des extraits polliniques (Gray *et al.*, 1991). Ce dernier résultat pourrait toutefois possiblement s'expliquer par l'absence dans le milieu de culture de facteurs stylaires additionnels nécessaires à l'AI (voir section 3.4.6). En revanche, chez *Solanum chacoense*, par l'utilisation de styles d'âges et de tailles similaires afin de limiter la variabilité inter-stylaire, il a été possible de mesurer une réduction allant jusqu'à 30% des niveaux de S-RNases lors des croisements compatibles (Liu *et al.*, 2009). Bien que cette dernière étude ne démontre pas directement que cette baisse soit causée par une dégradation des S-RNases, elle suggère

toutefois que le contrôle de la dégradation des S-RNases puisse être un mécanisme central des réactions d'AI.

Afin de contourner les difficultés de quantification des S-RNases dans les styles pollinisés, l'effet d'extraits de tubes polliniques sur des S-RNases purifiées d'origines bactériennes ou végétales a aussi été testé *in vitro* chez *Petunia inflata* (Hua and Kao, 2006). Dans ce système, des quantités connues de S-RNases sont incubées en présence d'extraits polliniques compatibles ou incompatibles puis quantifiées. Ce traitement induit la dégradation haplotype-indépendante de toutes les S-RNases bactériennes. Curieusement, les S-RNases stylaires, toutes glycosylées, ne sont pas dégradées dans ce système, alors que leur traitement préalable par une N-glycosidase rend leur dégradation possible (Hua and Kao, 2006) (voir section 3.4.2.7). Ces résultats supportent donc l'implication de la dégradation des S-RNases dans le contrôle de l'AI, mais l'absence de dégradation haplotype-spécifique suggère toutefois que ce système *in vitro* ne peut reconstituer la totalité des réactions d'AI (Hua and Kao, 2006).

3.4.3.7.2. La dégradation des S-RNases est ubiquitine-dépendante

La dégradation des S-RNases par l'action d'une protéine F-box implique leur ubiquitination préalable (Vierstra, 2003). Plusieurs études ont donc tenté de démontrer l'ubiquitination des S-RNases *in vitro* et *in vivo* ainsi que cherché à déterminer la localisation des résidus lysines ciblés sur les S-RNases par ce processus (Hua and Kao, 2006, 2008; Qiao *et al.*, 2004b; Qin *et al.*, 2005). Chez *Solanum chacoense*, l'implication du seul résidu lysine conservé chez tous les allèles, présent au niveau de la région hydrophile C4 (Ioerger *et al.*, 1991), a été testée par mutagenèse dirigée (Qin *et al.*, 2005). Une S_{11} -RNase dont le résidu lysine en région C4 a été remplacé par un résidu arginine, chimiquement semblable mais ne pouvant pas lier l'ubiquitine, présente un phénotype identique à la S_{11} -RNase de type sauvage (Qin *et al.*, 2005). Ce résultat infirme l'hypothèse d'une implication exclusive de ce résidu dans l'ubiquitination des S-RNases car elle impliquerait qu'une telle modification génère plutôt une S-RNase impossible à dégrader pour le tube pollinique, qui conférerait donc une auto-incompatibilité constitutive. Une analyse systématique par blocs des résidus lysines portés par la S_3 -RNase de *Petunia inflata* fût par la suite réalisée *in vitro* (Hua and Kao, 2008)

en utilisant le système de détection de la dégradation de S-RNases présenté en section précédente. Ces analyses révèlent un rôle potentiel de six résidus lysines dans la région C-terminale de la S_3 -RNase, en aval de la région C4, dans sa dégradation (Hua and Kao, 2008) mais ce rôle effectif *in vivo* n'a pas été testé à ce jour. En utilisant un système *in vitro* dans lequel des extraits polliniques furent incubés en présence d'extraits stylaires compatibles ou incompatibles puis séparés sur gels d'électrophorèses, il a été possible chez *Antirrhinum* de mettre en évidence la présence exclusive, dans les extraits traités de manière compatible, de bandes immuno-réactives avec deux anticorps ciblés contre la S-RNase et contre l'ubiquitine (Qiao *et al.*, 2004b). Ces résultats suggèrent que les S-RNases sont bien ubiquitinées dans les croisements compatibles. Parallèlement, l'implication de la dégradation ubiquitine-dépendante dans l'AI est aussi supportée par l'inhibition de la dégradation des S-RNases *in vitro* en présence de MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome 26S (Hua and Kao, 2006).

3.4.3.7.3. Les interactions entre pollen *S* et les S-RNases déterminent leur stabilité dans le pollen

Si les réactions d'AI sont basées sur la dégradation des S-RNases compatibles par pollen *S*, la spécificité de cette dégradation devrait être déterminée par des interactions différentielles entre un SLF/SFB et les différents allèles de S-RNases. On prédit donc que SLF/SFB devrait pouvoir entraîner la dégradation des toutes les S-RNases sauf celles de même haplotype et que des liaisons allèles-dépendantes entre SLF/SFB et les S-RNases seraient ainsi attendues.

Or, des analyses de type double hybride de levure (Y2H), co-immunoprécipitation (co-IP) et *pull-down* chez *Antirrhinum hispanicum* (Qiao *et al.*, 2004b) ont d'abord mis en évidence une liaison non haplotype-spécifique de AhSLF- S_2 avec les S-RNases, AhSLF- S_2 liant en effet aussi bien la S_2 - que la S_3 -RNase. Par contre, chez *Petunia inflata*, des analyses de type *pull-down* utilisant des S-RNases exprimées chez *Escherichia coli* indiquent que PiSLF $_2$, lorsqu'immobilisé sur résine d'affinité chromatographique, lie significativement moins de S_2 -RNase que d'autres S-RNases d'haplotype distinct (Hua and Kao, 2006). Ces résultats, depuis confirmés par des expériences de co-IP (Kubo *et al.*, 2010), suggèrent que la spécificité des réponses d'AI est basée sur une liaison plus faible entre les SLF et les S-

RNases de même haplotype, comparativement aux autres S-RNases. Cette observation critique est à la base des modèles d'AI basés sur la dégradation des S-RNases (voir section 3.4.4).

3.4.3.8. Structures déterminant la spécificité allélique de pollen *S*

Les faibles niveaux de variabilité entre allèles et l'absence de régions variables délimitées chez les SLF de *Solanaceae* et *Plantaginaceae* ont empêché jusqu'à présent la description des régions qui déterminent la spécificité allélique de pollen *S*. Toutefois, l'analyse chez *Petunia inflata* de séquences *SLF-like*, initialement considérées comme n'ayant pas de rôle dans l'AI (Hua *et al.*, 2007), a permis de délimiter trois régions, désignées SR1, SR2 et SR3, pouvant contrôler ces interactions spécifiques (Fields *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2007). Ces régions ont été déterminées par l'analyse d'alignements de séquences PiSLF et PiSLF-*like* (Hua *et al.*, 2007) et leur rôle a été validé par l'analyse *in vitro* de plusieurs protéines chimériques basées sur des permutations de trois segments FD1, FD2 et FD3, contenant chacun respectivement les régions SR1, SR2 et SR3 (Hua *et al.*, 2007). Les résultats obtenus suggèrent que FD2 est responsable de l'affinité non spécifique de PiSLF pour les S-RNases car FD2 exprimé seul peut lier toutes les S-RNases testées à des niveaux plus élevés qu'un PiSLF complet. De plus, si FD2 chez PiSLF est remplacé par la région équivalente chez un PiSLF-*like*, la protéine PiSLF chimérique perd sa capacité à lier les S-RNases testées (Hua *et al.*, 2007). FD1 et FD3 régulent négativement la liaison avec ces S-RNases, et sont ainsi possiblement responsable de la spécificité allélique de PiSLF (Hua *et al.*, 2007). FD2 est nécessaire, mais pas suffisante à la fonction de PiSLF, car l'échange de cette région entre une protéine PiSLF et une protéine PiSLF-*like* génère des protéines qui ne sont pas en mesure de causer un effet hétéroallélique, contrairement à un PiSLF de type sauvage (Fields *et al.*, 2010).

Des preuves récentes de l'implication des *SLF-like* dans l'AI suggèrent que différentes classes de SLF ne lient qu'un sous-ensemble de S-RNases (Kubo *et al.*, 2010) (voir section 3.4.4.2). Ceci implique que les différences observées entre la capacité pour la région FD2 des PiSLF et PiSLF-*like* à lier les S-RNases n'est donc valable que pour un nombre limité d'allèles de S-RNases. Les régions qui contrôlent la spécificité allélique des SLF de différentes classes devront donc aussi être déterminées. De plus, puisque la structure des SFBs

chez les *Rosaceae* est différente des SLFs de *Solanaceae*, et leurs mécanismes possiblement distincts (voir section 3.4.5), des analyses similaires seront nécessaires chez les *Rosaceae*.

3.4.4. De nouveaux modèles d'auto-incompatibilité basés sur la dégradation des S-RNases

3.4.4.1. Modèle simple de dégradation par un unique pollen *S*

L'identification de pollen *S* comme protéine F-box a suggéré un modèle d'AI similaire au modèle de l'inhibiteur mais basé sur la dégradation sélective des S-RNases plutôt que sur l'inhibition de leur activité (Fig. I.7) (Lai *et al.*, 2002). Ce modèle est appuyé par la dégradation des S-RNases *in vitro* (Hua and Kao, 2006) et *in vivo* (Liu *et al.*, 2009), l'ubiquitination des S-RNases *in vitro* (Hua and Kao, 2006) et *in vivo* (Qiao *et al.*, 2004b) ainsi que par la capacité de SLF/SFB à lier les S-RNases de manière haplotype-dépendante (Hua and Kao, 2006; Kubo *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2004b).

Dans ce modèle de dégradation, l'absence de liaison forte entre un allèle SLF et la S-RNase d'haplotype correspondant lors d'un croisement incompatible maintient active la S-RNase, ce qui cause le rejet pollinique (Fig. I.7.A). Lors d'un croisement compatible, un SLF d'haplotype donné peut lier toutes les S-RNases d'haplotypes distincts et catalyser leur dégradation, permettant ainsi la croissance du pollen (Fig. I.7.B).

Ce modèle peut expliquer la compatibilité du pollen hétéroallélique, chacun des deux allèles SLF présents dans le tube pollinique pouvant catalyser la dégradation de la S-RNase d'haplotype opposé (Fig. I.7.D). Inversement, la perte de fonction pollen *S* devrait causer une incompatibilité constitutive du pollen, l'absence de pollen *S* prévenant la dégradation de toute S-RNase (Fig. I.7.C), bien qu'un tel mutant n'ait à ce jour jamais été rapporté. De manière intéressante, un tel modèle pourrait expliquer comment une S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} chez *Solanum chacoense* (Matton *et al.*, 1999) peut rejeter les pollens d'haplotypes S_{11} et S_{13} mais aussi le pollen hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ (Fig. I.4) (Luu *et al.*, 2001). Cette S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} pourrait avoir perdu sa capacité à interagir avec les S_{11} -SLF et S_{13} -SLF, empêchant donc sa dégradation. Aucun des S_{11} -SLF ou S_{13} -SLF n'étant en mesure de

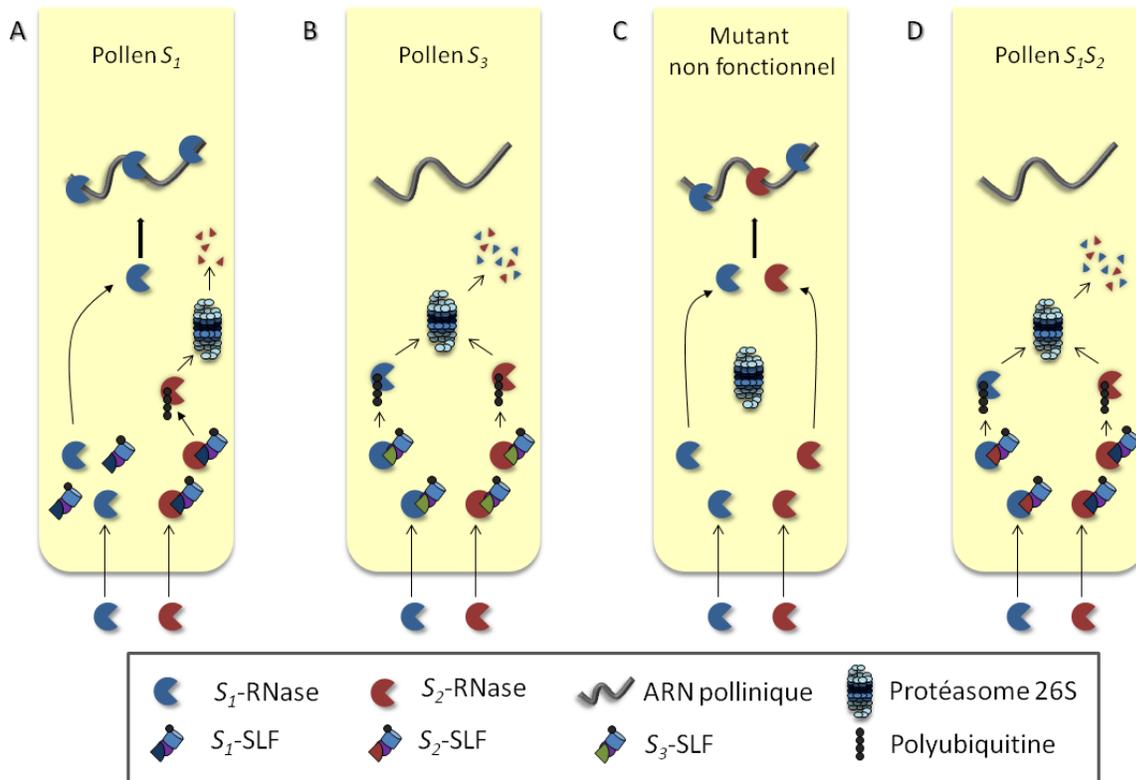


Figure I.7 : Modèle de dégradation basé sur un unique pollen *S*.

Dans le modèle de dégradation simple, pollen *S* est une protéine F-box (SLF) qui assure l'ubiquitination et la dégradation protéasome-dépendante de toutes les S-RNases hormis celles de même haplotype, ce qui provoque le rejet pollinique lors d'un croisement incompatible (A). Dans un croisement compatible (B), pollen *S* entraîne la dégradation de toutes les S-RNases présentes et prévient donc le rejet pollinique. Une mutation causant la perte de fonction pollen *S* (C) entraînerait donc une incompatibilité constitutive du pollen muté, celui-ci n'étant plus en mesure de dégrader aucune S-RNase. Inversement, le pollen hétéroallélique (D) devrait devenir constitutivement auto-compatible, la présence de deux SLF de spécificités distinctes entraînant la dégradation de toutes les S-RNases.

dégrader cette S-RNase, leur présence conjointe dans le pollen hétéroallélique S_{11}/S_{13} ne permet pas non plus sa dégradation et elle cause donc le rejet du pollen. Le pollen hétéroallélique $S_{12}S_{14}$ reste toutefois constitutivement compatible sur une plante exprimant la S_{11}/S_{13} -RNase et cette dernière peut donc être dégradée par les S_{12} -SLF et/ou S_{14} -SLF et ne constitue donc pas une S-RNase « universelle » capable de rejeter tout pollen. Les bases biochimiques à la base de la perte de la capacité des deux S_{11} - et S_{13} -SLF à dégrader la S_{11}/S_{13} -RNase sont dans le cadre d'un tel modèle encore indéterminées mais plusieurs hypothèses sont possibles. Par exemple, si S_{11} -SLF reconnaît la S_{11}/S_{13} -RNase comme une S_{11} -RNase et S_{13} -SLF reconnaît la S_{11}/S_{13} -RNase comme une S_{13} -RNase, la dégradation de la S_{11}/S_{13} -RNase serait impossible.

Le modèle de dégradation, malgré ses atouts, présente quand même plusieurs lacunes. Par exemple, il n'intègre pas dans ses mécanismes les résultats d'observations microscopiques qui démontrent la séquestration spatiale des S-RNases lors des réactions d'AI et suggèrent une séparation physique de ces dernières avec les protéines SLF/SFB (Goldraij *et al.*, 2006). De plus, la mise en évidence récente de mécanismes d'inhibition de la croissance du pollen incompatible précédant une possible mise en contact des S-RNases avec SLF/SFB (Roldan *et al.*, 2012) suggère que le modèle de dégradation n'est pas suffisant pour expliquer la totalité du spectre des mécanismes liés aux réactions d'AI. De plus, ce modèle n'octroie pas de rôle à plusieurs autres molécules, non codées par le locus *S* mais toutefois apparemment nécessaires aux réactions d'AI, décrites plus en détails en section 3.4.6. Par ailleurs, chez le genre *Prunus*, l'auto-incompatibilité du pollen hétéroallélique (Sassa *et al.*, 2010) ainsi que l'observation de la perte d'auto-incompatibilité chez des plantes mutées au niveau de l'unique candidat pollen *S* (Sonneveld *et al.*, 2005; Ushijima *et al.*, 2004) s'opposent fondamentalement aux prédictions du modèle de dégradation, suggérant dans cette sous-famille des mécanismes d'AI particuliers, développés plus en détail en section 3.4.5. Enfin, le modèle de dégradation n'intègre pas plusieurs observations récentes chez *Petunia inflata* (Kubo *et al.*, 2010) qui suggèrent un nouveau modèle d'AI basé sur un pollen *S* composé de plusieurs protéines F-box (voir section suivante).

3.4.4.2. Modèle de dégradation par un pollen *S* multipartite

Bien que leur profils d'expression soient similaires à SLF, les autres F-box identifiées au locus *S*, désignées *SLF-like*, ont d'abord été supposées ne pas avoir de rôle dans l'AI (Fields *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2007). Chez *Petunia*, leur similarité avec PiSLF est faible, de l'ordre de 47.4% à 57.6% (Hua *et al.*, 2007). De manière plus importante, elles n'ont initialement pas montré d'interaction avec plusieurs S-RNases testées (Hua *et al.*, 2007) et lorsque vérifié, elles n'ont pu induire d'effet hétéroallélique dans les haplotypes testés lors d'expériences de transgénèse (Fields *et al.*, 2010). La présence au locus *S* de gènes exprimés dans le pollen et codants pour des protéines F-box, et présentant les caractéristiques attendues pour pollen *S* (voir section 3.4.3.4), bien que montrant des niveaux de variabilité allélique inférieurs à ceux attendus, était donc difficile à rationaliser. Cette difficulté a été renforcée par l'identification chez plusieurs espèces d'haplotypes intercompatibles présentant des S-RNases distinctes mais des gènes SLF/SFB identiques (Kubo *et al.*, 2010; Minamikawa *et al.*, 2010).

La compréhension du rôle joué dans l'AI par de multiples gènes F-box et des gènes précédemment classifiés comme *SLF-like* a été rendue possible par une analyse approfondie des gènes de type SLF chez *Petunia inflata* et *Petunia hybrida* (Kubo *et al.*, 2010). Dans cette étude, plusieurs séquences codant pour des gènes de type SLF ont été caractérisées à partir de plantes d'haplotypes variés et les résultats obtenus ont mis en évidence que pour deux haplotypes intercompatibles, *S*₇ et *S*₁₉, leurs S-RNases étaient distinctes, mais les gènes PiSLF identiques (Kubo *et al.*, 2010). Cette étude a aussi révélé que plusieurs des protéines de type SLF n'étaient en mesure de causer un effet hétéroallélique que pour un groupe d'haplotypes déterminés. Des tests fonctionnels de liaisons entre plusieurs de ces protéines de type SLF et plusieurs S-RNases ont confirmé que la capacité des SLF à causer l'effet hétéroallélique dans un haplotype dépend de leur capacité à lier les S-RNases correspondantes (Kubo *et al.*, 2010). Les auteurs ont donc déduit que PiSLF ne codait qu'une partie de la fonction pollen *S* et que plusieurs SLF étaient conjointement responsables de l'inhibition du large spectre de S-RNases auquel les tubes polliniques peuvent être confrontés (Kubo *et al.*, 2010). L'analyse phylogénétique de tous les gènes de type SLF présents au locus *S* chez *P. inflata* et/ou *P. hybrida*, ainsi que plusieurs tests fonctionnels d'interactions entre les protéines SLF correspondantes et plusieurs allèles de S-RNases a maintenant permis de distinguer 10 gènes

(ou classes de gènes) présents au locus S , dont les membres de 7 classes ont été fonctionnellement testés et validés comme faisant partie de pollen S (Kubo *et al.*, 2010; Sun and Kao, 2013; Williams *et al.*, 2013). Ceci a amené à une nouvelle nomenclature pour les gènes de type SLF, PiSLF₂ (Sijacic *et al.*, 2004) étant maintenant désigné S_2 -SLF I (SLF de classe I d'haplotype S_2) (Kubo *et al.*, 2010).

Une reformulation du modèle de dégradation, basée sur la dégradation des S-RNases par un pollen S multipartite (Kubo *et al.*, 2010), a donc été proposée (Fig. I.8). Selon ce modèle, chaque haplotype exprime plusieurs SLF qui sont membres de plusieurs classes distinctes. Chaque protéine SLF donnée est responsable de la liaison et de la dégradation d'un sous-ensemble de S-RNases et plusieurs SLFs sont donc requis pour la dégradation de toutes les S-RNases lors d'un croisement compatible (Fig. I.8.B). Dans un croisement incompatible, aucune des protéines SLF présentes au locus S n'est en mesure de lier et dégrader au moins une des S-RNases présentes dans les tissus stylaires, causant ainsi l'AI (Fig. I.8.A). La capacité d'une protéine de type SLF donnée à causer un effet hétéroallélique lors de son expression dans le pollen dépend donc de sa capacité à lier et dégrader une S-RNase qui ne peut être dégradée par les protéines de type SLF déjà présentes chez la plante de type sauvage (Fig. I.8.D) (Kubo *et al.*, 2010). Donc, bien que fonctionnellement similaire au modèle de dégradation simple présenté précédemment, ce nouveau modèle d'AI se distingue quant aux prédictions d'une mutation qui toucherait un gène SLF. Si dans l'ancien modèle une perte de fonction SLF est supposée causer un rejet constitutif du pollen muté, dans ce nouveau modèle une mutation d'un gène SLF ne cause cet effet que sur des styles présentant les S-RNases normalement reconnues par cette protéine SLF, si ces S-RNases ne sont pas aussi reconnues par une autre protéine SLF présente au locus S . La mutation d'un gène SLF devrait donc causer une perte partielle de compatibilité en prévenant la reconnaissance et la dégradation d'un sous-ensemble de S-RNases, si elles ne peuvent être par ailleurs dégradées par une autre protéine SLF (Fig. I.8.C). Un tel modèle expliquerait les pertes de compatibilité partielles observées chez plusieurs lignées mutantes naturelles au niveau des gènes SFB chez *Pyrus pirifolia* (Kakui *et al.*, 2011; Sassa *et al.*, 2007). Chez *P. inflata* par contre, lorsque l'effet de la suppression au niveau du pollen de l'expression de la S_2 -SLF1, qui peut dégrader les S_3 , S_7 et

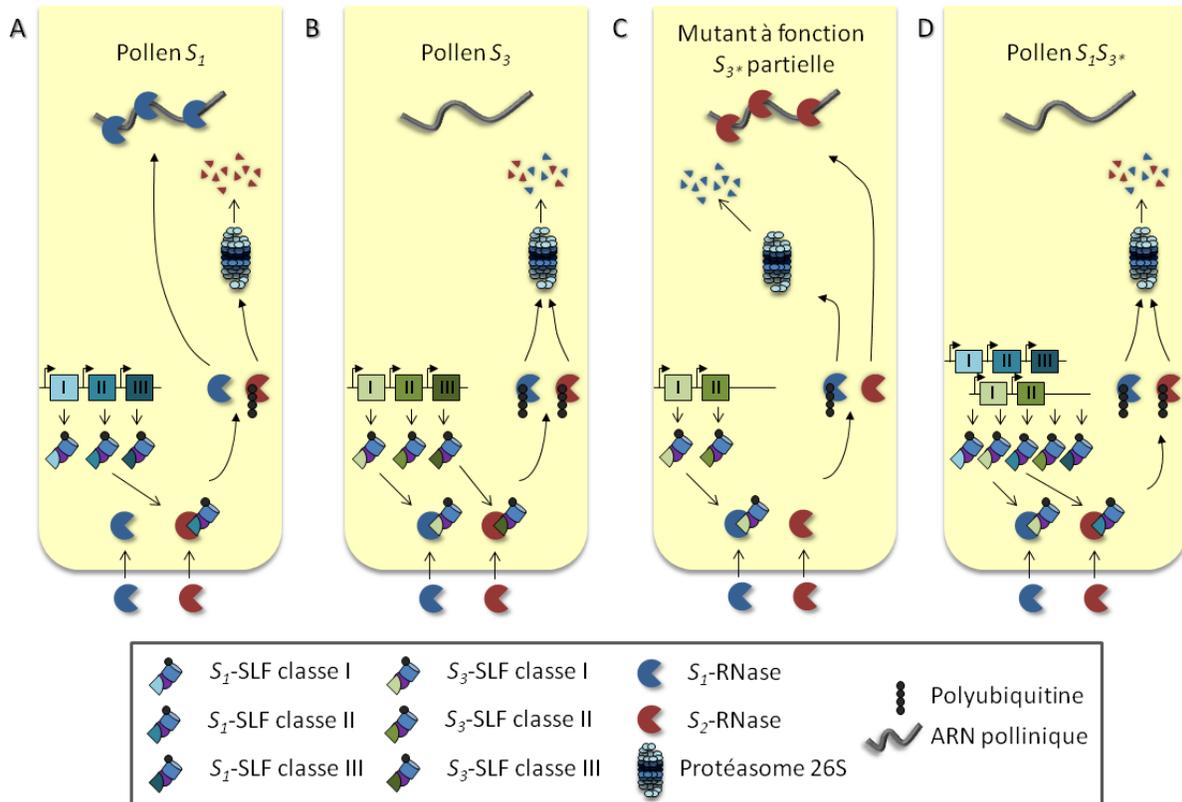


Figure I.8 : Modèle de dégradation basé sur un pollen *S* codé par plusieurs SLF.

Dans le modèle de dégradation basé sur un pollen *S* multipartite, la fonction pollen *S* est portée par un ensemble de protéines F-box (SLF) de différentes classes. Un SLF est responsable de l'ubiquitination et de la dégradation protéasome-dépendante d'un sous-ensemble de *S*-RNases, et le spectre complet des SLFs présentes au niveau d'un haplotype assure la dégradation de toutes les *S*-RNases hormis celles de même haplotype. Lors d'un croisement incompatible (A), aucune des différentes protéines SLF présentes ne peut causer la dégradation des *S*-RNases de même haplotype. Dans un croisement compatible (B), les différentes protéines SLF présentes peuvent communément causer la dégradation de toutes les *S*-RNases. La délétion d'un gène SLF (C) dans un haplotype entrainerait donc une perte partielle de compatibilité envers les *S*-RNases normalement reconnues exclusivement par cette protéine. Inversement, le pollen hétéroallélique (D) devrait devenir constitutivement auto-compatible, les protéines SLF codées par deux locus *S* distincts pouvant dégrader le spectre complet des *S*-RNases. La délétion d'un gène SLF dans ce pollen n'affectera sa compatibilité que si les *S*-RNases dégradées par cette protéine SLF mutée ne peuvent pas être dégradées par une autre des protéines SLF présentes.

S_{13} -RNases mais pas les S_5 et S_{11} -RNases, a été évalué, il a été observé que ce pollen restait compatible avec toutes ces S-RNases (Sun and Kao, 2013). Ces résultats indiquent non seulement que les S_5 et S_{11} -RNases sont dégradées par l'action d'autres SLF et non la S_2 -SLF1 mais aussi que d'autres SLF distinctes seraient capable de lier les S_3 , S_7 et S_{13} -RNases. Ceci pourrait suggérer que ce système aurait évolué de façon à sélectionner au moins deux protéines SLF capables de lier une même S-RNase afin d'éviter les effets délétères d'une mutation au niveau d'un gène SLF (Sun and Kao, 2013). Toutefois, cette hypothèse devra être testée expérimentalement par des expériences de suppressions multiples car la suppression de S_2 -SLF1 n'étant pas complète dans les plantes transgéniques mentionnées (Sun and Kao, 2013), il reste toujours possible que de petites quantités de cette protéine soient suffisantes à la dégradation des S_3 , S_7 et S_{13} -RNases. Le modèle de dégradation des S-RNases par un pollen S constitué de multiples protéines F-box peut aussi, de manière similaire au modèle précédent, facilement expliquer le rejet du pollen hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ par une S-RNase à double spécificité S_{11}/S_{13} chez *Solanum chacoense* (Matton *et al.*, 1999) à la différence près que dans ce nouveau modèle, un tel phénotype serait causé par la perte de la capacité de liaison entre cette S-RNase modifiée et les protéines F-box responsables de la dégradation des S_{11} - et S_{13} -RNase dans les haplotypes S_{13} et S_{11} , respectivement. La présence conjointe de ces F-box dans le pollen hétéroallélique $S_{11}S_{13}$ ne permettant non plus la dégradation de la S_{11}/S_{13} -RNase, ce pollen serait donc rejeté. Il est cependant encore indéterminé si la fonction pollen S chez *Solanum chacoense* est assurée par une seule ou plusieurs protéines de type SLF.

Toutefois, de plus en plus d'évidences semblent confirmer que pollen S est bien constitué de multiples protéines de type SLF chez la plupart des familles présentant une AI basée sur les S-RNases, ce qui suggère que le modèle d'AI basé sur un unique pollen S, présenté en section précédente, pourrait être rendu obsolète à très court terme. Ainsi, chez plusieurs *Solanaceae* comme *Petunia inflata* (Kubo *et al.*, 2010) et *Nicotiana glauca* (Wheeler and Newbigin, 2007), tout laisse effectivement croire que le déterminant Pollen S est codé par plusieurs classes de gènes SLF. Les données rapportées supportent la même conclusion chez les *Plantaginaceae* (Zhou *et al.*, 2003) et chez les *Maloideae*, spécifiquement pour *Malus domestica* chez lequel la présence de deux gènes similaires à 87.5%, désignés SFBB (*S*-locus F-Box Brothers) et qui semblent coder conjointement pour pollen S, a été rapportée (Sassa *et*

al., 2007). Des analyses plus récentes chez *Malus* (Minamikawa *et al.*, 2010) et *Pyrus pirifolia* (Aguiar *et al.*, 2013; Kakui *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2011) soutiennent eux aussi l'hypothèse d'un pollen *S* multipartite. *Solanum chacoense* faisant partie des *Solanaceae*, il est par conséquent très probable que pollen *S* soit aussi constitué de multiples protéines SLF chez cette espèce. Chez les *Prunoideae* par contre, un modèle d'AI basé sur un unique déterminant pollen *S* reste encore pour le moment plausible, bien que ce dernier soit fondamentalement différent de celui présenté en section précédente, des particularités dans ce groupe suggérant l'existence potentielle de mécanismes d'AI distincts des autres familles et sous-familles (voir section suivante).

3.4.5. Des divergences chez les *Prunoideae* suggèrent un modèle alternatif

En effet, si les *Solanaceae*, *Rosaceae* et *Plantaginaceae* partagent bien la S-RNase comme déterminant stylaire de l'AI et une (ou plusieurs) protéines F-box comme déterminant pollinique, ceci ne veut pas nécessairement dire que les mécanismes de rejet du pollen sont conservés chez tous ces membres. Par exemple, le pollen hétéroallélique présente une compatibilité constitutive chez les *Solanaceae*, *Plantaginaceae* et la sous-famille *Maloideae* des *Rosaceae* mais reste incompatible chez la sous-famille *Prunoideae* de ces dernières (Tao and Iezzoni, 2010). L'analyse des loci *S* révèle aussi plusieurs différences entre les *Prunoideae* et les autres familles et sous-familles. De fait, bien que plusieurs protéines F-box soient effectivement présentes au locus *S* chez les *Prunoideae*, contrairement aux autres espèces ces dernières ne montrent pas de forte similarité avec SFB, le candidat pollen *S* dans ce groupe. De plus, plusieurs d'entre elles sont exprimées au niveau stylaire et leur variabilité est très limitée comparativement aux autres gènes de type SFB (Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003a). Il est donc possible que dans cette sous-famille, le déterminant pollen *S* soit codé par un unique gène SFB, la variabilité entre allèles étant similaire à celle observées entre les allèles de S-RNases correspondantes (Ushijima *et al.*, 2003).

Un autre aspect qui distingue les *Prunoideae* des autres familles concerne l'analyse des mutations touchant le déterminant pollen *S*. Chez les *Solanaceae* et *Plantaginaceae*, des mutants pollen *S* complets n'ont jamais été rapportés, probablement parce qu'une telle perte de

fonction entrainerait le rejet constitutif du pollen, ce dernier n'étant plus en mesure de dégrader aucune S-RNase (Hua *et al.*, 2008). Toutefois, des mutants pollen *S* partiels ont été rapportés chez *P. pyrifolia*, où le pollen d'un haplotype désigné S_{4m} est non seulement incompatible avec l'haplotype stylaire S_4 mais est aussi rejeté par des styles comportant l'haplotype S_1 (Saito *et al.*, 2002). Cette perte partielle de compatibilité par rapport à l'haplotype S_4 sauvage semble due à une mutation au niveau d'un des gènes SFB présent au locus *S* (Kakui *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2008). Chez les *Prunoideae*, par contre, les mutations touchant SFB semblent être liées à une perte de l'AI (Sassa *et al.*, 2010). Ainsi, chez *Prunus avium* et *Prunus mume*, les haplotypes S_{4^*} , S_f et S_{3^*} sont auto-compatibles et présentent des mutations au niveau des gènes SFB prévenant l'expression de protéines fonctionnelles (S_{4^*} et S_f) (Ushijima *et al.*, 2004) ou une délétion complète du gène SFB (S_{3^*}) (Sonneveld *et al.*, 2005). Cette auto-compatibilité en absence d'un pollen *S* fonctionnel a suggéré la présence d'un mécanisme général d'inactivation ou de dégradation des S-RNases, encore non identifié (Sonneveld *et al.*, 2005). Une telle hypothèse impliquerait donc que la fonction de pollen *S* chez *Prunus* serait, en totale opposition aux observations chez les autres espèces, liée à la protection des S-RNases lors de croisements incompatibles. Un tel mécanisme pourrait expliquer l'absence d'effet hétéroallélique chez les *Prunoideae*, deux pollen *S* distincts dans un unique tube pollinique prévenant alors la dégradation potentielle de deux S-RNases distinctes, entraînant ainsi l'auto-incompatibilité. Une telle hypothèse, qui reste à être confirmée expérimentalement, soulève évidemment de nombreuses questions quant au mode d'évolution d'un tel mécanisme spécifique au *Prunoideae*, considérant que les S-RNases elles-mêmes semblent avoir divergé avant la spéciation (Igit and Kohn, 2001).

3.4.6. D'autres molécules sont aussi impliquées dans les mécanismes d'auto-incompatibilité de type *Solanaceae*

Le locus *S* est nécessaire mais pas suffisant à l'AI, car son transfert dans une plante dépourvue de système d'AI ne lui confère pas la capacité de rejet de l'auto-pollen (Beecher and McClure, 2001; Beecher *et al.*, 2001; Bernatzky *et al.*, 1995; McClure *et al.*, 2000). Un allèle *S* d'une lignée auto-compatible de *Petunia hybrida* est par contre fonctionnel chez une progéniture hybride issue d'un croisement avec une plante de *Petunia inflata* auto-

incompatible (Ai *et al.*, 1991). Ceci suggère la présence chez *P. inflata* de facteurs nécessaires à l'AI mais absents chez *P. hybrida*, ce qui renforce l'hypothèse que des facteurs à l'extérieur du locus *S* sont requis pour l'AI. De fait, plusieurs protéines non liées au locus *S* mais impliquées dans l'AI ont été identifiées à ce jour (Franklin-Tong, 2008; McClure *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011b; Sassa *et al.*, 2010). Tous ces facteurs, regroupés sous le terme de « modificateurs », sont classés en deux catégories : les modificateurs de type I qui modulent l'expression des S-RNases et les modificateurs de type II qui agissent sans moduler l'expression des S-RNases, des SLFs ou d'autres facteurs connus (Cruz-Garcia *et al.*, 2005; Tsukamoto *et al.*, 2003). Les modificateurs de type I sont très peu caractérisés et ne sont pas décrits dans ce travail, leur effet n'étant généralement décrit qu'au niveau génétique (Hosaka and Hanneman, 1998). Les modificateurs de type II sont mieux caractérisés, même si leurs modes d'actions restent encore peu connus.

La protéine SBP1 (S-RNase Binding Protein 1) est un modificateur de type II initialement identifié par criblage double hybride de levures en utilisant la région N-terminale de la *S*₁-RNase de *P. hybrida* comme appât et une banque d'ADN complémentaire pollinique comme proie (Sims and Ordanic, 2001). Ses homologues chez *Solanum chacoense* et *P. inflata* furent identifiés par la suite par une méthode similaire en utilisant des appâts constitués des régions HV (Hua and Kao, 2006; O'Brien *et al.*, 2004), SBP1 dans toutes ces expériences n'étant pas en mesure d'interagir avec des appâts formés de séquences complètes de S-RNases. Toutefois, cette limitation ne dérive probablement que d'une difficulté à exprimer des S-RNases complètes dans les levures. En effet, l'homologue de SBP1 chez *Malus x domestica*, désigné MdSBP1, est capable de lier les S-RNases contenues dans des extraits stylaires lors d'analyses de type pull-down (Minamikawa *et al.*, 2013). La protéine SBP1 contient un domaine C-terminal RING (Really Interesting New Gene), caractéristique des E3 ubiquitine-ligases, suggérant un rôle dans la dégradation des S-RNases. SBP1 ne montre toutefois pas de polymorphisme entre haplotypes, n'est pas codé au locus *S*, est exprimé dans tous les tissus et lie les S-RNases de façon non-haplo-type-spécifique, ce qui invalide un rôle possible en tant que déterminant pollen *S* (Sims, 2012). Chez *P. inflata*, il a été démontré par des analyses de type pull-down et double hybride de levures que SBP1 était capable de lier les protéines PiSLF₁ et PiSLF₂ ainsi que CUL1 et une E2, suggérant son implication dans un complexe E3

atypique responsable de l'ubiquitination des S-RNases, tel que démontré chez *P. inflata* (Hua and Kao, 2006). SBP1 occuperait donc dans ce complexe le rôle qu'occupent les deux protéines SKP1 et RBX1 dans les complexes SCF typiques. Cette hypothèse est supportée par l'absence inattendue de liaison entre les protéines PiSLF et les homologues SKP1 chez *P. inflata* (Meng *et al.*, 2011a) ainsi que par la capacité de PiSBP1 à catalyser l'ubiquitination des S-RNases *in vitro* en présence d'une E1 et d'une E2 (Hua and Kao, 2008). SBP1 est par ailleurs aussi capable, tel que démontré par des analyses de type double hybride de levures chez *Nicotiana glauca*, de rentrer en interaction avec plusieurs glycoprotéines stylaires impliquées dans la croissance pollinique et l'AI comme les protéines 120 kDa et NaTTS (*Nicotiana glauca* Transmitting Tract Specific protein) (Lee *et al.*, 2008) (voir plus bas). Cette multitude de ligands potentiels, ainsi que la nature ubiquitaire de SBP1 dans les tissus, suggère pour cette protéine un rôle plus large que la seule AI. Cette conjecture pourrait être supportée par le fait qu'à ce jour aucune analyse de suppression de SBP1 n'a été rapportée, cette dernière étant donc potentiellement létale.

Contrairement aux SLFs de *P. inflata*, pollen *S* chez *Antirrhinum hispanicum* semble bien former un complexe E3 de type SCF. En effet, des criblages double hybride de levures utilisant AhSLF-S₂ comme appât ont identifié dans une banque pollinique d'ADN complémentaire une protéine similaire à SKP1, désigné AhSSK1, qui lie la région N-terminale de AhSLF-S₂ (Huang *et al.*, 2006). AhSSK1 est exprimé spécifiquement dans le pollen, ne montre pas de polymorphisme allélique et n'a pas d'orthologue connu chez *Arabidopsis thaliana*, suggérant un rôle spécifique à l'AI. La démonstration par analyse *pull-down* d'une liaison entre AhSSK1, AhSLF, les S-RNases et CUL1 supporte donc l'hypothèse du recrutement de AhSLF dans un complexe SCF typique (Huang *et al.*, 2006). L'orthologue de AhSSK1 chez *P. hybrida*, désigné PhSSK1 (Zhao *et al.*, 2010) présente des caractéristiques similaires et une réduction de son expression par ARN interférant cause une réduction de la fertilité du pollen normalement compatible. Ce résultat est consistant avec l'hypothèse qu'un complexe E3 de type SCF incluant PhSSK1 cause l'ubiquitination des S-RNases. Des résultats similaires ont été observés chez *Prunus avium*, où l'orthologue de AhSSK1 montre bien une liaison avec PavSFB (Matsumoto *et al.*, 2012), ainsi que chez *Pyrus bretschneideri*, chez lequel il a été démontré que deux protéines de type SSK, PbSSK1 et PbSSK2, étaient capable

de former avec des PbSLF ou PhSLF, ainsi que PbCUL1, des complexes SCF typiques (Xu *et al.*, 2013). De plus, l'analyse phylogénétique des séquences de type SSK chez les *Solanaceae*, *Plantaginaceae* et *Rosaceae* indiquent qu'elles forment un clade monophylétique unique, ce qui suggère que ces familles partagent des mécanismes moléculaires et biochimiques communs dans le cadre de l'AI (Xu *et al.*, 2013). Pourtant, les études chez *P. inflata* n'ont pas démontré d'interaction entre PiSSK1 et PiSLF, malgré le fait que toutes les variantes alléliques de PiSLF testées lient SBP1 (Meng *et al.*, 2011a). Ceci suggère donc paradoxalement que SBP1 et non SSK1 serait impliqué dans le complexe E3 chez cette espèce. Toutefois, il est possible que les deux types de complexes, comprenant des protéines de type SSK ou SBP, soient tous deux impliqués dans des mécanismes distincts dans le cadre de l'AI, bien que cette hypothèse reste à démontrer.

Un autre facteur nécessaire à l'AI et non lié au locus *S* est une protéine désignée 120 kDa. Cette glycoprotéine basique est spécifique aux tissus du style où elle est sécrétée dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission. Sa taille prédite est de 78 kDa, la taille de 120 kDa observée sur gels SDS-PAGE étant due à sa glycosylation (Lind *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1997). Ses caractéristiques l'associent aux protéines de type arabinogalactanes (AGP), des protéoglycanes complexes présents dans tous les tissus végétaux qui se caractérisent par leur haute teneur en O-Glycosylation et en résidus hydroxyprolines (Nguema-Ona *et al.*, 2012). Cette famille très large de protéines est impliquée dans des nombreux processus (Ellis *et al.*, 2010), particulièrement dans le développement floral (Losada and Herrero, 2012), la croissance pollinique et la fécondation (Majewska-Sawka and Nothnagel, 2000). Avec d'autres AGPs, comme les protéines PELPIII (Pistil-specific Extensin-Like Proteins) (de Graaf *et al.*, 2003) ou TTS (Transmitting-Tract-Specific) (Cheung *et al.*, 1995; Sommer-Knudsen *et al.*, 1998), la protéine 120 kDa peut lier des S-RNases immobilisées sur résine de chromatographie (Cruz-Garcia *et al.*, 2005). Cependant, PELPIII et TTS ne semblent pas avoir d'effet sur l'AI (Cruz-Garcia *et al.*, 2005), tandis que la suppression de 120 kDa chez *Nicotiana* cause l'auto-compatibilité chez les plantes transgéniques (Hancock *et al.*, 2005). L'immunolocalisation de 120 kDa dans des tubes polliniques démontre que cette dernière est localisée à la périphérie des compartiments vacuolaires dans lesquels les S-RNases sont séquestrées (Goldraij *et al.*, 2006). Toutefois, 120 kDa n'est pas requise pour l'import des S-

RNases, sa suppression n'affectant pas leur entrée dans le pollen (Goldraij *et al.*, 2006). Le rôle potentiel de la liaison, observée chez *Nicotiana*, entre 120 kDa et la protéine SBP1 *alata* (Lee *et al.*, 2008) (voir plus haut) reste par ailleurs à être établi.

Un dernier facteur stylaire, non lié au locus *S*, essentiel à l'AI et désigné HT fut isolé par hybridation différentielle des transcrits styloires de lignées auto-compatibles et auto-incompatibles de *Nicotiana* (McClure *et al.*, 1999). HT est une protéine acide de 8.6 kDa riche en résidus asparagines et aspartates qui est sécrétée au niveau de la MEC des tissus styloires mais ne présente aucune homologie connue et aucune variabilité allélique. Le pic d'accumulation des transcrits HT lors du développement floral coïncide avec le moment de transition des styles vers l'AI et la suppression de son expression par introduction d'un ARN antisens cause une auto-compatibilité partielle des plantes transgéniques (McClure *et al.*, 1999). De plus, les gènes HT ne sont pas fonctionnels chez plusieurs espèces auto-compatibles chez les *Solanaceae*, comme *Solanum lycopersicum* et *Solanum pimpinellifolium* (Kondo *et al.*, 2002b). Chez *S. chacoense*, deux homologues de HT, HT-A et HT-B, qui ne présentent que 50% d'identité entre eux, ont été identifiés (O'Brien *et al.*, 2002). La suppression de leur expression n'affecte l'AI que dans le cas de HT-B, orthologue probable de HT chez *S. chacoense*, les lignées les plus réprimées démontrant comme chez *Nicotiana* une perte partielle de l'AI (O'Brien *et al.*, 2002). Cette perte d'AI est aussi accompagnée par une augmentation de la longévité florale avant abscission (O'Brien *et al.*, 2002). L'orthologue de HT-B chez *Petunia* a aussi des caractéristiques similaires (Puerta *et al.*, 2009). L'absence d'homologie et de motifs fonctionnels connus rend l'analyse de la fonction de HT-B difficile. Cependant, des observations au microscope confocal suggèrent que la présence de HT serait liée à la libération des S-RNases d'un compartiment vacuolaire, dans lequel elles seraient séquestrées, vers le cytoplasme lors des étapes initiales des réactions d'AI. Lors de croisements compatibles, la protéine HT-B semble par contre dégradée, tel que démontré par immuno-buvardage (Goldraij *et al.*, 2006). La fonction biochimique de HT dans un tel mécanisme reste toutefois encore à déterminer (voir section suivante).

Des analyses récentes suggèrent que HT est régulée par l'activité de NaStEP (*Nicotiana alata* Stigma-Expressed Protein), une protéine similaire aux inhibiteurs des protéases de type Kunitz (Jimenez-Duran *et al.*, 2013). Identifiée à l'aide d'une banque

stylaire d'ADN complémentaire de *N. alata* par analyse différentielle des transcrits présents chez cette espèce auto-incompatible, mais absent chez *Nicotiana plumbaginifolia* (auto-compatible), NaStEP est une protéine stigmat-spécifique exprimée à maturité florale et localisée dans la vacuole mais libérée dans les exsudats stigmatiques lors de la pollinisation (Busot *et al.*, 2008). NaStEP est incorporée aux tubes polliniques en croissance et sa suppression entraîne l'auto-compatibilité (Jimenez-Duran *et al.*, 2013), suggérant pour NaStEP un rôle d'activateur pour HT. En effet, chez ces transgéniques, HT semble être dégradée dans les croisements compatibles et incompatibles, plutôt que dans les seuls croisements compatibles, comme pour les plantes de type sauvage (Jimenez-Duran *et al.*, 2013).

3.4.7. Un modèle d'auto-incompatibilité basé sur la séquestration des S-RNases

Suite à l'observation de la présence des S-RNases à l'intérieur d'un compartiment vacuolaire dans les tubes polliniques lors des étapes initiales des réactions d'AI, et à la démonstration de la dégradation de la protéine HT lors des croisements compatibles chez *Nicotiana alata* (Goldraij *et al.*, 2006), un autre modèle d'AI a été proposé. Ce modèle, dit de la séquestration des S-RNases (Fig. I.9), tente d'intégrer dans ses mécanismes plusieurs molécules ayant un rôle démontré dans l'AI, contrairement au modèle de dégradation qui se base uniquement sur les interactions différentielles entre les S-RNases et les SLF/SFB. Le rôle de ces interactions reste par contre incertain dans le modèle de séquestration (McClure *et al.*, 2011).

Ce modèle est basé sur l'observation de la séquestration des S-RNases dans un compartiment, apparemment vacuolaire et délimité par la protéine 120 kDa, suite à leur pénétration dans les tubes polliniques jusqu'à 16h après pollinisation (Goldraij *et al.*, 2006), et ce dans tous les types de croisements. Cependant, 36h après pollinisation des différences entre types de croisements sont visibles : dans les croisements compatibles, les S-RNases restent séquestrées, tandis que dans les croisements incompatibles les S-RNases sont présentes au niveau du cytosol et le compartiment vacuolaire est absent (Goldraij *et al.*, 2006). Cette

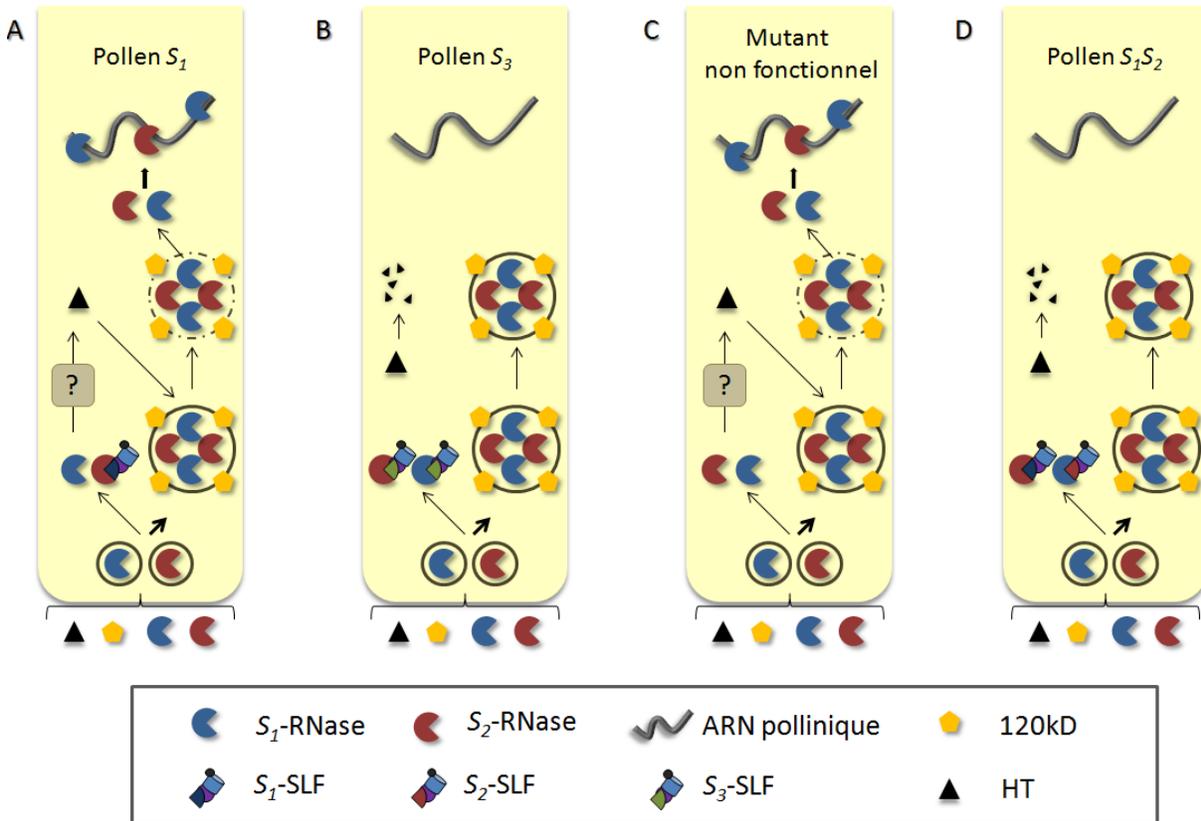


Figure I.9 : Modèle de séquestration des S-RNases.

Dans le modèle de séquestration des S-RNases, les S-RNases qui pénètrent les tubes polliniques s'accumulent au niveau d'un compartiment vacuolaire délimité par la protéine 120 kDa et sont donc isolées de leur substrat. Dans un croisement incompatible (A), il est proposé que l'interaction entre une petite fraction cytoplasmique de S-RNases et SLF prévienne, par un mécanisme encore indéterminé, le processus normal de dégradation de la protéine HT, qui pourra alors déstabiliser le compartiment vacuolaire, entraînant la libération des S-RNases au cytoplasme. Dans un croisement compatible (B), l'interaction entre les S-RNases cytoplasmiques et SLF ne peut prévenir la dégradation de HT, et les S-RNases restent séquestrées. Ce modèle prédit que la perte de fonction SLF (C) entraînerait une incompatibilité constitutive du pollen muté alors que le pollen hétéroallélique (D) serait constitutivement compatible. La protéine NaSTEP, qui contrôle potentiellement la stabilité de HT, n'est pas représentée dans cette figure et les mécanismes qui contrôlent l'activité de ces deux protéines dans le cadre de l'auto-incompatibilité ne sont pas connus.

disparition du compartiment vacuolaire semble liée à la présence de HT, une forte diminution des niveaux de cette protéine étant au contraire observée dans les croisements compatibles. Ces observations suggèrent ainsi un rôle pour HT dans la déstabilisation du compartiment dans lequel les S-RNases sont séquestrées (Goldraij *et al.*, 2006). Cette hypothèse est appuyée par la perte de l'AI observée chez des mutants partiellement dépourvus d'expression HT chez lesquels on observe une séquestration vacuolaire continue des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques, et ce dans tous les types de croisements (Goldraij *et al.*, 2006).

En contraste avec les prédictions du modèle de dégradation, ces expériences ne prédisent ou ne démontrent aucune décroissance des quantités de S-RNases dans les tubes polliniques compatibles (Goldraij *et al.*, 2006). Par ailleurs, HT semblerait être l'effecteur principal dans le déclenchement de la réaction d'AI, puisqu'il contrôlerait la relâche des S-RNases vers le cytosol dans les croisements incompatibles (Goldraij *et al.*, 2006). La stabilité de HT semble elle-même être liée à la présence d'une autre protéine, NaStEP (Jimenez-Duran *et al.*, 2013).

Le modèle de séquestration propose donc que dans un premier temps, les S-RNases pénètrent les tubes polliniques et sont ciblées vers un compartiment vacuolaire, délimité par la protéine stylaire 120 kDa, où elles sont isolées de leur substrat et donc inaptes à exercer leur effet cytotoxique. Une partie de la charge en S-RNase est toutefois mobilisée vers le cytoplasme où prend place leur interaction avec SLF/SFB, qui va déterminer le phénotype de rejet. Dans un croisement incompatible, ces interactions mènent à une stabilisation des niveaux de la protéine HT, dont la fonction suggérée est l'altération du compartiment séquestrant les S-RNases, leur libération au cytoplasme causant le rejet pollinique (Fig. I.9.A). Dans un croisement compatible, il est proposé que ces interactions mènent à la dégradation de HT et ainsi préviennent la déstabilisation du compartiment dans lequel les S-RNases sont séquestrées, permettant ainsi une croissance ininterrompue du tube pollinique (Fig. I.9.B). Ce modèle prédit aussi que la perte de fonction SLF/SFB entraînerait une incompatibilité constitutive du pollen muté (Fig. I.9.C) alors que le pollen hétéroallélique serait constitutivement compatible (Fig. I.9.D). Or, les mécanismes à la base de ces phénomènes sont encore indéterminés, la fonction biochimique de la plupart des protéines impliquées dans ce modèle restant incertaine. Bien que la nature des signaux menant à la dégradation ou la

stabilisation de HT soient non connus, il est intéressant de noter que ce modèle postule que la compatibilité du pollen est la condition passive, l'AI étant considérée comme un mécanisme actif de rejet (McClure *et al.*, 2011). Par opposition, le modèle de dégradation postule que le rejet pollinique est la condition passive et que ce sont les interactions différentielles entre S-RNases et SLF/SFB qui mènent à leur détoxification dans les tubes polliniques compatibles

Plusieurs questions demeurent quant à la validation du modèle de séquestration, en particulier le mécanisme par lequel une partie des S-RNases a accès au cytoplasme, car l'interaction des S-RNases avec un SLF/SFB cytoplasmique est essentielle pour la détermination de la spécificité de la réaction d'AI. Un transport rétrograde du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme a été suggéré (McClure, 2006) mais n'a jamais été confirmé. Par ailleurs, les mécanismes contrôlant la stabilité de HT, ainsi que le rôle des complexes S-RNases/SLF/SFB dans ces derniers n'ont pas été caractérisés. Toutefois, plusieurs protéines semblables à HT, désignées HTL (HT Like) (Sassa and Hirano, 2006) ou HT-M (HT-Mijikai) (Kondo and McClure, 2008) et dépourvues de fonction dans l'AI, semblent être systématiquement dégradées lors de la pollinisation pour tout type de croisement, compatible et incompatible. Ces observations suggèrent que la dégradation de HT dans les croisements compatibles constitue un aspect normal de la croissance pollinique, et c'est plutôt sa stabilisation dans les croisements incompatibles que l'on doit chercher à comprendre (McClure *et al.*, 2011). Il a été suggéré que l'activité de la fraction cytoplasmique des S-RNases pouvait altérer suffisamment le métabolisme pollinique pour empêcher la dégradation de HT et ainsi permettre la libération du reste des S-RNases. L'AI dans ce cas serait considérée comme auto-renforcée (McClure *et al.*, 2011). La protéine NaStEP semble être impliquée dans la stabilisation de HT dans les croisements incompatibles car la dégradation de HT est observée dans tout type de croisement dans les styles d'une plante dépourvue de NaStEP. (Jimenez-Duran *et al.*, 2013). Un lien direct entre ces deux protéines devra toutefois être confirmé. Par ailleurs, considérant que HT ne semble pas elle-même localisée au niveau du compartiment vacuolaire séquestrant les S-RNases, un lien direct entre cette protéine et la déstabilisation endomembranaire reste à établir, d'autant plus que HT ne comporte pas de domaine intra-membranaire. S'il a été suggéré qu'une possible interaction entre les membranes intracellulaires et HT repose sur des modifications post-traductionnelles

de cette dernière, considérant les différences entre sa taille théorique et la taille observée sur gel SDS-PAGE (Kondo and McClure, 2008; McClure *et al.*, 1999), cette hypothèse n'a jamais été confirmée expérimentalement. De plus, s'il semble que les protéines HT et HT-M soient présentes dans la fraction microsomiale d'extraits protéiques stylaires de *Nicotiana alata* soumis à une ultracentrifugation, la protéine HT elle-même semble être en majorité présente sous une forme soluble alors que les protéines HT-M sont exclusivement présentes dans le culot (Kondo and McClure, 2008). Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'extrapoler quant à la localisation de HT une fois ce dernier intégré aux tubes polliniques. La fonction de HT dans l'AI reste donc encore largement indéterminée. Enfin, étant donné que la dégradation haplotype-spécifique des S-RNases compatibles n'est pas requise dans ce modèle, le rôle des protéines F-box dans l'AI resterait encore à déterminer. Une intégration des deux modèles de dégradation et de séquestration reste toutefois possible. Si on admet que les mécanismes prônés par le modèle de dégradation constituent l'étape initiale de reconnaissance entre la fraction cytoplasmique des S-RNases et SLF/SFB avant la libération éventuelle du reste de la charge des S-RNases, les interactions spécifiques entre ces protéines mènent à la dégradation des S-RNases compatibles et à la non-dégradation des S-RNases incompatibles. Dans les croisements compatibles, la dégradation de toutes les S-RNases cytoplasmiques permettraient la dégradation normale de HT et la séquestration du reste des S-RNases. Dans les croisements incompatibles, les S-RNases non-dégradées seraient en mesure d'altérer suffisamment le métabolisme pollinique pour empêcher la dégradation de HT et ainsi permettre la libération du reste des S-RNases dans un processus-auto renforcé. A ce jour, aucune évidence d'un tel mécanisme n'a toutefois été rapportée.

4. Démarche scientifique et objectifs du projet de recherche

Le thème conducteur des travaux présentés dans cette thèse est la détermination du rôle joué par certaines caractéristiques conservées des S-RNases dans l'AI, ainsi que la recherche de protéines interagissant possiblement avec les S-RNases, dans le but de caractériser et d'améliorer des connaissances quant à leurs fonctions dans le rejet pollinique. Bien qu'un rôle direct pour les S-RNases dans les réactions d'auto-incompatibilité ait été démontré depuis longtemps (Lee *et al.*, 1994; McClure *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1995), il est surprenant de

constater qu'à ce jour leurs fonctions exactes dans le rejet des tubes polliniques et leur impact effectifs sur ces derniers demeurent largement indéterminés (voir sections 3.4.2.4 et suivantes). Par ailleurs, en dehors des études de modification de leur activité par mutagenèse dirigée (Huang *et al.*, 1994) ou des tentatives de changement de spécificité par des substitutions au niveau des régions HV (Kao and McCubbin, 1996; Matton *et al.*, 1999; Matton *et al.*, 1997; Zurek *et al.*, 1997), peu d'études de caractérisations fonctionnelles sur les différentes régions caractéristiques des S-RNases ont été rapportées. Depuis une décennie (Sijacic *et al.*, 2004), les études sur l'AI se sont concentrées sur l'identification et la caractérisation des protéines qui constituent le déterminant pollen *S* mais, ce faisant, beaucoup de questions relatives aux fonctions des S-RNases dans l'AI sont restées inexplorées. Par exemple, l'investigation du rôle de la glycosylation des S-RNases, une caractéristique parfaitement conservée chez ces dernières, n'a pas été ré-abordée depuis près de vingt ans (Karunanandaa *et al.*, 1994) alors qu'il a plus récemment été démontré que la glycosylation pouvait affecter les tests de dégradation *in vitro* des S-RNases par les protéines SLF (Hua and Kao, 2006). Enfin, bien que l'identification de pollen *S* chez les différentes espèces utilisant un tel système d'AI soit effectivement un objectif important, de nombreuses autres protéines sont aussi impliquées dans les réactions d'AI (voir section 3.4.6) et leur identification et la caractérisation de leur rôle dans l'AI sont aussi des buts centraux à la compréhension globale des mécanismes de l'AI (McClure *et al.*, 2011). Les chapitres suivants, qui ont été publiés sous forme d'articles scientifiques dans des revues spécialisés, présentent donc plusieurs analyses que nous avons réalisées chez notre organisme modèle, *Solanum chacoense*. Leur thème central est le fonctionnement des S-RNases, en particulier la caractérisation fonctionnelle de certaines de leurs caractéristiques ainsi que la recherche de ligands polliniques potentiels. Nous avons ainsi cherché à élucider en partie le destin des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques dans le cadre de l'auto-incompatibilité gamétophytique chez *Solanum chacoense*, aussi bien au niveau de leur fonction qu'au niveau de leurs modifications ou interactions possibles dans les tubes polliniques en croissance.

L'objectif de notre première étude était la caractérisation du rôle de la région C4 des S-RNases dans leur fonction dans l'AI. Il est généralement accepté, bien que non formellement démontré, que les régions C1 et C5 participent au repliement et à la stabilisation de la structure

des S-RNases, alors que les régions C2 et C3 font parti du site catalytique (Ioerger *et al.*, 1991). Bien qu'on lui ait aussi attribué arbitrairement un rôle structural, la région C4 est atypique dans la mesure où elle comporte de nombreux résidus chargés, exposés en surface de la protéine, qui pourraient constituer un potentiel site de liaison avec un ligand (Ida *et al.*, 2001b; Matsuura *et al.*, 2001). La région C4 est aussi intéressante dans la mesure où elle diffère entre S-RNases de *Solanaceae* et de *Rosaceae* (Ushijima *et al.*, 1998), bien que fortement conservée individuellement à l'intérieur de ces groupes. Certaines *Rosaceae* montrant des caractéristiques distinctes des autres genres et familles au niveau de leur système d'AI (Tao and Iezzoni, 2010), un rôle non uniquement structural semblait donc plausible pour la région C4. Il est ainsi possible que cette région puisse identifier les S-RNases comme telles auprès d'un transporteur spécifique, responsable de leur pénétration dans les tubes polliniques, ou encore d'autres interactants. Ceci est important car les mécanismes par lesquels les S-RNases pénètrent les tubes polliniques demeurant encore indéterminés (voir section 3.4.2.6). De plus, puisqu'un parmi les deux résidus lysine conservés chez toutes les S-RNases de *Solanaceae* est localisé en région C4, il semblait aussi envisageable que ce résidu puisse constituer une cible idéale pour le processus d'ubiquitination qui contrôle la dégradation des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques compatibles. Ainsi, dans le but de formellement déterminer si la région C4 est impliquée dans une ou plusieurs de ces fonctions, nous avons donc généré plusieurs mutants de la *S*₁₁-RNase modifiés au niveau de la région C4 de façon à altérer la structure, les niveaux d'affinités possible pour un ligand ou encore les possibilités d'ubiquitination de ces S-RNases. Les plantes exprimant ces transgènes ont été évaluées par des tests de croisements et des analyses de type Western-blot afin d'évaluer la possibilité que certaines modifications de la région C4 puissent prévenir la fonction normale des S-RNases.

L'objectif de notre seconde étude était de comprendre le rôle de la glycosylation des S-RNases dans l'AI. Bien que l'implication directe de la glycosylation dans la détermination allélique des S-RNases ait été invalidée par la démonstration qu'une S-RNase dépourvue de site de glycosylation était toujours incompatible (Karunanandaa *et al.*, 1994), il est difficile de réconcilier la conservation d'un site de glycosylation chez toutes les S-RNases avec une absence de fonction dans l'AI (voir section 3.4.2.7). Il a d'ailleurs été suggéré auparavant qu'une S-RNase dépourvue de glycosylation puisse acquérir un phénotype de rejet constitutif

en prévenant son interaction avec un potentiel inhibiteur (Oxley *et al.*, 1996). Cette hypothèse n'avait jamais été testée, et la mise en évidence que des sites de glycosylation peuvent être ciblés par des protéines F-box (Yoshida, 2007) a suggéré un mécanisme biochimique pour cette hypothèse. En effet, si les sucres conjugués aux S-RNases constituaient une cible reconnue par pollen *S* sous la forme d'une ou plusieurs protéines SLF, leur suppression pourrait prévenir la dégradation de ces S-RNases, permettant ainsi une activité cytotoxique constitutive et donc un rejet incondtionnel de tout pollen (voir aussi section 3.4.2.7). Afin de tester cette hypothèse, nous avons donc généré par mutagenèse dirigée une S_{11} -RNase dépourvue de site de glycosylation. Nous souhaitons de plus aussi tester l'hypothèse, telle que proposée chez *Nicotiana sylvestris* (Golz *et al.*, 1998), selon laquelle la présence de sucres dans les régions HV des S-RNases pourrait altérer leur phénotype de compatibilité en prévenant leur reconnaissance spécifique. Pour ce faire, nous avons généré deux nouveaux mutants de la S_{11} -RNase comportant un site additionnel de glycosylation en région HVa et dont le site natif en région C2 fût conservé ou éliminé, respectivement. Les plantes exprimant ces différents transgènes ont été évaluées par des tests de croisements et des analyses de type Western-blot afin d'évaluer la possibilité que la présence ou l'absence de sucres conjugués au niveau de certaines régions des S-RNases puissent prévenir leur fonction normale.

Enfin, l'objectif de notre dernière étude était l'identification de facteurs polliniques interagissant avec les S-RNases et potentiellement impliqués dans les mécanismes d'AI. Il a déjà été démontré que de nombreuses protéines stylaires peuvent rentrer en interaction avec les S-RNases (voir section 3.4.6), même si l'implication exacte et la fonction précise de la majorité de ces protéines dans les mécanismes de l'AI restent encore à établir (Sims, 2012; Sims *et al.*, 2010). Par contre, au niveau pollinique, à l'exception des protéines SLF/SFB (Hua and Kao, 2006), SBP (Hua and Kao, 2006; Meng *et al.*, 2011a; Sims and Ordanic, 2001) et des autres protéines impliquées dans la formation des complexes $SCF^{SLF/SFB}$ (voir section 3.4.6), très peu de protéines pouvant interagir avec les S-RNases ont été rapportées (Sims, 2012). Les protéines constituant pollen *S* chez *Solanum chacoense* n'ayant pas à ce jour été formellement identifiées, la recherche de ligands polliniques pouvant lier les S-RNases pouvait théoriquement permettre soit l'identification de nouveaux facteurs polliniques potentiellement impliqués dans l'AI soit l'identification des orthologues de(s) SLF chez *Solanum chacoense*.

Nous avons d'abord réalisé des expériences d'interactions protéine-protéine avec des S-RNases immobilisées sur résine chromatographique incubées en présence d'extraits polliniques. L'identification des protéines retenues par les S-RNases a été réalisée par spectrométrie de masse. Bien que ces expériences n'aient pas permis l'identification de pollen *S* chez *S.chacoense*, elles ont permis d'identifier eEF1A comme un nouvel interactant potentiellement impliqué dans les réactions d'AI. La liaison entre les S-RNases et eEF1A a par la suite été validée par des expériences de type *pull-down*. eEF1A étant impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et le cytosquelette d'actine étant apparemment déstabilisé lors des réactions d'AI (Liu *et al.*, 2007; Roldan *et al.*, 2012), bien que la S-RNase n'interagisse pas directement avec l'actine (Matsumoto and Tao, 2012; Roldan *et al.*, 2012), nous avons aussi réalisé des analyses additionnelles de type *pull-down* en présence d'actine afin de mieux caractériser les liaisons entre ces différents facteurs.

Chapitre II. Molecular analysis of the conserved C4 region of the S_{11} -RNase of *Solanum chacoense*

Publication :

Ce chapitre a été publié dans le journal *Planta* (Springer-Verlag) sous forme électronique le 14 janvier 2005 (DOI : 10.1007/s00425-004-1470-8) (ISSN : 1432-2048) et sous forme papier dans le volume 221(4) : 531-7 en juin 2005 (ISSN : 0032-0935).

Attribution des travaux :

J'ai réalisé la majorité des manipulations expérimentales ayant donné lieu aux résultats présentés sous forme de figures dans ce manuscrit (incluant croisements, modélisations tridimensionnelles et Western-blot). X. Qin a préparé des constructions par mutagenèse dirigée et a réalisé l'analyse Northern présentée en figure III.2.b. G. Laublin a effectué la transformation et la régénération des plantes transgéniques. Les figures ont été préparées par les deux auteurs principaux et le manuscrit a été rédigé par M. Cappadocia, D. Morse, J. Soulard et X. Qin.

Molecular analysis of the conserved C4 region of the S_{11} -RNase of *Solanum chacoense*

Xike Qin*, Jonathan Soulard*, Geneviève Laublin, David Morse and Mario Cappadocia

** These two authors have contributed equally to this work.*

Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV)

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal

4101 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H1X 2B2

Corresponding author:

Mario Cappadocia

Abstract

The stilar component to gametophytic self-incompatibility in *Solanaceae* is an S-RNase. Its primary structure has a characteristic pattern of two hypervariable regions, involved in pollen recognition, and five constant regions. Two of the latter (C2 and C3) constitute the active site, while the highly hydrophobic C1 and C5 are believed to be involved in protein stability. We analyzed the role of the C4 region by site directed mutagenesis. A GGGG mutant, in which the four charged residues in the C4 region were replaced with glycine, did not accumulate to detectable levels in styles, suggestive of a role in protein stability. A R115G mutant, in which a charged amino acid was eliminated to reduce the potential binding affinity, had no effect on the pollen rejection phenotype. This suggests the C4 does not interact with partners such as potential pollen tube receptors facilitating S-RNase uptake. Finally, a K113R mutant replaced a potential ubiquitination target with arginine. However, this S-RNase acted as the wild type in both incompatible and compatible crosses. The latter crosses rule out a role of the conserved C4 lysine in ubiquitination.

Keywords : self-incompatibility, site-directed mutagenesis, *Solanum chacoense*, S-RNase

Introduction

Self-incompatibility (SI) is a prezygotic reproductive barrier used by Angiosperms to promote outcrossing, assure intraspecific genetic variability and prevent inbreeding. This cell-cell recognition mechanism involves interactions between gene products expressed in the pollen, and those expressed in specialized cells of the pistil. As a result, self-incompatible plants reject self- but accept non-self pollen (de Nettancourt, 1977, 2001). Among the various SI systems, the most widespread is the gametophytic, or GSI, where the genotype of the haploid pollen determines its own incompatibility phenotype.

Generally characterized by stylar rejection and typically found in species with wet stigmas and binucleate pollen, GSI is present in more than 60 families, and has been studied at the molecular level in the *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Campanulaceae*, *Poaceae* and *Papaveraceae*. With the exception of the *Poaceae* and *Papaveraceae*, all these families share an RNase-based GSI controlled by a highly complex *S*-locus with multiple *S*-haplotypes containing, among other elements, both the pistillar and the pollen determinants to SI (for recent reviews see (Franklin-Tong and Franklin, 2003; Kao and Tsukamoto, 2004)). Pollen rejection occurs when the *S*-haplotype of the haploid pollen matches either of the two *S*-haplotypes of the diploid pistil. The components to the SI reaction must be tightly linked or the system would break down, suggesting that the style and pistil components are physically close.

The pistillar determinant to SI was identified almost 15 years ago as a highly polymorphic stylar extracellular ribonuclease (S-RNase) (McClure *et al.*, 1989). The alignment of the deduced amino acid sequences of solanaceous S-RNases reveals a distinct pattern of five short conserved (designated C1 through C5) and two longer hypervariable (HV) regions. These latter contain the *S*-haplotype-specific sequences that constitute the determinants for pollen recognition (Matton *et al.*, 1997). The conserved C2 and C3 regions are hydrophilic and constitute the active site of the protein, as they contain the two conserved histidines essential for RNase activity (Green, 1994). The conserved C1, C4 and C5 regions are thought to be involved in stabilizing the core of the protein (Ioerger *et al.*, 1991). While this seems likely from the highly hydrophobic nature of the C1 and C5 regions, it is less

evident for the C4 region where half of the residues are charged. Intriguingly, although the C1, C2, C3, C5 regions of the *Solanaceae* and *Rosaceae* S-RNases share similar positions and sequences, a region conserved among the *Rosaceae*, and named RC4, has no homology to its counterpart in solanaceous species (Ushijima *et al.*, 1998). Thus, the role of the C4 region remains to be further investigated.

RNase activity is needed for self- pollen rejection (Huang *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994). This finding suggests that SI is caused by the cytotoxic action of the S-RNases degrading pollen tube RNA in *S*-haplotype-specific manner. Two models have been proposed to account for this. The receptor model proposes entry of the S-RNases inside the pollen tube is *S*-haplotype-specific, i.e. does not allow entry of S-RNases of different haplotypes, and implies that the pollen determinant to SI (pollen *S*-gene product) is membrane- or cell wall-bound (Dodds *et al.*, 1996b). The inhibitor model permits penetration of the S-RNases inside the pollen tube in *S*-haplotype-independent manner, and implies that the pollen *S*-gene product acts as a cytoplasmic inhibitor of non-cognate S-RNases (Kao and McCubbin, 1996; Thompson and Kirch, 1992). The finding that an S-RNase of one haplotype accumulates in the cytoplasm of pollen tubes of different *S*-haplotypes has provided experimental support for the inhibitor model (Luu *et al.*, 2000). This finding draws attention to the mechanism, still unknown, by which S-RNases penetrate inside the pollen tubes. It is tempting to speculate that a conserved domain of the protein might play such a role.

The pollen determinant to S-RNase-mediated SI has remained elusive for many years, but has finally been identified as an F-box family member (Sijacic *et al.*, 2004). The general role of F-box proteins in ubiquitin-mediated protein degradation (for review see (Pickart, 2004)) suggests a novel biochemical basis for the SI reaction, in which inhibition of activity is replaced by protein degradation. This new model requires the F-box protein not to trigger degradation when bound specifically to the recognition domain of its cognate S-RNase (incompatible crosses) and to cause degradation when not bound in an allele-specific manner (compatible crosses). The breakthrough has occurred with the discovery, in *Rosaceae* and *Scrophulariaceae*, of several F-box genes physically linked to the S-RNase gene (Ikeda *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2002; Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003a). Some were expressed in the pollen, and displayed levels of allelic sequence variability high enough to be considered

good candidates for being the pollen *S* gene. These were designated as *S*-haplotype-specific F-box genes (SFB) (Ikeda *et al.*, 2004; Ushijima *et al.*, 2003) or *S*-locus F-box genes (SLF) (Entani *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2002). The formal implication of F-box genes in SI has very recently been provided by the transgenic approach in *Petunia*. In a first study, the transformation of plants S_1S_1 , S_1S_2 and S_2S_3 haplotype with a transgene containing the pollen-expressed S_2 allele of the *P.inflata* SLF, has resulted in self-compatibility through the production of *S*-heteroallelic pollen (Sijacic *et al.*, 2004). Similarly, the transfer of S_2 SLF from *Anthirrhinum hispanicum* into an SI line of *Petunia hybrida*, converted the latter into SC (Qiao *et al.*, 2004a).

The aim of the present study was to investigate the role of the C4 region in solanaceous S-RNases. We were particularly interested in testing the hypothesis that the C4 region could be involved in S-RNase entry into the pollen tube or in mediating the compatibility response by either inhibiting S-RNase activity or by targeting the protein itself for degradation. In particular, assuming that ubiquitination is responsible for degradation of S-RNase in *Solanum*, we wanted to see if substituting the lysine in the S_{11} -C4, one of the few lysine residues conserved among solanaceous S-RNases, would disrupt the pathway leading to S-RNase inhibition. In *Anthirrhinum*, degradation of S-RNases is proposed to occur through F-box protein-mediated ubiquitination (Qiao *et al.*, 2004b). Our analyses showed no involvement of the C4 region in any of these functions, and support the idea that it plays a structural role.

Materials and methods

Plant materials

The diploid ($2n=2x=24$) *Solanum chacoense* self-incompatible genotypes used in the present study include two parental lines (obtained from the Potato Introduction Station at Sturgeon Bay, Wi) PI 458314 (called 314) which carries the S_{11} and S_{12} alleles and PI 230582 (called 582) which carries the S_{13} and S_{14} alleles. Other genotypes used here include plants L25 ($S_{11}S_{12}$), VF60 ($S_{12}S_{12}$) and G4 ($S_{12}S_{14}$, noted for its high regenerability *in vitro*) all of which have been described previously (Matton *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2001).

Transgenic plants and mutagenesis

The *S₁₁* genomic DNA was used as template for PCR-based mutagenesis. The mutant *S₁₁* with four amino acid substitutions, the GGGG construct, was generated in several steps. First, one pair of primers 5'-AAATCGGAACGCGAATCCTCCACCCAAACCA-3' (C4-A) and 5'-GAGACCATGGTTAAATCAGGCTTACAT-3' (NcoI-Met) was used to amplify a 0.5 kb mutated fragment corresponding to the sequence from the start codon to the C4 region (the mutated sequences are underlined and restriction sites are boxed). A second pair of primers 5'-GGAGGTGGGTTTGGTCTTCTGAG AACTCTCC-3' (C4-B) and 5'-CTCTGAATTCAAGGACATACATTTGATAG-3' (EcoRI-stop) was then used to amplify a 1.2 kb fragment corresponding to the sequence from the C4 to the end of the 3'-UTR. Lastly, the primers NcoI-Met and EcoRI-stop were used to amplify the 1.7 kb full length mutated *S₁₁* which was then cloned into pBluescript SK⁺ (Stratagene). A 1.4 kb HindIII-NcoI promoter fragment from the style-specific tomato chitinase gene (Harikrishna *et al.*, 1996) cloned separately into pBluescript, was merged with the mutated *S₁₁* at the NcoI site. Following digestion with Sall and EcoRI, the 3.1-Kb chimeric fragment containing chitinase promoter and the mutated *S₁₁* was cloned in the binary transformation vector pBIN19 (Clontech, Palo Alto, CA). The construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. Plants were transformed by the leaf disc method using the *S. chacoense* G4 genotype as described (Matton *et al.*, 1997)

For the additional constructs, a previous construct containing the chitinase promoter and wild type *S₁₁* in pBluescript SK⁺ was used as template for PCR-based mutagenesis using a kit (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). In the R115G construct, arginine was substituted with glycine using the primers 5'-TTGCGCTTAAAAGATGGTTTTGATCTTCTGAGA-3' and 5'-AACGCGAATTTTCTACCAA^AACTAGAAGACTCT-3'. In the K113R construct, lysine was substituted with arginine using the primers 5'-TTGCGCTTAAGAGATAGGTTTGATCTTCTGAGA-3' and 5'-AACGCGAATTCTCTATCC AA^ACTAG AAGACTCT-3'. All mutant constructs were cloned into vector pBIN19 as described above. All constructs were sequenced before and after transformation into *Agrobacterium tumefaciens* to confirm the sequence at the mutated site.

The presence of a transgene in DNA extracted from regenerated plants was verified by PCR using primers NcoI-Met and EcoRI-stop. These primers specifically amplify the S_{11} gene from the $S_{12} S_{14}$ background of the transformed host G4.

RNA and protein analysis

For determination of the amount of transgene accumulation, total RNA was extracted from the styles of transformed plants as described (Matton *et al.*, 1997). The RNA was electrophoresed on agarose gels, transferred to nylon membranes and hybridized to a radiolabeled probe prepared from the authentic S_{11} genomic DNA.

For measurement of accumulated S_{11} -RNase, total protein of freshly collected styles was extracted and electrophoresed on standard SDS gels. After transfer to nitrocellulose membranes, Western blot analysis was performed with an anti- S_{11} antibody raised against a 15 amino acid peptide corresponding to the HVa region (Matton *et al.*, 1999).

Genetic crosses

Genetic crosses were performed using fresh pollen from plants of known S -allele constitution and were monitored by fruit set. They were classified as fully incompatible if they resulted in no fruit formation after pollination, and compatible if fruits were formed after almost every pollination. Plants were classified as partially compatible when fruit set was between these two extremes. Where appropriate, pollen tube growth inside styles collected about 48 h after pollination, was monitored by epifluorescence microscopy using aniline blue staining (Matton *et al.*, 1997).

Results

The predicted three-dimensional structure of the S_{11} -RNase (Fig. II.1) indicates that the C4 region (amino acid sequence : LKDRFDLL) has 4 charged amino acids directed outwards. The architecture of the C4 region is striking and suggests the possibility that it may bind with high affinity to a protein partner either on the membrane or inside the cytoplasm of the pollen tube. To investigate the role of this highly conserved region, the sequence of the C4 region in

the wild type S_{11} -RNase was modified by site directed mutagenesis to produce a series of various constructs (Fig. II.1.b) that were introduced into the host genotype G4 ($S_{12}S_{14}$).

In construct GGGG, all four charged amino acids in C4 (.KDR.D..) were substituted with glycine (Fig. II.1.b). A total of 27 transgenic plants harboring the GGGG construct were crossed with S_{11} and S_{12} pollen from either 314 or L25 individuals (producing both S_{11} and S_{12} pollen). All crosses resulted in fruit formation. Pistils, examined by fluorescence microscopy, revealed the presence of numerous incompatible tubes arrested in the upper third of the style, together with numerous tubes entering the ovary. This semi-compatible response was interpreted as full rejection of S_{12} pollen, an expected behavior of the G4 host (Qin *et al.*, 2001), and full acceptance of S_{11} pollen.

The acceptance of S_{11} pollen, and the resultant compatible phenotype, could have resulted either from inability of the GGGG-S-RNase to enter pollen tubes or from below threshold levels of S_{11} -RNase accumulation. The molecular analyses clearly distinguished between these two possibilities: no S_{11} -RNase could be detected in any transgenic plant with an anti- S_{11} antibody (Fig. II.2.a). This failure to express the RNase at the protein level was not due to lack of the transgene, as PCR analysis revealed its presence in all regenerants (not shown), or to lack of transcription of the transgene, as Northern blot analysis showed high levels of transgene transcripts in about one third of the plants (Fig. II.2.b). Our previous transformation studies also show transgene expression in about one third the plants examined (Matton *et al.*, 1999; Matton *et al.*, 1997). Taken together, these results suggest that the mutated protein might be unable to fold properly and, as a result, is rapidly degraded soon after synthesis.

To avoid this potential problem, a less drastic mutagenesis was performed in the C4 region. In the R115G construct, only the arginine in position 115 was substituted with glycine (LKDGFDLL). In this experiment, a total of 35 transgenic plants were submitted to genetic analysis. The crosses revealed that 19 of them were fully or partially compatible with S_{11} pollen, whereas 16 fully rejected S_{11} pollen (Table II.I). The rejection of S_{11} pollen excluded the possibility that the modification in the C4 domain affected entry of the R115G S-RNase into the pollen tubes. Furthermore, all these transgenics accepted S_{13} pollen (the normal compatible response), excluding the possibility that this modification to the C4 region could

prevent binding to a general S-RNase inhibitor (Luu *et al.*, 2001). An impairment of the S-RNase to bind to the S-RNase inhibitor should lead, in fact, to full rejection of all pollen types, since the mutant S-RNase would remain fully active.

The western blots confirmed that plants fully incompatible with S_{11} pollen also displayed levels of transgenic S-RNase accumulation close to the values found in wild type plants (Fig. II.3.a), whereas individuals partially compatible with S_{11} pollen had lower levels of transgenic S-RNase in the styles. This is most evident if the ability of the styles to reject S_{11} pollen is plotted directly against the levels S_{11} -RNase in the styles as determined by densitometric scans (Fig. II.3.b).

To directly address the potential role of the C4 region in targeting the S-RNase for degradation by ubiquitin-mediated proteolysis, the conserved lysine was substituted with arginine in the K113R construct. A total of 35 transgenic plants were analyzed, of which 17 were fully or partially compatible with S_{11} pollen and nine fully rejected S_{11} pollen (Table II.II). The rejection of S_{11} pollen indicates that the modified S-RNase can enter the pollen tubes. Once again, densitometric scans of Western blots confirm the expected relationship between S-RNase levels and the pollen rejection phenotype (Fig. II.4). However, crosses with S_{13} pollen revealed full compatibility (Table II.II). This compatible response clearly rules out a role of the modified lysine in targeting the S-RNase to the proteasome.

Discussion

The analyses described here were undertaken to provide insight into the role played by the C4 domain in S-RNases. The C4 region is highly conserved in the solanaceous S-RNases (Richman *et al.*, 1996; Sassa *et al.*, 1996) and the crystal structure reveals an unusual and rather unique organization (Ida *et al.*, 2001a). The four charged amino acids extend outwards from the surface of the protein much like fingers from one hand, while the hydrophobic residues in this region are buried deep in the heart of the protein and in fact constitute an important element defining the RNA-binding fold at the active site of the protein. This organization is observed in the published structure of the *Nicotiana* S-RNase (Ida *et al.*, 2001a) and in the predicted structure of our S_{11} -RNase (Fig. II.1).

One interpretation of this structure is that the necessity of keeping the charged amino acids in the aqueous phase provides a mechanism for pushing the adjacent hydrophobic amino acids into the protein core. However, while this would explain the conserved pattern of charged and non-polar residues, it does not account for the conserved pattern of positively and negatively charged residues. This characteristic suggests instead an alternative role for the C4 region as a high-affinity binding site for other proteins.

The possibility that this region might bind other proteins was intriguing, as there are several candidates potentially binding to a region common to different S-RNases. One candidate is an RNase inhibitor similar to that proposed by the various inhibitor models (Kao and McCubbin, 1996; Luu *et al.*, 2001). Alternatively, the C4 (or more specifically a conserved lysine in this region) might be involved in directing the formation of an ubiquitinated intermediate. Lastly, the region might be involved in assuring S-RNase entry into the pollen tubes either alone or as part of a complex. While it is still unclear how many different stylar proteins enter pollen tubes (Lind *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1995) a mechanism clearly exists for non *S*-haplotype-specific uptake of S-RNases (Luu *et al.*, 2000).

The constructs used here were designed to assess all of these possibilities. First, if the charged residues are involved in maintaining the hydrophobic residues of the C4 region in the core of the protein, the GGGG construct should lack this stabilizing force. The position of the hydrophobic residues suggests they are likely to be important for the structure of the protein, so that this mutation might well produce a dramatic change in the three dimensional structure of the protein. Indeed, our results are consistent with this, as none of the transgenics accumulated detectable levels of the S-RNase despite an apparently normal range of mRNA accumulation. It is possible that the modified protein misfolds inside the endoplasmic reticulum (ER) lumen and thus becomes targeted for degradation (Kostova and Wolf, 2003). However, we cannot exclude the possibility that the choice of glycine itself may have influenced the stability of the protein structure. This issue could perhaps be explored by examining protein stability after other alterations (such as to alanines, for example).

The effects of the R115G mutation are expected to be much less drastic than the GGGG mutation, at least with regard to the three dimensional structure of the protein. However, thermodynamic considerations suggest that this single amino acid substitution might

have a large effect on the binding affinity with any potential partners. The formation of single ionic bond provides a standard free energy change of about -3 kcal/mol, and thus replacement of this arginine with glycine would be expected to change the equilibrium constant by a factor of 100. Our data indicates, however, that the levels of S-RNase needed for pollen rejection are not different from those observed in wild type or the K113R mutant (compare figures II.3 and II.4). This result provides no indication that additional substitutions in the C4 might provoke an effect on the phenotype, and thus suggests that this region is not directly involved in protein-protein interactions. We also note that a single glycine substitution can easily be accommodated without adverse effect on protein stability and RNase activity.

Ubiquitination can occur at specific lysine residues within a polypeptide chain (Batonnet *et al.*, 2004; Galluzzi *et al.*, 2001) presumably by recognition of a particular amino acid context around the targeted lysine. Amino acid sequence alignments of solanaceous S-RNases reveal that in almost all cases two lysines are present in the C4 region (Sassa *et al.*, 1996). In contrast, our S_{11} -RNase has only one, thus allowing a direct test of the potential role of the C4 in protein degradation. In the K113R mutant, lysine was replaced by arginine so that the charge of the protein would remain unchanged, and to thus minimize any effect of the mutation on the three dimensional structure of the protein. However, assuming that ubiquitination is responsible for degradation of S-RNase in *Solanum* as it is in *Anthirrhinum* (Qiao *et al.*, 2004b) and that the C4 lysine is used in targeting the protein for ubiquitination, the mutant S-RNase would be expected to reject all pollen types as it could no longer be degraded. Our results clearly demonstrate that the phenotype of K113R transgenics expressing wild type amounts of the mutant RNase are indistinguishable from wild type S_{11} -RNase with respect to its breeding behaviour with both S_{11} and S_{13} pollen. It is important to note that our results do not rule out ubiquitination of the S-RNases in mediating compatibility. However, they do clearly eliminate the possibility that the C4 lysine alone is the target. It is still possible that the other conserved lysine (in the C3 region) might play such a role or, alternatively, that other lysines in the protein can be used when the C4 lysine is lost.

Acknowledgements

We thank Drs. D. Luu and A. Zocchi for helpful discussions and Dr. B. Liu for a critical review of the manuscript. We also thank Drs. B. McClure and C. Gasser for graciously providing the chitinase promoter. We are grateful to G. Teodorescu for plant care. This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (MC) and Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (DM, MC).

Table II.I : Phenotypes of transgenic R115G plants.

Pistil Genotype $S_{12}S_{14}$	Transgenic Plant Phenotype			
	x $S_{11}S_{12}$ Pollen Donor		x $S_{13}S_{14}$ Pollen Donor	
	Comp ^a	Partial Comp	Incomp	Comp
Number of plants	16	3	16	35
Number of fruits per pollinated flowers	61/63	13/21	0/51	68/69

^a Comp, compatible ; Partial Comp, partially compatible ; Incomp, incompatible

Table II.II : Phenotypes of transgenic K113R plants.

Pistil Genotype $S_{12}S_{14}$	Transgenic Plant Phenotype			
	x $S_{11}S_{12}$ Pollen Donor		x $S_{13}S_{14}$ Pollen Donor	
	Comp ^a	Partial Comp	Incomp	Comp
Number of plants	17	9	9	35
Number of fruits per pollinated flowers	84/86	35/106	0/52	132/136

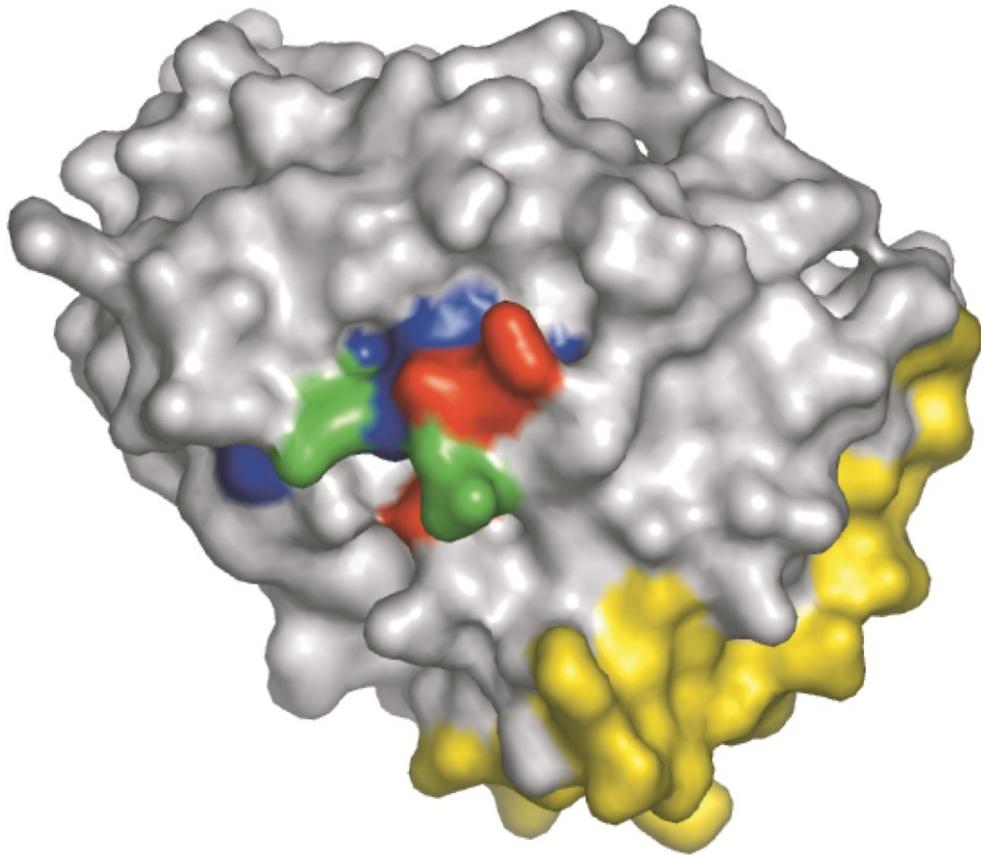
^a Comp, compatible ; Partial Comp, partially compatible ; Incomp, incompatible

Figure legends

Figure II.1 : Three-dimensional structure of the C4 domain in the S_{11} -RNase.

(a) Swiss-model structure prediction for the S_{11} -RNase sequence based on the structure of *Nicotiana alata* SF₁₁-RNase. The basic and acidic residues in the C4 domain are in red and green, respectively, while the hydrophobic residues are blue. The HV recognition domains in yellow are well separated from the C4 region. Alternate templates for threading, such as S₃ from *Pyrus pyrifolia* (Matsuura *et al.*, 2001) produce only slight variations in the predicted structure. (b) Amino acid sequences of the C4 regions in the wild type and mutant sequences used in the present study.

a



b

Genotype	C4 region sequence
S ₁₁ RNase	LKDRFDLL
GGGG	LGGGFGLL
R115G	LKDGFDLL
K113R	LRDRFDLL

Figure II.2 : Expression of the GGGG transgene at the protein and RNA levels.

(a) Western blot analysis of stylar protein extracts from six transgenic plants (lane 1, T16; lane 2, T21; lane 3, T24; lane 4, T25; lane 5, T26; lane 6, T34) using the anti- S₁₁-RNase. The plants L25 (S₁₁ S₁₂, lane 7) and VF60 (S₁₂ S₁₂, lane 8) are shown for comparison. No protein is detectable in the transgenic plant extracts even at long exposure times. Bottom panel shows Ponceau-stained membranes as control for protein load. (b) Northern blot analysis of total RNA extracted from styles of five transgenic plants (lane 1, T21; lane 2, T24; lane 3, T25; lane 4, T26; lane 5, T34) using a probe prepared from S₁₁ genomic sequence. The plant L25 (S₁₁ S₁₂, lane 6) is shown for comparison. Bottom panel shows the ethidium bromide-stained gel as control for RNA load.

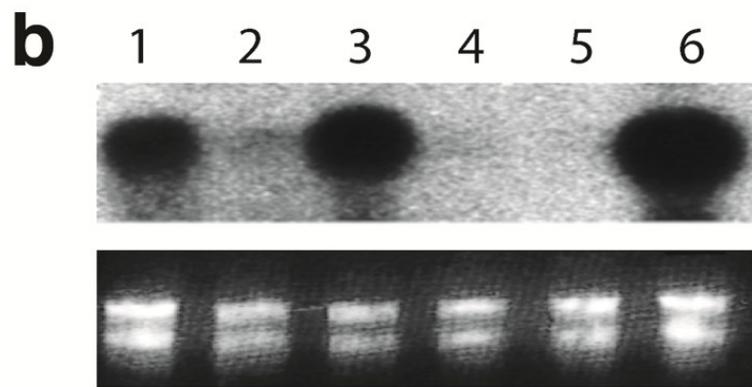
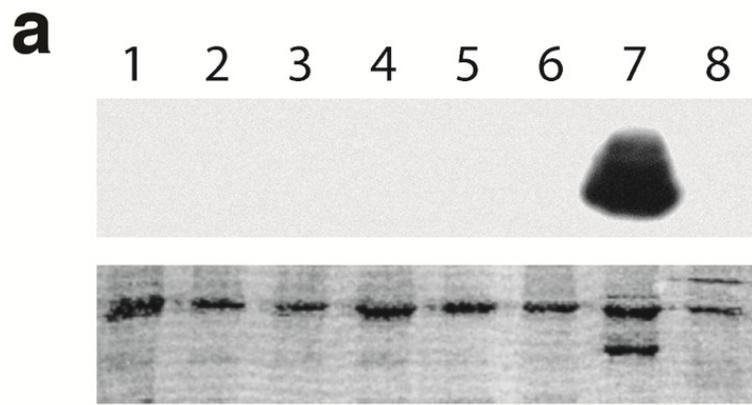


Figure II.3 : Expression of the R115G transgene and correlation of phenotype with protein levels.

(a) Western blot analysis of stylar protein extracts from seven transgenic plants (lane 1, T1; lane 2, T18; lane 3, T38; lane 4, T39; lane 5, T24; lane 6, T36; lane 7, T44) using the anti- S_{11} -RNase. The plants L25 ($S_{11}S_{12}$, lane 8) and VF60 ($S_{12} S_{12}$, lane 9) are shown for comparison. Bottom panel shows Ponceau-stained membranes as control for protein load. (b) The number of incompatible pollinations (calculated as percent of wild type) is plotted as a function of transgene S-RNase levels (shown as percent of L25 wild type levels). RNase levels were quantitated from densitometric scans of the Western blots.

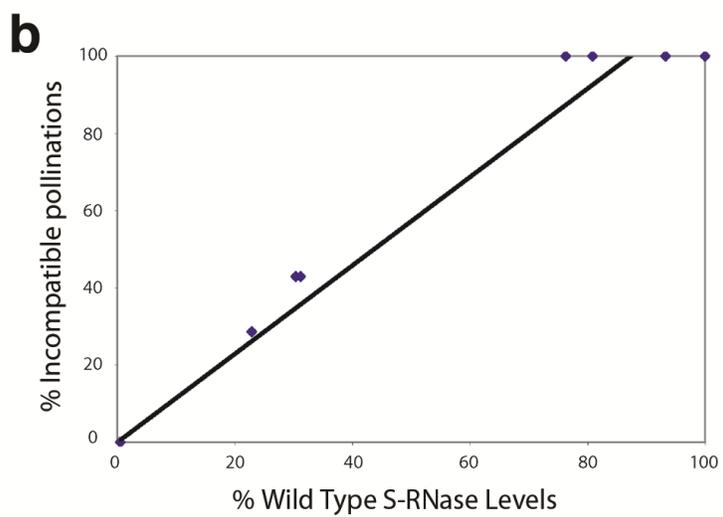
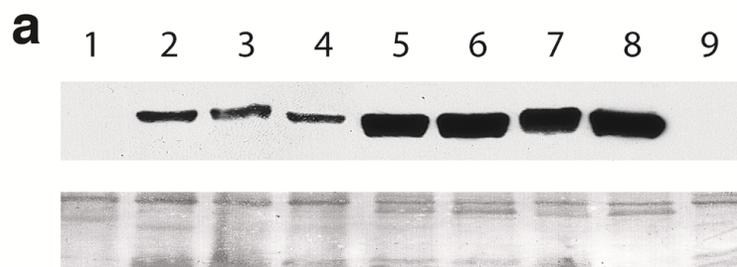
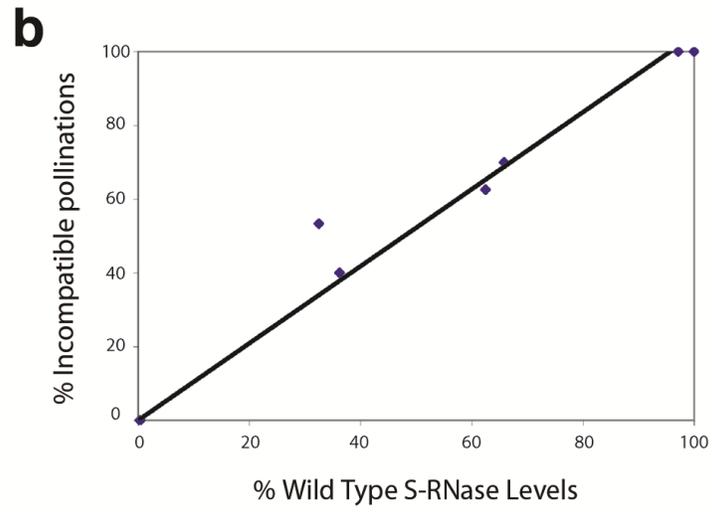
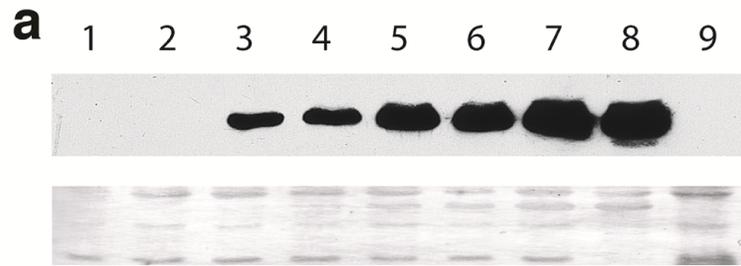


Figure II.4 : Expression of the K113R transgene and correlation of phenotype with protein levels.

(a) Western blot analysis of stylar protein extracts from seven transgenic plants (lane 1, T6; lane 2, T28; lane 3, T2; lane 4, T38; lane 5, T27; lane 6, T32; lane 7, T56) using the anti- S_{11} -RNase. The plants L25 ($S_{11} S_{12}$, lane 8) and VF60 ($S_{12} S_{12}$, lane 9) are shown for comparison. Bottom panel shows Ponceau-stained membranes as control for protein load. (b) The number of incompatible pollinations (calculated as percent of wild type) is plotted as a function of transgene S-RNase levels (shown as percent of L25 wild type levels). RNase levels were quantitated from densitometric scans of the Western blots.



Chapitre III. A new dual-specificity incompatibility allele revealed by absence of glycosylation in the conserved C2 site of a *Solanum chacoense* S-RNase

Publication :

Ce chapitre a été publié dans le journal Journal of Experimental Botany (Oxford Journals) sous forme électronique le 25 mars 2013 (DOI : 10.1093/jxb/ert059) (ISSN : 1460-2431) et sous forme papier dans le volume 64 (7) : 1995-2003 en avril 2013 (ISSN : 0022-0957).

Attribution des travaux :

J'ai réalisé la majorité des manipulations expérimentales ayant donné lieu aux résultats présentés sous forme de figures dans ce manuscrit, incluant la préparation d'une construction par mutagenèse dirigée, la transformation et la régénération des plantes transgéniques. N. Boivin a contribué aux croisements et à certaines analyses Western. Les deux constructions Glc^{C2HV_a} et Glc^{HV_a} ont été préparées par X. Qin. J'ai préparé toutes les figures à l'exception de la figure III.4, réalisée par D. Morse. Le manuscrit a été rédigé par M. Cappadocia, J. Soulard, et D. Morse.

**A new dual-specific incompatibility allele revealed by absence of glycosylation
in the conserved C2 site of a *Solanum chacoense* S-RNase**

Jonathan Soulard, Xike Qin, Nicolas Boivin, David Morse and Mario Cappadocia

Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV)

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal

4101 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H1X 2B2

Corresponding author:

Mario Cappadocia

Abstract

The stelar determinant of gametophytic self-incompatibility (GSI) in *Solanaceae*, *Rosaceae* and *Plantaginaceae* is an S-RNase encoded by a multiallelic *S*-locus. The primary structure of S-RNases shows five conserved (C) and two hypervariable (HV) regions, the latter forming a domain implicated in S-haplotype-specific recognition of the pollen determinant to SI. All S-RNases are glycosylated at a conserved site in the C2 region, although previous studies have shown that N-linked glycans at this position are not required for S-haplotype-specific recognition and pollen rejection. We report here the incompatibility phenotype of three constructs derived from an originally mono-glycosylated S_{11} -RNase of *S. chacoense* that were designed to explore the role of the hypervariable domain in determining pollen recognition and the role of the N-linked glycan in the C2 region. In one series of experiments, a second glycosylation site was introduced in the HVa region to test for inhibition of pollen specific recognition. This modification does not impede pollen rejection, although our analysis shows incomplete glycosylation at the new site in the HVa region. A second construct, designed to permit complete glycosylation at the HVa site by suppression of the conserved site in the C2 region, did increase the degree of site occupancy but again, glycosylation was incomplete. Plants expressing this construct rejected S_{11} pollen and, surprisingly, also rejected S_{13} pollen thus displaying an unusual dual specificity phenotype. This construct differs from the first by the absence of the conserved C2 glycosylation site, and thus the dual specificity is observed only in the absence of the C2 glycan. A third construct, completely lacking glycosylation sites, conferred an ability to reject only S_{11} pollen, disproving the hypothesis that lack of a conserved glycan would confer a universal pollen rejection phenotype to the plant.

Keywords : Gametophytic self-incompatibility, *Solanum chacoense*, S-RNase, site-directed mutagenesis, allelic recognition, glycosylation.

Introduction

Self-incompatibility (SI) is a genetic mechanism widespread among flowering plants that allows the pistil of a flower to discriminate between genetically related (self) and unrelated (non-self) pollen (de Nettancourt, 2001). In the *Solanaceae*, *Rosaceae* and *Plantaginaceae*, the pollen phenotype is determined by its haploid genotype (gametophytic SI, or GSI), and is controlled by a multigenic *S*-locus, inherited as a single segregating unit, which contains polymorphic male and female determinants to SI. Variants of the *S*-locus are termed *S*-haplotypes, whereas variants in the polymorphic genes of the *S*-locus are called alleles (McCubbin and Kao, 2000). In the families mentioned above, the pistil-expressed *S*-gene product is an extremely polymorphic glycoprotein with RNase activity termed S-RNase (McClure *et al.*, 1989). The catalytic activity of S-RNases is essential for pollen rejection (Huang *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994) and this cytotoxic activity must thus be exerted inside the incompatible pollen tubes. However, since S-RNases have been shown by immunolocalization to enter pollen tubes in non-*S*-haplotype-specific manner (Goldraij *et al.*, 2006; Luu *et al.*, 2000), at least part of the SI mechanism must involve the ability of compatible pollen tubes to block the RNase activity of any non-self S-RNase. This blockage could occur by inhibition of the RNase activity (Kao and McCubbin, 1996; Luu *et al.*, 2001; Sims and Ordanic, 2001), by degradation of the S-RNase (Hua and Kao, 2006, 2008; Hua *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011a; Qiao *et al.*, 2004b) or by blocking access to the RNA substrates in the pollen tube cytosol (McClure, 2008; McClure *et al.*, 2011).

Sequence comparisons of S-RNases in the *Solanaceae* have revealed a pattern of highly five conserved (C1 to C5) and two highly variable (HV) regions (Parry *et al.*, 1997b). The conserved regions C1, C4 and C5 appear to be involved in stabilizing the three-dimensional structure of the S-RNase (Ioerger *et al.*, 1991; Qin *et al.*, 2005), whereas the conserved regions C2 and C3 each contain a histidine residue essential for RNase activity (Green, 1994). The two hypervariable (HV) regions (HVa and HVb) are thought to play a key role in *S*-haplotype specificity (Kao and McCubbin, 1996; Matton *et al.*, 1999; Matton *et al.*, 1997; Zurek *et al.*, 1997), although other motifs of the protein can contribute to allele specificity (Verica *et al.*, 1998). In the *Rosaceae*, domains outside the hypervariable region have been shown to be key in determining allelic specificity, as *S*₆- and *S*₂₄-RNases in *Prunus*

(*Rosaceae*) are identical in their hypervariable region yet have distinct incompatibility phenotypes (Wunsch and Hormaza, 2004) and similar observations have been made in *Pyrus* (Zisovich *et al.*, 2004). The hypervariable region thus appears not to be the sole determinant for specific pollen rejection.

Curiously, all S-RNases known to date possess potential N-glycosylation sites, the role of which, if any, is still unknown (Meng *et al.*, 2011b). For example, S-RNases from *N. alata* have from one to five sites (Oxley *et al.*, 1996, 1998), while those from *S. chacoense* contain from one to four sites (Liu *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2001). There can be differences in the type and structure of the side chains of sugars, termed microheterogeneity, attached to the same S-RNase (Oxley and Bacic, 1995; Woodward *et al.*, 1992), and in S-RNases with multiple sites, some may remain unoccupied (Parry *et al.*, 1997b). In the *Solanaceae*, a single glycosylation site, at the N terminus of the C2 region, is conserved in practically all cases (Singh and Kao, 1992) (with the exception of the S_1 -RNase from *Petunia hybrida* whose single glycosylation site is located near the carboxy terminus of the protein (Clark *et al.*, 1990)). In the *Rosaceae*, the conserved glycosylation site is located in the fourth conserved region 4 (RC4) (Ishimizu *et al.*, 1998b).

The role of the sugar moieties maybe that generally ascribed to secreted proteins, such as facilitation of protein secretion or increased solubility in the extracellular matrix (McClure, 2009). However, enzymatic removal of the glycan side chains has no effect on RNase activity of the protein (Broothaerts *et al.*, 1991), and removal of the C2-glycosylation site of the *Petunia hybrida* S_3 -RNase by site directed mutagenesis did not alter the ability to fully reject S_3 pollen (Karunanandaa *et al.*, 1994). Alternatively, it is possible that the sugar groups may play a more vital role in the SI response. In the case of the *Petunia* S_3 -RNase without a glycosylation site, the rejection of other pollen haplotypes was not investigated, and it has been suggested that these transgenic plants might have acquired the ability to reject any pollen type (Oxley *et al.*, 1996). This possibility is intriguing as the *S*-locus product expressed in pollen (pollen-*S* determinant) has been identified as an F-box protein (Lai *et al.*, 2002) and N-linked glycans can be a specific target of F-box proteins (Yoshida, 2007). It is also an interesting coincidence that *S-like* RNases, not involved in SI, are not glycosylated (Green, 1994).

In order to explore the role of glycosylation in the SI response of *S.chacoense*, we generated two constructs both with a new N-glycosylation site inside the HVa region of the S_{11} -RNase. In one, the original glycosylation site in the C2 region (Saba-El-Leil *et al.*, 1994) was maintained, whereas in the other it was removed. Interestingly, the mono-glycosylated transgenics harboring only a glycosylation site in the HVa region were found to reject S_{13} pollen in addition to S_{11} pollen. Western analyses revealed the presence of two size classes of protein, suggesting the non-glycosylated form may reject the S_{11} pollen while the glycosylated form may reject S_{13} pollen. In order to confirm that the non-glycosylated form would reject S_{11} pollen, we eliminated the conserved glycosylation site in the C2 region of the native S_{11} -RNase, validating its ability to reject S_{11} pollen. This construct also allowed a test of the hypothesis that an S-RNase lacking N-linked glycans might show a universal pollen rejection phenotype.

Materials and methods

Plant material

The self-incompatible diploid genotypes ($2n=2x=24$) of *Solanum chacoense* used in the present study include the previously described genetic lines PI 230582 ($S_{13}S_{14}$) (Rivard *et al.*, 1989), L25 ($S_{11}S_{12}$) (Qin *et al.*, 2001), G4 ($S_{12}S_{14}$) (Van Sint Jan *et al.*, 1996), a tetraploid line ($S_{11}S_{11}S_{13}S_{13}$) (Luu *et al.*, 2001) and PI458312 ($S_{15}S_{16}$) (Liu *et al.*, 2009).

Mutagenesis of the S_{11} -RNase glycosylation sites and plant transformation

A previously described construct (Qin *et al.*, 2005) containing the wild type S_{11} -RNase (hereafter identified as Glc^{C2} to indicate that it contains only the endogenous N-glycosylation site located in the C2 conserved region) under control of the chitinase promoter (Harikrishna *et al.*, 1996) in the pBluescript II phagemid cloning vector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used as a PCR template for site directed mutagenesis.

All PCR reactions were made using either Taq DNA polymerase (Promega Corporation, Madison, WI) or Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), according to the manufacturers' instructions.

To create the construct with an additional N-glycosylation site at the hypervariable HVa region of the S_{11} -RNase (hereafter identified as $Glc^{C2/HVa}$) the AAA codon for lysine in the sequence KLTYNFYFSD was changed into a AAT codon for asparagine (K72N) using mutagenic primers $Glc^{C2}A$ (5'-AAGTACTGCAAGCCAAATCTTACCTATAACTAT-3') and $Glc^{C2}B$ (5'- ATAGTTATAGGTAAGATTTGGCTTGCAGTACTT -3') and a PCR mutagenesis kit (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

This latter construction $Glc^{C2/HVa}$ was further modified to remove the conserved site in C2, by again changing the AAC codon at position 50 to a CAA codon (N50Q). Such modified S_{11} -RNase was identified as Glc^{HVa} . Here the PCR overlap mutagenic primers were $Glc^{C2/HVa}A$ (5'-CGAATAGTTCCA AAACAATTTACGATTCACGG-3') and $Glc^{C2/HVa}B$ (5'-CCGTGAATCGTAAATTGTTTTGGA ACTATTCG-3'), while the two flanking primers in the vector, forward-HindIII 5'-(5'-GCGGCGCGTTCAAGCTTTCTAGAAGATCTCT-3') and reverse-EcoR1stop (5'-CTCTGAATTCAAGGACATACATTTGATAG-3') contained endonuclease restriction sites to facilitate further cloning steps. Both $Glc^{C2/HVa}$ and S_{11} - Glc^{HVa} constructs were ligated into pBluescript II using restriction endonucleases HindIII and EcoRI (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and subcloned into the pBIN19 binary plant transformation vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA) using the same enzymes.

To create the construct lacking the original glycosylation motif in the C2, (hereafter identified as *NoGlc*), site directed mutagenesis by PCR overlap extension (Higuchi *et al.*, 1988) was used to change the AAC codon for asparagine at position 50 of S_{11} -RNase to a CAA codon for glutamine (N50Q). Mutagenic primers *NoGlcA* (5'-CAACGAATAGTTCCAAAACAATTTACGATTCACGGTC-3'), *NoGlcB* (5'-GACCGTGAATCGTAAATTGTTTTGGA ACTATTCGTTG-3') in combination with flanking primers T7 and T3 respectively to first generate separate mutated overlapping PCR fragments. These fragments were purified and mixed then used with primers T7 and T3 to generate a full-length *NoGlc* fragment. That fragment was digested using restriction endonucleases XbaI and Sall (Promega Corporation, Madison, WI, USA), cloned into pBluescript II, then subcloned into the pBIN19 binary plant transformation vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA) using the same enzymes.

Sequencing validated all three mutated ChiP- S_{11} -RNase constructs after cloning into the pBIN19 transformation vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA), which were then transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Plants were transformed by the leaf disc method and regenerated as described previously (Matton *et al.*, 1997) using the *S.chacoense* genotype G4 carrying the $S_{12}S_{14}$ alleles.

Crosses and pollen observation

Genetic crosses of transgenic plants were performed using pollen freshly collected from various genotypes as described (Qin *et al.*, 2001). Where appropriate, styles were stained with aniline blue 48 hours post-pollination and examined by fluorescence microscopy to assess pollen tube growth (Matton *et al.*, 1997).

Western-Blot analyses and deglycosylation of S-RNases

Stylar proteins were extracted from both transgenic and non-transgenic plants as described (Qin *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2005). The protein concentration of crude extracts from ten styles of each plant was determined by Bradford protein assay (Bradford, 1976). Deglycosylated protein samples containing 40 μ g of total proteins were prepared by digestion with peptide-N-glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's instructions. Non-deglycosylated samples were prepared by the same procedure but omitting the PNGase F enzyme.

Samples were analyzed by SDS-PAGE with 20 μ g of total stylar protein loaded per lane. Proteins were then transferred to Hybond C-Extra nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Piscataway, NJ) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Protein transfer was visualized after staining the membranes with Ponceau S using an ImageQuant LAS 4000 imaging system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Immunoblots were performed as described (Qin *et al.*, 2005) with a specific primary antibody raised against a 15 amino acid peptide corresponding to the HVa region of the S_{11} -RNase and a commercial horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich Corporation, St-Louis, MO, USA). HRP activity was visualized using the

Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) according the manufacturer's instructions and recorded using an ImageQuant LAS 4000 imaging system.

Results

Glc^{C2/HVa} transgenic plants

A previous report of self-compatible *N. sylvestris* found that styles expressed high levels of a stylar "relic S-RNase" (Golz *et al.*, 1998). To explain why this species is self-compatible, the authors suggested that an N-glycosylation site inside the hypervariable HVa region might be involved. To experimentally test the hypothesis that a bulky polysaccharide moiety in the HVa region might prevent the pollen *S*-gene product from interacting with the S-RNase thus leading to compatibility, we first produced an *S*₁₁-RNase with an extra glycosylation site in the HVa region.

Protein levels corresponding to the Glc^{C2/HVa} S-RNase, assessed by Western blots, varied from almost undetectable to levels higher than wild type *S*₁₁-RNases (Fig. III.1). Genetic crosses assessed the impact of these variable levels of Glc^{C2/HVa} on the incompatibility phenotype. All plants were self-incompatible and fully incompatible with pollen from the untransformed G4 (*S*₁₂*S*₁₄) line. In addition, crosses using pollen from PI 230582 (*S*₁₃*S*₁₄) were compatible as expected, due to the presence of compatible *S*₁₃ pollen. The crosses with pollen from line L25 (*S*₁₁*S*₁₂) revealed that transgenic plants with low expression levels, such as line 17, had an incomplete *S*₁₁-rejection phenotype, whereas plants with higher expression levels (lines 5,13 26, 27, 35) fully rejected *S*₁₁ pollen (Fig. III.1). Microscopic observations confirmed the complete arrest of *S*₁₁ pollen tubes inside the styles of plants highly expressing the transgene. The rejection of *S*₁₁ pollen was surprising, as we had predicted the glycosylation site in the HVa region, previously identified as one of the two allelic recognition domains in our *S*₁₁-RNase (Matton *et al.*, 1997), would block binding to this region of the S-RNase. To assess the possibility that the HVa site was not fully occupied, we analyzed the stylar extracts before and after treatment with PNGase. Before treatment, two size classes of protein reacting with the anti-*S*₁₁ antibody could be detected. One size class, more abundant and having the

same apparent molecular weight as the authentic S_{11} -RNase (26 kDa), was interpreted as a mono-glycosylated form of the protein. The second size class, with a slightly slower mobility (28 kDa), was interpreted as the di-glycosylated form of the protein. This suggests that one of the two sites was indeed not fully occupied. Interestingly, two size classes of protein reacting with the anti- S_{11} antibody were still present after treatments with the PNGase. One of the bands had an apparent molecular weight of 24kDa, corresponding to the fully deglycosylated S_{11} -RNase, while the other had a size commensurate with the mono-glycosylated form which we interpret as a sugar moiety resistant to PNGase. We also note that the same amount of antibody reactive protein is detected in the sample before and after de-glycosylation with PNGase, suggesting that the presence of the sugar group did not interfere with the antibody reaction. We conclude that incomplete glycosylation of the HVa glycosylation site could result in an S_{11} pollen rejection phenotype due to an S_{11} -RNase glycosylated only at the C2 region, as this mono-glycosylated form is expected to be identical to the wild type.

Glc^{HVa} transgenic plants

The inability of the Glc^{C2/HVa} plants to fully glycosylate both sites may have resulted from the proximity of the two sites and a difficulty in accessing sufficient amounts of the glycosylating precursor. We therefore produced another modified S_{11} -RNase, termed Glc^{HVa}, which contains only a single glycosylation site inside the HVa region. The genetic analysis of 41 Glc^{HVa} transgenics revealed that all plants were self-incompatible and incompatible with line G4 ($S_{12}S_{14}$). When crossed with pollen from line L25 ($S_{11}S_{12}$), three individuals termed lines Glc^{HVa}-13, 16 and 37, were found to completely reject S_{11} pollen (Fig. III.2.A). This pollen rejection phenotype correlated with the amounts of the Glc^{HVa}-RNase which was similar to that found in the L25 control plants as detected by Western blot analysis (Fig. III.2.A). Pollen tubes in their styles displayed the reaction characteristic of an SI response when examined by fluorescence microscopy. Most of the pollen tubes were arrested at mid-style, although in rare instances a very small number of pollen tubes were found near the stylar basis but none entering the ovarian region.

Surprisingly, however, when these three individuals were crossed with PI 230582 ($S_{13}S_{14}$), they were found to partially reject S_{13} pollen, which was expected to be fully

compatible with the modified S_{11} -RNase (Fig. III.2.A). Western blots revealed the presence of two size classes of protein reacting with the anti- S_{11} antibody (Fig. III.2.A). Analysis of the extracts from these three individuals before and after treatment with the PNGase were therefore undertaken (Fig. III.2.B). In untreated extracts, the upper band (31 kDa) was systematically more intense than the lower band, whereas after treatment with the PNGase, the lower band appeared more intense. These samples also show the same amount of signal before and after deglycosylation, again suggesting that the sugar group in the HVa region does not interfere with the antibody reaction. The lower band in the three transgenics corresponds to the unglycosylated form, as its size is identical to the enzymatically deglycosylated L25 S_{11} -RNase. The upper band in the three transgenic lines thus corresponds to the monoglycosylated form, and this band is more intense than the lower band, indicating an increase in glycosylation at the HV site compared to the double glycosylated $\text{Glc}^{\text{C2}/\text{HVa}}$ (Fig. III.2.B).

Two possibilities could account for the acquisition of this unexpected dual specific pollen rejection phenotype. In the first, one of the two forms of the protein could have acquired the dual specific phenotype, perhaps due to the modified amino acid in the HVa region similar to a dual specific allele previously generated by site directed mutagenesis in the HVa region of the S_{11} -RNase (Table III.I) (Matton *et al.*, 1999). Alternatively, as two S-RNase forms (glycosylated and non-glycosylated) are found in our transgenics, one form might confer the S_{11} -rejection phenotype while the other might confer the S_{13} -rejection phenotype. To assess the possibility that a single form of the Glc^{HVa} -RNase could recognize and reject both S_{11} and S_{13} pollen, we submitted these individuals to the heteroallelic pollen test (Luu *et al.*, 2001) in which our previously described dual-specific allele was found to reject the normally compatible heteroallelic diploid pollen derived from a $S_{11}S_{11}S_{13}S_{13}$ individual (Luu *et al.*, 2001). As shown (Fig. III.2.A), this behavior is also evident in Glc^{HVa} -RNase expressing plants, supporting its identification as a new dual specific allele.

NoGlc transgenic plants

To test the possibility that a non-glycosylated S-RNase would represent a universal rejecter, we generated an additional construct, called NoGlc, lacking the original glycosylation motif in the C2 region. The genetic analysis of δ_{11} NoGlc transgenics revealed that all plants

were self-incompatible and incompatible with line G4. Western blot analyses performed on these plants showed a variable level of signal. The crosses with pollen from line L25 ($S_{11}S_{12}$) revealed that transgenic plants with low expression levels had an incomplete S_{11} -rejection phenotype, whereas plants with higher expression levels fully rejected S_{11} pollen (Fig. III.3). In order to assess whether or not the plants highly expressing the transgene were able to reject other pollen types, we pollinated them with pollen from line PI 230582 ($S_{13}S_{14}$). All crosses resulted in full compatibility. These plants were also crossed with pollen from an unrelated genotype PI458312 ($S_{15}S_{16}$). The results of the crosses indicated once again full compatibility (Fig. III.3). From these results we conclude that the lack of glycosylation of the S-RNases does not prevent them from being functional and does not generate an S-RNase resistant to degradation.

Discussion

In this study we assessed two aspects of S-RNases glycosylation. We first sought to determine if the presence of an N-linked glycan inside the HVa region would affect pollen recognition, as suggested by a study using the self-compatible *N.sylvestris* expressing a stylar “relic S-RNase” with an N-glycosylation site inside the hypervariable HVa region (Golz *et al.*, 1998). Second, we were curious to determine if a non-glycosylated S-RNase could reject all different pollen types as proposed by Oxley (Oxley *et al.*, 1996, 1998).

Relic S-RNases, found in both SC and SI species (Golz *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2003; Roldan *et al.*, 2010) are a particular type of S-like RNases, structurally similar to functional S-RNases and expressed exclusively in the pistil (Roldan *et al.*, 2010). However, in common with S-like RNases, they are not coded by the S-locus and are not associated with SI. The relic S-RNase from *N.sylvestris* displayed levels of RNase activity comparable to those found in self-incompatible *Nicotiana* species (Golz *et al.*, 1998), and it was suggested that the bulky polysaccharide moiety in the HVa region might prevent the pollen S-gene product from interacting with the S-RNase, leading to compatibility.

The explanation proposed by (Golz *et al.*, 1998) predicts that blocking recognition of the HVa region would lead to compatibility, even in styles with high levels of transgene expression. This is an interesting prediction since a new model of the pollen rejection

mechanism, termed the collaborative non-self recognition system (Kakui *et al.*, 2011; Kubo *et al.*, 2010), actually predicts the opposite result. The collaborative non-self recognition model, based on the finding that the *S*-locus contains a number of pollen recognition F-box proteins, proposes that one or a combination of these F-box proteins is able to recognize and degrade any *S*-RNase with the exception of that encoded by the same *S*-locus. Blocking access to the recognition domain in the HVa region should thus make the *S*-RNase resistant to degradation, resulting in pollen rejection.

Our first attempt to introduce a glycosylation site in the HVa region, the $\text{Glc}^{\text{HVa/C2}}$ plants, produced five individuals that turned out to completely reject S_{11} pollen while allowing passage of S_{13} pollen. This *S*-RNase is not a universal rejector. However, an analysis of the *S*-RNase by Western blot revealed that glycosylation at the site in the HVa region was incomplete. This conclusion is based on the finding that the $\text{Glc}^{\text{C2/HVa}}$ plants express two different forms of the *S*-RNase with distinct molecular weights (Fig. III.1). We interpret these two size classes as mono- and di-glycosylated forms of the enzyme, with the mono-glycosylated form being more abundant. We also interpret the mono-glycosylated form as equivalent to the wild type S_{11} -RNase (i.e., glycosylated at the site in the C2 region), as the wild type S_{11} -RNase is always fully glycosylated at the C2 site (Fig. III.1) and the HVa glycosylation site only becomes available to the glycosylation machinery after the C2 region has entered the endoplasmic reticulum (ER).

To attempt to overcome the problem of incomplete glycosylation in the HVa region, we constructed the Glc^{HVa} *S*-RNase, whose single glycosylation site was moved from the C2 region to the HVa domain. Unfortunately, this protein also turned out to be incompletely glycosylated, as two bands can be observed by gel analysis (Fig. III.2). It is possible that the protein context surrounding the HVa site is not as efficient as that surrounding the C2 site, which is always fully glycosylated. In addition, since two bands are observed even after a treatment with the PNGase (Fig. III.2.B), it seems likely that the protein context surrounding the HVa region may also allow heterogeneity in the sugar groups themselves. This is suggested by the observation that the ratio of signal intensity between the upper (mono-glycosylated) and lower (deglycosylated) forms is significantly different before and after PNGase treatment. We interpret this to mean that part of the mono-glycosylated form is

sensitive, and part resistant, to PNGase activity. This is not infrequent in plants, as addition of $\alpha(1-3)$ -fucose to the N-acetyl glucosamine attached to the asparagine protects the sugar group against PNGase treatment (Tretter *et al.*, 1991).

Even more surprisingly, however, the three plants that contained sufficient S-RNase to reject S_{11} pollen were also able to partially reject S_{13} pollen. At least in part, this double specificity may relate to the inherent similarity between S_{11} and S_{13} -RNases as the two mature protein sequences share 95% sequence identity. Indeed, four of the amino acid differences between the two lie in the HV region, and we have previously reported that mutation of three of these in the S_{11} sequence also allowed rejection of both S_{11} and S_{13} pollen (Matton *et al.*, 1999). However, the C2 region of the previously generated dual specific S-allele is fully glycosylated and thus differs from the Glc^{HVa} plants in which mutagenesis of the acceptor site in the C2 region blocks glycosylation at this site.

We propose that rejection of both S_{11} pollen and S_{13} pollen occurs because the unglycosylated form of the RNase in transgenic Glc^{HVa} plants has acquired a dual specificity incompatibility phenotype. This phenotype could be explained by the self-recognition model (Fig. III.4) if the site used to recognize the RNase as an S_{13} haplotype was partially occluded by the sugar group in the C2 region, thus explaining why the $\text{Glc}^{\text{C2/HVa}}$ cannot reject S_{13} pollen. This idea is supported by the observation that in the *Rosaceae* S-RNases can be phenotypically different despite having identical sequences in the HV region (Wunsch and Hormaza, 2004; Zisovich *et al.*, 2004). Interestingly, this observation also implies that sugar groups remain on the S-RNase even after entry into the pollen tube cytoplasm.

However, it is important to note that the dual specific phenotype can also be accommodated by the collaborative non-self recognition model. In this case, since the incompatibility of an individual haplotype results from the lack of a specific SLF capable of targeting the S-RNase for degradation, glycosylation of the Glc^{HVa} -RNase would impede binding by the SLF that normally recognizes and degrades the S_{13} -RNase.

The surprising rejection of S_{13} pollen, which occurs at least partially in three of our Glc^{HVa} plants, is reminiscent of a previously characterized dual specific form of the S_{11} -RNase (Matton *et al.*, 1999). The new dual specific allele shares with the previously described dual

specific allele a modification in the HV region (Table III.I) that replaces a positively charged amino acid (Lys in the HVa region of the Glc^{HVa}, and Arg in the HVb region of the HVapb) with an uncharged amino acid (Asn and Leu for the Glc^{HVa} and HVapb, respectively). Curiously, the new allele differs from the previous allele in that the dual specificity is only revealed when the S-RNase cannot be glycosylated in the normal C2 region. It is important to stress that the unusual rejection phenotype of the Glc^{HVa} plants that we observe here is not due to overexpression of the transgene, as the S-RNase levels measured in the styles are lower than those found for wild type plants (Fig. III.2). It is also not due to an ability to reject any pollen type, as pollen from an *S*₁₅*S*₁₆ stock is accepted. Furthermore, it is unlikely to result from fortuitous insertion of the transgene in a component of the SI machinery required for allowing pollen to resist the effects of elevated S-RNase activity, as the three transgenic lines with this same phenotype represent independent insertion events. Lastly, the phenotype is not due to female sterility, as all lines set seeded fruits after compatible pollinations.

It is also of interest to note that the NoGlc plants have definitely laid to rest the “universal rejecter” hypothesis. This model posits the glycan moiety to be a key element involved in recognition of all non-self S-RNases. For example, compatible pollinations would exploit recognition of the conserved sugar moiety in order to target all S-RNases to the proteasome, while during incompatible pollinations, interaction between the C2-glycan and the proteasomal targeting system would be blocked by allele-specific binding to the recognition domain in the HV region. This is clearly not the case, as NoGlc plants do not reject all pollen but behave as though they expressed a normal *S*₁₁-RNase. In particular, *S*₁₅*S*₁₆ pollen is able to set fruit. These results firmly rule out the possibility that the C2 glycosylation site might be an important recognition site for the degradation of the S-RNase by providing a universal mechanism for detoxifying S-RNases. However, we note that the sugar group in the C2 region can in some cases affect the pollen rejection phenotype of the S-RNase, as the presence of the glycan moiety at the C2 position appears to interfere with recognition of the Glc^{C2/HVa} RNase as an *S*₁₃-RNase.

Acknowledgements

We are grateful to an anonymous reviewer who provided an excellent interpretation for some of our data. We thank M. Lemay for plant care. This work was supported by financial assistance from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MC and Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT) to MC and DM.

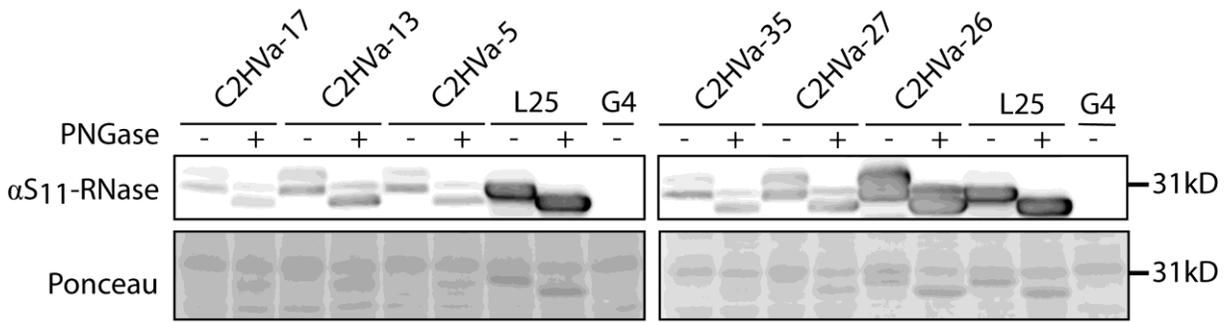
Table III.I : Sequence comparison of the Glc^{HVa} and the previously described dual specific HVapb-RNase.

<u>S-RNase</u>	<u>HVa Sequence</u>	<u>HVb sequence</u>
<i>S</i> ₁₁ -RNase	KPKLT <u>Y</u> NYF	IDQASARK
Glc ^{HVa}	KP <u>N</u> LTYNYF	IDQASARK
HVapb	KPKL <u>N</u> Y <u>N</u> <u>F</u> F	IDQAS <u>A</u> <u>L</u> K
<i>S</i> ₁₃ -RNase	KPKL <u>N</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>F</u> F	IDQAS <u>A</u> <u>L</u> K

Figure legends

Figure III.1 : Plants expressing a diglycosylated S_{11} -RNase have a normal S -phenotype.

Glc^{C2HV_a} plant lines express an S_{11} -RNase that contains a glycosylation site in the HVa region in addition to the normal and conserved glycosylation site in the C2 region. Western blot analysis of six selected plants shows a range of protein levels detectable using an anti- S_{11} -RNase antibody. The size of the bands in the absence of PNGase (-) is consistent with a mono- and a di-glycosylated form, while in the presence of PNGase (+) the sizes are consistent with a non-glycosylated and a mono-glycosylated form. L25 plants ($S_{11}S_{12}$) and the untransformed host G4 ($S_{12}S_{14}$) are shown as positive and negative controls, respectively. The pollination phenotype of each plant is shown for a representative pollination with $S_{11}S_{12}$ and $S_{13}S_{14}$ tester stocks and is reported as the number of fruits set per pollination.

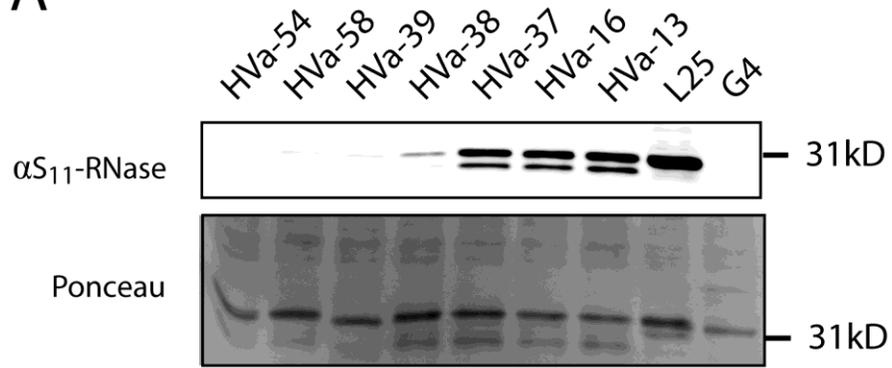


Pollen	Fruits/Flowers pollinated								
S11S12	$\frac{7}{12}$	$\frac{0}{13}$	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{6}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{0}{11}$	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{12}$	
S13S14	$\frac{8}{8}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{10}{10}$	

Figure III.2 : Plants expressing the Glc^{HVa} RNase have an unusual dual specificity incompatibility phenotype.

Western blot analysis of seven plant lines expressing an S_{11} -RNase engineered to contain only a single glycosylation site in the HVa region show a wide range of protein levels (A). L25 plants ($S_{11}S_{12}$) and the untransformed host G4 ($S_{12}S_{14}$) are shown as positive and negative controls, respectively, and the pollination phenotype of each plant is shown for a representative pollination with $S_{11}S_{12}$, $S_{13}S_{14}$, $S_{15}S_{16}$ and $S_{11}S_{11}S_{13}S_{13}$ tester stocks. The three highly expressing lines are shown with (+) and without (-) PNGase treatment (B).

A



Pollen	Fruits/Flowers pollinated								
S11S12	$\frac{8}{8}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{6}{8}$	$\frac{0}{16}$	$\frac{0}{13}$	$\frac{0}{15}$	$\frac{0}{6}$	$\frac{5}{5}$
S13S14	$\frac{6}{6}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{4}{14}$	$\frac{5}{13}$	$\frac{8}{16}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{6}{6}$
S15S16	$\frac{7}{7}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{6}{7}$	$\frac{5}{5}$
S11S11S13S13	$\frac{7}{7}$	$\frac{8}{9}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{2}{12}$	$\frac{3}{11}$	$\frac{6}{7}$	$\frac{5}{5}$

B

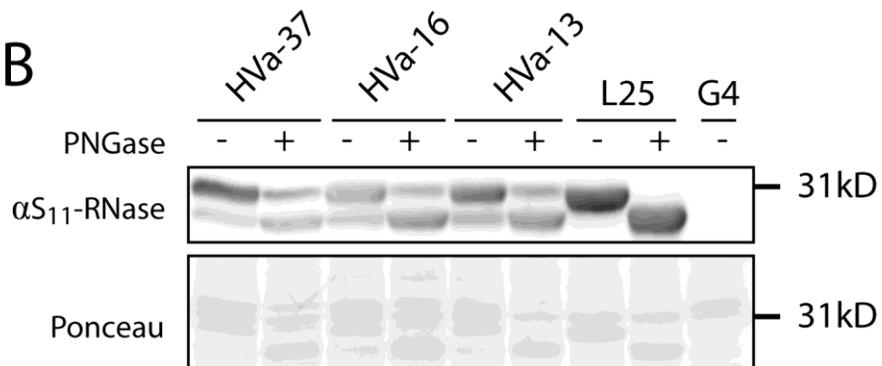
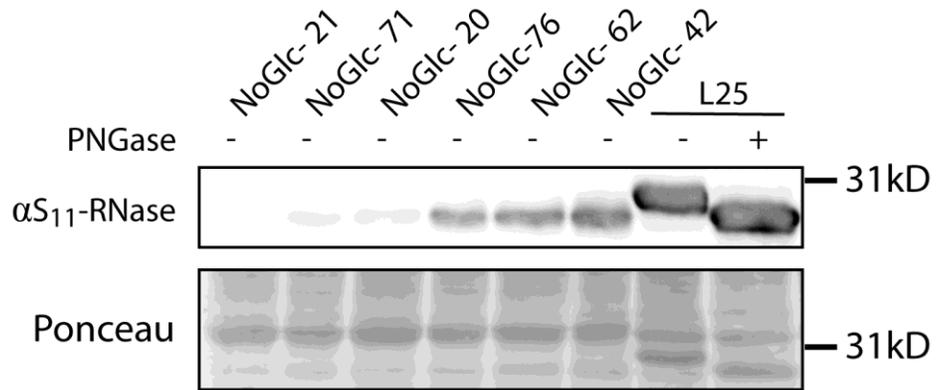


Figure III.3 : Plants expressing the NoGlc S-RNase have a normal S-phenotype.

Western blot analysis of seven plant lines expressing an S-RNase lacking all glycosylation sites shows a range of protein levels. L25 plants are shown as a positive control, and the pollination phenotype of each plant is shown for a representative pollination with $S_{11}S_{12}$, $S_{13}S_{14}$ and $S_{15}S_{16}$ tester stocks.

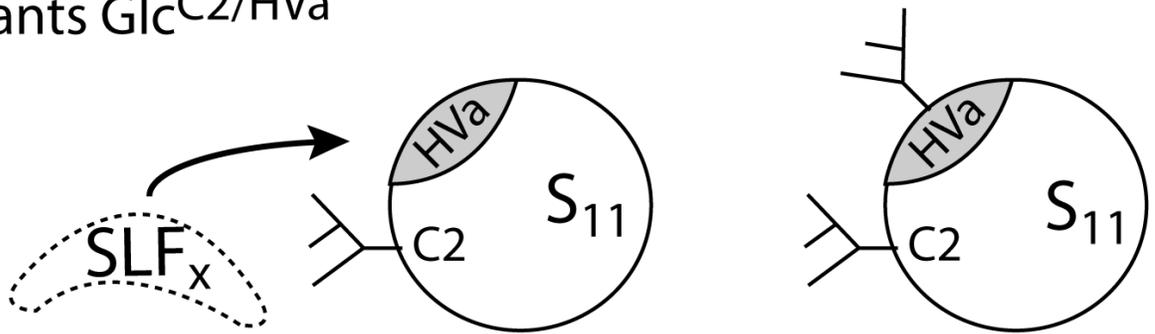


Pollen	Fruits/Flowers pollinated						
	NoGlc-21	NoGlc-71	NoGlc-20	NoGlc-76	NoGlc-62	NoGlc-42	L25
S11S12	$\frac{16}{16}$	$\frac{8}{19}$	$\frac{3}{13}$	$\frac{0}{15}$	$\frac{0}{19}$	$\frac{0}{17}$	$\frac{0}{7}$
S13S14	$\frac{7}{7}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{7}{7}$
S15S16	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{6}{6}$

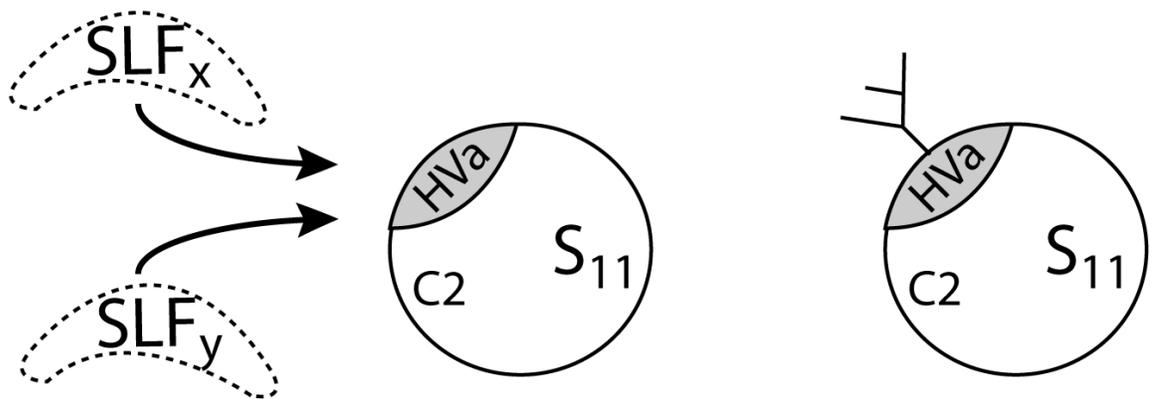
Figure III.4 : Model for the different S-RNases produced by Glc^{C2HV_a} and Glc^{HV_a} transgenic lines.

Each of the transgenic lines produces two S-RNase forms (spheres), differing from one another with regard to glycosylation at the newly introduced site in the HVa region. The glycan groups are shown as twigs at the protein surface, either in the hypervariable HVa region or the conserved C2 region. A hypothetical interaction with the pollen component (dotted line) is shown for recognition by either the S_{11} or S_{13} pollen (SLFx and SLFy, respectively).

Plants Glc^{C2/HVa}



Plants Glc^{HVa}



Chapitre IV. eEF1A is an S-RNase binding factor in self-incompatible *Solanum chacoense*

Publication :

Ce chapitre a été soumis pour publication.

Attribution des travaux :

J'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales ayant donné lieu aux résultats présentés sous forme de figures dans ce manuscrit hormis l'analyse d'immunolocalisation par microscopie électronique à transmission présentée en figure IV.4 qui a été réalisée par N. Boivin. J'ai préparé les figures et rédigé le manuscrit avec l'aide de D. Morse et M. Cappadocia.

eEF1A is an S-RNase binding factor in self-incompatible *Solanum chacoense*

Jonathan Soulard, Nicolas Boivin, David Morse, and Mario Cappadocia

Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV)

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal

4101 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H1X 2B2

Corresponding author:

Mario Cappadocia

Summary

Self-incompatibility (SI) is a genetic mechanism that allows flowering plants to identify and block fertilization by self-pollen. In the *Solanaceae*, SI is controlled by a multiallelic S-locus encoding both S-RNases and F-box proteins as female and male determinants, respectively. S-RNase activity is essential for pollen rejection, and a minimum threshold value of S-RNases in the style is also required. Here we present biochemical evidence that eEF1A is a novel S-RNase-binding partner *in vitro*. We further show that the normal actin binding activity of eEF1A is enhanced by the presence of S-RNase. Lastly, we find that there is a co-localization of S-RNase and actin in the incompatible pollen tubes in structures reminiscent of the actin bundles formed by eEF1A. We propose that increased binding of eEF1A to actin in the presence of S-RNase could help explain the disruption of the actin cytoskeleton observed during SI reactions.

Keywords : Gametophytic self-incompatibility, pollination, eEF1A, S-RNase, actin, ultrasensitive response

Introduction

Angiosperms represent the largest and most diverse group of land plants. In most species flowers have male (anther) and female (pistil) sexual organs in close proximity, increasing the risk of self-pollination. To prevent selfing and limit the deleterious effects of inbreeding, angiosperms have adopted several strategies to promote out-crossing. Among these strategies, self-incompatibility (SI) is one of the most widespread, reported in more than 100 families and estimated to be present in almost 40% of species, and is considered an important factor of the evolutionary success of angiosperms (Igic *et al.*, 2008). SI is a genetically inherited device that allows a fertile flower to reject self- or closely related pollen by blocking the growth of pollen tubes on or inside the pistil, while genetically unrelated (non-self) pollen is accepted and can accomplish fertilization (de Nettancourt, 2001). *Solanaceae* employ a gametophytic SI system (GSI), where the breeding behavior of the pollen is determined by its own haploid genotype. Both female and male specificity determinants of SI (style-*S* and pollen-*S*, respectively) are under the control of elements of a multigenic, multiallelic locus called the *S*-locus (de Nettancourt, 2001). Variants of the *S*-locus are termed haplotypes, whereas variants of any of the individual genes in the *S*-locus are termed alleles (McCubbin and Kao, 2000).

The female determinant is a polymorphic glycoprotein with ribonuclease activity called the S-RNase (McClure *et al.*, 1989) that is expressed in the style (Anderson *et al.*, 1989) and that penetrates inside the pollen tubes in a *S*-haplotype-independent manner (Luu *et al.*, 2000). The involvement of the S-RNase in SI has been firmly established in both loss- and gain-of-function transgenic plants (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994) and its catalytic activity is essential to its function (Huang *et al.*, 1994). The male determinant is expressed exclusively in the pollen and is determined by a group of *S*-locus-specific F-box proteins (termed variously SLF or SFB) acting collaboratively, each of which being responsible for the recognition and proteasome-mediated degradation of a subset of non-self S-RNases inside the pollen tube (Kubo *et al.*, 2010; Sun and Kao, 2013). Thus, in a compatible pollination, non-self pollen growth is permitted because the ensemble of SLF proteins present at its *S*-locus is able to degrade the S-RNases penetrating into the pollen tube (Kubo *et al.*, 2010). Conversely, the

rejection of self-pollen in an incompatible pollination is due to the fact that self S-RNases cannot be degraded by any of the SLF proteins of the pollen tube (Kubo *et al.*, 2010).

Full manifestation of the SI response also requires several other proteins not encoded by the S-locus (see (McClure *et al.*, 2011), some of which can interact directly with the S-RNases (Sims *et al.*, 2010). Among these, a stylar 11 kDa protein, identified as a phytocyanin, was found to bind to the SC10-RNase from *Nicotiana alata* (McClure *et al.*, 2000). Another S-RNase-binding protein, SBP1, first found in *Petunia hybrida* pollen using a yeast-two-hybrid screen (Sims and Ordanic, 2001) was later shown to be present in many tissues and to interact with S-RNases in a non-S-haplotype-specific manner (Hua and Kao, 2006; O'Brien *et al.*, 2004; Sims and Ordanic, 2001). SBP1 contains a RING-HC domain in its C-terminal region suggesting it is involved in the ubiquitin-mediated degradation of S-RNases (Sims and Ordanic, 2001). SBP1 also binds SLF proteins, and is thought to be part of a novel E3 ubiquitin-ligase complex able to target a specific S-RNase for degradation through its interaction with SLF, as found in *Petunia inflata* (Hua and Kao, 2006; Meng *et al.*, 2011b). Three stylar arabinogalactan proteins, NaTTS (*Nicotiana alata* transmitting tract specific), NaPELPIII (*Nicotiana alata* pistil extension-like protein III) and a 120 kDa glycoprotein have also been shown to interact with S-RNases immobilized on affinity resin (Cruz-Garcia *et al.*, 2005), but no biochemical function for any is known. The 120 kDa glycoprotein in particular was found to be critical for SI (Hancock *et al.*, 2005) and to interact with SBP1 in a yeast-two-hybrid assay (Lee *et al.*, 2008). An additional protein reported to directly interact with S-RNases is NaTrxh, a secreted stylar protein belonging to the thioredoxin h subgroup II and identified by differential expression analysis in *Nicotiana*. NaTrxh, was found to bind and reduce S-RNases *in vitro* (Juarez-Diaz *et al.*, 2006) although its involvement as a modifier gene in SI remains to be demonstrated. A *Petunia hybrida* ubiquitously expressed protein up-regulated in germinating pollen, PGPS/D3 (Guyon *et al.*, 2000) was also shown to bind S-RNases in a yeast-two-hybrid assay (Guo *et al.*, 2006). Finally, actin also interacts with S-RNases in a yeast-two-hybrid screen, although the interaction was not confirmed by pull-down experiments in native conditions (Matsumoto and Tao, 2012). This latter finding is intriguing since actin dynamics are an essential component of pollen tube growth (Cheung *et al.*, 2008; Staiger *et al.*, 2010) and recent results suggest that S-RNases can act to disrupt the actin

cytoskeleton in *Pyrus pirifolia* (Liu *et al.*, 2007) and *Nicotiana glauca* (Roldan *et al.*, 2012) pollen tubes.

The SI response also requires the presence of a minimum level of S-RNase in the style, an amount referred to as a threshold level. For example, transgenic plants must express more than this minimum level of S-RNase in order to show an SI phenotype, and several species show a phenomenon termed sporadic self-compatibility, or SSC (i.e. occasional fruit formation after crosses expected to be incompatible) (see (Qin *et al.*, 2006) and references therein). In *Solanum chacoense*, SSC has been used to estimate the threshold for the S_{12} -RNase in a number of different genotypes (Qin *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2001), with compatibility correlated to below threshold levels. So far, no molecular mechanism has been proposed to account for the all-or-nothing SI response, which thus resembles an ultrasensitive response to S-RNase concentration.

In this work we report that eEF1A, a component of the eukaryotic translational machinery, binds S-RNase *in vitro*. Furthermore, the normal actin binding of eEF1A is enhanced by the S-RNase. In addition, we observe the formation of actin bundles during incompatible crosses *in vivo*, and these bundles are often associated with S-RNase. We suggest that eEF1A may provide a functional connection between the S-RNase and the actin cytoskeleton. In addition, this finding may also help to explain the threshold phenomenon, as S-RNase sequestered in an eEF1A-actin complex may be unable to exercise its normal cytotoxic effects.

Results

In *Solanaceae*-type gametophytic self-incompatibility, glycosylated stylar ribonucleases, termed S-RNases, are taken up indiscriminately by growing pollen tubes (Luu *et al.*, 2000). Once inside the pollen tubes, interactions with proteins of the cytoplasm control S-RNase stability (Hua and Kao, 2006) and determine if they will be allowed to exert their cytotoxic action leading to the rejection of self-pollen tubes that share a common *S*-haplotype with the style (Huang *et al.*, 1994). To identify pollen proteins potentially involved in mediating the SI response, we first purified an S-RNase-enriched fraction from the styles of a *Solanum chacoense* genotype with an $S_{11}S_{12}$ allelic composition. An immobilized lectin,

Concanavalin-A (ConA) allows a range of glycoproteins to be purified from crude stylar extracts, of which the major component is the mono-glycosylated S_{11} -RNase (Supp. Fig. IV.1). The S_{11} -RNase is more abundant than the S_{12} -RNase (Qin *et al.*, 2006) and is monoglycosylated, allowing it to be more easily eluted from the ConA column than the S_{12} -RNase which has four glycosylation sites (Liu *et al.*, 2008). The partially purified glycoprotein fraction was then re-immobilized on ConA resin and used to select binding partners from a pollen extract. To ensure that only pollen proteins binding the immobilized glycoproteins were selected, the pollen extracts were themselves passed twice through ConA resin to remove any abundant proteins potentially binding the ConA alone. SDS-PAGE analysis of the retained proteins followed by LS-MS/MS sequencing identified a number of ribosomal proteins, and curiously, a translation factor called eEF1A (Supp. Table IV.I).

The finding that a translation factor was an S-RNase binding partner was intriguing considering that the role of the S-RNase is to catalyze RNA degradation, thus blocking translation. To eliminate the possibility that a protein other than the S-RNase in the glycosylated protein fraction might be responsible for binding eEF1A, we prepared an even more highly purified S-RNase using ion exchange chromatography (IEX) to fractionate the ConA-purified stylar extract prior to immobilization on a new ConA column (Fig. IV.1). The entire specific eluate, analyzed directly by MS sequencing (Supp. Table IV.II), revealed that in addition to the S_{11} -RNase only two proteins were present, eEF1A and actin. Thus, no other proteins appear to be involved in the interaction between these three components.

To confirm the interaction between *S. chacoense* S_{11} -RNase and eEF1A, we next immobilized eEF1A using a GST-tagged *S. chacoense* eEF1A expressed in bacteria. For this experiment, GST-eEF1A was purified using a glutathione agarose resin, then mixed with a total stylar protein extract and passed again through the affinity resin. Western blot analysis of the specific eluate showed that both S-RNase and actin were again retained on the immobilized eEF1A (Fig. IV.2.A). We also observed binding of the S-RNase to a heterologous eEF1A from *Lingulodinium polyedrum*, indicating S-RNase binding to eEF1A is not restricted to the *S. chacoense* protein (Fig. IV.2.B). No binding to GST alone was ever observed.

Since actin accompanied S-RNase binding to eEF1A in this experiment, we were curious as to whether different pairs of proteins were able to bind one another. We first tested the ConA purified S-RNase immunologically for the presence of actin, reasoning that if binding between the two were possible, then actin should have co-purified with the S-RNase, but no actin could be detected (Supp. Fig. IV.1). We next asked if our eEF1A could bind actin independently of the S-RNase, as widely documented in other systems (Mateyak and Kinzy, 2010) as well as bind the S-RNase independently of actin. We thus tested binding of a commercial actin and a purified S-RNase in different combinations to an immobilized GST-eEF1A. Immunological analysis of the specific eluates indicated that similar amounts of S-RNase were bound to eEF1A whether actin was present or not (Fig. IV.3.A), suggesting that actin and S-RNase do not compete for the same binding site on eEF1A. However, while eEF1A alone bound moderate amounts of actin, the amount of actin bound was markedly increased by the presence of S-RNase (Fig. IV.3.B). We interpret these results to indicate that the formation of a ternary complex between the S-RNase, EF1A and actin is likely to occur when all three proteins are present.

Lastly, we were curious to see if any evidence could be found to support the interaction of S-RNase, eEF1A and actin *in vivo*. We therefore tested both our anti-S-RNase and the anti-actin on sections of styles taken either 18 or 24 hours after incompatible pollination. If the ternary interaction observed *in vitro* was also occurring *in vivo*, we predicted that the S-RNase and actin should co-localize in pollen tubes. Interestingly, actin staining was often found clustered in circular, electron-dense regions roughly 100 nm in diameter. These regions were always observed associated with S-RNase staining, generally to a degree higher than that found elsewhere in the cytoplasm (Fig. IV.4).

Discussion

eEF1A is one of several subunits that constitute the eukaryotic elongation factor eEF-1 (Sasikumar *et al.*, 2012). In its GTP-bound form, eEF1A binds and delivers aminoacyl-tRNAs to the ribosome and thus regulates the elongation phase of protein synthesis (Carvalho *et al.*, 1984). eEF1A mRNA levels correlate with the rate of cell growth (Grant *et al.*, 1992), although, as eEF1A is present in a ~20 fold molar excess over other elongation factors or the

ribosome itself (Slobin, 1980), it is unlikely to be the rate determining step (Condeelis, 1995). This overabundance of eEF1A has led to suggestions that it may also be involved in other cellular processes, and indeed eEF1A has been shown to have “moonlighting” functions in nuclear export, proteolysis, apoptosis and signal transduction (Sasikumar *et al.*, 2012). One of its most highly documented features, however, is its interaction with the actin cytoskeleton and its bundling activity on actin filaments (Clore *et al.*, 1996; Demma *et al.*, 1990; Dharmawardhane *et al.*, 1991), a role that appears to be mutually exclusive with its function in translation (Liu *et al.*, 1996). First reported in *Dictyostelium* (Yang *et al.*, 1990), this activity can be regulated by pH (Edmonds, 1993) and Ca^{2+} / Calmodulin (Durso and Cyr, 1994; Kurasawa *et al.*, 1996) and has been suggested to be evolutionary conserved (Demma *et al.*, 1990). eEF1A is considered to be essential for the regulation of the actin cytoskeleton (Gross and Kinzy, 2005), which reciprocally can influence protein synthesis (Gross and Kinzy, 2007). Interestingly, both protein synthesis and the cytoskeletal structure are affected during the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility response (Liu *et al.*, 2007; McClure *et al.*, 1990; Roldan *et al.*, 2012).

During the growth of pollen tubes in the style, S-RNases are imported from the extracellular matrix of the style into the pollen tube cytoplasm in a *S*-haplotype-independent manner (Luu *et al.*, 2000). The cytotoxic effect of the S-RNases, and the subsequent incompatibility reaction, occurs when pollen tubes share the same haplotype as the S-RNase (de Nettancourt, 2001). Interestingly, it has recently been shown that S-RNases might also trigger disruption of the actin cytoskeleton in self-incompatible pollen tubes (Liu *et al.*, 2007; Roldan *et al.*, 2012). By contrast, in compatible pollen tubes, S-RNases are targeted for degradation (Liu *et al.*, 2009), which abrogates their cytotoxic action. Curiously, a minimum threshold quantity of S-RNase in the style is required to trigger the self-incompatibility reaction (Clark *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2006), but to date, no mechanism has yet been proposed to account for this. The threshold phenomenon is conceptually akin to a sigmoidal or ultrasensitive response for which a variety of mechanisms, including cooperativity, positive feedback loops and molecular titration (Zhang *et al.*, 2013) have been proposed. It is an intriguing possibility that eEF1A may potentially act to titrate the amount of free S-RNase following import into the pollen tube cytoplasm. If true, this binding could give

rise to an ultrasensitive response because the amount of unbound S-RNase is likely to increase most markedly when the cytoplasmic supply of eEF1A is exhausted. The eEF1A concentration would thus define the inflection point in the ultrasensitive response to increasing S-RNase concentrations. Interestingly, the binding and immobilization of the S-RNase in a complex with eEF1A and actin might also result in sequestration of eEF1A, which in turn might prevent its subsequent participation in protein synthesis.

During normal pollen tube elongation, the actin cytoskeleton is organized as an array of long filaments extending from the base to a distal region of the pollen tube just behind the growing tip, where the extensive vesicular activity required for membrane extension occurs (Cheung and Wu, 2008). The integrity of the cytoskeletal organization and in particular its dynamic nature is critical to the polarized growth of the pollen tube (Cheung *et al.*, 2008). During the incompatible reaction, the presence of self S-RNases results in a gradual disorganization of the filamentous actin cytoskeleton and in a reduction in the pollen tube growth rate (Roldan *et al.*, 2012). This drastic effect on actin reorganization is not seen in compatible pollen tubes, possibly due to degradation of the S-RNase. It is thus tempting to speculate that recruitment of the S-RNase-eEF1A complex to the actin cytoskeleton may provide a potential functional link between the stylar incompatibility component and the extensive reorganization of the actin cytoskeleton that occurs during the incompatible reaction (Liu *et al.*, 2007; Roldan *et al.*, 2012). Indeed, the staining of incompatible pollen tubes with anti-actin reveals bundles, the size of which is consistent with those formed *in vitro* by the eEF1A-actin complex from *Dictyostelium* (Edmonds, 1993; Yang *et al.*, 1990). In our case, such bundles also contain S-RNase, although S-RNase labeling apparently unassociated with actin can also be observed in the cytoplasm (Fig. IV.4).

Our results demonstrate a previously unsuspected binding between eEF1A and S-RNases. This binding is unlikely to be simply due to electrostatic attraction since eEF1A and the S_{11} -RNase are both basic proteins (pI 9.5 and 8.4 respectively). Furthermore, this binding does not require actin although the amount of actin binding to eEF1A in our pull-down experiments is stimulated markedly by the presence of S-RNase (Fig. IV.3). We note that our purified S-RNase preparations do not contain immunologically detectable levels of actin (Supp. Fig. IV.1), implying that appreciable binding of S-RNase to actin requires eEF1A. Our

results thus suggest models where either all three proteins bind together or where eEF1A acts as an intermediate between the S-RNase and actin. It must be noted that several reports in the literature suggest a possible binding between actin and mammalian or fungal ribonucleases such as bovine seminal RNase (Simm *et al.*, 1987), angiogenin (Hu *et al.*, 1993) or ACTIBIND (de Leeuw *et al.*, 2007). The nature of this binding is unclear, however, as the native structure and activity of at least the fungal enzyme is not required (de Leeuw *et al.*, 2007). Actin has also recently been suggested as a candidate protein interacting with the *Prunus avium* S₆-RNase in a yeast two-hybrid screening (Matsumoto and Tao, 2012), but subsequent pull-down assays only validated such interaction at concentrations of reducing agents high enough to potentially induce protein aggregation (Takase *et al.*, 2002).

In summary, we have identified eEF1A as a potential S-RNase-binding protein in *S. chacoense* pollen extracts. We propose that binding between the two may provide an explanation for the S-RNase threshold effect observed in the self-incompatibility reaction, below which pollen rejection does not occur (Clark *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2006). Moreover, this finding opens up a new and tantalizing glimpse of how S-RNases may influence the actin cytoskeleton and translation in pollen tubes. This opens a fascinating vista of potential rejection mechanisms of the pollen tubes by the S-RNase, considering both the actin cytoskeleton and the translation apparatus, which are increasingly shown to be interdependent, are disrupted during the self-incompatibility reaction.

Materials and Methods

Plant material

The self-incompatible diploid genotypes ($2n=2x=24$) of *Solanum chacoense* used in this study include the previously described L25 and V22 lines carrying the self-incompatibility alleles $S_{11}S_{12}$ and $S_{11}S_{13}$ respectively (Qin *et al.*, 2001), as well as the $S_{12}S_{12}$ genetic line 2548 and the tGFP- $S_{11}S_{13}$ line (kindly provided by Dr. Matton, Université de Montréal) (Liu *et al.*, 2009).

Protein extraction and purification

Stylar proteins were extracted from 0.5 g of L25 styles ground in liquid nitrogen using ConA extraction buffer (100 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol). After clarification by centrifugation, the extraction buffer was replaced with ConA binding buffer (100 mM Tris HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.02% 2-mercaptoethanol) by chromatography on PD-10 columns (GE Healthcare Biosciences, PA) and the extract incubated with 0.5 mL of Concanavalin A resin (GE Healthcare Biosciences, PA) at room temperature for 1h. After washing the resin with ConA binding buffer, the bound proteins were washed with low-salt ConA binding buffer (100 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.02% 2-mercaptoethanol). The bound proteins were then either used directly for the pollen protein binding assay on the resin or were eluted using ConA elution buffer (100 mM Tris HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% 2-mercaptoethanol, 1 M α -D-methyl-glucoside) for further purification. To further purify the S-RNase, the buffer in the ConA eluate was replaced with IEX binding buffer (50 mM MES pH 5.5) by PD-10 chromatography and the extract applied to a Resource S cation-exchange column using an AKTA FPLC system (GE Healthcare Biosciences, PA). Proteins were eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl in IEX binding buffer, and all fractions containing the *S*₁₁-RNase, as verified by immunoblotting, were pooled. The IEX elution buffer was then replaced with ConA binding buffer by PD-10 chromatography and the purified *S*₁₁-RNase extract immobilized on 0.5 mL of ConA resin. The resin was then washed with low-salt ConA binding buffer before use for the pollen protein-binding assay.

Pollen proteins were extracted from 0.5 g of mature L25 pollen in ConA extraction buffer using a French press. After clarification by centrifugation, the extraction buffer was replaced with low-salt ConA binding buffer and the sample incubated twice with 0.5 mL of Concanavalin A resin to deplete Concanavalin A-binding proteins from the pollen extract. Unbound proteins were then incubated with the ConA-bound stylar proteins or ConA-bound purified *S*₁₁-RNase at room temperature for 1 h. The resin containing bound protein was subsequently washed with low-salt ConA binding buffer and ConA binding buffer. Proteins remaining bound to the resin were then eluted with ConA elution buffer. Protein fractions

were then electrophoresed on SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. Candidate protein bands binding a partially purified S_{11} -RNase extract were excised and sequenced separately by LC-MS/MS at the Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC, Université de Montréal), whereas the entire eluate containing proteins binding the Resource S-purified S_{11} -RNase was sequenced directly.

Cloning and recombinant protein expression

A full length *S. chacoense* eEF1A coding sequence (GenBank Accession Number KF573426) was cloned and sequenced using sequence information derived from Illumina sequencing of pollen RNA from lines V22 and 2548 using BamHI-ScEF1a-F (5' GGGGGGATCCGGTAAGGAAAAGATTCACAT 3') as a forward primer and ScEF1a-BamHI-R (5' GGGGGGATCCTCACTTTCCTTCTTCTGGG 3') as a reverse primer. The sequence was subcloned into the BamHI site of the pGEX-4T-2 protein expression vector (GE Healthcare Biosciences, PA) in frame with the N-terminal GST tag. The derived amino acid sequence of this pollen tube eEF1A contains all the amino acids determined by MS sequencing of the ConA column eluate. An eEF1A coding sequence from the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* was also amplified using primer sequences derived from a sequence database generated by Illumina RNA-Seq (GenBank Accession number JO706501), forward primer BamHI-EF1a-F (5' GGGGGGGGATCCTCTGATCAAAAAGAACATGTCTCTA 3') and reverse primer Efla-NotI-R (5' GGGGGGGCGGCCGCTTATTCAATCTTTGTAATTTTACCA 3') and using *L. polyedrum* cDNA as template. This sequence was similarly subcloned in pGEX-4T-2 to create a N-terminal GST fusion protein.

The expression vectors were used to transform BL21(DE3) competent *E. coli* (New England Biolabs, MA) according to the manufacturer's instructions. For protein expression, 100 mL of each culture at an OD of 0.5 were induced with 0.1 mM IPTG and incubated for 3 hours at 28°C. Cultures were lysed in extraction buffer (PBS pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT and 2 mM PMSF) using a French press. The GST-tagged recombinant proteins were purified by incubating clarified crude bacterial extracts for 2h with 200 μ L GST resin (Bio Basic Inc, Ontario). After washing the resin with the same buffer, bound proteins were eluted

using elution buffer (50mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT and 10 mM reduced glutathione). The buffer in the eluted proteins was replaced with interaction buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM sodium chloride, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT) by chromatography on PD-10 columns (GE Healthcare Biosciences, PA). The protein concentration of the purified extracts was determined using a Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, CA).

GST pull-down experiments

For pull-downs using only ConA purified S-RNase (as in Fig. IV.2), stylar proteins were extracted from 0.25 g of V22 styles ground in liquid nitrogen using GST extraction buffer (PBS pH 8, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT and 2 mM PMSF) and the extraction buffer replaced with GST interaction buffer using PD-10 columns. Typically, 1 mg stylar protein was incubated with 100 μ L of GST resin preloaded with either 250 μ g GST or 250 μ g of the GST-tagged eEF1A for 2h at room temperature. The resin then washed four times with GST interaction buffer before elution of the bound proteins with interaction buffer containing 10 mM reduced glutathione. All the protein fractions were precipitated with 4 volumes of acetone and resuspended in 100 μ l of SDS-PAGE loading buffer. Sample volumes corresponding to 5% of the flow through or wash and 40% of the eluate were electrophoresed on SDS-PAGE and transferred on a Hybond C-extra nitrocellulose membrane (GE Healthcare Biosciences, PA) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, CA) according to the manufacturer's instructions. Protein transfer was visualized by staining the membranes with Ponceau S and recorded using an ImageQuant LAS 4000 imaging system (GE Healthcare Biosciences, PA). For the pull-downs using Resource S purified S-RNase (as in Fig. IV.3), the GST resin was loaded with GST or GST-tagged eEF1A as above. This resin was then incubated for 1h at room temperature with either 10 μ g of purified *S*₁₁-RNase, 10 μ g of a commercial bovine actin preparation (Sigma-Aldrich Corporation, MO) or both together. The resin was then washed and eluted as above.

Immunoblotting analyses

Antibodies for western blots (Matton *et al.*, 1999) included a rabbit anti-*S*₁₁-RNase antibody (Matton *et al.*, 1999), a commercial plant-specific mouse monoclonal anti-actin (Sigma-Aldrich Corporation, MO) and a commercial animal specific rabbit anti-actin (Sigma-Aldrich Corporation, MO), used as described previously (Qin *et al.*, 2005) or according the manufacturer's instructions. Primary antibodies were detected using commercial horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich Corporation, MO) and the Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate kit (EMD Millipore Corporation, MA) according the manufacturer's instructions and recorded using an ImageQuant LAS 4000 imaging system system.

Immunoelectron microscopy

Immunolocalization preparations and experiments were performed essentially as described previously (Luu *et al.*, 2000) on 70 nm transversal sections of V22 (S11S13) styles collected 18 or 24h after pollination with incompatible pollen from the tGFP-S11S13 plant. Sections were labeled simultaneously with a rabbit anti-*S*₁₁-RNase primary antibody (Luu *et al.*, 2000) and a commercial mouse plant-specific anti-actin primary antibody (Sigma-Aldrich Corporation, MO). The primary antibodies were visualized by simultaneous staining with a 20 nm colloidal gold-labeled goat anti-rabbit secondary antibody (BBI International, ND) and a 5 nm colloidal gold-labeled goat anti-mouse secondary antibody (BBI International, ND). All antibodies were used at a 1/100 dilution, and sections were observed using a JEOL JEM- 1010 operating at 80 kV

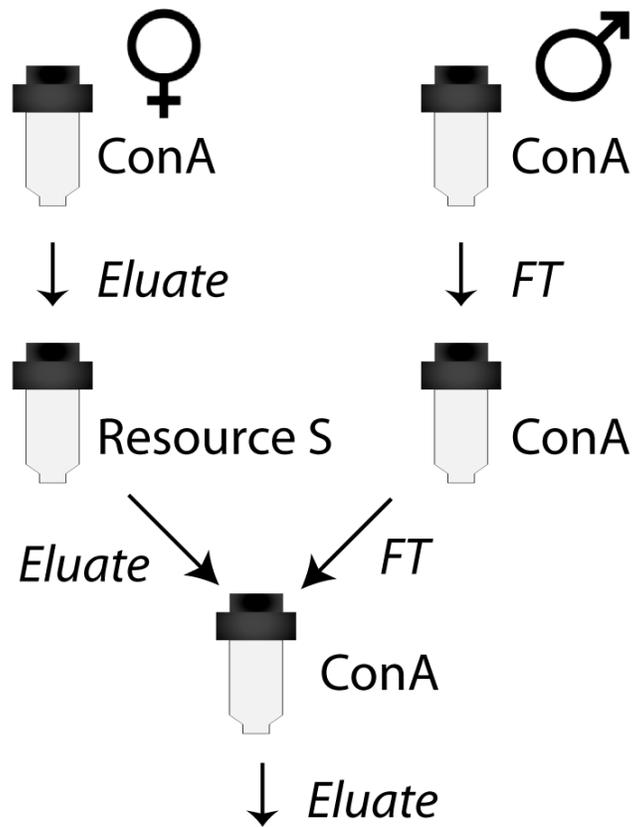
Acknowledgements

We are grateful to Drs. J. Labovitz and F. Bou Daher for critically reading the manuscript and L. Pelletier for technical assistance. This work was supported by financial assistance from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MC.

Figure legends

Figure IV.1 : Protein purification schema and proteins identified in the final eluate.

The stylar S-RNase was purified by ConA and Resource S (ion exchange) chromatography before being immobilized on ConA beads. Pollen proteins, depleted of proteins binding non-specifically to the ConA resin, were applied to the immobilized S-RNase, washed and eluted with ConA elution buffer. Only three proteins were detected in the specific eluate by LC-MS/MS.



Protein	# Pep	Coverage
RNase	12	52%
Actin	10	29%
eEF1A	7	17%

Figure IV.2 : GST pull-down of S_{11} -RNase by eEF1A.

(A) Stylar total protein extracts containing an S_{11} -RNase were used for chromatography on glutathione agarose beads in the presence of bacterially expressed GST or with a bacterially expressed *S. chacoense* eEF1A-GST fusion protein. Samples for each experiment are 10% of the column flow-through (FT), the wash (W) and the specific eluate (E). Binding of the eEF1A to the S-RNase and to the endogenous pollen actin was assessed by Western blot. (B) Binding of the S-RNase to a *Lingulodinium polyedrum* eEF1A.

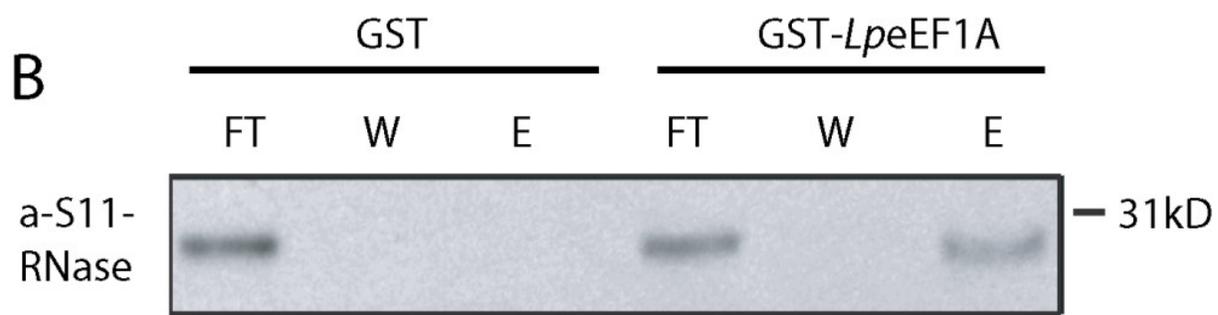
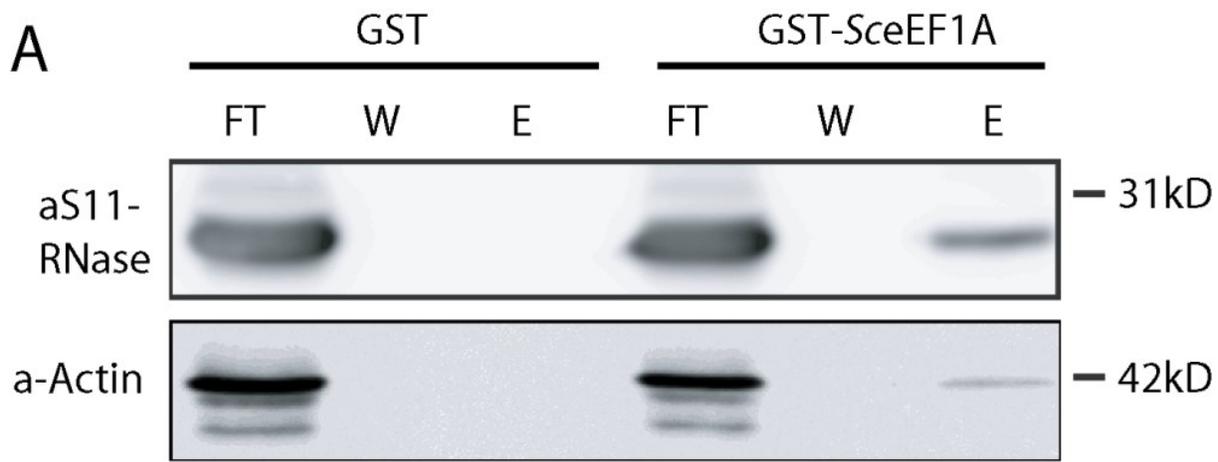


Figure IV.3 : eEF1A binding to actin is increased by S_{11} -RNase.

(A) A GST-eEF1A fusion protein immobilized on GST resin was mixed with known amounts of purified S_{11} -RNase and/or a commercial bovine actin. GST-eEF1A binds similar amounts of S_{11} -RNase whether actin is present or not but the amount of actin bound by eEF1A increases markedly in the presence of S_{11} -RNase. (B) A GST protein control binds neither S_{11} -RNase nor actin.

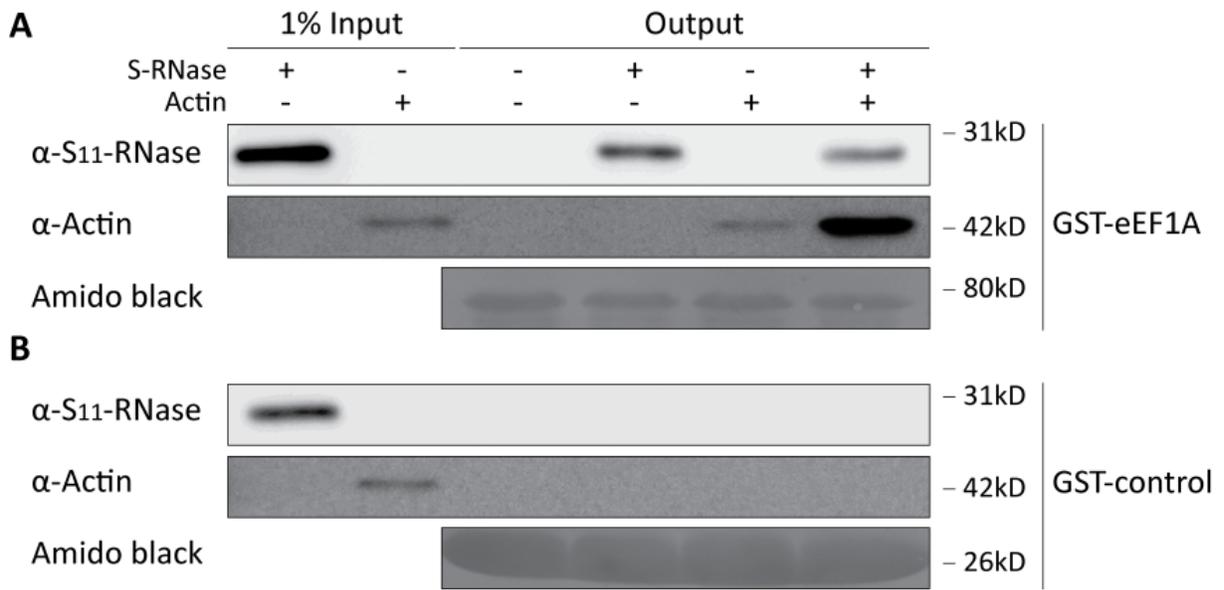
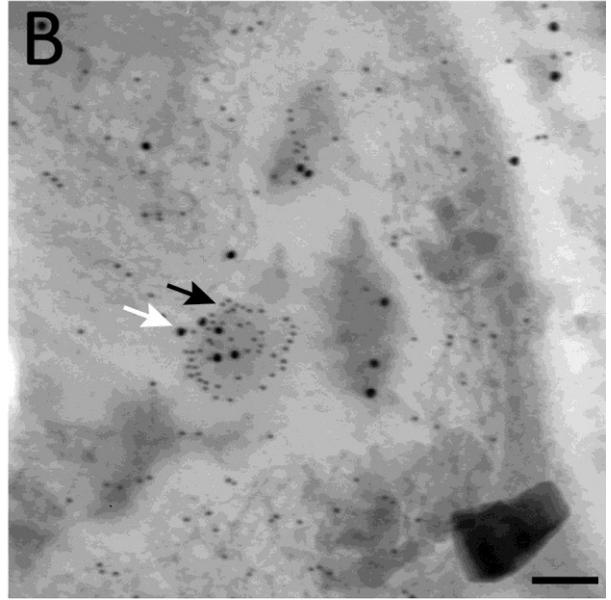
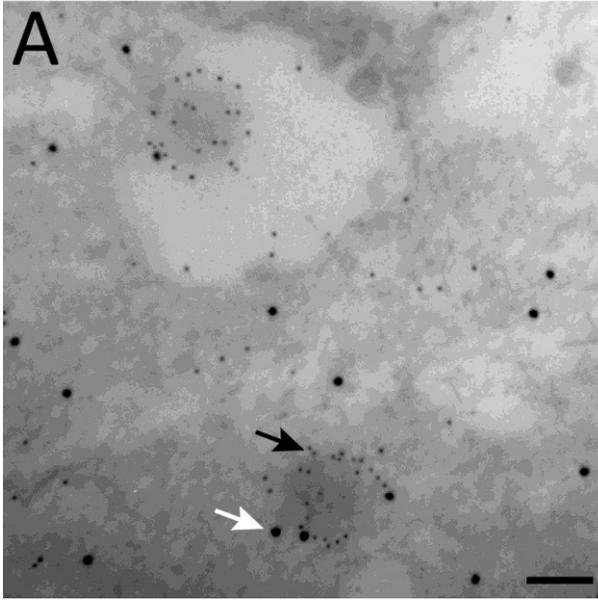


Figure IV.4 : Regions of intense actin staining in incompatible pollen tubes also stain with S_{11} -RNase.

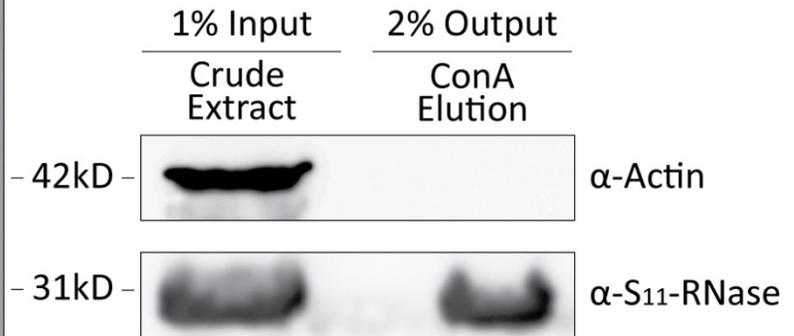
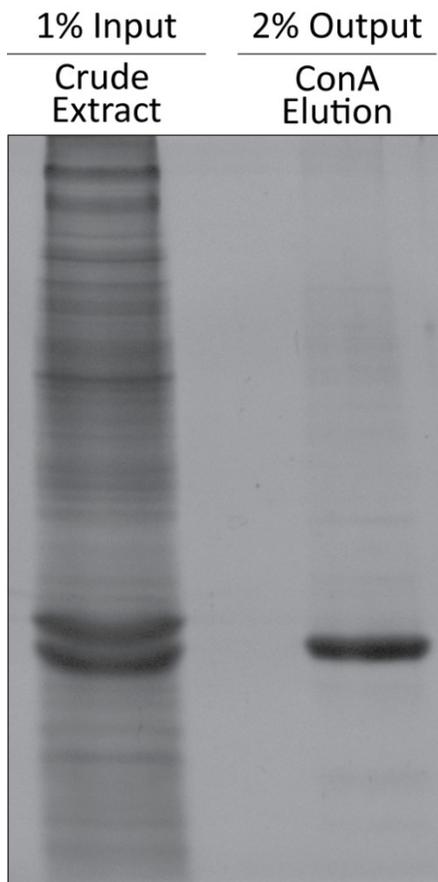
Incompatible pollen tubes 18h (A) and 24h (B) post-pollination stained simultaneously with anti-actin (5 nm colloidal gold, black arrows) and anti- S_{11} -RNase (20 nm colloidal gold, white arrows). Scale bars are 0.1 μ m.



Supplementary figure legends

Supplementary figure IV.1 : S_{11} -RNase-enriched preparations by ConA chromatography do not contain actin.

A partially purified S_{11} -RNase fraction eluted from a ConA column contains the S_{11} -RNase as the principal component. Stylar actin does not co-purify with the S_{11} -RNase as shown by the lack of anti-actin antibody staining in the ConA eluate.



Supplementary table IV.I : Proteins interacting with a crude S-RNase preparation.

<u>MW_{obs}</u> <u>(kDa)</u>	<u>Best match</u> <u>(<i>S. tuberosum</i>)</u>	<u>Coverage</u> <u>(%)</u>	<u>MW_{exp}</u> <u>(kDa)</u>
50	eEF1A	26	50
49	60S ribosomal protein L4-1	45	45
48	60S ribosomal protein L4-1	51	45
40	60S ribosomal protein L4-1	42	45
36	60S ribosomal protein L5	29	35
33	60S ribosomal protein L7A-like	44	29
32	60S ribosomal protein L7A-like	44	29
30	60S ribosomal protein L7	56	28
28	60S ribosomal protein L7	45	28

Supplementary table IV.II : List of peptides sequenced from proteins interacting with an immobilized highly purified S-RNase.

S₁₁-RNase

YQYLK
IDQASAR
TLQIHR
EGPQLLK
HWIQLK
MLNDLDK
KDQPAWK
TVTQMDPDIK
LTYNYFSDK
TVTQMDPDIK
IYNQNTYFSLALR
MLNDLDKHWIQLK
IVPGSSYTFEEIFDAVK
LQLVLTWPPSFCHANNCQR

Actin

VVAPPER
CDVDIR
VVAPPERK
DLTEHLAK
GYSFTTSAEK
EITALAPSSMK
HTGVMVGMGQK
DAYVGDEAQSK
AVFPSIVGRPR
NFELPDGQVITIGAER
VAPEEHPVLLTEAPLNPK

eEF1A

EVSSYLK
QTVAVGVVK
NVAVKDLK
LPLQDVYK
IGGIGTVPVGR
STNLDWYK
VGYNPDKIPFVPISGFEGDNMIER

Chapitre V. Discussion et perspectives

1. Impact des travaux

1.1. La région C4 a une fonction structurelle

La caractérisation de la région C4 de la S_{11} -RNase de *Solanum chacoense*, présentée au chapitre II de ce travail, constitue la première analyse formelle de la fonction d'une région conservée des S-RNases non impliquée dans leur activité catalytique. Les régions C1 et C5 étant en effet fortement hydrophobes et non exposées en surface de ces protéines, leur rôle dans la détermination de la structure tridimensionnelle des S-RNases n'a jamais été mis en doute. Toutefois, attribuer une fonction similaire à la région C4 en absence de validation expérimentale semble moins évident, considérant que la moitié des résidus constituant cette région sont chargés et exposés en surface de la protéine (Ida *et al.*, 2001a; Ioerger *et al.*, 1991; Matsuura *et al.*, 2001). De plus, les régions RC4 des S-RNases de *Rosaceae* ne montrent pas de similarité avec la région C4 des S-RNases chez les autres familles (Ioerger *et al.*, 1991; Ma and Oliveira, 2002; Ushijima *et al.*, 1998), bien que les régions RC4 et C4 soient fortement conservées à l'intérieur de ces groupes respectifs. L'AI chez les Rosaceae présentant par ailleurs des caractéristiques distinctes des autres familles (voir section 3.4.5), ces caractéristiques intrigantes justifiaient donc une investigation expérimentale du rôle exact de la région C4 des S-RNases.

Les expériences présentées dans cette étude ont testé l'implication de la région C4 dans d'éventuelles interactions avec des ligands protéiques comme un récepteur spécifique ou un inhibiteur général des S-RNases ainsi que dans la dégradation ubiquitine-dépendante des S-RNases. Les résultats obtenus n'ont permis de mettre en évidence aucune implication de la région C4 dans de tels mécanismes, suggérant plutôt un rôle structurel (Qin *et al.*, 2005). En particulier, l'altération du résidu lysine conservé en région C4 ne prévient pas la dégradation de cette S-RNase, indiquant que ce résidu ne constitue pas un site exclusif d'ubiquitination des S-RNases. Une analyse *in vitro* rapportée par la suite a mis en évidence le rôle potentiel de six résidus lysine en région C-terminale des S-RNases chez *Petunia inflata* (Hua and Kao, 2008).

Toutefois, étant donné qu'aucun des mutants présentés dans cette étude ne prévient totalement la dégradation des S-RNases *in vitro*, il est probable qu'aucun résidu lysine ne constitue individuellement un site exclusif d'ubiquitination. Le fait qu'aucun mutant constitutivement incompatible en raison d'une impossibilité à dégrader une S-RNase modifiée n'ait encore été rapporté supporte une telle hypothèse. Les constructions analysées chez *Petunia* n'ont cependant jamais été évaluées *in vivo*, et le système *in vitro* (voir section I.3.4.3.7.1) utilisé pour détecter leur dégradation présente la particularité de ne pas être en mesure de dégrader les S-RNases glycosylées (Hua and Kao, 2006), ce qui permet de s'interroger sur la représentativité d'un tel système par rapport à la situation *in planta* (voir aussi plus bas). Aussi est-il possible que ce dernier ne puisse répliquer la totalité des mécanismes d'AI et que l'impact *in vivo* des mutations testées soit différent de celui observé *in vitro*. Le mode d'ubiquitination des S-RNases n'a toutefois pas été exploré de manière plus approfondie à ce jour, pas plus que l'éventualité que l'ubiquitination des S-RNases puisse accomplir des rôles additionnels en dehors de leur dégradation. L'analyse par spectrométrie de masse de S-RNases ubiquitinées *in vivo*, purifiées à partir d'extraits stylaires pollinisés, ou de S-RNases après leur traitement *in vitro* avec des extraits polliniques (voir section I.3.5.7.1) permettrait sans doute de déterminer précisément les profils et modes d'ubiquitination de ces protéines. Par ailleurs, la substitution par des résidus arginine de tous les résidus lysine d'une S-RNase, si ceci n'affecte pas la stabilité de la protéine, serait un bon moyen de tester la possibilité de générer une S-RNase d'incompatibilité « universelle » car dépourvue de mode de dégradation.

La région C4 ne semble pas non plus être impliquée dans la pénétration des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques, ce processus n'étant pas altéré dans les constructions analysées exprimant la protéine à un niveau détectable. Aucune mutation au niveau des S-RNases ou d'autres protéines impliquées dans l'AI n'a d'ailleurs à ce jour permis d'observer une déficience à ce niveau, suggérant un mode d'entrée non spécifique à ces protéines, le plus probable étant par endocytose. Par contre, si nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence l'implication de la région C4 dans de possibles interactions avec un ligand, cette hypothèse ne peut toutefois pas être pour autant totalement rejetée. D'abord, sur un plan théorique, parce que C4 est la seule région conservée des S-RNases exposée en surface de la protéine et constitue donc la seule région qui peut identifier les S-RNases comme telles auprès

d'un éventuel ligand protéique. Ainsi, chez les *Prunoideae*, la région RC4 serait une cible logique pour un inhibiteur général des S-RNases même si chez les *Solanaceae*, un tel inhibiteur général ne semble pas nécessaire au fonctionnement de l'AI. Nous avons prédit que la mutation que nous avons introduite au niveau d'un résidu chargé modifierait significativement les affinités de liaison dans cette région, et elle aurait donc dû révéler une telle fonction en limitant de telles interactions. Il est toutefois possible que le résidu modifié ne participe pas aux interactions dans cette région, ce qui aurait limité les modifications phénotypiques observables. Dans ce cas, des modifications simples ou doubles au niveau des résidus chargés (moins drastiques qu'une mutation de tous ces résidus, tel que testé) auraient possiblement produit des résultats différents. Par ailleurs, le choix de l'acide aminé glycine, utilisé pour la substitution des résidus chargés dans la région C4 des mutants présentés dans cette étude, pourrait potentiellement avoir influencé négativement les résultats obtenus. Il reste donc possible que d'éventuelles substitutions avec un autre acide aminé puissent générer un phénotype différent. Ceci est surtout vrai pour le premier mutant présenté, dépourvu totalement de résidus chargés en région C4, qui avec des substitutions différentes pourrait potentiellement être exprimé au niveau protéique, contrairement à ce que nous avons observé. La région C4 est néanmoins capable d'accueillir au moins un résidu glycine sans être affectée, le second mutant présenté étant parfaitement fonctionnel en dépit d'une telle substitution au niveau d'un de ses résidus chargés.

1.2. Le rôle de la glycosylation des S-RNases reste incertain

1.2.1. Aucune fonction pour la glycosylation des S-RNases ?

La fonction de la glycosylation des S-RNases n'étant toujours pas déterminée, les multiples mutants *S*₁₁-RNase présentés au chapitre III, altérés en insérant et/ou en éliminant un site de glycosylation, avaient pour but de tester le rôle possible des sucres dans la reconnaissance allélique dans les systèmes d'AI. Des expériences rapportées auparavant suggéraient que la glycosylation des S-RNases n'est pas requise au rejet pollinique (Karunanandaa *et al.*, 1994). Il a toutefois été suggéré par la suite (Oxley *et al.*, 1996) que ce mutant avait potentiellement acquis la capacité de rejeter tout pollen de manière constitutive, l'absence de sucres en surface des S-RNases prévenant possiblement son inhibition ou sa

dégradation par pollen *S*. La vérification d'une telle hypothèse, simple à réaliser, n'a curieusement jamais été rapportée par les auteurs de l'étude originale (Karunanandaa *et al.*, 1994). Suite à l'identification de pollen *S* (Sijacic *et al.*, 2004), la possibilité pour certaines protéines F-box de cibler des sucres conjugués (Yoshida, 2007) a enfin donné une base biochimique plausible pour cette hypothèse. Ceci nous a encouragé à générer à notre tour un mutant S_{11} -RNase non glycosylé. Le phénotype de ce dernier est toutefois celui d'une S_{11} -RNase de type sauvage, ce qui invalide la possibilité d'une génération d'une S-RNase à rejet universel constitutif et semblerait confirmer une absence de fonction directe de la glycosylation dans la reconnaissance allélique des S-RNases (Karunanandaa *et al.*, 1994; Soulard *et al.*, 2013).

1.2.2. Les S-RNases restent glycosylées dans les tubes polliniques

En dépit de la conclusion précédente, l'analyse des autres mutants générés au cours de la même étude suggère par contre d'autres hypothèses intéressantes. L'acquisition surprenante de la capacité de rejet du pollen S_{13} et $S_{11}S_{13}$ par une S_{11} -RNase mutée afin d'insérer un site de glycosylation en région HVa et de supprimer le site natif conservé en région C2 suggère tout d'abord que les S-RNases ne sont pas déglycosylées à l'intérieur des tubes polliniques (Soulard *et al.*, 2013). En effet, si les S-RNases étaient déglycosylées à l'intérieur des tubes polliniques, on s'attendrait à ce que cette S_{11} -RNase comportant uniquement un site de glycosylation en HVa montre un phénotype similaire au mutant S_{11} -RNase comportant deux sites de glycosylation en région C2 et HVa, dont le phénotype est celui du type sauvage car ces deux S-RNases mutées ne différeraient alors que d'un acide aminé en région C2, ce dernier étant responsable de la présence ou l'absence du site de glycosylation dans cette région. Ces deux mutants montrant des phénotypes distincts, l'acquisition de la double spécificité S_{11}/S_{13} ne peut alors dériver que d'une altération des interactions allèles-spécifiques par l'absence de sucres normalement conservés en région C2 ou bien directement de la mutation introduite dans la séquence d'acides aminés en région C2. Il est difficile d'envisager comment cette mutation ponctuelle dans une région conservée, qui substitue un résidu asparagine en glutamine, pourrait affecter les interactions alléliques entre ces S-RNases et les protéines SLF afin de conférer une nouvelle spécificité. En effet, ces deux résidus présentent des caractéristiques physico-chimiques similaires et ne diffèrent que par la longueur de leurs

chaines latérales par la présence d'un carbone additionnel. De plus, une mutation similaire en C2 chez un mutant S_{11} -RNase n'affecte pas le phénotype de cette dernière. En conséquence, il est plus plausible que ce soit bien l'absence ou la présence de glycosylation en région C2 qui distingue la double-spécificité S_{11}/S_{13} de la simple spécificité S_{11} et ces résultats ne peuvent s'expliquer que si les S-RNases ne sont pas déglycosylées à l'intérieur des tubes polliniques. Il est difficile de concilier cette conclusion avec les résultats d'analyse de la dégradation des S-RNases qui montrent que les S-RNases glycosylées ne sont pas en mesure d'être dégradées par l'action d'extrait stylaires, au contraire des S-RNases d'origine bactérienne (et donc non glycosylées) ou de S-RNases déglycosylées enzymatiquement (Hua and Kao, 2006). Dans cette optique, ces résultats soulignent l'importance de la validation *in planta* des expériences réalisées *in vitro*.

1.2.3. La glycosylation pourrait moduler la spécificité allélique

Si l'hypothèse selon laquelle une glycosylation en région HVa serait la cause de l'auto-compatibilité observée chez *Nicotiana sylvestris* (Golz *et al.*, 1998) n'a pu être confirmée par nos résultats, cette dernière ne peut pour le moment être totalement invalidée, car la présence de deux bandes immunoréactives chez les deux mutants testés indique que la glycosylation en région HVa n'est pas complète. La présence de S-RNases non glycosylées en région HVa pourrait dans notre cas masquer les effets éventuels de la glycosylation au niveau de cette région sur la fonction des S-RNases. Il est intéressant de constater que la glycosylation en région HVa analysée dans notre étude partage avec le mutant rapporté chez *N. sylvestris* (Golz *et al.*, 1998) la caractéristique de résister partiellement à la déglycosylation enzymatique (Soulard *et al.*, 2013). En dépit de cette conclusion, l'analyse des mutants générés dans cette étude suggère que la glycosylation pourrait dans certains cas moduler la reconnaissance allélique (Soulard *et al.*, 2013). Cependant, en absence de connaissances plus précises quant aux régions des S-RNases et protéines SLF impliquées dans leurs interactions, il reste pour le moment impossible de déterminer précisément comment la présence de sucres pourrait moduler ces liaisons. En attente de la confirmation d'un tel phénomène à un niveau généralisé chez plusieurs espèces, le rôle exact de la glycosylation des S-RNases, suffisamment important pour que toutes ces protéines aient conservé au moins un site de glycosylation, reste encore à déterminer.

1.3. eEF1A : un nouvel élément de la réaction d'AI ?

De nombreuses protéines pouvant entrer en interaction avec les S-RNases ont été identifiées (Sims, 2012), mais la fonction précise de la plupart d'entre elles dans les mécanismes de l'AI reste encore à déterminer. Il est fort probable que plusieurs facteurs impliqués dans les processus d'AI restent encore à identifier avant de permettre une compréhension précise des processus qui mènent à la réaction d'AI. Dans le cas de *S. chacoense*, une large proportion des facteurs rapportés possiblement impliqués dans l'AI n'a pas encore été identifiée ou caractérisée, notamment l'ensemble des protéines SLF qui constituent pollen *S*. Malgré les nombreux essais d'identification de pollen *S* réalisés dans notre laboratoire, la plupart des approches moléculaires ou biochimiques qui ont été testées ont échoué et c'est seulement récemment par séquençage Illumina d'ARN polliniques que les premiers candidats pollen *S* ont été identifiés chez *S. chacoense* (Soulard, résultats non publiés).

L'approche que nous avons choisie pour l'identification des interactants avec les S-RNases fut la caractérisation des protéines polliniques pouvant entrer en interaction avec des S-RNases immobilisées sur résine chromatographique. Bien qu'elles n'aient pas permis d'identifier pollen *S* chez *S. chacoense*, ces analyses, présentées au chapitre IV, ont mis en évidence une liaison entre la S_{11} -RNase et eEF1A (Soulard, 2013). Cette protéine est un composant de la machinerie de traduction chez les eucaryotes, et est aussi impliquée dans de nombreux processus additionnels (Mateyak and Kinzy, 2010; Sasikumar *et al.*, 2012), y compris l'organisation du cytosquelette d'actine (Gross and Kinzy, 2005). La perte de l'intégrité du cytosquelette d'actine lors des réactions d'AI est un processus bien caractérisé chez les *Papaveraceae*, mais n'a été mis en évidence chez les *Solanaceae* que récemment (Liu *et al.*, 2007; Roldan *et al.*, 2012). Il semble donc que les S-RNases soient capables d'induire une altération du cytosquelette d'actine dès les étapes initiales de la réaction d'AI. Paradoxalement, il ne semble pas que les S-RNases soient en mesure de lier directement l'actine (Matsumoto and Tao, 2012). Puisque la traduction protéique et l'organisation du cytosquelette d'actine sont deux processus interdépendants altérés par les réactions d'AI, il est séduisant de supposer que la liaison avec eEF1A constitue un lien fonctionnel entre les S-RNases et ces altérations. De plus les S-RNases semblent pouvoir modifier l'interaction entre

eEF1A et l'actine (Soulard, 2013), ce qui pourrait potentiellement altérer les fonctions de eEF1A dans les deux processus considérés.

Si une telle hypothèse devait être confirmée, ceci désignerait eEF1A à la fois comme une cible et comme un acteur central des processus observés lors des réactions d'AI. La suppression de eEF1A étant certainement létale, valider un tel rôle dans les réactions d'AI par des analyses de mutants avec « perte de fonction » serait impossible. Toutefois, des expériences de co-localisation d'eEF1A par microscopie confocale ou électronique, couplées au marquage de l'actine et des S-RNases, permettraient de vérifier la plausibilité d'une telle hypothèse. L'implication d'eEF1A dans un mécanisme de réponse ultrasensible déterminant les quantités « seuils » de S-RNase requises au rejet pollinique sera par contre plus difficile à confirmer, à moins que l'analyse des quantités d'eEF1A dans différents types de pollen révèle des différences significatives qui seraient en corrélation directe avec les valeurs « seuils » déterminées pour chacun de ces haplotypes. Ces valeurs « seuils » pouvant aussi varier du côté stylaire en fonction du degré de glycosylation des S-RNases (Liu *et al.*, 2008), il serait cependant nécessaire de vérifier si des S-RNases comportant différents niveaux de glycosylation lient eEF1A ou affectent le lien entre eEF1A et l'actine de manières différentes.

2. Quelles futures approches permettront de résoudre les questions qui restent quant au fonctionnement de l'AI ?

2.1. Les mécanismes de l'AI sont encore largement indéterminés

Bien que les dernières années aient permis l'identification de nombreux nouveaux facteurs impliqués dans l'AI en plus des S-RNases, et que ces études aient permis de cerner un peu mieux les mécanismes qui constituent la base des réactions d'AI, ces découvertes ont aussi soulevé une multitude de questions et mis en évidence de nombreuses disparités entre espèces, disparités inattendues dans un système qui phylogénétiquement précéderait la spéciation (Igic and Kohn, 2001). Ces observations ont donné lieu à la formulation de multiples modèles d'AI qui semblent pour le moment « incompatibles » entre eux (McClure *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011b). Par ailleurs, considérant que les avancées récentes ont généré autant d'énigmes que de réponses, et que la fonction précise de la plupart des protéines ayant

un rôle démontré dans l'AI reste à déterminer, une compréhension précise des facteurs et événements impliqués dans les réactions d'AI reste pour le moment un objectif à long terme qui devra se baser sur de nombreuses approches analytiques et expérimentales.

2.2. L'impact des S-RNases sur les tubes polliniques reste à éclaircir

En ce qui concerne les S-RNases, bien que ces dernières aient été identifiées il y a maintenant près de 25 ans (McClure *et al.*, 1989), leur rôle précis dans l'AI reste pourtant peu clair. Une des questions fondamentales concernant leur fonction reste l'évaluation de leur impact effectif sur les tubes polliniques. Contrairement aux systèmes d'AI de type *Papaveraceae* et *Brassicaceae*, il n'a d'ailleurs jamais été possible de répliquer complètement les réactions d'AI de type *Solanaceae in vitro*, et cette lacune empêche de nombreuses analyses biochimiques qui seraient plus simples à effectuer en absence de tissus stylaires. Par contre, des expériences de greffage *in vivo* ont démontré que les tubes polliniques étaient capables de croissance, bien que limitée, dans des tissus stylaires incompatibles et que cette croissance pouvait reprendre à un taux normal suite à leur pénétration subséquente dans des tissus stylaires compatibles (Lush and Clarke, 1997) (voir section I.3.4.7). Il reste ainsi à déterminer si l'AI se contente de limiter sévèrement la croissance pollinique avant abscission florale ou si l'éclatement des tubes polliniques représente bien une conséquence directe de la réaction d'AI, (Herrero and Dickinson, 1981; Shivanna, 1979)

Il est probable que la déstabilisation du cytosquelette d'actine, observée suite à un traitement en présence de S-RNases, puisse permettre une réduction sévère de la croissance du tube pollinique en déstabilisant la structure interne du cytosquelette. Toutefois il reste à déterminer comment les S-RNases initient un tel phénomène, ces dernières étant apparemment séquestrées dans un compartiment vacuolaire (Goldraij *et al.*, 2006) et ne pouvant donc pas lier directement l'actine (Matsumoto and Tao, 2012). Si une interaction avec eEF1A peut théoriquement médier un tel phénomène (voir chapitre IV), il n'est pas encore exclu que d'autres protéines puissent être impliquées dans ce processus, comme observé chez *Papaver* (Poulter *et al.*, 2011).

Si la déstabilisation du cytosquelette d'actine est directement liée à l'initiation de la MCP dans les tubes polliniques lors de la réaction d'AI chez *Papaver rhoeas* (Thomas *et al.*, 2006), il n'est toutefois pas encore clair si un tel lien existe dans les espèces comportant des systèmes d'AI basés sur les S-RNases, ou même si la MCP est directement impliquée dans les réactions d'AI chez ces dernières (voir section I.3.4.2.5). La meilleure approche pour démontrer un tel phénomène serait la mise en évidence de l'implication de protéines similaires aux caspases dans les réactions d'AI basées sur les S-RNases. Une telle démonstration supporterait alors l'hypothèse de la présence d'une cascade de signalisation dans les réactions d'AI basées sur les S-RNases (Wang and Zhang, 2011), hypothèse rarement considérée dans les modèles de ce type d'AI, à la différence des systèmes de type *Papaver* et *Brassica*. Il serait toutefois nécessaire de déterminer quels événements initient la MCP dans les tubes polliniques. Par exemple, il serait intéressant de vérifier si, comme chez *Papaver*, la MCP peut être induite directement dans le pollen suite à la déstabilisation du cytosquelette d'actine (Thomas *et al.*, 2006) ou si au contraire elle dérive plutôt d'évènements de signalisation directement ou indirectement liés aux S-RNases.

Un dernier point central à éclaircir quant au fonctionnement des S-RNases reste aussi l'élucidation des mécanismes qui contrôlent son entrée dans les tubes polliniques. La présence d'un transporteur spécifique étant peu probable, il est possible qu'elles soient internalisées par endocytose comme le reste des composés nutritifs contenus dans la MEC stylaire. Une organisation normale du cytosquelette d'actine étant critique aux processus de vésicularisation et de trafic endocytique (Cheung and Wu, 2008), il serait intéressant de vérifier si l'application de composés pouvant déstabiliser les filaments d'actines, comme la cytochalasine D ou la latrunculine B, pourrait prévenir ou limiter l'import des S-RNases dans les tubes polliniques. Par ailleurs, la séquestration des S-RNases n'ayant à ce jour été rapportée que chez *Nicotiana* (Goldraij *et al.*, 2006), il serait intéressant de vérifier si un tel phénomène peut s'observer chez d'autres espèces. Une étude de la localisation des S-RNases à l'intérieur des tubes polliniques par microscopie confocale en utilisant des marqueurs pour les différents compartiments intracellulaires pourrait aussi s'avérer utile pour éclaircir certaines ambiguïtés du modèle de séquestration des S-RNases. En particulier, il serait important d'expliquer comment les S-RNases peuvent entrer en interaction avec les SLF cytoplasmiques si la majorité d'entre elles

sont séquestrées. La mise en évidence d'un transport rétrograde des S-RNases vers le cytoplasme pourrait répondre à cette question. Il serait aussi dans ce cadre nécessaire de clarifier la fonction des interactions S-RNases/SLF, la dégradation des S-RNases n'étant actuellement pas une composante prédite par le modèle de séquestration (McClure *et al.*, 2011).

2.3. Les mécanismes de pollen *S* restent incertains

2.3.1. Les bases biochimiques des interactions SLF/S-RNases devront être précisées

Les résultats qui ont mené à la formulation du modèle de dégradation des S-RNases par de multiples protéines SLF ayant chacune une spécificité pour un sous-ensemble de S-RNases, obtenus chez *Petunia inflata*, ont résolu la plupart des problèmes traditionnellement reliés à un modèle de type inhibiteur/dégradation (voir section 1.3.4.4) et identifié formellement le déterminant pollen *S* chez les *Solanaceae* (Kubo *et al.*, 2010; Sijacic *et al.*, 2004). Ce modèle est d'ailleurs actuellement en mesure d'expliquer la majorité des phénomènes particuliers à l'AI basée sur les S-RNases, comme la compatibilité du pollen hétéroallélique. Une étape subséquente logique dans la caractérisation du fonctionnement de ces protéines reste donc l'inventaire des liaisons spécifiques entre les différents SLF identifiés à ce jour et les différentes S-RNases. Comme mentionné en section précédente, si une approche *in vitro* peut être utile pour une évaluation rapide à haut débit de ces interactions, elles devront toutefois être confirmées *in vivo*. L'approche technique la plus évidente pour un tel inventaire est bien sûr la transgénèse, car les interactions entre une protéine SLF spécifique et les S-RNases peuvent être confirmées par induction d'une interaction compétitive chez le pollen hétéroallélique. Cette méthode a été utilisée récemment pour porter à 7 le nombre de gènes de type SLF présents au locus *S* et fonctionnellement testés comme faisant partie de pollen *S* (Williams *et al.*, 2013) quoique les interactions confirmées à ce jour n'aient été testées que pour une seule variante allélique de chacun de ces gènes. Un inventaire exhaustif des interactions SLF/S-RNase pour toutes les variantes alléliques des différents gènes SLF reste donc à compiler.

Cet inventaire complété, il sera critique d'établir par la suite les régions sur les protéines SLF et S-RNases qui conditionnent ces interactions spécifiques, de manière plus précise que précédemment rapporté (Hua *et al.*, 2007), et de vérifier si les différentes classes de SLF reconnaissent les mêmes allèles de S-RNases aux mêmes sites. Il serait aussi intéressant de vérifier, lorsque ces travaux auront été étendus à d'autres espèces, s'il est possible de prédire, par des analyses phylogénétiques, les interactions entre protéines SLF et S-RNases en se basant sur les similarités de séquences entre espèces au niveau de ces deux types de protéines. Ces analyses permettront aussi de confirmer l'hypothèse récente selon laquelle ces systèmes d'AI auraient évolué de façon à ce qu'une S-RNase donnée, lors d'un croisement compatible, soit toujours reconnue par au moins deux protéines SLF distinctes, afin de limiter les effets d'une mutation (Sun and Kao, 2013). D'autre part, plus spécifiquement chez *Solanum chacoense*, lorsque les protéines SLF responsables de la reconnaissance et de la dégradation des S₁₁- et S₁₃-RNases auront été identifiées, il sera intéressant de vérifier comment ces interactions sont altérées chez un mutant S-RNase à double spécificité S₁₁/S₁₃. De plus, si la similarité de séquence entre les SLF qui reconnaissent les S₁₁- et S₁₃-RNases est du même ordre que la similarité entre ces deux mêmes S-RNases (Saba-El-Leil *et al.*, 1994), il serait intéressant dans le cadre de la détermination des régions qui contrôlent leurs interactions, de vérifier si la génération d'un allèle SLF à double spécificité S₁₁/S₁₃ serait aussi possible, tel que réalisé pour les S-RNases (Luu *et al.*, 2001; Matton *et al.*, 1999).

2.3.2. Les particularités de l'AI chez les *Prunoideae* devront être investiguées

Dans le cas particulier des *Prunoideae*, les difficultés liées à la transformation dans ces espèces préviennent une confirmation rapide de l'identité de pollen *S* par transgénése. Comme discuté en section I.3.6.3, les analyses rapportées suggèrent que pollen *S* est constitué d'une unique protéine SFB chez les *Prunoideae* (Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003a). De manière surprenante, les mutations touchant SFB semblent être liées à une perte de l'AI (Sassa *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 2005; Ushijima *et al.*, 2004) plutôt qu'à une perte partielle de compatibilité comme observé chez les autres familles (Kakui *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2008).

Ceci suggère que, dans ces espèces, SFB soit paradoxalement responsable de la protection des S-RNases d'haplotype identique à celui du pollen et que la dégradation générale des S-RNases d'haplotype distincts soit due à un mécanisme général d'inactivation ou de dégradation des S-RNases, encore non identifié (Sassa *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 2005). Un tel mécanisme pourrait expliquer l'absence d'effet du pollen hétéroallélique chez ces espèces. Des analyses d'interaction protéine-protéine entre les protéines SFB et S-RNases chez les *Prunoideae* permettraient d'évaluer la plausibilité d'un tel modèle, puisqu'on prédirait alors que chaque protéine SFB ne peut rentrer en interaction qu'avec la S-RNase d'haplotype identique. À plus grande échelle, la recherche d'autres protéines pouvant lier les S-RNases pourrait aussi éventuellement identifier la ou les protéines potentiellement responsables de leur dégradation générale. L'identification d'un tel déterminant permettrait par ailleurs d'analyser les régions des S-RNases impliquées dans de telles interactions. À plus long terme, bien que les approches par transgénèse soient en principe difficilement envisageables pour ces espèces, elles seront toutefois nécessaires afin de confirmer un tel rôle de protection de S-RNases pour SFB. La stratégie la plus évidente dans ce cas serait de vérifier si l'expression d'un allèle SFB additionnel au niveau du pollen causerait son rejet spécifique sur les styles portant une copie de l'haplotype correspondant, par opposition aux *Solanaceae* chez lesquels on observe plutôt la perte d'AI par effet du pollen hétéroallélique (Sijacic *et al.*, 2004). Dans tous les cas, des analyses phylogénétiques à grande échelle seront nécessaires afin d'expliquer comment un tel système, significativement différent de celui observé chez les autres espèces utilisant ce type d'AI, a pu, de manière surprenante, évoluer spécifiquement chez cette sous-famille des *Rosaceae*.

2.4. Le rôle de nombreuses autres protéines reste à expliquer

Bien qu'une étude approfondie des interactions entre protéines SLF et S-RNases constitue un des objectifs centraux à une meilleure compréhension future des événements menant au rejet spécifique du pollen, le rôle, encore largement inexploré, des autres protéines impliquées dans l'AI mais non liées au locus S devra être déterminé. Les modèles de dégradation des S-RNases n'incluent aucune de ces protéines et le modèle de séquestration n'attribue à la plupart d'entre elles aucune fonction. Il est donc important de caractériser les rôles joués par ces protéines afin de les incorporer et mieux les situer dans les modèles.

Notamment, le rôle de la protéine HT reste encore à déterminer et les évènements qui mènent à sa dégradation dans les tubes polliniques compatibles devront être identifiés. Les approches utilisant l'analyse des interactions protéine-protéine sont délicates à entreprendre, considérant la taille très réduite de ce peptide, ce qui explique qu'à ce jour aucun ligand n'ait été rapporté pour HT. À ce titre, l'étude de HT sera plus facilement appréhendable par des études de microscopie qui permettront sans doute de mieux déterminer le mode de transport et la localisation subcellulaire dynamique de HT dans les tubes polliniques. Une étude comparative utilisant de telles approches avec les protéines similaires à HT qui ne sont pas impliquées dans l'AI (de type HTL ou HT-M) (Kondo and McClure, 2008; Sassa and Hirano, 2006), permettrait aussi de mieux cerner les caractéristiques de HT qui lui confèrent un rôle particulier dans l'AI. Par ailleurs, des approches biochimiques devraient pouvoir déterminer si HT subit des modifications post-traductionnelles dans les tissus stylaires ou polliniques, un anticorps contre cette protéine révélant généralement plusieurs classes de tailles différentes (McClure *et al.*, 1999). L'isolement et la séparation par chromatographie de ces différents peptides ainsi que leur caractérisation par des analyses de spectrométrie de masse pourraient répondre à ces interrogations. Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier si des styles pollinisés de manière compatible et incompatible contiennent des formes de HT distinctes. L'expression ectopique de HT dans les tubes polliniques, à la manière de ce qui a été réalisé pour les S-RNases (Meng *et al.*, 2009), pourrait aussi permettre d'obtenir des indices quant à son fonctionnement. Enfin, l'absence de dégradation de HT étant apparemment liée à la protéine NaSteP, un lien, direct ou indirect, entre ces deux protéines devra être établi. Dans ce cadre, la caractérisation des possibles ligands pour la protéine NaSteP sera certainement utile et permettrait peut être d'identifier une protéine pouvant directement influencer HT ainsi que d'expliquer comment la suppression de NaSteP cause la perte d'AI (Jimenez-Duran *et al.*, 2013). La majorité des approches citées, seraient utiles à la caractérisation de la protéine 120 kDa, qui, paradoxalement, semble délimiter le compartiment vacuolaire séquestrant les S-RNases de manière plus évidente encore que HT (Goldraj *et al.*, 2006), et cause, comme ce dernier, un phénotype de compatibilité partielle en cas de suppression (Hancock *et al.*, 2005).

Une autre des énigmes qui restent à résoudre concerne la nature du complexe de type SCF responsable de la dégradation des S-RNases. Comme discuté en section I.3.7, les résultats

obtenus chez *P. inflata*, qui montrent la formation d'un complexe SCF atypique comportant la protéine SBP (Hua and Kao, 2006, 2008; Meng *et al.*, 2011a), s'opposent complètement aux résultats obtenus chez les autres espèces (Huang *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2010), qui suggèrent plutôt la formation d'un complexe SCF canonique comportant un homologue de SKP1 désigné SSK. Les deux protéines semblent avoir des rôles directs dans l'AI, SBP pouvant aussi lier les protéines 120 kDa et NaTTS (Sims, 2012) et la suppression de SSK1 causant une perte partielle de compatibilité (Zhao *et al.*, 2010). La majorité des approches ayant mené à l'identification de ces facteurs étant basées sur des approches *in vitro*, la nature des complexes responsables de la dégradation des S-RNases devra être confirmée par des approches *in vivo*. Des analyses de type Co-IP pourraient possiblement permettre l'isolement de complexes SCF complets. Par ailleurs, si ces protéines s'y prêtent, leur conjugaison avec des chromophores permettrait de détecter leurs interactions par des analyses microscopiques de type FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Il est aussi possible que les deux complexes puissent être formés et assument des rôles spécifiques, bien que l'absence d'interaction *in vitro* entre PiSSK et les PiSLF (Meng *et al.*, 2011a) rende une telle hypothèse peu plausible.

2.5. Les applications agricoles de l'AI nécessiteront une meilleure compréhension de ses mécanismes

En conclusion, bien que de nombreuses découvertes dans les dernières décennies aient avancé significativement notre compréhension des mécanismes qui contrôlent la reconnaissance et le rejet haplotype-spécifique du pollen dans l'AI basées sur les S-RNases, il est encore difficile de formuler un modèle global et complet de ces réactions notamment en raison d'une absence de fonction précise bien caractérisée pour de nombreux facteurs qui y sont impliqués ainsi que de différences marquées entre espèces, différences difficiles à concilier. De nombreux facteurs connus n'ont par ailleurs été caractérisés que chez une seule espèce et leur caractérisation de manière plus globale sera nécessaire à une intégration générale de ces connaissances. De plus, il est probable que d'autres facteurs nécessaires à l'AI restent encore à identifier.

Pour ces raisons, le transfert des connaissances théoriques accumulées jusqu'à maintenant à des applications pratiques d'intérêt économique dans le domaine agricole, tel que présenté en section I.1, reste pour le moment dans le domaine du long terme, notamment le transfert de l'AI dans des espèces auto-compatibles afin de faciliter la production de graines hybrides. Des avancées dans ce but ont été réalisées chez *Arabidopsis* (Nasrallah *et al.*, 2002) pour un système d'AI sporophytique de type *Brassicaceae*, mais un tel transfert chez d'autres espèces de familles différentes n'a jamais été rapporté. De manière plus prometteuse, il a récemment été démontré que la mise en présence d'un pollen d'*Arabidopsis thaliana* exprimant une copie ectopique de PrpS (voir section I.3.3) avec son ligand PrsS d'haplotype correspondant pouvait induire sur ce pollen une réaction similaire à la réaction d'AI observée chez *P. rhoeas* (de Graaf *et al.*, 2012). Un tel résultat est inattendu, car *Arabidopsis thaliana* est une espèce auto-compatible membre de la famille des *Brassicaceae*, dont la divergence avec les *Papaveraceae* est estimée à 140 millions d'années. Cette découverte est toutefois stimulante dans la mesure où elle suggère que les réactions d'AI de type *Papaveraceae* se basent sur des cibles et voies de signalisation endogènes qui pourraient être conservées chez la majorité des dicotylédones. Il reste à déterminer si ce système peut être transféré chez d'autres espèces d'intérêt économique, ou si le transfert de l'AI pourrait être utilisé dans d'autres cadres (Hunter, 2009).

Quant à l'objectif opposé, la suppression de l'AI chez de nombreuses espèces d'intérêt économique, les perspectives à court terme semblent plus favorables. En effet, chez les espèces dotées de systèmes d'AI basés sur un pollen *S* constitué de multiples protéines SLF, l'insertion, dans un individu d'haplotype donné, des SLF capables de dégrader les S-RNases d'allèles correspondants permettrait en théorie de générer des lignées constitutivement auto-compatibles (Kubo *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2004a; Sijacic *et al.*, 2004). De même, la suppression de l'expression des S-RNases pourrait aussi être envisagée dans le même objectif. Une grande partie des arbres fruitiers d'intérêt économique font par contre plutôt partie de la sous-famille des *Prunoideae*, chez lesquels pollen *S* semble être constitué d'une seule protéine SFB qui serait responsable de la protection des S-RNases d'haplotype correspondant envers un système de dégradation général encore non identifié. Par conséquent, chez ces espèces, c'est plutôt la suppression, chez un individu d'haplotype donné, des protéines SFB responsable de

la protection des S-RNases correspondantes envers cet hypothétique mécanisme général de dégradation (Sassa *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 2005; Ushijima *et al.*, 2004) qui permettrait le plus simplement la suppression de l'AI. De telles approches seront toutefois probablement difficiles à mettre en place en raison des difficultés techniques associées à la transformation chez certaines espèces ainsi qu'au temps nécessaire à l'obtention d'individus matures. Par conséquent, à ce jour aucun résultat pratique de suppression de l'AI, exploitable dans un cadre de production agricole, n'a été rapporté. Les avancées récentes dans le domaine des techniques de « *genome editing* », qui constituent une alternative aux techniques traditionnelles de sélection ou d'expression transgénique permettront sans aucun doute, lorsqu'elles seront appliquées de manière plus générale dans le domaine de l'amélioration végétale, d'accélérer considérablement la mise en place des approches présentées.

Bibliographie

- Aguiar B, Vieira J, Cunha AE, Fonseca NA, Reboiro-Jato D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Raspe O, Vieira CP.** 2013. Patterns of evolution at the gametophytic self-incompatibility *Sorbus aucuparia* (Pyrinae) S pollen genes support the non-self recognition by multiple factors model. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2423-2434.
- Ai Y, Tsai DS, Kao T-H.** 1992. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two S proteins of a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* **19**, 523-528.
- Ai YJ, Kron E, Kao T-H.** 1991. S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Molecular Genetics and Genomics* **230**, 353-358.
- Ai YJ, Singh A, Coleman CE, Ioerger TR, Kheyrpour A, Kao T-H.** 1990. Self-incompatibility in *Petunia inflata* - Isolation and characterization of cDNAs encoding 3 S-allele-associated proteins. *Sexual Plant Reproduction* **3**, 130-138.
- Alvarez G, Ceballos FC, Quinteiro C.** 2009. The role of inbreeding in the extinction of a European royal dynasty. *PLoS One* **4**, e5174.
- Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Niall HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ, Clarke AE.** 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **321**, 38-44.
- Anderson MA, McFadden GI, Bernatzky R, Atkinson A, Orpin T, Dedman H, Tregear G, Fernley R, Clarke AE.** 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* **1**, 483-491.
- Ardley HC, Robinson PA.** 2005. E3 ubiquitin ligases. *Essays in Biochemistry* **41**, 15-30.
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ.** 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263-274.
- Bariola PA, Green PJ.** 1997. Plant ribonucleases. In: D'Alessio G, Riordan JF, eds. *Ribonucleases: structure and functions*. New York: Academic Press, 164-190.
- Barrett SCH.** 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* **88**, 154-159.
- Barrett SCH, Shore JS.** 2008. New insights on heterostyly : comparative biology, ecology and genetics. In: Franklin-Tong VE, ed. *Self-incompatibility in flowering plants. Evolution, diversity and mechanisms*. Heidelberg: Springer, 3-32.
- Bateman AJ.** 1955. Self-incompatibility systems in angiosperms. III. *Cruciferae*. *Heredity* **9**, 52-68.
- Batonnet S, Leibovitch MP, Tintignac L, Leibovitch SA.** 2004. Critical role for lysine 133 in the nuclear ubiquitin-mediated degradation of MyoD. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5413-5420.
- Beecher B, McClure BA.** 2001. Expressing self-incompatibility RNases (S-RNases) in transgenic plants. *Methods in Molecular Biology* **160**, 65-85.

- Beecher B, Murfett J, McClure BA.** 1998. RNaseI from *Escherichia coli* cannot substitute for S-RNase in rejection of *Nicotiana plumbaginifolia* pollen. *Plant Molecular Biology* **36**, 553-563.
- Beecher B, Zurek D, McClure BA.** 2001. Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia*. *Sexual Plant Reproduction* **14**, 69-76.
- Bernatzky R, Glaven RH, Rivers BA.** 1995. S-related protein can be recombined with self-compatibility in interspecific derivatives of *Lycopersicon*. *Biochemical Genetics* **33**, 215-225.
- Bertin RI.** 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *American Journal of Botany* **80**, 557-560.
- Bertin RI, Newman CM.** 1993. Dichogamy in angiosperms. *The Botanical Review* **59**, 112-152.
- Bittles AH, Neel JV.** 1994. The costs of human inbreeding and their implications for variations at the DNA level. *Nature Genetics* **8**, 117-121.
- Bosch M, Franklin-Tong VE.** 2007. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18327-18332.
- Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ, Goring DR.** 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. *The Plant Cell* **8**, 1641-1650.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bredemeyer GM, Blaas J.** 1981. S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana alata*. *Theoretical and Applied Genetics* **59**, 429-434.
- Breuer K.** 1961. Selbstfertile diploide aus polyploiden selbststeriler petunien; Die duplikation des S-Locus. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **92**, 252-260.
- Broothaerts W, Keulemans J, Van Nerum I.** 2004. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Reports* **22**, 497-501.
- Broothaerts W, Vanvinckenroye P, Decock B, Van Damme J, Vendrig JC.** 1991. *Petunia hybrida* S-proteins: ribonuclease activity and the role of their glycan side chains in self incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* **4**, 258-266.
- Broothaerts WJ, van Laere A, Witters R, Preaux G, Decock B, van Damme J, Vendrig JC.** 1990. Purification and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* **14**, 93-102.
- Busot GY, McClure BA, Ibarra-Sanchez CP, Jimenez-Duran K, Vazquez-Santana S, Cruz-Garcia F.** 2008. Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3187-3201.

- Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T.** 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**, 220-223.
- Cappadocia M.** 2003. FLOWERING AND REPRODUCTION | Gametophytic Self-Incompatibility. In: Thomas B, ed. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Oxford: Elsevier, 333-342.
- Cardozo T, Pagano M.** 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 739-751.
- Carvalho MD, Carvalho JF, Merrick WC.** 1984. Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **234**, 603-611.
- Charlesworth D, Willis JH.** 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics* **10**, 783-796.
- Chawla B, Bernatzky R, Liang W, Marcotrigiano M.** 1997. Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum*: inheritance and expression of S-related proteins. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 992-996.
- Chen G, Zhang B, Zhao Z, Sui Z, Zhang H, Xue Y.** 2010. 'A life or death decision' for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2027-2037.
- Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD.** 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science* **318**, 643-645.
- Cheung AY, Duan QH, Costa SS, de Graaf BH, Di Stilio VS, Feijo J, Wu HM.** 2008. The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins. *Molecular Plant* **1**, 686-702.
- Cheung AY, Wang H, Wu HM.** 1995. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393.
- Cheung AY, Wu HM.** 2008. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 547-572.
- Clark KR, Okuley JJ, Collins PD, Sims TL.** 1990. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible *Petunia*. *The Plant Cell* **2**, 815-826.
- Clark KR, Sims TL.** 1994. The S-ribonuclease gene of *Petunia hybrida* is expressed in nonstylar tissue, including immature anthers. *Plant Physiology* **106**, 25-36.
- Clarke AE, Anderson MA, Bacic T, Harris PJ, Mau SL.** 1985. Molecular basis of cell recognition during fertilization in higher plants. *Journal of Cell Science - Supplement* **2**, 261-285.
- Clore AM, Dannenhoffer JM, Larkins BA.** 1996. EF-1[alpha] is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. *The Plant Cell* **8**, 2003-2014.

- Condeelis J.** 1995. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 169-170.
- Cornish EC, Pettitt JM, Bonig I, Clarke AE.** 1987. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **326**, 99-102.
- Craig KL, Tyers M.** 1999. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**, 299-328.
- Crane MB, Thomas PT.** 1939. Genetical studies in pears. *Journal of Genetics* **37**, 287-299.
- Cruz-Garcia F, Hancock CN, Kim D, McClure BA.** 2005. Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *The Plant Journal* **42**, 295-304.
- Darlington CD, Mather K.** 1949. *The elements of genetics*. London: George Allen & Unwin.
- Darwin C.** 1876. *The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom*. London: John Murray.
- Darwin C.** 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
- de Graaf BH, Knuiman BA, Derksen J, Mariani C.** 2003. Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana glauca*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 55-63.
- de Graaf BH, Rudd JJ, Wheeler MJ, Perry RM, Bell EM, Osman K, Franklin FC, Franklin-Tong VE.** 2006. Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature* **444**, 490-493.
- de Graaf BH, Vatovec S, Juarez-Diaz JA, Chai L, Kooblall K, Wilkins KA, Zou H, Forbes T, Franklin FC, Franklin-Tong VE.** 2012. The *Papaver* self-incompatibility pollen S-determinant, PrpS, functions in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **22**, 154-159.
- de Leeuw M, Roiz L, Smirnov P, Schwartz B, Shoseyov O, Almog O.** 2007. Binding assay and preliminary X-ray crystallographic analysis of ACTIBIND, a protein with anticarcinogenic and antiangiogenic activities. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **63**, 716-719.
- de Nettancourt D.** 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Berlin: Springer Verlag.
- de Nettancourt D.** 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- de Nettancourt D, Ecochard R, Perquin MDG, van der Drift T, Westerhof M.** 1971. The generation of new S alleles at the incompatibility locus of *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Theoretical and Applied Genetics* **41**, 120-129.
- Demma M, Warren V, Hock R, Dharmawardhane S, Condeelis J.** 1990. Isolation of an abundant 50,000-Dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amebas*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2286-2291.

- Dharmawardhane S, Demma M, Yang F, Condeelis J.** 1991. Compartmentalization and actin binding properties of ABP-50: the elongation factor-1 alpha of *Dictyostelium*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **20**, 279-288.
- Dodds PN, Bonig I, Du H, Rodin J, Anderson MA, Newbigin E, Clarke AE.** 1993. S-RNase gene of *Nicotiana alata* is expressed in developing pollen. *The Plant Cell* **5**, 1771-1782.
- Dodds PN, Clarke AE, Newbigin E.** 1996a. Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana alata* that is induced by phosphate starvation. *Plant Molecular Biology* **31**, 227-238.
- Dodds PN, Clarke AE, Newbigin E.** 1996b. A molecular perspective on pollination in flowering plants. *Cell* **85**, 141-144.
- Dodds PN, Ferguson C, Clarke AE, Newbigin E.** 1999. Pollen-expressed S-RNases are not involved in self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Sexual Plant Reproduction* **12**, 76-87.
- Durso NA, Cyr RJ.** 1994. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *The Plant Cell* **6**, 893-905.
- Edmonds BT.** 1993. ABP50: an actin-binding elongation factor 1 alpha from *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cellular Biochemistry* **52**, 134-139.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A.** 2010. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* **153**, 403-419.
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S.** 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells* **8**, 203-213.
- Entani T, Takayama S, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A.** 1999. Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**, 1882-1888.
- Fields AM, Wang N, Hua Z, Meng X, Kao T-H.** 2010. Functional characterization of two chimeric proteins between a *Petunia inflata* S-locus F-box protein, PiSLF2, and a PiSLF-like protein, PiSLFLb-S₂. *Plant Molecular Biology* **74**, 279-292.
- Foote HC, Ride JP, Franklin-Tong VE, Walker EA, Lawrence MJ, Franklin FC.** 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2265-2269.
- Franklin-Tong VE.** 2008. *Self-incompatibility in flowering plants. Evolution, diversity and mechanisms*. Heidelberg: Springer.
- Franklin-Tong VE, Franklin FC.** 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* **8**, 598-605.
- Franklin-Tong VE, Holdaway-Clarke TL, Straatman KR, Kunke JG, Hepler PK.** 2002. Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal* **29**, 333-345.

- Franklin-Tong VE, Lawrence MJ, Franklin FCH.** 1988. An *in vitro* bioassay for the stigmatic product of the self-incompatibility gene in *Papaver rhoeas* L. *New Phytologist* **110**, 109-118.
- Franklin-Tong VE, Ride JP, Read ND, Trewavas AJ, Franklin FCH.** 1993. The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *The Plant Journal* **4**, 163-177.
- Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabieres F, Ponchet M, Poupet A, Ricci P.** 1997. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiology* **115**, 1557-1567.
- Galluzzi L, Paiardini M, Lecomte MC, Magnani M.** 2001. Identification of the main ubiquitination site in human erythroid alpha-spectrin. *FEBS Letters* **489**, 254-258.
- Ganders FR.** 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**, 607-635.
- Geitmann A, Snowman BN, Emons AM, Franklin-Tong VE.** 2000. Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant Cell* **12**, 1239-1251.
- Goldberg EE, Kohn JR, Lande R, Robertson KA, Smith SA, Igic B.** 2010. Species selection maintains self-incompatibility. *Science* **330**, 493-495.
- Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-Garcia F, McClure BA.** 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**, 805-810.
- Golz JF, A.E. C, E. N.** 2000. Mutational approaches to the study of self-incompatibility: revisiting the pollen-part mutants. *Annals of Botany* **85**, 95-103.
- Golz JF, Clarke AE, Newbigin E, Anderson M.** 1998. A relic S-RNase is expressed in the styles of self-compatible *Nicotiana glauca*. *The Plant Journal* **16**, 591-599.
- Golz JF, Su V, Clarke AE, Newbigin E.** 1999. A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana glauca* S locus. *Genetics* **152**, 1123-1135.
- Grant AG, Flomen RM, Tizard ML, Grant DA.** 1992. Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells. *International Journal of Cancer* **50**, 740-745.
- Gray JE, McClure BA, Bönig I, Anderson MA, Clarke AE.** 1991. Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on *in vitro* grown pollen tubes. *The Plant Cell* **3**, 271-283.
- Green PJ.** 1994. The ribonucleases of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**, 421-445.
- Gross SR, Kinzy TG.** 2005. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 772-778.
- Gross SR, Kinzy TG.** 2007. Improper organization of the actin cytoskeleton affects protein synthesis at initiation. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 1974-1989.

- Gu J, Isaji T, Xu Q, Kariya Y, Gu W, Fukuda T, Du Y.** 2012. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconjugate Journal* **29**, 599-607.
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR.** 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 382-387.
- Guo YX, Zhang YS, Xue YB.** 2006. Petunia germinating pollen S/D3 interacts with S-RNases in *Petunia hybrida* Vilm. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**, 584-590.
- Guyon VN, Astwood JD, Garner EC, Dunker AK, Taylor LP.** 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in *Petunia*. *Plant Physiology* **123**, 699-710.
- Haffani YZ, Gaude T, Cock JM, Goring DR.** 2004. Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Molecular Biology* **55**, 619-630.
- Hancock CN, Kent L, McClure BA.** 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **43**, 716-723.
- Harikrishna K, Jampates-Beale R, Milligan SB, Gasser CS.** 1996. An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Molecular Biology* **30**, 899-911.
- Herrero M, Dickinson HG.** 1981. Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* **47**, 365-383.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK.** 1988. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* **16**, 7351-7367.
- Hillwig MS, Liu X, Liu G, Thornburg RW, Macintosh GC.** 2010. *Petunia* nectar proteins have ribonuclease activity. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2951-2965.
- Hiscock SJ, McInnis SM.** 2003. Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends Plant Sci* **8**, 606-613.
- Hiscock SJ, Tabah DA.** 2003. The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**, 1037-1045.
- Hosaka K, Hanneman REJ.** 1998. Genetics of self-compatibility in self-incompatible wild diploid species *Solanum chacoense*. I. Detection of an S-locus inhibitor (Sli) gene. *Euphytica* **99**, 191-197.
- Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL.** 1993. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1217-1221.
- Hua Z, Kao T-H.** 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, Kao T-H.** 2008. Identification of major lysine residues of S₃-RNase of *Petunia inflata* involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation *in vitro*. *The Plant Journal* **54**, 1094-1104.
- Hua Z, Meng X, Kao T-H.** 2007. Comparison of *Petunia inflata* S-Locus F-box protein (PiSLF) with PiSLF like proteins reveals its unique function in S-RNase based self-incompatibility. *The Plant Cell* **19**, 3593-3609.
- Hua ZH, Fields A, Kao T-H.** 2008. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Molecular Plant* **1**, 575-585.
- Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y.** 2006. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *The Plant Journal* **46**, 780-793.
- Huang S, Lee H-S, Karunanandaa B, Kao T-H.** 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self pollen. *The Plant Cell* **6**, 1021-1028.
- Hugot K, Ponchet M, Marais A, Ricci P, Galiana E.** 2002. A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 243-250.
- Hunter P.** 2009. Me, myself and I. *EMBO Reports* **10**, 1297-1300.
- Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbigin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M.** 2001a. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* S(F₁₁)-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Journal of Molecular Biology* **314**, 103-112.
- Ida K, Shinkawa T, Norioka S, Newbigin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M.** 2001b. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of S-allelic glycoprotein S(F₁₁)-RNase from *Nicotiana alata*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **57**, 143-144.
- Ide H, Kimura M, Arai M, Funatsu G.** 1991. The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *FEBS Letters* **284**, 161-164.
- Igic B, Kohn JR.** 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13167-13171.
- Igic B, Lande R, Kohn JR.** 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 93-104.
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Hauk NR, Nakano R, Sassa H, Iezzoni AF, Kohn JR, Tao R.** 2004. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction* **16**, 235-243.
- Indriolo E, Tharmapalan P, Wright SI, Goring DR.** 2012. The ARC1 E3 ligase gene is frequently deleted in self-compatible *Brassicaceae* species and has a conserved role in *Arabidopsis lyrata* self-pollen rejection. *The Plant Cell* **24**, 4607-4620.
- Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao T-H.** 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in *Solanaceae*. *Sexual Plant Reproduction* **4**, 81-87.

- Ishimizu T, Endo T, Yamaguchi-Kabata Y, Nakamura KT, Sakiyama F, Norioka S.** 1998a. Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of *Rosaceae*: implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Letters* **440**, 337-342.
- Ishimizu T, Mitsukami Y, Shinkawa T, Natsuka S, Hase S, Miyagi M, Sakiyama F, Norioka S.** 1999. Presence of asparagine-linked N-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *European Journal of Biochemistry* **263**, 624-634.
- Ishimizu T, Miyagi M, Norioka S, Liu YH, Clarke AE.** 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.
- Ishimizu T, Norioka S, Kanai M, Clarke AE, Sakiyama F.** 1996a. Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gametophytic self-incompatibility. *European Journal of Biochemistry* **242**, 627-635.
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F.** 1996b. Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *Journal of Biochemistry* **120**, 326-334.
- Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, Norioka S.** 1998b. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Plant Molecular Biology* **37**, 931-941.
- Jimenez-Duran K, McClure BA, Garcia-Campusano F, Rodriguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-Garcia F.** 2013. NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiology* **161**, 97-107.
- Jost W, Bak H, Glund K, Terpstra P, Beintema JJ.** 1991. Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *European Journal of Biochemistry* **198**, 1-6.
- Juarez-Diaz JA, McClure B, Vazquez-Santana S, Guevara-Garcia A, Leon-Mejia P, Marquez-Guzman J, Cruz-Garcia F.** 2006. A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3418-3424.
- Kachroo A, Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2001. Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* **293**, 1824-1826.
- Kakeda K, Jordan ND, Conner A, Ride JP, Franklin-Tong VE, Franklin FC.** 1998. Identification of residues in a hydrophilic loop of the *Papaver rhoeas* S protein that play a crucial role in recognition of incompatible pollen. *The Plant Cell* **10**, 1723-1732.
- Kakita M, Murase K, Iwano M, Matsumoto T, Watanabe M, Shiba H, Isogai A, Takayama S.** 2007. Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *The Plant Cell* **19**, 3961-3973.

- Kakui H, Kato M, Ushijima K, Kitaguchi M, Kato S, Sassa H.** 2011. Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of S locus F-box brothers genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *The Plant Journal*.
- Kao T-H, McCubbin AG.** 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12059-12065.
- Kao T-H, McCubbin AG.** 1997. Molecular and biochemical bases of gametophytic self-incompatibility in *Solanaceae*. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**, 171-176.
- Kao T-H, Tsukamoto T.** 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* **16**, 72-83.
- Karunanandaa B, Huang S, Kao T-H.** 1994. Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S₃ protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *The Plant Cell* **6**, 1933-1940.
- Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H.** 1988. Amino-acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* **176**, 683-697.
- Kipreos ET, Pagano M.** 2000. The F-box protein family. *Genome Biology* **1**, reviews3002.
- Kirch H-H, Li Y-Q, Seul U, Thompson RD.** 1995. The expression of a potato (*Solanum tuberosum*) S-RNase gene in *Nicotiana tabacum* pollen. *Sexual Plant Reproduction* **8**, 77-84.
- Kock M, Stenzel I, Zimmer A.** 2006. Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3717-3726.
- Kondo K, McClure BA.** 2008. New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Molecular Plant* **1**, 634-644.
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y.** 2002a. Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *The Plant Journal* **30**, 143-153.
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowyama Y.** 2002b. Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *The Plant Journal* **29**, 627-636.
- Kostova Z, Wolf DH.** 2003. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO Journal* **22**, 2309-2317.
- Kothke S, Kock M.** 2011. The *Solanum lycopersicum* RNaseLER is a class II enzyme of the RNase T2 family and shows preferential expression in guard cells. *Journal of Plant Physiology* **168**, 840-847.
- Kowyama Y, Kunz C, Lewis I, Newbigin E, Clarke AE, Anderson M.** 1994. Self-compatibility in a *Lycopersicon peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. *Theoretical and Applied Genetics* **88**, 849-864.

- Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao T-H, Takayama S.** 2010. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* **330**, 796-799.
- Kurasawa Y, Hanyu K, Watanabe Y, Numata O.** 1996. F-actin bundling activity of *Tetrahymena* elongation factor 1 alpha is regulated by Ca²⁺/calmodulin. *Journal of Biochemistry* **119**, 791-798.
- Kurata N, Kariu T, Kawano S, Kimura M.** 2002. Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 391-397.
- Kurihara H, Mitsui Y, Nakamura KT, Wakabayashi E, Ohgi K, Irie M.** 1989. Crystallization of a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *Journal of Molecular Biology* **206**, 791-792.
- Kurihara H, Mitsui Y, Ohgi K, Irie M, Mizuno H, Nakamura KT.** 1992. Crystal and molecular structure of RNase Rh, a new class of microbial ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *FEBS Letters* **306**, 189-192.
- Kurihara H, Nonaka T, Mitsui Y, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT.** 1996. The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **255**, 310-320.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y.** 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.
- Lawrence MJ.** 1975. Genetics of self-incompatibility in *Papaver rhoeas*. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences* **188**, 275-285.
- Lee CB, Kim S, McClure BA.** 2009. A pollen protein, NaPCCP, that binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiology* **149**, 791-802.
- Lee CB, Swatek KN, McClure BA.** 2008. Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 26965-26973.
- Lee HS, Huang S, Kao T-H.** 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**, 560-563.
- Lee HS, Singh A, Kao T-H.** 1992. RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanaceous S proteins. *Plant Molecular Biology* **20**, 1131-1141.
- Li XX, Zou Y, Xiao CL, Gituru RW, Guo YH, Yang CF.** 2013. The differential contributions of herkogamy and dichogamy as mechanisms of avoiding self-interference in four self-incompatible *Epimedium* species. *Journal of Evolutionary Biology* **26**, 1949-1958.
- Liang L, Lai Z, Ma W, Zhang Y, Xue Y.** 2002. AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1579**, 64-71.

- Liang LZ, Huang JA, Xue YB.** 2003. Identification and evolutionary analysis of a relic S-RNase in *Antirrhinum*. *Sexual Plant Reproduction* **16**, 17-22.
- Lind JL, Boning I, Clarke AE, Anderson M.** 1996. A style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* *in vivo*. *Sexual Plant Reproduction* **9**, 75-86.
- Liu B, Boivin N, Morse D, Cappadocia M.** 2012. A time course of GFP expression and mRNA stability in pollen tubes following compatible and incompatible pollinations in *Solanum chacoense*. *Sexual Plant Reproduction* **25**, 205-213.
- Liu B, Morse D, Cappadocia M.** 2008. Glycosylation of S-RNases may influence pollen rejection thresholds in *Solanum chacoense*. *Journal of Experimental Botany* **59**, 545-552.
- Liu B, Morse D, Cappadocia M.** 2009. Compatible pollinations in *Solanum chacoense* decrease both S-RNase and S-RNase mRNA. *PLoS One* **4**, e5774.
- Liu G, Tang JZ, Edmonds BT, Murray J, Levin S, Condeelis J.** 1996. F-actin sequesters elongation factor 1 alpha from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *Journal of Cell Biology* **135**, 953-963.
- Liu ZQ, Xu GH, Zhang SL.** 2007. *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes *in vitro*. *Protoplasma* **232**, 61-67.
- Lloyd DG, Webb CJ.** 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**, 135-162.
- Loffler A, Abel S, Jost W, Beintema JJ, Glund K.** 1992. Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiology* **98**, 1472-1478.
- Loffler A, Glund K, Irie M.** 1993. Amino acid sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *European Journal of Biochemistry* **214**, 627-633.
- Losada JM, Herrero M.** 2012. Arabinogalactan-protein secretion is associated with the acquisition of stigmatic receptivity in the apple flower. *Annals of Botany* **110**, 573-584.
- Lush WM, Clarke AE.** 1997. Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 27-35.
- Luu DT, Heizmann P, Dumas C, Trick M, Cappadocia M.** 1997. Involvement of SLR1 genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in *Brassicaceae*. *Sexual Plant Reproduction* **10**, 227-235.
- Luu DT, Marty-Mazars D, Trick M, Dumas C, Heizmann P.** 1999. Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell* **11**, 251-262.
- Luu DT, Qin X, Laublin G, Yang Q, Morse D, Cappadocia M.** 2001. Rejection of S-heteroallelic pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* **159**, 329-335.
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M.** 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**, 649-651.

- Ma RC, Oliveira MM.** 2002. Evolutionary analysis of S-RNase genes from *Rosaceae* species. *Molecular Genetics and Genomics* **267**, 71-78.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA.** 2000. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology* **122**, 3-10.
- Mascarenhas JP.** 1975. Biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review* **41**, 259-314.
- Mascarenhas JP.** 1993. Molecular mechanisms of pollen-tube growth and differentiation. *The Plant Cell* **5**, 1303-1314.
- Mateyak MK, Kinzy TG.** 2010. eEF1A: thinking outside the ribosome. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 21209-21213.
- Matsumoto D, Tao R.** 2012. Isolation of pollen-expressed actin as a candidate protein interacting with S-RNase in *Prunus avium* L. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **81**, 41-47.
- Matsumoto D, Yamane H, Abe K, Tao R.** 2012. Identification of a Skp1-like protein interacting with SFB, the pollen S determinant of the gametophytic self-incompatibility in *Prunus*. *Plant Physiology* **159**, 1252-1262.
- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S.** 2001. Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 45261-45269.
- Matton DP, Luu DT, Xike Q, Laublin G, O'Brien M, Maes O, Morse D, Cappadocia M.** 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 DP, Maes C, Laublin G, Qin XK, Bertrand C, Morse D, Cappadocia M.** 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell* **9**, 1757-1766.
- Matton DP, Morse D, Cappadocia M.** 1998. Are the hypervariable regions of S-RNases sufficient for allele-specific recognition of pollen? Reply. *The Plant Cell* **10**, 316-317.
- McClure BA.** 2006. New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 639-646.
- McClure BA.** 2008. *Comparing models for S-RNase-based self-incompatibility*. In: Franklin-Tong VE, ed. *Self-incompatibility in flowering plants. Evolution, diversity and mechanisms*. Heidelberg: Springer, 217-236.
- McClure BA.** 2009. Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1069-1081.
- McClure BA, Cruz-Garcia F, Beecher B, Sulaman W.** 2000. Factors affecting inter- and intra-specific rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany* **85**, 113-123.
- McClure BA, Cruz-Garcia F, Romero C.** 2011. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany* **108**, 647-658.

- McClure BA, Franklin-Tong VE.** 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta* **224**, 233-245.
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE.** 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen RNA. *Nature* **347**, 757-760.
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE.** 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957.
- McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R.** 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13548-13553.
- McCubbin AG, Chung YY, Kao T-H.** 1997. A mutant S₃ RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *The Plant Cell* **9**, 85-95.
- McCubbin AG, Kao T-H.** 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 333-364.
- McCubbin AG, Wang X, Kao T-H.** 2000a. Identification of self-incompatibility (S-) locus linked pollen cDNA markers in *Petunia inflata*. *Genome* **43**, 619-627.
- McCubbin AG, Zuniga C, Kao T-H.** 2000b. Construction of a binary bacterial artificial chromosome library of *Petunia inflata* and the isolation of large genomic fragments linked to the self-incompatibility (S-) locus. *Genome* **43**, 820-826.
- Meng X, Hua Z, Sun P, Kao T-H.** 2011a. The amino terminal F-box domain of *Petunia inflata* S-locus F-box protein is involved in the S-RNase-based self-incompatibility mechanism. *AoB Plants* **2011**, plr016.
- Meng X, Hua Z, Wang N, Fields AM, Dowd PE, Kao T-H.** 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, Sun P, Kao T-H.** 2011b. S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata*. *Annals of Botany* **108**, 637-646.
- Minamikawa M, Fujii D, Kakui H, Kotoda N, Sassa H.** 2013. Identification of an S-RNase binding protein1 (SBP1) homolog of apple (*Malus × domestica*). *Plant Biotechnology* **30**, 119-123.
- Minamikawa M, Kakui H, Wang S, Kotoda N, Kikuchi S, Koba T, Sassa H.** 2010. Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes. *Plant Molecular Biology* **74**, 143-154.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV.** 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 448-462.
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA.** 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563-566.

- Murfett J, Bourque JE, McClure BA.** 1995. Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II- and III-transcribed gene constructs. *Plant Molecular Biology* **29**, 201-212.
- Murfett J, McClure BA.** 1998. Expressing foreign genes in the pistil: a comparison of S-RNase constructs in different *Nicotiana* backgrounds. *Plant Molecular Biology* **37**, 561-569.
- Nasrallah ME, Liu P, Nasrallah JB.** 2002. Generation of self-incompatible *Arabidopsis thaliana* by transfer of two S-locus genes from *A. lyrata*. *Science* **297**, 247-249.
- Newbigin E, Paape T, Kohn JR.** 2008. RNase-based self-incompatibility: puzzled by pollen S. *The Plant Cell* **20**, 2286-2292.
- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet JC, Driouich A.** 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* **110**, 383-404.
- Nishio T, Hinata K.** 1982. Comparative studies on S-glycoproteins purified from different S-genotypes in self-incompatible *BRASSICA* species I. Purification and chemical properties. *Genetics* **100**, 641-647.
- Norioka N, Norioka S, Ohnishi Y, Ishimizu T, Oneyama C, Nakanishi T, Sakiyama F.** 1996. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *Journal of Biochemistry* **120**, 335-345.
- Norioka S, Oneyama C, Takuma S, Shinkawa T, Ishimizu T, Nakanishi T, Sakiyama F.** 2007. Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 878-886.
- Nunes MD, Santos RA, Ferreira SM, Vieira J, Vieira CP.** 2006. Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) population. *New Phytologist* **172**, 577-587.
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP.** 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, Major G, Sier-Ching C, Matton DP.** 2004. Isolation of S-RNase binding proteins from *Solanum chacoense*: identification of an SBP1 (RING finger protein) orthologue. *Sexual Plant Reproduction* **17**, 81-87.
- Ohtsubo K, Marth JD.** 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855-867.
- Okada K, Tonaka N, Moriya Y, Norioka N, Sawamura Y, Matsumoto T, Nakanishi T, Takasaki-Yasuda T.** 2008. Deletion of a 236 kb region around S₄-RNase in a stylar-part mutant S₄sm-haplotype of Japanese pear. *Plant Molecular Biology* **66**, 389-400.
- Okada K, Tonaka N, Taguchi T, Ichikawa T, Sawamura Y, Nakanishi T, Takasaki-Yasuda T.** 2011. Related polymorphic F-box protein genes between haplotypes clustering in

the BAC contig sequences around the S-RNase of Japanese pear. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1887-1902.

Ortega E, Boskovic RI, Sargent DJ, Tobutt KR. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genetics and Genomics* **276**, 413-426.

Oxley D, Bacic A. 1995. Microheterogeneity of N-glycosylation on a stylar self-incompatibility glycoprotein of *Nicotiana alata*. *Glycobiology* **5**, 517-523.

Oxley D, Bacic A. 1996. Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana alata*. *European Journal of Biochemistry* **242**, 75-80.

Oxley D, Munro SL, Craik DJ, Bacic A. 1996. Structure of N-glycans on the S₃- and S₆-allele stylar self-incompatibility ribonucleases of *Nicotiana alata*. *Glycobiology* **6**, 611-618.

Oxley D, Munro SL, Craik DJ, Bacic A. 1998. Structure and distribution of N-glycans on the S₇-allele stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana alata*. *Journal of Biochemistry* **123**, 978-983.

Parry S, Newbigin E, Currie G, Bacic A, Oxley D. 1997a. Identification of active-site histidine residues of a self-incompatibility ribonuclease from a wild tomato. *Plant Physiology* **115**, 1421-1429.

Parry SK, Y.H. L, A.E. C, E. N, eds. 1997b. *S-RNases and other plant extracellular ribonucleases*. New York: Academic Press.

Pickart CM. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**, 181-190.

Poulter NS, Bosch M, Franklin-Tong VE. 2011. Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver pollen*. *Annals of Botany* **108**, 659-675.

Poulter NS, Vatovec S, Franklin-Tong VE. 2008. Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in *Papaver pollen*. *Plant Physiology* **146**, 1358-1367.

Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H. 2009. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1309-1318.

Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TP, Xue Y. 2004a. The F-box protein AhSLF-S₂ controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* **16**, 2307-2322.

Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y. 2004b. 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, Liu B, Soulard J, Morse D, Cappadocia M. 2006. Style-by-style analysis of two sporadic self-compatible *Solanum chacoense* lines supports a primary role for S-RNases in determining pollen rejection thresholds. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2001-2013.

- Qin X, Luu DT, Yang Q, Maes O, Matton DP, Morse D, Cappadocia M.** 2001. Genotype-dependent differences in S₁₂-RNase expression lead to sporadic self-compatibility in *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology* **45**, 295-305.
- Qin X, Soulard J, Laublin G, Morse D, Cappadocia M.** 2005. Molecular analysis of the conserved C4 region of the S₁₁-RNase of *Solanum chacoense*. *Planta* **221**, 531-537.
- Rea AC, Nasrallah JB.** 2008. Self-incompatibility systems : barriers to self-fertilization in flowering plants. *International Journal of Developmental Biology* **52**, 627-636.
- Read SM, Newbigin E, Clarke AE, McClure BA, Kao T-H.** 1995. Disputed ancestry: comments on a model for the origin of incompatibility in flowering plants. *The Plant Cell* **7**, 661-664.
- Richman AD, Uyenoyama MK, Kohn JR.** 1996. Allelic diversity and gene genealogy at the self-incompatibility locus in the *Solanaceae*. *Science* **273**, 1212-1216.
- Rivard SR, Cappadocia M, Vincent G, Brisson N, Landry BS.** 1989. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of plants produced by *in vitro* anther culture of *Solanum chacoense* Bitt. *Theoretical and Applied Genetics* **78**, 49-56.
- Roldan JA, Quiroga R, Goldraij A.** 2010. Molecular and genetic characterization of novel S-RNases from a natural population of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Reports* **29**, 735-746.
- Roldan JA, Rojas HJ, Goldraij A.** 2012. Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the *in vivo* self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany* **110**, 787-795.
- Romero C, Vilanova S, Burgos L, Martinez-Calvo J, Vicente M, Llacer G, Badenes ML.** 2004. Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes. *Plant Molecular Biology* **56**, 145-157.
- Royo J, Kunz C, Kowyama Y, Anderson M, Clarke AE, Newbigin E.** 1994. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6511-6514.
- Saba-El-Leil M, Rivard S, Morse D, Cappadocia M.** 1994. The S₁₁ and S₁₃ self incompatibility alleles in *Solanum chacoense* Bitt. are remarkably similar. *Plant Molecular Biology* **24**, 571-583.
- Saito T, Sato Y, Sawamura Y, Shoda M, Kotobuki K.** 2002. Studies on breeding of self-compatibility in Japanese pear : 2. Characteristic of pollen of S^{4sm} gene originated from 'Osanijisseiki'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **71**, 123.
- Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR.** 2009. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell* **21**, 2655-2671.
- Santos-Gally R, Gonzalez-Voyer A, Arroyo J.** 2013. Deconstructing heterostyly : the evolutionary role of incompatibility system, pollinators, and floral architecture. *Evolution* **67**, 2072-2082.

- Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG.** 2012. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **3**, 543-555.
- Sassa H, Hirano H.** 2006. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Molecular Genetics and Genomics* **275**, 97-104.
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H.** 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. *Molecular Genetics and Genomics* **241**, 17-25.
- Sassa H, Hirano H, Nishio T, Koba T.** 1997. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *The Plant Journal* **12**, 223-227.
- Sassa H, Kakui H, Minamikawa M.** 2010. Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in *Rosaceae*. *Sexual Plant Reproduction* **23**, 39-43.
- Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, Suzuki Y, Hanada T, Ushijima K, Kusaba M, Hirano H, Koba T.** 2007. S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* **175**, 1869-1881.
- Sassa H, Nishio T, Koyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H.** 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular Genetics and Genomics* **250**, 547-557.
- Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700.
- Schultz CJ, Hauser K, Lind JL, Atkinson AH, Pu ZY, Anderson MA, Clarke AE.** 1997. Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Molecular Biology* **35**, 833-845.
- Shiba H, Hinata K, Suzuki A, Isogai A.** 1995. Breakdown of self-incompatibility in *Brassica* by the antisense RNA of the Slg Gene. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* **71**, 81-83.
- Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa T, Che FS, Suzuki G, Watanabe M, Hinata K, Isogai A.** 2001. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiology* **125**, 2095-2103.
- Shivanna KR.** 1979. Recognition and rejection phenomena during pollen-pistil interaction. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B* **88**, 115-141.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T-H.** 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**, 302-305.
- Simm FC, Krietsch WK, Isenberg G.** 1987. On the interaction of bovine seminal RNase with actin *in vitro*. *European Journal of Biochemistry* **166**, 49-54.

- Sims TL.** 2012. Protein interactions in S-RNase-based gametophytic self-incompatibility. In: Cai J, Rongsheng W, eds. *Protein Interactions*: InTech, 171-194.
- Sims TL, Ordanic M.** 2001. Identification of a S-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* **47**, 771-783.
- Sims TL, Patel A, Shrestha P.** 2010. Protein interactions and subcellular localization in S-RNase-based self-incompatibility. *Biochemical Society Transactions* **38**, 622-626.
- Singh A, Ai Y, Kao T-H.** 1991. Characterization of ribonuclease-activity of 3 S-allele-associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiology* **96**, 61-68.
- Singh A, Kao T-H.** 1992. Gametophytic self-incompatibility: biochemical, molecular genetic, and evolutionary aspects. *International Review of Cytology* **140**, 449-483.
- Slobin LI.** 1980. The role of eucaryotic factor Tu in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay. *European Journal of Biochemistry* **110**, 555-563.
- Smalle J, Vierstra RD.** 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 555-590.
- Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ.** 2002. Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *The Plant Cell* **14**, 2613-2626.
- Sommer-Knudsen J, Lush WM, Bacic A, Clarke AE.** 1998. Re-evaluation of the role of a transmitting tract-specific glycoprotein on pollen tube growth. *The Plant Journal* **13**, 529-535.
- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbins TP.** 2005. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S-haplotype-specific F-box gene. *The Plant Cell* **17**, 37-51.
- Soulard J, Qin X, Boivin N, Morse D, Cappadocia M.** 2013. A new dual-specific incompatibility allele revealed by absence of glycosylation in the conserved C2 site of a *Solanum chacoense* S-RNase. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1995-2003.
- Staiger CJ, Franklin-Tong VE.** 2003. The actin cytoskeleton is a target of the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 103-113.
- Staiger CJ, Poulter NS, Henty JL, Franklin-Tong VE, Blanchoin L.** 2010. Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1969-1986.
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8816-8820.
- Stephenson AG, Doughty J, Dixon S, Elleman C, Hiscock S, Dickinson HG.** 1997. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating. *The Plant Journal* **12**, 1351-1359.

- Stone JM, Collinge MA, Smith RD, Horn MA, Walker JC.** 1994. Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science* **266**, 793-795.
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR.** 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *The Plant Cell* **15**, 885-898.
- Stone SL, Arnoldo M, Goring DR.** 1999. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**, 1729-1731.
- Stout AB, Chandler C.** 1941. Change from self-incompatibility to self-compatibility accompanying change from diploidy to tetraploidy. *Science* **94**, 118.
- Sun P, Kao TH.** 2013. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: the relationship between a self-incompatibility locus F-box protein and its non-self S-RNases. *The Plant Cell* **25**, 470-485.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K.** 2000. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* **403**, 913-916.
- Takase K, Higashi T, Omura T.** 2002. Aggregate formation and the structure of the aggregates of disulfide-reduced proteins. *Journal of Protein Chemistry* **21**, 427-433.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che FS, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A.** 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1920-1925.
- Tao R, Iezzoni AF.** 2010. The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae* **124**, 423-433.
- Taylor CB, Bariola PA, delCardayre SB, Raines RT, Green PJ.** 1993. RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5118-5122.
- Thomas SG, Franklin-Tong VE.** 2004. Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* **429**, 305-309.
- Thomas SG, Huang S, Li S, Staiger CJ, Franklin-Tong VE.** 2006. Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *Journal of Cell Biology* **174**, 221-229.
- Thompson RD, Kirch HH.** 1992. The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends in Genetics* **8**, 381-387.
- Tomoyeda M, Eto Y, Yoshino T.** 1969. Studies on ribonuclease produced by *Rhizopus* Sp .I. Crystallization and some properties of ribonuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **131**, 191-202.
- Tretter V, Altmann F, Marz L.** 1991. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry* **199**, 647-652.

- Tsai DS, Lee H-S, Post LC, Kreiling KM, Kao T-H.** 1992. Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sexual Plant Reproduction* **5**, 256-263.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Sato T, Masada M, Marchesi E, Kao T-H.** 2003. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an S-RNase gene. *Sexual Plant Reproduction* **15**, 255-266.
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Marchesi E, Kao TH.** 2005. Duplication of the S-locus F-box gene is associated with breakdown of pollen function in an S-haplotype identified in a natural population of self-incompatible *Petunia axillaris*. *Plant Mol Biol* **57**, 141-153.
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H.** 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell* **15**, 771-781.
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H.** 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in *Rosaceae*. *Molecular Genetics and Genomics* **260**, 261-268.
- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R.** 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal* **39**, 573-586.
- Van Nerum I, Certal AC, Oliveira MM, Keulemans J, Broothaerts W.** 2000. PD1, an S-like RNase gene from a self-incompatible cultivar of almond. *Plant Cell Reports* **19**, 1108-1114.
- Van Sint Jan V, Laublin G, Birhman RK, Cappadocia M.** 1996. Genetic analysis of leaf explant regenerability in *Solanum chacoense*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **47**, 9-13.
- Vanoosthuysse V, Tichtinsky G, Dumas C, Gaude T, Cock JM.** 2003. Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* S locus receptor kinase. *Plant Physiology* **133**, 919-929.
- Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ, Tobutt KR.** 2006. Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 856-866.
- Verica JA, McCubbin A, Kao T-H.** 1998. Are the hypervariable regions of S RNases sufficient for allele-specific rejection of pollen? *The Plant Cell* **10**, 314-316.
- Vieira J, Fonseca NA, Vieira CP.** 2009. RNase-based gametophytic self-incompatibility evolution: Questioning the hypothesis of multiple independent recruitments of the S-pollen gene. *Journal of Molecular Evolution* **69**, 32-41.
- Vieira J, Morales-Hojas R, Santos RA, Vieira CP.** 2007. Different positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pistil S-RNase gene in the *Solanaceae* and *Rosaceae* (*Prunus*, *Pyrus*, and *Malus*). *Journal of Molecular Evolution* **65**, 175-185.

- Vierstra RD.** 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* **8**, 135-142.
- Walker JC, Zhang R.** 1990. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* **345**, 743-746.
- Wallis B, Han SP.** 1998. Ribosomes in incompatible pollen tubes in the *Solanaceae*. *Physiologia Plantarum* **103**, 461-465.
- Wang CL, Wu J, Xu GH, Gao YB, Chen G, Wu JY, Wu HQ, Zhang SL.** 2010. S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *Journal of Cell Science* **123**, 4301-4309.
- Wang CL, Xu GH, Jiang XT, Chen G, Wu J, Wu HQ, Zhang SL.** 2009. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* *in vitro*. *The Plant Journal* **57**, 220-229.
- Wang CL, Zhang SL.** 2011. A cascade signal pathway occurs in self-incompatibility of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 420-421.
- Wang H-Y, Xue Y-B.** 2005. Subcellular localization of the S Locus F-box protein AhSLF-S₂ in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 76-83.
- Wang L, Dong L, Zhang Y, Zhang Y, Wu W, Deng X, Xue Y.** 2004a. Genome-wide analysis of S-Locus F-box-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **56**, 929-945.
- Wang X, Hughes AL, Tsukamoto T, Ando T, Kao T-H.** 2001. Evidence that intragenic recombination contributes to allelic diversity of the S-RNase gene at the self-incompatibility (S) locus in *Petunia inflata*. *Plant Physiology* **125**, 1012-1022.
- Wang Y, Tsukamoto T, Yi KW, Wang X, Huang S, McCubbin AG, Kao T-H.** 2004b. Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility (S-) locus and gene identification in an 881-kb contig containing S₂-RNase. *Plant Molecular Biology* **54**, 727-742.
- Wang Y, Wang X, McCubbin AG, Kao T-H.** 2003a. Genetic mapping and molecular characterization of the self-incompatibility (S) locus in *Petunia inflata*. *Plant Molecular Biology* **53**, 565-580.
- Wang Y, Wang X, Skirpan AL, Kao T-H.** 2003b. S-RNase-mediated self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany* **54**, 115-122.
- Watanabe M, Suwabe K, Suzuki G.** 2012. Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in *Brassicaceae*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* **88**, 519-535.
- Webb CJ, Lloyd DG.** 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**, 163-178.
- Wesche J.** 2002. Retrograde transport of ricin. *International Journal of Medical Microbiology* **291**, 517-521.

- Wheeler D, Newbiggin E.** 2007. Expression of 10 S-class SLF-like genes in *Nicotiana alata* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S locus. *Genetics* **177**, 2171-2180.
- Wheeler MJ, de Graaf BH, Hadjiosif N, Perry RM, Poulter NS, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin FC, Franklin-Tong VE.** 2009. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* **459**, 992-995.
- Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnoff N, Franklin-Tong VE.** 2011. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of *Papaver*. *Plant Physiology* **156**, 404-416.
- Williams JS, Natale CA, Wang N, Li S, Brubaker TR, Sun P, Kao T-H.** 2013. Four previously identified *Petunia inflata* S-Locus F-box genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility. *Molecular Plant*.
- Willing RP, Bashe D, Mascarenhas JP.** 1988. An analysis of the quantity and diversity of messenger-RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. *Theoretical and Applied Genetics* **75**, 751-753.
- Woodward JR, Craik D, Dell A, Khoo KH, Munro SL, Clarke AE, Bacic A.** 1992. Structural analysis of the N-linked glycan chains from a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Glycobiology* **2**, 241-250.
- Wu HM, Wang H, Cheung AY.** 1995. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**, 395-403.
- Wu J, Wang S, Gu Y, Zhang S, Publicover SJ, Franklin-Tong VE.** 2011. Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* activates nonspecific cation conductance permeable to Ca^{2+} and K^{+} . *Plant Physiology* **155**, 963-973.
- Wunsch A, Hormaza JI.** 2004. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 299-305.
- Xu BB, Grun P, Kheyr-Pour A, Kao T-H.** 1990a. Identification of pistil-specific proteins associated with three self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense*. *Sexual Plant Reproduction* **3**, 54-60.
- Xu BB, Mu JH, Nevins DL, Grun P, Kao T-H.** 1990b. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. *Molecular Genetics and Genomics* **224**, 341-346.
- Xu C, Li M, Wu J, Guo H, Li Q, Zhang Y, Chai J, Li T, Xue Y.** 2013. Identification of a canonical SCF(SLF) complex involved in S-RNase-based self-incompatibility of *Pyrus* (*Rosaceae*). *Plant Molecular Biology* **81**, 245-257.
- Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES.** 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *The Plant Cell* **8**, 805-814.

- Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R.** 2003a. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant and Cell Physiology* **44**, 764-769.
- Yamane H, Tao R, Mori H, Sugiura A.** 2003b. Identification of a non-S RNase, a possible ancestral form of S-RNases, in *Prunus*. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 90-100.
- Yamane H, Ushijima K, Sassa H, Tao R.** 2003c. The use of the S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for S-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1357-1361.
- Yang F, Demma M, Warren V, Dharmawardhane S, Condeelis J.** 1990. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1a. *Nature* **347**, 494-496.
- Ye ZH, Droste DL.** 1996. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology* **30**, 697-709.
- Yoshida Y.** 2007. F-box proteins that contain sugar-binding domains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2623-2631.
- Zhang Q, Bhattacharya S, Andersen ME.** 2013. Ultrasensitive response motifs: basic amplifiers in molecular signalling networks. *Open Biology* **3**, 130031.
- Zhao L, Huang J, Zhao Z, Li Q, Sims TL, Xue Y.** 2010. The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Journal* **62**, 52-63.
- Zhou J, Wang H, Ma W, Zhang Y, Han B, Xue Y.** 2003. Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box genes in *Anthirrhinum*. *Sexual Plant Reproduction* **16**, 165-177.
- Zisovich AH, Stern RA, Sapir G, Shafir S, Goldway M.** 2004. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction* **17**, 151-156.
- Zuberi MI, Dickinson HG.** 1985. Pollen-stigma interaction in *Brassica*. III. Hydration of the pollen grains. *Journal of Cell Science* **76**, 321-336.
- Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA.** 1997. Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *The Plant Journal* **11**, 797-808.

