

Université de Montréal

**Exploration du rôle de la signalisation  
des *Mitogen-Activated Protein Kinases*  
lors de la fécondation chez les plantes**

Par  
Benjamin Damien Mazin

Institut de recherche en biologie Végétale  
Département de science biologique  
Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph.D.)

Octobre 2020  
© Benjamin Damien Mazin

*Cette thèse intitulée*

**Exploration du rôle de signalisation des *Mitogen-Activated Protein Kinases* lors de la fécondation chez les plantes**

*Présentée par*  
**Benjamin Damien Mazin**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**David Morse**  
Président-rapporteur

**Daniel Philippe Matton**  
Directeur de recherche

**Daniel Kierzkowski**  
Codirecteur

**Annie Angers**  
Membre du jury

**Patrick Gulick**  
Examineur externe





## Résumé

La reproduction est un événement crucial pour la vie des plantes. Ce processus nécessite la formation du pollen et des ovules. Les cellules germinales vont subir la méiose puis une succession de mitoses, deux pour le pollen et trois pour l'ovule, ce qui va leur permettre d'acquérir leurs structures finales. Une fois formés, ces deux gamètes doivent se rencontrer. Pour cela, le grain de pollen va germer sur le stigmate puis former le tube pollinique. Le tube pollinique en croissance va traverser les différents tissus femelles et ainsi tracter les deux cellules spermatiques jusqu'à l'ovule, permettant la reproduction.

Un important réseau de signalisation cellulaire est nécessaire pour permettre ces événements. Les cascades des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) sont l'un des réseaux de signalisation les plus étudiés chez les plantes. Ces kinases sont impliquées dans de très nombreux processus développementaux tels que la formation de l'embryon ou des stomates. Pour autant, leurs rôles restent encore peu caractérisés pendant de la fécondation. Ce projet a pour objectif de mieux comprendre le rôle que jouent les MAPK lors de la formation des gamètes mâles et femelles ainsi que lors de la croissance des tubes polliniques. Plusieurs membres de la superfamille des MAPKs ont été caractérisés pour leurs rôles dans la reproduction sexuée des végétaux. De précédents travaux dans le laboratoire de Daniel P. Matton, ont démontré l'implication de deux *MAPK Kinases Kinases* (MAP3K), la *Solanum chacoense Fertilization-Related Kinase 1* (*ScFRK1*) et *ScFRK2*. Ces deux kinases sont nécessaires pour le développement de l'ovule et du pollen chez *S. chacoense*, une espèce de pomme de terre sauvage diploïde.

Dans un premier temps, nous avons étudié la fonction d'une nouvelle ScFRK, la *ScFRK3*. Ce troisième membre de la classe des FRKs chez *S. chacoense*, est, elle aussi, impliquée dans le développement des gamétophytes mâles et femelles. Du patron d'expression jusqu'à l'établissement d'une voie de signalisation potentielle, en passant par la caractérisation phénotypique des mutants, plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de comprendre le rôle de ScFRK3 lors de la formation des gamètes chez *Solanum chacoense*. Nous montrons que la ScFRK3 est impliquée dans la formation du pollen ainsi que celui des ovules.

Nous avons ensuite poursuivi nos recherches en affinant le phénotypage du mutant de surexpression *ScFRK2*. En effet, les précédentes études ont permis de montrer que la surexpression de *ScFRK2* conduit le primordium ovulaire à la formation de structures carpéloïdes. Pour autant, les ensembles des primordium ovulaires ne sont pas devenu des structures carpéloïde. Nous montrons ici que seulement 10 % des ovules dans l'ovaire sont devenu

des carpéloïde. Notre étude montre qu'en plus des structures carpéloïdes, un grand nombre d'ovule n'ont pas de sac embryonnaire à l'anthèse ce qui explique le faible nombre de graines par fruit. L'analyse du développement des sacs embryonnaires montre que la surexpression de *ScFRK2* entraîne l'arrêt au stade mégaspore fonctionnelle. Ce phénotype est similaire à ce qui a pu être observé dans les lignées ARN interférant pour la *ScFRK1* et la *ScFRK3*.

De précédentes études faites chez *Arabidopsis thaliana* semblent montrer que les membres de la superfamille des MAPK ne sont pas essentiels pour la croissance du tube pollinique. Pour comprendre le rôle que jouent les MAPK dans l'élongation du tube pollinique, nous avons utilisé un inhibiteur des MAP Kinase Kinase (MKK), appelé U0126. La présence de cette drogue dans le milieu de croissance des grains de pollen provoque une diminution de la germination et de l'élongation du tube pollinique. L'utilisation de la méthode semi-*in vivo* montre une perte de la polarisation de la croissance des tubes polliniques causée par l'inhibition des MKK. La présence de l'inhibiteur conduit à la diminution de la quantité de filaments d'actine ainsi qu'à leur désorganisation à l'apex du tube. L'exocytose est aussi affectée par l'inhibition des MKK. Les cascades MAPK sont nécessaires à la croissance polarisée du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

Pour finir, nous avons voulu identifier certains membres de la superfamille des MAPK impliqués dans la croissance du tube pollinique. Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux orthologues de la famille ScFRK chez *Arabidopsis thaliana*. Les AtMAP3K19-20-21 sont les orthologues les plus proches de ScFRK3. Ces *AtMAP3K* sont exprimées lors du développement des grains de pollen et lors de l'élongation de tube pollinique. L'analyse du pollen des différentes lignées mutantes montre qu'en leur absence, le pollen ne présente aucun problème de développement contrairement à *ScFRK3*. Par contre, les doubles mutants et le triple mutant pour les *AtMAP3K19-20-21* montrent une diminution de la capacité de germination. L'élongation du tube pollinique est affectée lors de la mutation d'au moins une des *AtMAP3K*. Ces deux études démontrent que les MAPK sont essentielles dans la formation et l'élongation du tube pollinique.

**Mots-Clefs :** Cascade de signalisation, Mitogen-Activated Protein Kinases, Fertilization-Related Kinase (FRK), Développement, Pollen, Sac embryonnaire, Tube pollinique, *Solanum chacoense* et *Arabidopsis thaliana*.

## Abstract

Reproduction is a crucial event for plant life. This process requires the formation of pollen and ovules. The germ cells will undergo meiosis and then a succession of mitosis, two for the pollen and three for the ovule, which will allow them to acquire their final structures. Once formed, these two gametes must meet each other. For this, the pollen grain will germinate on the stigmas to form the pollen tube. The growth of the pollen tube will pass through the different female tissues and thus pull the two sperm cells to the ovum for reproduction.

An important cellular signaling network is necessary to allow these events to occur. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPKs) cascades are one of the most studied signaling networks in plants. These kinases are involved in a wide range of developmental processes such as embryo formation and stomata. However, their roles remain poorly characterized during fertilization. The aim of this project is to better understand the role played by MAPKs during the formation of male and female gametes as well as during the growth of pollen tubes. Several members of the MAPK superfamily have been characterized for their role in the sexual reproduction of plants. Previous work in Daniel P. Matton's laboratory has demonstrated the involvement of two MAPK Kinases (MAP3K), *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 1 (ScFRK1) and ScFRK2. These two kinases are necessary for egg and pollen development in *S. chacoense*, a diploid wild potato species.

In a first step, we studied the functionality of a new ScFRK, ScFRK3. This third member of the class of FRKs in *S. chacoense*, is also involved in the development of male and female gametophytes. From the expression pattern to the establishment of a potential signaling pathway, through the phenotypic characterization of mutants, several experiments have been performed in order to understand the role of ScFRK3 in the formation of gametes in *S. chacoense*. We show that ScFRK3 is involved in the formation of pollen as well as that of the embryonic sac.

We then continued our research by refining the phenotyping of the overexpression mutant ScFRK2. Indeed, previous studies have shown that ScFRK2 overexpression leads the ovular primordium to the formation of carpeloid structures. However, the sets of ovular primordia have not become capeloid structures. We show here that only 10% of the eggs in the ovary have become carpeloid. Our study shows that in addition to the carpeloid structures, a large number of ova do not have an embryonic sac in the anthesis, which explains the low number of seeds per fruit. The analysis of the development of the embryonic sacs shows that

overexpression of ScFRK2 leads to the cessation of the functional megaspore stage. This phenotype is similar to what has been observed in interfering RNA lines reducing expression of ScFRK1 and ScFRK3.

Previous studies in *Arabidopsis thaliana* suggest that members of the MAPK superfamily are not essential for pollen tube growth. To understand the role that MAPKs play in pollen tube elongation, we used a MAP Kinase Kinase (MKK) inhibitor called U0126. The presence of this drug in the growth medium of pollen grains causes a decrease in germination and elongation of the pollen tube. The use of the semi *in vivo* method shows a loss of polarization of the pollen tube growth caused by the inhibition of MKK. The presence of the inhibitor leads to a decrease in the number of actin filaments and their disorganization at the apex of the tube. Exocytosis is also affected by MKK inhibition. We show in this chapter that MAPK cascades are necessary for polarized pollen tube growth in *Arabidopsis thaliana*.

Finally, we wanted to identify some members of the MAPK superfamily involved in pollen tube growth. We were first interested in the ScFRK family orthologs in *Arabidopsis thaliana*. AtMAP3K19-20-21 are the closest orthologs to ScFRK3. These AtMAP3K are expressed during the development of pollen grains and during the elongation of the pollen tube. Pollen analysis of the different mutant lines shows that in their absence the pollen does not present any development problems unlike ScFRK3. On the other hand, double mutants and triple mutant for AtMAP3K19-20-21 show a decrease in germination capacity. Pollen tube elongation is affected when at least one of the AtMAP3Ks is mutated. These two studies demonstrate that MAPKs are essential for the formation and elongation of the pollen tube and that AtMAP3K19-20-21 participate in these biological processes.

**Keywords** : Signaling cascade, Reproduction, Mitogen-Activated Protein Kinases [1], Fertilization-Related Kinase (FRK), Development, Pollen, Embryo Sac, Pollen tube, *Solanum chacoense* and *Arabidopsis thaliana*.

## **Enivrez-vous**

Il faut être toujours ivre. Tout est là : c'est l'unique question. Pour ne pas sentir l'horrible fardeau du Temps qui brise vos épaules et vous penche vers la terre, il faut vous enivrer sans trêve.

Mais de quoi ? De vin, de poésie ou de vertu, à votre guise. Mais enivrez-vous.

Et si quelquefois, sur les marches d'un palais, sur l'herbe verte d'un fossé, dans la solitude morne de votre chambre, vous vous réveillez, l'ivresse déjà diminuée ou disparue, demandez au vent, à la vague, à l'étoile, à l'oiseau, à l'horloge, à tout ce qui fuit, à tout ce qui gémit, à tout ce qui roule, à tout ce qui chante, à tout ce qui parle, demandez quelle heure il est ; et le vent, la vague, l'étoile, l'oiseau, l'horloge, vous répondront : « Il est l'heure de s'enivrer ! Pour n'être pas les esclaves martyrisés du Temps, enivrez-vous sans cesse ! De vin, de poésie ou de vertu, à votre guise. »

Charles Baudelaire – Le Spleen de Paris, XXXIII

## Remerciements

Je voudrais remercier Daniel Philippe Matton pour m'avoir fait confiance dès mon premier stage durant l'été 2012. Il m'a permis d'apprendre à être autonome, mais aussi débrouillard. Je dois aussi le remercier pour le sublime appartement dans lequel j'ai pu habiter.

Je remercie mon codirecteur de thèse, Daniel Kierzkowski, pour ces nombreux conseils dans le domaine de la microscopie et dans l'orientation de ma thèse. Je souhaite aussi lui dire merci pour son sa jovialité et son entrain contagieux.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire : Yang, Audrey, Rachid, Fangwen, Claire, Caroline, Valentin, et Samuel qui ont tous contribué en participant aux expériences ou en aidant à leurs réalisations. Je veux aussi les remercier pour leurs conseils jour et nuit et trois cent soixante-cinq jours par ans sans aucune contribution en retour seulement par amour de la science. Je tiens à remercier plus particulièrement Caroline Daigle avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci à toi pour le temps que tu m'as consacré durant mes deux stages et pour la passion de la recherche que tu m'as transmise. Je souhaite aussi dire un merci tout particulier à Valentin Joly, qui a été un collègue, mais qui est surtout un ami qui m'est cher. Tu m'as longuement soutenu, encouragé et motivé grâce à ton affection pour la science, la politique et l'humour absurde. Je voudrais aussi remercier l'ensemble des stagiaires pour leurs aides et leurs passions pour la science du vivant. Merci à Théo, Miguel, Raquel et Misuki.

Merci aussi à tous ceux qui ont travaillé, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse. Je pense bien sûr aux anciens membres de l'IRBV Mathieu, Steve, Samuel et Youssef. Je souhaite remercier Sonia et Hana qui a toujours pris du temps pour discuter de mes problèmes expérimentaux. Je voudrais aussi remercier les professeurs David Morse et Jean Rival qui ont toujours pris le temps de m'écouter et de m'avoir donné tant de conseils.

Je souhaite aussi remercier Nicolas, Denis et David qui ont toujours été présents dans n'importe quelle situation et essayé de faire de leurs possibles pour dédramatiser n'importe quelle situation.

Je voudrais dire merci à mon conjoint Marc-André qui est présent depuis le début de ma thèse malgré mon manque d'affection chronique et mon esprit bien Français, ma toujours soutenu et encourager. Je voudrais remercier du fond du cœur ma mère (Béatrice), mon père [2], ma sœur (Laetitia), mes trois petits frères (Maximilien, Arthur et Hugo), mon beau-frère (Julien), mes belles-sœurs (Estelle et Léa), ma nièce (Mya) et mes neveux (Noland, Arron, Mathis et Lucas) qui ont toujours été là, malgré les 6000 km qui nous ont séparés et que j'aime

profondément. Je voudrais aussi remercier mes amis Nicolas, Guillaume, Thomas, Jean et Philippe qui ont toujours été présents.



# Table des matières

RESUME	2
ABSTRACT	4
REMERCIEMENT	7
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES	13
TABLE DES TABLEAUX	15
ABBREVIATIONS	16

## **1 INTRODUCTION** **20**

---

<b>1.1 LA FORMATION DU POLLEN.</b>	<b>20</b>
1.1.1 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE	20
1.1.2 SIGNALISATION CELLULAIRE	21
<b>1.2 DEVELOPPEMENT DE L'OVULE</b>	<b>25</b>
1.2.1 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE	25
1.2.2 SIGNALISATION CELLULAIRE	26
<b>1.3 POLLINISATION</b>	<b>28</b>
1.3.1 HYDRATATION ET GERMINATION	28
1.3.2 CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE	28
1.3.2.1 Flux ioniques	30
1.3.2.2 Cytosquelette	31
1.3.2.3 Trafic vésiculaire	33
<b>1.4 INTERACTION POLLEN-OVULE ET FECONDATION</b>	<b>34</b>
1.4.1 GUIDAGE PAR LE STYLE ET LE TISSU DE TRANSMISSION	34
1.4.2 GUIDAGE OVULAIRE	35
1.4.2.1 Guidage longue distance	35
1.4.2.2 Guidage funiculaire	35
1.4.2.3 Guidage micropylaire	35
1.4.3 RECEPTION DES SIGNAUX PAR LE TUBE POLLINIQUE	36
1.4.4 DOUBLE FECONDATION	38
<b>1.5 LES CASCADES DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE</b>	<b>39</b>
1.5.1 INFORMATION GENERALE SUR LES MAPK	39
1.5.2 IMPLICATION DES KINASES	42
1.5.2.1 Lors du développement du pollen	42
1.5.2.2 Lors du développement des ovules	44
1.5.2.3 Lors de la pollinisation	46
<b>1.6 PROBLEMATIQUE ET PROJET DE RECHERCHE</b>	<b>48</b>

## **2 LA SOLANUM CHACOENSE FERTILIZATION-RELATED KINASE 3 EST IMPLIQUEE DANS LE DEVELOPPEMENT DES GAMETOPHYTES MALES ET FEMELLES.** **50**

<b>2.1 UNE NOUVELLE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE SOLANUM CHACOENSE, SCFRK3, EST IMPLIQUEE DANS LE DEVELOPPEMENT DES GAMETOPHYTES.</b>	<b>50</b>
2.1.1 PREAMBULE	50
2.1.2 SOMMAIRE	50
<b>2.2 THE SOLANUM CHACOENSE FERTILIZATION-RELATED KINASE 3 IS INVOLVED IN MALE AND FEMALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT.</b>	<b>51</b>

2.2.1	APPORT ORIGINAL	51
2.2.2	ABSTRACT	52
2.2.3	BACKGROUND	52
2.2.4	METHODS	55
2.2.4.1	Plant material and transformation	55
2.2.4.2	RNA expression and in situ hybridization	56
2.2.4.3	Pollen development and viability analyses	56
2.2.4.4	MKKs and MPKs retrieval and RACE	57
2.2.4.5	Directed Yeast-two hybrid assays	57
2.2.4.6	Subcellular localization and bimolecular fluorescence complementation assays	57
2.2.5	RESULTS	58
2.2.5.1	ScFRK3, a MEKK related to the Arabidopsis MAPKKK19, 20 and 21	58
2.2.5.2	ScFRK3 expression pattern suggests a role in reproductive development	59
2.2.5.1	ScFRK3 RNAi plants show reproductive defects	61
2.2.5.2	Ovule development is affected in ScFRK3 RNAi mutants	62
2.2.5.3	Pollen development and viability are also affected in ScFRK3 RNAi lines	66
2.2.5.4	ScFRK3 interacts with ScMKK3	68
2.2.6	SCMCK3 INTERACTS WITH SCMPK13	70
2.2.7	DISCUSSION	71
2.2.8	CONCLUSIONS	74
2.2.9	DECLARATIONS ET FUNDING	74

### **3 LA SCFRK2 EST IMPLIQUEE DANS LE DEVELOPPEMENT DU SAC EMBRYONNAIRE CHEZ SOLANUM CHACOENSE.** **76**

<b>3.1</b>	<b>LA SOLANUM CHACOENSE FERTILIZATION-RELATED KINASE 2 EST NECESSAIRE POUR LE DEVELOPPEMENT DES GAMETOPHYTES FEMELLES.</b>	<b>76</b>
3.1.1	PREAMBULE	76
3.1.2	SOMMAIRE	76
<b>3.2</b>	<b>THE SCFRK2 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE (MAP3K) IS INVOLVED IN EARLY EMBRYO SAC DEVELOPMENT IN SOLANUM CHACOENSE.</b>	<b>77</b>
3.2.1	APPORT ORIGINAL	77
3.2.2	ABSTRACT	77
3.2.3	INTRODUCTION	78
3.2.4	RESULTS AND DISCUSSION	79
3.2.5	DECLARATIONS AND FUNDING	81

### **4 LES CASCADES DES MITOGEN ACTIVATED-PROTEIN KINASE SONT NECESSAIRE POUR LA CROISSANCE POLARISEE DU TUBE POLLINIQUE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA.** **82**

<b>4.1</b>	<b>LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE REQUIERENT L'IMPLICATION DES CASCADES MAPK</b>	<b>82</b>
4.1.1	PREAMBULE	82
4.1.2	SOMMAIRE	82
<b>4.2</b>	<b>LES CASCADES DES MITOGEN ACTIVATED-PROTEIN KINASE SONT CRUCIAUX POUR LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA.</b>	<b>83</b>
4.2.1	APPORT ORIGINAL	83
4.2.2	RÉSUMÉ	83
4.2.3	INTRODUCTION	84
4.2.4	MATERIELS ET METHODES	86
4.2.4.1	Plantes et conditions de croissance	86
4.2.4.2	Tests de germination et de croissance in vitro	87

4.2.4.3	Tests semi-in vitro tube pollinique	87
4.2.4.4	Visualisation et quantification de la dynamique des filaments d'actine dans les tubes pollinique en croissance	87
4.2.4.5	Visualisation et quantification des vésicules RabA4b-YFP dans les tubes pollinique en croissance.	88
4.2.5	RESULTATS	88
4.2.5.1	Effets de l'inhibiteur de MKK sur la germination et la croissance des TP.	88
4.2.5.2	Effets de différentes concentrations de U0126 sur la croissance des TP.	90
4.2.5.3	Effet de U0126 sur l'organisation des filaments d'actines.	91
4.2.5.4	Effets de l'inhibition des MKK sur l'exocytose chez des TP.	93
4.2.6	DISCUSSION	94

## **5 LES MITOGEN ACTIVATED-PROTEIN KINASE KINASE KINASE 19, 20 ET 21 SONT IMPLIQUEES LORS DE LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU TP CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA.** **97**

<b>5.1</b>	<b>LES MITOGENS ACTIVATED-PROTEIN KINASE KINASE KINASE 19, 20 ET 21 PARTICIPENT A LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU TP D'ARABIDOPSIS THALIANA.</b>	<b>97</b>
5.1.1	PREAMBULE	97
5.1.2	SOMMAIRE	97
<b>5.2</b>	<b>L'IMPLICATION DES AtMAP3K 19, 20 ET 21 DANS LA CROISSANCE DU TP CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA.</b>	<b>98</b>
5.2.1	APPORT ORIGINAL	98
5.2.2	RESUME	98
5.2.3	INTRODUCTION	99
5.2.4	MATERIELS ET METHODES	101
5.2.4.1	Les plantes et leurs conditions de croissance	101
5.2.4.2	Expression transitoire dans le TP de Nicotiana tabacum.	101
5.2.4.3	Isolation d'ARN et RT-PCR	102
5.2.4.4	Coloration GUS	102
5.2.4.5	Mutation de map3k19 par la méthode CRISPR-Cas9	103
5.2.4.6	Viabilité du pollen	103
5.2.4.7	Tests de germination et de croissance in vitro	104
5.2.4.8	Tests de croissance in vivo et coloration au bleu d'aniline	104
5.2.5	RESULTATS	105
5.2.5.1	Les AtMAP3K19, 20 et 21 sont les paralogues des ScFRK1, 2 et 3	105
5.2.5.2	Les AtMAP3K19, 20 et 21 sont exprimées dans le pollen et le TP.	105
5.2.5.3	Effets de la mutation des AtMAP3K19, 20 et 21 sur la formation des grains de pollen	108
5.2.5.4	Effets de la mutation des AtMAP3K19, 20 et 21 sur la germination et l'élongation des TP.	109
5.2.5.5	Localisation cellulaire dans le tube pollinique	112
5.2.6	DISCUSSION	112

## **6 DISCUSSION ET PERSPECTIVE GENERALES** **115**

<b>6.1</b>	<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>115</b>
6.1.1	CHEZ <i>SOLANUM CHACOENSE</i>	115
6.1.2	CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	117
<b>6.2</b>	<b>PERSPECTIVES</b>	<b>119</b>
6.2.1	CHEZ <i>SOLANUM CHACOENSE</i>	119
6.2.2	CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	121

## **7 CONCLUSION** **123**

<b>8</b>	<b><u>BIBLIOGRAPHIES</u></b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>142</b>
<b>9.1</b>	<b>ANNEXES 1 : LA SCFRK3 EST IMPLIQUEE LORS DU DEVELOPPEMENT DES GAMETES.</b>	<b>142</b>
<b>9.2</b>	<b>ANNEXES 2 : LES CASCADES DES MAPK SONT NECESSAIRES POUR LA CROISSANCE POLARISEE DU TP CHEZ <i>A. THALIANA</i>.</b>	<b>152</b>
<b>9.3</b>	<b>ANNEXES 3 : LES ATMAP3K19-20-21 SONT IMPLIQUEES LORS DE LA GERMINATION ET LA CROISSANCE DU TP CHEZ <i>A. THALIANA</i>.</b>	<b>154</b>
<b>9.4</b>	<b>ANNEXES 4 : THE SCRALF3 SECRETED PEPTIDE INVOLVED IN SPOROPHYTE TO GAMETOPHYTE SIGNALING.</b>	<b>157</b>

# Table des figures

FIGURE 1: DEVELOPPEMENT DU GAMETOPHYTE MALE. ....	21
FIGURE 2: SCHEMA ILLUSTRANT LES LIGNEES CELLULAIRES ET LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE DANS LE DEVELOPPEMENT DES GAMETOPHYTES MALES DANS LE CONTEXTE DES MUTATIONS GAMETOPHYTIQUES QUI AFFECTENT LA DIVISION ASYMETRIQUE, LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE ET LA STRUCTURATION. ....	24
FIGURE 3: LE DEVELOPPEMENT DES OVULES ET DES SACS EMBRYONNAIRES CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ET <i>SOLANUM CHACOENSE</i> . ....	26
FIGURE 4 : SCHEMA D'ORGANISATION DU GRADIENT CALCIUM, DES FILAMENTS D'ACTINE (FA) ET DU TRAFIC VESICULAIRE PENDANT LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE. ....	29
FIGURE 5: DISTRIBUTION ET REGULATION DES ELEMENTS DU CYTOSQUELETTE ET DES CANAUX CALCIQUES DANS LE TP. ....	32
FIGURE 6 : CONTROLE PAR RHO-LIKE GTPASE (ROP)1 DE LA CROISSANCE DU TP. ....	37
FIGURE 7: STRUCTURE DU PISTIL ET DEROULEMENT DE L'INTERACTION AVEC LE POLLEN CHEZ <i>A. THALIANA</i> . .....	39
FIGURE 8: CASCADE MAPK CANONIQUE ET NON CANONIQUE. ....	41
FIGURE 9: VIABILITE DU POLLEN SAUVAGE ET DE DEUX LIGNEES DE PLANTES TRANSGENIQUES <i>ScFRK1</i> . ....	43
FIGURE 10: PHENOTYPE DES FRUITS DES MUTANTS DONT L'EXPRESSION DE <i>ScFRK1</i> EST REDUITE. ....	45
FIGURE 11: DEVELOPPEMENT DE L'OVAIRE CHEZ DES PLANTES MUTANTES DE SUREXPRESSION <i>ScFRK2</i> . ....	46
FIGURE 12 : GUIDAGE DEFECTUEUX DES TUBES POLLINIQUES CHEZ LES MUTANTS <i>MPK3;MPK6</i> . ....	47
FIGURE 13: PHYLOGENIC POSITIONING OF <i>ScFRK3</i> INSIDE THE FRK CLASS AND CELLULAR LOCALIZATION. .....	59
FIGURE 14: <i>ScFRK3</i> EXPRESSION PATTERN IN REPRODUCTIVE DEVELOPMENT. ....	60
FIGURE 15: <i>iFRK3</i> MUTANTS PRODUCE SMALLER FRUITS AND LESSER SEEDS. ....	62
FIGURE 16: OVULE PHENOTYPING IN <i>iFRK3</i> MUTANTS. ....	65
FIGURE 17: POLLEN PHENOTYPING IN <i>iFRK3</i> MUTANTS. ....	67
FIGURE 18: <i>ScFRK3</i> INTERACTS WITH THE MAP KINASE KINASE <i>ScMKK3</i> . ....	69
FIGURE 19: <i>ScMKK3</i> INTERACTS WITH THE MAP KINASE <i>ScMPK13</i> . ....	71
FIGURE 20: FRUITS, OVARIES AND OVULES PHENOTYPE OF <i>ScFRK2</i> OVEREXPRESSION LINES. ....	80
FIGURE 21: CORRELATION BETWEEN EMBRYO SAC DEVELOPMENT STAGES AND BUD SIZE IN WT AND <i>ScFRK2</i> OVEREXPRESSION MUTANTS. ....	81
FIGURE 22 : EFFETS DE U0126 LORS DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE DES TP <i>IN VITRO</i> . ....	89
FIGURE 23: EFFETS DE LA CONCENTRATION DE U0126 SUR LA CROISSANCE DES TP. ....	91
FIGURE 24: EFFETS DU DSMO, DE U0124 ET DE U0126 SUR LES FILAMENTS D'ACTINE EN UTILISANT DES TUBES EXPRIMANT LIFEACT-MEGFP. ....	92
FIGURE 25 : EFFETS DU DSMO, DE U0124 ET U0126 SUR L'EXOCYTOSE EN UTILISANT DES TP EXPRIMANT YFP-RABA4B. ....	94
FIGURE 26 : POSITIONNEMENT PHYLOGENIQUE DE LA <i>AtMAP3K19</i> , DE LA <i>AtMAP3K20</i> ET DE LA <i>AtMAP3K21</i> DANS LA CLASSE DES <i>ScFRK</i> ET DE L'ENSEMBLE DES <i>AtMAP3K</i> . ....	105
FIGURE 27: RT-PCR POUR LES PATRONS D'EXPRESSION <i>MAP3K19</i> , <i>20</i> ET <i>21</i> . ....	106
FIGURE 28 : ANALYSE HISTOCHEMIE DE L'EXPRESSION DU GENE RAPPORTEUR GUS PAR LE PROMOTEUR DES TROIS <i>MAP3Ks</i> . ....	107
FIGURE 29 : TEST DE VIABILITE DES GRAINS DE POLLEN A L'ANTHESE. ....	109
FIGURE 30 : TESTS DE GERMINATION ET DE CROISSANCE <i>IN VITRO</i> . ....	110
FIGURE 31 : CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES <i>IN VIVO</i> . ....	111
FIGURE 32 : LOCALISATION CELLULAIRE DE LA <i>AtMAP3K19-20-21</i> DANS LE TP. ....	112
FIGURE 33: PHYLOGENETIC TREE SHOWING THE RELATIONS BETWEEN THE <i>AtMKKs</i> , THE <i>SlMKKs</i> AND THE <i>ScMKKs</i> FOUND IN THE <i>S. CHACOENSE</i> OVULE AND POLLEN TRANSCRIPTOME. ....	149
FIGURE 34: PHYLOGENETIC TREE SHOWING THE RELATIONS BETWEEN THE <i>AtMPKs</i> , <i>StMPKs</i> AND THE <i>ScMPKs</i> FOUND IN THE <i>S. CHACOENSE</i> TRANSCRIPTOME. ....	150
FIGURE 35: <i>ScMKK3</i> AND <i>ScMPK13</i> EXPRESSION AND LOCALIZATION. ....	151
FIGURE 36: CONSERVATION OF THE C-TERMINAL <i>ScFRK3</i> SEGMENT AND ITS CLOSEST GENES IN <i>S.</i> <i>CHACOENSE</i> AND <i>A. THALIANA</i> . ....	151
FIGURE 37: EFFETS DE U0126 SUR L'ORGANISATION DES FILAMENTS D'ACTINE LORS DE LA CROISSANCE DES TP. ....	152
FIGURE 38: <i>SCRALF3</i> EXPRESSION IN FLOWER REPRODUCTIVE TISSUES. ....	162

<b>FIGURE 39: <i>SCRALF3</i> EXPRESSION IN THE RECEPTACLE AND VASCULAR TISSUES OF REPRODUCTIVE WHORLS.</b>	163
<b>FIGURE 40: <i>SCRALF3</i> EXPRESSION IN ANTHERS THROUGHOUT FLOWER DEVELOPMENT.</b>	164
<b>FIGURE 41: POLLEN DEVELOPMENT IN WILD TYPE <i>S. CHACOENSE</i> AND RNAi-<i>SCRALF3</i> MUTANT LINES.</b>	165
<b>FIGURE 42 : QUANTIFICATION OF POLLEN DEVELOPMENT PHENOTYPE IN RNAi-<i>SCRALF3</i> MUTANT LINES.</b>	166
<b>FIGURE 43 :PROBLEMATIC POLLEN FROM <i>SCRALF3</i> RNAi LINES DOES NOT GO THROUGH MITOSIS I.</b>	168
<b>FIGURE 44: <i>SCRALF3</i> PERTURBATION IN RNAi MUTANT DOES NOT AFFECT NON-REPRODUCTIVE TISSUES OF THE FLOWER, NOR POLLEN TUBE GROWTH.</b>	171
<b>FIGURE 45: PROTEINS ALIGNMENT OF <i>SCRALF3</i> ORTHOLOGUES.</b>	171

# Table des Tableaux

<b>TABLEAU 1 : CORRELATION BETWEEN OVULE DEVELOPMENT STAGES AND BUD SIZE IN WT AND <i>IFRK3</i> MUTANTS.</b> .....	64
<b>TABLEAU 2 : LIST OF PRIMERS.</b> .....	142
<b>TABLEAU 3 : MKKS AND MPKS FOUND IN <i>S. CHACOENSE</i> OVULE AND POLLEN TRANSCRIPTOME AND THEIR ORTHOLOGS IN <i>A. THALIANA</i>.</b> .....	143
<b>TABLEAU 4 : HEATMAP DE LA SUPERFAMILLE DES MAPKS DANS LE POLLEN SEC, DU TUBE POLLINIQUE APRES 30 MINUTES DE CROISSANCE <i>IN VITRO</i> (PT 0,5 HEURE), DU TUBE POLLINIQUE APRES 4 HEURES DE CROISSANCE <i>IN VITRO</i> (PT 4 H) ET DU TUBE POLLINIQUE EN CROISSANCE SEMI — <i>IN VITRO</i> (PT SIV).</b>	153
<b>TABLEAU 5 : AMORCES UTILISES POUR REALISER LES EXPERIENCES PRESENTEES DANS LE CHAPITRE IV. .</b>	154
<b>TABLEAU 6 : HEATMAP DES <i>ATMAP3Ks</i> DANS LE POLLEN SEC, DU TUBE POLLINIQUE APRES 30 MINUTES DE CROISSANCE <i>IN VITRO</i> (PT 0,5H), DU TUBE POLLINIQUE APRES 4 HEURES DE CROISSANCE <i>IN VITRO</i> (PT 0,5H) ET DU TUBE POLLINIQUE EN CROISSANCE SEMI- <i>IN VITRO</i> (PT SIV).</b>	155
<b>TABLEAU 7 : DELETION DE 16 ACIDE NUCLEIQUE DANS LE GENE <i>ATMAP3K19</i>.</b>	156

# Liste des abréviations

**ABP**: Actin binding protein;

**APTG1**: Abnormal pollen tube Guidance 1;

***A. thaliana***: Arabidopsis thaliana;

**BCIP**: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate;

**BiFC**: Bimolecular fluorescence complementation;

**Ca<sup>2+</sup>**: Ion calcium;

**CaM**: Calmodulines;

**CBL**: Calcineurin B-like;

**CBP**: Protéines dépendante du calcium;

**CDK**: Cyclin-Dependent-kinase;

**CKI1**: Cytokinin independent 1;

**Cl<sup>-</sup>**: Ion chlore;

**CML**: CaM-Like;

**CNB**: Cyclic Nucleotide-Binding;

**CNGC**: Cyclic Nucleotide-Gated Channels;

**COBL10**: COBRA-Like10;

**CPK**: Protéines kinase dépendantes au calcium;

**CRP**: Cysteine-rich proteins;

**CRT3**: Calreticulin 3;

**DAZ**: Activated Zinc Finger 1;

**DIC**: Differential interference contrast;

**DIG**: Digoxigenin;

**DROP**: Defective region of pollen;

**DUO1**: DUO Pollen 1;

**FA**: Filament d'actine;

**FBL17**: F-box Like 17;

**FDA**: Fluorescein diacetate;

**FG**: Female gametophyte;

**FM**: Functional megaspore;

**GABA**: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique;

**GCS1/HAP2**: Cell-Specific/HAPLESS 2;



**GEF:** Guanine Nucleotide-exchange factors;

**gem1:** Germini pollen 1;

**GFP:** Green fluorescent protein;

**GPI:** Glycosylphosphatidylinositol;

**GRL:** Glutamate-Receptor-Like;

**HIK:** Hinkel;

**ICR1/RIP1:** INTERACTOR OF CONSTITUTIVELY ACTIVE ROP1/ ROP INTERACTIVE PARTNER1;

**K<sup>+</sup>:** Ion potassium;

**kD:** Kilodalton;

**KRP6:** Kip-Related protein;

**LIP:** Lost in pollen tube guidance;

**MAP3K, MAPKKK, MEKK:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase;

**MPK, MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase;

**MAP:** Microtubule-Associated proteins ;

**MDIS1:** Male discoverer 1;

**MDP:** Microtubule-Destabilizing protein;

**MEB:** Microscopes électroniques à balayage;

**MIK1/2:** MDIS1-INTERacting receptor like Kinases 1/2;

**MPK:** Mitogen-activated protein kinase;

**MKK, MEK, MAPKK:** Mitogen-activated protein kinase kinase;

**MMC:** Megaspore mother cell;

**MSL:** Mechanosensitive ion channels-like;

**MSP1:** MULTIPLE SPOROPHYTE;

**MT:** Microtubules;

**MW:** Molecular weight;

**NBT:** Nitro blue tetrazolium;

**NLS:** Nuclear localization signal;

**OX:** Overexpression;

**PI4P 5-kinases:** Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases;

**PMC:** Pollen mother cell;

**PMI:** Pollen mitosis I;

**PMII:** Pollen mitosis II;

**POD1:** Pollen defective in guidance;

**PRK:** Receptor-like kinase;

**PtdIns(4,5)P2:** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate;

**Rboh:** Respiratory burst oxydase;

**RE:** Reticulum endoplasmique;

**RLM-RACE:** RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends;

**RKD:** RWP-RK domain-containing;

**RIC:** ROP-Interactive CRIB motif Containing protein 3

**RNA:** Ribonucleic acid;

**RNAi:** RNA interference;

**ROP:** Rho GTPas of plant;

**ROS:** Reactive Oxygen Species;

**RT-PCR:** Reverse transcription polymerase chain reaction;

**ScFRK3:** *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 3;

**SEM:** Scanning electron microscopy;

**SYT2:** SYNAPTOTAGMIN 2;

***T. fournieri:*** *Torenia fournieri*;

**TES:** Tétraspore;

**TF:** Facteur de transcription;

**TIO:** Two-in-one;

**TP:** Tube pollinique;

**Y2H:** Yeast-two hybrid;

**WHS:** WUSCHEL;

**YPAD:** Yeast extract, peptone, adenine;

**YFP:** Yellow fluorescent protein.



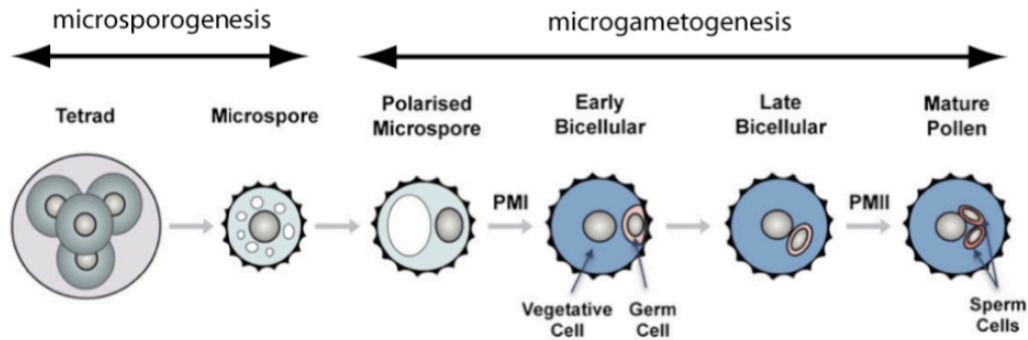
# 1 Introduction

---

## 1.1 La formation du pollen.

### 1.1.1 Description morphologique

Les grains de pollen tiennent leur origine de l'hypodermiale archésporiale qui est localisé aux quatre coins des anthères immatures [3]. Les cellules de l'archésporiale subissent une division péricleinale et donnent le primordium pariétale et une couche de primordium sporogène. Le primordium pariétal donne la couche du milieu et le tapetum. Ces deux tissus cellulaires sont indispensables pour la formation du pollen mature. Le tapetum joue le rôle de cellule nourricière et se désagrège à la fin de la formation du pollen pour permettre la libération de ce dernier. Le primordium sporogène, quant à lui, se développe en microsporocytes, aussi souvent appelées « les cellules mères du pollen ». Ces cellules subissent la méiose et forment ainsi quatre microspores haploïdes appelés tétrades. Chacune d'elles forme une paroi de callose très épaisse, ce qui conduira à leur séparation (**Figure 1**). Les microspores haploïdes se développent en microsporocytes et subissent une mitose asymétrique (PMI), car la division nucléaire est adjacente à la paroi cellulaire et l'orientation du fuseau mitotique est positionné de telle façon qu'une cellule est plus petite que l'autre. Cette division cellulaire permet de former un grain de pollen bicellulaire avec la cellule végétative, la plus grosse cellule, et la cellule générative, la plus petite cellule (**Figure 1**) [4]. Les deux cellules ont une destinée différente. La cellule végétative est à l'origine de la formation du futur tube pollinique [5]. La cellule générative subit une mitose appelée PMII, formant les deux cellules spermatiques (**Figure 1**) [6, 7]. Chez *A. thaliana*, le pollen subit une étape de déshydratation dans les anthères, ce qui conclura la formation du grain de pollen. La fin de la formation du pollen est corrélée à la dessiccation de l'anthère permettant sa libération. Chez *A. thaliana*, la pollinisation du stigmate se produira alors que la fleur n'est pas encore ouverte, favorisant ainsi son autofécondation. Par contre, *Solanum chacoense* est une plante qui est auto-incompatible, c'est-à-dire que le pollen va devoir être transporté jusqu'à une autre plante pour qu'il puisse féconder les fleurs.



**Figure 1: Développement du gamétophyte mâle.**

Représentation schématique des différents stades morphologiques du développement du gamétophyte mâle. Au cours de la microsporogénèse, les microspores subissent une division méiotique pour produire une tétrade de microspores haploïdes, libérées par la suite. Durant la microgamétogénèse, la microspore libérée subit une *mitose pollinique I* (PMI) pour produire un pollen bicellulaire avec une petite cellule générative (*germ cell*) incluse dans une grande cellule végétative (*vegetative cell*). Par la suite la cellule générative subit la *mitose pollinique II* (PMII) pour former deux gamètes mâles (*sperm cells*) identiques. Extrait de Borg *et al.* 2009 [8].

### 1.1.2 Signalisation cellulaire

Le développement du pollen est un modèle pour étudier les gènes impliqués lors de la méiose et les mitoses dans le règne végétal. La méiose est importante dans le cycle de la vie sexuelle des plantes. Elle permet la réduction du niveau de ploïdie des gamétophytes mâles et femelles nécessaires à la fécondation. Après la méiose, chaque microsporocyte formera quatre microspores haploïdes [9, 10]. À ce jour, le mécanisme qui gouverne l'entrée d'une cellule en méiose reste peu caractérisé dans le règne végétal. Chez le riz, la mutation du gène *MILI*, codant pour une CC-type-glutarédoxine, conduit à l'arrêt total de la différenciation méiotique mâle [11]. La perte de fonction d'autres gènes, chez des espèces telles que *A. thaliana* ou le maïs, conduit régulièrement au blocage des gamétophytes au niveau de la prophase I [12, 13].

Autant pour la mitose que pour la méiose, le cycle cellulaire est contrôlé par deux familles de protéines : les cyclines et les *Cyclin-Dependent-Kinase* (CDK). Dans le règne végétal, la méiose suit ce modèle général. Les cyclines vont cibler et activer spécifiquement les CDK. Ces complexes sont nécessaires pour l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire [14, 15]. Par exemple, le pic de concentration de la CDKA;1 active permet la progression en métaphase I et en métaphase II (**Figure 2**). La mutation de CDKA conduit à un retard de la phase S, la cellule germinale va se diviser plus tardivement et pour un grand nombre d'espaces, la PMII s'effectuera dans le tube pollinique [16-18]. Par contre, les cyclines conduisant à la

progression lors de la méiose ne sont pas encore caractérisées. On dénombre, dans le génome d'*A. thaliana*, 21 cyclines A et B, dont les fonctions et les caractéristiques cytologiques restent à ce jour méconnues [19]. La méiose est une étape clef de la vie des plantes, car elle permet la formation des tétardes de microspores haploïdes. Peu de gènes spécifiques à la méiose des aux gamétophytes mâles et femelles ont été caractérisés [20].

La première division mitotique (PMI) est asymétrique, c'est-à-dire que les cellules filles sont différentes par leur taille et leur destinée cellulaire. Ainsi les microspores se divisent en une grosse cellule fille appelée cellule végétative qui donnera le grain de pollen et une petite cellule fille appelée cellule germinale qui donnera les deux cellules spermatiques (**Figure 1**). Ce type de division permet au pollen de former deux lignes cellulaires distinctes [9]. Lorsque les microspores de tabac sont cultivées en présence de colchicine, les cellules se divisent symétriquement ou ne se divisent pas. Dans les deux cas, les cellules prennent l'identité de cellule végétative [21, 22]. Cette expérience montre l'importance de la division asymétrique pour la prise d'identité des cellules germinales. Chez *A. thaliana*, des marqueurs de la cellule végétative doivent être présents pour que les cellules puissent prendre cette identité. L'absence de division asymétrique n'est pas suffisante pour qu'elle devienne une cellule végétative. Cela inclut les gènes impliqués dans la polarité des microspores et la cytokinèse du pollen comme *GEMINI POLLEN 1 (GEM1)* [23] et la combinaison des régulateurs du cycle cellulaire CDKA;1, FBL17, E2F [12, 24] ou les facteurs de transcription tels que MYB81, DEFECTIVE REGION OF POLLEN 1 (DROP1) et DROP2 (**Figure 2**) [25-27].

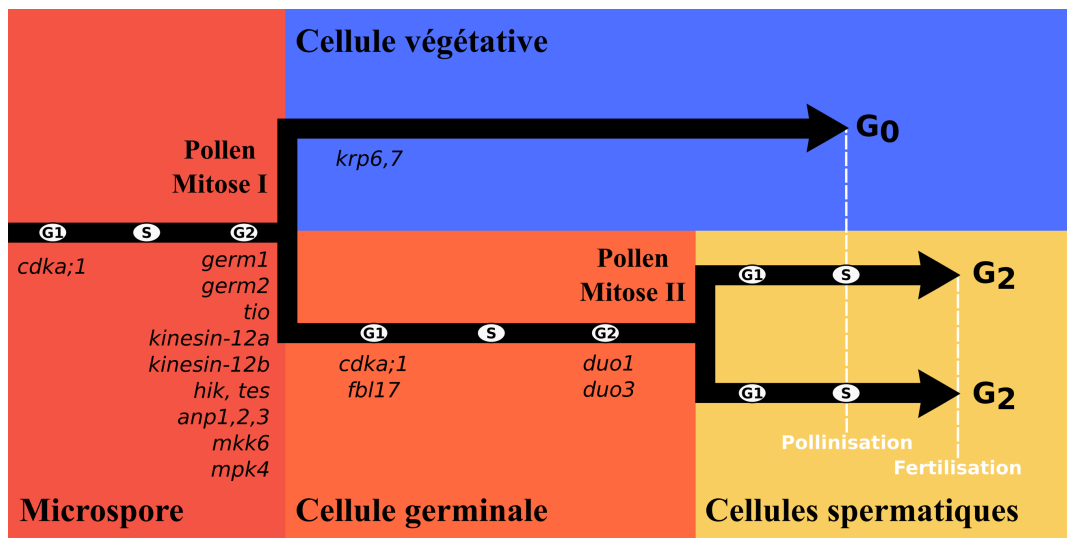
La division asymétrique des microspores nécessite (1) la polarisation cellulaire, impliquant la migration nucléaire vers le pôle de la cellule germinale, (2) la division nucléaire orientée selon un axe prédéfini et [28] la cytokinèse guidée dans l'espace pour isoler les deux lignées distinctes de cellules filles [9]. Ces étapes ont besoin de réguler précisément les microtubules. L'approche génétique a permis de mettre en évidence un grand nombre de gènes impliqués dans le fuseau mitotique. Les gènes *GEM1* et *GEM2* codent pour des protéines de la famille des *Microtubule-Associated Protein* [1]. La mutation de *GEM1* ou *GEM2* entraîne une perte de la division asymétrique conduisant à la formation de pollen bi-cellulaire puis à la mort de la cellule germinale (**Figure 2**) [23, 29, 30]. Les études faites, chez *A. thaliana* et le tabac, ont démontré un phénotype analogue provenant d'un problème de migration du noyau lors de PMI. Plus récemment, l'analyse cytologique d'un mutant nommé *GEM3*, dû à la similarité de phénotype avec les deux précédents gènes, perturbe aussi la PMI [31]. Cette mutation touche le gène *AUGMIN subunit 6 (AUG6)* qui code pour une sous-unité du complexe augmin ayant

pour fonction de relier les microtubules au centrosome de la cellule. Cette étude démontre une fois de plus l'importance de l'organisation des microtubules lors de la division asymétrique PMI [31].

Chez le tabac, la mutation du gène *TWO-IN-ONE* (*TIO*) est totalement différente des précédentes mutations. La perte de fonction du gène *TIO* ne modifie pas la migration et l'orientation des noyaux lors de la division asymétrique. Par contre, en raison d'une plaque cellulaire incomplète pendant la cytokinèse, cette mutation produit des grains de pollens binucléés (**Figure 2**) [32]. Ce gène *TIO* code pour une protéine kinase Ser/Thr FUSED. Cette protéine est localisée à la ligne médiane du phragmoplaste naissant et elle va interagir avec deux kinésines ayant une redondance fonctionnelle, PAKRP1/Kinesin-12A et PAKRP1L/Kinesin-12B [33, 34]. Ces kinésines sont aussi localisées au niveau de la ligne médiane du phragmoplaste et vont participer à l'organisation des microtubules. Des tests d'interaction avec la méthode de doubles hybrides ont montré que *TIO* interagit également avec TÉTRASPORE (*TES*), une autre kinésine jouant un rôle dans la cytokinèse végétale [34]. *TES* et HINKEL (*HIK*) sont deux protéines de type kinésine redondantes, importantes pour l'expansion du phragmoplaste lors de la PMI. La cytokinèse de la PMI restera incomplète si ces deux gènes sont mutés, soit le même phénotype observé chez le mutant *tio* [35]. *TES* et *HIK* sont les orthologues de *AtNACK1* et *AtNACK2*, des kinésines bien connues dans la voie de la cytokinèse chez *A. thaliana* [36]. Les différentes études montrent que la protéine *TIO* active la cascade NACK-PQR qui est une cascade de signalisation MAPK (voire la partie 1.5.1). Une fois la kinésine *NtNACK1* activée par *TIO*, celle-ci va phosphoryler la MAP3K *NtNPK1* (*AtANP1*, 2, 3). La *NtNPK1* activée va phosphoryler la MKK *NtNQK* (*AtMKK6*), et enfin, cette MKK activera le MPK *NtNRK1/NTF6* (*AtMPK4*). La *NtNTF6* activée favorisera l'expansion du phragmoplaste en phosphorylant la *Microtubule Associated Protein 65* (*MAP65*) et d'autres protéines associées aux microtubules [36-38]. L'ensemble de cette cascade MAPK est directement impliquée dans la fertilité du pollen.

La première division mitotique permet la formation de la cellule végétative et la cellule germinale. Seule la cellule germinale va subir une deuxième division, cela indique que des facteurs sont exprimés spécifiquement dans la cellule germinale pour induire une deuxième division. La PMII est bien différente de la PMI, car elle se fait symétriquement [9]. Pour expliquer la spécificité de la PMII dans la cellule germinale, la protéine kinase CDKA;1 joue là aussi un rôle important. Le gène F-box-Like 17 (*FBL17*) qui est seulement exprimé dans la cellule germinale a pour fonction d'inhiber la Kip-Related protein 6 (*KRP6*) et la *KRP7* qui sont deux inhibiteurs des CDK [39, 40]. Cela permet l'accumulation de CDKA;1 et donc la

progression en PMII de la cellule germinale. Ainsi la mutation de *FBL17* entraîne l'inhibition de la *CDKA;1* empêchant la deuxième division (**Figure 2**) [40].



**Figure 2:** Schéma illustrant les lignées cellulaires et la progression du cycle cellulaire dans le développement des gamétophytes mâles dans le contexte des mutations gamétophytiques qui affectent la division asymétrique, la progression du cycle cellulaire et la structuration. D'après Twell *et al.*, 2011 [9].

La protéine DUO POLLEN 1 (*DUO1*) est un facteur de transcription MYB contrôlant le développement des gamétophytes mâles [41]. Ce gène a été conservé durant l'évolution, car il est nécessaire pour la spécialisation des lignées spermatisques chez les ancêtres communs du règne végétal. Chez *A. thaliana*, la mutation *DUO1* conduit à une baisse d'expression de la *CYCLYNB1;1* aboutissant à l'échec de la PMII pendant la phase G2/M (**Figure 2**) [42]. Le facteur de transcription *DUO1* et deux autres facteurs de transcription ACTIVATED ZINC FINGER1 (*DAZ1*) et *DAZ2* régulent l'expression des variantes histones H3.10 spécifiques aux cellules spermatisques et des facteurs fusogéniques *CELL-SPECIFIC 1/HAPLESS 2* (*GCS1/HAP2*) [25, 43]. Le facteur de transcription *DUO3* contrôle l'expression de certains gènes qui sont aussi régulés par *DUO1*. La protéine *DUO3* est nécessaire pour la phase G2/M du cycle cellulaire de la PMII [44].

La description des gènes qui régulent la formation du grain de pollen mature montre la complexité de la signalisation pour obtenir un pollen avec trois cellules spécialisées. Il reste un grand nombre de gènes à découvrir pour comprendre l'ensemble des mécanismes sous-jacents, mais sa simplicité et sa facilité d'accès rendent les recherches plus aisées que celles du sac embryonnaire.



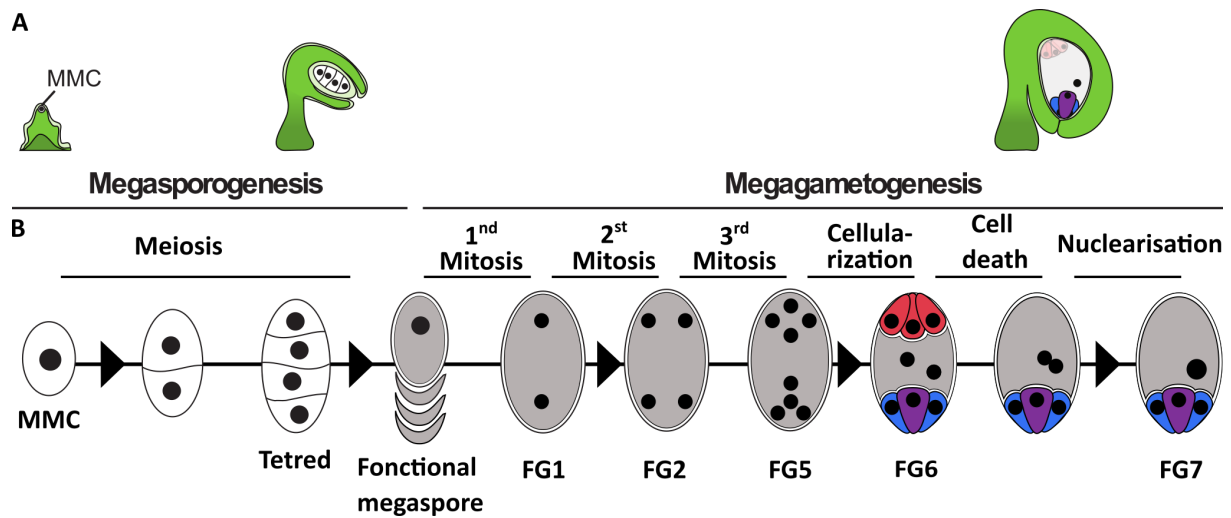
## 1.2 Développement de l'ovule

Le développement de l'ovule comme pour le pollen, est complexe et nécessite deux étapes : la première, la méiose, est appelée mégasporogénèse et la seconde étape qui est une succession de trois mitoses est appelée la mégagametogénèse.

### 1.2.1 Description morphologique

Le développement du sac embryonnaire est initié lorsque dans le gynécée sporophyte, une seule cellule sous-épidermique se différencie en cellule mère mégaspore (MMC). Lors de la différenciation, la MMC s'élargit, s'allonge et sa taille nucléaire double. La MMC entre en méiose et forme ainsi quatre mégaspores haploïdes (**Figure 3**) [45]. La fin de la méiose est marquée par l'accumulation de callose au niveau des parois cellulaires. Trois des mégaspores dégénèrent, généralement celles les plus proches du micropyle, laissant une mégaspore fonctionnelle (FM) qui donnera naissance au sac embryonnaire (stade FG1) [46-48].

Par la suite, l'ovule entre dans la phase de mégagametogénèse. La FM va subir trois mitoses successives sans cellularisation afin d'obtenir un syncytium contenant huit noyaux (**Figure 3** et **Figure 7**, panneau de droite). La première division mitotique se fait dans l'axe micropylaire-chalazal afin de positionner les deux noyaux aux deux extrémités du sac embryonnaire. Ces deux noyaux vont être physiquement séparés par une grosse vacuole. Ces noyaux vont subir deux mitoses successives pour former quatre noyaux à chaque pôle (stade FG2) [45]. La position des noyaux lors des divisions est cruciale pour la cellularisation qui cloisonne le gaméophyte femelle en sept cellules. De plus, leurs positions selon l'axe micropylaire-chalazal déterminent leurs futures identités cellulaires. Une fois que les huit noyaux sont formés au stade FG5, les noyaux les plus centraux de chaque pôle vont migrer au centre du sac embryonnaire puis fusionner pour donner la cellule centrale diploïde. Les trois cellules restantes au pôle chalazal se cellularisent et forment les cellules antipodales qui vont généralement dégénérer. Deux des trois noyaux du pôle micropylaire se cellularisent et forment les synergides (**Figure 3** et **Figure 7**, panneau de droite). Ces deux cellules sont essentielles pour la fécondation, car elle sécrète un grand nombre de protéines pour guider le tube pollinique à travers le tissu femelle. Le noyau le plus central du côté micropylaire se cellularise pour former la cellule œuf qui une fois fécondée donnera le zygote [46-49].



**Figure 3: Le développement des ovules et des sacs embryonnaires chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum chacoense*.**

A. L'initiation du tégument se produit en même temps que la mégasporogénèse. B. Une cellule mère mégaspore (MMC) subit deux méioses successives pour former une tétrade, dont trois cellules dégénèrent. La mégaspore va devenir la mégaspore fonctionnelle (FM). Cette cellule va subir trois mitoses successives puis du repositionnement des noyaux, suivie de la cellularisation puis de la différenciation des cellules. Le sac embryonnaire mature comporte deux synergides (en bleu), une cellule ovulaire (en mauve) et une cellule centrale. FG1-7, femelle gamétophyte stade 1-7. D'après Chevalier *et al.*, 2013[45].

### 1.2.2 Signalisation cellulaire

La formation du sac embryonnaire nécessite un grand nombre de gènes contrôlant la division cellulaire, la migration des noyaux, la prise d'identité cellulaire et surtout une synchronisation entre ces différentes modifications cellulaires.

La différenciation d'une cellule en MMC est l'évènement initial du développement de l'ovule. Les marqueurs de cette différenciation restent à caractériser. Cependant, une importante voie de signalisation a été identifiée dont WUSCHEL [50]. Cette protéine est requise pour le maintien des cellules souches des méristèmes floraux [51, 52]. La diminution de l'expression de ce gène empêche la différenciation d'une cellule du primordium ovulaire en MMC [53]. À l'inverse, certains gènes peuvent induire une multiplication des cellules MMC dans un primordium ovulaire. Chez le riz, le gène *MULTIPLE SPOROPHYTE (MSP1)* est exprimé dans le noyau des cellules autour de la MMC et code un récepteur kinase *leucine-rich repeat* qui a pour ligand le gène *TAPETUM DETERMINANTI* [54-56]. La suppression du gène *MSP1* du riz, ou la perte de fonction de son orthologue chez le maïs, conduisent à la formation

de primordium ovulaires avec un grand nombre de MMC et des problèmes lors de la méiose conduisant à la stérilité [54, 57].

Une fois que la MMC est formée, elle va rentrer en méiose. Beaucoup des gènes impliqués dans la méiose du pollen participent aussi à la méiose de la MMC (**Figure 3**). Par exemple, la CDKA;1 est nécessaire pour la progression de la MMC en phase G1/S de la méiose [58]. Comme pour le gamétophyte mâle, les gènes *KIP-RELATED PROTEIN 4 (KRP4)*, *KRP6* et *KRP7* ainsi que des inhibiteurs des CDK jouent un rôle important pour la progression lors de la méiose et la différenciation des cellules du sac embryonnaire [59]. Contrairement au pollen, peu de gènes spécifiques à l'ovule ont été découverts. Pour autant, les dernières études mettent en évidence l'importance de l'état de la chromatine dans la spécificité de la méiose du gamétophyte femelle [60]. La méiose de la MMC permet la formation de quatre cellules haploïdes, les mégaspoires. Trois d'entre elles dégèrent par la voie de la mort cellulaire programmée, tandis qu'une survit et donne naissance à la FM [60]. Les protéines KRP sont nécessaires pour la sélection de la FM. Chez *A. thaliana*, le septuple mutant *KRP* empêche la dégénérescence des mégaspoires [61].

La mégagaméto-génèse est initiée lorsque la FM subit les trois cycles de divisions nucléaires. Ce processus inclut une fine régulation des divisions mitotiques, le positionnement des noyaux selon l'axe polaire, mais aussi l'acquisition des différentes identités cellulaires pour assurer la fertilité du gamétophyte femelle [62]. Les régulateurs du cycle cellulaire tels que CDKA;1 et les KRPs jouent là encore un rôle important dans la transition de la phase G1/S [24, 63]. Lors de la formation du pollen, la protéine F-BOX-LIKE17 (FBL17) est impliquée dans la PMII de la cellule germinale. Lors du développement du sac embryonnaire, la mutation de FBL17 et CDKA;1 conduit à l'arrêt du développement de l'ovule à la phase FG1 ou FG2 puis sa dégénération (**Figure 3**) [24, 58].

L'établissement de l'identité cellulaire dépend de l'axe polaire. L'histidine kinase CYTOKININ INDEPENDENT1 (CKI1) va permettre d'établir l'identité des synergides et de la cellule œuf. Cette protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique périmoléculaire des noyaux au pôle chalazal au stade FG2 [64]. L'expression ectopique de *CKI1* dans la cellule centrale est suffisante pour lui donner l'identité de synergide ou de cellule œuf [65]. D'autres types de protéines sont nécessaires pour la différenciation de la cellule œuf comme les facteurs de transcription *RWP-RK domain-containing (RKDs)* [66, 67]. Dans le génome d'*A. thaliana*, cinq gènes codent pour la famille des RKD et ils sont tous exprimés lors du développement de l'ovule. La combinaison à différentes mutations suggère leur implication dans la mégagaméto-génèse. La surexpression ectopique de *AtRKD1* et *AtRKD2* cause une prolifération

des tissus. De plus, cette surexpression est suffisante pour conférer à une cellule le même profil d'expression que la cellule œuf [50, 68]. Chez *Marchantia polymorpha*, où n'est présente qu'une seule copie du gène *MpRKD*, la mutation nulle de ce gène affecte la différenciation de l'œuf et des cellules spermatiques [66].

La présentation des voies de signalisation connues à ce jour, a pour but de mettre en évidence l'importance de l'expression des gènes, de la localisation des facteurs de transcription, du cytosquelette, des facteurs du cycle cellulaire, des récepteurs, etc. Ceci démontre le rôle crucial des cascades de signalisation dans la régulation et dans la coordination des différents facteurs impliqués dans la formation des gamètes mâles et femelles.

### 1.3 Pollinisation

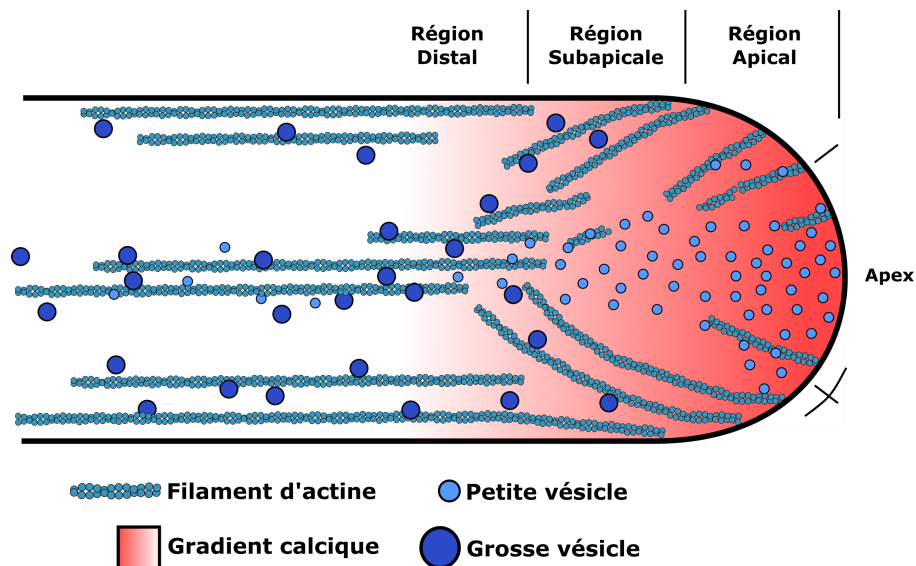
#### 1.3.1 Hydratation et germination

Chez les Brassicaceae, le stigmate est sec, c'est-à-dire que la présence d'un grain de pollen sur le stigmate, conduit à la sécrétion localisée et spécifique de vésicules lui permettant de se réhydrater [69]. Cette étape de reconnaissance entre le manteau d'exine du grain de pollen et le stigmate fait partie d'une des barrières sélectives du pollen [70, 71]. Une fois que le pollen est reconnu par le stigmate, une signalisation intracellulaire dans les cellules de la surface du stigmate permet la fusion et la sécrétion d'un grand nombre de vésicules contenant un grand nombre d'éléments permettant la réhydratation des grains de pollen. Des pompes calciques sont apportées par ces vésicules parce qu'un important efflux de calcium des papilles stigmatiques vers le pollen est nécessaire pour l'hydratation de ce dernier [72]. Chez les espèces comme *Solanum chacoense*, le stigmate est dit humide [45]. Contrairement, au stigmate sec, l'ensemble des pollens présents sur le stigmate vont s'hydrater et germer. Pour ces espèces, cette étape n'est pas sélective. La sélection des gamètes mâles s'effectuera plus tardivement. Après l'hydratation, le pollen germe et forme le TP (**Figure 7**) [45].

#### 1.3.2 Croissance du tube pollinique

Le TP doit traverser le stigmate puis le style par le tissu de transmission pour tracter les deux cellules spermatiques jusqu'à l'ovule (**Figure 7**). Ces différents tissus sont indispensables pour la croissance et le guidage du TP (le guidage du TP sera décrit dans la partie 1.4). Le transport des cellules spermatiques dans les papilles stigmatiques est effectué

par la croissance polarisée du TP. Cette croissance est rapide. Par exemple, le TP de maïs croît de  $1,66 \mu\text{m}$  par heure alors que le TP d'*A. thaliana* a une vitesse maximale de  $0,2 \mu\text{m}$  par heure [73, 74]. Cette élongation rapide du TP repose sur un grand nombre de mécanismes cellulaires. L'influx ionique à l'apex du TP est le premier à avoir été démontré. Un grand nombre de canaux calciques se localisent spécifiquement dans la région apicale, conduisant à la formation d'un gradient calcique (**Figure 4** et **Figure 5**) [75]. L'augmentation intracellulaire de la concentration calcique joue le rôle de second messenger et régule le dynamisme et l'organisation du cytosquelette [76]. Le cytosquelette contrôle le trafic vésiculaire et le mouvement des organites ainsi que le transport des cellules spermatiques (**Figure 4**) [77, 78]. Les études successives ont permis de mettre en évidence trois processus cellulaires essentiels pour le développement des TP. Le premier est le flux ionique et les protéines qui lui sont dépendantes. Le deuxième est le cytosquelette et le troisième est le trafic vésiculaire.



**Figure 4 : Schéma d'organisation du gradient calcium, des filaments d'actine (FA) et du trafic vésiculaire pendant la croissance du tube pollinique.**

Le calcium forme un gradient dans le tube pollinique avec une forte concentration dans la région apicale. Les filaments d'actine (FA) se décomposent en trois régions. La région apicale (RA) contient des FA très courts, très dynamiques et très nombreux. Dans la région subapicale (RS), les FA sont plus longs, mais sont moins nombreux et moins dynamiques ce qui permet la formation de la frange d'actine (*actin fringe*). Dans la région distale (RD), les FA sont très longs, mais peu nombreux et peu dynamiques. Le trafic vésiculaire est dépendant des FA. Les longs FA, dans la RD, vont permettre de tracter les grosses vésicules. La frange d'actine va retenir les grosses vésicules et laisser passer les petites vésicules jusqu'à la RA. Les petites vésicules vont fusionner avec la membrane plasmique dans l'apex dû à la forte concentration de calcium. Fait part Mazin B.

### 1.3.2.1 Flux ioniques

Brewbaker et Kwack (1963) ont mis en évidence l'importance de l'influx de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire pendant la germination et l'élongation du TP [79]. La méthode *Yellow Cameleon* apparue en 1990, permettant une localisation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, a démontré un gradient calcique avec une forte concentration de calcium à l'apex du TP [80-84]. Ce gradient se met en place dès le début de la germination, ce qui permet la polarisation du TP (**Figure 5**). La constitution du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire nécessite une localisation des canaux calciques dans la région apicale (**Figure 4** et **Figure 5**). Trois types de canaux sont exprimés dans le TP : les *Cyclic Nucleotide-Gated Channels* (CNGC), les *Mechanosensitive ion channels-like* (MSL) et les *Glutamate-Receptor-Like* (GRL) [85-87]. Les CNGC sont les mieux caractérisés tant sur le plan fonctionnel que celui de leurs rôles biologiques. Ces canaux sont des hétérotétramères et chaque unité est structurée par six domaines transmembranaires (S1-S6) comprenant un pore (P-loop) entre le S5 et le S6. En C-terminal, il y a la présence d'un domaine *Cyclic Nucleotide-Binding* (CNB) puis d'un domaine *Calmodulin-binding*. Ces deux domaines dans la partie intracellulaire vont permettre la régulation du canal [88, 89]. Les canaux CNGC7, CNGC8 et CNGC18 sont impliqués dans le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le TP. Leurs localisations cellulaires montrent une haute spécificité pour la région apicale [90]. D'autres types de canaux calciques, tels que le AtMSL8 ou encore AtGLR1.2 et AtGLR3.7, sont cruciaux pour la mise en place et le maintien de la forte concentration de calcium dans la région apicale (**Figure 4** et **Figure 5**) [91-93].

Le fort influx calcique localisé dans la région apicale va permettre l'activation des protéines dépendantes du calcium (CBP) spécifiquement dans cette région. Les données transcriptomiques du TP d'*A. thaliana* montrent que quatre familles codant pour des CBPs sont fortement exprimées. On compte 3 isoformes de calmodulines (CaM), 18 protéines CaM-like (CML), 17 protéines kinase dépendantes au calcium (CPK) et 4 protéines *calcineurin B-like* (CBL) [86]. Les CBP montrent une forte activité (**Figure 5**), là où la concentration calcique est la plus élevée. La diminution de l'expression des CBP, comme la ZmCPK32 chez le maïs ou encore la AtCBL2 et la AtCBL3 chez *A. thaliana*, conduisent à la diminution de la vitesse de croissance et une perte de la polarisation du TP [94, 95]. Le mutant *CML25* présente des problèmes de germination ainsi qu'une croissance plus lente. Il semble que la protéine CML25 soit un régulateur de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  [78].

D'autres flux ioniques tels que  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  sont cruciaux pour la signalisation intracellulaire et la pression de turgescence [96-98]. Pour autant, les études semblent montrer

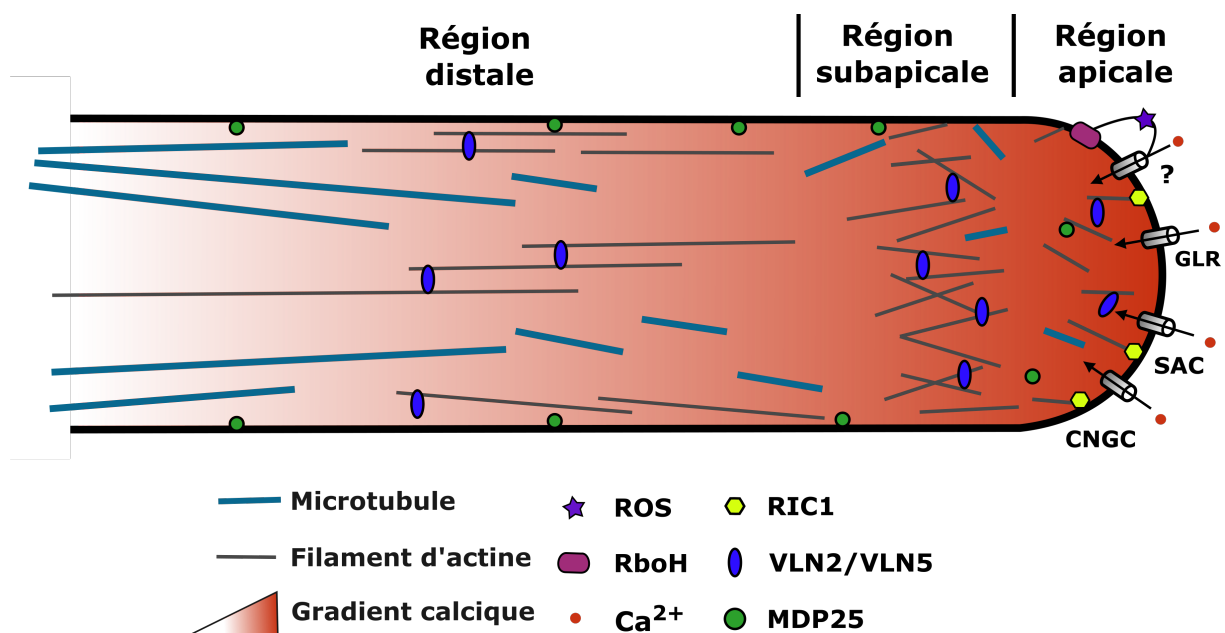
que l'influx et l'efflux de ces ions sont dépendants de ceux du calcium. L'ensemble de ces données montrent l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  pour la germination du pollen, la polarisation et la croissance.

### 1.3.2.2 Cytosquelette

Depuis les années 1970, l'implication du cytosquelette dans la croissance du TP a clairement été démontrée. Les études sur le TP ont mis en évidence l'importance des filaments d'actine (FA) pour la croissance et le guidage [99-102]. Quant aux microtubules (MT), ils ne semblent pas essentiels [76].

Le TP est un système cellulaire très important pour comprendre l'implication des FA dans la polarisation des cellules en croissance. La première chose à noter est la formation de trois zones distinctes qui présentent une organisation différente des FA le long du TP (**Figure 4** et **Figure 5**) [103, 104]. Dans la région distale du TP, les FA sont arrangés de façon parallèle et uniforme à la paroi du TP. Cette organisation va permettre le transport des organites ou des grosses vésicules de la base vers l'apex du TP [105]. Dans la région subapicale, les FA ne sont pas parfaitement organisés. Ils forment un filet appelé frange d'actine, ce qui empêche les organites et les grosses vésicules de passer [103, 106-108]. Enfin, dans la région apicale, les FA sont beaucoup moins abondants, mais beaucoup plus dynamiques. Cette activité importante dans l'apex du TP a été observée dans les tubes polliniques chez le tabac, le lys et *A. thaliana* (**Figure 4** et **Figure 5**) [109-111].

Cette organisation des FA est dépendante du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$ . De nombreuses protéines liant l'actine (*actin-binding proteins*, ABP) font le lien entre la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et l'organisation des FA [112, 113]. Par exemple, plusieurs membres de la superfamille des villine-gélosine-fragmine régulent le dynamisme et l'organisation de l'actine dans le TP [114]. Chez *A. thaliana*, le double mutant *VLN2/VLN5* présente une diminution de la quantité de filaments ainsi qu'une augmentation du temps de vie des FA dans le TP, ce qui suggère que les villines VLN2 et VLN5 aident à la dépolymérisation en présence d'une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 5**) [114, 115]. D'autres protéines telles que RIC1, un membre de la famille des *ROP-interactive CRIB motif containing*, régulent la croissance du TP [116, 117]. RIC1 est principalement localisée à la membrane plasmique dans la région apicale du TP (**Figure 5**). Le mutant *RIC1* entraîne la diminution de la stabilité des FA dans la région apicale, démontrant ainsi l'implication de cette protéine dans le processus de régulation des FA. Il a aussi été démontré que RIC1 fait le lien entre les extrémités des FA et la membrane plasmique [117].



**Figure 5: Distribution et régulation des éléments du cytosquelette et des canaux calciques dans le TP.**

Plusieurs protéines sont impliquées dans l'organisation des FA ou du gradient calcique, telles que les VLN2, VLN5, RIC1 et MDP25. Ils sont impliqués dans la régulation de la construction et de la dynamique des FA dans les différentes régions. De longs et épais faisceaux de MT orientés axialement existent dans la tige distale du TP et sont relativement plus stables. Les canaux calciques sont localisés spécifiquement à l'apex du tube pour maintenir le gradient calcique. L'influx de Ca<sup>2+</sup> semble être régulé par la formation de ROS, qui sont produits par Rboh. Fait part Mazin B.

Chez beaucoup d'espèces, les microtubules (MT) ne sont pas considérés comme essentiels à la croissance du TP. En effet, des études pharmacologiques ont démontré que la dépolymérisation de l'ensemble des microtubules ne conduit pas à un arrêt de la croissance du TP [102]. Cependant, chez le tabac, les MT sont impliqués dans le mouvement du noyau végétatif et des cellules spermatiques, mais aussi dans l'endocytose et l'exocytose [77]. Les MT corticaux s'organisent en deux groupes distincts (**Figure 5**). Le premier, présent dans la région distale, s'organise sous la forme d'épais faisceaux. Le deuxième groupe se compose de petits fragments de MT dans la partie subapicale et apicale du TP [76]. Ce groupe est beaucoup plus dynamique que le premier. À ce jour, les acteurs moléculaires permettant la polymérisation et la dépolymérisation des MT dans le TP n'ont pas été caractérisés. Plusieurs protéines associées aux microtubules (*microtubule-associated proteins*, MAP) sont certes exprimées dans le TP, mais il a été montré que les protéines MAP18 et MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEIN 25 (MDP25) affectent seulement le dynamisme des FA [118-120]. Les régulateurs des microtubules ainsi que le lien entre les MAP/MDP et leur effet sur le FA restent à découvrir.



### 1.3.2.3 Trafic vésiculaire

Le gradient calcique et le cytosquelette organisent spatialement et temporellement le trafic vésiculaire dans le TP. Le maintien d'une croissance polarisée requiert la localisation spécifique de l'exocytose à l'extrémité du TP [121, 122]. Ces vésicules contiennent les composants de la membrane plasmique, des parois cellulaires, des canaux ioniques, des récepteurs pour la communication cellule-cellule et un grand nombre d'enzymes pour la modification membranaire [121, 123, 124].

Un lien très fort existe entre la distribution des FA et le trafic vésiculaire. Les longs FA très stables dans la partie distale vont permettre aux cellules germinales, au noyau végétatif, aux réticulum endoplasmiques ainsi qu'aux mitochondries d'être tractés par les myosines durant la croissance du TP. Cependant, les grosses vésicules ne pourront pas traverser la partie subapicale principalement due à leurs tailles. La frange d'actine composée de petits et de très nombreux FA forme un filet naturel qui va retenir la progression des grosses structures dans la région distale du TP (**Figure 4**). Dû à la forte concentration de  $Ca^{2+}$  dans cette région, les myosines se détachent des FA. Ainsi, seules les vésicules de petite taille peuvent traverser la région subapicale pour se rendre à l'apex et ainsi fusionner avec la membrane plasmique. Les études génétiques ont montré que plusieurs mutations des *Actin Binding Protein* (ABP) perturbent le trafic vésiculaire et les mouvements des gros organites (**Figure 4**) [77, 125, 126]. De plus, les différentes concentrations de  $Ca^{2+}$  favorisent les différentes étapes de l'exocytose [127-129]. En 2015, Wang *et al.* ont identifié une calmoduline, SYNAPTOTAGMIN 2 (SYT2), impliquée dans la formation des vésicules [130].

D'autres études ont montré un lien entre l'exocytose à l'apex et la voie de signalisation dépendante des ROP1 (*Rho GTPase of Plant*). La localisation à la membrane plasmique de l'apex de ROP1-active va permettre la fusion de vésicules spécifiquement à cet endroit. Pour autant, nous ne savons pas par quel mécanisme le  $Ca^{2+}$  régule le verrouillage des vésicules et leur fusion à la membrane plasmique. L'exocytose est aussi associée à la signalisation moléculaire permettant le guidage du TP (voir partie 1.4.3 ) [131, 132].

Le TP a besoin de contrebalancer l'exocytose avec l'endocytose, car un excès de membrane plasmique conduirait à une diminution de la pression de turgescence, et donc une diminution de la vitesse d'élongation. Pour autant, très peu de facteurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans l'endocytose. Ces deux flux vésiculaires permettent l'apport de nouveaux

composants pour la membrane plasmique et la communication, sans pour autant diminuer la pression de turgescence nécessaire à la croissance du TP [133].

Nous avons pu montrer dans cette partie un lien étroit entre l'influx de calcium, le cytosquelette et le trafic vésiculaire. Ces trois mécanismes biocellulaires sont interdépendants.

## **1.4 Interaction pollen-ovule et fécondation**

La pénétration du TP dans les tissus femelles se fait en dégradant le tissu femelle et en sécrétant des enzymes telles que des polygalacturonases ou des extensines. Une fois qu'ils ont atteint l'ovaire, chaque TP est guidé individuellement par un seul sporophyte afin de faire sortir le TP du tissu de transmission et de l'amener sur un septum puis sur un funicule (**Figure 7**). L'étude de la croissance du TP est essentielle pour comprendre la reproduction. Un autre aspect intéressant est la capacité du TP à recevoir les signaux femelles pour être conduit du stigmate jusqu'au micropyle. Différents types de guidage ont été décrits. Le guidage dans le style et le tissu de transmission va permettre d'orienter le TP du dessus du stigmate jusqu'à un funicule. Le guidage funiculaire puis le guidage micropylaire vont permettre la sortie du TP du tissu de transmission pour aller jusqu'à l'ovule (**Figure 7**).

### **1.4.1 Guidage par le style et le tissu de transmission**

Le guidage commence à partir du moment où le grain de pollen sec s'hydrate. L'influx d'eau en provenance de l'exsudat du stigmate va polariser le grain de pollen pour permettre une germination du TP qui est déjà orientée. Il a été trouvé dans la matrice extracellulaire du stigma du lys une petite protéine, la chémocyanine, et chez *A. thaliana*, la plantacyanine, une protéine similaire à 86,8% [134, 135]. Ces petites protéines d'environ 10 kDa sont des acteurs d'attraction stylaire. Les expériences de surexpression chez *A. thaliana* dans les tissus femelles entraînent des défauts de pénétration de TP sauvage dans les cellules papillaires [136].

Dans le tissu de transmission, différents types de guidage peuvent être mis en place, et cela, en fonction des espaces. Le guidage est dit « passif » comme chez le lys, *Torenia fournieri* ou encore *S. chacoense*, car la structure creuse de leurs styles suffit pour exercer sur les TP une direction unique [137, 138]. Chez *A. thaliana*, le guidage fait intervenir des acteurs moléculaires agissant sur le TP pour guider et favoriser sa croissance [139]. Ainsi, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) forme un gradient croissant du stigmate aux ovules, aidant le guidage des TP [140].

Le pic de concentration maximale est atteint au niveau du tégument interne des ovules. Pour autant, l'implication de GABA dans le guidage du TP n'est pas encore bien comprise.

## **1.4.2 Guidage ovulaire**

### **1.4.2.1 Guidage longue distance**

L'ovule sécrète des molécules chimioattractantes pour permettre aux TP de s'extraire du tissu de transmission et les conduire vers un funicule. Chez *A. thaliana*, 40% des TP ont tendance à émerger du tissu de transmission au niveau du premier ovule. Chez les mutants *sin1*, dont les ovules sont dépourvus de sacs embryonnaires, les TP ne sortent plus de façon préférentielle au niveau des premiers ovules [141]. Aucun acteur moléculaire n'a été identifié, mais des résultats non publiés dans le laboratoire du professeur Tetsuya Higashiyama à l'Université de Nagoya (Japon) ont suggéré une protéine sécrétée par l'ovule qu'ils ont nommé CALL1, qui serait impliquée dans l'attraction des TP dans le tissu de transmission chez *T. fournieri*. Le guidage longue distance va emporter le TP du tissu de transmission au bord du funicule (Higashiyama et al., *unpublished results*).

### **1.4.2.2 Guidage funiculaire**

Le guidage funiculaire permet de guider le TP du tissu de transmission jusqu'à 200  $\mu\text{m}$  du micropyle. Les tests faits *in vitro* ont montré que les ovules avec le funicule ont une capacité d'attraction de 53% alors que les ovules sans funicule ont une capacité de 35%. Cette expérience simple montre que le funicule n'est pas entièrement nécessaire pour le guidage, mais augmente la capacité d'attraction des TP. Son rôle reste à caractériser, mais il pourrait être un support physique pour le TP, et participer à la génération et au maintien du gradient des chimioattractants. Pour autant, aucune protéine sécrétée par l'ovule n'a été caractérisée [142].

### **1.4.2.3 Guidage micropylaire**

Le guidage micropylaire conduit le TP du funicule jusqu'à l'oosphère en passant par le micropyle pour permettre la double fécondation. Il est généralement admis que le guidage micropylaire commence à  $\sim 200 \mu\text{m}$  des synergides. Un grand nombre de protéines sécrétées par les synergides permettent de guider le tube pollinique [143, 144]. Certaines de ces protéines sont des petites protéines riches en cystéine (*cysteine-rich proteins*, CRP) appartenant à la

famille des défensines qui sont aussi appelées LURE1 [145-147]. Ces peptides se caractérisent par un motif de cystéines spécifiques qui leur donnent une structure tridimensionnelle essentielle pour le contact avec un ou des récepteurs exprimés sur le TP. Chez *A. thaliana*, cette famille comporte 6 gènes, dont quatre codent pour des protéines chimioattractantes (AtLURE1.1, AtLURE1.2, AtLURE1.3 et AtLURE1.4) [147, 148]. *AtLURE1.5* est exprimée par les synergides, mais la perte d'une cystéine la rend inactive. Quant à *AtLURE1.6*, elle est considérée comme un pseudogène. L'ensemble de ces gènes sont sous le contrôle du facteur de transcription MYB98 présent seulement dans les synergides [144].

### 1.4.3 Réception des signaux par le tube pollinique

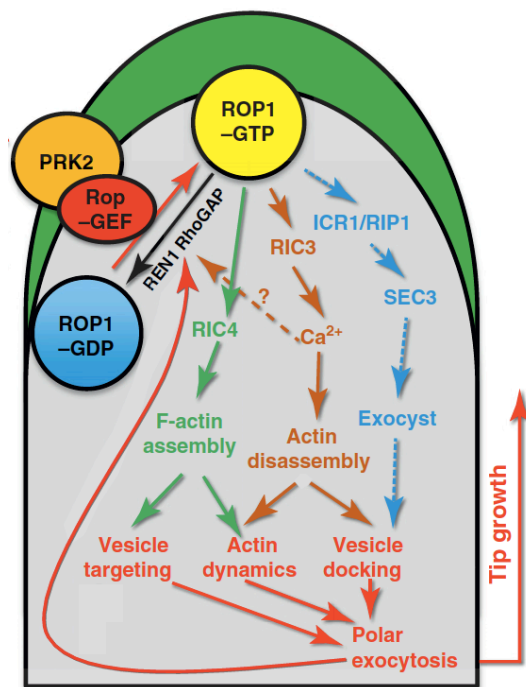
Un grand nombre de chimioattractants sont présents pour guider le TP du stigmate au micropyle. Le TP doit recevoir l'ensemble de ces informations pour modifier sa vitesse de croissance et changer de direction [149]. Les voies de signalisation vont jouer un rôle clé pour agir sur les trois acteurs de la croissance (l'influx calcique, le cytosquelette et le trafic vésiculaire) pour répondre aux signaux extracellulaires. L'ensemble des recherches menées ces dernières décennies se sont concentrées essentiellement sur le guidage micropylaire. Nous ne connaissons aucun récepteur et aucune voie de signalisation impliqués dans l'orientation de la germination, du guidage tissulaire et du guidage à longue distance. Pour le guidage funiculaire, il a été démontré que deux *mitogen-activated protein kinase*, MPK3 et MPK6, sont impliquées dans la voie de traduction des signaux ovulaires [150].

Récemment, il a été démontré que les récepteurs hétérodimériques MALE DISCOVERER1 (MDIS1) et MDIS1-INTERACTING RECEPTOR LIKE KINASE1 (MIK1)/MIK2 sont impliqués dans le guidage micropylaire [151]. Les mutants de ces trois gènes ont montré un problème partiel lors des tests semi-*in vivo*, cependant le guidage n'est pas affecté *in vivo*. Les différents tests biochimiques montrent une liaison entre LURE1.2 et MDIS1, MIK1 et MIK2 [151, 152]. Il reste à déterminer leurs rôles dans le guidage micropylaire.

En parallèle de cette recherche, un autre récepteur du type LRR *receptor-like kinase* a été démontré essentiel pour le guidage micropylaire [153]. Le RECEPTOR-LIKE KINASE 6 (PRK6) est directement impliqué dans la réception du signal du peptide AtLURE1.2 chez *A. thaliana* [154]. Les tests de guidage semi-*in vivo* ont démontré une perte totale de sensibilité pour le peptide LURE1 en contexte mutant. La localisation cellulaire de PRK6 lors des tests de guidage montre une accumulation asymétrique avant une réorientation du TP, ce qui démontre qu'il fait partie des récepteurs intégrant les chimioattractants. PRK6 est impliqué dans la

croissance du TP avec trois autres récepteurs : PRK1, PRK3 et PRK8 [154]. Cette même étude a aussi montré une interaction directe entre PRK6 et PRK3.

L'interaction entre le domaine extracellulaire de PRK6 et la LURE1.2 entraîne la phosphorylation du domaine intracellulaire du récepteur [152]. Le domaine intracellulaire du récepteur va interagir avec une Rho-likeGTPase des plantes - Guanine Exchange Factor (Rho-GEF) qui va activer deux voies antagonistes essentielles pour la polarisation et le guidage du TP. Pour cela, la Rho-GEF modifie ROP-GDP en ROP-GTP dans la région apicale conduisant à l'activation de RIC4 qui favorise la polymérisation de l'actine et de RIC3 qui va favoriser la dépolymérisation des filaments d'actine en augmentant la concentration calcique intracellulaire. De plus, ROP-GTP active ICR1/RIP1, qui semble être nécessaire pour le verrouillage des vésicules à la membrane plasmique lors d'exocytose à l'apex [129, 155]. Cependant, nous ne savons pas comment RIC3, RIC4 et ICR1/RIP1 font pour modifier l'activité de ces différents acteurs de la croissance. En plus de cette voie, ces protéines jouent un rôle dans le guidage du TP, mais nous ne savons pas quels sont leurs rôles précisément. (**Figure 6**).



**Figure 6 : Contrôle par Rho-like GTPase (ROP)1 de la croissance du TP.**

La ROP1 est activée localement à la membrane plasmique. La voie RIC4 favorise la polymérisation des FA et induit l'accumulation de vésicules exocytaires à l'apex. Il favorise également des boucles de rétroaction positive pour augmenter la zone de ROP1 actif. ROP1 active également la voie RIC3-calcium. RIC3-dépendante  $Ca^{2+}$  favorise la dépolymérisation des FA et facilite l'exocytose à l'apex. L'exocytose est également favorisée par deux autres protéines ROP1 et ROP Interactive Partner 1 (RIP1 / ICR1), par la suite avec la sous-unité d'exocyste SEC3 qui assure la médiation de l'attachement des vésicules exocytaires sur les PM. L'exocytose polarisée provoque la migration de la protéine activatrice de la GTPase Rho (GAP)

REN1 vers la MP apical, qui désactive la ROP1 active localisée dans les MP. Figure extraite de Craddock *et al.*, 2012 [156].

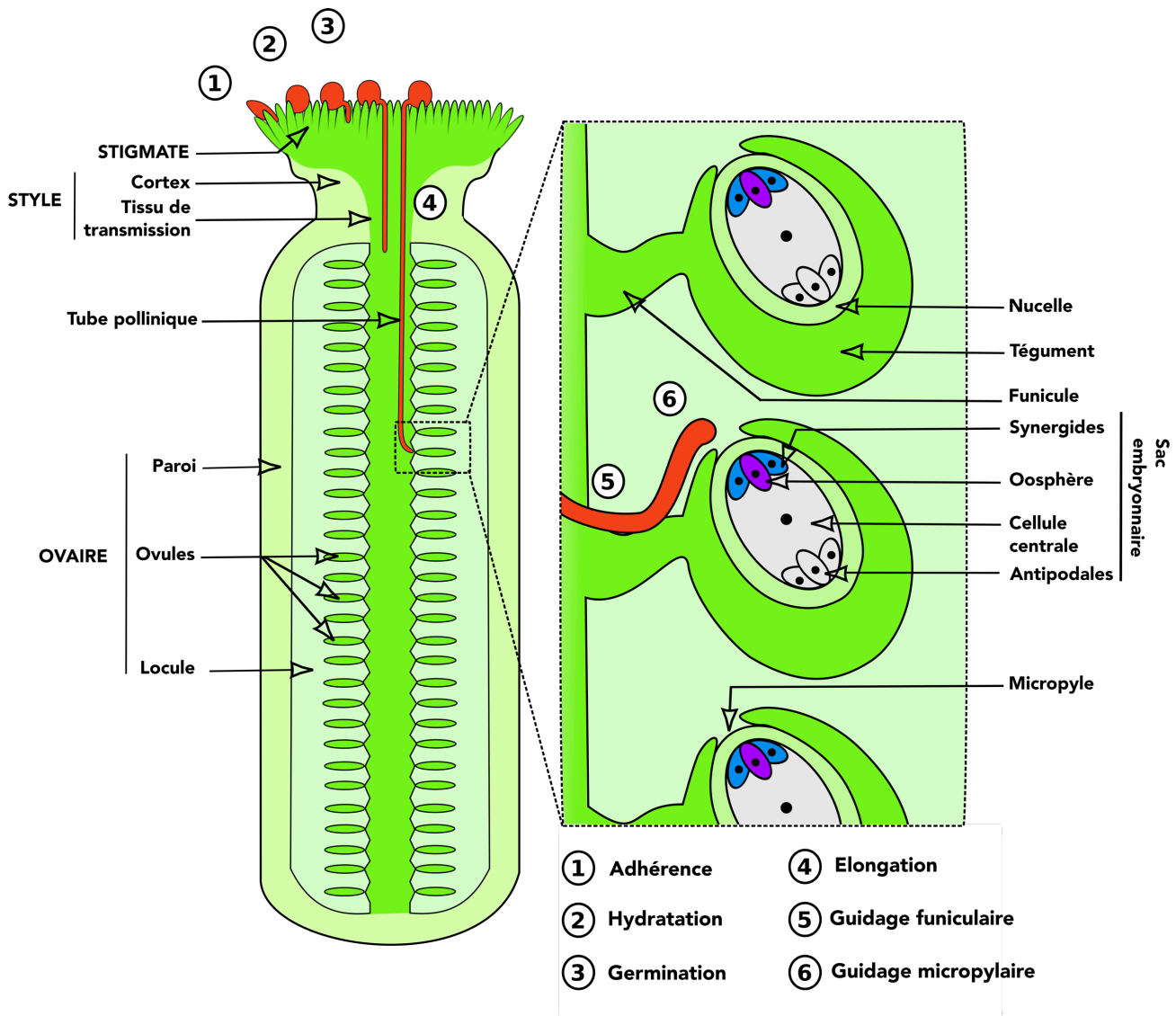
Le réticulum endoplasmique (RE) semble jouer un rôle important pour le guidage. Trois protéines du RE ont été montrées comme essentielles pour le guidage micropylaire. L'ABNORMAL POLLEN TUBE GUIDANCE1 (APTG1) codant pour une mannosyltransférase localisée au RE affecte aussi le guidage micropylaire [157]. Les mutants *APTG1* affectent la localisation cellulaire de COBL10 suggérant ainsi qu'*APTG1* est impliquée dans la synthèse du GPI pour COBL10. POLLEN DEFECTIVE IN GUIDANCE (POD1) est aussi localisée dans le RE. Cette protéine interagit avec la Calreticulin 3 (CRT3) pour aider au repliement des protéines membranaires (106). Leurs mutations conduisent à une perte de sensibilité aux chimioattractants. L'hypothèse émise est que POD1 et CRT3 aident au repliement de PRK6.

Ces dernières décennies ont permis de mieux comprendre comment le pollen reçoit et traite les informations pour changer sa vitesse de croissance et sa direction. Cependant, un grand nombre de questions restent en suspens : comment RIC3/RIC4 interagit-il avec l'influx calcique et les FA ? Quels sont les rôles des PRK1/3/8 dans le guidage et la croissance ? Comment MIK1/2 et MDIS1 influencent le guidage ? De plus, nous ne savons pas quelles sont les voies de signalisation du guidage à longue distance et funiculaire.

#### 1.4.4 Double fécondation

Une fois qu'ils ont atteint le micropyle, les TP ralentissent permettant ainsi de traverser lentement l'appareil filiforme jusqu'au micropyle (**Figure 7**) [158]. Les cellules synergides dégénèrent après l'arrivée d'un TP. L'extrémité du pollen va éclater à l'intérieur d'une synergide. Les cellules spermatiques vont sortir du TP pour se placer entre la cellule germinale et la cellule centrale. Les deux cellules spermatiques s'immobilisent pendant approximativement 7,4 min [74]. Après ce temps d'immobilisation, la première fusion avec une cellule spermatique et la cellule centrale se produit, puis s'ensuit la deuxième fusion entre l'autre cellule spermatique et l'oosphère [74]. Chez *A. thaliana*, les cellules spermatiques ne sont pas prédéterminées pour fusionner avec l'une ou l'autre des cellules femelles [159]. La fusion d'une des cellules spermatiques et de l'oosphère donne le zygote. Quant à la fusion entre

la cellule centrale et la seconde cellule spermatique, elle donnera l'albumen. Cette double fécondation permettra la formation de la graine.



**Figure 7: Structure du pistil et déroulement de l'interaction avec le pollen chez *A. thaliana*.** À droite, une vue détaillée d'une coupe longitudinale d'ovaire présentant les dernières interactions avant la fécondation. Fait par Mazin B.

## 1.5 Les cascades des mitogen-activated protein kinase

### 1.5.1 Information générale sur les MAPK

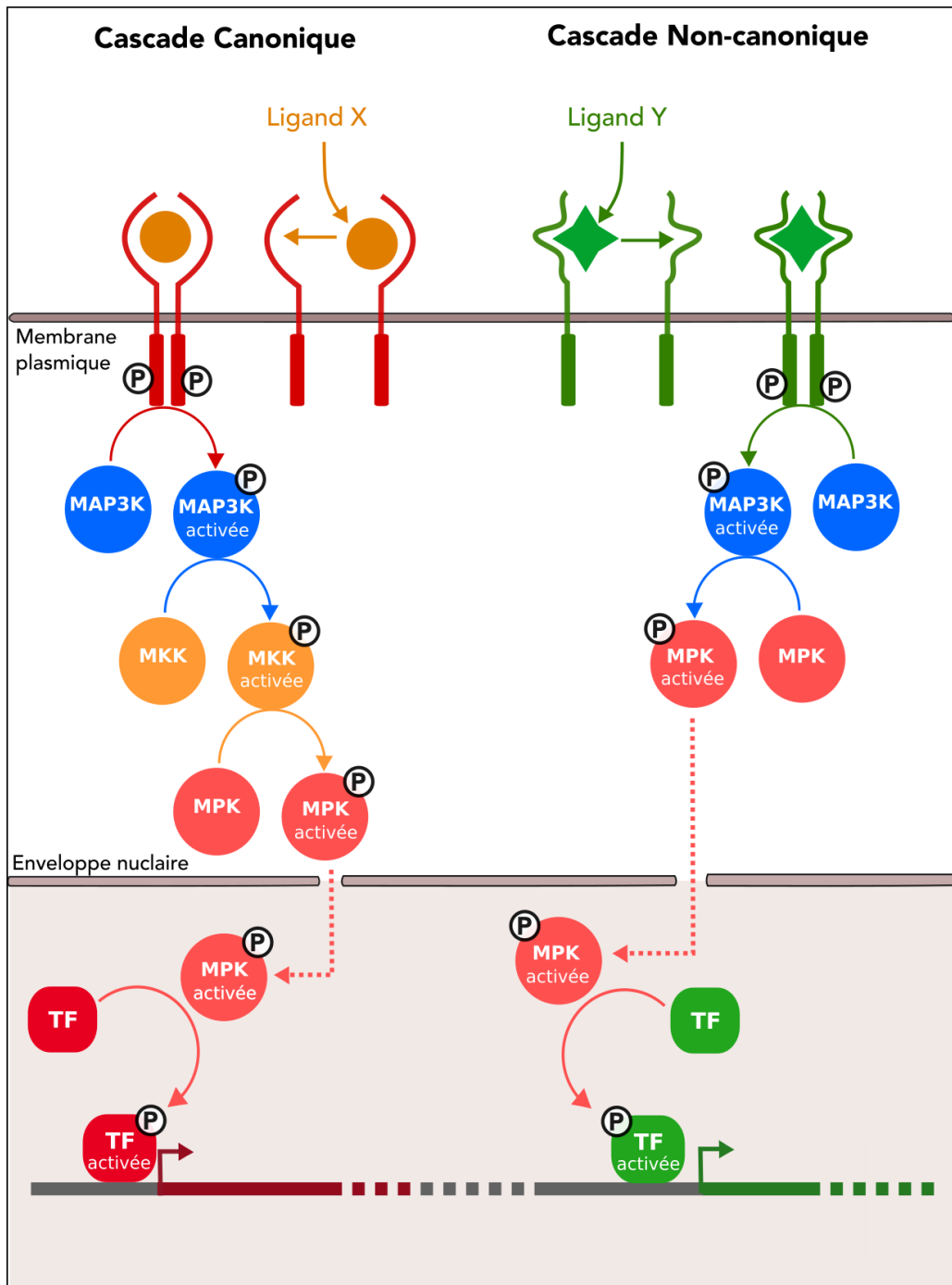
Chez les eucaryotes, la phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus répandue: jusqu'à 30% des protéines sont phosphorylables [160]. Cette modification chimique est effectuée principalement par des protéines appelées sérine/thréonine/tyrosine kinases. Elles

se décomposent en plusieurs grandes familles. L'une d'elles est appelée *mitogen-activated protein kinase* [1]. Cette famille de kinase est celle qui est le mieux caractérisée tant au niveau fonctionnel qu'au niveau mécanique [161]. Nous savons que ces protéines sont nécessaires pour la réponse à de nombreux signaux extracellulaire, comme lors de stress biotique ou abiotique, du cycle cellulaire et du développement tissulaire [162]. Chez *A. thaliana*, les études génomiques montrent que 51 gènes font partie de la famille des MAPKs. Cette famille se divise en trois sous-classes qui interagissent sous la forme d'une cascade moléculaire.

L'activation d'une cascade MAPK est induite par la liaison entre un ligand extracellulaire et son récepteur transmembranaire (**Figure 8**). Ce récepteur qui se trouve à l'état monomérique va se dimériser en présence du ligand permettant l'activation de son domaine kinase intracellulaire. Ce domaine va activer une MAPK Kinase Kinase (MAP3K) en la phosphorylant. Le domaine régulateur de cette MAP3K situé dans sa partie N ou C-terminale va changer de conformation et ainsi libérer son domaine kinase. La MAP3K activée va phosphoryler une MAPK Kinase (MKK) sur ses résidus S/T-X-X-X-X-S/T (serine/thréonine - cinq acides aminés – sérine/thréonine) ce qui permettra son activation [163]. À son tour, la MKK va phosphoryler une MAPK (MPK) cytoplasmique ou nucléaire qui, une fois phosphorylée sur ses résidus T-X-Y (thréonine – D/E – tyrosine), va phosphoryler un ou plusieurs facteurs de transcription (*transcription factors*, TF). Ces protéines vont modifier l'expression génique de la cellule permettant une réponse spécifique aux signaux exogènes [164]. Le génome d'*A. thaliana* contient >60 MAP3Ks répartis en trois familles : les Rafs, les Ziks et les MEKKs, 10 MAPKK (MKK) et 20 MAPK (MPK) [1, 165]. Nous nous intéresseront uniquement aux sous-groupe des 21 MEKK que nous nommeront MAP3K pour simplifié la compréhension des cascades de signalisation durant cette thèse.

Depuis la découverte de ces cascades de signalisation, il a été démontré à nombreuses reprises qu'une MAP3K peut activer directement une MPK (**Figure 8**) [166]. Par exemple, la MAP3K20 interagit directement avec MPK18 et la phosphoryle. Cette cascade non canonique est impliquée dans la dépolymérisation des microtubules dans les racines [167, 168]. D'autres voies non canoniques ont été bien caractérisées, par exemple l'activation directe d'une MPK par une autre protéine. La MPK8 est activée directement par la CaM3 lors d'une blessure des feuilles. Cette voie de signalisation permet l'inhibition très rapide de la formation de ROS homéostatique [169].





**Figure 8: Cascade MAPK canonique et non canonique.**

À gauche: le ligand X va interagir avec un récepteur spécifique à la membrane d'une cellule. Une fois, dimériser, le récepteur va activer une cascade canonique des MAPK (MAP3K-MKK-MPK) spécifique au récepteur. Cette cascade va activer des facteurs de transcription (TF) pour répondre aux stimuli exogènes en modifiant l'expression génique de la cellule. À droite: le ligand Y va interagir avec son récepteur et activer une cascade de MAPK non canonique. La MAP3K va phosphoryler directement une MPK, ce qui va conduire à la régulation d'autre TF que la cascade canonique. Fait par Mazin B.

## 1.5.2 Implication des kinases

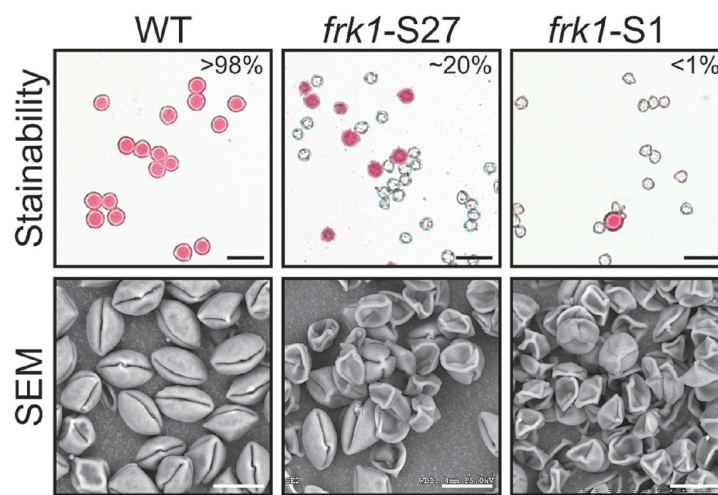
### 1.5.2.1 Lors du développement du pollen

Plusieurs études montrent la nécessité des cascades MAPK lors du développement du grain de pollen. La voie MAPK la mieux caractérisée dans le développement du pollen est la cascade NACK-PQR qui implique la AtMPK4. L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) du pollen mutant *AtMPK4* montre qu'un grand nombre de pollens sont morphologiquement anormaux ou sont morts à l'anthèse [170]. La protéine TIO va phosphoryler les MAP3K nommées AtANP1/2/3. Ces protéines kinase vont activer la AtMKK6, qui conduira à la phosphorylation de la AtMPK4. La kinase va réguler l'activité de différentes Microtubule Associated Protein [1], telle que AtMAP34, en les phosphorylant afin de réguler l'organisation des microtubules [36, 171]. Cette cascade de signalisation va permettre la cytokinèse lors de la division asymétrique du pollen PMI en régulant l'activité des microtubules.

Chez *A. thaliana*, les kinases AtMAP3K $\epsilon$ 1 et AtMAP3K $\epsilon$ 2 (AtMAP3K7 et AtMAP3K6) sont nécessaires pour le développement du gamétophyte mâle. Ces deux kinases sont principalement localisées au niveau de la membrane plasmique. Le double mutant conduit à une diminution du nombre de pollens arrivant à maturité. Cette étude suggère qu'elles pourraient être impliquées dans la régulation de la membrane plasmique lors de la méiose de la MMC (**Figure 1**) [172, 173]. Pour autant, nous ne savons pas quels MKK et MPK se trouvent en aval de ces deux MAP3Ks.

La famille des FERTILIZATION-RELATED KINASE (FRK) est un sous-groupe de MAP3K présent chez les solanacées. Les FRK connaissent une évolution et une expansion rapide soutenant l'hypothèse qu'ils ont acquis de nouveaux rôles, principalement dans le développement des gamètes mâles et femelles des solanacées [174]. Chez *Solanum chacoense*, la sous-famille ScFRK se compose de six membres. Deux FRK, la FRK1 et la FRK2, sont nécessaires lors de la formation du pollen. Le gène *FRK1* est exprimé dans les cellules mères du pollen et comme beaucoup de MAPK, la protéine est localisée dans le noyau [175]. Pour étudier le rôle de cette MAP3K, deux lignées RNAi ont été générées (*ScFRK1-S1* et *ScFRK1-S27*) pour diminuer l'expression de FRK1 dans la plante. La pollinisation d'anthères sauvages par du pollen mutant conduit pour la plante *ScFRK1-S27* à une diminution du nombre de grains et pour la lignée *ScFRK1-S1* à l'absence complète de grains [175]. L'échec de cette fécondation indique que le gamétophyte mâle n'est pas capable de féconder le sac embryonnaire sauvage.

L'analyse des grains de pollen permet d'observer une forte létalité dans ces deux lignées, 80 % de pollen mort pour la plante *ScFRK1-S27* et 99 % pour la lignée *ScFRK1-S1* (**Figure 9**) [175]. L'étude du développement du gamétophyte mâle montre qu'il n'a pas de problème lors de la méiose, donc la formation des tétrades n'est pas affectée par la diminution d'expression de *ScFRK1*. Par contre, les microsporocytes n'arrivent pas à progresser en PMI. L'absence de la division asymétrique conduit à la dégénérescence progressive des gamétophytes mâles. *ScFRK1* est nécessaire pour l'entrée en PMI (**Figure 1**) [175].



**Figure 9: Viabilité du pollen sauvage et de deux lignées de plantes transgéniques *ScFRK1*.** Figures du haut : les pollens sont colorés avec de l'acétocarmin 1%. Les grains de pollen viables sont roses. Barre d'échelle=50µm. Figures du bas : Pollen mature vue en microscopie électronique à balayage. Barre d'échelle = 20µm. Figure extrait de Lafleur *et al*, 2015 [175].

La *ScFRK2* est aussi nécessaire pour le développement du pollen. Dans la jeune anthère, l'ARNm de *ScFRK2* s'accumule principalement dans les microsporocytes et le tapetum [176]. Au moment de l'anthèse, l'ARNm *ScFRK2* n'est plus exprimé dans le tapetum en dégénérescence ou dans les grains de pollen, mais se trouve en abondance sur la paroi de l'anthère, dans l'épiderme et dans l'endothélium. Des lignées transgéniques surexprimant *ScFRK2* (*ScFRK2-OX*) ont permis d'étudier le rôle de ce gène lors du développement du pollen. Deux lignées *ScFRK2-OX* ont été identifiées et présentent un taux de mortalité des grains de pollen variant entre 31,5 % et 55 %. Pour expliquer ce problème, cette étude suggère un dysfonctionnement sporophytique dû à l'augmentation de l'expression de *ScFRK2* [176].

Chez *A. thaliana*, les orthologues putatifs de la sous-famille FRK sont au nombre de trois (*AtMAP3K19*, *AtMAP3K20* et *AtMAP3K21*) [174, 177]. Aucun de ces gènes n'a été étudié lors du développement des gamétophytes ou de la croissance du TP. Pour autant, les études transcriptomiques ont permis de montrer une concentration élevée des transcrits de la

*AtMAP3K19* et la *AtMAP3K20* lors du développement du pollen et du TP [178]. L'expression de *AtMAP3K21* n'a pas été analysée [178].

En plus des MAP3Ks, certaines MPK sont nécessaires à la fécondation. Par exemple, la *AtMPK3* et la *AtMPK6* sont impliquées dans la formation des anthères. Lors de leur développement, ces kinases participent à la différenciation des cellules archésporiales [179, 180]. Il semblerait y avoir un mécanisme de contrôle de la concentration et de la distribution de ces MPKs dans l'anthère, mais ce mécanisme n'est pas encore élucidé. Par contre, il a été démontré que ces MPKs phosphorylent *SPOROCTELESS* et *NOZZLE*, qui sont deux facteurs de transcription impliqués dans la prise d'identité des cellules archésporiales [180]. En plus de leurs rôles dans le développement de l'anthère, la *AtMPK3* et la *AtMPK6* jouent un rôle lors des premiers stades de développement du pollen. Les facteurs de transcription spécifiques du pollen, appelés *AtWRKY34* et *AtWRKY2*, sont nécessaires pour la formation du pollen. La mutation de ces FT produit des pollens anormaux et une forte létalité des grains de pollen à l'anthère. L'étude de ces FT montre qu'ils doivent être phosphorylés par *AtMPK3/AtMPK6* au début de la gamétogénèse mâle pour obtenir un pollen fonctionnel [150].

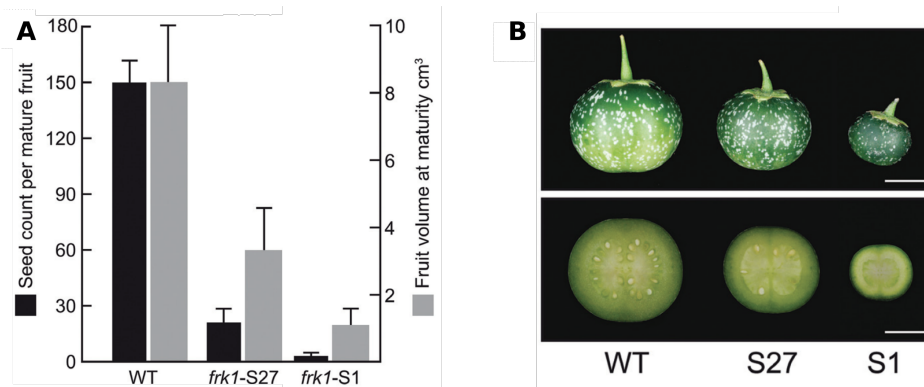
Chez la tomate, les mutants pour les deux MPK, *SIMP7* et *SIMP20*, qui présentent respectivement une diminution d'expression du gène ou une mutation nulle, affectent le développement du pollen [181, 182]. La mutation de *SIMP7* conduit à la formation anormale du pollen, probablement due à son implication dans la dégradation du tapetum [181]. La *SIMP20* est impliquée dans le développement post-méiotique par la régulation de l'expression des gènes qui interviennent dans les métabolismes des sucres et des auxines [182]. La mutation de cette MPK de la tomate conduit elle aussi à la formation de gamétophytes mâles anormaux.

L'ensemble de ces études montrent que les MAPK sont indispensables pour l'ensemble du processus permettant la formation du grain de pollen chez de nombreuses espèces.

#### **1.5.2.2 Lors du développement des ovules**

L'implication des cascades MAPK est moins comprise lors du développement du gamétophyte femelle. Pour autant certaines MAPK sont impliquées dans ce processus. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* le double mutant *AtMPK3;AtMPK6* conduit à l'infertilité des sacs embryonnaires [179, 183]. Ces deux MPK sont impliquées dans le maintien de la prolifération cellulaire durant le développement du tégument de l'ovule. La diminution de la taille du tégument chez le double mutant entraîne des problèmes lors du développement de l'ovule, ce qui conduit à l'infertilité de l'ovaire [179].

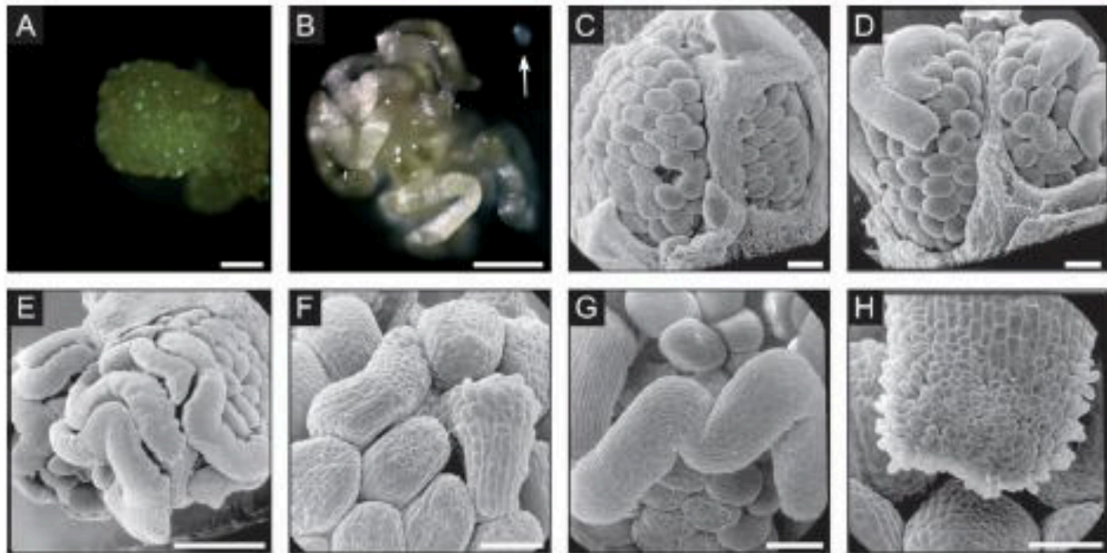
Chez *Solanum chacoences*, les FRK sont aussi nécessaires pour la formation du sac embryonnaire. L'analyse de ScFRK1 montre une implication directe des MAPK dans le processus de développement du gamétophyte femelle [175]. Cette MAP3K nucléaire est fortement exprimée dans le tégument et la cellule mère des mégaspoires. À l'anthèse, ce gène est exprimé dans les synergides et la cellule œuf. La pollinisation des lignées RNAi-*ScFRK1* par du pollen sauvage produit de petits fruits avec dix fois moins de graines que la lignée sauvage (**Figure 10**) [175]. L'observation des ovules à l'anthèse des lignées RNAi montre qu'un grand nombre d'ovules présentent un sac embryonnaire dégénéré, ce qui explique le faible nombre de grains après la fécondation. L'étude du développement du sac embryonnaire de ces lignées montre que la MMC se différencie et progresse en méiose formant ainsi la FM (**Figure 2**). Par contre, la première division mitotique ne se produit pas. Ne progressant plus, les sacs embryonnaires vont progressivement dégénérer [175].



**Figure 10: Phénotype des fruits des mutants dont l'expression de ScFRK1 est réduite.**

A. La diminution du nombre de graines par fruit (noir) et son volume (gris) chez les lignées transgéniques *Scfrk1-S1* et *Scfrk1-S27*. B. Comparaison de fruits et de tranches de fruits provenant de plantes de serre et des lignées transgéniques S1, S27. Barre d'échelle = 1 cm. Image adaptée de Lafleur *et al*, 2015 [175].

L'ARN *ScFRK2* s'accumule très tôt lors du développement dans le mégasporocyte et dans le tégument de l'ovule [177]. Le croisement de pollen sauvage avec des lignées surexprimant *ScFRK2* (OX-*ScFRK2*) produit de petits fruits avec peu de grain. L'observation des ovaires OX-*ScFRK2* à l'anthèse montre une conversion de certains ovules en structure carpéloïde (**Figure 11**). L'expression ectopique de *ScFRK2* dans les tissus végétatifs ne cause pas de modification visible de la plante. Ainsi cette étude suggère que la kinase ScFRK2 est impliquée dans l'établissement de l'identité de l'ovule durant les premiers stades de développement [177].



**Figure 11: Développement de l'ovaire chez des plantes mutantes de surexpression *ScFRK2*.**

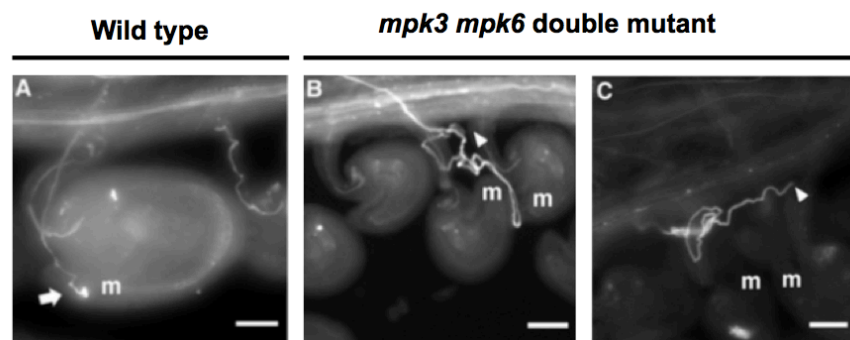
En A, regroupement d'ovules à l'intérieur de l'ovaire de type sauvage lorsque la paroi de ce dernier a été délicatement enlevée. En B, c'est un regroupement d'ovules photographiés de la même manière qu'en A, mais chez les plantes mutantes. Les images C-D-E-F-G-H ont été prises à partir d'un microscope électronique à balayage (MEB). Les ovules provenant de la plante de type sauvage (C) sont beaucoup plus organisés que les ovules provenant de la plante mutante (D et E). En F, il est possible d'observer des structures «carpelloïdes» qui semblent provenir du regroupement d'ovules, et en G, il y a élongation de ces structures. Finalement, il y a établissement de papilles aux extrémités de ces structures (H), tout comme elles sont présentes sur le stigmate. Barres de mesure : 1 mm pour (A) et (B), 100  $\mu\text{m}$  pour (C), (D), (F), (G) et (H), 50  $\mu\text{m}$  pour (E). Figure tirée de Gray-Mitsumumne *et al*, 2006 [177].

### 1.5.2.3 Lors de la pollinisation

La pollinisation d'organe femelle par le TP requière là encore les cascades MAPK. La *AtMPK6* joue un rôle durant la croissance du TP. La mutation de cette MAPK n'est pas suffisante pour observer un effet sur la germination et la croissance. Par contre, la double mutations *AtMPK6* et le facteur de transcription spécifique au pollen, *AtWRKY2*, conduit à la diminution de la germination et de la croissance des TP [184]. En plus de ce lien entre la *AtMPK6* et des FT, cette MPK participe à la régulation du trafic vésiculaire. La grande concentration en phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) de la membrane plasmique apicale est essentielle à la croissance polarisée des TP [185]. La biosynthèse des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est contrôlée par les phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PI4P 5-kinases). La PI4P 5-kinase 6 (*AtPIP5K6*) est nécessaire à l'endocytose médiée par la clathrine et la croissance apicale des tubes polliniques[186]. L'étude parue en 2017 démontre que *AtPIP5K6* est une cible de la *AtMPK6* c'est-à-dire que cette MAPK contrôle la production de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et donc elle participe à la régulation du trafic vésiculaire dans le TP [187]. Pour

autant, cette article confirme que le simple mutant *AtMPK6* ne présente pas de diminution de la germination ou de la croissance du TP [187].

En 2014, une étude a montré que la *AtMPK3* et la *AtMPK6* sont impliquées dans le guidage funiculaire [150]. Ces deux MPKs sont aussi nécessaires dans le développement du pollen, comme nous avons pu le voir précédemment. Pour étudier l'implication de ces deux MPKs dans le TP, Guan Y. et al. ont utilisé la méthode de complémentation par étiquette fluorescente, afin d'identifier des pollens *AtMPK3*<sup>-/-</sup>;*AtMPK6*<sup>-/-</sup>. Ils ont pu ainsi montrer que 58% des TP *AtMPK3*<sup>-/-</sup>;*AtMPK6*<sup>-/-</sup> présentent des problèmes lors du guidage funiculaire sans pour autant affecter la croissance du TP [150]. Cependant, les essais de guidage semi-*in vitro* montrent que le guidage micropylaire est normal. De plus, ils n'ont pas identifié les kinases en amont et les protéines phosphorylées en aval de ces MPKs permettant le guidage (**Figure 12**).



**Figure 12 : Guidage défectueux des tubes polliniques chez les mutants *MPK3;MPK6*.**

La croissance du TP en pistil de type sauvage a été visualisée par coloration au bleu d'aniline. A. Un ovule fécondé par un tube pollinique de type sauvage en condition de pollinisation limitée. B-C. La pollinisation des pistils de type sauvage avec des grains de pollen des plantes *MPK3*<sup>-/-</sup> *MPK6*<sup>-/-</sup> *gMPK6-YFP* +/- (B) et (C), les tubes polliniques *MPK3;MPK6* errent sur l'ovule sans trouver le micropyle. Fait par Guan et al., 2014 [150].

L'ensemble de ces résultats permet de montrer que les MAPK participent à l'élongation des TP. Aucune étude ne montre qu'ils sont nécessaires durant la croissance et le guidage du TP. Effectivement ces résultats sont à nuancer car chez les doubles mutants *AtWRKY2/AtMPK6*, la croissance des tubes diminue, mais ne conduit pas à une diminution ou l'arrêt de la fécondation et aucune autre étude n'a permis de montrer l'implication de MAPK dans la croissance du TP. L'implication des MAPK lors de l'élongation du tube pollinique reste à clarifier.



## 1.6 Problématique et projet de recherche

Durant l'introduction, nous avons pu observer la complexité de la formation du gamétophyte mâle avec la méiose, la division asymétrique de la PMI, la mise en place des facteurs d'identité cellulaire ainsi que la division de la PMII, qui sont des étapes complexes nécessitant un réseau de signalisation précis (Partie 1). Le développement du sac embryonnaire avec la détermination de la MMC, la méiose, les trois mitoses successives, la migration, la cellularisation et la prise de l'identité des cellules nécessite des cascades de signalisation dans le but de réguler et de coordonner la transcription des gènes (Partie 2). La germination, la croissance et le guidage du TP n'échappent pas à l'importance de la communication intracellulaire (Partie 3 et Partie 4). Nous pouvons résumer en disant que la fécondation est une histoire de communication moléculaire. Cependant, cette signalisation reste encore très méconnue.

Les cascades des *mitogen-activated protein kinases* sont caractérisées pour leurs rôles essentiels dans la signalisation cellulaire dans le règne végétal. De plus, les études ont permis de montrer qu'elles jouent un rôle durant le développement des gamétophytes mâle et femelle, mais aussi lors de la croissance et le guidage du TP (Partie 5). Pour autant, un grand nombre de cascades restent à identifier pour comprendre le développement de ces structures complexes. Les ScFRK semblent être un bon point de départ pour comprendre le rôle de certaines MAPK lors de la fécondation. En effet, les études phylogéniques sur la famille des ScFRK semble montrer qu'elles sont impliquées dans la formation des gamètes et lors de la fécondation. De plus, deux ScFRK ont démontré leurs implications dans le développement des gamétophytes mâles et femelles.

Le chapitre deux a pour objectif de caractériser une nouvelle ScFRK, la *ScFRK3*, qui est phylogénétiquement la plus proche des *AtMAP3K19*, *20* et *21* chez *Arabidopsis thaliana*. Est-ce que la *ScFRK3* est exprimée lors du développement des gamétophytes mâles et femelles ? Joue-t-elle un rôle lors de la formation des gamètes mâles et femelles ? Quels ScMKK et ScMPK se trouvent en aval de cet MAP3K ?

Le troisième chapitre essaye de caractériser plus finement les mutants surexprimant *ScFRK2*. La conversion de l'ovule en structure carpéloïde n'affecte qu'une partie des ovules présents dans l'ovaire. Le chapitre deux a pour but de savoir si la conversion des ovules est suffisante pour expliquer la diminution drastique du nombre de grains dans les lignées surexprimant *OX-ScFRK2* et si ce n'est pas le cas identifier la cause de cette diminution du nombre de grain dans le fruit.



Le chapitre quatre a pour but de comprendre si les cascades MAPK sont essentielles à la croissance polarisée du tube pollinique. Pour cela, nous avons utilisé une drogue, appelée U0126 qui peut inhiber sept des dix MKK présentes dans le génome d'*A. thaliana* [188, 189]. Cette drogue affecte-t-elle la germination et la croissance polarisée du TP ? Et si oui, l'organisation des filaments d'actine et du trafic vésiculaire va-t-elle être affectée par l'inhibition des MKK ?

Le chapitre cinq a pour objectif de caractériser les MAPK impliquées dans la germination et la croissance des tubes polliniques chez *A. thaliana*. Les trois orthologues putatifs de ScFRK3 chez *A. thaliana*, la *AtMAP3K19*, la *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21* sont-elles exprimées dans les tissus reproducteurs mâles et femelles et dans le tube pollinique ? Jouent-elles un rôle dans le développement des gamétophytes mâles et femelles ? Participent-elles à la formation et la croissance du TP ?

Plus généralement, ma thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle que jouent les MAPK lors du développement des gamétophytes mâles et femelles et lors du développement du TP chez *Solanum chacoense* et *Arabidopsis thaliana*.

## **2 La *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 3 est impliquée dans le développement des gamétophytes mâles et femelles.**

---

### **2.1 Une nouvelle *mitogen-activated protein kinase kinase kinase Solanum chacoense*, ScFRK3, est impliquée dans le développement des gamétophytes.**

Mazin Benjamin Damien

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,  
Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

#### **2.1.1 Préambule**

L'étude phylogénétique de la sous-famille des *Fertilization-Related Kinases* (FRK) chez les Solanacées a permis de supposer que l'ensemble des membres sont impliqués dans le développement des gamétophytes. Chez *Solanum chacoense*, deux membres de la famille des FRK, *ScFRK1* et *ScFRK2* ont permis de vérifier cette hypothèse. Afin de parfaire nos connaissances sur la classe FRK, nous avons entrepris la caractérisation d'une nouvelle ScFRK.

#### **2.1.2 Sommaire**

Dans le chapitre un, nous avons présenté deux membres de la famille de ScFRK, les protéines ScFRK1 et ScFRK2, qui sont impliquées dans le développement des gamétophytes mâles et femelles chez *Solanum chacoense*. Dans ce deuxième chapitre, nous présentons un nouveau membre de cette sous-famille, la ScFRK3, qui est requise pour le développement du pollen et du sac embryonnaire. Le gène *ScFRK3* est fortement exprimé juste après la méiose et lors des étapes de la mitose dans les deux gamétophytes en développement. La pollinisation des lignées transgéniques RNAi-*ScFRK3* par du pollen sauvage produisent des petits fruits contenant un faible nombre de graines. L'observation des lignées transgéniques a montré que jusqu'à 43 % des sacs embryonnaires sont dégénérés à l'anthèse. L'analyse du développement des ovules révèle que les MMC se développent normalement jusqu'à la mégaspore fonctionnelle. Par contre, entre 22 % et 43 % des mégaspores fonctionnelles ne progressent pas en mitose I et vont progressivement dégénérer. Le développement du pollen est aussi affecté

par la diminution de l'expression de *ScFRK3*. Notre étude a permis de déterminer l'arrêt du développement des gamétophytes mâles avant la première mitose. La méthode de double hybride et de BiFC ont révélé une interaction entre ScFRK3-ScMKK3 et ScMKK3-ScMPK13. La ScMKK3 et la ScMPK13 pourraient être impliquées en aval de la ScFRK3 pour permettre le processus développemental des gamétophytes. Le chapitre II montre qu'un autre membre des FRKs, la *ScFRK3*, est impliqué lors du développement du pollen et du sac embryonnaire chez *Solanum chacoense*.

## **2.2 The *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 3 is involved in male and female gametophyte development.**

Caroline Daigle\*, Benjamin Damien Mazin\* and Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

\* Caroline Daigle et Benjamin Mazin ont fait un travail équivalent.

Publié dans BMC Plant Biology (2019)

DOI : 10.1186/s12870-019-1804-0

### **2.2.1 Apport original**

Caroline Daigle est l'instigatrice de l'article. Elle a réalisé la phylogénie, une partie des tests de la localisation cellulaire, l'ensemble des expressions *ScFRK3* lors du développement, la formation des mutants, la quantification des grains par fruit, l'analyse des sacs embryonnaires à l'anthèse et l'ensemble des tests d'interactions entre les MAP3K-MKK et MKK-MPK. Elle a rédigé une partie de l'article.

Benjamin Mazin a fait une partie des tests de la localisation cellulaire, la vérification de l'expression des six ScFRKs dans les lignées transgéniques, les photos des fruits, l'analyse du phénotype du développement des ovules chez les mutants, l'analyse des grains de pollen à l'anthèse et lors du développement du pollen. Il a rédigé une partie de l'article.

Daniel P. Matton a supervisé les travaux. Il a aussi contribué à l'écriture et à la correction de l'article, de même qu'à la conception des figures.

### 2.2.2 Abstract

The Fertilization-related kinases (FRK) form a class that belongs to the MEKK subfamily of plant MAP3Ks. It was recently shown that FRK class kinases expanded during angiosperm evolution, reaching their maximum numbers in the lineage leading to solanaceous species and culminating in the *Solanum* genus where they account for more than 40% of the total MAP3Ks. The first members studied, ScFRK1 and ScFRK2 were shown to play a pivotal role in gametophyte development in the wild potato species *Solanum chacoense*. ScFRK3 is also involved in gametophyte development. *ScFRK3* is expressed in developing pollen and young ovules, reaching its highest level immediately after meiosis and during the mitosis steps in both gametophytes. Hence, three independent lines of *ScFRK3* RNAi mutant plants showed decreased number of seeds per fruit. We also observed an important number of degenerated embryo sac in mature ovary. Analysis of ovule development showed that most embryo sacs did not enter mitosis I in *ScFRK3* RNAi mutant plants. Severe lethality was also observed during male gametophyte development, with pollen being arrested before mitosis I, as observed in the female gametophyte. Obvious defects in vegetative organs were not observed, emphasizing the reproductive roles of the FRK class kinases. To isolate MAP kinases acting downstream of ScFRK3, a de novo *S. chacoense* transcriptome from male and female reproductive organs was assembled. Of the five ScMKKs and 16 ScMPKs retrieved, only the ScMKK3 interacted with ScFRK3, while only the ScMPK13 interacted with ScMKK3, leading to an apparent single three-tiered canonical MAP kinase cascade combination involving ScFRK3-ScMKK3-ScMPK13. The ScFRK3 MAPKKK is involved in a signaling cascade that regulates both male and female gamete development, and most probably act upstream of ScMKK3 and ScMPK13.

**Keywords:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAP3K), Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MAPKK), Mitogen-Activated Protein Kinase (MPK), signaling cascade, reproduction, gametophyte, embryo sac, pollen, *Solanum chacoense*.

### 2.2.3 Background

Unlike in animals, gamete development in plants is a highly regulated process resulting not only from a meiosis, but also by several mitosis, giving rise to multicellular gametophytes. In most species, the female gametophyte, which is called the embryo sac (ES), comprises at maturity eight nuclei embedded in seven cells [45]. Development of the female gametophyte is

divided in two steps, meiosis and megagametogenesis. In meiosis, the megaspore mother cell (MMC) undergoes meiosis, resulting into four haploid tetrads of which only one will survive to become the functional megaspore (FM). During megagametogenesis, the female gametophyte (FG) undergoes three successive mitosis rounds. The resulting eight nuclei ES then becomes polarized, with four nuclei at the chalazal pole and four at the micropylar pole. One nuclei from each pole migrates to the center while others go through cellularization and differentiation. At the mature stage (FG7), two synergids and one egg cell are positioned at the micropylar pole while the three other cells, the antipodals, occupy the chalazal pole. The two nuclei in the center merge together to become the unique diploid central cell [45, 190]. On the male side, the pollen mother cell (PMC) undergoes meiosis to produce a tetrad of microspores. The first pollen mitosis (PMI) occurs after maturation of the haploid microspore, producing two different cells inside the pollen grain: a large central cell, called the vegetative cell, and a smaller one, the generative cell [8]. Once pollen grains land on the stigma of a suitable flower of the same species, the vegetative cell generates a pollen tube that will elongate through the style toward the ovules. In solanaceous species like *Solanum chacoense*, the second pollen mitosis (PMII) occurs within the generative cell during tube elongation to form two identical sperm cells [8]. When the pollen tube reaches the micropyle of the ovule, the two sperm cells are released from the pollen tube to fertilize the egg cell and the central cell, leading to double fertilization giving rise to the diploid embryo and the triploid endosperm respectively [191].

Cell-cell communication and coordination of male and female gametophyte development involves complex and tightly regulated steps. Accordingly, genes shown to be essential for gametophyte development are found in a wide array of functionalities [45]. Some of them are necessary for the megaspore mother cell (MMC) meiosis [192], DNA recombination and chromosome integrity [193], while others are involved in FG maintenance and mitosis, their mutation leading to developmental arrest of the embryo sac before mitosis I [194, 195]. Because of its simple structure, pollen has been intensely used as a model to study plant mitosis and cytokinesis. Indeed, mutations in numerous genes cause defects going through PMC meiosis, PMI (pollen mitosis I) or PMII (pollen mitosis II). For example, mutation in the *TIO* (*TWO-IN-ONE*) gene, coding for a FUSED Ser/Thr protein kinase, also shows cytokinesis defects at PMI, producing binucleate pollen due to an incomplete cell plate formed during cytokinesis [32]. *TIO*, which is localized at the midline of the nascent phragmoplast, interacts with the PAKRP1/kinesin-12A protein, suggesting its role in cytokinesis microtubule organization [33]. In yeast two-hybrid assays, *TIO* also interacts with

AtNACK1/TETRASPORE [196], another kinesin known to function in plant cytokinesis [34]. Indeed, TES and HINKEL [197] are two redundant kinesins involved in PMI cytokinesis [35]. They are orthologous to the tobacco NACK1, involved in somatic cytokinesis. NtNACK1 is upstream of a MAPK signaling cascade, where it activates the MAPKKK NtNPK1 (AtANP1, 2, 3). Once activated, NtNPK1 activates the MAPKK NtNQK (AtMKK6), and finally, NtNQK activates the MPK NtNRK1/NTF6 (AtMPK4) [36]. Activated NtNTF6 then promotes phragmoplast expansion by phosphorylating MAP65 and other Microtubule-Associated proteins (MAPs) [198].

MAPK signaling is widely used to transduce signals from cell to cell, and plants own the largest MAPK family among all eukaryotes. For example, the genome of *A. thaliana* contains 21 MAP3Ks, 10 MAPKKs (MKKs), and 20 MAPKs (MPKs) [1]. MAPKs have been shown to be involved in numerous processes, such as stress response [199], defense [200], hormone signaling [201], and development [162]. This last process is probably the least investigated, since relatively little is known, especially in gametophyte development. In *A. thaliana*, from the 21 MEKKs, two functionally redundant MEKKs have been found to play a role in pollen development: *MAP3Kε1*; *MAP3Kε2* (*MAP3K7*; *MAP3K6*) double mutants show defects in plasma membrane formation in developing pollen, and also in embryo development at the globular or heart stages [173]. Embryo development is also affected in *YODA* mutants, demonstrating the role of this MAP3K in the asymmetric division of the zygote after fertilization [202]. Some MPKs have also been found to play roles in gametophyte development, like AtMPK4, involved in the cell plate expansion in male-specific meiotic cytokinesis [170, 203], or AtMPK3 and AtMPK6, which function redundantly in anther and ovule integument development [179, 184], early pollen development [150], and pollen tube elongation and guidance prior to fertilization [150, 187]. Recently, two MPKs in tomato, *SIMPK7* and *SIMPK20* found to affect pollen development when, were knock-down or knock-out, respectively [181, 182]. *SIMPK7* mutants displayed abnormal pollen formation, probably due to its involvement in tapetum degradation [181], while *SIMPK20* is involved in post-meiotic development through the regulation of gene expression that mediates sugar and auxin metabolism [182]. In *S. chacoense*, a diploid species close to the cultivated potato (*S. tuberosum*), two MAP3Ks were shown to play roles in both female and male gametophyte development [175-177]. These MAP3Ks are members of a recently characterized MEKK class called the Fertilization-Related Kinases (FRKs) class, that showed rapid evolution and expansion in solanaceous species [174]. *ScFRK1* downregulated mutant [175] and *ScFRK2* overexpressed mutant [177] led to the production of small fruits with severely reduced seed set.

Megagametogenesis and microgametogenesis showed development arrest at the female gametophyte stage (Mazin B., et al., unpublished). In *A. thaliana*, AtMAP3K19, 20 and 21 are their closest orthologs. In recent years, the roles of AtMAP3K20 have started to be uncovered. AtMAP3K20 was shown to interact with calmodulins and calmodulin-like proteins [204], and might be involved in pollen development, being highly expressed in pollen and as a target of the DUO1 R2R3 myb transcription factor [25]. In *Brassica napus*, BnMAP3K20 and BnMAP3K19 were shown to be stress regulated [205]. Yeast two-hybrid assays also showed that BnMAP3K19 interacted with BnMKK8 and BnMKK9 whereas BnMAP3K20 interacted strongly with BnMKK3 and to a lesser extent to BnMKK8 and BnMKK9 [205]. More recently, AtMAP3K20 was shown to modulate abscisic acid responses through the MKK5-MPK6 kinase cascade and is also involved in *Arabidopsis* cortical microtubule functions through two non-complementary pathways, one with MAP3K20, MKK3 and a still unknown MPK; the second, as a non-canonical MAPK cascade made of MAP3K20 and MPK18, bypassing the need for an MKK intermediate.

Herein, we provide the characterization of the MAP3K *ScFRK3*, a third member of the FRK family in *S. chacoense* that is phylogenetically close to *AtMAP3K19*, 20 and 21. We describe its roles in both male and female gametophyte development, where ScFRK3 acts as a major role during gametophyte development. We also provide a putative MAPK signaling cascade involving ScFRK3, ScMKK3 and ScMPK13 in reproductive development.

## 2.2.4 Methods

### 2.2.4.1 Plant material and transformation

*Solanum chacoense* Bitt. plants (genotype G4, S<sub>12</sub>S<sub>14</sub> self-incompatibility alleles and V22 S<sub>11</sub>S<sub>13</sub> self-incompatibility alleles) were derived from *S. chacoense* Bitt. lines PI458314 and PI230582 from the NRSP-6 United States Potato Genebank (Sturgeon Bay, Wisconsin) and were greenhouse-grown under long-day conditions (16 h light/8 h dark). For crosses, genotype V22 was used as the pollen donor. Transgenic plants were produced in the G4 genotype by agroinfiltration and callus regeneration as described previously [206] using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. DNA cloning was done with GATEWAY® technology using pDONRTM/Zeo as the entry vector and pK7GWIWG2(I) for RNAi mutant plants [207] as destination vectors. RNAi expression was under the control of the CaMV35S promoter [175, 181]. After *in vitro* selection on appropriate antibiotics, twenty independent plants were chosen

for further analyses. Polyploid plants were identified by stomatal guard cell chloroplasts number and discarded. Semi-quantitative RT-PCRs using the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen) were performed with 2.5 mg of total RNA from stamens and ovules extracted from 6 mm growing buds and ovules of wild type and each mutant. All primers used for PCRs and the number of cycles for each gene are listed in : Annexes 1 :**Tableau 2.**

#### **2.2.4.2 RNA expression and in situ hybridization**

RNA from different tissues (leaf, stem, root, petal, anther, ovary, style and bud) were extracted with TRIzol™ reagent (Invitrogen). RT-PCRs were performed as described earlier. *In situ* hybridizations were performed on 6 mm flower buds [208]. Tissue sections of 8 µm were made as described in Lantin *et al.*, 1999 [209] with VistaVision Histobond microscope slides (VWR). Sense and antisense RNA probes were synthesized from a 600 bp *ScFRK3* PCR amplicon that included the variable C-terminal domain (for primers, see Annexes 1: **Tableau 2**) using digoxigenin-11-UTP with T3 (for sense probe) and T7 (for antisense probe) RNA polymerases (Roche). Microscope slides were hybridized with 50 ng of sense or antisense RNA probes corresponding to the best signal to ratio concentration. Probe hybridizations were made overnight at room temperature, while detection with the anti-DIG antibody was made for one hour at 37°C. Tissue section staining was performed overnight at room temperature using NBT/BCIP solution (Roche). Ovule clearing and microscopy Ovules from 3 to 8 mm buds and from mature flowers were extracted from ovaries and were fixed and cleared as described previously [210]. Cleared ovules were observed by differential interference contrast microscopy using a Zeiss Axio Imager M1 microscope with a Zeiss Axiocam HRc camera.

#### **2.2.4.3 Pollen development and viability analyses**

Microspore development was studied by staining squashed anthers from all development stages with the Hoechst 33342 nuclear stain (NucBlue ® Live ReadProbes ® Reagent; Life Technologies). Developing pollen grains were observed under ultraviolet wavelength (358 nm) using a blue/cyan filter as well as under bright-field with 1% acetocarmine for pollen viability assessment. Pollen viability was also analyzed with fluorescein diacetate (FDA) staining as described previously. For pollen viability test, three replicates each using pollen from six different flowers were used. Observations were made with



a Zeiss Axiocam HRc camera on a Zeiss Axio Imager M1 microscope. For SEM, fresh mature pollen grains were directly observed with a JEOL JSM-7400F High Resolution Field Emission Scanning Electron Microscope in extended vacuum mode.

#### **2.2.4.4 MKKs and MPKs retrieval and RACE**

The DNA sequence of Pollen- and ovule-expressed *MKKs* and *MPKs* were retrieved from a *de novo* ovule and pollen tube transcriptome from *S. chacoense* (Transcriptome Shotgun Assembly, Genbank accession: GDZW00000000). Amino acid sequences from the kinase domains of the *A. thaliana* 10 *MKKs* and 20 *MPKs* were used to screen against the *S. chacoense* transcriptome. The BLAST (tblastn) algorithm was used to compare the *A. thaliana* sequences against the *S. chacoense* database. The matching transcripts were then compared with the NCBI database to ensure their correspondence to true *MKKs* or *MPKs*. Since most of the transcripts lacked a complete 5' or 3' fragment, full-length RNA was obtained using ligase-mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACEs) (GeneRacer Kit, Life Technologies).

#### **2.2.4.5 Directed Yeast-two hybrid assays**

The *ScFRK3* and *ScMPKs* were cloned into the pGBKT7 vector which contains the DNA binding-domain [199] while the *MKKs* were cloned into pGADT7 vector which contain the activation-domain (AD) (Clontech). Individual baits (*ScFRK3* or *ScMKK3*) and preys (respectively all *MKKs* or all *MPKs*) were respectively introduced in the Y2H Gold and Y187 yeast strains. Baits and preys were grown in SD (-)Trp and SD (-)Leu media, mixed in 2X YPAD and incubated for 16 h at 30°C with slow shaking. One to two microliters(L) from each mating was then deposited on selective media ((SD (-)Leu (-)Trp); (SD (-)Leu (-)Trp (-)His (-)Ade (+)Aureobasidin A); (SD (-)Leu (-)Trp (-)His (-)Ade (+)Aureobasidin A (+) 50mM 3AT)) and incubated at 30°C for 3 to 6 days. Yeast two hybrids assays were done in triplicates.

#### **2.2.4.6 Subcellular localization and bimolecular fluorescence complementation assays**

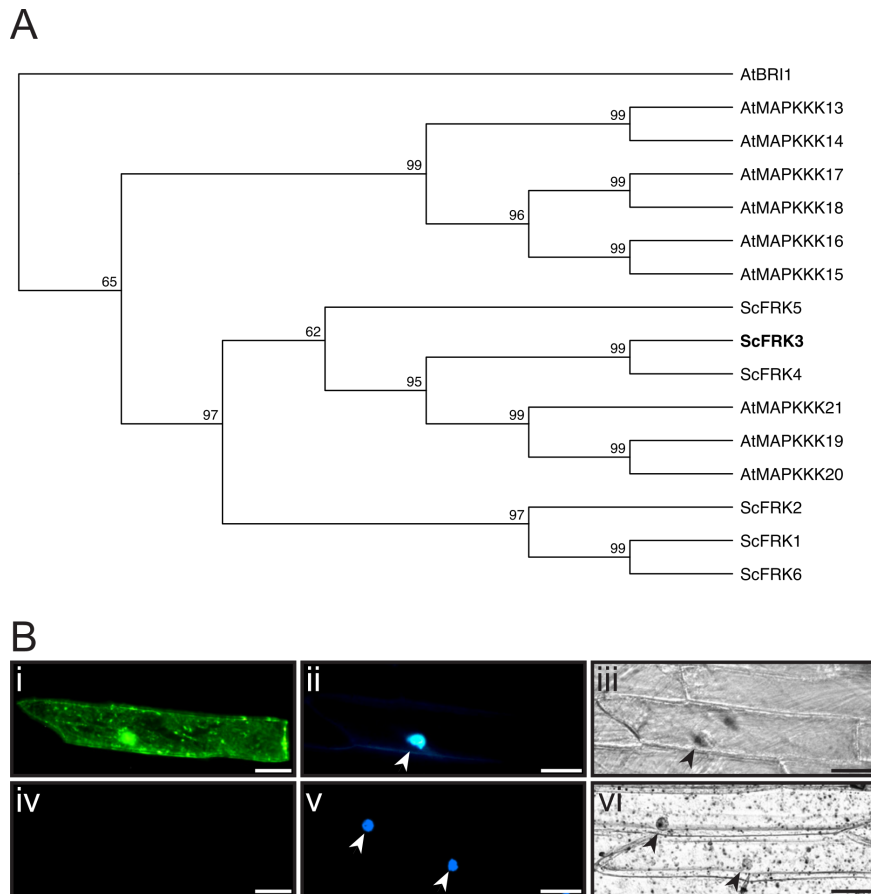
For subcellular localization, *ScFRK3*, *ScMKK3* and *ScMPK13* ORFs were fused to the N-terminus of green fluorescent protein (GFP) using the GATEWAY® technology in the pMDC83 plasmid as the destination vector [211]. For BiFC, pUC-SPYNE and pUC-SPYCE destination vectors were used to fuse the N (pUC-SPYNE) part of the yellow fluorescent protein

(YFP) or the C (pUC-SPYCE) part of the YFP to the C-terminus end of one of the proteins of interest [212]. Tagged proteins were transiently expressed in onion epidermal cells through DNA-coated microparticle bombardment using the Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad). Onion epidermal cells (1 cm<sup>2</sup>) were bombarded with 1.0 μm gold particles from a distance of 9 cm and at a pressure of 1,100 psi. For subcellular localization assays, as well as BiFC interactions, all experiments were done in triplicates with at least 10 fluorescent cells per replicate in order to validate the results.

## 2.2.5 Results

### 2.2.5.1 *ScFRK3, a MEKK related to the Arabidopsis MAPKKK19, 20 and 21*

From the combined *S. chacoense* ovule and pollen tube transcriptome, 21 different MEKKs were isolated with six of them (ScFRK1-6) belonging to the FRK class [174]. Among these, ScFRK3 and 4 are the closest orthologs of the *A. thaliana* MAP3K19, 20 and 21 (**Figure 13**), sharing between 43% and 75% amino acid pairwise identity with those from *A. thaliana*. The FRK class kinase has recently been shown to have largely expanded in solanaceous species [174]. In fully characterized solanaceous genomes, like *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*, their total number (15 and 17 FRKs, respectively) account for more than 40% of the whole MEKKs subfamily. As for other members of the FRK class, ScFRK3 is a small MEKK with a 352 amino acids sequence (39 kD) consisting mainly of a protein kinase domain (from 3-260) and a short C-terminal domain (from 261-352). Unlike ScFRK1 [175], and some other members of the FRK class (36) that are predicted as nuclear proteins, ScFRK3 did not harbor a mono- or bipartite nuclear localization signal. Nonetheless, ScFRK3 was found both in the cytoplasm and the nucleus, even when linked to the GFP fluorescent marker (**Figure 13B**).

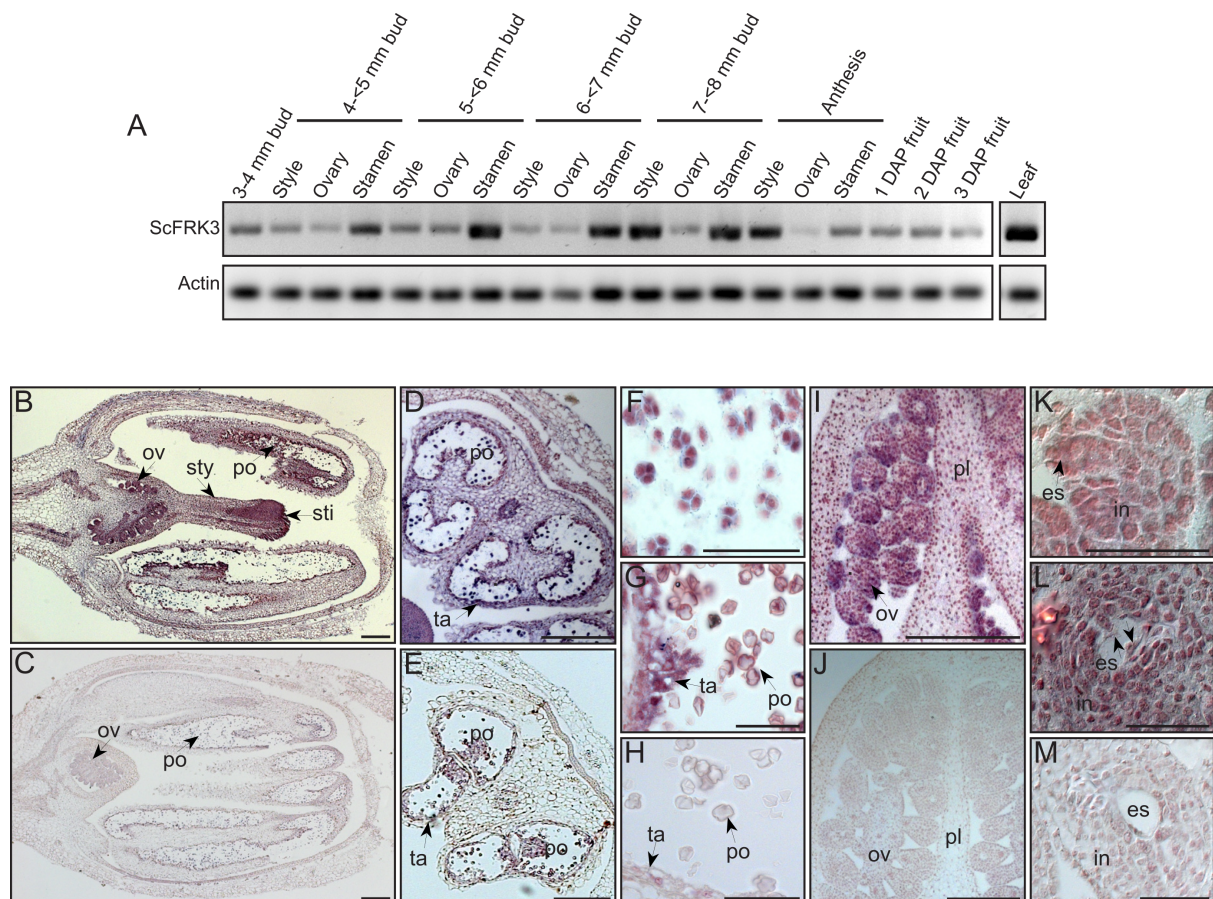


**Figure 13: Phylogenetic positioning of ScFRK3 inside the FRK class and cellular localization.**  
 A. Phylogenetic tree of the ScFRKs (ScFRK1-6) and AtMAP3K13-21 (AtMAPKKK13-21). ScFRK3 and ScFRK4 are the closest orthologs of the *Arabidopsis* AtMAP3K19-21 (MAPKKK19-21). The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the kinase domain of AtBRI1. B. (i) Transient expression of ScFRK3-GFP in onion cells through microparticle bombardment showing the subcellular localization of ScFRK3 in the cytoplasm and nucleus. Nuclear staining of (ii) with Hoechst 33342 DNA stain. (iii) DIC image of (i and ii). (iv-vi) Negative control with (iv) bombardment of empty vector (pMDC83);(v) Nuclear staining of (iv) with Hoechst 33342 DNA stain; (vi) DIC image of v and vi. Arrowhead points to the nucleus. Scale bars: 50  $\mu$ m.

### 2.2.5.2 *ScFRK3* expression pattern suggests a role in reproductive development

It was recently shown that *ScFRK3* was expressed in somatic tissues such as leaves, stems, roots, as well as in flower buds [174], suggesting a role in reproductive development similarly to the two previously described FRK class members, *ScFRK1* and *ScFRK2* [175-177]. To precisely determine in which tissue and developmental stages *ScFRK3* is expressed, semi-quantitative RT-PCRs were performed on flower buds ranging from 3 to 8 mm length, on flowers at anthesis, and on fruits from one to three days after pollination (DAP). As shown in **Figure 14A**, *ScFRK3* is expressed in reproductive tissues of very young buds (3 mm length). While *ScFRK3* expression in ovary remains unchanged at all stages, stylar expression increased

in 7-8 mm buds (corresponding to 1 day before anthesis; 1 DBA). Stamen mRNA expression was the strongest overall with a steep increase in 5-6 mm buds that stayed stable until the day before anthesis. At anthesis stage, stamen expression decreased sharply while stilar expression remained high. *ScFRK3* mRNA was also detected in young fruits, from 1 to 3 DAP. To finely define the *ScFRK3* expression pattern, *in situ* hybridizations were performed on developing flower buds. As shown in **Figure 14B**, *ScFRK3* is expressed in 6 mm whole flower buds, especially in the ovules, pollen and tapetum. *ScFRK3* mRNAs are detected in young pollen, particularly in tetrads (**Figure 14D** and **F**) and young microspores before PMI (**Figure 14G**). Inside the ovary, *ScFRK3* is highly expressed in the ovule compared to the placenta and pericarp (**Figure 14I**), although expression is still lower than in pollen. *ScFRK3* ovular expression is observed in the integument as well as in the young embryo sac. As shown in **Figure 14K** and **L**, *ScFRK3* mRNAs are detected in the ovule at the MMC stage (**Figure 14K**) as well as during the first mitosis of the FG (**Figure 14L**). Taken together, *ScFRK3* expression profile strongly suggests a role in gametophyte development, especially at young developmental stages.



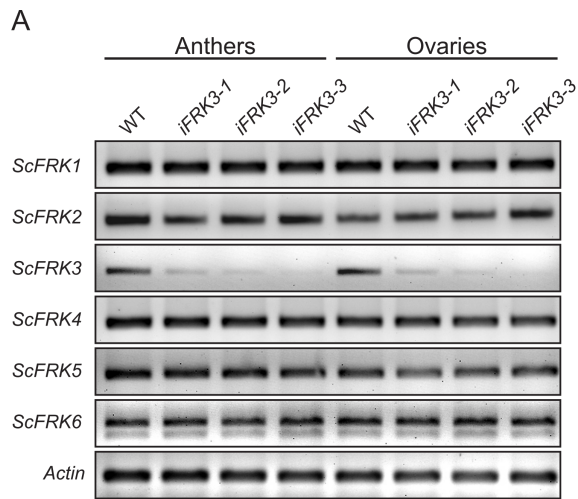
**Figure 14: *ScFRK3* expression pattern in reproductive development.**

**A.** Semi-quantitative RT-PCRs on reproductive tissue using *ScFRK3* specific primers. **B-M.** *In situ* localization of *ScFRK3* transcripts using 50 ng of antisense probe in young flower bud (**B**), young stamen (**D**), pollen at tetrad stage (**F**) and young microspore stage (**G**), inside the ovary

(I), in ovule before FM stage (K) and in ovule after the first mitosis (L). In situ hybridizations using 50 ng of sense probe in young flower bud (C), young stamen (E), young microspore (H), inside the ovary (J) and an ovule after the first mitosis (M). Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  (B-E, I and J) and 50  $\mu\text{m}$  (F-H, K-M). Abbreviations: es, embryo sac; in, integument; ov, ovule; pl, placenta; po, pollen; sti, stigma; sty, style; ta, tapetum; nu, nucleus.

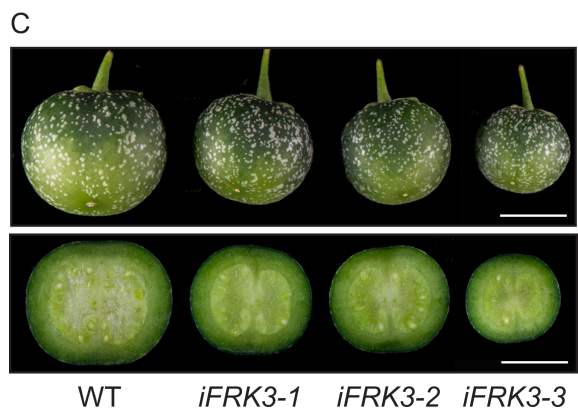
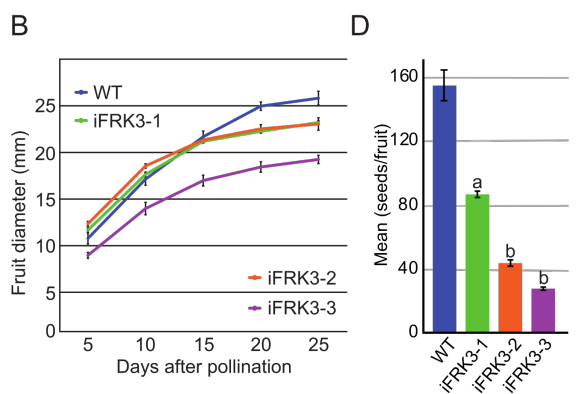
#### **2.2.5.1 *ScFRK3* RNAi plants show reproductive defects**

To elucidate the function of the *ScFRK3* gene, RNAi mutant plants were generated and tested for the downregulation of *ScFRK3* mRNA expression levels. RT-PCRs were performed on stamens and ovules extracted from 6 mm growing buds (**Figure 15A**). Three different lines (*iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3* that showed a significant decrease in *ScFRK3* mRNA levels in anthers and ovule during development were kept for further investigation. Since pairwise nucleotide sequence identity between *ScFRK3* and its five *S. chacoense* closest relatives (**Figure 13**) ranged from 40% to 69%, semi-quantitative RT-PCR analyses were performed to determine whether expression of the other five ScFRK members may be affected by the *ScFRK3* RNAi construct. As shown in **Figure 15A**, RNA expression levels from the five other ScFRKs remained unchanged in all three *ScFRK3* RNAi mutants tested, indicating that the reproductive phenotype observed in *ScFRK3* RNAi lines is linked to the downregulation of the *ScFRK3* gene only. The three *ScFRK3* RNAi lines were then cross-pollinated with a compatible *S. chacoense* accession for fruit size and seed set analyses. Lines *iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3* showed severely reduced fruit size (**Figure 15B** and C). Seed set in these three interference lines was also severely reduced, with a mean ranging from 28 to 87 seeds compared to 155 in WT plants (**Figure 15C** and D).



**Figure 15: *iFRK3* mutants produce smaller fruits and lesser seeds.**

A. RT-PCR analysis of *ScFRK1-6* transcripts on anthers and ovules taken from 6 mm flower buds of WT and *iFRK3* mutant plants. B. Fruits diameters from WT and *iFRK3* mutant lines from 5 DAP to 25 DAP (maturity). Ten fruits per plant lines were used for student test. At 25 days, each *ScFRK3* RNAi mutants showed a significantly different size ( $p < 0.001$ ; student test) compare to the WT. C. Comparison of fruit morphology and seed number of control plants and *iFRK3* mutant. D. Number of seeds per fruit in *ScFRK3* RNAi mutants. Five fruits per plant lines were used for a: student test  $p < 0.02$ ; b: student test  $p < 0.001$ .



### 2.2.5.2 Ovule development is affected in *ScFRK3* RNAi mutants

Since *ScFRK3* expression is detected early on during reproductive development (**Figure 14**) and seed set clearly affected in RNAi *ScFRK3* mutant lines (**Figure 15 C and D**), we microscopically observed gametophytic development on cleared ovules. As for other solanaceous species, *S. chacoense* has a Polygonum-type embryo sac (ES). To determine at which stages the ovule is mostly affected in RNAi mutant lines, ovules from WT and mutant flower buds (from 3 to 8 mm length) were analyzed. The results are summarized in **Tableau 1**.

Microscopic analyses of 3-4 mm WT bud showed high proportion of ovules (red) at the MMC stage, with a low proportion (yellow-white) of ovules beginning the meiosis. In contrary, in 4-5 mm buds the majority of ovule (red) pass the meiosis stage (functional megaspore) and began mitosis. After the three mitosis, an eight nuclei ES (FG5-FG6) is observed in 6-7 mm buds. Central cell karyogamy, cellularization and antipodal cells degeneration are the final steps of ES maturation (FG7), occurring generally in 7-8 mm buds, approximately one day prior anthesis. These three steps are grouped together and represented by Mat (for maturation) in **Tableau 1**. Ovules from the three *iFRK3* mutants started to develop normally but, unlike in WT, most of ES did not progress further than the functional megaspore stage (FM) (represented in red compartments, **Tableau 1**). A small proportion of the ES, however, displayed delayed development, and could progress through one, two or the three mitosis. **Figure 16A** shows the proportion of normal ES (black), degenerated ES (dark grey) and ES that were stopped during one of the mitosis stages (light grey) in *iFRK3* mutants and WT flowers at anthesis. In mature flowers, 93% of WT ES were normal while only 52%, 46% and 22% of *iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3* ES were normal, respectively. In contrast, only 6% of WT ES were completely degenerated, compared to 43%, 45% and 69% in *iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3*, respectively. Typical phenotypes presented in *iFRK3* mutants are shown in **Figure 16 (B-I)**. **Figure 16** shows that the FM development is not affected in *iFRK3* mutants (**Figure 16B** and **C**), unlike the first mitosis step or FG2 (**Figure 16D** and **E**), leading to the degeneration of the female gametophyte in mature flowers (**Figure 16F-I**). These results suggest that *ScFRK3* is involved in female gametophyte development.

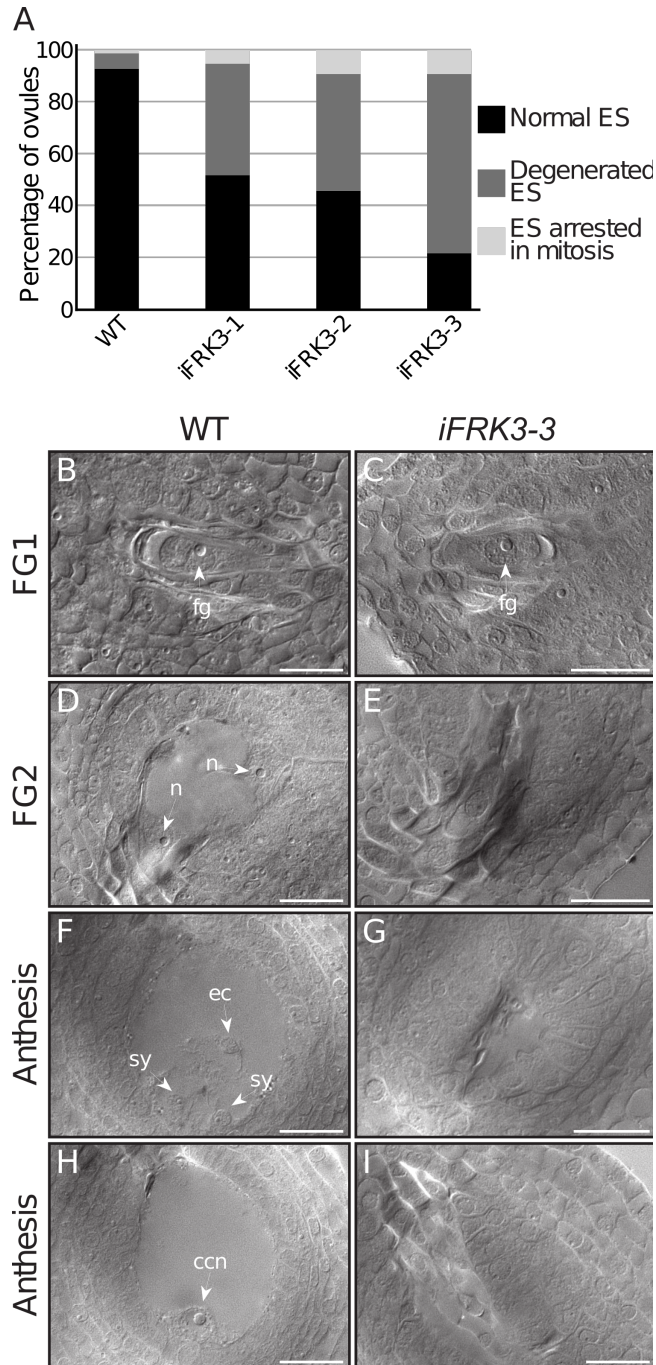


**Tableau 1: Correlation between ovule development stages and bud size in WT and *iFRK3* mutants.**

Genotype	Bud size (mm)	P	MMC	D	T	FM	MI	MII	MIII	Mat	ES	Dg	Tot
WT	3 - 4	13	52	18	10	5	2						100
	4 - 5				3	43	43	8	2			1	100
	5 - 6				1	29	38	23	5	3		1	100
	6 - 7					7	16	23	23	28		3	100
	7 - 8						3	2	10	37	41	7	100
<i>iFRK3-1</i>	3 - 4		75	17	8								100
	4 - 5			1	21	59	7					12	100
	5 - 6				3	50	16	6				25	100
	6 - 7				3	27	17	14	4	8		27	100
	7 - 8					18	17	6	1	30	9	20	100
<i>iFRK3-2</i>	3 - 4	2	68	17	9	4							100
	4 - 5				29	55	4					12	100
	5 - 6				3	63	25					9	100
	6 - 7				1	43	30	9	1			16	100
	7 - 8				2	30	5	14	6	13	8	22	100
<i>iFRK3-3</i>	3 - 4		70	21	6	3							100
	4 - 5				26	55	19						100
	5 - 6				9	50	12	1				28	100
	6 - 7				1	30	19	7		3		40	100
	7 - 8					20	18	6	6	4	3	43	100

P: Primordium; MMC: Megaspore Mother Cell; D: Dyad; T: Tetrad; FG: Functional Megaspore, MI: Mitosis I; MII: Mitosis II; MIII: Mitosis III; Mat: Embryo sac Maturation; ES: Embryo Sac; Dg: Degenerated; Tot: Total of ovules observed. Expression levels are shown on a color scale with red indicating strong proportion of ovule, yellow for low proportion of ovule, and white with no ovule at a given stage





**Figure 16: Ovule phenotyping in *iFRK3* mutants.**

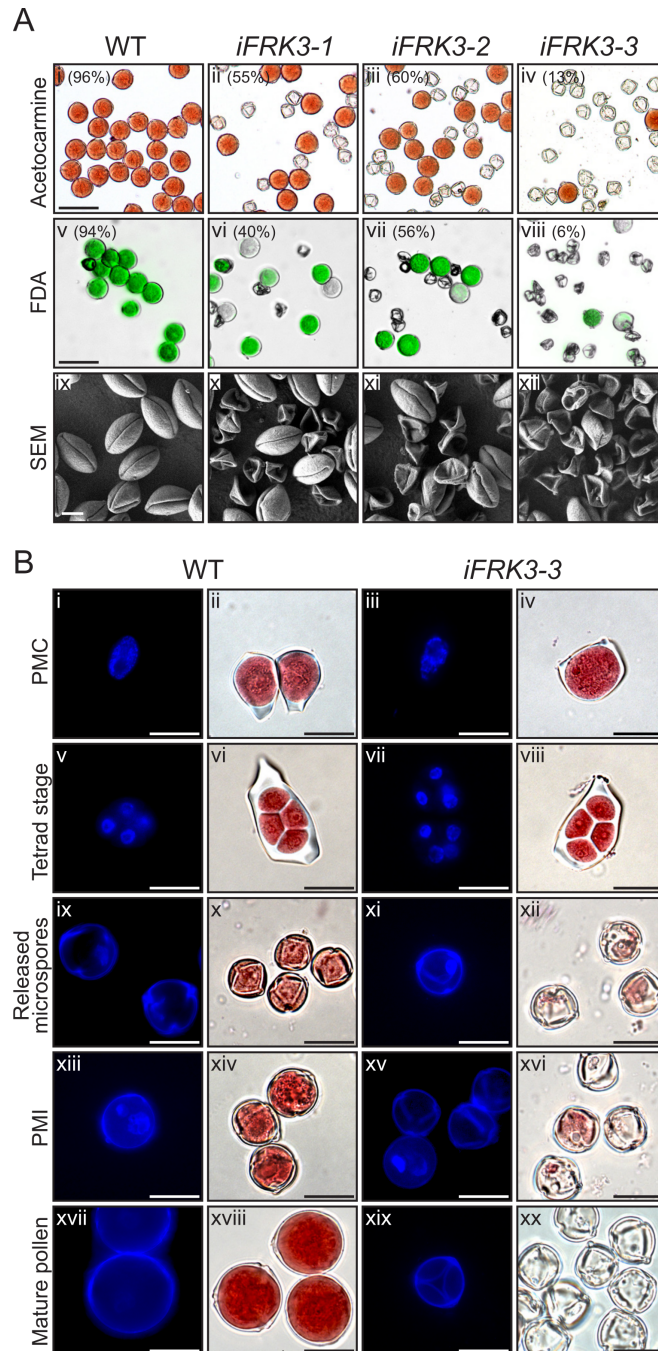
A. Percentage of normal embryo sacs, degenerated ES (dark gray) and ES arrested during mitosis stages (light gray) from anthesis flowers in WT and *iFRK3* mutants. B-I. DIC images of developing ovules in WT and *iFRK3-3* mutant plants. Ovule at the FG1 stage in WT (B) and *iFRK3-3* mutant flowers (C). Ovule at first mitosis stage (FG2) in WT (D) and degenerating in *iFRK3-3* mutant plants (E). Mature ovule in WT (F and H) and in *iFRK3-3* mutant flowers (G and I). F and H are different Z-stack planes of the same ovule. Abbreviations: ccn, central cell nucleus; ec, egg cell; fg, functional megaspore; n, nuclei; sy, synergids. Scale bars: 20  $\mu$ m.

### 2.2.5.3 Pollen development and viability are also affected in *ScFRK3* RNAi lines

Since *ScFRK3* mRNAs were detected in stamen, pollen viability was also analyzed in *iFRK3* mutants. Pollen from WT, *iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3* mature flowers were stained with 1% acetocarmine solution, and viable as well as non-viable pollen grains were counted. As displayed in **Figure 17A**, 96% of WT pollen grains were viable, compared to 55%, 60%, and 13% in *iFRK3-1*, *iFRK3-2* and *iFRK3-3* respectively. With the acetocarmine staining method, viable pollen grains are round and evenly stained in pink (**Figure 17A**, i-iv), while dead pollen grains are smaller, translucent and mostly deformed. For more accuracy, fluorescein diacetate (FDA) staining was also used to analyze pollen viability in WT and *iFRK3* mutants (**Figure 17A**, v-viii). In comparison to WT, around half of the pollen grains were considered dead, failing to show FDA fluorescence in *iFRK3-1* and *iFRK3-2* mutants. For *iFRK3-3*, only 6% of the pollen grains showed FDA fluorescence and were considered alive. To analyze the ultrastructure of pollen defects in *iFRK3* plant lines in more details, pollen grains were observed by scanning electron microscopy. Normally, *Solanum chacoense* pollen grains consists of three equally distributed apertures that run longitudinally to the pollen axis. However, *iFRK3* mutants produced numerous shriveled and collapsed pollen grains (**Figure 17A**, ix-xii). As was observed for ovule development, pollen viability phenotype was also more severe in the *iFRK3-2* and *iFRK3-3* line.

To determine when exactly pollen development was affected in *ScFRK3* disrupted plants, pollen viability assays and DNA staining were performed on developing WT and mutant pollen. A comparison between WT and *iFRK3-3* plants is shown in **Figure 17B**. At the PMC stage, pollen mother cells from WT and *iFRK3-3* plants were fully viable, as observed by acetocarmine staining (**Figure 17B**, i-iv). Next, at the microspore tetrad stage, pollen from both WT and *iFRK3-3* plants had fully undergone meiosis (**Figure 17B**, v-viii), including microspore release (**Figure 17B**, ix-xii). As the microspores grew, PMI occurred normally in the WT and produced a two-celled pollen grain, the vegetative and the germ cells (**Figure 17B**, xiii and xiv). In contrast to WT pollen, PMI did not occur in most pollen grains in the *iFRK3-3* mutant, already starting to collapse and die (**Figure 17B**, xv-xvi). WT mature pollen grains (**Figure 17B**, xvii and xviii) were fully viable as observed with by acetocarmine staining, while pollen grains from *iFRK3-3* mutants were mostly dead (**Figure 17A**, iv and **Figure 17B**, xix and xx). The few remaining pollen grains that could go through PMI grew successfully to maturity, as was

observed for WT pollen. These results show that *ScFRK3* is involved not only in the female gametophyte, but also on the male side, in pollen development.



**Figure 17: Pollen phenotyping in *iFRK3* mutants.**

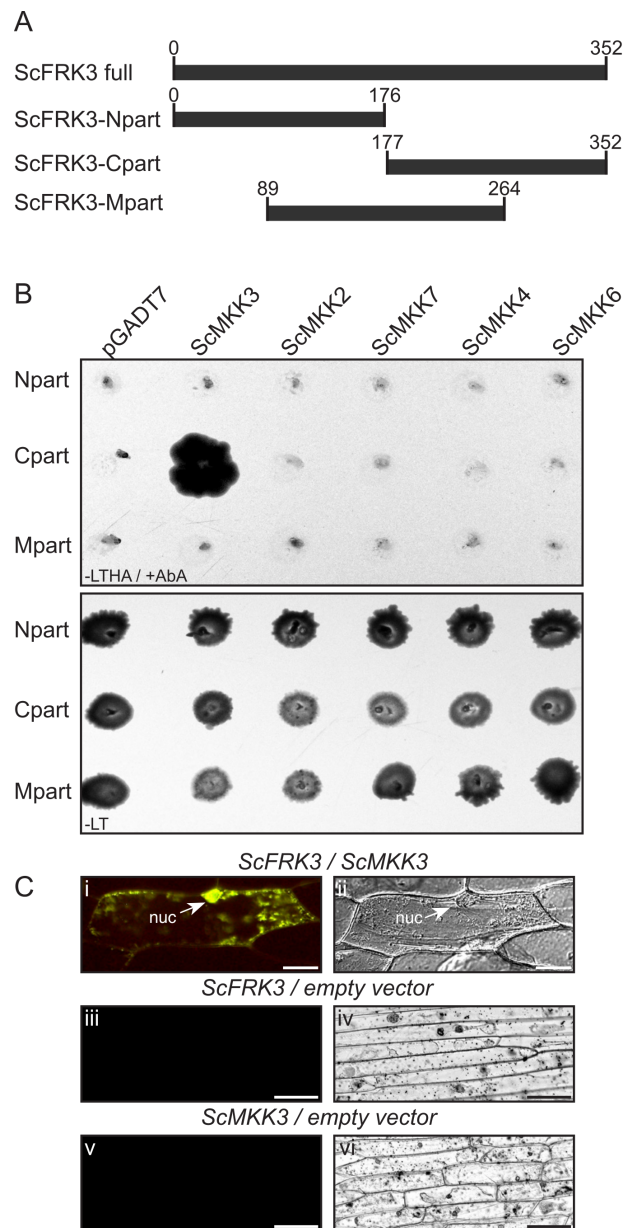
A. The pollen grains were examined by acetocarmine staining (i-iv), fluorescein diacetate (FDA) staining (v-viii) and scanning microscopy, respectively (ix-xii). For acetocarmine and FDA scale bars: 50  $\mu$ m. For SEM scale bars: 10  $\mu$ m. B. Pollen development phenotyping using Hoechst 33342 DNA stain (i, iii, v, vii, ix, xi, xiii, xv, xvii and xix) and acetocarmine staining (ii, iv, vi, viii, x, xii, xiv, xvi, xviii and xx) in WT (i, ii, v, vi, ix, x, xiii, xiv, xvii and xviii) and *iFRK3-3* mutant (iii, iv, vii, viii, xi, xii, xv, xvi, xix and xx) plants. PMC stage (i-iv). Tetrad stage (v-viii). Released microspores (ix-xii). Microspores after PMI (xiii-xvi). Mature pollen (xvii-xx). Scale bars : 20  $\mu$ m.

#### 2.2.5.4 *ScFRK3* interacts with *ScMKK3*

In the MAPKKK family, *ScFRK3* is classified as a MEKK subfamily kinase, thus its involvement in a canonical MAPK signaling pathway is expected. To reconstitute a three tier kinase module with *ScFRK3* acting as the upstream kinase, yeast-two hybrid (Y2H) assays were performed with the *ScMKKs* and *ScMPKs* found in the *S. chacoense* combined ovule and pollen transcriptome. Using the 10 *MKKs* and the 20 *MPKs* from *A. thaliana* to screen the *S. chacoense* transcriptome, five *ScMKKs* and 16 *ScMPKs* were retrieved (See Annexes 1: **Tableau 3**). A phylogenetic analysis for both *S. chacoense* *MKKs* (Annexes 1: **Figure 33**) and *MPKs* (Annexes 1: **Figure 34**) was performed to assign their closest ortholog (s) in *A. thaliana* and *Solanum lycopersicum*. All *ScMPKs* expressed in the combined pollen and ovule transcriptome had clear orthologs in tomato, while three others (isotigs 27038, 27937 and 36598) which could not be clearly assigned among the 20 *AtMPKs* (Annexes 1: **Tableau 3** & **Figure 34**).

Directed Y2H assays were then performed using *ScFRK3* fused to the binding domain [199] as bait and all *ScMKKs* from our combined pollen and ovule transcriptome were fused to the activation domain (AD) as preys. Since the full version of *ScFRK3* was interacting with all preys, including the negative control (pGADT7, empty vector, not shown), three different versions of the *ScFRK3*-pGBKT7 constructs were made (**Figure 18A**). The N-terminal construct (*ScFRK3*-Npart), comprised amino acids 1 to 176, the middle part (*ScFRK3*-Mpart) comprised amino acids 89 to 264, while the *ScFRK3* C-terminal part (*ScFRK3*-Cpart) comprised amino acids 177 to 352. While none of the separate *ScFRK3* constructs interacted with the empty vector (pGADT7), the *ScFRK3*-Cpart interacted only with isotig15708, which was renamed *ScMKK3*, being the closest ortholog to the *Arabidopsis* *MKK3* (**Figure 18B**). This interaction was exclusive since only the *ScFRK3*-Cpart interacted with *ScMKK3*, while the *ScFRK3*-Npart and -Mpart did not interact with any *ScMKKs*. The *ScFRK3*-*ScMKK3* interaction was also confirmed *in vivo* in onion epidermal cells using BiFC assays. When *ScFRK3*-NYFP and *ScMKK3*-CYFP were co-expressed in onion cells, fluorescence was observed inside the nucleus and in the cytoplasm (**Figure 18C**, i and iii). Moreover, the expression pattern of *ScMKK3* was verified by semi-quantitative RT-PCR using specific primers and was found to be expressed in somatic as well as reproductive tissues (style, ovary, stamen and buds) (Annexes 1: **Figure 35A**), overlapping the *ScFRK3* expression pattern. As for

ScFRK3, ScMKK3-GFP alone was also localized inside the nucleus and the cytoplasm (Annexes 1: **Figure 35B**, i and ii). Taken together, these results suggest that ScFRK3 interacts with ScMKK3 in both the nucleus and cytoplasm.



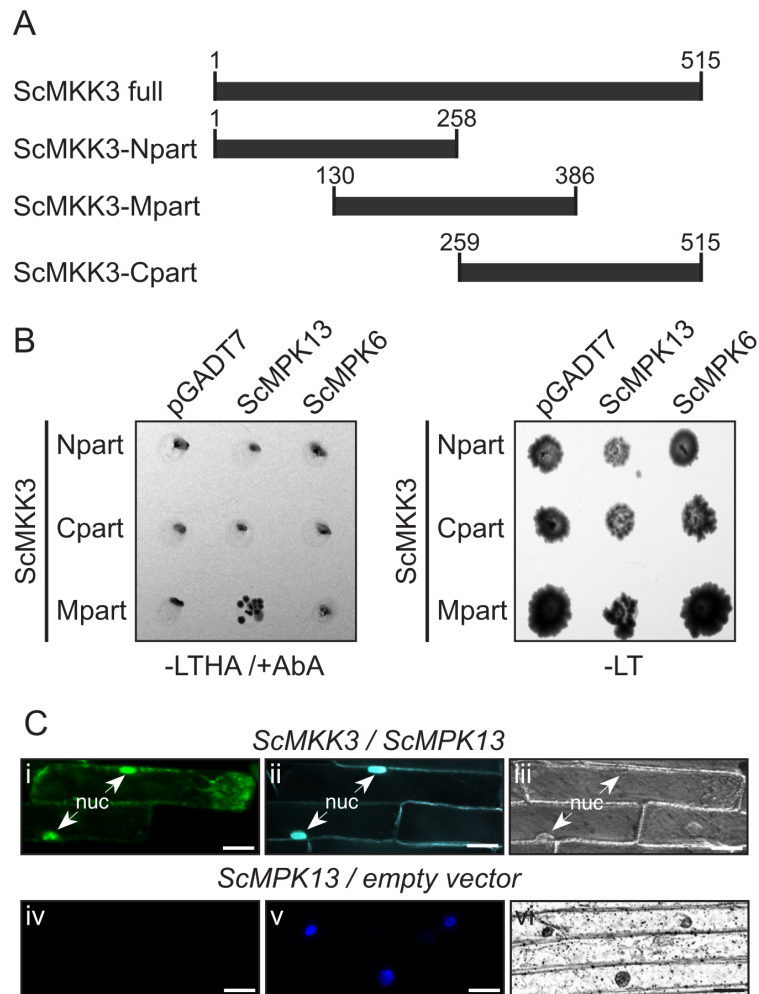
**Figure 18: ScFRK3 interacts with the MAP kinase kinase ScMKK3.**

A. Diagram showing the three different constructs made in pGBKT7 with ScFRK3 as the insert. B. Directed Y2H assays between the three ScFRK3-pBKT7 constructs and the five ScMKKs found in the *S. chacoense* transcriptome. The only positive interaction is shown between ScFRK3-Cpart and ScMKK3. -LTHA/+AbA: Y2H media without leucine, tryptophan, histidine, adenine and with aureobasidin A; -LT: Y2H media without leucine and tryptophan. C. (i) The interaction between ScFRK3 (35S::ScFRK3-YFPN) and ScMKK3 (35S::ScMKK3-YFPC) is confirmed by BiFC in onion cells. (iii) 35S::ScFRK3-YFPN and 35S::YFPC only (empty vector) used as negative control. (v) 35S::ScMKK3-YFPN and 35S::YFPC only (empty vector) used as negative control. (ii, iv, vi) All BiFC interactions were done in triplicates with at least 10 fluorescent cells per replicate. DIC image of i, iii and v. Scale bars : 50  $\mu$ m.

## 2.2.6 ScMKK3 interacts with ScMPK13

To identify MPK(s) that could act downstream of ScMKK3 and form a possible signaling cascade downstream of ScFRK3, directed Y2H assays were performed using ScMKK3 fused to the AD as bait, and all 16 ScMPKs from our combined pollen and ovule transcriptome fused to the BD as preys [174]. Since the full version of ScMKK3 was interacting with all ScMPKs preys as well as the negative control vector (pGADT7, empty vector, not shown), three new versions of ScMKK3 were produced. The ScMKK3 constructs are shown in **Figure 19A**. Amongst the 16 ScMPKs, none interacted with the ScMKK3-N and -C parts while only one interacted with the ScMKK3-Mpart, the *S. chacoense* isotig37333 (**Figure 19 B**). None of the other 15 ScMPKs, nor the negative control, grew on -LTHA/+AbA selective media (not shown except for isotig37161, since the 14 others were also negative). When compared to the *A. thaliana* MPKs, the closest ortholog of isotig37333 was clearly the *A. thaliana* MPK13 with 77 % identities between proteins (Annexes 1: **Figure 34**), thus, isotig37333 was renamed ScMPK13 to follow the *A. thaliana* nomenclature. The Y2H interaction between ScMKK3 and ScMPK13 was also confirmed by *in vivo* complementation assays using BiFC in onion epidermal cells (**Figure 19C**). Yellow fluorescence was observed in the nucleus and cytoplasm of cells co-expressing ScMKK3-CYFP and ScMPK13-NYFP. Like most MPKs (47), ScMPK13-GFP is localized in the nucleus and in the cytoplasm (Annexes 1 : **Figure 35iii**). Thus, the above-mentioned results strongly suggest that ScMKK3 and ScMPK13 interact together in a potential signaling cascade downstream of ScFRK3. As expected, RT-PCR analysis showed that ScMPK13 is also expressed in buds, and in other reproductive tissues (Annexes 1: **Figure 35A**), overlapping the ScFRK3 and ScMKK3 expression patterns, supporting the hypothesis that ScFRK3-ScMKK3-ScMPK13 form a likely three-tiered MAPK cascade.





**Figure 19: ScMKK3 interacts with the MAP kinase ScMPK13.**

A. Diagram showing the three different constructs made in pGBKT7 with ScMKK3 as the insert. B. Directed Y2H between the three constructions of ScMKK3-pBKT7 and two ScMPKs. The only positive interaction is shown between ScMKK3-midpart and ScMPK13. C. (i) The interaction between ScMKK3 (35S::MKK3-YFPC) and ScMPK13 (35S::MPK13-YFPC) is confirmed by BiFC in onion cells. (iv) 35S::MPK13-YFPC and 35S::YFPN only (empty vector) used as negative control. (ii, v) All BiFC interactions were done in triplicates with at least 10 fluorescent cells per replicate. Nuclear localization confirmation with the Hoechst 33342 DNA stain. (iii, vi) DIC image of i and ii, and iv and v, respectively. Scale bars: 50  $\mu$ m.

### 2.2.7 Discussion

Plant genomes harbor the largest MAPK family within the eukaryotes, suggesting major roles and a wide involvement in various biological processes. Here, we introduced ScFRK3, a *Solanum chacoense* MAPKKK within the MEKK family. ScFRK3 is part of the FRK class (Fertilization-related kinases) of which two other members have been previously characterized [175-177]. The FRK class is a monophyletic group inside the MEKK subfamily that appeared within the Angiospermae and has largely expanded within the Solanaceae family [174]. The

FRK class can be further subdivided into 4 groups. Compared to *A. thaliana* (Brassicaceae) and *Gossypium raimondii* (Malvaceae), that respectively have three and two FRK class kinases, *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* (Solanaceae) possess 15 and 17 members, respectively. Furthermore, of the four FRK groups found in haploid genome in Solanaceae, *A. thaliana* and *G. raimondii* only harbor one, group 4, the most ancient group in dicots [174].

The highly specific tissue expression for the first two FRKs characterized, and the phenotypes observed in *ScFRK2* overexpression plant lines [176, 177] and RNAi down-regulated *ScFRK1* lines [175], showed that these kinases play important roles in reproductive tissues, suggesting that other members of the FRK class might also play roles in reproductive development. The current analysis of the *ScFRK3* gene supports this hypothesis. As for *ScFRK1* and 2, *ScFRK3* is expressed in developing ovules and stamens, which is consistent with the developmental defects observed in both male and female gametophytes in *ScFRK3* down-regulated RNAi mutants. But, in contrast to *ScFRK1* and *ScFRK2*, *ScFRK3* is also expressed in leaves to similar levels than in reproductive tissues, while no obvious leaf phenotype could be observed in RNAi lines that showed severe reproductive defects. Since no single mutants could be rescued by the other FRKs, *ScFRK1*, 2 and 3 are clearly not genetically redundant. Considering that the amino acid pairwise identity between *ScFRK1* to 3 ranges from 32 to 42% (48 to 57% nucleotide identity from the ORF), it is not surprising that RNA interference using *ScFRK3* did not affect levels of the other 5 *ScFRKs*, as shown in **Figure 15**. Furthermore, although *ScFRK1* to 3 are expressed in both male and female reproductive tissues, their respective mRNA expression does not follow the same pattern. *ScFRK1* mRNA expression is detected very early on during ovule and pollen development, in the integument and megaspore mother cell (MMC) and in pollen mother cells (PMC), respectively. Before anthesis, *ScFRK1* mRNA levels increase in ovaries to reach a maximum around anthesis, where strong accumulation of *ScFRK1* mRNAs can be observed in the integument, the synergids and egg cell. In the absence of pollination, *ScFRK1* mRNA levels slowly decrease, being still high 72 h after anthesis. Pollination and fertilization have drastic effects on *ScFRK1* mRNA accumulation with a steep decrease already 12 h after pollination, and an almost complete absence of *ScFRK1* mRNAs at fertilization [175]. On the contrary, *ScFRK2* mRNA levels are very weak in all tissues tested and almost undetectable in mature ovaries, where they increase dramatically after fertilization [177]. *ScFRK3* mRNAs, however, are more abundant in developing stamens than in developing ovules. *ScFRK3* RNA level is slightly higher in ovules of 5-6 mm buds and decreases to reach undetectable expression (in RT-PCR) at anthesis, while expression is still detected in stamens. Weak expression is still detected after pollination and in



developing fruits. In situ hybridization confirmed the RT-PCR results, showing that *ScFRK3* is expressed strongly in developing pollen (tetrads and microspore) as well as in the anther tapetum, and is also expressed in young ovules, at lower levels.

Unlike the other two FRKs characterized previously, *ScFRK3* is found both in the cytoplasm and the nucleus, where it possibly initiates its signaling cascade. Yeast two hybrid screens revealed that only *ScFRK3* (**Figure 18**), and not *ScFRK1* nor *ScFRK2* (data not shown), could interact with *ScMKK3*. Although the full length *ScFRK3* proteins sequence interacted with all preys and the negative control, segmentation the protein in three parts showed that only the *ScFRK3* C-terminal part interacted with *ScMKK3* (**Figure 17**). Using Y2H, the interaction between *AtMAP3K20* and *AtMKK3* showed that the *AtMAP3K20* C-terminal part comprised a motif enabling a strong interaction with the *AtMKK3*, supporting the interaction between *ScFRK3* and *ScMKK3* in *S. chacoense* [213]. Furthermore, fine dissection of the *AtMAP3K20* C-terminal part pinpointed to a smaller segment that is also present in *AtMAP3K19* and *21* as well as *ScFRK3* and *4* (Annexes 1:**Figure 36**). This segment encompassed a typical DEF mammalian MAP kinase docking site (Docking site for ERK, FXFP), strongly supporting its interaction with *ScMKK3*. Such DEF domains are generally characterized by an FXF where X can be (P/D/E)) motif located between 6 and 20 amino acids C-terminal to the (S/T)-P phosphoacceptor site [214]. Of the 16 *ScMPKs* retrieved from the *S. chacoense* pollen and ovule transcriptome, only one, isotig37333 renamed *ScMPK13*, being closest to the *A. thaliana* *AtMPK13*, interacted with *ScMKK3* (**Figure 19**). Both *ScMKK3* and *ScMPK13* genes are also co-expressed in the same tissues as *ScFRK3* (compare **Figure 14A** and Annexes 1:**Figure 35A**). Furthermore, BiFC assays showed that *ScFRK3* co-localized with *ScMKK3* (**Figure 18C**), and *ScMKK3* with *ScMPK13* (**Figure 19C**), both in the cytoplasm and the nucleus, suggesting the possibility of a unique signaling cascade specific to *ScFRK3*, involving *ScMKK3* and *ScMPK13*.

In *A. thaliana*, several mutants have been identified by their defects in gametophyte development, especially in both male and female mitosis steps. For example, some proteins associated with microtubules and cytokinesis, like TIO in the male gametophyte, are crucial for male and female mitosis [32, 34]. One exception is the potential signaling cascade involved in PMI, which starts with HINKEL and TETRASPORE acting as receptor/sensor, transmitting signals to the MAPK cascade (ANP1-3 - MKK6 - MPK4) to phosphorylate MAP65 and other MAPs involved in microtubule organization [36]. On the female side, despite all the mutants blocked in FG1 stage, no potential signaling cascade has yet been uncovered. For example,

AtKin-1, a kinesin involved in microtubule dynamics and FG mitosis, also play roles in long-distance transport of organelles, vesicles and chromosomes. Yet no interacting partner has been found [195]. In ES maturation, the CKI1 histidine kinase has been shown to act upstream of the MYB119 transcription factor, which expression level is lower in *CKI* mutants [215]. Similarly, no intermediate proteins have yet been uncovered in this pathway.

Recently, a tomato MAPK from group D, *SIMP*K20, was shown to regulate pollen development after meiosis, with no effect on the maternal side [182]. Another tomato MAPK, *SIMP*K7, orthologous to *AtMPK4*, both classified in MAPK group B, like *ScMPK13*, have been reported as actors in tapetum and early pollen development [181]. Here, we showed the involvement of the ScFRK3 in gametophyte development, a MAPKKK clearly acting in both male and female gametophyte development, that interacted only with ScMKK3. Our protein-protein interaction results suggest that the ScFRK3-ScMKK3-ScMPK13 could be a bona fide three-tiered cascade involved in plant gametophyte development. Further genetic analysis of the two downstream kinases from *ScFRK3* should reveal the full role of this new cascade.

### 2.2.8 Conclusions

The present study on the MAPKKK ScFRK3 confirmed the implication of the ScFRK family in reproductive development. The *ScFRK3* showed strong expression during anther and ovary development, specifically in the male and female gametophyte, hence *ScFRK3* RNAi mutant plants showed severe defects in reproduction, with embryo sac and pollen development arrested before mitosis I. Protein-protein interaction assays also suggested a three-tiered MAPK cascade with ScFRK3-ScMKK3-ScMPK13. This study reinforces the important role of MAPK kinase cascades in the development of reproductive tissues in plants.

### 2.2.9 Declarations et funding

Acknowledgements C.D. was a recipient of PhD fellowships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT). D.P.M. acknowledges the support of a Université de Montréal Research Chair in Functional Genomics and Plant Signal Transduction. Funding For this work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2014-03883). Contigs assemblies can be downloaded from the NCBI Shotgun

Assembly Sequences: Genome (WGS) and Transcriptome [216] at the following URL:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=GDZX01>

### **3 La ScFRK2 est impliquée dans le développement du sac embryonnaire chez *Solanum chacoense*.**

---

#### **3.1 La *Solanum chacoense Fertilization-Related Kinase 2* est nécessaire pour le développement des gamétophytes femelles.**

Mazin Benjamin Damien

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,  
Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

##### **3.1.1 Préambule**

La *Fertilization-Related Kinase 2* est nécessaire pour la formation des gamétophytes mâles et femelles. La surexpression de *ScFRK2* conduit une petite partie des primordiums ovulaires à se développer en structure carpéloïde.

##### **3.1.2 Sommaire**

Le chapitre II vient appuyer l'hypothèse que le sous-groupe des *Fertilization-Related Kinase* (FRK) est requis pour le développement des gamétophytes mâles et femelles chez *S. chacoense*. L'utilisation des méthodes de transgénèse a permis de démontrer que deux des ScFRK, *ScFRK1* et *ScFRK3*, sont nécessaires pour le développement du sac embryonnaire. En effet, la diminution de l'expression de l'une d'entre elles, entraîne l'arrêt du développement des ovules au stade mégaspore fonctionnel. La surexpression de la *ScFRK2* (OX-*ScFRK2*) dans l'ovaire produit des fruits plus petits contenant trois fois moins de graines que le fruit sauvage. Cette différence semble être expliquée par la conversion d'ovules en structures carpéloïdes. Nous démontrons dans ce chapitre que les structures carpéloïdes ne représentent que 10 % des ovules chez les lignées transgéniques OX-*ScFRK2*. Elles ne permettent donc pas d'expliquer entièrement la diminution du nombre de grains par fruit. L'observation des sacs embryonnaires à l'anthèse, des ovules n'ayant pas subi de conversion, montrent que dans 66 % à 76 % des cas, ils sont dégénérés. L'étude du développement des sacs embryonnaires démontre qu'un grand nombre de gamètes n'arrivent pas à progresser en mitose I et sont bloqués au stade mégaspore

fonctionnelle comme lors de la diminution d'expression de *ScFRK1* et *ScFRK3*. Le chapitre III permet d'approfondir les connaissances sur la *ScFRK2* lors de la formation du gamétophyte femelle chez *Solanum chacoense*.

### **3.2 The *ScFRK2* mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) is involved in early embryo sac development in *Solanum chacoense*.**

Benjamin Damien Mazin, Valentin Joly and Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

Publié dans *Plant Signaling & Behavior* (2019)

DOI: 10.1080/15592324.2019.1620059

#### **3.2.1 Apport original**

Benjamin Mazin est l'instigateur principal de l'article. Il a réalisé l'ensemble des expériences décrites et a aussi rédigé l'article.

Valentin Joly a aidé à la conception des figures et la mise en page de l'article. Il a contribué à l'écriture et la correction de l'article.

Daniel P. Matton a supervisé et subventionné les travaux. Il a aussi contribué à l'écriture et à la correction de l'article.

#### **3.2.2 Abstract**

Fertilization-Related Kinases (FRK) are a group of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K or MEKK) that has proliferated in Solanaceae species. Studies on the wild potato *Solanum chacoense* have shown that three *ScFRKs* are directly involved in female gametophyte development. Decreasing the expression of *ScFRK1* and *ScFRK3* by RNA interference lead to embryonic sac development arrest at the functional megaspore stage. As for *ScFRK2*, the first FRK studied, antisense and co-suppression lines showed no abnormality, while overexpression lines lead to a drastic decrease in seed numbers, presumably caused by a conversion of the ovule into a carpel-like structure. Here we show that in *ScFRK2* overexpression lines carpel-like structures from the ovule cannot explain the drastic decrease in seeds considering the low percentage of these carpel-like structures, but interferes in early

ovule development as observed in *ScFRK1* and *ScFRK3* knock-down mutants where most ovules are arrested at the functional megaspore stage. The highly similar phenotype from knock-down mutants (*ScFRK1* and *ScFRK3*) and *ScFRK2* overexpression lines suggests that these MAP kinases could operate antagonistically through a balance between *ScFRK1* and 3 on one side and *ScFRK2* on the other. This study strongly suggests the importance of the FRK family expression levels during early stages of ovule development in *S. chacoense* embryo sac.

**Keywords:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases (MAP3Ks), Fertilization-Related Kinases (FRKs), ovule development, *Solanum chacoense*.

### 3.2.3 Introduction

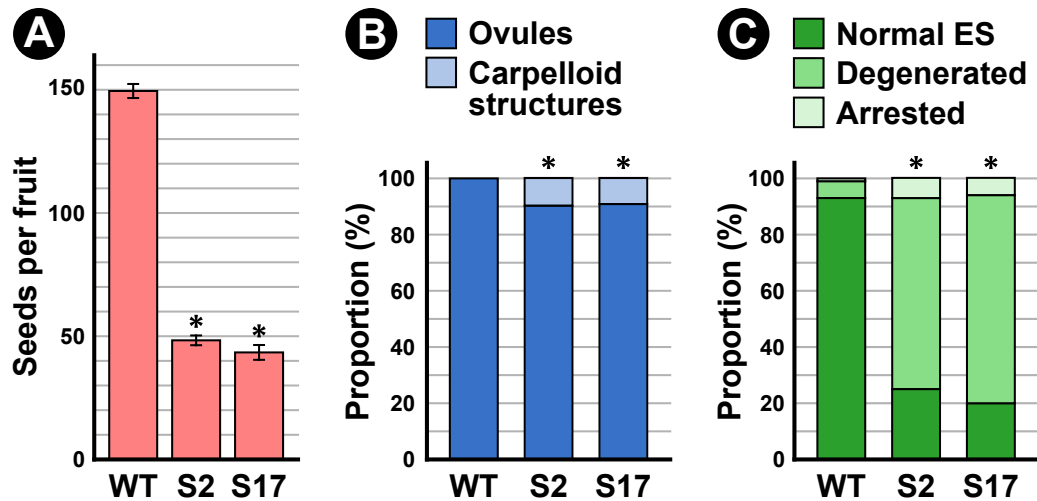
In flowering plants, the female gametophyte (FG)—also known as the embryo sac (ES) or megagametophyte—is the ovular structure targeted by the pollen tube to achieve double fertilization. Its biological importance and its exquisite structure have made it a model system for the study of cell specialization, cell-cell communication, and programmed cell death [46]. In the ovary, the FG development starts with the meiotic division of a megaspore mother cell (MMC) into four haploid cells, of which three degenerates, leaving a single functional megaspore (FM), which undergoes three mitotic divisions producing eight non-cellularized nuclei which will eventually migrate and be compartmentalized into an oosphere, a central cell, two synergid cells, and three antipodal cells. The success of this complex developmental program relies on a constant and dynamic cell signaling networks [45].

Protein kinases play an essential role in signal transduction in eukaryotes, and several of them were shown to be involved in ovule development. For instance, *TWO-IN-ONE*, a kinase from the FUSED family, is required for proper ES cellularization [32], while the CYTOKININ INDEPENDENT 1 histidine kinase, an activator of cytokinin signaling, controls the specification of the central cell [65]. In solanaceous species, the development of reproductive structures involves mitogen-activated kinase kinase kinase (MAP3K) proteins from the FERTILIZATION-RELATED KINASE (FRK) family [174]. In *Solanum chacoense*, three closely related genes from this family, *ScFRK1*, *ScFRK2* and *ScFRK3*, are expressed in developing embryo sac and in ovule integument (Solanaceae have unitegmic ovules), starting at the MMC stage. The expression of *ScFRK1* is maintained until the final mature ES stage, and eventually concentrates in the egg cell and synergids [175], while *ScFRK2* and *ScFRK3* are expressed until the first mitosis only [177, 217]. All *ScFRK1* and *ScFRK3* knock-down mutants

produced smaller fruits with a sharp decrease in the number of seeds per fruit, caused by an early gametogenesis defects, with most FMs failing to enter the first mitotic division, leading to ovary degeneration [175, 217]. Interestingly, no clear ovule development phenotypes were observed in *ScFRK2* antisense lines that showed reduced *ScFRK2* mRNA levels, nor from a fully co-suppression line from sense overexpressed *ScFRK2* [177]. In contrast, *ScFRK2* overexpression lines (mainly *ScFRK2* -S2 and S17) were shown to exhibit a dramatic diminution in seed set [177].

### 3.2.4 Results and discussion

After confirming the low seed set phenotype in *ScFRK2*-S2 and S17 overexpression line (**Figure 20A**), we set out to determine whether it was linked to ES developmental defects similar to *ScFRK1* and *ScFRK3*. We first corroborated the existence of aberrant carpelloid structures in ovaries of both mutant lines, resulting from the overgrowth of the ovule integument (**Figure 20B**). However, this morphological abnormality remained limited to 10% and 9% ovules in *ScFRK2* -S2 and S17 lines, respectively, which was insufficient to explain the drastic reduction in the number of seeds. Therefore, we further examined the remaining, seemingly normal ovules for potential ES formation defects. As shown in **Figure 20C**, flowers at anthesis from *ScFRK2* -S2 and S17 plants exhibited a significant enrichment in degenerated ESs (66% and 76%, respectively) as well as in prematurely arrested ESs (7% and 6%, respectively). To identify the stages at which ovules development in wild-type (WT) and *ScFRK2* overexpression mutants stopped, we used a solanaceous ovule clearing method described previously (**Figure 21**) [210]. In WT plants, the majority of ESs are at the MMC stage in young 3-4 buds (**Figure 21A** and D) and undergo three consecutive mitoses in 5-7 buds (**Figure 21A**, F, and H), to ultimately attained most mature ESs in 7-8 buds (**Figure 21A** and G). In *ScFRK2* overexpression lines, early ES development was similar to WT, the majority of ovules having formed a MMC in 3-4 buds, which normally goes through a meiosis to produce a FM in 4-5 mm buds **Figure 21B**, C, E, and G). However, most mutant ESs remain blocked at the FG stage while the flower buds continue to grow. Mutant FGs failed to enter the first mitosis, which correlated with a clear increase in the number of degenerated ESs (**Figure 21B**, C, I, and K).

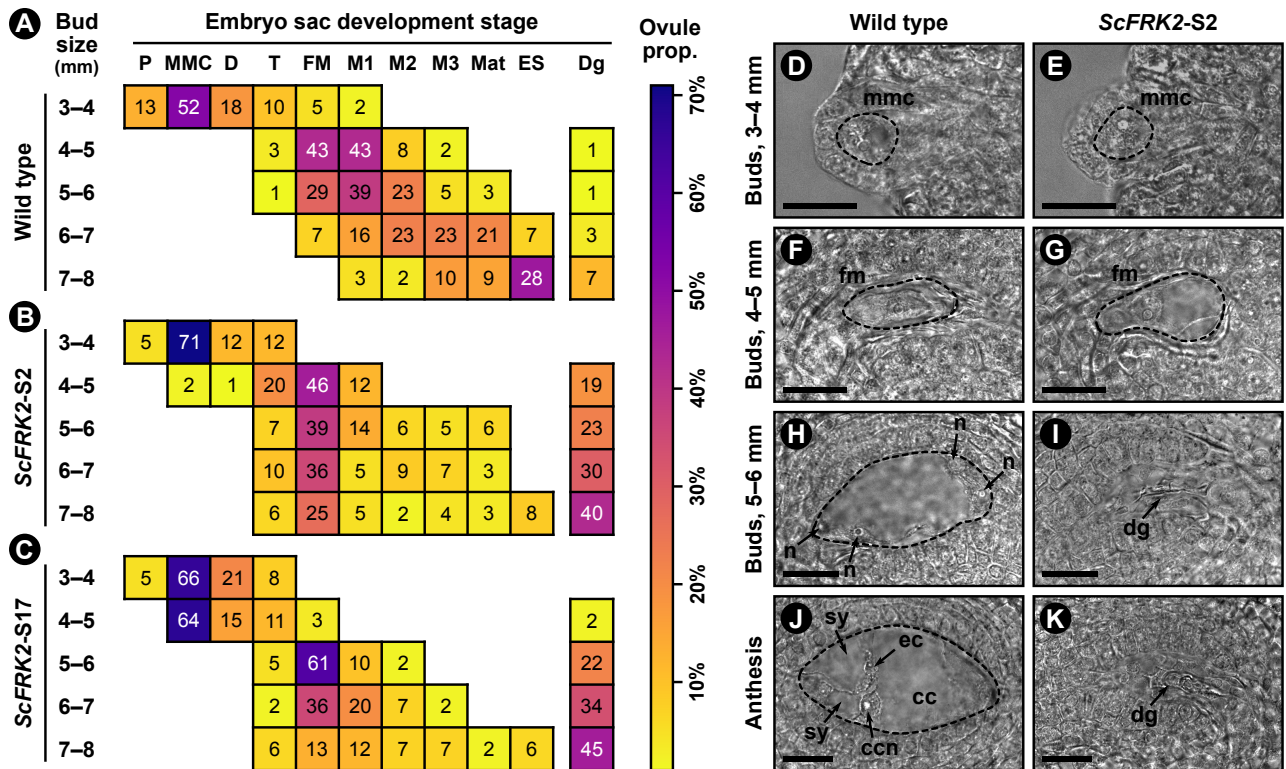


**Figure 20: Fruits, ovaries and ovules phenotype of *ScFRK2* overexpression lines.**

A. Mean number of seeds per fruit in wild type (WT) and in *ScFRK2* -S2 and S17 overexpression lines, based on 10 fruits per sample. Stars indicate a significant variation compared to the WT (Student's t-test,  $p < 0.001$ ); error bars represent one standard error. B. Proportion of carpelloid structures and ovules in WT and mutant ovaries. C. Proportion of ovules that did not develop into a carpelloid structures showing a normal ES, a degenerated ES, and an ES arrested at a mitotic stage, in WT and *ScFRK2* ovaries. In (B) and (C), stars indicate a significantly different distribution compared to the WT, as shown with a Fisher's exact test (B) and a  $\chi^2$  test (C), with  $p < 0.001$ .

These results show a new role for the ScFRK2 protein during female gamete formation. The *ScFRK1* and *ScFRK3* knock-down lines as well as *ScFRK2* overexpressed lines individually do not affect either the formation of the megaspore mother cells or the FM. However, the expression variations of these three FRKs lead to embryo sac arrest from mitotic I, and formation of a degenerated embryonic sac [175, 217]. This suggests that expression levels of the three MEKKs are precisely regulated to allow proper progression of ovule development in early stages. The fact that highly similar phenotype from knock-down mutants (*ScFRK1* and *ScFRK3*) and overexpression (*ScFRK2*), suggests that these MAP kinases could operate antagonistically through a balance between ScFRK1 and 3 on one side and ScFRK2 on the other. Considering the high numbers of FRKs in Solanaceous species that are expressed in ovules [174], these results confirm the importance of MAP kinase kinase FRK family in female gametophyte development.





**Figure 21: Correlation between embryo sac development stages and bud size in WT and *ScFRK2* overexpression mutants.**

A-C. Number and proportion of ovules observed at each ES development stage in growing buds from WT plants and *ScFRK2* mutant lines. Abbreviations: P, primordium; MMC, megaspore mother cell; D, dyad; T, tetrad; FG, functional megaspore; M1, mitosis I; M2, mitosis II; M3, mitosis III; Mat, embryo sac maturation; ES, mature embryo sac; Dg, degenerated ES. D-K. DIC images of developing ovules in WT and *ScFRK2* -S2 mutant plants. Ovule at the MMC stage in WT (D) and *ScFRK2* -S2 mutant flowers (E). Ovule before the first mitosis stage (FG1) in WT (F) and *ScFRK2* -S2 mutant flowers (G). Ovule after the first mitosis stage (FG2) in WT (H) and degenerating in *ScFRK2* -S2 mutant plants (I). Mature ovule in WT (J) and in mutant flowers (K). Abbreviations: cc, central cell; ccn, central cell nucleus; dg, degenerated embryo sac; ec, egg cell; fm, functional megaspore; mmc, megaspore mother cell; n, nucleus; sy, synergid cell. Scale bars: 20  $\mu$ m.

### 3.2.5 Declarations and funding

No potential conflicts of interest were disclosed. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2014-03883).

## **4 Les cascades des *mitogen activated-protein kinase* sont nécessaire pour la croissance polarisée du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.**

---

### **4.1 La germination et la croissance du tube pollinique requièrent l'implication des cascades MAPK**

Mazin Benjamin Damien

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

#### **4.1.1 Préambule**

Dans le règne végétal, les cascades des *mitogen activated-protein kinase* sont le cœur de la signalisation intracellulaire. Pour autant, leurs rôles restent à être caractérisés lors de la germination et de la croissance polarisée du tube pollinique chez *A. thaliana*.

#### **4.1.2 Sommaire**

Nous avons pu voir dans l'introduction que les articles publiés sur la superfamille des MAPK et le tube pollinique montrent que ces protéines jouent un rôle, mais elles ne semblent pas essentielles pour la croissance du tube pollinique. Avant d'essayer d'identifier les membres de la superfamille MAPK qui pourraient être impliquées dans ce processus biologique, nous avons au préalable décidé de répondre à la question : est-ce que les cascades MAPK sont nécessaires pour la croissance du TP ? Pour cela, nous avons utilisé la drogue U0126 inhibe l'activité de sept des dix MKK présentes dans le génome *Arabidopsis thaliana* [188, 189]. Même si cette drogue n'a pas la capacité d'inhiber l'ensemble des MKK dans le TP, elle est un point de départ nécessaire pour pouvoir par la suite rechercher les membres de cette famille MAPK qui sont impliqués dans la croissance du tube pollinique.

## 4.2 Les cascades des *mitogen activated-protein kinase* sont cruciaux pour la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

Benjamin Damien Mazin and Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,  
Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

En rédaction

### 4.2.1 Apport original

Benjamin Mazin est l'instigateur principal de l'article. Il a réalisé et analysé l'ensemble des expériences décrites dans ce chapitre et il a aussi rédigé sous la forme d'un article.

### 4.2.2 Résumé

Les membres de la superfamille des *mitogen activated protein kinase* [1] sont impliqués dans l'intégration des signaux extracellulaires durant le développement des plantes. Le rôle des MAPK lors de la germination et de la croissance polarisée du TP n'est pas bien caractérisé. Afin de comprendre leurs rôles, nous avons ajouté au milieu de croissance, la drogue U0126 capable d'inhiber sept des dix MAPK présentes chez *Arabidopsis thaliana*. La présence de la drogue conduit à la diminution de la germination des grains de pollen ainsi qu'à la diminution de la croissance du TP en condition *in vitro*. Une forte inhibition des MKK due à une concentration élevée de U0126, conduit à la perte de la polarisation de la croissance puis à la rupture précoce (*early burst*) du TP. Pour comprendre ce phénotype, nous avons observé l'organisation des filaments d'actine lors de la croissance des TP en absence et en présence de U0126. Nous avons pu montrer la diminution du nombre de filaments d'actine dans l'ensemble du tube pollinique ainsi que la désorganisation des filaments d'actine dans la région subapicale. L'exocytose étant dépendante des filaments d'actine dans le TP, une réduction du trafic vésiculaire exocyttaire a pu être observée en présence de U0126. Ces résultats permettent de conclure à l'implication des MKK et plus généralement aux cascades MAPK lors de la germination et la croissance polarisée du TP chez *Arabidopsis thaliana*.

**Mots clefs** : Tube pollinique [5], Mitogen-activated protein kinase [1], U0126, U0124, Filament d'actine (FA), Exocytose.

### 4.2.3 Introduction

Chez les angiospermes, le grain de pollen présent sur le stigmate se réhydrate pour former le TP. Cette cellule a pour fonction biologique de transporter les cellules spermatiques à travers les tissus femelles jusqu'à l'ovule. Pour ce faire, il va croître de façon polarisée, c'est-à-dire par son extrême apex appelé région apicale (RA) [218]. Cette région est la plus dynamique du TP. Elle permet l'apport de la membrane à la RA ainsi qu'un grand nombre de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire [76]. La polarisation du TP nécessite le contrôle et la synchronisation de trois mécanismes cytoplasmiques. Le premier est la mise en place d'un gradient calcique [75]. Le deuxième est l'organisation des filaments d'actine (FA) et le troisième est le trafic vésiculaire. Ces trois mécanismes étant interdépendants, l'organisation et le dynamisme des FA vont contribuer à l'exocytose spécifiquement dans la RA.

Les FA d'actine s'organisent en trois régions différentes le long du TP. Dans la RA, les FA sont très petits, très dynamique et en très grand nombre. La région subapicale (RS) contient moins de FA et ils sont moins dynamiques que dans la RA. Par contre, leurs plus grandes stabilités leur permettent de former un filet actine appelée frange d'actine (*actin fringe*). Dans la région distale (RD), les FA sont très longs, très épais et présents en très petit nombre. L'organisation régionalisée des FA structure le trafic vésiculaire [77, 130]. Dans la RD, les longs FA permettent aux cellules germinales et aux grosses structures comme les mitochondries d'être tractées durant l'élongation du TP. La formation de la frange d'actine dans la RS permet la concentration des petites vésicules et empêche les grosses structures de pénétrer dans la RA [77, 130]. La grande concentration de vésicule dans la RA va permettre la fusion à la membrane plasmique pour apporter l'ensemble des éléments nécessaires à la croissance à l'apex du TP [77, 130]. Cette organisation du calcium, des FA et du trafic vésiculaire requiert un important réseau de signalisation intracellulaire pour coordonner l'ensemble de ces mécanismes.

Différentes études ont permis d'identifier certains récepteurs nécessaires pour réguler la polarisation du TP. Les deux *récepteurs like-kinase* qui ont une redondance fonctionnelle, *ANXUR1* et *ANXUR2*, sont localisées à l'extrême apex du TP [219]. La surexpression des protéines ANXUR produit une suractivation de l'exocytose conduisant à l'accumulation trop importante de matériel de la paroi cellulaire entraînant l'arrêt de la croissance du TP [220]. De plus, ces récepteurs semblent réguler l'activité de deux NADPH oxydases, RbohH et RbohJ qui permettraient la formation de pulsations de ROS dans la RA [220]. Ces pulsations réguleraient l'influx calcique en activant les canaux calciques. Les Rboh semblent aussi impliqués dans l'exocytose en contrôlant la concentration de ROS [220]. Les RECEPTOR-LIKE KINASE 3

(PRK3) et PRK6 sont aussi nécessaires dans la croissance [154]. La double mutation *PRK3;FRK6* conduit à une diminution de la vitesse de croissance. La recherche d'interaction a permis de montrer que le récepteur PRK6 interagit avec les ROP-GEF (*Rho of plant guanine nucleotide-exchange factors*) qui sont des protéines clefs de la croissance polarisée du TP [154]. En effet, les ROP-GEF vont permettre de moduler l'influx calcique et de promouvoir la polymérisation des FA et de l'exocytose à l'extrême apex des TP. Ils vont moduler l'activité de nombreuses protéines telles que *Rop-interactive CRIB motif-containing protein 4* (RIC4) qui va favoriser l'assemblage des FA et induire l'accumulation de l'exocytose dans la RA ou encore la protéine ROP Interactive Partner 1 (RIP1/ICR1) qui interagit avec la sous-unité exocyste SEC3 permettant la fixation des vésicules exocytaires sur le PM spécifiquement dans la RA [129, 155, 156, 221-223]. Malgré la découverte de ces protéines, les voies de signalisation intracellulaire du TP restent encore à caractériser.

Les cascades *mitogen-activated protein kinase* sont importantes dans l'intégration, la modulation et la traduction des réseaux de signalisation chez les plantes [164]. Ces voies de signalisation très conservées durant l'évolution se caractérisent par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation permettant respectivement une activation/ désactivation. Cette modification post-traductionnelle permet une réponse rapide à des signaux cytoplasmiques et extracellulaires [161]. Ces cascades de signalisation sont utilisées dans de très nombreux contextes tels que le développement embryonnaire, le développement et la fermeture des stomates, le développement des racines, la cytokine ou encore le développement des gamétophytes mâles et femelles [162, 170, 224]. Une cascade canonique de la superfamille MAPK se constitue de trois kinases : une MAPK (MPK), une MAPK kinase (MKK) et une MAPK kinase kinase (MAP3K). Les MPKs sont activées par les MKK par phosphorylation, et les MKK sont régulées par phosphorylation par les MAP3K. Les MAP3K vont devenir actives dû à la phosphorylation par un récepteur. Une fois que les MPK sont phosphorylées, elles vont activer différents types de substrats tels que des facteurs de transcription ou encore des protéines associées aux microtubules [164]. Ainsi ils modifient le contexte cellulaire pour permettre une réponse spécifique aux signaux. La superfamille des MAPK sont au cœur du réseau de signalisation dans le règne végétal. Le génome d'*A. thaliana* contient >60 MAP3Ks répartis en trois familles : les Rafs, les Ziks et les MEKKs, 10 MKK et 20 MPK [1, 165]. Nous nous intéresseront uniquement aux sous-groupes des 21 MEKK que nous nommerons MAP3K pour simplifier la compréhension des cascades de signalisation durant cette thèse [1, 164, 165].

Des études ont montré l'implication de certains membres de la superfamille des MAPK dans la croissance du TP. Le double mutant *AtMPK6;AtWRKY2* est un facteur de transcription

spécifique au pollen, conduit à la diminution de la germination et de l'élongation des TP [184]. En plus de ce lien entre la MPK6 et ce FT, cette kinase participe à la régulation du trafic vésiculaire. L'enrichissement en phosphatidylinositol 4,5—bisphosphate (PtdIns (4,5) P2) de la membrane plasmique apicale est essentiel à la croissance polarisée des TP [185]. La biosynthèse des PtdIns (4,5) P2 est contrôlée par les phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PI4P 5-kinases). La PI4P 5-kinase 6 (PIP5K6) est nécessaire à l'endocytose médiée par la clathrine et la croissance apicale des tubes polliniques [186]. L'étude de Hempel *et al.* démontre que PIP5K6 est une cible de la MPK6 c'est-à-dire que cette MPK contrôle la production de PtdIns (4,5) P2 et donc, joue un rôle dans le trafic vésiculaire [187]. De plus en 2014, une étude a montré que la MPK3 et la MPK6 sont impliquées dans le guidage du TP. Ils ont pu montrer que 58 % des TP des doubles mutant *MPK3;MPK6* présentent des problèmes lors du guidage funiculaire sans pour autant affecter la croissance du TP [150].

Afin de comprendre le rôle des membres de la superfamille des MAPK lors de la croissance du TP, nous avons mis des TP, en présence de la drogue U0126. Cette drogue inhibe l'activité de sept des dix MKK présentes dans le génome d'*A. thaliana* [188, 189]. La présence de U0126 dans le milieu de croissance entraîne une diminution de la germination des grains de pollen. Les tests *in vitro* et semi *in vivo* montrent que l'inhibition des MKK conduit à une réduction de l'élongation due à la dépolarisation du TP. La diminution de l'activité des MKK conduit à la désorganisation des FA dans l'ensemble du TP ce qui entraîne la désorganisation de l'exocytose et la réduction du taux de renouvellement des vésicules dans la RA. Cette étude montre que les cascades MAPK sont essentielles pour la germination et la croissance polarisée du TP chez *A. thaliana*.

#### **4.2.4 Matériels et méthodes**

##### **4.2.4.1 Plantes et conditions de croissance**

Les graines d'*A. thaliana* sont semées sur le sol. Elles sont préalablement stérilisées puis striées pendant 3-4 jours à 4 °C, et cultivés à 22 °C selon un cycle de 16 heures lumière par jour et 8 heures de noirceur. L'écotype Columbia-0 a été utilisé comme le type sauvage (Tair). Les graines contenant les constructions pLAT52::lifeact-mEGFP [110] ou pLAT52::YFP-RabA4b [225] ont été offertes respectivement par le Pr Shanjin Huang (Institut de botanique, Académie des sciences de Chine, Pékin, Chine) et le Pr Zhenbiao Yang (Centre de biologie cellulaire végétale, Université de Californie, Riverside, États-Unis).

#### **4.2.4.2 Tests de germination et de croissance *in vitro***

Des expériences de germination *in vitro* du pollen d'*A. thaliana* ont été menées comme décrit [226]. En bref, les pollens de dix fleurs d'une même plante germent dans 25  $\mu$ L de PGM liquide (0,01 % d'acide borique, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> et 10 % de saccharose, pH 7,6) à 21 °C pendant trois heures. En outre, des essais de croissance du TP ont été réalisés dans 25  $\mu$ L de PGM solide (0,01 % d'acide borique, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> et 10 % de saccharose et 0,5 % d'agarose à bas point de fusion, pH 7,6) à 21 °C pendant trois heures. Au moins cinq répliques biologiques (c'est-à-dire des plantes apparentées pour chaque génotype) ont été utilisées pour chaque test, et les tests ont été répétés trois ou quatre fois. Deux cents grains de pollen ont été notés pour les taux de germination du pollen et cent tubes polliniques ont été mesurés dans chaque réplique.

#### **4.2.4.3 Tests semi-*in vitro* tube pollinique**

Les bourgeons floraux sont émasculés 16 heures avant l'anthèse. À l'anthèse, le stigmate est pollinisé manuellement. Après 30 min, les stigmates sont coupés au niveau du style [226]. Ils sont déposés sur du milieu PGM solide (0,01 % d'acide borique, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> et 10 % de saccharose et 0,5 % d'agarose à bas point de fusion, pH 7,6) à 21 °C pendant quatre heures. 0,3 % de DMSO, U0124 ou U0126 sont ajoutés juste avant la gélification du PGM puis une fine couche de PGM est déposée sur une lame. Les molécules U0124 et U0126 sont une première fois diluées dans du DMSO à une concentration de 2 mM puis diluées dans le PGM à une concentration de 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M. La quantification phénotypique a été réalisée quatre heures après la pollinisation. Pour chaque concentration de U0124 et U0126, trois répliquats ont été effectués. À chaque répliquat, 100 tubes polliniques ont été classifiés pour au moins dix styles différents.

#### **4.2.4.4 Visualisation et quantification de la dynamique des filaments d'actine dans les tubes polliniques en croissance**

Afin de visualiser la dynamique des filaments d'actine dans les TP, le marqueur d'actine Lifeactin-eGFP sous le promoteur spécifique du pollen pLAT52 a été introduit avec des plantes Columbia-0 [110]. Le mode Airyscan du confocale LSM800 (ZEISS) a été utilisé pour l'ensemble des observations de l'actine. Time-lapse Z-series images ont été collectées toutes

les 1,2 s à l'aide du logiciel ZEN avec un pas de 0,5  $\mu\text{m}$ . Au moins quinze tubes polliniques en présence de 0,3 % DMSO, 25  $\mu\text{M}$  de U0124 et 25  $\mu\text{M}$  de U0126 ont été analysés avec les méthodes décrites précédemment [110, 227]. L'ensemble des traitements et analyses d'image ont été réalisés à l'aide du logiciel FIJI [228].

#### **4.2.4.5 Visualisation et quantification des vésicules RabA4b-YFP dans les tubes polliniques en croissance.**

Pour observer le transport des vésicules dans les tubes polliniques, les plantes transgéniques exprimant P<sub>Lat52</sub>::YFP-RabA4b ont été utilisées [225]. La méthode semi-*in vivo* est utilisée pour observer les TP. Ils ont été imagés sous un microscope confocal LSM 800 (ZEISS) équipé d'un objectif 63 $\times$ . Les échantillons ont été excités par un laser à 488 nm avec la longueur d'onde d'émission fixée à 505-605 nm. Les sections optiques ont été balayées avec un pas de 0,5  $\mu\text{m}$ . Pour la récupération de la fluorescence après les expériences de photoblanchiment (FRAP), les régions apicales ont été blanchies deux fois pendant 2 s en utilisant un laser de 488 nm à 100 % de puissance et un laser de 405 nm à 100 % de puissance. La récupération de la fluorescence a été enregistrée à des intervalles de 3,72 s pendant 120 s avec un laser de 488 nm à une puissance de 0,25 %. Les méthodologies utilisées ont été décrites précédemment [225, 227]. L'expérience a été répétée au minimum quinze fois par condition. L'ensemble des analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel FIJI [228].

### **4.2.5 Résultats**

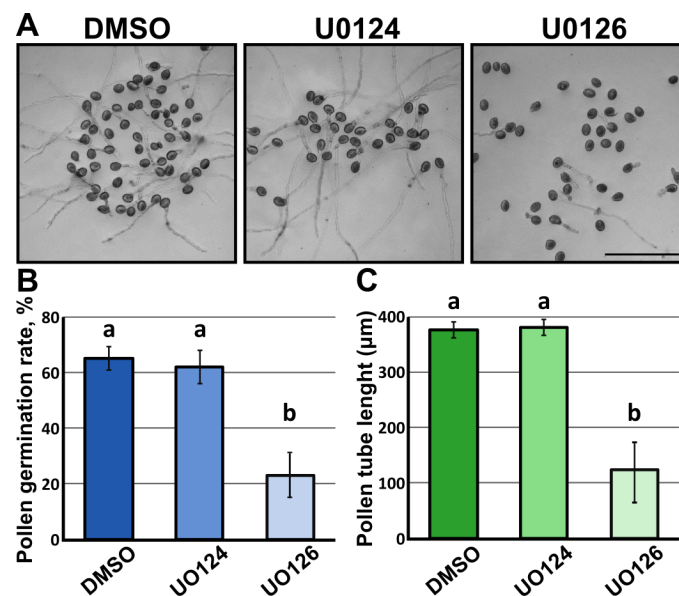
#### **4.2.5.1 Effets de l'inhibiteur de MKK sur la germination et la croissance des TP.**

Le groupe des MAP3K, MKK et MPK comprend 51 membres dont certaines ont des fonctions redondantes. Les résultats des RNA-seq, faits en 2009 par Qin, montrent qu'un grand nombre de membres de la superfamille des *MAPK* sont exprimés dans les grains de pollen, durant la germination et lors de la croissance *in vitro* et semi-*in vivo* des TP [229]. Vingt-deux membres de cette famille des MAPK s'expriment dans l'une de ces quatre conditions (Annexes 2: **Tableau 4**). La redondance fonctionnelle, dans certains contextes cellulaires comme la *AtMKK4/AtMKK5* et *AtMPK3/AtMPK6* lors de la formation des stomates et la létalité du grain de pollen rend l'étude de la superfamille des MAPK lors de la croissance du TP complexe [230, 231]. Pour cette étude, nous avons décidé d'utiliser U0126, l'inhibiteur des MKK, dans le but de comprendre l'effet de l'inhibition des cascades de la famille des MAPK pendant la



germination et la croissance du TP [188, 189]. Cet inhibiteur a été utilisé pour comprendre l'implication de cette famille de protéine dans le développement des nodules chez *medicago truncatula* ou encore dans la formation des poils racinaires d'*A. thaliana* [224, 232]. Depuis la découverte de cette drogue dans les années 90, nous savons aujourd'hui que parmi les 10 MKK présentes chez *A. thaliana*, U0126 inhibe l'activité de sept d'entre-elles : la AtMKK1, la AtMKK2, la AtMKK5, la AtMKK7, la AtMKK8, la AtMKK9 et la AtMKK10 [188].

Le TP étant une structure très sensible aux modifications de son milieu de croissance, nous avons utilisé un deuxième contrôle, U0124, qui est un analogue non fonctionnel de U0126 [188]. La présence de 25  $\mu\text{M}$  de U0124 dans le milieu PGM, ne semblent pas affecter la germination des grains de pollen ni la croissance du TP (**Figure 22**). Les grains de pollen en présence de 25  $\mu\text{M}$  de U0126, germent trois fois moins qu'en présence de 25  $\mu\text{M}$  U0124 ou du contrôle (**Figure 22**). De plus, leur longueur est significativement plus faible que dans les deux conditions contrôle (**Figure 22**). Ces premiers résultats montrent que la présence de U0126 induit une diminution de la germination et de la croissance du TP. L'inhibition de l'activité des sept MKKs dans le TP, *in vitro*, affecterait la germination et l'élongation du TP.

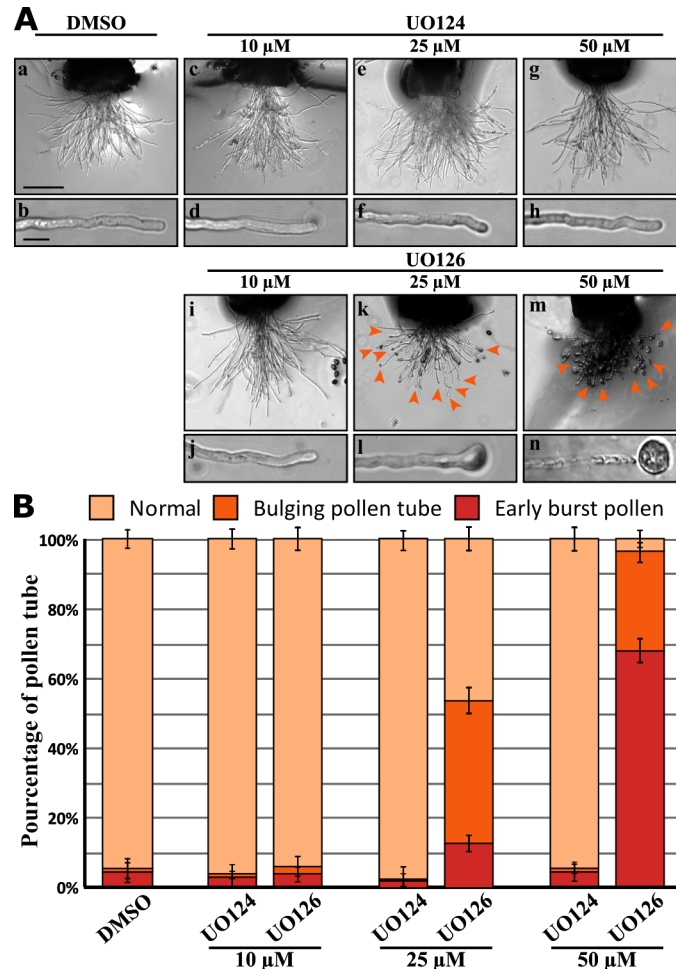


**Figure 22 : Effets de U0126 lors de la germination et de la croissance des TP *in vitro*.**

A. Grain de pollen 3 heures après germination *in vitro* en présence de DMSO, U0124 ou U0126. B. Pourcentage de germination du pollen en présence de DMSO, U0124 ou U0126. C. Longueur des tubes polliniques 3 heures après germination *in vitro* en présence de DMSO, U0124 ou U0126. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m, des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ , ANOVA à sens unique, test de Tukey).

#### 4.2.5.2 Effets de différentes concentrations de U0126 sur la croissance des TP.

Les tests d'inhibition des MKK en présence de la drogue U0126 montrent que l'ensemble des kinases ne sont pas toutes inhibées à la même concentration [188]. Afin de mieux comprendre la fonction des MKK lors de la croissance des TP, nous avons observé l'effet de trois différentes concentrations de U0124 et U0126 après quatre heures de croissance *semi-in vivo*. Ainsi, nous avons pu observer que la présence de 0,3 % de DMSO, de 10  $\mu\text{M}$ , de 25  $\mu\text{M}$ , de 50  $\mu\text{M}$  de U0124 ou encore de 10  $\mu\text{M}$  de U0126 n'affecte ni la croissance ni la morphologie du TP (**Figure 23A**, a-j). Par contre, l'augmentation de la concentration de U0126 entraîne une modification morphologique de l'apex du TP conduisant à la formation de TP bombé (**Figure 23A**, k et l, flèche orange). À 25  $\mu\text{M}$  de U0126, 41,2 % des TP présentent un gonflement d'apex et 12,5 % d'entre eux sont *éclatés* (Fig.2B). À 50  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur, la majorité des TP ont éclaté et seulement 2,1 % présentent un aspect normal (**Figure 23A**, m et n ; **Figure 23B**). Ces résultats montrent que la présence de DMSO, de U0124 ou d'une faible concentration de U0126 n'affecte pas la croissance des TP. À partir de 25  $\mu\text{M}$  de U0126, l'inhibition des MKK va favoriser la dépolarisation de l'apex du tube pollinique conduisant progressivement à un éclatement précoce des TP. Une forte inhibition des MKK entraîne l'éclatement des TP. Les MKK sont nécessaires à la croissance polarisée des TP chez *A. thaliana*.



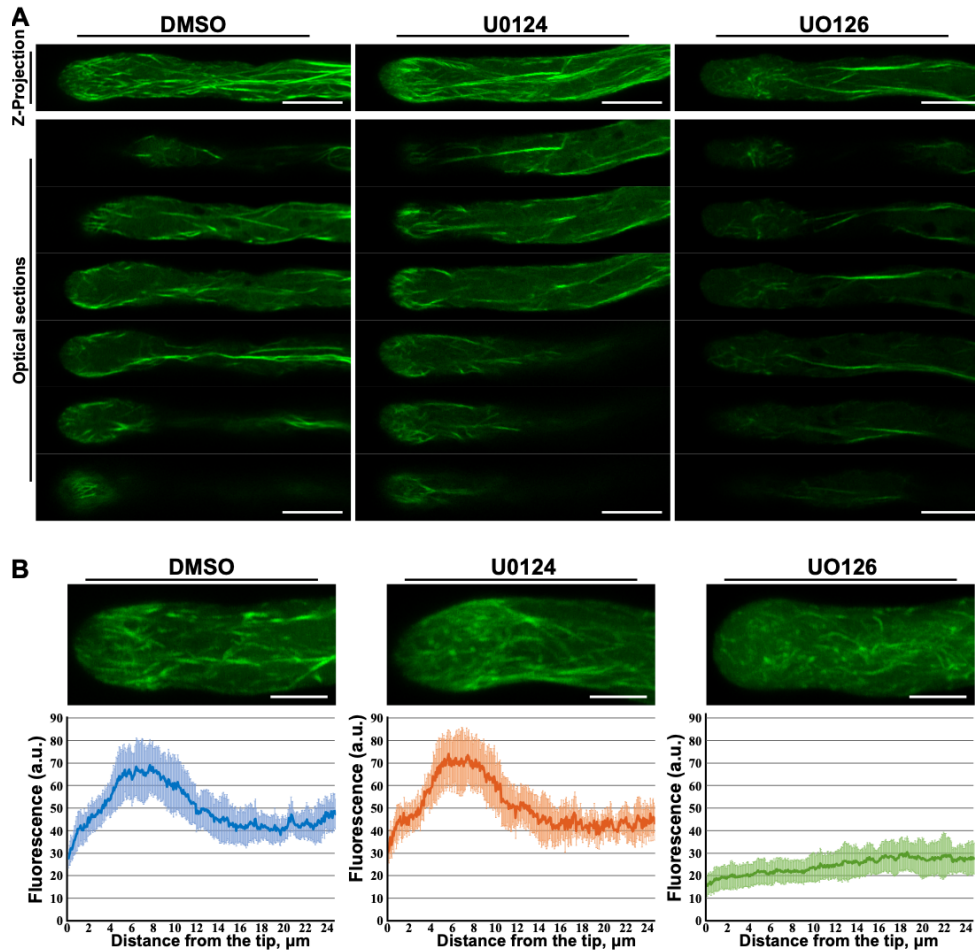
**Figure 23: Effets de la concentration de U0126 sur la croissance des TP.**

A. Croissance semi *in vivo* des tubes polliniques en présence de DMSO (a, b), de U0124 (10  $\mu$ M (c,d), 25  $\mu$ M (e, f), 50  $\mu$ M (g, h)) ou de U0126 (10  $\mu$ M (i, j), 25  $\mu$ M (k,l), 50  $\mu$ M (m,n)). Les flèches oranges indiquent les TP avec un apex bombé. (a, c, e, g, i, k, m) barre d'échelle = 150  $\mu$ m. (b, d, f, h, j, l, n) barre d'échelle = 15  $\mu$ m. B. Classification des tubes polliniques en trois groupes distincts : tube pollinique normale (*Normal*), tube pollinique bombé (*Bulging pollen tube*) et éclatement précoce des TP (*Early burst pollen tube*). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  s.e.m.

#### 4.2.5.3 Effet de U0126 sur l'organisation des filaments d'actines.

La polarisation de la croissance du TP nécessite une organisation spécifique des FA dans le TP. Les FA se composent de trois régions : la RA avec de petits FA, la RS avec de longs FA et la RD avec de très longs filaments [76]. Pour comprendre le phénotype observé précédemment, nous avons regardé l'effet de DMSO, U0124 et U0126 sur des pollens exprimant *Lifect-mEGFP* [110]. La présence de 0,3 % DMSO ou 25  $\mu$ M de U0124 ne semble pas affecter l'organisation des FA (**Figure 24A**). L'observation des FA dans les TP en présence de 25  $\mu$ M de U0126 montre une diminution de la présence de FA dans l'ensemble du TP, mais une désorganisation des FA dans la région apicale et subapicale (**Figure 24A**). En plus de la diminution de FA, d'autres phénotypes montrant la désorganisation des FA ont pu être observés

comme la présence de zone d'accumulation de fragments d'actine, mais aussi des cercles d'actine (Annexes 2: **Figure 37A**)[233].



**Figure 24: Effets du DMSO, de U0124 et de U0126 sur les filaments d'actine en utilisant des tubes exprimant Lifeact-mEGFP.**

A. Image des FA en présence de 0,3% DMSO, 25  $\mu\text{M}$  de U0124 ou de 25  $\mu\text{M}$  de U0126. Pour chaque condition test, le panneau supérieur montre les images de la projection Z. Barres d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ . B. Image des filaments d'actine en présence de 0,3 % DMSO, 25  $\mu\text{M}$  de U0124 ou de 25  $\mu\text{M}$  de U0126 et quantification de l'intensité de la fluorescence de Lifeact-mEGFP de l'extrémité à la base le long de l'axe de croissance du tube dans les TP. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  s.e. m.  $n > 15$ . Barres d'échelle = 5  $\mu\text{m}$ .

La répartition de l'intensité de la fluorescence émise le long du TP montre qu'en condition contrôle, les FA s'organisent en trois zones distinctes (**Figure 24B**). La quantité de FA dans la RS est plus importante que dans la RA ou RD formant ainsi la frange d'actine nécessaire à la croissance du TP. Par contre, la présence de U0126 vient désorganiser les FA. En effet, la courbe d'intensité montre l'absence d'une concentration plus importante de FA dans la RA, c'est-à-dire que l'inhibition des MKK conduit à la désorganisation des FA à l'apex du TP

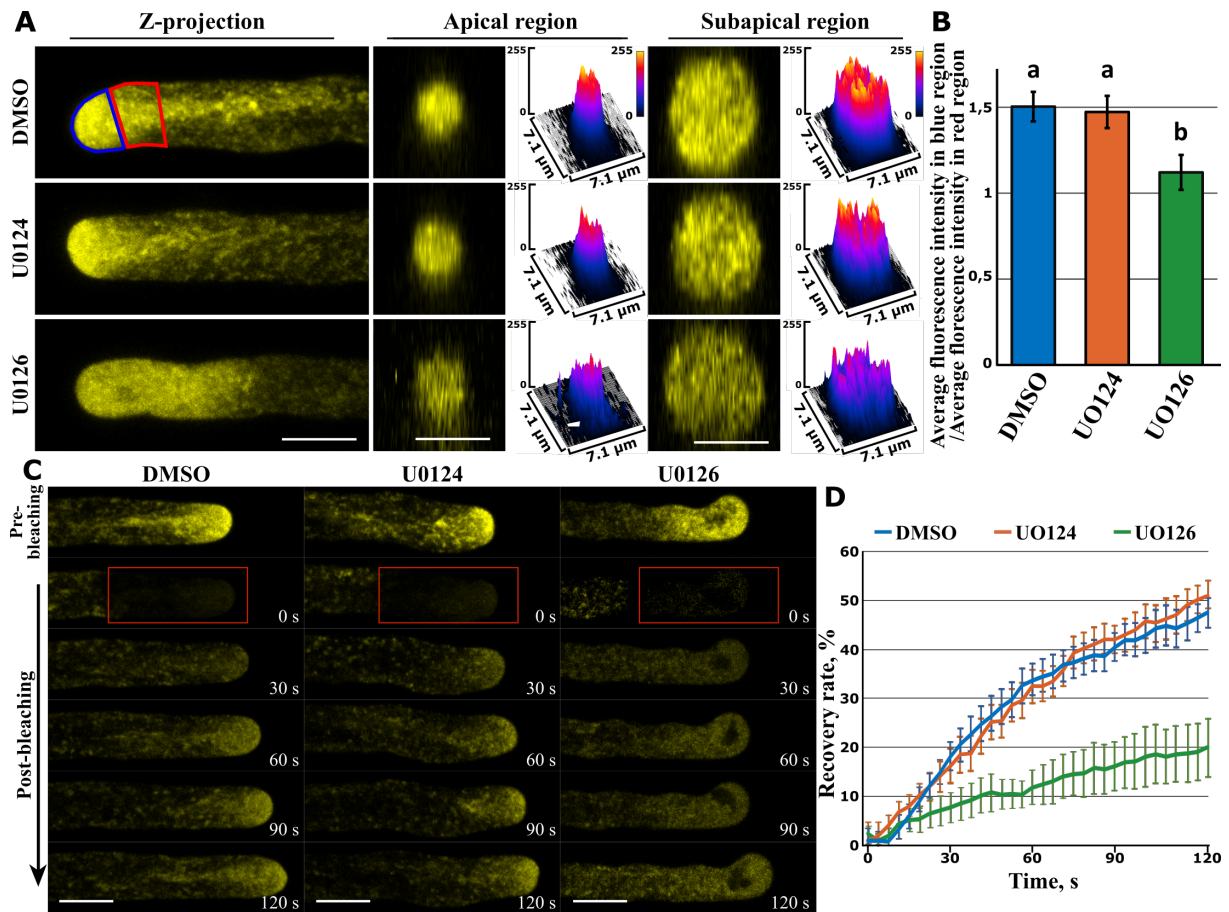
(**Figure 24B**). La comparaison des trois régions des TP avec 25  $\mu$ M de U0126 avec les deux autres contextes vient confirmer l'observation visuelle de la réduction des FA dans l'ensemble du TP (Annexes 2 : **Figure 37B**). Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les MKKs sont impliquées dans l'organisation et la stabilité des FA lors de la croissance du TP chez *A. thaliana*.

#### **4.2.5.4 Effets de l'inhibition des MKK sur l'exocytose chez des TP.**

La localisation spécifique de l'exocytose est l'un des mécanismes cellulaires les plus importants pour la croissance du TP, car les vésicules apportent la membrane plasmique ainsi que l'ensemble des éléments nécessaires pour la croissance polarisée dans la RA [77, 130]. Pour observer l'exocytose lors de l'élongation du TP, nous avons utilisé des plantes transgéniques exprimant YFP-RabA4b sous le contrôle du promoteur pLAT52 comme décrit précédemment [225]. RabA4B est recruté dans les vésicules qui émergent des compartiment du réseau trans-Golgi et il régule le trafic des membranes polarisées dans les cellules végétale comme le tube pollinique. L'organisation de l'exocytose conduit à la formation d'un cône en « V » inversé à la RA comme ce qui a pu être observé en présence de 0,3 % de DMSO ou de 25  $\mu$ M de U0124 (**Figure 25A**). Dans ces deux conditions, le ratio de la fluorescence dans le RA (en bleu, **Figure 25A**) par rapport à la RS (en rouge, **Figure 25A**) montre qu'il y a 50 % plus de vésicules dans la RA (**Figure 25B**). En revanche, la forme de cône en « V » inversé n'est plus visible dans les TP en présence de 25  $\mu$ M de U0126. Les vésicules contenant YFP-RabA4b semblent réparties de façon homogène entre la RA, RS et le début de la RD. Les coupes transversales de la RA et de la RS montrent une diminution de la quantité de vésicules en présence de U0126 par rapport aux deux autres conditions. Le ratio RA sur RD montre que la présence de U0126 conduit à la perte de la concentration des vésicules dans la RA (**Figure 25B**).

Afin d'examiner la dynamique des vésicules en présence YFP-RabA4b, nous avons utilisé la technique de récupération de la *fluorescence après photoblanchiment* (FRAP). Deux minutes après les avoir blanchis, les TP en présence de DMSO ou U0124 ont retrouvé 50 % de leur intensité initiale alors qu'en présence de U0126, les TP ont retrouvé en moyenne 20 % de l'intensité initiale. Ainsi le taux de récupération des vésicules est réduit dans les TP en présence de l'inhibiteur des MKKs (**Figure 25C et D**). L'ampleur de l'altération du taux de récupération des vésicules dans les RA et RS est en bonne corrélation avec l'ampleur de la réduction des filaments d'actine apicaux (**Figure 25**). Les résultats montrent que la perte de fonction d'activité

des MKK modifie le schéma d'accumulation des vésicules apicales et réduit le taux de renouvellement des vésicules dans le TP.



**Figure 25 : Effets du DMSO, de U0124 et U0126 sur l'exocytose en utilisant des TP exprimant YFP-RabA4b.**

A. Images de TP exprimant pLat52:YFP-RabA4b. Coupes transversales de la région apicale et subapicale des tubes polliniques illustrées en A. Les graphiques à droite des coupes transversales montrent les « surfaces plots » générées par FIJI. Les couleurs bleu et jaune indiquent respectivement une fluorescence faible et une fluorescence élevée. L'intensité moyenne de la fluorescence des pixels dans les régions encadrées en rouge et bleu a été déterminée afin d'évaluer le modèle d'accumulation des vésicules présenté en (B). Barre = 5  $\mu\text{m}$ . B. Quantification du schéma d'accumulation des vésicules contenant RabA4b dans les TP. La valeur de l'intensité de la fluorescence des pixels dans la région rouge a été divisée par celle de la région bleue pour obtenir un rapport permettant d'évaluer l'étendue de l'accumulation des vésicules. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SE,  $n > 20$ , des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ , ANOVA à sens unique, test de Tukey). C. Image de TP exprimant pLat52:YFP-RabA4b avant et après le photoblanchiment. Voir la série complète dans film S1 (DMSO), film S2 (U0124), film S3 (U0126). Les rectangles rouges indiquent les régions photoblanchies. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ . D. Graphique de la fluorescence YFP-RabA4b en fonction du temps de récupération. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SE,  $n > 15$ .

#### 4.2.6 Discussion

Dans le règne végétal, la super famille des *mitogen activated protein kinase* constitue un groupe de protéines essentiel pour l'intégration et la réponse aux signaux extracellulaires

[162]. Les cascades de signalisation MAPK sont impliquées dans de très nombreux stress abiotiques, stress biotiques ainsi que durant le développement tissulaire des plantes [162, 224, 234]. Les études sur la AtMPK3, la AtMPK4 et la AtMPK6 ont permis de montrer qu'elles sont nécessaires pour le développement des gamétophytes mâles [170, 180]. Les membres de la famille des MAPK sont aussi impliquées dans la croissance du TP. Les simples mutants *AtMPK6* ou *AtWRKY2* ne montrent aucun phénotype. Par contre, le double mutant *AtMPK6;AtWRKY2* entraîne une diminution de la germination des grains de pollen ainsi qu'une réduction de la longueur des TP [184]. De plus, la AtMPK6 régule la biosynthèse des PtdIns (4,5) P2 qui sont nécessaires pour le trafic vésiculaire [187]. Ces différentes études montrent que les MAPK semblent participer à la croissance du TP. Pour autant, ces kinases ne semblent pas essentielles malgré que plusieurs de membres des MAPK soit exprimées lors de la germination et lors de la croissance du TP (Annexes 2 : **Tableau 4**) [229]. Notre présente étude a pour objectif de savoir si la superfamille des MAPK sont nécessaires pour l'élongation du TP et de comprendre leurs fonctions lors de la croissance polarisé du TP.

La drogue U0126 inhibe sept MKKs parmi les dix MKK présents chez *A. thaliana* [188, 189]. Cette drogue a déjà été utilisée pour étudier l'implication des MAPK lors de la croissance des poils racinaires [224]. Les MKK font le lien entre les MAP3K et les MPK c'est-à-dire que la perte de leur activité revient à bloquer un grand nombre des cascades MAPK actives dans un tissu. La présence de U0126 dans le milieu PGM entraîne une diminution de la germination des grains de pollen et une réduction de la taille des TP. La germination des grains de pollen d'*A. thaliana* étant très sensible à une modification des conditions de croissance, nous avons utilisé un second contrôle, U0124 qui est un analogue non fonctionnel de U0126. En présence de U0124, les graines de pollen germent et les TP croissent autant que le contrôle avec 0,3 % de DMSO *in vitro* (**Figure 22**). L'augmentation de l'inhibition des MKK durant la croissance du TP, entraîne la perte de la polarité, produisant un gonflement de la RA puis l'éclatement précoce des TP (**Figure 23**). Ces résultats permettent de conclure qu'au moins un des sept MKK inhibés par U0126 est nécessaire pour la germination et la polarisation des TP.

L'organisation et l'aspect dynamique des FA dans le TP est cruciale pour la croissance polarisée du TP [76]. Ainsi nous avons observé l'action de U0126 sur les FA pour comprendre la cause de la perte de la polarisation. En présence de U0126, une diminution et la désorganisation du réseau des FA ont pu être montrées dans l'ensemble du TP. La perte d'activité des MKK affecte les FA à l'apex ce qui explique la perte de la croissance polarisée en présence de U0126 (**Figure 24**). L'exocytose est dépendante de l'organisation des FA dans

le TP [77], donc en présence de U0126, le trafic des vésicules exocytaires est altéré et le ratio de régénération « turnover » de ces vésicules est réduit (**Figure 25**). Ainsi nous démontrons ici que les MKK sont impliquées dans l'organisation des FA et dans la régulation de l'exocytose durant la croissance du TP.

La croissance des poils racinaires est très similaire au TP [156]. Comme le TP, les poils racinaires ont une croissance polarisée à l'apex qui nécessite l'implication des FA et du trafic vésiculaire [156]. De nombreuses familles de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire du TP sont aussi impliquées dans la croissance du poil racinaire. Par exemple, les familles ROP vont aussi jouer un rôle similaire dans la médiation des signaux extracellulaires reçus par les *receptor-like* kinase dans le poil racinaire et le TP [155, 235]. Les poils racinaires en croissance sur un milieu contenant du U0126 présentent un gonflement à l'apex et donc une perte de la croissance polarisée [224]. En présence de l'inhibiteur de MKK, l'organisation des FA est affectée et le trafic vésiculaire va être désorganisé dans le poil racinaire. L'ensemble de ces résultats semble démontrer que certains membres de la superfamille des MAPK sont impliqués dans l'organisation des FA lors de la croissance polarisée des cellules.



## **5 Les mitogen activated-protein kinase kinase kinase 19, 20 et 21 sont impliquées lors de la germination et la croissance du TP chez *Arabidopsis thaliana*.**

---

### **5.1 Les mitogens activated-protein kinase kinase kinase 19, 20 et 21 participent à la germination et la croissance du TP d'*Arabidopsis thaliana*.**

Mazin Benjamin Damien

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2.

#### **5.1.1 Préambule**

Les cascades MAPK sont impliquées lors de la germination et de la croissance du tube pollinique. À ce jour, aucune MAPK n'a été directement impliquée dans la croissance du TP.

#### **5.1.2 Sommaire**

Ce chapitre est présenté comme un article dont l'écriture n'est cependant pas achevée. Certaines manipulations devraient être réitérées afin d'affiner les résultats, et complétées pour une meilleure compréhension du rôle des AtMAP3K19-20-21 durant la fécondation. Cependant, l'ensemble des résultats présentés ici ont été obtenus en triplicata et nous semblent intéressants pour comprendre le rôle que jouent des MAPK lors de la croissance du TP. Ce chapitre fait le lien entre les chapitres 2-3, qui essaient de comprendre le rôle de certaines ScMAP3K (ScFRK) lors de la formation des gamètes chez *Solanum chacoense*, et le chapitre 4 qui tente de comprendre le rôle global des cascades MAPK lors de l'élongation du TP chez *A. thaliana*. Nous allons étudier dans ce chapitre le rôle des MAP3K19-20-21 qui sont les homologues putatifs des ScFRK1-2-3. Nous montrons ici que les AtMAP3K19-20-21 ne sont pas impliquées lors de la formation du grain de pollen ni celle du sac embryonnaire comme la ScFRK1-2-3. Par contre, elles jouent un rôle dans la germination du grain de pollen et l'élongation du tube pollinique chez *A. thaliana*.

## 5.2 L'implication des AtMAP3K 19, 20 et 21 dans la croissance du TP chez *Arabidopsis thaliana*.

Benjamin Damien Mazin, Rachid Benhamman, Audrey Loubert-Hudon et Daniel P. Matton

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101, rue Sherbrooke est, Montréal, QC, Canada, H1X 2B2

En rédaction.

### 5.2.1 Apport original

Benjamin Mazin est l'instigateur principal de l'article. Il a réalisé l'analyse phylogénétique, le mutant CRISPR-Cas9, la localisation cellulaire dans les TP de tabac et les tests de viabilité du pollen, de germination et de croissance du TP *in vivo* et *in vitro*. Il a rédigé l'article.

Rachid Benhamman a participé à l'instigation du projet et a réalisé la RT-PCR.

Audrey Loubert-Hudon a réalisé l'expression GUS sous le promoteur des AtMAP3K19-20-21.

Daniel P. Matton a supervisé et subventionné les travaux.

### 5.2.2 Résumé

Le développement du TP nécessite un important réseau de signalisation pour contrôler la germination et la croissance polarisée du TP. Les cascades MAPK sont cruciales pour permettre sa germination et son élongation. Certains membres de la super famille des MAPK participent, mais ne semblent pas nécessaires pour permettre la fécondation par le gamète mâle. La *mitogen activated protein kinase kinase kinase 19* (*AtMAP3K19*), la *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21* sont les orthologues putatifs de *ScFRK1*, *ScFRK2* et *ScFRK3* qui sont toutes trois nécessaires à la formation des gamètes chez *S. chacoense*. En utilisant le gène rapporteur GUS et des expériences de RT-PCR, nous démontrons que les trois *AtMAP3K19-20-21* sont exprimées fortement lors de la formation du gamétophyte mâle, durant la germination et la croissance du TP. Par contre, les simples, les doubles et le triple mutant des AtMAP3K ne présentent aucun défaut de viabilité des grains de pollen à l'anthèse. Les tests de croissance *in*

*in vitro* montrent que les doubles mutants germent moins que les graines de pollen sauvage. De plus, la mutation de l'une des AtMAP3K entraîne la diminution de la croissance du TP. Les tests *in vivo* confirment que les AtMAP3K19-20-21 sont impliquées pendant l'élongation des TP. L'ensemble de ces résultats montrent que les AtMAP3K19, 20 et 21 participent à la germination et la croissance du tube pollinique chez *A. thaliana*.

**Mots clefs:** *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (AtMAP3K), *Fertilization Related Kinase* (ScFRK), Pollen, Tube pollinique, Germination et Croissance du tube pollinique.

### 5.2.3 Introduction

Le développement des plantes requiert l'activation de nombreux réseaux de signalisation pour déchiffrer les différents signaux et y répondre de manière adéquate. La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle qui provoque de nombreux changements moléculaires affectant la fonction, la stabilité, l'activation, l'interaction, la localisation subcellulaire et la translocation des protéines [236]. Les cascades des *Mitogen-activated protein kinase* [1] utilisent la phosphorylation pour transmettre et amplifier les signaux extracellulaires. Elles sont associées à un large éventail de réponses lors du développement des différents tissus et durant un grand nombre de stress [237]. Les cascades MAPK canoniques impliquent en trois niveaux. Elles sont généralement initiées par la phosphorylation d'une MAPK kinase kinase (AtMAP3K) par le biais de divers activateurs tels que des récepteurs kinases transmembranaires, des récepteurs couplés aux protéines G ou encore des complexes histidine kinase à deux composants. Une fois activée, la MAP3K commence une cascade de phosphorylation séquentielle dans laquelle la MAP3K-active phosphoryle une MAPK kinase (MKK) sur le motif (S/T) — X — (S/T). À son tour, la MKK-active phosphoryle une MAPK (MPK) sur les résidus de thréonine et de tyrosine sur le motif T — (D/E) — Y, dans la boucle d'activation [238]. Une fois activée, la MPK va phosphoryler différents facteurs de transcription afin de modifier l'expression génique permettant à la cellule de répondre au signal extracellulaire. Chez *A. thaliana*, la superfamille des MAPK comprend 21 AtMAP3K, 10 AtMKK et 20 AtMPK [1].

La formation des gamétophytes mâles et la croissance du TP sont des événements fondamentaux pour la reproduction des plantes. L'anthère est le lieu de la formation des grains de pollen [3]. Le primordium sporogène rentre en méiose pour former les tétrades qui sont quatre cellules haploïdes. Chacune de ces cellules va se diviser asymétriquement, formant ainsi

une grosse cellule, la cellule végétative, qui donnera le TP et une petite cellule, la cellule générative. Cette petite cellule va subir une division symétrique permettant la formation des deux cellules spermatiques nécessaires à la fécondation [3]. De nombreux gènes, jouant un rôle crucial dans ce processus, ont été identifiés et caractérisés [10]. Certains travaux commencent à montrer l'importance des MAPK dans le développement du gamétophyte mâle. Chez *Arabidopsis thaliana*, les lignées mutantes nulles pour les kinases *AtMAP3Kε1* et *AtMAP3Kε2* (*AtMAP3K7* et *AtMAP3K6*) produisent un grand nombre de grains de pollen morts à l'anthèse. Ces protéines qui se localisent au niveau de la membrane plasmique jouent un rôle dans la régulation de la méiose [172, 173]. Chez *S. chacoense*, les études portant sur trois *AtMAP3K*, nommées *FERTILIZATION RELATED KINASE 1* (*ScFRK1*), *ScFRK2* et *ScFRK3*, ont montré qu'elles jouaient un rôle crucial lors du développement des gamétophytes femelles et mâles [175, 176, 217]. La diminution d'expression de *ScFRK1* ou de *ScFRK3* par l'utilisation d'ARN interférant, conduit à la production de petits fruits. L'ensemble de ces lignées transgéniques présentent une diminution significative de pollen viable. L'analyse développementale des grains de pollen montre que dans les deux cas, le développement des microspores a été interrompu lors de la première division mitotique. La diminution de l'expression de *ScFRK1* ou *ScFRK3* affecte aussi le développement du sac embryonnaire [175, 217]. La surexpression de *ScFRK2* entraîne une diminution du nombre de graines par fruit. Cette diminution s'explique par le nombre élevé de pollens morts et affecte le développement de l'ovule. La surexpression de *ScFRK2* perturbe le développement du pollen en raison d'un dysfonctionnement sporophytique [176].

La germination et la croissance polarisée requièrent l'activation d'une ou plusieurs cascades MAPK. En effet, la présence d'un inhibiteur des MKKs (U0126) dans le milieu de croissance affecte la germination et l'élongation du TP (Mazin et al., unpubl; chapitre 4). Cette diminution de l'élongation est due à la perte de polarisation du TP causée par la déstabilisation des FA à l'apex. La désorganisation des FA conduit à la perte de la concentration des vésicules excocytaires à l'apex des TP (Mazin et al., unpubl; Chapitre 4). Une autre étude a montré que la *AtMPK6* est impliquée dans la croissance du TP. La mutation de *AtMPK6* seul ne présente aucun défaut de germination ou de croissance. Par contre, le double mutant *AtMPK6* et *AtWRKY2* (un facteur de transcription spécifique du pollen) présente une diminution de la germination et un ralentissement de la croissance du TP [184]. Une autre étude a montré que la *AtMPK6* phosphoryle la Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5 — kinases 6 (PIP5K6). Par ce biais, elle contrôle la production de Phosphatidylinositol 4,5 — phosphate qui est nécessaire à l'endocytose médiée par les clathrines et la croissance apicale des TP [187].

Malgré les études faites sur la AtMPK6, aucune étude n'a permis d'identifier d'autres membres de la famille des MAPK jouant un rôle dans la croissance polarisée du TP.

Dans la présente étude, nous essayons de caractériser trois AtMAP3Ks (la *AtMAP3K19*, la *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21*) d'*A. thaliana* qui sont les orthologues les plus proches de la famille des *ScFRK* de *S. chacoense*. Ces trois kinases sont fortement exprimées lors de la formation des grains de pollen ainsi que dans le TP. Les simples, les doubles et le triple mutant forment tous un pollen viable. Par contre, une baisse de la germination des TP a pu être observée pour les doubles mutants et le triple mutant. Les tests de croissance *in vitro* et *in vivo* de l'ensemble des lignées mutantes montrent une diminution de l'élongation du TP. Cette étude montre que la *AtMAP3K19*, la *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21* sont impliquées dans la germination et la croissance du TP chez *A. thaliana*.

## 5.2.4 Matériels et méthodes

### 5.2.4.1 Les plantes et leurs conditions de croissance

Le type sauvage (Col), le mutant *AtMAP3K20* et le mutant *AtMAP3K21* d'*A. thaliana* ont été obtenus auprès de TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Nous avons utilisé les lignées d'insertion d'ADN-T suivantes, SALK\_021755 pour *AtMAP3K20* et SALK\_149019 pour *AtMAP3K21*. Après trois jours à 4 °C, les graines ont été cultivées dans des chambres à 21 °C avec une longue photopériode de jour (cycle de 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité). Pour rechercher les lignées homozygotes, des paires d'amorces spécifiques ont été utilisées (Annexe 3 : **Tableau 5**). La construction du mutant MAP3K19 va être décrite plus bas.

### 5.2.4.2 Expression transitoire dans le TP de *Nicotiana tabacum*.

La séquence des gènes codant des trois MAP3K a été clonée dans le vecteur pZY03 par la méthode Gateway comme décrit précédemment [239]. Les vecteurs obtenus expriment EGFP-MAP3K19, EGFP-MAP3K20 et EGFP-MAP3K21 sous le contrôle du promoteur pLAT52 (promoteur spécifique du pollen). Pour le bombardement de particules de tungstène, tous les plasmides ont été purifiés à l'aide de mini kits de plasmides (Qiagen). Les grains de pollen de *Nicotiana tabacum* mûrs ont été collectés juste avant chaque expérience et ont été transformés avec de l'ADN plasmidique en utilisant une procédure de bombardement

de particules décrite précédemment [240]. En bref, 1-2 µg d'ADN des constructions EGFP-MAP3K ont été utilisées pour chaque bombardement. Les grains de pollen transformés ont été incubés à température de la pièce pendant 4 heures avant d'être examinés au microscope inversé.

#### **5.2.4.3 Isolation d'ARN et RT-PCR**

Pour effectuer la RT-PCR afin d'analyser l'expression des MAP3K, nous avons isolé l'ARN total de divers tissus végétaux en utilisant le réactif d'isolement de l'ARN TRIzol® (Lifetechnology) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse a été effectuée à l'aide d'un kit de RT pour la synthèse d'ADNc de premier brin de M-MLV (Invitrogen). Des amorces spécifiques ont été utilisées pour l'analyse des RT-PCR, et le gène *Actine2* a été utilisé comme contrôle interne (Annexes 3 : **Tableau 5**).

#### **5.2.4.4 Coloration GUS**

Pour la construction des vecteurs GUS, la région promotrice d'environ 1,5 Kb en amont des séquences codantes des *AtMAP3K19*, *20* et *21* a été amplifiée par PCR (Annexes 3 : **Tableau 5**) et clonée dans le plasmide Gateway™ pMDC162 contenant le gène β-glucuronidase [211]. La souche C56C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été électro-transformée avec les différents vecteurs. Les plantes sauvages d'*A. thaliana* ont été infectées par "floral dip" comme décrit [241]. La génération M0 a été cultivée dans des milieux MS contenant l'antibiotique hygromycine et les plantes transgéniques ont été sélectionnées comme décrit dans [242]. La génération M1 a été vérifiée par PCR et analysée pour l'expression des gènes. La coloration GUS a été réalisée pour les plantes homozygotes de la génération M2 sélectionnée comme décrite [243]. Les tissus fraîchement récoltés ont été collectés et conservés dans de l'acétone à 80 % avant d'effectuer les tests β— glucuronidase dans un tampon de phosphate de potassium 100 mM, pH 7, Triton X-100 0,1 %, K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> 10 mM et K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> 10 mM. Les tissus ont ensuite été incubés dans du x-Gluc 2 mM à 37 °C pendant quatre heures. Les tissus ont subi une déshydratation grâce à une série de concentration d'éthanol de 20 à 70 % pendant 30 minutes, ce qui a permis de les nettoyer. Puis, les tissus ont été observés au microscope optique et photographiés numériquement à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager 1 ou d'un stéréomicroscope ZEISS SteREO Discovery V12.

#### 5.2.4.5 Mutation de *map3k19* par la méthode CRISPR-Cas9

Nous avons utilisé la méthode CRISPR-Cas9 développée par Hiroki Tsutsui et Tetsuya Higashiyama [244]. Nous avons utilisé le vecteur pKIR1.1 qui y a été digéré par l'enzyme AarI (ThermoFisher, #ER1581) puis déphosphorylé grâce à l'enzyme rAPid (Alkaline Phosphatase, Roche, #04898133001). Nous avons effectué une ligation (T4 Polynucleotide Kinase (NEB) avec la séquence cible (gARN) de la *AtMAP3K19*. La séquence du gARN présentant le meilleur score, selon le logiciel [www.atum.bio](http://www.atum.bio) (ATUM Website), a été sélectionnée. Cette séquence est présentée dans le **Tableau 5** (Annexe 3). Après transformation dans *E.coli* et une sélection par la spectinomycine, nous avons séquencé les vecteurs pour vérifier l'intégration du gARN. La souche C56C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été électro-transformée par le vecteur pKIR1.1-*AtMAP3K19*-gRNA. Les plantes sauvages d'*A. thaliana* ont été infectées par «*floral dip*» comme décrit [241]. La sélection des plantes M0 a été faite par la présence de fluorescence rouge dans la graine. Afin d'augmenter la probabilité d'une mutation dans la séquence de la *AtMAP3K19*, nous avons causé un stress de chaleur comme décrit dans l'article [5]. En bref, après quatre jours d'acclimatation à 21 °C, nous avons alternativement mis les plantes à 37 °C pendant 30 heures puis à 21 °C pendant 42 heures cela pendant 10 jours ; puis nous avons mis les plantes à 21 °C jusqu'à la fin de leurs croissances [5]. Par la suite, nous avons contre sélectionné les graines ne présentant pas de fluorescence rouge. Une fois les graines germées, nous avons amplifié la région de l'ADN<sub>génomique</sub> ciblé par le gARN par PCR puis nous avons séquencé la partie amplifiée, avec les amorces décrites dans le **Tableau 5**, afin de trouver une mutation à l'emplacement du gARN. Par la suite, les croisements ont été effectués avec les mutants T-DNA *MAP3K20* et *MAP3K21*. La sélection des doubles et du triple mutant a été fait par la méthode PCR et séquençage (Annexe 3 : **Tableau 5**).

#### 5.2.4.6 Viabilité du pollen

Pour le test de viabilité du pollen, trois répliques ont été utilisées, chacune utilisant le pollen de six fleurs différentes provenant de quatre plantes ayant le même génotype. Les grains de pollen à l'anthèse ont été mis en contact avec le colorant d'Alexander pendant 10 min puis mis entre lame et lamelle pour l'observation [245]. Les observations ont été faites avec une caméra Zeiss AxioCam HR sur un microscope Zeiss Axio Imager M1.

#### **5.2.4.7 Tests de germination et de croissance *in vitro***

Les expériences de germination *in vitro* du pollen d'*A. thaliana* ont été menées comme décrit [226]. En bref, le pollen de 15 fleurs de la même plante a germé dans 80 µl de PGM solide (0,01 % d'acide borique, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> 10 % de saccharose, 0,5 % d'agarose à bas point de fusion, pH 7,6) à 22 °C pendant trois heures. Les grains de pollen ont été classés comme germés si la longueur du TP était égale ou supérieure au diamètre du grain de pollen. Au moins six réplicas pour chaque génotype répété trois fois pour chaque moyenne. 200 grains de pollen ont été notés pour les taux de germination et 100 tubes ont été mesurés dans chaque réplique pour un total de plus de 500 tubes polliniques.

#### **5.2.4.8 Tests de croissance *in vivo* et coloration au bleu d'aniline**

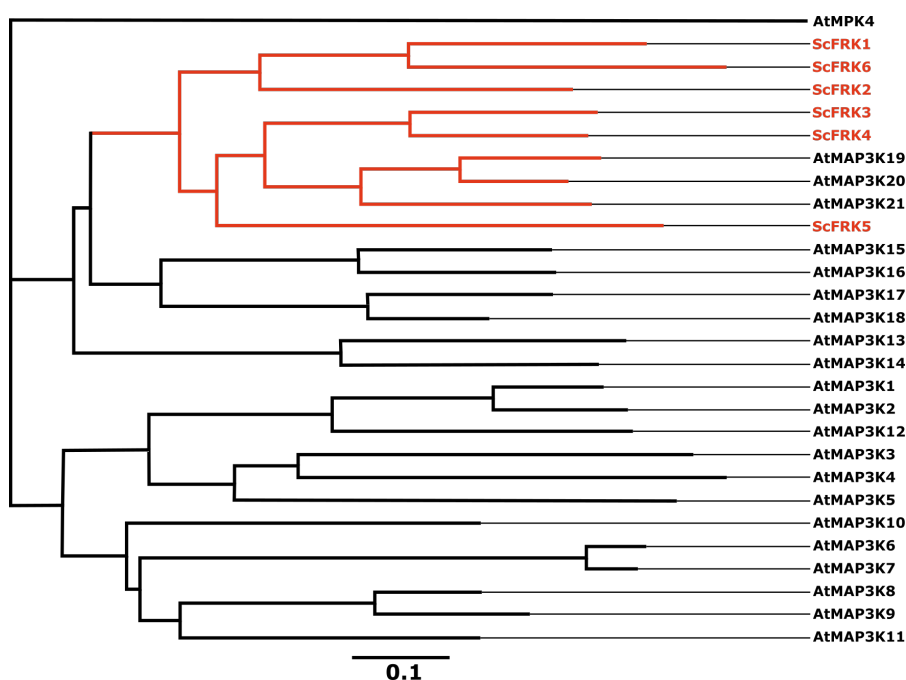
Pour les expériences de germination *in vivo* du pollen d'*A. thaliana*, des pistils de type sauvage ont été émasculés 16 heures avant l'anthèse. Puis, ils ont été pollinisés à la main avec du pollen provenant des plantes sauvages, des simples, des doubles ou du triple mutants. Le pollen des 10 premières fleurs de la tige principale des plantes a été utilisé. Une heure et demi après la pollinisation, les pistils ont été collectés. Les pistils ont été fixés pendant deux heures à température ambiante (TR) dans un fixateur acide acétique/éthanol (1:3), réhydratés pendant 30 min successivement à l'aide d'éthanol 70 %, 50 % et 30 % et de ddH<sub>2</sub>O à TR, puis ramollis avec 8M NaOH pendant une nuit à TR. Ensuite, ils ont été lavés trois fois à l'aide d'un tampon (108 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 11) et colorés avec 0,1 % de bleu d'aniline dans un tampon 108 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 11 avec 2 % (v/v) de glycérol pendant deux heures à l'obscurité à TR [246]. Enfin, les pistils ont été montés sur une lame de microscope à l'aide d'une goutte de solution de bleu d'aniline décolorée avec 5 % (v/v) de glycérol et soigneusement pressés avec une lamelle de couverture pour ouvrir le pistil longitudinalement. La fluorescence du bleu d'aniline a été observée au microscope inversé Zeiss Axio Imager Z1 en utilisant l'émission de lumière UV. Des pollinisations indépendantes (n = 15 à 20) ont été effectuées pour chaque génotype de pollen. La longueur des TP a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (domaine public ; <http://imagej.nih.gov/ij/>).



## 5.2.5 Résultats

### 5.2.5.1 Les *AtMAP3K19, 20 et 21* sont les paralogues des *ScFRK1, 2 et 3*

L'étude du génome d'*A. thaliana* a déterminé qu'il y avait 21 *AtMAP3K* dans le génome [1]. Parmi les 21 *AtMAP3Ks*, seulement trois, la *AtMAP3K19-20-21*, font partie du sous-groupe des FRK de *S. chacoense* (**Figure 26**). Elles partagent entre 48 et 60 % d'identité par paires d'acides aminés avec la *ScFRK3*. Les séquences protéiques des *AtMAP3K19*, *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21* sont similaires de 56 à 76 %. Une étude récente sur les kinases FRK a démontré un large développement de cette famille chez les Solanacées [217]. Leurs rôles chez les différentes espèces semblent fortement liés à la formation des gamètes et à la fécondation. Les études faites sur les kinases *ScFRK1*, *ScFRK2* et *ScFRK3* ont permis d'appuyer cette hypothèse [175, 176]. La *AtMAP3K19-20-21* sont les orthologues les plus proches de la famille des *ScFRK* (**Figure 26**). Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces trois kinases sont impliquées dans la reproduction d'*A. thaliana*.

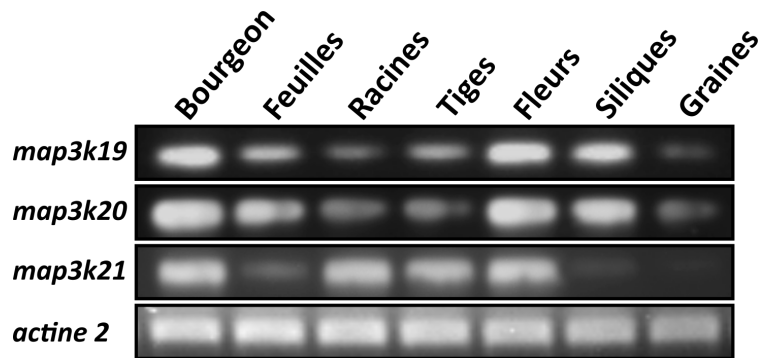


**Figure 26 : Positionnement phylogénétique de la *AtMAP3K19*, de la *AtMAP3K20* et de la *AtMAP3K21* dans la classe des *ScFRK* et de l'ensemble des *AtMAP3K*.**

A. L'Arbre phylogénétique des *AtMAP3K1-21* et des *ScFRKs* (*ScFRK1-6*). Les *AtMAP3K19-20-21* sont les homologues les plus proches des FRK de *S. chacoense*. L'arbre a été réalisé par la méthode de l'assemblage des voisins en utilisant 1000 répliques et enraciné avec la kinase *AtMPK4*.

### 5.2.5.2 Les *AtMAP3K19, 20 et 21* sont exprimées dans le pollen et le TP.

Les analyses transcriptomiques par micropuces ont démontrés une augmentation de l'expression des *AtMAP3K19* et *20* dans les derniers stades du développement des gamétophytes mâles (Annexes 3 : **Tableau 6**) [178]. L'étude des grains de pollen matures, des grains de pollen 30 minutes après la germination, 4 heures après la germination et les TP semi-*in vivo* montre que parmi les 20 *AtMAP3Ks* présentes sur la biopuce, les *AtMAP3K19* et *20* sont les plus fortement exprimées à ces différents stades (Annexes 3 : **Tableau 6**).



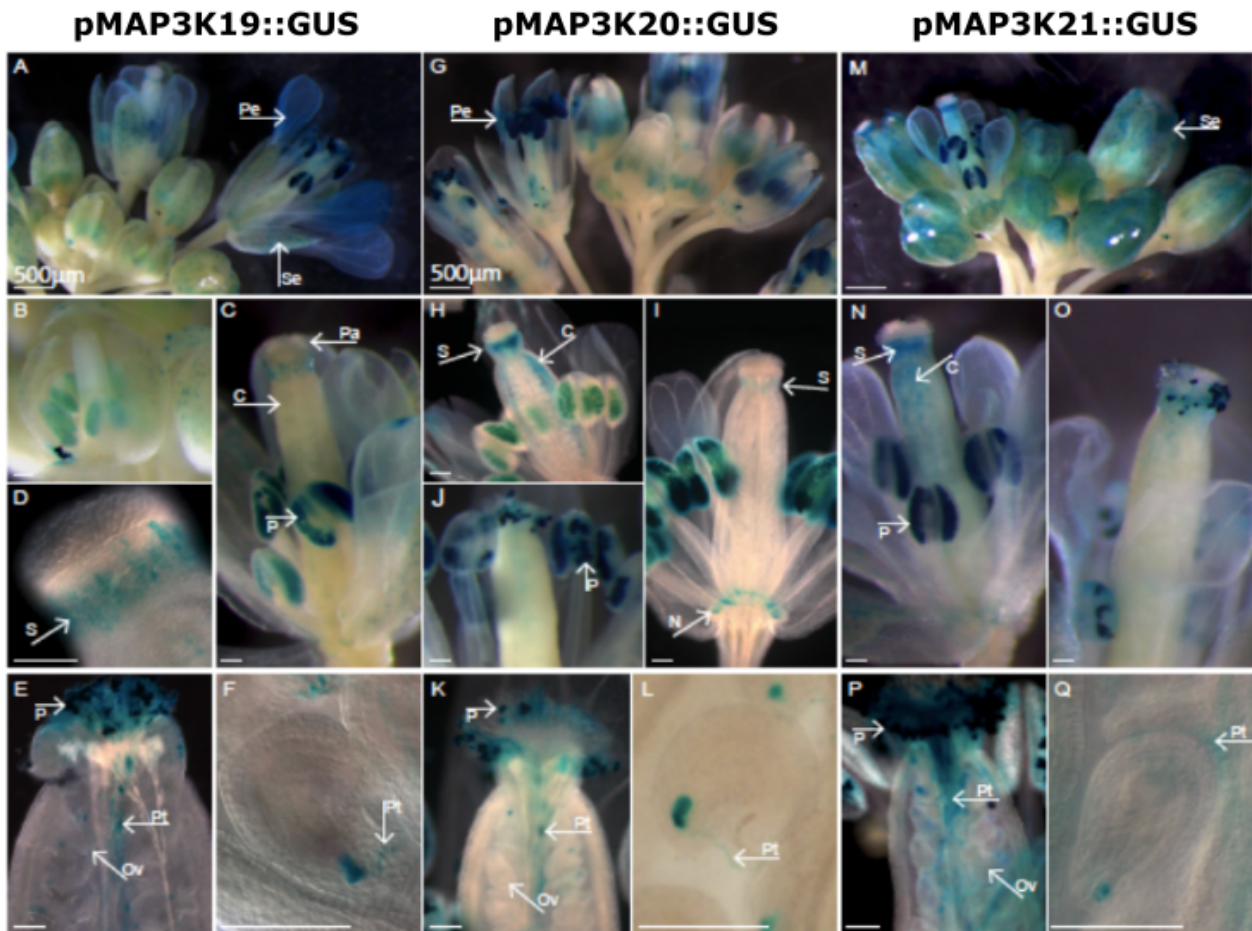
**Figure 27:** RT-PCR pour les patrons d'expression *MAP3K19*, *20* et *21*.

Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *MAP3K19*, *20* et *21* dans divers organes de la plante d'*A. thaliana*. Le gène de l'*Actine2* est utilisé comme contrôle interne pour une charge égale.

Pour déterminer dans quels tissus les trois *AtMAP3K* sont exprimées, des RT-PCR semi-quantitatives ont été effectuées sur les bourgeons, les feuilles de la rosette, les racines, les tiges, les fleurs, les grains ainsi que les siliques (**Figure 27**). La figure 27, nous montre que les *AtMAP3K19,20 et 21* sont exprimées fortement dans les bourgeons ainsi que dans les fleurs (**Figure 27**). L'expression GUS, sous le contrôle des promoteurs de la *AtMAP3K19*, *20* ou *21*, ont permis d'observer la localisation tissulaires de ces gènes (**Figure 28**). Les plantes transgéniques contenant ces constructions ont ensuite été analysées au moyen d'un test histochimique axé sur les fleurs. Bien que modérément exprimée dans les pétales de fleurs matures, l'expression de *AtMAP3K19* a surtout été trouvée dans le pollen et le style tout au long du développement (**Figure 28A-D**). L'expression devenait plus forte à mesure que le pollen se développait, atteignant un maximum autour du stade 11 de la fleur, correspondant à la première mitose du pollen (PMI) [247]. La coloration GUS a pu être suivie jusqu'à une cellule pollinique spécifique, elle a été observée dans les TP pendant sa croissance (**Figure 28E**) et suivie jusqu'à la décharge du TP pendant la fécondation (**Figure 28F**). Des schémas d'expression similaires ont également été observés pour les deux autres *AtMAP3K*. L'expression des *AtMAP3K20* et *AtMAP3K21* semble s'étendre à la partie supérieure de la valve à des stades plus jeunes (**Figure 28G-L, M-P**), tandis que la *AtMAP3K20* montre également une expression dans les glandes

nectarifères (**Figure 28I**). L'expression est encore plus forte dans le pollen tout au long de son développement, jusqu'à l'allongement du TP, atteignant un maximum dans le pollen autour du stade PMI (**Figure 28K-L ; Q-R**).

Ces deux expériences permettent d'affirmer que la *AtMAP3K21* est exprimée lors de la formation du grain de pollen et dans le TP. De façon plus générale, ces trois *AtMAP3Ks* s'expriment fortement lors de la formation du grain de pollen ainsi que lors de la croissance du TP.



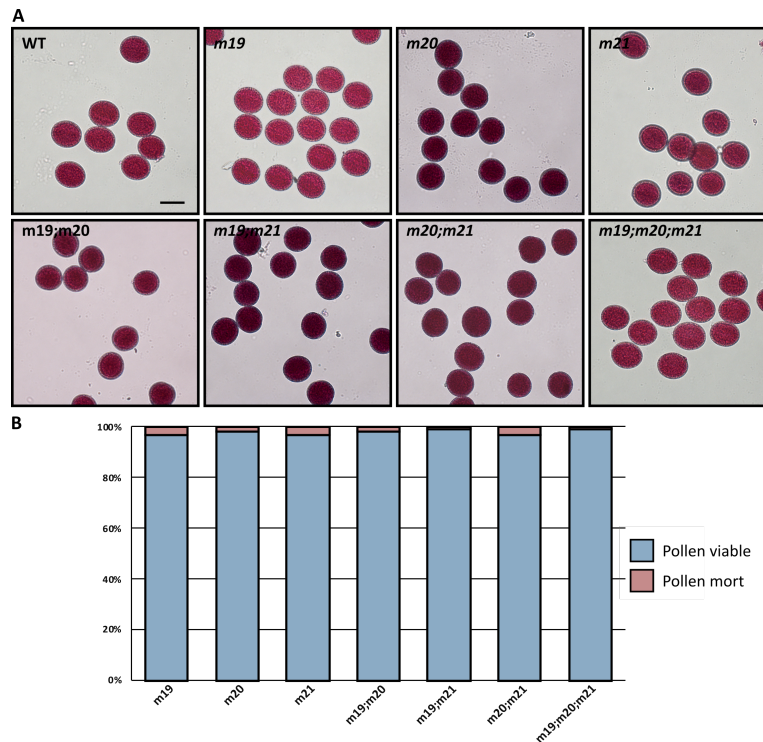
**Figure 28 : Analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur GUS par le promoteur des trois *MAP3Ks*.**

Expression du gène rapporteur GUS avec les promoteurs *AtMAP3K19* (H-F), *AtMAP3K20* (G-L) et *AtMAP3K21* (M-Q). L'observation globale de l'apex floral (A, G et M) permet de visualiser tous les stades de développement de la fleur. Un examen plus approfondi permet d'attester que l'expression des kinases se trouve principalement dans le pollen (P), la coloration augmentant avec le développement, jusqu'à environ la fin du stade 11. Des fleurs autour de ce stade ont été observées pour chaque gène (*MAP3K19* : B-D ; *MAP3K20* : H-J ; *MAP3K21* : N-O). La coloration dure dans le pollen pendant l'allongement du tube pollinique (PT) et peut être retracée jusqu'à l'éclatement pour les trois kinases (E-F ; K-L ; P-Q). Barre d'échelle = 100 µm, sauf pour A, G et M (500µm). Carpelle (C) ; nectars (N) ; ovule (Ov) ; papille, (Pa) ; pétale, (Pe) ; pollen, (P) ; tubes polliniques (PT) ; style, (S) ; valve (V).

### 5.2.5.3 Effets de la mutation des *AtMAP3K19*, *20* et *21* sur la formation des grains de pollen

Pour comprendre le rôle des *AtMAP3K19-20-21* lors de la formation du grain de pollen et lors de la germination et la croissance du TP, nous avons utilisé des lignées mutantes T-DNA disponibles sur TAIR pour la *AtMAP3K20* et la *AtMAP3K21*. La méthode CRISPR-Cas9 a permis d'obtenir un mutant nul pour le gène *AtMAP3K21* dans la lignée Col0. Nous avons obtenu une lignée homozygote contenant une délétion de 16 nucléotides dans le domaine kinase entraînant l'apparition d'un codon-STOP prématuré (Annexes 3 : **Tableau 7**). Toutes les lignées homozygotes pour la *AtMAP3K20* et *AtMAP3K21* ont été identifiées par PCR (Annexes 3 : **Tableau 7**). L'identification des lignées *AtMAP3K19* a été faite par la méthode PCR puis par séquençage (Annexes 3 : **Tableau 5**). Des croisements ont été effectués pour obtenir les simples, les doubles ainsi que le triple mutant.

Pour savoir si ces *AtMAP3K* sont impliquées lors du développement des gamétophytes mâles, nous avons observé la viabilité des grains de pollen à maturité avec la coloration d'Alexandre [245]. La **Figure 29A** nous montre que l'ensemble des grains de pollen dans les différents contextes génotypiques présente une coloration violette, nous permettant de conclure à la viabilité de ces pollens. La quantification de la viabilité des grains pollens chez les simples, les doubles ou le triple mutant, qui a été effectué trois fois sur six fleurs de quatre plantes ayant le même génotype, ne présentent aucune diminution de la viabilité des pollens à l'anthesis (**Figure 29B**). Ce résultat montre que les *AtMAP3K19-20-21* ne semblent pas nécessaires pour la formation des grains de pollen.



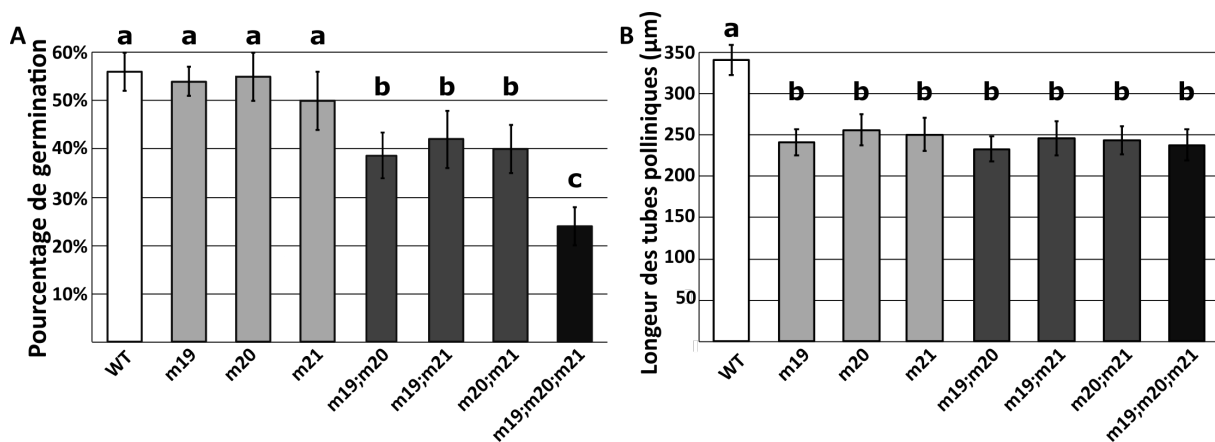
**Figure 29 : Test de viabilité des grains de pollen à l'anthèse.**

A. Image de grains de pollen colorés au colorant d'Alexandre des lignées de type sauvage, les simples mutantes *AtMAP3K19* (*m19*), *AtMAP3K20* (*m20*), *AtMAP3K21* (*m21*), les doubles mutantes *AtMAP3K19;AtMAP3K20* (*m19;m20*), *AtMAP3K19;AtMAP3K21* (*m19;m21*), *AtMAP3K20;AtMAP3K21* (*m20;m21*), et le triple mutant *AtMAP3K19;AtMAP3K20;AtMAP3K21* (*m19;m20;m21*). Barre d'échelle = 20  $\mu$ m. B. Pourcentage du pollen viable (bleu clair) et pollen mort (rouge clair) dans les lignées simples, doubles et triple mutant.

#### 5.2.5.4 Effets de la mutation des *AtMAP3K19*, *20* et *21* sur la germination et l'élongation des TP.

Les trois MAP3K étant fortement exprimés lors de la croissance du TP, nous avons analysé la capacité de germination et de croissance des différents génotypes (**Figure 28**). L'analyse statistique a indiqué que le taux de germination des simples mutants n'est pas différent de celui des plantes sauvages (WT) (**Figure 30A**). Cependant les doubles mutantes *AtMAP3K19;AtMAP3K20* (*m19;m20*), *AtMAP3K19;AtMAP3K21* (*m19;m21*) et *AtMAP3K20;AtMAP3K21* (*m20;m21*) présentent une diminution de la germination significativement différente des plantes sauvages. La capacité de germination des grains de pollen du triple mutant *AtMAP3K19;AtMAP3K20;AtMAP3K21* (*m19;m20;m21*) est plus faible que le type sauvage et il est significativement plus faible que les grains de pollen des

doubles mutants (**Figure 30A**). Ce résultat permet de conclure que les AtMAP3K19-20-21 sont toutes les trois impliquées dans la germination du pollen d'*A. thaliana*.



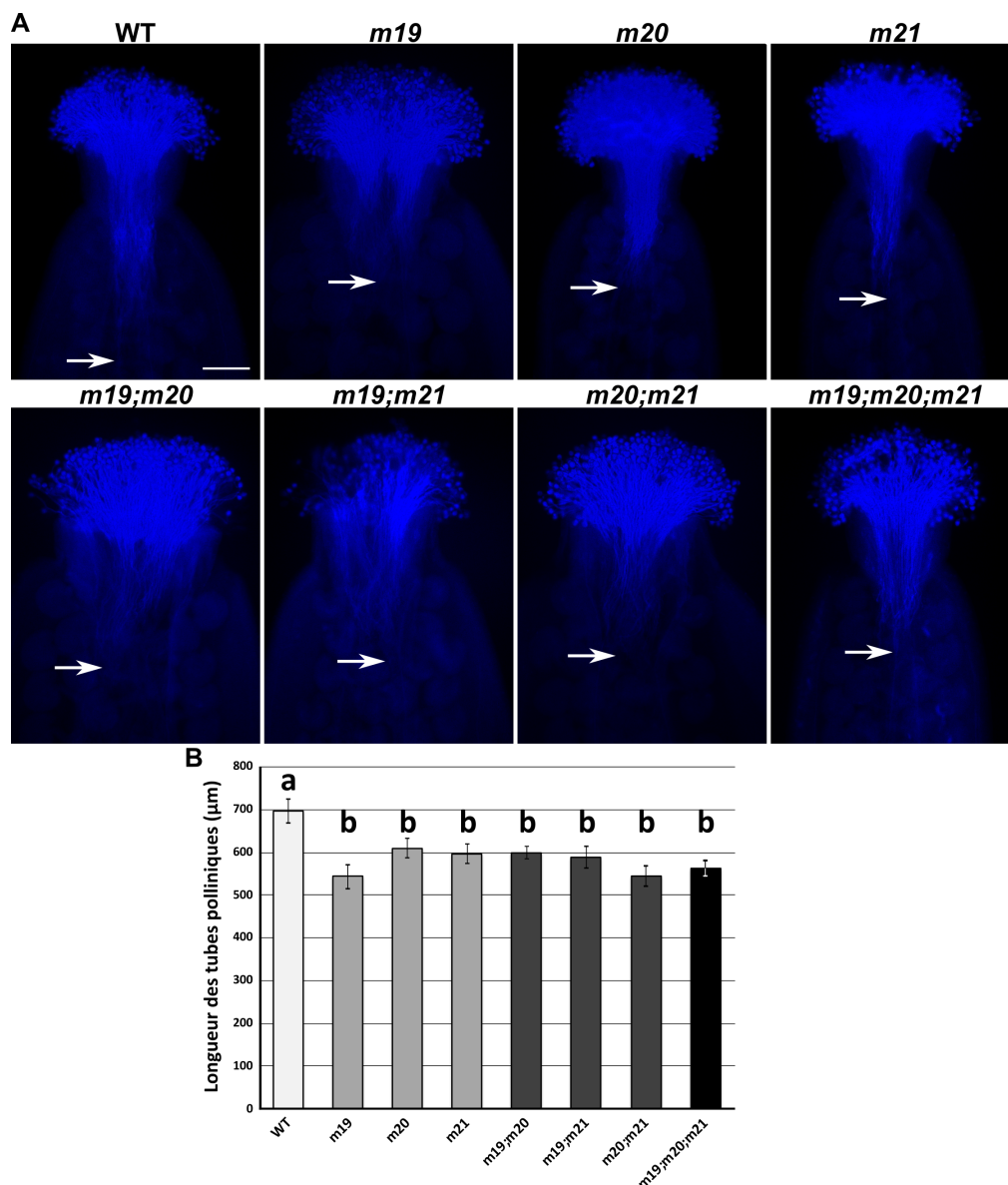
**Figure 30 : Tests de germination et de croissance *in vitro*.**

A. Pourcentage de germination du pollen et B. longueur du tube pollinique de type sauvage (WT), des simples mutants *MAP3K19* (*m19*), *MAP3K20* (*m20*), *MAP3K21* (*m21*), des doubles mutants *MAP3K19;MAP3K20* (*m19;m20*), *MAP3K20;MAP3K21* (*m19;m21*), *MAP3K20;MAP3K21* (*m20;m21*) et du triple mutant *MAP3K19;MAP3K20;MAP3K21* (*m19;m20;m21*) après trois heures de croissance *in vitro*. Les données représentent les valeurs moyennes  $\pm$ SE. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ , ANOVA à sens unique, test de Tukey).

Trois heures après germination *in vitro*, les TP des simples mutants *AtMAP3K19* (*m19*), *AtMAP3K20* (*m20*) et *AtMAP3K21* (*m21*) sont nettement plus courts que ceux de la plante sauvage (WT) (**Figure 30B**). Ce même résultat est aussi observable pour les trois doubles mutants ainsi que pour le triple mutant. En effet, la longueur des TP des différentes lignées mutantes est sensiblement plus courte que celle du type WT. La longueur moyenne des TP de type sauvage est de  $341,6 \pm 18,7 \mu\text{m}$  ( $n > 500$ ), alors qu'elle est entre  $233,4 \pm 18,2 \mu\text{m}$  et  $256,7 \pm 19,6 \mu\text{m}$  ( $n > 500$ ) pour les TP des différentes lignées mutantes après 3 heures de croissance *in vitro*. Pour confirmer ce phénotype, le comportement des TP des mutants ont également été observés *in vivo*. Pour cela, les stigmates WT ont été pollinisés avec du pollen des différentes lignées mutantes. Quatre-vingt-dix minutes post-pollinisation, les stigmates sont récoltés, fixés, réhydratés, colorés au bleu d'aniline puis observées au microscope sous lumière UV. Plus de 17 stigmates sont ainsi récoltés pour chaque lignée (**Figure 31A**). L'analyse statistique indique que le taux de croissance des TP de l'ensemble des mutants est nettement plus faible que celui des TP sauvages (**Figure 31B**). Les tests *in vivo* présentent les mêmes résultats que les tests de croissance *in vitro*. Ainsi nous pouvons conclure que les *AtMAP3K19*, *AtMAP3K20* et



AtMAP3K21 sont impliquées dans la germination et la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

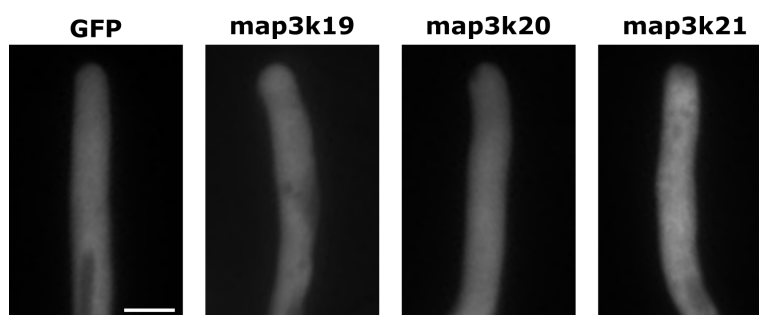


**Figure 31 : Croissance des tubes polliniques *in vivo*.**

A. Image des pistils colorés au bleu d'aniline, 90 min post-pollinisation avec par des grains de pollen de type sauvage (WT), des simples mutants *MAP3K19* (*m19*), *MAP3K20* (*m20*), *MAP3K21* (*m21*), des doubles mutants *MAP3K19*; *MAP3K20* (*m19*; *m20*), *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m19*; *m21*), *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m20*; *m21*) et du triple mutant *MAP3K19*; *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m19*; *m20*; *m21*) après 90 minutes de croissance. La flèche blanche montre la longueur maximum atteint par les tubes polliniques. B. Longueur des TP de type sauvage (WT), des simples mutants *MAP3K19* (*m19*), *MAP3K20* (*m20*), *MAP3K21* (*m21*), des doubles mutants *MAP3K19*; *MAP3K20* (*m19*; *m20*), *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m19*; *m21*), *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m20*; *m21*) et du triple mutant *MAP3K19*; *MAP3K20*; *MAP3K21* (*m19*; *m20*; *m21*) après 90 minutes de croissance dans les pistils WT. Les données représentent les valeurs moyennes  $\pm$  SEM d'au moins 15 répétitions pour chaque génotype. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ , ANOVA à sens unique, test de Tukey).

### 5.2.5.5 Localisation cellulaire dans le tube pollinique

Le TP est une cellule très atypique par son organisation intracellulaire, mais aussi parce qu'elle contient les deux cellules spermatiques. De nombreuses protéines impliquées dans la signalisation sont localisées spécifiquement à différents endroits de la cellule ou dans les cellules spermatiques pour permettre la croissance polarisée du TP [87]. Pour observer la localisation cellulaire des trois MAP3K, nous avons bombardé des grains de pollen de *Nicotiana tabacum*. Nous pouvons observer que les MAP3K19-20-21 se localisent dans l'ensemble du tube pollinique sans localisation particulière (**Figure 32**).



**Figure 32 : Localisation cellulaire de la AtMAP3K19-20-21 dans le TP.**

Localisation cellulaire de la GFP et des AtMAP3K19-20-21 dans le tube pollinique de *Nicotiana*.  
Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.6 Discussion

Les cascades de signalisation MAPK sont impliquées dans de nombreux processus développementaux comme la formation des stomates, la croissance des racines et également le développement des gamétophytes mâles et femelles [168, 174, 248]. Chez *Arabidopsis thaliana*, les données transcriptomiques réalisées en 2009, montrent une forte expression de la *AtMAP3K19* et de la *AtMAP3K20* lors du développement du grain de pollen, dans les grains de pollen 30 minutes après leur germination *in vitro*, après quatre heures *in vitro*, et dans les TP semi-*in vivo* (Annexes 3 : **Tableau 6**) [178]. Chez les Solanacées, les orthologues de ces kinases sont les membres de la famille des FERTILIZATION-RELATED KINASE (FRK). Une étude sur ce sous-groupe des FRK a déterminé qu'elles seraient principalement impliquées dans les processus développementaux des gamètes mâles et femelles [174]. Les études faites sur la ScFRK1, la ScFRK2 et la ScFRK3 démontrent l'importance de ces MAP3K lors de la formation des sacs embryonnaires et des grains de pollen [176, 177, 249, 250]. L'analyse phylogénétique



des ScFRK montre qu'elles sont les orthologues putatifs de la MAP3K19, MAP3K20 et la MAP3K21 chez *A.thaliana* (**Figure 26**).

Les *AtMAP3K* sont fortement exprimées dans les anthères, les grains de pollen, ainsi que les TP. L'analyse de l'expression GUS vient confirmer la forte expression de la *AtMAP3K19-20* dans les tissus reproducteurs mâles, lors de la germination et lors de la croissance du TP (**Figure 27** et **Figure 28**). La RT-PCR et l'expression GUS montre que la *AtMAP3K21* est elle aussi fortement exprimée durant la formation du gamétophyte mâle et durant l'élongation du TP. Contrairement aux *ScFRK1-2-3*, la méthode GUS n'a pas détecté d'expression des *AtMAP3Ks* dans les ovaires. Par conséquent, les *AtMAP3K19-20-21* ne jouent aucun rôle dans la formation du sac embryonnaire [175, 176].

L'ensemble des lignées mutantes pour les *AtMAP3K19-20-21* ne présentent aucun défaut évident des grains de pollen à l'anthèse (**Figure 29**). Contrairement aux *ScFRK1-2-3* où la modification de l'expression perturbe le développement du gamétophyte mâle, les *AtMAP3K* ne semblent pas être impliquées dans ce processus développemental. Par contre, les doubles mutants conduisent à une diminution de la germination des TP et ce phénotype est renforcé pour le triple mutant (**Figure 30**). De plus, les tests de croissance *in vitro* et *in vivo* montrent que l'élongation des TP est affectée lors de la mutation d'une ou l'autre des *AtMAP3K* (**Figure 30** et **Figure 31**). En revanche, les doubles et le triple mutants ne présentent pas une diminution significative par rapport aux les simples mutants (**Figure 30** et **Figure 31**). Ces résultats montrent que ces trois *AtMAP3Ks* participent à la germination et la croissance du TP. L'analyse de la germination et la croissance du TP a été faite pour les différentes lignées RNAi-*ScFRK3* et aucune d'entre elles ne présente de défaut de la germination ou de l'élongation des TP *in vitro* et *in vivo* (résultat non publié, Caroline Daigle et Daniel P. Matton). Malgré leurs homologies de séquence, le rôle des *AtMAP3K19-20-21* est bien différent de la fonction des *ScFRK1-2-3* chez *S. chacoense*.

L'utilisation de l'inhibiteur des MKK, U0126, a permis de démontrer que les cascades MAPK sont nécessaires à la germination et l'élongation du TP. Cette étude permet d'identifier des membres de cette superfamille impliqués dans ce processus biologique. Avant ces recherches, seule la MPK6 avait clairement été identifiée, dans l'élongation en interagissant avec certains facteurs de transcription AtWRKY ou encore certaines protéines kinases telles que PIP5K6 qui nécessaires pour l'endocytose [184]. Une autre étude faite par Benhamman Rachid et *al.* en 2018 a émis l'hypothèse que la cascade *AtMAP3K20-AtMKK3-AtMPK6* serait impliquée dans la régulation du cytosquelette lors de la croissance des racines [168]. De

plus, des résultats non publiés du laboratoire Matton ont montré que la AtMAP3K19 et 21 peuvent phosphoryler la AtMKK3. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que la AtMAP3K19-20-21 active la AtMKK3 et que celle-ci, une fois active, va phosphoryler la AtMPK6 pour réguler l'élongation du TP.

Cette étude sur les AtMAP3K19-20-21 vient démontrer pour la première fois l'implication directe de certaines MAPK lors de la germination et l'élongation du TP chez *A. thaliana*. L'identification de ces substrats en aval de ces trois AtMAP3K représente une étape importante dans la poursuite de la compréhension du rôle des cascades MAPK lors de la reproduction.

## 6 Discussion et perspective générales

---

### 6.1 Discussion générale

L'objectif de ma thèse était d'essayer de comprendre l'implication des MAPK pendant la formation des gamétophytes et lors de la germination et l'élongation du tube pollinique. Cette thèse permet la caractérisation d'une nouvelle MAPK, ScFRK3, et d'affiner nos connaissances sur la ScFRK2 chez *S. chacoense*. Afin d'élargir nos connaissances sur le rôle des MAPK, nous démontrons que les cascades MAPKs sont nécessaires lors de la germination et la croissance du tube pollinique chez *A. thaliana*. Pour finir, nous confirmons l'implication de cette famille de kinases, en essayant de comprendre le rôle des AtMAP3K19-20-21 lors de la reproduction. Malgré les homologies de séquence et la similarité d'expression entre les ScFRK2-3 et les AtMAP3K19-20-21, leurs rôles sont bien différents chez ces deux espèces, ce qui nous conduit à des conclusions et des perspectives bien différentes.

#### 6.1.1 Chez *Solanum chacoense*

Dans le premier chapitre, nous avons montré l'importance des réseaux de signalisation pour la formation des gamétophytes mâles et femelles [9, 62]. Les cascades MAPK semblent fortement impliquées dans ces processus développementaux. Chez les Solanacées, un sous-groupe de MAP3K, nommé FRK pour *Fertilization-Related Kinases*, joue un rôle dans la formation du pollen et des ovules [174].

Les études faites sur deux FRK, ScFRK1 et ScFRK2 chez *S. chacoense*, ont permis de démontrer que ces deux protéines kinase sont impliquées dans la formation des gamétophytes [176, 250]. Le phénotypage des mutants de surexpression *ScFRK2* présente une diminution drastique du nombre de graines par fruit. Cette même étude montre que la surexpression de *ScFRK2* conduit les ovules à se développer en structures carpéloïdes [176]. Dans le chapitre III, nous montrons effectivement que la transformation des ovules en structures carpéloïdes conduit à une diminution du nombre de graines par fruit, mais elle ne permet pas d'expliquer la totalité de ce phénotype, car les structures carpéloïdes représentent seulement 10 % des ovules de l'ovaire (**Figure 20**). Nous avons poursuivi nos investigations en observant le nombre d'ovules non carpéloïdes arrivant à maturité (**Figure 20**). Un grand nombre d'ovules sans sac embryonnaire a pu être observé dans les ovaires à l'anthesis ce qui permet d'expliquer la

diminution du nombre de graines par fruit. L'analyse du développement des sacs embryonnaires des lignées surexprimant *ScFRK2* montre qu'ils n'arrivent pas à entrer en mitose I. Après l'arrêt au stade mégaspore fonctionnelle, les sacs embryonnaires vont progressivement dégénérer (**Figure 21**). Ce chapitre permet de montrer l'implication de la *ScFRK2* dans la formation du sac embryonnaire.

Le chapitre II avait pour objectif de caractériser un nouveau membre de la famille des ScFRK. Tout comme la *ScFRK1* et la *ScFRK2*, la *ScFRK3* est exprimée dans les anthères et les ovaires tout au long de leur développement (**Figure 14**). *ScFRK1* est davantage dans l'ovaire à l'anthèse ainsi que dans les cellules-mères du pollen (PMC) [250]. La *ScFRK2* est plus fortement exprimée dans l'ovaire lors de la fécondation ainsi que dans le pollen immature [176, 177]. Quant à *ScFRK3*, elle est aussi exprimée dans les ovaires en développement, mais plus tôt que *ScFRK1*, et son expression est très faible lorsque la fleur est à l'anthèse (**Figure 14**). Également, on détecte un peu de son expression lorsque le fruit se développe, principalement au niveau du péricarpe.

L'analyse des lignées mutantes de sous-expression pour la *ScFRK1* et *ScFRK3* et les lignées de surexpression pour la *ScFRK2* présentent le même phénotype. Chez l'ensemble des lignées, les sacs embryonnaires arrêtent leur développement à l'étape de la mégaspore fonctionnelle, puis dégénèrent. Quant aux grains de pollen, ils n'entrent pas en mitose I [176, 217, 250]. Bien que les phénotypes des trois mutants soient similaires, les *ScFRK1-2-3* ne semblent pas jouer le même rôle. La méiose est un mécanisme moléculaire complexe, ainsi que l'entrée en mitose et les *ScFRK1-2-3* pourraient être impliquées à différents moments, tout en aboutissent aux mêmes phénotypes. Les différences d'expression entre ces trois kinases nous permettent de conclure que ces trois MAPK jouent des rôles distincts, mais que chacun d'eux est nécessaire en amont de la mitose I pour permettre la formation du sac embryonnaire et du grain de pollen, chez *S. chacoense*.

Le chapitre II met aussi l'accent sur la recherche des ScMKK et des ScMPK en aval de la *ScFRK3*. Cette recherche est un axe nouveau comparativement aux études précédentes. La *ScFRK3* interagit avec la ScMKK3 et la ScMKK3 interagit avec la ScMPK13, ce qui pourrait constituer la première voie d'intégration par les cascades MAPK découvertes chez *S. chacoense* (**Figure 18** et **Figure 19**). La découverte des cascades MAPK fait partie des perspectives que nous expliquerons plus longuement dans la partie 6.2.1.

### 6.1.2 Chez *Arabidopsis thaliana*

Le chapitre cinq avait pour objectif de caractériser la AtMAP3K19, la AtMAP3K20 et la AtMAP3K21 qui sont les homologues putatifs du groupe des ScFRK. La forte homologie de séquence entre ScFRK3 et les trois MAP3K d'*A. thaliana* nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une homologie de fonction entre ces MAP3K et la ScFRK3. L'analyse de l'expression des *MAP3K19-20-21*, grâce à la technique d'expression GUS, a confirmé que ces kinases sont fortement exprimées à la fin de la formation du gamète mâle et dans le grain de pollen mature (**Figure 27** et **Figure 28**) Contrairement aux ScFRKs, les *AtMAP3K* ne sont pas exprimées dans l'ovaire (**Figure 28**). Ces kinases ne jouent donc aucun rôle dans le développement de l'ovule ce qui est la première différence avec les ScFRKs. L'analyse d'expression nous mène naturellement à l'observation du gamétophyte mâle. L'observation des mutants *AtMAP3K20*, *AtMAP3K21* et *AtMAP3K19* ont montré que les grains de pollen sont viables chez les simples, les doubles et chez le triple mutant (**Figure 29**). Ces trois AtMAP3K ne semblent pas impliquées dans la formation du grain de pollen d'*A. thaliana*.

L'analyse des lignées GUS sous le contrôle des promoteurs de la *AtMAP3K19-20-21* révèle que ces trois kinases sont fortement exprimées pendant la croissance du TP (**Figure 28**). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre un, très peu de recherches ont été faites sur les MAPK lors de la croissance des TP chez *A. thaliana*. La AtMPK6 est la seule à avoir été identifiée comme jouant un rôle dans l'élongation du TP [184]. Pour autant, le simple mutant ne présente aucune diminution de la germination ou de l'élongation du TP. Ces débuts de résultat nous ont conduits naturellement à nous poser la question de la nécessité des cascades MAPK lors de la germination et la croissance du TP. Le chapitre quatre avait pour objectif de répondre à cette interrogation.

L'utilisation de U0126 permet d'inhiber sept des dix MKK lors de la germination du grain de pollen et du TP [189, 224]. En présence de U0126, la germination des grains de pollen est affectée. La taille des TP après trois heures de croissance est plus faible que dans les contrôles (**Figure 22**). Une augmentation de la concentration de U0126 conduit à un gonflement de l'apex puis à l'éclatement de la RA du TP (**Figure 23**). Ces résultats montrent que les MKK sont nécessaires pour la germination et la croissance du TP chez *A. thaliana*. L'analyse des FA montre une diminution et une désorganisation particulièrement importantes dans la région apicale et subapicale en présence de l'inhibiteur U0126 (**Figure 24** et **Figure 37**). Dans le TP,

l'organisation de l'exocytose est dépendante des filaments d'actine. Afin de confirmer l'impact de l'inhibition des MKK sur les FA, nous avons observé l'exocytose grâce au gène rapporteur YFP-RabA4b. En présence de U0126, la quantité de vésicules contenant YFP-RabA4b est diminuée dans la région apicale et le taux de renouvellement de ces vésicules est réduit de 30 % (**Figure 25**). L'inhibition de l'activité des MKK dans le TP entraîne une désorganisation des FA conduisant à la réduction de l'exocytose. Ce chapitre nous permet de démontrer que certaines cascades MAPK sont essentielles pour la croissance polarisée du tube pollinique.

La nécessité des cascades MAPK pendant la germination et la croissance du TP permet de soutenir l'hypothèse que les AtMAP3K19-20-21 pourraient jouer un rôle lors de ces deux processus biologiques. Les simples mutants *AtMAP3K19*, *AtMAP3K20* et *AtMAP3K21* ne présentent aucun problème de germination du pollen. En revanche, l'ensemble des doubles mutants montre une diminution d'en moyenne 29 % de germination des grains de pollen. Chez le triple mutant, ce phénotype est renforcé avec une diminution de 48 % par rapport au grain de pollen sauvage (**Figure 31**). Les tests de croissance *in vitro* et *in vivo* pour les simples, les doubles ou le triple mutant présentent une diminution de l'élongation des TP (**Figure 30** et **Figure 31**). Cependant, la diminution n'est pas renforcée chez les doubles ou le triple mutant. Ces résultats montrent que les AtMAP3K19-20-21 sont impliquées dans de la germination et la croissance des TP (**Figure 30** et **Figure 31**). Contrairement aux ScFRK1-2-3, les orthologues d'*A. thaliana* ne semblent pas jouer un rôle lors de la formation des gamétophytes mâles et femelles. Par contre, elles semblent requises pour la germination et la croissance du TP.

La signalisation des MAPK fonctionnant en cascade, la recherche d'une ou des MKK en aval de la AtMAP3K19-20-21 permettrait de mieux comprendre leurs rôles dans la germination et l'élongation du TP. Même si nous n'avons pas encore étudié cette partie, certaines études nous permettent déjà d'émettre des hypothèses sur ces cascades. En effet, la cascade AtMAP3K20-AtMKK3-AtMPK4/AtMPK6 est impliquée dans la croissance racinaire [168]. Un résultat non publié de Fangwen Bai dans le laboratoire de D. P. Matton, a montré que la AtMAP3K19 et la AtMAP3K21 interagissent elles aussi avec la AtMKK3 et les *essai kinases* montrent la phosphorylation de la AtMKK3 par ces trois kinases. De plus, la AtMPK6 est impliquée dans la croissance et le guidage du TP [150, 184, 187]. Ces deux résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que la AtMKK3 se trouve en aval des AtMAP3K19-20-21 et qu'une fois activée, elle pourrait phosphoryler la AtMPK6 qui, comme nous le savons déjà, joue un rôle dans l'élongation du TP. Bien sûr, cette cascade ne peut être la seule dans le TP,

car la mutation de la *AtMKK3* ou de la *AtMPK6* ne permet pas d'observer le phénotype observé pour les *AtMAP3K19-20-21*. Il semblerait donc que plusieurs cascades MAPK coexistent ce qui expliquerait en partie la spécificité de la réponse des MAPK dans le TP.

Le lien entre la signalisation MAPK et l'organisation des FA n'a jamais clairement été démontré. Cependant, l'utilisation de U0126 sur les poils racinaires a aussi montré un lien entre les cascades des MAPK et l'organisation FA à l'apex des poils racinaires. Dans la partie 1.3.2.2 qui est consacrée au rôle du cytosquelette dans le TP, nous avons décrit le rôle de deux protéines : la MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN [1] 18 et la MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEIN 25 [118, 119]. Malgré les noms de ces protéines, les auteurs ont démontré que ces protéines modifient le réseau des FA et non les microtubules dans le TP. Dans les racines, lors de la formation des stomates ou encore pendant la division asymétrique du pollen, certains MPK phosphorylent les MAP pour modifier l'organisation des microtubules [118, 119]. Il serait donc possible que certaines cascades MAPK modifient l'état de phosphorylation des MAP pour organiser temporellement et spécialement le réseau des FA dans le TP.

## 6.2 Perspectives

Cette thèse permet de mieux comprendre l'implication de la super famille des MAPK lors de la reproduction dans le règne végétal. Pour autant, ces différents chapitres ne sont que les prémisses d'une compréhension plus fine de la fonction des MAPK lors de la reproduction. La différence fonctionnelle entre les ScFRK et les AtMAP3K ouvre de nombreuses perspectives. Dans cette partie, nous présenterons quelques-unes des perspectives qui nous semblent les plus intéressantes à explorer, aux vues des résultats obtenus dans les chapitres précédents.

### 6.2.1 Chez *Solanum chacoense*

Le travail effectué sur la caractérisation de ScFRK3 pourrait être approfondi en identifiant les kinases en aval de cette FRK. La méthode du double hybride et du BiFC ont confirmé l'interaction entre ScFRK3 et ScMKK3. Pour autant, leurs interactions, dans le cadre d'une cascade de signalisation par voie MAPK, nécessitent la vérification du transfert de phosphate de la ScFRK vers la ScMCKK et de ScMCKK vers la ScMPK. Des *essais kinases in vitro* en utilisant des versions purifiées des protéines ScFRK3, ScMKK3 et ScMPK13, à l'aide

de ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) dATP, pourraient constituer une excellente expérience [251]. D'ailleurs, les trois protéines formant la cascade supposée ainsi que chacune de leurs versions *kinase-dead* ont été clonées dans des vecteurs d'expression bactériens, permettant l'ajout d'une étiquette de six histidines. Les Kinases ScMKK3 et ScMPK13 ont été exprimées et purifiées avec succès. Bien que ScFRK3 était suffisamment exprimée, nous n'avons pas été en mesure de la purifier. En effet, cette dernière n'est soluble qu'en conditions dénaturantes (8M urée). Malgré plusieurs tentatives (comme différentes conditions utilisées pour effectuer la dialyse), il a été impossible de réduire la concentration d'urée sans qu'il y ait précipitation. Une solution envisageable pour tenter de résoudre ce problème serait d'utiliser une autre méthode d'expression. Par exemple, l'expression dans les plantes de tabac ou encore dans les levures permettrait peut-être d'obtenir une protéine directement soluble [252]. Si la voie de signalisation proposée dans cette thèse (ScFRK3 → ScMKK3 → ScMPK13) s'avère confirmée par les *essai kinases*, il serait intéressant de modifier l'expression de *ScMKK3* et de *ScMPK13* en utilisant la méthode ARN interférent ou la méthode Crisper-Cas9. Ces différentes lignées permettraient d'observer et de comparer le phénotype avec celui observé pour les lignées *RNAi-ScFRK3* [217, 244]. Cette recherche de similarité phénotypique permettrait de démontrer que la ScMKK3 et la ScMPK13 se trouvent en aval de la ScFRK3.

La continuité du travail effectué sur la kinase ScFRK2 serait, comme pour ScFRK3, de trouver les kinases en aval. La même méthodologie que pour l'étude de la ScFRK3 serait envisagée. Les techniques de doubles hybrides et de BiFC vont permettre d'identifier une interaction possible avec une ou des ScMKK [213]. Les *essais kinases* permettent de confirmer le transfert de phosphate de la ScFRK2 aux ScMKK. Après avoir identifié les kinases en aval, la recherche du même phénotype dans des lignées RNAi ou l'inactivation du gène par la méthode CRISP-Cas9 des ScMKK identifiés permettrait de confirmer les liens entre la ScFRK2 et cette/ces ScMKK.

La connaissance des cascades MAPK dans le développement des gamétophytes, nous conduits naturellement à investiguer plus en profondeur le ou les déclencheur de cette voie (en amont) et ses conséquences (en aval) ; et ainsi à affiner la fonction des ScFRK. Par exemple, pour la cascade ScFRK3-ScMKK3-ScMPK13, la découverte des facteurs de transcription, ou toute autre protéine située en aval, par la méthode de criblage en double hybride chez la levure, pourraient être envisagées en utilisant ScMPK13 comme appât [168]. Pour compléter ce résultat, l'incubation d'un extrait de protéines provenant d'ovaires ou d'étamines avec/sans ScMPK13, suivi d'un gel 2D de la fraction enrichie en protéines phosphorylées permettrait d'identifier des cibles possibles de la ScMPK13 [253]. L'utilisation de ces deux méthodes à



large spectre va permettre d'identifier un certain nombre de protéines intéressantes. Suite à cela, des méthodes plus fines vont pouvoir être utilisées, comme le BiFC, le double hybride ou les *essais kinases* pour vérifier l'interaction [213, 251]. Bien sûr, la recherche de similarités phénotypiques va permettre de confirmer l'implication des facteurs de transcription, les protéines liées au cytosquelette, etc. Cette méthodologie pourrait être utilisée pour identifier les protéines en aval de la cascade ScFRK2 après l'identification de la ScMPK.

Parmi les six ScFRKs identifiées, les différentes études ont montré que trois d'entre elles sont impliquées dans la formation des gamétophytes [217, 249]. Sur une échelle de temps plus long et en vue de l'importance que joue la ScFRK1-2-3, il serait intéressant de savoir si la ScFRK4, la ScFRK5 et la ScFRK6, sont, elles aussi, impliquées dans la formation des gamétophytes mâle et femelle. Pour cela, la même méthodologie utilisée dans le chapitre 2 sur la ScFRK3 c'est-à-dire, l'identification des lieux d'expressions, la création de lignées mutantes par ARN interférant, surexpression, identification et caractérisation du ou des phénotypes liés à la modification de l'expression des ScFRK, etc.

### **6.2.2 Chez *Arabidopsis thaliana***

L'utilisation de l'inhibiteur U0126 a permis de montrer l'implication des cascades de signalisation MAPK lors de la germination et la croissance des TP. Le chapitre quatre est le point de départ d'études permettant d'identifier les membres de la super famille des MAPK impliqués dans ces processus biologiques. Le chapitre cinq a justement pour but de commencer cette identification. Les trois AtMAP3K19-20-21 participent à la germination et la croissance des TP. La prochaine étape de cette recherche est de croiser des lignées exprimant Lifeact-eGFP et des lignées de YFP-RabA4b avec les simples, les doubles et le triple mutant des *AtMAP3K19-20-21* [110, 114]. La construction des lignées mutantes avec Lifeact-eGFP va nous permettre d'observer le comportement des filaments d'actine lors de la germination et la croissance du TP. Ces lignées vont nous permettre de savoir si les *AtMAP3K19-20-21* régulent l'organisation des FA dans le TP. Les lignées YFP-RabA4b vont quant à elle, permettre l'observation de l'exocytose à l'apex du TP en absence des trois kinases [110, 114]. L'analyse des FA et de l'exocytose va permettre d'affiner notre compréhension du rôle de ces MAP3K lors de la croissance du TP chez *Arabidopsis thaliana*.

Pour poursuivre cette recherche, il serait intéressant d'identifier les MAPK en aval de ces MAP3Ks. L'hypothèse de la cascade AtMAP3K19-20-21—AtMKK3—AtMPK6 semble intéressante aux vues des recherches d'interactions menées par Benhamman R. et par F. Bai

dans le laboratoire de Daniel Matton [168, 213]. Nous pourrions observer la germination et la croissance du TP *in vitro* et *in vivo* du mutant *AtMKK3*. Le mutant *AtMPK6* ne présente aucun phénotype lié à la germination et l'élongation du TP [184]. Même si cette cascade participe à l'élongation du TP, d'autres membres de la superfamille sont nécessairement impliqués dans l'élongation polarisée du TP. La drogue U0126 inhibe sept des dix MKK présents chez *A. thaliana* (*AtMKK1, 2,5,7,8,9* et *10*). Les résultats de transcriptomique montrent que la *AtMKK5* est celle qui s'exprime le plus fortement parmi les sept inhibées (Annexes 2: **Tableau 4**) [178, 231, 254]. La *AtMKK5* est connue pour son rôle dans la réponse immunitaire, et dans la répartition et la formation des stomates chez *A. thaliana* [231, 234, 248]. Ces différentes études ont montré que la *AtMKK5* a la capacité de phosphoryler la *AtMPK6* [255]. Pour ces raisons, il serait intéressant d'observer la germination et l'élongation du TP en absence d'expression de la *AtMKK5*.

L'analyse des résultats de transcriptomique des grains de pollen et des tubes polliniques en croissance permet de s'intéresser à d'autres MAPK. Par exemple, parmi les 20 membres de la famille MPK, les biopuces montrent une forte expression pour la *AtMPK8-9-15-17-19* et *20* [178]. Après vérification de l'expression par RT-PCR, l'utilisation de mutant T-DNA ou la formation de mutant par la méthode CRISP-Cas9, permettraient d'observer si leur absence affecte la germination, l'élongation et la polarité des TP *in vivo* et *in vitro*. L'identification des membres de la superfamille des MAPK permettrait d'établir des cascades de signalisation, en recherchant les interactions possibles entre les différents membres, grâce à l'utilisation de techniques comme le BiFC.

Les différentes propositions de méthodologies ou de sujets faites dans cette partie ne sont bien entendu que des possibilités, et bien d'autres propositions de recherche pourraient être encore énoncées ici.

## 7 Conclusion

---

La fécondation est un événement essentiel pour les organismes vivants, elle permet la formation d'un nouvel individu. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre l'implication des cascades de signalisation MAPK lors de la reproduction végétale.

Ces recherches ont permis de mettre en lumière un nouveau phénotype lors de la surexpression de ScFRK2 dans les ovaires chez *Solanum chacoense*. La surexpression de cette MAP3K conduit un grand nombre de sacs embryonnaires à dégénérer après leurs entrées en mitose. Ces résultats démontrent que ScFRK2 est impliqué dans la formation du sac embryonnaire. Nous avons poursuivi ces recherches en caractérisant la ScFRK3, qui est aussi impliquée dans la formation du sac embryonnaire ainsi que du grain de pollen. La diminution de l'expression de ScFRK3 conduit un grand nombre de gamétophytes mâles et femelles à arrêter leurs développements avant d'être entrés en mitose. Ces recherches renforcent l'idée que le groupe des ScFRK joue un rôle essentiel lors du développement des gamétophytes femelles et mâles.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication des MKK lors de la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*. L'utilisation de U0126 a permis de montrer que l'inhibition des MKK conduit à la diminution de la germination et la croissance du tube pollinique. L'observation des filaments d'actine et du trafic vésiculaire en présence de U0126 a montré des désorganisations des FA dans la région apicale et subapicale ainsi qu'une diminution du trafic vésiculaire. Nous avons poursuivi ces recherches en identifiant trois MAP3K (AtMAP3K19, 20 et 21) fortement exprimées dans les graines de pollen et dans le tube pollinique. L'analyse des doubles et du triple mutant pour ces kinases a montré une diminution de la germination et de la croissance du TP. L'ensemble des résultats ont permis de comprendre l'importance des cascades MAPK lors de la croissance du tube pollinique chez *Arabidopsis thaliana*.

Ces recherches ne sont que la prémisse d'un objectif à plus long terme de compréhension de la signalisation moléculaire permettant la formation des grains de pollen, des ovules, ainsi que la croissance du tube pollinique. La recherche fondamentale avance et continuera à affiner et à révéler de nouveaux gènes à notre compréhension, de nouveaux mécanismes et de nouveaux réseaux de signalisation nécessaires à la fécondation, mais plus généralement à la survie et à l'évolution des espèces végétales.

## 8 Bibliographies

---

1. Group M: **Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**(7):301-308.
2. Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R *et al*: **Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*.** *Science* 2003, **301**(5633):653-657.
3. Misra RC: **Contribution to the embryology of *Arabidopsis thaliana*.** *Arga Univ J Res* 1962, **11**:119-131.
4. Owen HA, Makaroff CA: **Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae).** *Protoplasma* 1995, **185**(1):7-21.
5. LeBlanc C, Zhang F, Mendez J, Lozano Y, Chatpar K, Irish VF, Jacob Y: **Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress.** *Plant J* 2018, **93**(2):377-386.
6. Moffatt SRabA: **Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type *Arabidopsis* and a Male-Sterile Mutant Sharon M.** *The plant cell* 1990, **2**:877-889.
7. Smyth DR, Bowman, M.J., Meyerowitz, E.M.: **Early flower development in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 1990, **2**:755-767.
8. Borg M, Brownfield L, Twell D: **Male gametophyte development: a molecular perspective.** *Journal of Experimental Botany* 2009, **60**(5):1465-1478.
9. Twell D: **Male gametogenesis and germline specification in flowering plants.** *Sex Plant Reprod* 2011, **24**(2):149-160.
10. Berger F, Twell D: **Germline specification and function in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2011, **62**:461-484.
11. Hong L, Tang D, Zhu K, Wang K, Li M, Cheng Z: **Somatic and reproductive cell development in rice anther is regulated by a putative glutaredoxin.** *Plant Cell* 2012, **24**(2):577-588.
12. Greer E, Martin AC, Pendle A, Colas I, Jones AM, Moore G, Shaw P: **The Ph1 locus suppresses Cdk2-type activity during premeiosis and meiosis in wheat.** *Plant Cell* 2012, **24**(1):152-162.
13. De Muyt A, Pereira L, Vezon D, Chelysheva L, Gendrot G, Chambon A, Laine-Choinard S, Pelletier G, Mercier R, Nogue F *et al*: **A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination functions in *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS Genet* 2009, **5**(9):e1000654.
14. Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A: **Cell cycle control across the eukaryotic kingdom.** *Trends Cell Biol* 2013, **23**(7):345-356.
15. Wijnker E, Schnittger A: **Control of the meiotic cell division program in plants.** *Plant Reprod* 2013, **26**(3):143-158.
16. Dissmeyer N, Nowack MK, Pusch S, Stals H, Inze D, Grini PE, Schnittger A: **T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA;1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue.** *Plant Cell* 2007, **19**(3):972-985.
17. Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Alvim Kamei CL, Nowack MK, Novak B, Duan GL, Zhu YG, De Veylder L *et al*: **Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1.** *Plant Cell* 2009, **21**(11):3641-3654.

18. Yang C, Sofroni K, Wijnker E, Hamamura Y, Carstens L, Harashima H, Stolze SC, Vezon D, Chelysheva L, Orban-Nemeth Z *et al*: **The Arabidopsis Cdk1/Cdk2 homolog CDKA;1 controls chromosome axis assembly during plant meiosis.** *EMBO J* 2020, **39**(3):e101625.
19. Bulankova P, Akimcheva S, Fellner N, Riha K: **Identification of Arabidopsis meiotic cyclins reveals functional diversification among plant cyclin genes.** *PLoS Genet* 2013, **9**(5):e1003508.
20. Mercier R, Mezard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M: **The molecular biology of meiosis in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2015, **66**:297-327.
21. Ito ITaM: **Induction of typical cell division in isolated microspores of Lilium longiflorum and Tulipa gesneriana.** *Plant Science* 1980, **17**(3):279-285.
22. Terasaka O, Niitsu, T.: **Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells.** *Bot Mag Tokyo* 1987, **100**:205-2016.
23. Park SK, Howden R, Twell D: **The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate.** *Development* 1998, **125**(19):3789-3799.
24. Zhao X, Harashima H, Dissmeyer N, Pusch S, Weimer AK, Bramsiepe J, Bouyer D, Rademacher S, Nowack MK, Novak B *et al*: **A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant Arabidopsis thaliana.** *PLoS Genet* 2012, **8**(8):e1002847.
25. Borg M, Brownfield L, Khatab H, Sidorova A, Lingaya M, Twell D: **The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in Arabidopsis.** *The Plant Cell Online* 2011, **23**(2):534-549.
26. Zhang J, Huang Q, Zhong S, Bleckmann A, Huang J, Guo X, Lin Q, Gu H, Dong J, Dresselhaus T *et al*: **Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization.** *Nat Plants* 2017, **3**:17079.
27. Yamaoka S, Nishihama R, Yoshitake Y, Ishida S, Inoue K, Saito M, Okahashi K, Bao H, Nishida H, Yamaguchi K *et al*: **Generative Cell Specification Requires Transcription Factors Evolutionarily Conserved in Land Plants.** *Curr Biol* 2018, **28**(3):479-486 e475.
28. Duncia JV, Santella JB, 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC *et al*: **MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products.** *Bioorg Med Chem Lett* 1998, **8**(20):2839-2844.
29. Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ: **MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9):711-714.
30. Park SK, Rahman D, Oh SA, Twell D: **gemini pollen 2, a male and female gametophytic cytokinesis defective mutation.** *Sex Plant Reprod* 2004, **17**(2):63-70.
31. Oh SA, Jeon J, Park HJ, Grini PE, Twell D, Park SK: **Analysis of gemini pollen 3 mutant suggests a broad function of AUGMIN in microtubule organization during sexual reproduction in Arabidopsis.** *Plant J* 2016, **87**(2):188-201.
32. Oh SA, Johnson A, Smertenko A, Rahman D, Park SK, Hussey PJ, Twell D: **A Divergent Cellular Role for the FUSED Kinase Family in the Plant-Specific Cytokinetic Phragmoplast.** *Current Biology* 2005, **15**(23):2107-2111.
33. Oh SA, Allen T, Kim GJ, Sidorova A, Borg M, Park SK, Twell D: **Arabidopsis Fused kinase and the Kinesin-12 subfamily constitute a signalling module required for phragmoplast expansion.** *The Plant Journal* 2012, **72**(2):308-319.

34. Oh S, Bourdon V, Dickinson H, Twell D, Park S: **Arabidopsis Fused kinase TWO-IN-ONE dominantly inhibits male meiotic cytokinesis.** *Plant Reproduction* 2014, **27**(1):7-17.
35. Oh S-A, Bourdon V, Das 'Pal M, Dickinson H, Twell D: **Arabidopsis Kinesins HINKEL and TETRASPORE Act Redundantly to Control Cell Plate Expansion during Cytokinesis in the Male Gametophyte.** *Molecular Plant* 2008, **1**(5):794-799.
36. Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y: **HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Physiol* 2010, **51**(10):1766-1776.
37. Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y: **The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis.** *Genes & Development* 2001, **15**(3):352-363.
38. Nishihama R, Soyano T, Ishikawa M, Araki S, Tanaka H, Asada T, Irie K, Ito M, Terada M, Banno H *et al*: **Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex.** *Cell* 2002, **109**(1):87-99.
39. Gusti A, Baumberger N, Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A, Genschik P: **The Arabidopsis thaliana F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development.** *PLoS One* 2009, **4**(3):e4780.
40. Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG: **Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors.** *Nature* 2008, **455**(7216):1134-1137.
41. Rotman N, Durbarry A, Wardle A, Yang WC, Chaboud A, Faure JE, Berger F, Twell D: **A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants.** *Curr Biol* 2005, **15**(3):244-248.
42. Durbarry A, Vizir I, Twell D: **Male Germ Line Development in Arabidopsis. duo pollen Mutants Reveal Gametophytic Regulators of Generative Cell Cycle Progression.** *Plant Physiology* 2005, **137**(1):297-307.
43. Borg M, Rutley N, Kagale S, Hamamura Y, Gherghinoiu M, Kumar S, Sari U, Esparza-Franco MA, Sakamoto W, Rozwadowski K *et al*: **An EAR-Dependent Regulatory Module Promotes Male Germ Cell Division and Sperm Fertility in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2014, **26**(5):2098-2113.
44. Brownfield L, Hafidh S, Durbarry A, Khatab H, Sidorova A, Doerner P, Twell D: **Arabidopsis DUO POLLEN3 Is a Key Regulator of Male Germline Development and Embryogenesis.** *The Plant Cell* 2009, **21**(7):1940-1956.
45. Chevalier É, Loubert-Hudon A, Zimmerman EL, Matton DP: **Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization.** *New Phytologist* 2011, **192**(1):13-28.
46. Tekleyohans DG, Nakel T, Gross-Hardt R: **Patterning the Female Gametophyte of Flowering Plants.** *Plant Physiol* 2017, **173**(1):122-129.
47. Nakajima K: **Be my baby: patterning toward plant germ cells.** *Curr Opin Plant Biol* 2018, **41**:110-115.
48. Schmidt A, Schmid MW, Grossniklaus U: **Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction.** *Development* 2015, **142**(2):229-241.

49. Chevalier E, Loubert-Hudon A, Matton DP: **ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell–cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species.** *The Plant Journal* 2013, **73**(6):1019-1033.
50. Koszegi D, Johnston AJ, Rutten T, Czihal A, Altschmied L, Kumlehn J, Wust SE, Kirioukhova O, Gheyselinck J, Grossniklaus U *et al*: **Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program.** *Plant J* 2011, **67**(2):280-291.
51. Laux T, Mayer KF, Berger J, Jurgens G: **The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis.** *Development* 1996, **122**(1):87-96.
52. Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T: **Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem.** *Cell* 1998, **95**(6):805-815.
53. Lieber D, Lora J, Schrempp S, Lenhard M, Laux T: **Arabidopsis WIH1 and WIH2 genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate.** *Curr Biol* 2011, **21**(12):1009-1017.
54. Zhao X, de Palma J, Oane R, Gamuyao R, Luo M, Chaudhury A, Herve P, Xue Q, Bennett J: **OsTDL1A binds to the LRR domain of rice receptor kinase MSP1, and is required to limit sporocyte numbers.** *Plant J* 2008, **54**(3):375-387.
55. Nonomura K, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N: **The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice.** *Plant Cell* 2003, **15**(8):1728-1739.
56. Yang L, Qian X, Chen M, Fei Q, Meyers BC, Liang W, Zhang D: **Regulatory Role of a Receptor-Like Kinase in Specifying Anther Cell Identity.** *Plant Physiol* 2016, **171**(3):2085-2100.
57. Wang CJ, Nan GL, Kelliher T, Timofejeva L, Vernoud V, Golubovskaya IN, Harper L, Egger R, Walbot V, Cande WZ: **Maize multiple archesporial cells 1 (mac1), an ortholog of rice TDL1A, modulates cell proliferation and identity in early anther development.** *Development* 2012, **139**(14):2594-2603.
58. Nowack MK, Harashima H, Dismeyer N, Zhao X, Bouyer D, Weimer AK, De Winter F, Yang F, Schnittger A: **Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in Arabidopsis.** *Dev Cell* 2012, **22**(5):1030-1040.
59. Zhao X, Bramsiepe J, Van Durme M, Komaki S, Prusicki MA, Maruyama D, Forner J, Medzihradzky A, Wijnker E, Harashima H *et al*: **RETINOBLASTOMA RELATED1 mediates germline entry in Arabidopsis.** *Science* 2017, **356**(6336).
60. She W, Grimanelli D, Rutowicz K, Whitehead MW, Puzio M, Kotlinski M, Jerzmanowski A, Baroux C: **Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants.** *Development* 2013, **140**(19):4008-4019.
61. Cao L, Wang S, Venglat P, Zhao L, Cheng Y, Ye S, Qin Y, Datla R, Zhou Y, Wang H: **Arabidopsis ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule.** *PLoS Genet* 2018, **14**(3):e1007230.
62. Erbasol Serbes I, Palovaara J, Gross-Hardt R: **Development and function of the flowering plant female gametophyte.** *Curr Top Dev Biol* 2019, **131**:401-434.
63. Domenichini S, Benhamed M, De Jaeger G, Van De Slijke E, Blanchet S, Bourge M, De Veylder L, Bergounioux C, Raynaud C: **Evidence for a role of Arabidopsis CDT1**

- proteins in gametophyte development and maintenance of genome integrity.** *Plant Cell* 2012, **24**(7):2779-2791.
64. Liu Z, Yuan L, Song X, Yu X, Sundaresan V: **AHP2, AHP3, and AHP5 act downstream of CKI1 in Arabidopsis female gametophyte development.** *J Exp Bot* 2017, **68**(13):3365-3373.
  65. Yuan L, Liu Z, Song X, Johnson C, Yu X, Sundaresan V: **The CKI1 Histidine Kinase Specifies the Female Gametic Precursor of the Endosperm.** *Dev Cell* 2016, **37**(1):34-46.
  66. Rovekamp M, Bowman JL, Grossniklaus U: **Marchantia MpRKD Regulates the Gametophyte-Sporophyte Transition by Keeping Egg Cells Quiescent in the Absence of Fertilization.** *Curr Biol* 2016, **26**(13):1782-1789.
  67. Koi S, Hisanaga T, Sato K, Shimamura M, Yamato KT, Ishizaki K, Kohchi T, Nakajima K: **An Evolutionarily Conserved Plant RKD Factor Controls Germ Cell Differentiation.** *Curr Biol* 2016, **26**(13):1775-1781.
  68. Tedeschi F, Rizzo P, Rutten T, Altschmied L, Baumlein H: **RWP-RK domain-containing transcription factors control cell differentiation during female gametophyte development in Arabidopsis.** *New Phytol* 2017, **213**(4):1909-1924.
  69. Heslop-Harrison YaS, K.R.: **The receptive surface of the angiosperm stigma.** *Annals of Botany* 1977, **41**:1233-1258.
  70. Luu DT, Heizmann P, Dumas C: **Pollen-Stigma Adhesion in Kale Is Not Dependent on the Self-(In)Compatibility Genotype.** *Plant Physiol* 1997, **115**(3):1221-1230.
  71. Dominguez E MJA, Quesada M.A. and Heredia A.: **Pollen sporopollenin- degradation and structural elucidation.** *Sex Plant Reprod* 1999, **12**(3):171-178.
  72. Synek L, Sekeres J, Zarsky V: **The exocyst at the interface between cytoskeleton and membranes in eukaryotic cells.** *Front Plant Sci* 2014, **4**:543.
  73. Barnabas B, and Fridvalszky, L.: **Adhesion and germination of differently treated maize pollen grains on the stigma.** *Acta Botanica Hungarica* 1984, **30**(3-4):329-332.
  74. Hamamura Y, Saito C, Awai C, Kurihara D, Miyawaki A, Nakagawa T, Kanaoka MM, Sasaki N, Nakano A, Berger F *et al*: **Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in Arabidopsis thaliana.** *Curr Biol* 2011, **21**(6):497-502.
  75. Steinhorst L, Kudla J: **Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**(7):1573-1581.
  76. Fu Y: **The cytoskeleton in the pollen tube.** *Curr Opin Plant Biol* 2015, **28**:111-119.
  77. Cai G, Parrotta L, Cresti M: **Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth.** *J Integr Plant Biol* 2015, **57**(1):63-78.
  78. Wang SS, Diao WZ, Yang X, Qiao Z, Wang M, Acharya BR, Zhang W: **Arabidopsis thaliana CML25 mediates the Ca(2+) regulation of K(+) transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation.** *Plant Cell Environ* 2015, **38**(11):2372-2386.
  79. H. BJLaKB: **The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth.** . *American Journal of Botany* 1964, **50**(9):859-865.
  80. Rathore KS, Cork RJ, Robinson KR: **A cytoplasmic gradient of Ca2+ is correlated with the growth of lily pollen tubes.** *Dev Biol* 1991, **148**(2):612-619.
  81. Pierson ES, Miller DD, Callaham DA, Shipley AM, Rivers BA, Cresti M, Hepler PK: **Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the**



- intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media.** *Plant Cell* 1994, **6**(12):1815-1828.
82. Iwano M, Shiba H, Miwa T, Che FS, Takayama S, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A: **Ca<sup>2+</sup> dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2004, **136**(3):3562-3571.
  83. Franklin-Tong VE RJ, Read ND, Trewavas AJ, Franklin F.C.: **The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium.** *Plant Journal* 1993, **4**:163-177.
  84. Rui Malho NDR, M Salomé Pais, Anthony J Trewavas: **Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth.** *The Plant Journal* 1994, **5**(3):331-341.
  85. Song LF, Zou JJ, Zhang WZ, Wu WH, Wang Y: **Ion transporters involved in pollen germination and pollen tube tip-growth.** *Plant Signal Behav* 2009, **4**(12):1193-1195.
  86. Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD: **Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation.** *Plant Physiol* 2005, **138**(2):744-756.
  87. Zhou L, Fu Y, Yang Z: **A genome-wide functional characterization of Arabidopsis regulatory calcium sensors in pollen tubes.** *J Integr Plant Biol* 2009, **51**(8):751-761.
  88. Demidchik V, Davenport RJ, Tester M: **Nonselective cation channels in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2002, **53**:67-107.
  89. Very AA, Sentenac H: **Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**(4):168-175.
  90. Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF: **A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(36):14531-14536.
  91. Moutinho A, Hussey PJ, Trewavas AJ, Malho R: **cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(18):10481-10486.
  92. Tsuruhara A, Tezuka T: **Relationship between the self-incompatibility and cAMP level in *Lilium longiflorum*.** *Plant Cell Physiol* 2001, **42**(11):1234-1238.
  93. Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo JA: **Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine.** *Science* 2011, **332**(6028):434-437.
  94. Li J, Li Y, Deng Y, Chen P, Feng F, Chen W, Zhou X, Wang Y: **A calcium-dependent protein kinase, ZmCPK32, specifically expressed in maize pollen to regulate pollen tube growth.** *PLoS One* 2018, **13**(5):e0195787.
  95. Scheible N, McCubbin A: **Signaling in Pollen Tube Growth: Beyond the Tip of the Polarity Iceberg.** *Plants (Basel)* 2019, **8**(6).
  96. Tavares B, Dias PN, Domingos P, Moura TF, Feijo JA, Bicho A: **Calcium-regulated anion channels in the plasma membrane of *Lilium longiflorum* pollen protoplasts.** *New Phytol* 2011, **192**(1):45-60.
  97. Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z: **Signaling in pollen tube growth: crosstalk, feedback, and missing links.** *Mol Plant* 2013, **6**(4):1053-1064.
  98. Padmanaban S, Czerny DD, Levin KA, Leydon AR, Su RT, Maugel TK, Zou Y, Chanroj S, Cheung AY, Johnson MA *et al*: **Transporters involved in pH and K<sup>+</sup> homeostasis affect pollen wall formation, male fertility, and embryo development.** *J Exp Bot* 2017, **68**(12):3165-3178.

99. Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ: **Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth.** *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:109-125.
100. Chen N, Qu X, Wu Y, Huang S: **Regulation of actin dynamics in pollen tubes: control of actin polymer level.** *J Integr Plant Biol* 2009, **51**(8):740-750.
101. Fu Y: **The actin cytoskeleton and signaling network during pollen tube tip growth.** *J Integr Plant Biol* 2010, **52**(2):131-137.
102. Staiger CJ, Poulter NS, Henty JL, Franklin-Tong VE, Blanchoin L: **Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen.** *J Exp Bot* 2010, **61**(7):1969-1986.
103. Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK: **Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube.** *Planta* 2005, **221**(1):95-104.
104. Ren H, Xiang Y: **The function of actin-binding proteins in pollen tube growth.** *Protoplasma* 2007, **230**(3-4):171-182.
105. Duckney P, Deeks MJ, Dixon MR, Kroon J, Hawkins TJ, Hussey PJ: **Actin-membrane interactions mediated by NETWORKED2 in Arabidopsis pollen tubes through associations with Pollen Receptor-Like Kinase 4 and 5.** *New Phytol* 2017, **216**(4):1170-1180.
106. Geitmann A, Emons AM: **The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth.** *J Microsc* 2000, **198**(Pt 3):218-245.
107. Hepler PK, Vidali L, Cheung AY: **Polarized cell growth in higher plants.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, **17**:159-187.
108. Ye J, Zheng Y, Yan A, Chen N, Wang Z, Huang S, Yang Z: **Arabidopsis formin3 directs the formation of actin cables and polarized growth in pollen tubes.** *Plant Cell* 2009, **21**(12):3868-3884.
109. Fu Y, Wu G, Yang Z: **Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes.** *J Cell Biol* 2001, **152**(5):1019-1032.
110. Qu X, Zhang H, Xie Y, Wang J, Chen N, Huang S: **Arabidopsis villins promote actin turnover at pollen tube tips and facilitate the construction of actin collars.** *Plant Cell* 2013, **25**(5):1803-1817.
111. Rounds CM, Hepler PK, Winship LJ: **The apical actin fringe contributes to localized cell wall deposition and polarized growth in the lily pollen tube.** *Plant Physiol* 2014, **166**(1):139-151.
112. Su H, Feng H, Chao X, Ding X, Nan Q, Wen C, Liu H, Xiang Y, Liu W: **Fimbrins 4 and 5 Act Synergistically During Polarized Pollen Tube Growth to Ensure Fertility in Arabidopsis.** *Plant Cell Physiol* 2017, **58**(11):2006-2016.
113. Qian D, Xiang Y: **Actin Cytoskeleton as Actor in Upstream and Downstream of Calcium Signaling in Plant Cells.** *Int J Mol Sci* 2019, **20**(6).
114. Zhang H, Qu X, Bao C, Khurana P, Wang Q, Xie Y, Zheng Y, Chen N, Blanchoin L, Staiger CJ *et al*: **Arabidopsis VILLIN5, an actin filament bundling and severing protein, is necessary for normal pollen tube growth.** *Plant Cell* 2010, **22**(8):2749-2767.
115. Huang S, Qu X, Zhang R: **Plant villins: versatile actin regulatory proteins.** *J Integr Plant Biol* 2015, **57**(1):40-49.
116. Wu G, Gu Y, Li S, Yang Z: **A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets.** *Plant Cell* 2001, **13**(12):2841-2856.

117. Zhou Z, Shi H, Chen B, Zhang R, Huang S, Fu Y: **Arabidopsis RIC1 Severs Actin Filaments at the Apex to Regulate Pollen Tube Growth.** *Plant Cell* 2015, **27**(4):1140-1161.
118. Qin T, Liu X, Li J, Sun J, Song L, Mao T: **Arabidopsis microtubule-destabilizing protein 25 functions in pollen tube growth by severing actin filaments.** *Plant Cell* 2014, **26**(1):325-339.
119. Zhu L, Zhang Y, Kang E, Xu Q, Wang M, Rui Y, Liu B, Yuan M, Fu Y: **MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in Arabidopsis by modulating F-actin organization.** *Plant Cell* 2013, **25**(3):851-867.
120. Kang E, Zheng M, Zhang Y, Yuan M, Yalovsky S, Zhu L, Fu Y: **The Microtubule-Associated Protein MAP18 Affects ROP2 GTPase Activity during Root Hair Growth.** *Plant Physiol* 2017, **174**(1):202-222.
121. Onelli E, Moscatelli A: **Endocytic Pathways and Recycling in Growing Pollen Tubes.** *Plants (Basel)* 2013, **2**(2):211-229.
122. Jiang Y, Zhang M, Huang S: **Analysis of Actin-Based Intracellular Trafficking in Pollen Tubes.** *Methods Mol Biol* 2017, **1662**:125-136.
123. Chae K, Lord EM: **Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins.** *Ann Bot* 2011, **108**(4):627-636.
124. Camacho L, Malho R: **Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> and GTPases.** *J Exp Bot* 2003, **54**(380):83-92.
125. Tan X, Cao K, Liu F, Li Y, Li P, Gao C, Ding Y, Lan Z, Shi Z, Rui Q *et al*: **Arabidopsis COG Complex Subunits COG3 and COG8 Modulate Golgi Morphology, Vesicle Trafficking Homeostasis and Are Essential for Pollen Tube Growth.** *PLoS Genet* 2016, **12**(7):e1006140.
126. Jiang Y, Wang J, Xie Y, Chen N, Huang S: **ADF10 shapes the overall organization of apical actin filaments by promoting their turnover and ordering in pollen tubes.** *J Cell Sci* 2017.
127. Coelho PC, Malho R: **Correlative Analysis of [Ca]<sup>2+</sup> and Apical Secretion during Pollen Tube Growth and Reorientation.** *Plant Signal Behav* 2006, **1**(3):152-157.
128. Chen J, Gutjahr C, Bleckmann A, Dresselhaus T: **Calcium signaling during reproduction and biotrophic fungal interactions in plants.** *Mol Plant* 2015, **8**(4):595-611.
129. Luo N, Yan A, Liu G, Guo J, Rong D, Kanaoka MM, Xiao Z, Xu G, Higashiyama T, Cui X *et al*: **Exocytosis-coordinated mechanisms for tip growth underlie pollen tube growth guidance.** *Nat Commun* 2017, **8**(1):1687.
130. Wang H, Han S, Siao W, Song C, Xiang Y, Wu X, Cheng P, Li H, Jasik J, Micieta K *et al*: **Arabidopsis Synaptotagmin 2 Participates in Pollen Germination and Tube Growth and Is Delivered to Plasma Membrane via Conventional Secretion.** *Mol Plant* 2015, **8**(12):1737-1750.
131. Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J: **Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis.** *Curr Biol* 2007, **17**(6):520-527.
132. Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, Onelli E, Cresti M, Santo N, Idilli A: **Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 21):3804-3819.
133. Guo J, Yang Z: **Exocytosis and endocytosis: coordinating and fine-tuning the polar tip growth domain in pollen tubes.** *J Exp Bot* 2020, **71**(8):2428-2438.

134. Kim S, Mollet JC, Dong J, Zhang K, Park SY, Lord EM: **Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(26):16125-16130.
135. Park SY, Jauh GY, Mollet JC, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, Lord EM: **A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix.** *Plant Cell* 2000, **12**(1):151-164.
136. Dong J, Kim ST, Lord EM: **Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2005, **138**(2):778-789.
137. Higashiyama T, & Hamamura, Y.: **Gametophytic pollen tube guidance.** *Sex Plant Reprod* 2008, **21**(1):17-26.
138. Iwanami Y: **Physiological studies of pollen.** *Yokohama Municipal University* 1959.
139. Qu LJ, Li L, Lan Z, Dresselhaus T: **Peptide signalling during the pollen tube journey and double fertilization.** *J Exp Bot* 2015, **66**(17):5139-5150.
140. Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D: **Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels.** *Cell* 2003, **114**(1):47-59.
141. Ray A, Lang, J. D., Golden, T., & Ray, S.: **SHORT INTEGUMENT (SIN1), a gene required for ovule development in Arabidopsis, also controls flowering time.** *Development* 1996, **122**(9):2631-2638.
142. Palanivelu R, Preuss D: **Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro.** *BMC Plant Biol* 2006, **6**:7.
143. Jones-Rhoades MW, Borevitz JO, Preuss D: **Genome-wide expression profiling of the Arabidopsis female gametophyte identifies families of small, secreted proteins.** *PLoS Genet* 2007, **3**(10):1848-1861.
144. Punwani JA, Rabiger DS, Drews GN: **MYB98 positively regulates a battery of synergid-expressed genes encoding filiform apparatus localized proteins.** *Plant Cell* 2007, **19**(8):2557-2568.
145. Kanaoka MM, Higashiyama T: **Peptide signaling in pollen tube guidance.** *Curr Opin Plant Biol* 2015, **28**:127-136.
146. Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D *et al*: **Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells.** *Nature* 2009, **458**(7236):357-361.
147. Takeuchi H, Higashiyama T: **A species-specific cluster of defensin-like genes encodes diffusible pollen tube attractants in Arabidopsis.** *PLoS Biol* 2012, **10**(12):e1001449.
148. Zhong S, Liu M, Wang Z, Huang Q, Hou S, Xu YC, Ge Z, Song Z, Huang J, Qiu X *et al*: **Cysteine-rich peptides promote interspecific genetic isolation in Arabidopsis.** *Science* 2019, **364**(6443).
149. Higashiyama T, Yang WC: **Gametophytic Pollen Tube Guidance: Attractant Peptides, Genetic Controls, and Receptors.** *Plant Physiol* 2017, **173**(1):112-121.
150. Guan Y, Lu J, Xu J, McClure B, Zhang S: **Two Mitogen-Activated Protein Kinases, MPK3 and MPK6, Are Required for Funicular Guidance of Pollen Tubes in Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2014, **165**(2):528-533.
151. Wang T, Liang L, Xue Y, Jia PF, Chen W, Zhang MX, Wang YC, Li HJ, Yang WC: **A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants.** *Nature* 2016, **531**(7593):241-244.

152. Zhang X, Liu W, Nagae TT, Takeuchi H, Zhang H, Han Z, Higashiyama T, Chai J: **Structural basis for receptor recognition of pollen tube attraction peptides.** *Nat Commun* 2017, **8**(1):1331.
153. Chakraborty S, Nguyen B, Wasti SD, Xu G: **Plant Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase (LRR-RK): Structure, Ligand Perception, and Activation Mechanism.** *Molecules* 2019, **24**(17).
154. Takeuchi H, Higashiyama T: **Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis.** *Nature* 2016, **531**(7593):245-248.
155. Li S, Gu Y, Yan A, Lord E, Yang ZB: **RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth.** *Mol Plant* 2008, **1**(6):1021-1035.
156. Craddock C, Lavagi I, Yang Z: **New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases.** *Trends Cell Biol* 2012, **22**(9):492-501.
157. Dai XR, Gao XQ, Chen GH, Tang LL, Wang H, Zhang XS: **ABNORMAL POLLEN TUBE GUIDANCE1, an Endoplasmic Reticulum-Localized Mannosyltransferase Homolog of GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL10 in Yeast and PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN ANCHOR BIOSYNTHESIS B in Human, Is Required for Arabidopsis Pollen Tube Micropylar Guidance and Embryo Development.** *Plant Physiol* 2014, **165**(4):1544-1556.
158. Higashiyama T, KH, Kawano S., kuroiwa T.: **Explosive discharge of pollen tube content in *Torenia fournieri*.** *Plant Physiology* 2000, **122**:11-13.
159. Dresselhaus T, Franklin-Tong N: **Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization.** *Mol Plant* 2013, **6**(4):1018-1036.
160. Colcombet J, Hirt H: **Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes.** *Biochem J* 2008, **413**(2):217-226.
161. Farooq A, Zhou MM: **Structure and regulation of MAPK phosphatases.** *Cell Signal* 2004, **16**(7):769-779.
162. Xu J, Zhang S: **Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development.** *Trends Plant Sci* 2015, **20**(1):56-64.
163. Madhani HD, Fink GR: **The riddle of MAP kinase signaling specificity.** *Trends Genet* 1998, **14**(4):151-155.
164. Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N: **Signaling through MAP kinase networks in plants.** *Arch Biochem Biophys* 2006, **452**(1):55-68.
165. Hamel L-P, Nicole M-C, Sritubtim S, Morency M-J, Ellis M, Ehltling J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J *et al*: **Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families.** *Trends in Plant Science* 2006, **11**(4):192-198.
166. Su SH, Suarez-Rodriguez MC, Krysan P: **Genetic interaction and phenotypic analysis of the Arabidopsis MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity.** *FEBS Lett* 2007, **581**(17):3171-3177.
167. Walia A, Lee JS, Wasteneys G, Ellis B: **Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells.** *Plant J* 2009, **59**(4):565-575.
168. Benhamman R, Bai F, Drory SB, Loubert-Hudon A, Ellis B, Matton DP: **The Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) Acts Upstream of MKK3 and MPK18 in Two Separate Signaling Pathways Involved in Root Microtubule Functions.** *Front Plant Sci* 2017, **8**:1352.

169. Takahashi F, Mizoguchi T, Yoshida R, Ichimura K, Shinozaki K: **Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis**. *Mol Cell* 2011, **41**(6):649-660.
170. Zeng Q, Chen J-G, Ellis BE: **AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis**. *The Plant Journal* 2011, **67**(5):895-906.
171. Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y: **NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis**. *Genes Dev* 2003, **17**(8):1055-1067.
172. Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ: **The protein kinase genes MAP3K  $\epsilon$  1 and MAP3K  $\epsilon$  2 are required for pollen viability in Arabidopsis thaliana**. *The Plant Journal* 2006, **48**(2):193-205.
173. Chaiwongsar S, Strohm A, Su S-H, Krysan PJ: **Genetic analysis of the Arabidopsis protein kinases MAP3K $\epsilon$ 1 and MAP3K $\epsilon$ 2 indicates roles in cell expansion and embryo development**. *Frontiers in Plant Science* 2012, **3**.
174. Daigle C, Matton DP: **Genome-wide analysis of MAPKKKs shows expansion and evolution of a new MEKK class involved in solanaceous species sexual reproduction**. *BMC Genomics* 2015, **16**(1):1-15.
175. Lafleur E, Kapfer C, Joly V, Liu Y, Tebbji F, Daigle C, Gray-Mitsumune M, Cappadocia M, Nantel A, Matton DP: **The FRK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) from Solanum chacoense is involved in embryo sac and pollen development**. *J Exp Bot* 2015, **66**(7):1833-1843.
176. O'Brien M, Gray-Mitsumune M, Kapfer C, Bertrand C, Matton DP: **The ScFRK2 MAP kinase kinase kinase from Solanum chacoense affects pollen development and viability**. *Planta* 2007, **225**(5):1221-1231.
177. Gray-Mitsumune M, O'Brien M, Bertrand C, Tebbji F, Nantel A, Matton DP: **Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from Solanum chacoense**. *J Exp Bot* 2006, **57**(15):4171-4187.
178. Menges M, Dóczy R, Ökrész L, Morandini P, Mizzi L, Soloviev M, Murray JAH, Bögre L: **Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways**. *New Phytologist* 2008, **179**(3):643-662.
179. Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S: **Haplo-Insufficiency of MPK3 in MPK6 Mutant Background Uncovers a Novel Function of These Two MAPKs in Arabidopsis Ovule Development**. *The Plant Cell* 2008, **20**(3):602-613.
180. Zhao F, Zheng YF, Zeng T, Sun R, Yang JY, Li Y, Ren DT, Ma H, Xu ZH, Bai SN: **Phosphorylation of SPOROCTELESS/NOZZLE by the MPK3/6 Kinase Is Required for Anther Development**. *Plant Physiol* 2017, **173**(4):2265-2277.
181. Chen L, Guan X, Qin L, Zou T, Zhang Y, Wang J, Wang Y, Pan C, Lu G: **Downregulation of the mitogen-activated protein kinase SIMAPK7 gene results in pollen abortion in tomato**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2016, **126**(1):79-92.
182. Chen L, Yang D, Zhang Y, Wu L, Zhang Y, Ye L, Pan C, He Y, Huang L, Ruan YL *et al*: **Evidence for a specific and critical role of mitogen-activated protein kinase 20 in uni-to-binucleate transition of microgametogenesis in tomato**. *New Phytol* 2018.
183. Bush SM, Krysan PJ: **Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development**. *J Exp Bot* 2007, **58**(8):2181-2191.

184. Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S: **Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by MAPKs Is Required for Pollen Development and Function in Arabidopsis.** *PLoS Genet* 2014, **10**(5):e1004384.
185. Stenzel I, Ischebeck T, Quint M, Heilmann I: **Variable Regions of PI4P 5-Kinases Direct PtdIns(4,5)P(2) Toward Alternative Regulatory Functions in Tobacco Pollen Tubes.** *Front Plant Sci* 2011, **2**:114.
186. Zhao Y, Yan A, Feijo JA, Furutani M, Takenawa T, Hwang I, Fu Y, Yang Z: **Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in Arabidopsis and tobacco.** *Plant Cell* 2010, **22**(12):4031-4044.
187. Hempel F, Stenzel I, Heilmann M, Krishnamoorthy P, Menzel W, Golbik R, Helm S, Dobritzsch D, Baginsky S, Lee J *et al*: **MAPKs Influence Pollen Tube Growth by Controlling the Formation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in an Apical Plasma Membrane Domain.** *Plant Cell* 2017, **29**(12):3030-3050.
188. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P: **Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.** *Biochem J* 2000, **351**(Pt 1):95-105.
189. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F *et al*: **Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.** *J Biol Chem* 1998, **273**(29):18623-18632.
190. Yadegari R, Drews GN: **Female Gametophyte Development.** *The Plant Cell* 2004, **16**(suppl 1):S133-S141.
191. Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T: **Double fertilization on the move.** *Current Opinion in Plant Biology* 2012, **15**(1):70-77.
192. Zsögön A, Szakonyi D, Shi X, Byrne ME: **Ribosomal Protein RPL27a Promotes Female Gametophyte Development in a Dose-Dependent Manner.** *Plant Physiology* 2014, **165**(3):1133-1143.
193. Grini PE, Thorstensen T, Alm V, Vizcay-Barrena G, Windju SS, Jørstad TS, Wilson ZA, Aalen RB: **The ASH1 HOMOLOG 2 (ASHH2) Histone H3 Methyltransferase Is Required for Ovule and Anther Development in Arabidopsis.** *PLoS ONE* 2009, **4**(11):e7817.
194. Alandete-Saez M, Ron M, Leiboff S, McCormick S: **Arabidopsis thaliana GEX1 has dual functions in gametophyte development and early embryogenesis.** *The Plant Journal* 2011, **68**(4):620-632.
195. Wang H, Liu R, Wang J, Wang P, Shen Y, Liu G: **The Arabidopsis kinesin gene AtKin-1 plays a role in the nuclear division process during megagametogenesis.** *Plant Cell Rep* 2014, **33**(5):819-828.
196. Chen Z, Tan JLH, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F: **Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in Arabidopsis thaliana.** *Development* 2008, **135**(1):65-73.
197. Matsubayashi Y: **Posttranslationally modified small-peptide signals in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2014, **65**:385-413.
198. Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y: **Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells.** *Genes & Development* 2006, **20**(8):1004-1014.
199. Moustafa K, AbuQamar S, Jarrar M, Al-Rajab A, Trémouillaux-Guiller J: **MAPK cascades and major abiotic stresses.** *Plant Cell Rep* 2014, **33**(8):1217-1225.

200. Meng X, Zhang S: **MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling.** *Annual Review of Phytopathology* 2013, **51**(1):245-266.
201. Smékalová V, Doskočilová A, Komis G, Šamaj J: **Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants.** *Biotechnology Advances* 2014, **32**(1):2-11.
202. Yuan GL, Li HJ, Yang WC: **The integration of Gbeta and MAPK signaling cascade in zygote development.** *Sci Rep* 2017, **7**(1):8732.
203. Suzuki T, Matsushima C, Nishimura S, Higashiyama T, Sasabe M, Machida Y: **Identification of Phosphoinositide-Binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of Arabidopsis MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis.** *Plant Cell Physiol* 2016, **57**(8):1744-1755.
204. Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP: **Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(11):4730-4735.
205. Sun Y, Wang C, Yang B, Wu F, Hao X, Liang W, Niu F, Yan J, Zhang H, Wang B *et al*: **Identification and functional analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes in canola (Brassica napus L.).** *Journal of Experimental Botany* 2014, **65**(8):2171-2188.
206. Matton DP, Maes O, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Cappadocia M: **Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition.** *The Plant Cell* 1997, **9**(10):1757-1766.
207. Karimi M, Inzé D, Depicker A: **GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.** *Trends in Plant Science* 2002, **7**(5):193-195.
208. Germain H, Chevalier É, Caron S, Matton D: **Characterization of five RALF-like genes from Solanum chacoense provides support for a developmental role in plants.** *Planta* 2005, **220**(3):447-454.
209. Lantin S, O'Brien M, Matton DP: **Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato Solanum chacoense Bitt.** *Plant Molecular Biology* 1999, **41**(3):371-386.
210. Loubert-Hudon A, Matton DP: **Ovule Clearing Method for Solanaceous Species.** *Bio-protocol* 2013, **3**(21):e951.
211. Curtis MD, Grossniklaus U: **A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta.** *Plant Physiology* 2003, **133**(2):462-469.
212. Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C *et al*: **Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation.** *Plant J* 2004, **40**(3):428-438.
213. Bai F, Matton DP: **The Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) C-terminal domain interacts with MKK3 and harbors a typical DEF mammalian MAP kinase docking site.** *Plant Signal Behav* 2018, **13**(8):e1503498.
214. Ley R, Hadfield K, Howes E, Cook SJ: **Identification of a DEF-type docking domain for extracellular signal-regulated kinases 1/2 that directs phosphorylation and turnover of the BH3-only protein BimEL.** *J Biol Chem* 2005, **280**(18):17657-17663.
215. Rabiger DS, Drews GN: **MYB64 and MYB119 Are Required for Cellularization and Differentiation during Female Gametogenesis in Arabidopsis thaliana.** *PLoS Genet* 2013, **9**(9):e1003783.



216. Dobritsa AA, Geanconteri A, Shrestha J, Carlson A, Kooyers N, Coerper D, Urbanczyk-Wochniak E, Bench BJ, Sumner LW, Swanson R *et al*: **A large-scale genetic screen in Arabidopsis to identify genes involved in pollen exine production.** *Plant Physiol* 2011, **157**(2):947-970.
217. Daigle C, Mazin B, Matton DP: **The Solanum chacoense Fertilization-Related Kinase 3 (ScFRK3) is involved in male and female gametophyte development.** *BMC Plant Biol* 2019, **19**(1):202.
218. Adhikari PB, Liu X, Wu X, Zhu S, Kasahara RD: **Fertilization in flowering plants: an odyssey of sperm cell delivery.** *Plant Mol Biol* 2020, **103**(1-2):9-32.
219. Boisson-Dernier A, Roy S, Kritsas K, Grobei MA, Jaciubek M, Schroeder JI, Grossniklaus U: **Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge.** *Development* 2009, **136**(19):3279-3288.
220. Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U: **ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases.** *PLoS Biol* 2013, **11**(11):e1001719.
221. Cole RA, Fowler JE: **Polarized growth: maintaining focus on the tip.** *Curr Opin Plant Biol* 2006, **9**(6):579-588.
222. Zhang X, Bi E, Novick P, Du L, Kozminski KG, Lipschutz JH, Guo W: **Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion.** *J Biol Chem* 2001, **276**(50):46745-46750.
223. Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z: **A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes.** *J Cell Biol* 2005, **169**(1):127-138.
224. Samaj J, Ovecka M, Hlavacka A, Lecourieux F, Meskiene I, Lichtscheidl I, Lenart P, Salaj J, Volkmann D, Bogre L *et al*: **Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth.** *EMBO J* 2002, **21**(13):3296-3306.
225. Lee YJ, Szumlanski A, Nielsen E, Yang Z: **Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth.** *J Cell Biol* 2008, **181**(7):1155-1168.
226. Boavida LC, McCormick S: **Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana.** *Plant J* 2007, **52**(3):570-582.
227. Zheng Y, Xie Y, Jiang Y, Qu X, Huang S: **Arabidopsis actin-depolymerizing factor7 severs actin filaments and regulates actin cable turnover to promote normal pollen tube growth.** *Plant Cell* 2013, **25**(9):3405-3423.
228. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B *et al*: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**(7):676-682.
229. Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R: **Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil.** *PLoS Genet* 2009, **5**(8):e1000621.
230. Pillitteri LJ, Torii KU: **Mechanisms of stomatal development.** *Annu Rev Plant Biol* 2012, **63**:591-614.
231. Khan M, Rozhon W, Bigeard J, Pflieger D, Husar S, Pitzschke A, Teige M, Jonak C, Hirt H, Poppenberger B: **Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases**

- phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in Arabidopsis thaliana.** *J Biol Chem* 2013, **288**(11):7519-7527.
232. Ryu H, Laffont C, Frugier F, Hwang I: **MAP Kinase-Mediated Negative Regulation of Symbiotic Nodule Formation in Medicago truncatula.** *Mol Cells* 2017, **40**(1):17-23.
233. Laggoun F, Dardelle F, Dehors J, Falconet D, Driouich A, Rochais C, Dallemagne P, Lehner A, Mollet JC: **A chemical screen identifies two novel small compounds that alter Arabidopsis thaliana pollen tube growth.** *BMC Plant Biol* 2019, **19**(1):152.
234. Zhao C, Nie H, Shen Q, Zhang S, Lukowitz W, Tang D: **EDR1 physically interacts with MKK4/MKK5 and negatively regulates a MAP kinase cascade to modulate plant innate immunity.** *PLoS Genet* 2014, **10**(5):e1004389.
235. Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu HM: **FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(41):17821-17826.
236. Vu LD, Gevaert K, De Smet I: **Protein Language: Post-Translational Modifications Talking to Each Other.** *Trends Plant Sci* 2018, **23**(12):1068-1080.
237. CristinaRodriguez M, Petersen M, Mundy J: **Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants.** *Annual Review of Plant Biology* 2010, **61**(1):621-649.
238. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J: **MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity.** *Nature* 2002, **415**(6875):977-983.
239. Di Giorgio JA, Bienert GP, Ayub ND, Yaneff A, Barberini ML, Mecchia MA, Amodeo G, Soto GC, Muschietti JP: **Pollen-Specific Aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 Are Required for Pollen Development and Pollination in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell* 2016, **28**(5):1053-1077.
240. Zhang D, Wengier D, Shuai B, Gui CP, Muschietti J, McCormick S, Tang WH: **The pollen receptor kinase LePRK2 mediates growth-promoting signals and positively regulates pollen germination and tube growth.** *Plant Physiol* 2008, **148**(3):1368-1379.
241. Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH: **Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method.** *Nat Protoc* 2006, **1**(2):641-646.
242. Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A: **A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation.** *Plant Methods* 2006, **2**:19.
243. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW: **GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.** *EMBO J* 1987, **6**(13):3901-3907.
244. Tsutsui H, Higashiyama T: **pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Physiol* 2017, **58**(1):46-56.
245. Alexander MP: **Differential staining of aborted and nonaborted pollen.** *Stain Technol* 1969, **44**(3):117-122.
246. Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T: **GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**(1):64-71.
247. Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG: **Stamen structure and function.** *Plant Cell* 2004, **16 Suppl**:S46-60.

248. Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S: **Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2007, **19**(1):63-73.
249. Mazin BD, Joly V, Matton DP: **The ScFRK2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) is involved in early embryo sac development in Solanum chacoense.** *Plant Signal Behav* 2019, **14**(8):1620059.
250. Lafleur E: **Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes polliniques.** M. Sc. Montréal: Université de Montréal; 2009.
251. Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y: **MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants.** *Cell Res* 2008, **18**(12):1190-1198.
252. Yamada K, Yamaguchi K, Shirakawa T, Nakagami H, Mine A, Ishikawa K, Fujiwara M, Narusaka M, Narusaka Y, Ichimura K *et al*: **The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation.** *EMBO J* 2016, **35**(22):2468-2483.
253. Liu B, Morse D, Cappadocia M: **Compatible pollinations in Solanum chacoense decrease both S-RNase and S-RNase mRNA.** *PLoS One* 2009, **4**(6):e5774.
254. Gao C, Sun P, Wang W, Tang D: **Arabidopsis E3 ligase KEG associates with and ubiquitinates MKK4 and MKK5 to regulate plant immunity.** *J Integr Plant Biol* 2020.
255. Zhang M, Wu H, Su J, Wang H, Zhu Q, Liu Y, Xu J, Lukowitz W, Zhang S: **Maternal control of embryogenesis by MPK6 and its upstream MKK4/MKK5 in Arabidopsis.** *Plant J* 2017, **92**(6):1005-1019.
256. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH: **Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerization and Nuclear Translocation.** *Cell* 1998, **93**(4):605-615.
257. Pacini E, Jacquard C, Clément C: **Pollen vacuoles and their significance.** *Planta* 2011, **234**(2):217-227.
258. Pacini E, Juniper B: **The Ultrastructure of Pollen Grain Development in Lycopodium Peruvianum.** *Caryologia* 1984, **37**(1-2):21-50.
259. McCormick S: **Male gametophyte development.** *Plant Cell* 1993, **5**(10):1265-1275.
260. Mariani C, Beuckeleer MD, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB: **Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene.** *Nature* 1990, **347**(6295):737-741.
261. Parish RW, Li SF: **Death of a tapetum: A programme of developmental altruism.** *Plant Science* 2010, **178**(2):73-89.
262. Carrizo Garcia C, Nepi M, Pacini E: **It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms-a review.** *Protoplasma* 2017, **254**(1):57-73.
263. Murphy E, Smith S, De Smet I: **Small signaling peptides in Arabidopsis development: how cells communicate over a short distance.** *Plant Cell* 2012, **24**(8):3198-3217.
264. Bircheneder S, Dresselhaus T: **Why cellular communication during plant reproduction is particularly mediated by CRP signalling.** *J Exp Bot* 2016, **67**(16):4849-4861.
265. Olsen AN, Mundy J, Skriver K: **Peptomics, Identification of Novel Cationic Arabidopsis Peptides with Conserved Sequence Motifs.** *In Silico Biology* 2002, **2**(4):441-451.

266. Murphy E, De Smet I: **Understanding the RALF family: a tale of many species.** *Trends Plant Sci* 2014.
267. Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA, Jr.: **RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, **98**(22):12843-12847.
268. Wolf S, Hofte H: **Growth Control: A Saga of Cell Walls, ROS, and Peptide Receptors.** *Plant Cell* 2014, **26**(5):1848-1856.
269. Zhang GY, Wu J, Wang XW: **Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalization factor gene, BoRALF1, from broccoli flowers.** *Molecular Biology Reports* 2010, **37**(7):3273-3281.
270. Covey PA, Subbaiah CC, Parsons RL, Pearce G, Lay FT, Anderson MA, Ryan CA, Bedinger PA: **A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation.** *Plant Physiology* 2010, **153**(2):703-715.
271. Morato do Canto A, Ceciliato PHO, Ribeiro B, Ortiz Morea FA, Franco Garcia AA, Silva-Filho MC, Moura DS: **Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in Arabidopsis.** *Plant Physiology and Biochemistry* 2014, **75**:45-54.
272. Mecchia MA, Santos-Fernandez G, Duss NN, Somoza SC, Boisson-Dernier A, Gagliardini V, Martinez-Bernardini A, Fabrice TN, Ringli C, Muschietti JP *et al*: **RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in Arabidopsis.** *Science* 2017, **358**(6370):1600-1603.
273. Ge Z, Bergonci T, Zhao Y, Zou Y, Du S, Liu MC, Luo X, Ruan H, Garcia-Valencia LE, Zhong S *et al*: **Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling.** *Science* 2017, **358**(6370):1596-1600.
274. Sharma A, Hussain A, Mun BG, Imran QM, Falak N, Lee SU, Kim JY, Hong JK, Loake GJ, Ali A *et al*: **Comprehensive analysis of plant rapid alkalization factor (RALF) genes.** *Plant Physiol Biochem* 2016, **106**:82-90.
275. Campbell L, Turner SR: **A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests There Are Two Distinct Functional Groups.** *Frontiers in Plant Science* 2017, **8**(37).
276. Wilson ZA, Zhang D-B: **From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development.** *Journal of experimental botany* 2009, **60**(5):1479-1492.
277. Feng X-L, Ni W-M, Elge S, Mueller-Roeber B, Xu Z-H, Xue H-W: **Auxin Flow in Anther Filaments is Critical for Pollen Grain Development through Regulating Pollen Mitosis.** *Plant Molecular Biology* 2006, **61**(1-2):215-226.
278. Bosco CD, Dovzhenko A, Liu X, Woerner N, Rensch T, Eismann M, Eimer S, Hegermann J, Paponov IA, Ruperti B *et al*: **The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis.** *The Plant Journal* 2012, **71**(5):860-870.
279. Ding Z, Wang B, Moreno I, Duplákóvá N, Simon S, Carraro N, Reemmer J, Pěňčík A, Chen X, Tejos R: **ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis.** *Nature communications* 2012, **3**:941.
280. Clark NM, de Luis Balaguer MA, Sozzani R: **Experimental data and computational modeling link auxin gradient and development in the Arabidopsis root.** *Front Plant Sci* 2014, **5**:328.

281. Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI: **Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism.** *Ann Bot* 2006, **97**(5):883-893.

## 9 Annexes

### 9.1 Annexes 1 : La ScFRK3 est impliquée lors du développement des gamètes.

Tableau 2 : List of primers.

	Sequence	Size of amplicon	Number of cycles
FRK1 RT-PCR F	5'-CCAAAGAAGAGGAAGAGGCAAC-3'	343	28
FRK1 RT-PCR R	5'-GGTGAGAAATAACCCATACGACG-3'		
FRK2 RT-PCR F	5'-GGATTCGCAAGCAAGGTTGG-3'	379	28
FRK2 RT-PCR R	5'-CCTTCCTCTTCCTCTGATGAAC-3'		
FRK3 RT-PCR F	5'-GTCCATTGATTTCCAGATTG-3'	343	28
FRK3 RT-PCR R	5'-GTGGCAACCAATGTTATGTAC-3'		
FRK4 RT-PCR F	5'-GCAACAGTGGCAGCCCTTCAAC-3'	338	28
FRK4 RT-PCR R	5'-TGGCCTAGCCTAATCACTAAATTG-3'		
FRK5 RT-PCR F	5'-GAAATCGCCTCTTCGTTTGTG-3'	227	28
FRK5 RT-PCR R	5'-CTACAGAGAGTGTAGCCAAATAAG-3'		
FRK6 RT-PCR F	5'-GCAATTGCTAGATCCGAAGC-3'	288	28
FRK6 RT-PCR R	5'-GGATCAAACCCATACATACTTC-3'		
Actine RT-PCR F	5'-TGAGTTACCAGATGGTCAGG-3'	228	23
Actine RT-PCR R	5'-TCCTTGCTCATAACGATCAGC-3'		
ScMKK3 RT-PCR F	5'-GAGGGTCTGCCAAACTTGAAAG-3'	198	28
ScMKK3 RT-PCR R	5'-CCATTTACAGGAACACACACAAC-3'		
ScMPK13 RT-PCR F	5'-GTTGAGGATGCATTGAACCATCC-3'	232	28
ScMPK13 RT-PCR R	5'-GCTAAACCTGCCACAACCAAATC-3'		
FRK3 ORF F	5'-ATGGATTGGGTTTCGTGGTG-3'	1059	
FRK3 ORF R	5'-TCACCTAACAGTAACCCAG-3'		
FRK3 in situ T3 F	5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGGGCAAAGAGAGTTGATGATG-3'	603	
FRK3 in situ T7 R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCACCTAACAGTAACCCAG-3'		
FRK3 Npart F	5'-GGGGCCATGGAGGATTGGGTTTCGTGGTGAAGC-3'		
FRK3 Npart R	5'-GGGGGGATCCGTGACCATCTCCGGCGACATG-3'		
FRK3 Cpart F	5'-GGGGCCATGGAGCGGCGGCAACAGGGTAC-3'		
FRK3 Cpart R	5'-GGGGGGATCCTCACCTAACAGTAACCCAGTCA-3'		
FRK3 Midpart F	5'-GGGGCCATGGAGGAGTATGCTACTGGAGGTTTCG-3'		
FRK3 Midpart R	5'-GGGGGGATCCCGTCCATCTTCTTGGATC-3'		

**Tableau 3 : MKKs and MPKs found in *S. chacoense* ovule and pollen transcriptome and their orthologs in *A. thaliana*.**

MKKs and MPKs found in *Solanum chacoense* ovule and pollen transcriptomes and their closest orthologs in *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* (tomato) from neighbor joining phylogenies based on their protein kinase domain from Prosite (<https://prosite.expasy.org>).

	<i>S. chacoense</i> transcript	Closest <i>A. thaliana</i> ortholog	Closest <i>S. lycopersicum</i> ortholog ( Acc. Number NCBI)	Group
MKKs	isotig13756	AtMKK2	SIMKK1 (CAA04261)	A
	isotig15708	AtMKK3	SIMKK5(543946)	B
	isotig25857	AtMKK7; AtMKK8; AtMKK9	SIMKK 4(543948)	D
	isotig37602	AtMKK4; AtMKK5	SIMKK2 (543720)	C
	isotig38529	AtMKK6	SIMKK3 (543947)	A
MPKs	isotig07712	AtMPK18; AtMPK19	SIMPK10 (543859)	D
	isotig10718	AtMPK9	SIMPK16 (100736548)	D
	isotig16044	AtMPK4; AtMPK11; AtMPK12	SIMPK6 (100736474)	B
	isotig17837	AtMPK16	SIMPK13 (AEH42670.1)	D
	isotig27038	Unclear	SIMPK14 (100736548)	D
	isotig27937	Unclear	SIMPK8 (100736510)	C
	isotig34221	AtMPK20	SIMPK12 (100736475)	D
	isotig34270	AtMPK18; AtMPK19	SIMPK11 (AEH42668)	D
	isotig34923	AtMPK9	SIMPK16 (100736539)	D
	isotig35805	AtMPK1; AtMPK2	SIMPK9 (100736512)	C
	isotig36077	AtMPK4; AtMPK11; AtMPK12	SIMPK5 (100534642)	B
	isotig36598	Unclear	SIMPK7 (AEH42638.1)	B
	isotig37161	AtMPK6	SIMPK1 (543792)	A
	isotig37197	AtMPK3	SIMPK3 (543880)	A
	isotig37281	AtMPK6	SIMPK2 (543879)	A
	isotig37333	AtMPK13	SIMPK4 (100736513)	B

**ScFRK**

>ScFRK1

MEKNQEAEIMWKRGRITLGGGFGFVSLACTTHSDDSPLIPSLIAVKSCMLSHSESLED  
 EIEFLRMCQDCPHVIRSFVGVKVTQEDDILLYNLLLEYASAGSLADRLLNNDQLGLPEF  
 QVQKHTKNVLLGLRFIHRKGIIHC DIKPHNILLTSTDDDDAEVAKIADFGLSLTLEQS  
 WTQKQGMRTKRYMAPESLLKQEYGPADIWALGCTVYELITGTPLWESSNSDPEF  
 DDVLHRIMYEENLENDKLSTEAKDFMSYCLIKNPKSRWSAGLLLNHSFLKSADSVL  
 PPKRKRQHGYSRLQRRKKAFTTQPHIRHLVIDL\*

>ScFRK2

MASIRWSRGRITIGKGAEGTVTLATTHNNFSIAVKSSLFSCSKSLQKEREFLNEFQDCS  
QIIRCFGADVTEEDNNILYNILLEYAIGGSLAHRIGKKSGLPDFEVKKYSPILLGLRV  
VHGKGFVHGDIKPHNILLVGTEKRAKIADFGFASKVGIGSKKRKLRGTPMYMAPESV  
LDDEYGTPADIWAFGCTVFEMITGKKVWDCTGINDPLHLLCKIGMQSPDLHDDKMS  
KQAEDFLNKCVD RDPHSRWTADLLNHPFLSSDNNDVHQQRKELNLVDLCNSTEL  
KPMKLLTNKRRRKLVERC\*

>ScFRK3

MDWVRGEAVGHGSFGKVNLAIPRKQSTQFLPLMVMKSSGVSHSVSLVNEKKILDEL  
NGCPEIIRCFGESYSFENGDSLYNLLLEYATGGSLAEKLLKSENYKLSEFEVSGYTKGI  
LKGLQYVHEVGYAHCDIKLQNILLGEDGKVKIADFGLAKRVDDDELRYELRGTPLYM  
SPEMVTGGEQGTPADIWALGCVVAEMVAGVPAFRFSNVTELLMAIGVKNQLPQIPEE  
LSEEGKDFLSKCFVQDPRKRWTAEMLLKHPFVADHDTVLLNEEIKNGVPSISPCKPF  
DFPDWVSDESAQSSVTCITFLPSPENLNSSCGRWSTSPAERLMGLVSEFSTESEWCSH  
DDWVTVR\*

>ScFRK4

MDWVRGETVGHGSFGKVSFAIPRNQSTLFSPSMVVKSSSASC SATLMNEKMILDELK  
GCPQIINC VGDSYSYENGEKLYNVLLEYACGGALSDKLNNSGDQRLPEFEVRKYTKG  
LIKGIHYIHKNGYVHCDIKLPNILLGKNGQVKISDFGLSKRAESKKYDKLRCELRGTP  
LYMSPEMVI GGEQDTPADIWALGCVVAEMATGNPVWRCS DITKLLMTIGLGDQLPEI  
PQNLSEEGKDFLEKCLVKDPKRWTAEMLLKHPFVADEDDTVLLNEERCNSGSPSTS  
PRCPDFPDWVSNKSAESSVTCITSLPSPAFQESMNWSDES WSTSPTERIRELVCECR  
PEFEWSTADGWVSVR\*

>ScFRK5

MQQGMESKKKIEVEELKNVNEFGDGVSWYRGAMLGKGSFGYVYLANLKNPKSKN  
RYLPSVMAVKSAEVS VSGSIQKEREVLSNIKGCOPYVIRCFGDETTSGNNGVMAYNLL  
LEYGSGGTLAERINKLGLAEFEVRLYTRSMRLRGLNHIHAIGYVHCDMKPENVLLVPN  
SSKGSVEFRAKIGDLGLAKRENQSKRRL ETYWRGTPMYLSPEAVADNVQESPA DI  
WALGCIVLEMLTGKPPWDRKDAEDVLKKIGEGHELPEIPGDLSKEAKDFLKGCFVRK  
PTYRWTAEMLLIHPFVEGLCDNDDGVEERQEVEDINEVDSMQLVTETDDEV SILKKI  
GAAFRRGIRWYWSEDDTEITEDEIASSFAEERMSIRSSSIDSGFNSMIDTSSQVARSNPS  
NNSKCKPLKFTIPAGVLALGGRREI\*

>ScFRK6

MAGLLWKRGTTLGQGGFGVVS LASTSNALFRSVTLPSLIA LKSCNYSASQSLKEEVEI  
LRMFKHSPYIAHCFGANVSFEDNVNLYNSLPEYASGGSLADRLQNCNSLSESEVKKH  
TKNVLLGLSCIHNNGIIHCDIKYGNILLVGRDKTAKIADFGLSVTLEQGMNQKQGVIR  
GTERYMAPESVINTEYTSQVDI WALGCTVHELITGTPMWEDADGDDVLDKIEFEPEK  
FQNSKLSNEAQN FLEKCLVKNPSTRWTADMLLNHTFLQNSSKVANTAKTRKKKSDS  
MSLLHKPIQKITFKIDHHKFSRQLLDPKPLLDKPIKKITFKFGNHKFSRQLLDPKPLH  
KPIQKITFKIGNHKFMRQSPDLKEVENEP CGRVLGTDNR

**ScMKKs**

>isotig37602

MRPTQPAANSTSSAAASSMPPPSSAGQRRRPRRRD LTLPLPQRDVALAVPLPLPPTS  
APSSSSSSSSSPLPTPLHFSELERVNRIGSGTGGTVYKVLHRPTGRLYALKVIYGNHED



SVRLQMCREIEILRDVDNPNVVRCHGMFDHNGEIQVLLEFMDKGSLEGIHIPLEQPLS  
DLTRQVLSGLYYLHRRKIVHRDIKPSNLLINSRREVKIADFGVSRVLAQTMDPCNSSV  
GTIAYMSPERINTDLNHGQYDGYAGDIWSLGVSILEFYLRFPFSVGRQGDWASLMC  
AICMSQPPEAPPTASREFREFIACCLQRDPARRWTAQAQLLRHPFITQNSPGTHTGPATT  
SLSNQAHQLLPPPHFSSSSSSS

>isotig25857

MALVRDRRHLNLRPLPEPSERRPRFPLPLPPSSVSTVNSTANTTTTTTTTTTTASTTTISI  
SELEKLKVLGHGNGGTVYEVVRHKRTSAIYALKVVHGSDSDPEIRRQILREISILRRTDSP  
YVIKCHGVIDMPGGDIGILMEYMNAGTLENLLKSQSTFSELCLAKIAKQVLGGLDYL  
HSHKIIHRDLKPSNLLVNREMEVKIADFGVSKIMGRITLDPCNSYVGTCAYMSPERFDP  
DTYGGNYNGYAADIWSLGLTLMELYMGHFPFLPPGQRPDWATLMCAICFGEPPSLPE  
NTSEKFNDFMKCCQLQKESKRWSAHQLLQHPFIQSIDLKST

>isotig13756

MKKGSFAPNLKLSLPPPDEVALSKFLTESGTFKDGDLLVNRDGVRIVSQSEVAAPSVI  
QPSDNQLCLADFEAVKVIKGNNGGIVRLVQHKWTGQFFALKVIQMNIDESMRKHIA  
QELRINQSSQCPYVVICYQSFFDNGAISLILEYMDGGSLADFLKKVETIPERYLAVICK  
QVLKGLWYLHHEKHIIHRDLKPSNLLINHRGDVKITDFGVSAVLA LASTSGLANTFVGT  
YNYMSPERISGGAYDYKSDIWSLGLVLECATGHFPYTPPEGDEGWVNVYELMETIV  
DQPEPCAPPDQFSPQFCFISACVQKHQKDRLSANELMSHPFITMYDDQDIDLGSYFT  
SAGPPLATLTEL

>isotig38529

MKTAKPLKQLKLSVPAQDTPISSFLTASGTFHDGDLNQLKGLRLISEENESLPSETKE  
IDLQFSLEDLETIKVIGKGGGIVQLVRHKWVGTLFALKVIQMNIQEDIRKQIVQELKI  
NQASQCPHVVCYHSFYHNGAISLVLEYMDRGSVDVIGQLKTILEPYLAVVCKQVL  
QGLVYLHHERHVIHRDIKPSNLLVNHKGEVKITDFGVSA MLASSMGQRDTFVGTYN  
YMAPERISGSTYDYKSDIWSLGMVILECAIGRFPYIQSEDQQARPSFYELLEAIVSSPPP  
SAPADQFSPEFCSFVSACIQKDPDRSSALDLLSHPFIKKFEDKDIDLSILVSSLEPPVNF  
PR

>isotig15708

MAGLEELKKKLVPLFDADKGFSPSTSTSDPFDSYSLSDAGTVNLLSQSYGVYNINELGL  
QKWPVDDTDHGEKTYRCASHEMRVFGAIGAGASSVVQRAIHIPHTRIIALKKINIFEK  
EKRQQLL TEIRTLCEAPCYQGLVEFYGAFYTPDSGQISIALEYMDGGSLADIIKIRKSIP  
EPISSMVQKLLHGLSYLHGVRHLVHRDIKPANLLVNLKGEPKITDFGISAGLESSIAM  
CATFVGTVTYMSPERIRNENYSYPADIWSLGLALFECGTGEFPYTANDGPVNLMLQIL  
DDPSPSLSRHDYSPEFCSFVDA CLKKNPDDRPTADQLLSHPFTIKYSDSALDLGTFVR  
DIFDPTQRMKDLADMLTIHYLLFDGSDEFWQHTKTLYNECSTFSFGGKESIGPNNIF  
STLSNIRNTLAGEWPEKLVHVVEKLCQRANGQDGV AIRVSGSFIVGNQFLICGDGM  
QVEGLPNLKDLSIDIPSKRMGTFHEQFIVEKANIIGRYFITKHELFIQ

## ScMPKs

>isotig35805

MATPVEPPNGIRSPGKHYYSMWQSLFEIDTKYVPIKPIGRGAYGIVCSSVNRETNEKV  
AIKKINNAFENRVDALRTLRELKLLRHLRHENVIALKDVMMPHHRPSFKDVYLVYEL  
MDTDLHQIVKSSQTLTNDHCQYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLINANCDL

KICDFGLARTSSGKDQFMTEYVVTRWYRAPELLLCDNYGTSIDVWSVGCIFAELG  
RKPVPFGTECLNQLKLIINILGSQREEDLEFIDNPKARKYIKSLPSPGTPFSRLYPQAH  
PLAIDLLQRMLVFDPSKRISVMEALQHPYMSPLYDPNTDPPAQVPINLDIDEDLGEETI  
RDMMWTEILHYHPEAATAAMEEVM

>isotig27937

MATQVEAPNGIRSRGKHYYTMWQTVFEVDTKYVPIKPIGRGAYGVVCSVNRRETNE  
KVAIKKINNVFSNRIDALRTLRELKLLRHIRHENVIALKDVMMPPIHRNSFKDIYLVYEL  
MDTDLNHIKSPQPLSDDHCKYFLFQLLRGLKYLHSANILHRDLKPGNLLVNANCEL  
KICDFGLARTSRDNGQFMTEYVVTRWYRAPELLLCDNYGTSIDVWSVGCIFAELG  
RKPLFPFGTECLNQLKLIINILGSQPEADLHFIDNPRAKGFIRSLPFTRGAHFSSLFPNAD  
PLAIDLLQRMLIFDPSKRITVTEALYHPYLSLFDPTCNLPAQFPLNLNIDENMAEPLIR  
EMMLREIFHYHPEAAYINTFY

>isotig37197

MVDANMSGAQFPDFPKIVTHGGQYVQYDIFGNYFEITNKYRPPIMPPIGRGAYGIVCSV  
FNAELNEMVAVKKIANAFDNYMDAKRTLREIKLLRHLDHENVIGLRDVIPPLRREFS  
DVYIATELMDTDLHQIIRSNQGLSEDHCQYFMYQLLRGLKYIHSANVHRDLKPSNLL  
LNANCDLKICDFGLARPNVENENMTEYVVTRWYRAPELLNSSDYTAIDVWSVGC  
IFMELMNRKPLFAGKDHVHQIRLLTELLGTPTESDLSFLRNEDAKRYVRQLPQHPRQ  
QLATVFPVHNPLAIDLVDKMLTLDPTRRITVEDALAHPYLAKLHDAADEPVCVPPFSF  
DFEQQGIGEEQIKDMIYQEALALNPEYA

>isotig37161

MDVSAPQTDTMMPDVAAPAVQQPPPPPQPLPGMDNIPATLSHGGRFIQYNIFGNIFEV  
TAKYKPPIMPPIGKAYGIVCSALNSETNENVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRH  
MDHENIVAIRDIIPPPQREAFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNQGLSEEHCQYFLYQILR  
GLKYIHSANVLRDLKPSNLLLNNANCDLKICDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRPP  
ELLLNSSDYTAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLMELIGTPSEAEMEF  
LNENAKRYIRQLPLYRRQSFTEKFPVNPAAIDLVEKMLTFDPRRRITVEDALAHPYL  
TSLHDISDEPICMTPFNDFEQHALTEEQMKELIYRESIAFNPEYQRM

>isotig37281

MDGSAPQTDTVMSDAAAGQQPATPPLPMAGMENIPATLSHGGRFIQYNIFGNIFEV  
AKYKPPIMPPIGKAYGIVCSALNSETNEHVVAIKKIANAFDNKIDAKRTLREIKLLRHM  
DHENIVAIRDIIPPPQREAFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNQGLSEEHCQYFLYQILRGL  
KYIHSANVLRDLKPSNLLLNNANCDLKICDFGLARVTSETDFMTEYVVTRWYRPP  
ELLLNSSDYTAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLMELIGTPSEAEMEF  
NENAKRYIRQLPLYRRQSFVEKFPVNPAAIDLVEKMLTFDPRRRITVEGALAHPYL  
TSLHDISDEPVCMTPFSDFEQHALTEEQMKELIYREGLAFNPEYQHM

>isotig37333

MDAENIENSVEIKGIPTRDGKYVEYNVVGNLFEVTSKYVPPIQPVGRGAYGIVCCATN  
SETKEEIAIKKIGNAFENRIDAKRTLREIKLLSHMDHENVIKIKDIVRPPDREEFNDVYI  
VYELMDTDLHQIIRSSQALTEDHCQYFLYQLLRGLKYVHSANVLRDLKPSNLLLNA  
NCDLKICDFGLARTTSEADFMTEYVVTRWYRAPELLNCTEYTAIDIWSVGCILME  
LIKREPLFPGRDYAQQGLIILKLLGSPEESDLGFLRSDNARKYVKQLPQVPKQPFSEHF  
PDVSPALDLAEKMLVFDPAKRITVEDALNHPFMISLHEINEEPVCTSPFNDFEQASL  
SEEDIKELIWNEALKFDPDPTTK

>isotig16044

MSLSSSSADHGGHSNIRGIPTGGRYVQYNVHGSLFEVSRKYVPPIRPIGRGANGMV  
CAAVNSEETREEVAIKKIGNAFDNVIDAKRTLREIKLLSHMDHENVIAIKDVIRPPQKK  
NFNDVYIVYELMDTDLHQIHSQQLTDEHCRHFLYQILRGLKYIHSANILHRDLKPSN  
LLVNAKCDLKIGDFGLARTTTTETDFMMEYCVTRWYRAPELLNCSEYTSALDIWSVG  
CILGEILTRQPLFPGRDYVHQLRLITELIGSPDDASLGFLRSNNARRYVRQLPRYPRQQ  
FAARFPNSSPRAVDLLEKMLIFDPSRRITADEALCHPYLAPLHEINEEPVCPRPFSLDFE  
QPSLTEDNIKELIWREAAKFNPDPTH

>isotig36077

MEASPGDHGVQSNFNGVPTHTGGRYVQYNVYGNLFEVSKKYVPLRPVGRGAYGIVC  
AALNSEETREEIAIKKIGNAFDNRIDAKRTLREIKLLRHMDHDNVIAMKDIIRPPQTENF  
NDVYIVYELMDTDLHQIIRSNQQLTDDHCRYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNL  
LLNANCDLKVGDFGLARTTSETDFMTEYVTRWYRAPELLNCSEYTAALDIWSVG  
CILGEMMTRQPLFPGRDYVHQLKLITELIGSPDDASLGFLRSDNARRYVRQLPQYPRQ  
QFAAKFPNSSPGAVDLLEKMLVFDPSRRVTVDEALCHPYLAPLHDINEEPCMPFDFE  
DFEQPSFTEENIKELIWRESVNFNPDPTH

>isotig36598

MANQTGGASSTGSRDIRGVLIHGGQYVRYNVYGSLEFVSSKYVPPIRPIGRGAYGLV  
CAAVNSEETREEVAIKKIGNAFDNRIDAKRTLREIKLLRHLDHENVIAIKDLIRPPKKEA  
FNDVYIVSELMDTDLHQIIRSEQPLTNDHCQYFMYQLLRGLKYVHSANVLHRDLKPS  
NLFLNANCDLKIGDFGLARTTSETDFMTEYVTRWYRAPELLNCSEYTGALDIWWSV  
GCIFGEIMTREPLFPKDYVQQLRLITELIGSPDDASLQFLRSDNARRYVRQLPQYPK  
QQFSARFSPMSPLAVDLLEKMLVFDPTRRITVDEALCHPFLSSLHDLNDEPICPRPFSV  
DFDEPSITEEKIKELIWRESVKFYPDFVEQNI

>isotig34923

MGGSSSFVDGVLRFHRRHTNEDAILTQPHNSADTHLQEKQENKHEFTITDFDFTG  
LKLIVPKRFHLPISSSSMDPIKNALETEFFTEYGEASRYQVQEVIGKGSYGVVGSVA  
DTHTGERVAIKKINDVFDHVSDATRILREIKLLRLLRHPDIVEIKHIMLPPSRREFKDIY  
VVFELMESDLHQVIKANNDLTHEHYQFFLYQLLRGLKYIHTANIFHRDLKPKNILAN  
ADCKLKICDFGLARVSFNDVPSAIFWTDYVATRWRAPELCGSFFSKYTPALDIWSIG  
CIFAELLSGKPLFPGKNVVHQDLITDLLGTPPETVAKIRNEKARRYLSSMRKKQP  
GFAKKFPNADPLALRLLERLLAFDPKDRPSAEEGLEDPYFHGLSNADREPCRPPIKLE  
FEFEKRKLAKDDVRELIYREILEYHPQMLQEYLSGGDQTSFGMYPSGVDRFKRQFAH  
LEEAGKGEHSAPILRQHASLPRERVPAPKDDTSSQNNDCEKRTVSTTLQSPPAQSEG  
SENYARSLLKSASISGSKCVEVKRRNAEEPIEEQNEEVDGLSQEVASLHV

>isotig10718

MGGGSTFVDGVRRLFHRRSSTTTTITIVHTNAEPILNNLEKPIKISDSQYQQEEGELI  
IIEFDISGLKFIRVPKRVDFPFSSASYQMDHHRKNSQEAFFTEYGEASRYQIQEVIGK  
GSYGVVASAVDTKTGERVAIKKINDVFEHVSDATRILREIKLLRLLRHPDIVEIKHIML  
PPSRREFKDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPHEHYQFFLYQLMRGLKYTHTANVFH  
RDLKPKNILANADCKLKICDFGLARVSFNDTPSAIFWTDYVATRWRAPELCGSFFS  
KYTPALDIWSIGCIFAEMLTGKPLFPGKNVVHQDLMTDLLGTPPETIAKIRNEKARR  
YLGNMRRKPPVYAQKFPHADPLALRLLERILAFDPKDRPSAEEALADPYFSSLSNVD  
REPSTHPISRLEFERRKLAKEDVRGLIYREILEYHPQMLQEYHRGGDQTSFGMYPS  
VDRFKRQFAHLEEHYKGERSTPLQRQHASLPRERVPAPKDETSSQNIDFEKQTSASV  
ASTLESPPGQSEGSEYSGANVQNGPNKANYSARSLLKSASISGSKCVVVKRRNAEEE  
AIKEQTDGVDGLAQKLADLHG

>isotig27038

MVMDFFEYGEAHQYEIQEVVVGKGSYGVVAAIDTHTGEKVAIKKINDVFEHS  
CEATRILREIKLLRLLRHPDIVEIKHILLPPCPREFKDIYVVFELMECDLQHVIKANDSL  
TAEHYQFFMYQLLRGLKYMHTANVFHRDLKPKNILANADCKLKICDFGLARVSLGD  
NPSAVFWDYVATRWRAPELCGSFFSKYTPAVDIWSLGCIFAEMLTGKPLFPGKNA  
VHQLDLITDLLGTPSTEASRIKNEKARRYLSMCKKAPIPLSQQFPHVDPLALRLLER  
LIAFDPKDRPSAEEALAHYPFRGLANKEQEPSSQTISKFEFDFERRKLGKEDIRELIYRE  
ILEYHPQMLQEHLHGTDHDFMYPGVDCKQFQFDHLEGHSGRGGSTLFRRYASLP  
RERVCASTDEEADKDGEFERHVVASMAQRCLPSPSSPKVKKPDTANTVEGPTEAGH  
STPMNTERCMLRSSSISFSKCVGAIWDCEVSVF

>isotig17837

MNYNMNMQSGDVFDFTEYGEESRYKIEEVIGKGSYGVVCSAYDTHLGEKVAIKKI  
NDIFEHVSDATRILREIKLLRLLRHPDIVEIKHILLPPSRREFKDIYVVFELMESDLHQVI  
KANDDLTPEHYQFFLYQLLRGLKYIHTANVFHRDLKPKNILANADCKLKICDFGLAR  
VAFNDTPTAIFWTDYVATRWRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSIGCIFAELLTGKPLFPG  
KNVVHQLDLMTDLLGTPSPESIRARNEKARRYLSMRKKKSVPFSHKFPHADPLALR  
LLERMLAFDPKDRPNAEEALADPYFRNLAKVEREPSAQPVTKMEFEFERRRITKEDV  
RELIYREILEYHPKMLKEFLEGQEPSFMYPYSAVDKFKKQFAYLEEHYKGGAAAPP  
ERQHSSSLPRACVLYSDNSVQNPVEVANDLSKCSIKEDEKQADRSSMIPMTRLPLQV  
PQNVQGAARPGRVSSVLRYNCGAAATAAEVIEQRRIARNPGGPTQYPISENTSYP  
RRHPSCKNERGEDSTEVSNGVQPKPEQYIARKVAAAPGGPGNQWY

>isotig07712

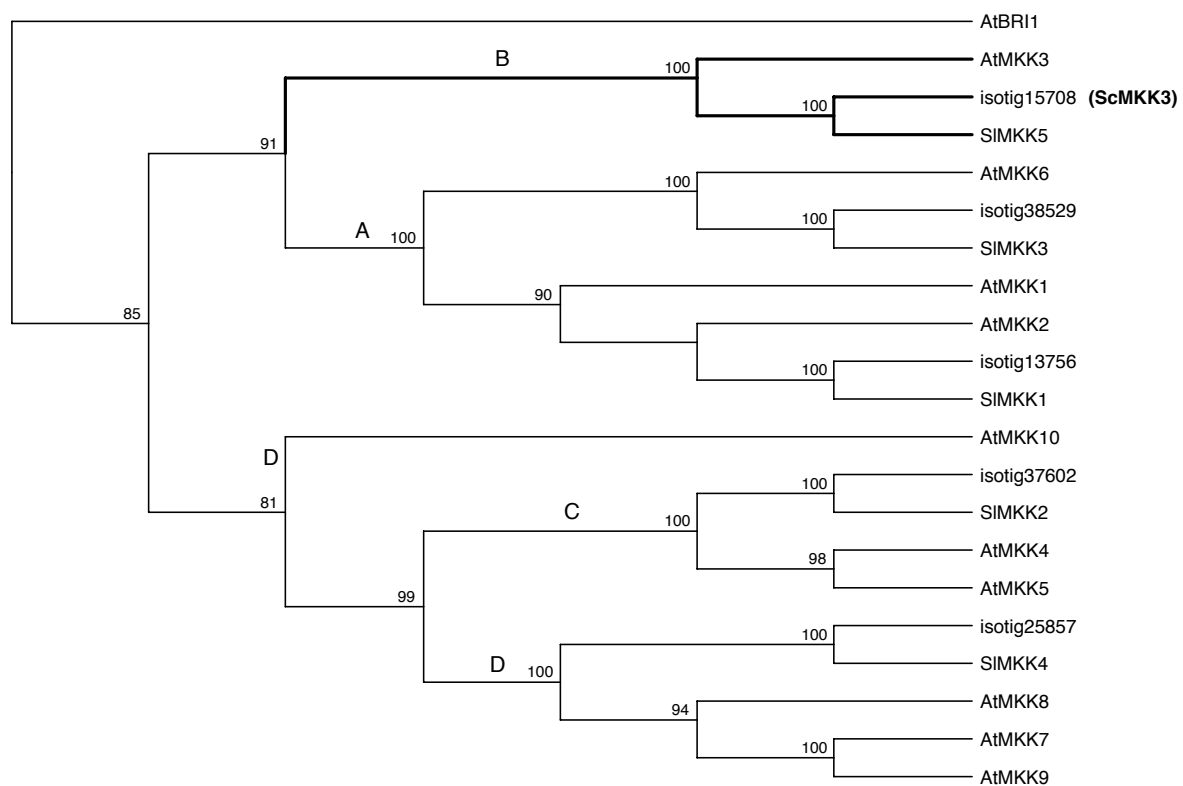
MMQQDHRKKNTKEVEFFTEYGEANRYKILEVVVGKGSYGVVCAAIDTHTGEKVAIKK  
ITDIFEHASDAIRILREIKLLRLLRHPDIVDIKRIMLPPSKRDFKDIYVVFELMESDLHHV  
IKANDDLSEHHRFFLYQMLRALKYMHTANVYHRDLKPKNILANANCKLKICDLGL  
ARVSFNDTPTTALWTDYVATRWRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSIGCIFAEVLTGKPL  
FPGKSVVHQLDLMTDLLGTPSADTISGVRNEKARKYLTSMRKKNPVPFTEKFPGADP  
LVLRLQLLAFDPKDRPTAEEALSDPYFKGLAKIEREPSCRPISEFEFEKRRLTKE  
DIKELIFREILEYHPQLQKDYIAGNDGTNYLYPSATGQFRRQFAYLEENNGKSGTVIPL  
GRKHVSLPRSAVNSSTDPPKARQNFVDFDHTQVTEKSSTDVRAEKISGTIQNISRPPH  
RVHAAKPRVVGPIPYDGRMLTQNTGLLPHGISPHYMFRMNPGNREKCGTEAKDT  
TQVRPLPAQCNMGVEMNTNPYYPTQEKVVQLGGQIAIDAKLLQAQTQFGAVSAAA  
VAVAAHREVGTIQYSLT

>isotig34270

MQQDQHKKSSKEVEFFTEYGDANRYKILEVVVGKGSYGVVCAAIDTHTGEKVAIKKIT  
DIFEHISDAIRILREVKLLRLLRHPDIVEIKRIILPPSRREFRDIYVVFELMESDLHHVIKA  
NDDLQEHHRFFLYQMLRALKFMHTANVYHRDLKPKNILANANCKLKICDFGLARV  
AFSDTPTTTFWTDYVATRWRAPELCGSFFSKYTPAIDIWSIGCIFAEVLTGKPLFPGK  
SVVHQLDLITDLLGTPSVDIVSGVRNEKARKYLTDKMKKSPVPFTEKFRKADPLALK  
LLQRLLAFFDPKDRPTAEEALADPYFKGLAKIEREPSSQPISKLEFEFERRRVTKDDIRE  
LIFREILEYHPQLLDYMGANSKANFLYPSAIGNFRRQFAYLEENSGKSGPVIPPGRKH  
VSLPRSTVNSSTIPPRTQQNPMFDHRQVTEKATAGIRVSDPKVLRPPPRVPTAKPGRV  
LGPVLSYDGRSIVTDGRVYPQNSVVQPHGMSPHYLFRRSNSTHLERCGTEAEKDRS  
QVKLQHGQCMVAKSSASMSFEMNTNPYYHTQARVAQLGGQIAMDAKLLQAQTQF  
GAVGAAAVAVAAHREVGTVQYGLT

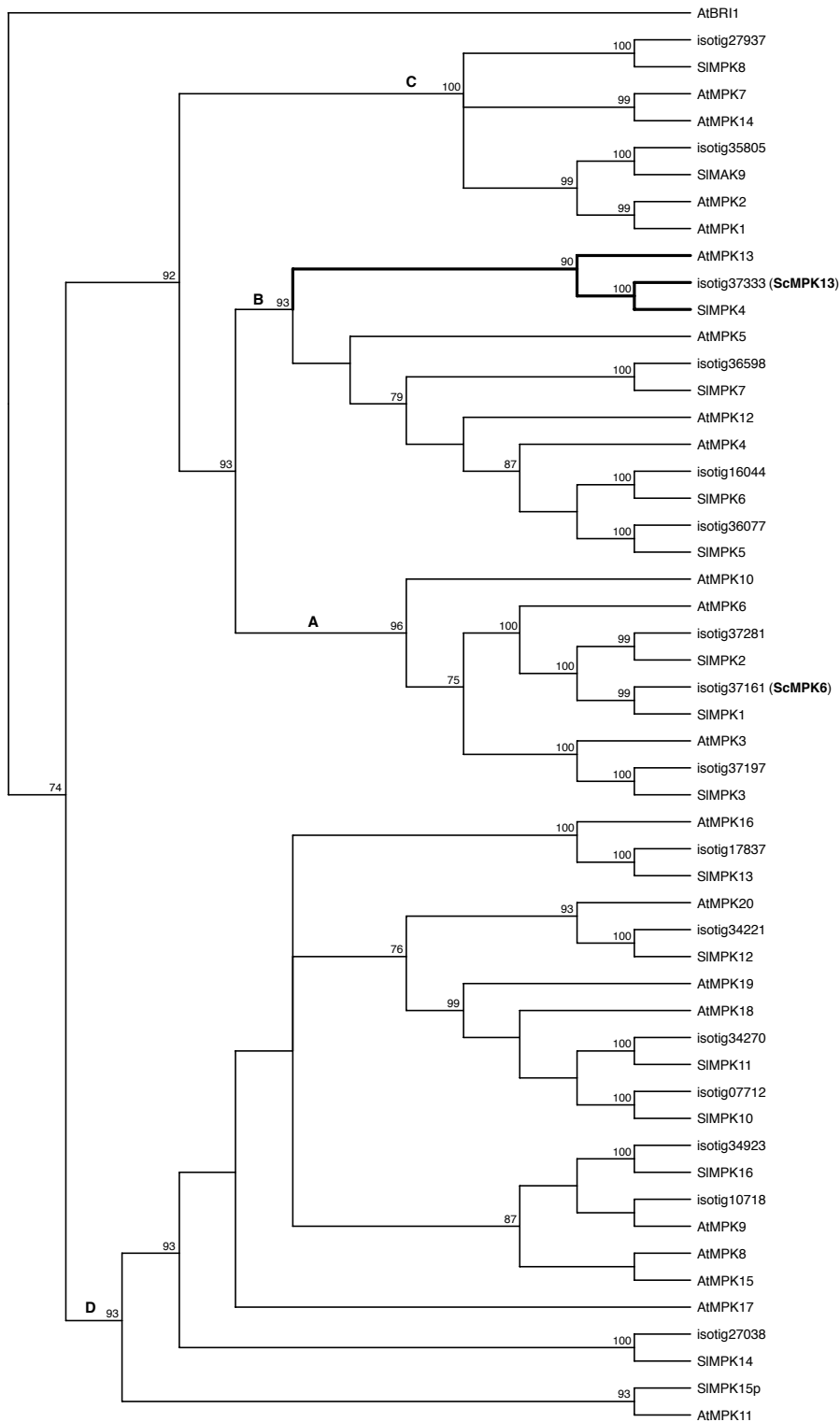
>isotig34221

MQPDHRKKSSAEMDFSEYGDANRYKIQEVIGKGSYGVVCSAIDTHTGEKVAIKKIH  
DIFEHISDAARILREIKLLRLLRHPDIVEIKHIMLPPSRDFKDIYVVFELMESDLHQVIK  
ANDDL TREHYQFFLYQLLRALKYIHTANVYHRDLKPKNILANANCKLKICDFGLARV  
AFNDTPTTIFWTDYVATRWRAPELCGSFYSKYTPAIDIWSIGCIFAELVTGKPLFPGK  
NVVHQLDLMTDLLGTPSMDTISRVRNDKARRYLTSMRKKQPVSFAQKFPNADPLSL  
KLLERLLAFDPKDRPTAEEALADPYFKGLAKSEREPSCKSISKMEFEEFERRRVTKEDL  
RELIFREILEYHPQLRKDYLNVERTNFLYPSAVDQFRKQFAHLEENGANGVPVPM  
DRKHVSLPRSTVVHSNPPLKEQPIAANMRDRQNGEESCSRNCRDSEGLASSLRTL  
QAQPRNALAAKPGKVVGPGLAYDSGNREKYDPRPQVRNAVGPQIMSSVYNYDRS  
GVVKQERSVETERGMNSHSPMAPCGMAAKLSPDIANIDSNPFYMMRAGVTKPDR  
VDDRITIDTNLLQAQSQYGGIGVAAAAATTGAAHRKVGTVQYGMSSRMY



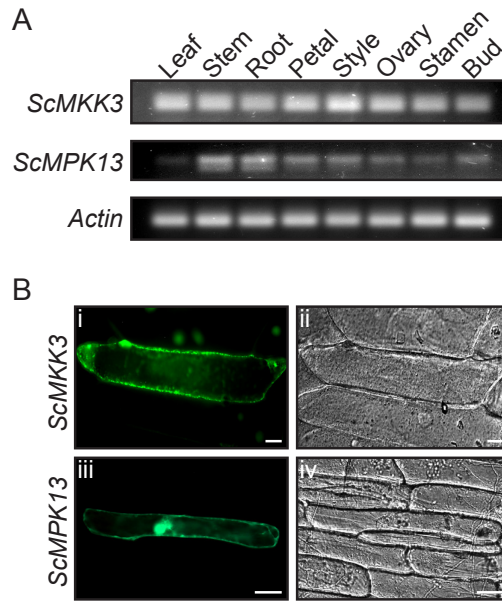
**Figure 33: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMKKs, the SIMKKs and the ScMKKs found in the *S. chacoense* ovule and pollen transcriptome.**

All MKK sequences come from *A. thaliana* (At), *S. Lycopersicum* (Sl) or *S. chacoense*. In tomato, the closest ortholog of the *S.chacoense* isotig15708 [217] is Solyc03g019850, named SIMKK5 (ITAG release 3.0; <http://solgenomics.net>) with 99 % amino acid sequence identity. The MKKs are classified in four groups, from A to D. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the *Arabidopsis* BRI1 receptor kinase. Only the kinase domain was use for the alignment.



**Figure 34: Phylogenetic tree showing the relations between the AtMPKs, StMPKs and the ScMPKs found in the *S. chacoense* transcriptome.**

All MKK sequences come from *A. thaliana* (At), *S. Lycopersicum* (Sl) or *S. chacoense*. The MPKs are classified in four groups, from A to D. The tree was made by the Neighbor Joining method using 1000 replicates and rooted with the *Arabidopsis* BRI1 receptor kinase. Only the kinase domain was used for the alignment.



**Figure 35: *ScMKK3* and *ScMPK13* expression and localization.**

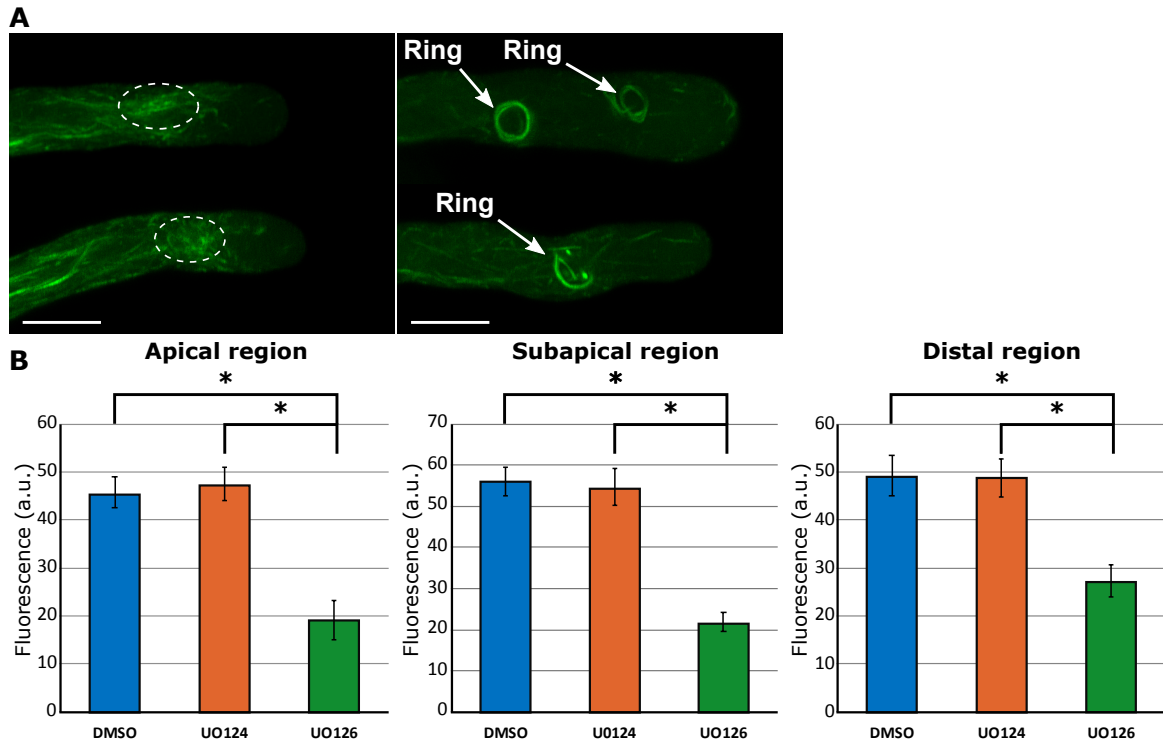
A. Expression profiling on different tissues for *ScMKK3* and *ScMPK13* using semi-quantitative RT-PCRs. B. Protein localization of *ScMMK3* and *ScMPK13* using microparticle bombardment. *ScMKK3*-GFP localization in onion cell (i) and DIC image (ii). *ScMPK13*-GFP localization in onion cell (iii) and DIC image (iv). Scale bars: 50  $\mu$ m.

ScFRK3	261	ADHDTVTL	LLNEE	I	-KNGVPS	I	SPKCPFD	FPDWS	DESAO	SSVTCS	I	TLPSFE	-	-	NLNS	SCRWST	SPAER	LMGLVSE	EFST	EWC	SHDD	WVTVR	352					
ScFRK4	265	ADEDDTV	LLNEE	R	CNSGSP	ST	SPRCPPF	FPDWS	SNKSAE	SSVTCS	I	TLPSHAF	QESMN	WSD	ESWST	SP	TER	I	RELVCE	CRPE	FEWS	TADGW	SVR	360				
AIMKKK19	289	KTED	-	-	-	-	VST	SPRCPE	FPDWS	VSSG	S	-	-	-	-	-	QT	IDSP	DERVAS	LVTDM	I	P	-	DWSVTNS	WTVR	344		
AIMKKK20	285	KDEK	-	-	-	-	VLM	SPKCPFE	FDWDS	SFTLDSN	-	-	-	-	-	-	PSF	DS	PVER	LGSLV	SGS	I	P	-	DWSVGG	SWLTVR	342	
AIMKKK21	273	EDEA	-	-	-	-	CSV	SPRNP	FDFR	GWNS	VQSPVN	-	-	-	-	-	DSVM	F	GLVGS	PEER	I	SGLVSE	KVPR	-	DWSV	SCDWN	NVR	336

**Figure 36: Conservation of the C-terminal *ScFRK3* segment and its closest genes in *S. chacoense* and *A. thaliana*.**

The AtMKKK20 C-terminal segment (285-342) was shown to interact with AtMKK3 and harbored a typical DEF mammalian MAP kinase docking site (Docking site for ERK, FxFP) identical to the *S. chacoense* *ScFRK3* and 4, as well as the two closest MKKKs in *A. thaliana* (85) [2]. DEF domains are generally characterized by a FxP (P/D/E) motif located between 6 and 20 amino acids C-terminal to the (S/T)-P phosphoacceptor site [256].

## 9.2 Annexes 2 : Les cascades des MAPK sont nécessaires pour la croissance polarisée du TP chez *A.thaliana*.



**Figure 37: Effets de U0126 sur l'organisation des filaments d'actine lors de la croissance des TP.**

Z-projection des TP après trois heures de croissance en présence de U0126. Les cercles en pointillé blanc représentent une accumulation de fragment d'actine anormale. Les flèches blanches montrent les cercles d'actine. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence relative des filaments d'actine dans la région apicale (graphique à gauche), subapicale (graphique central) et distale (graphique à droite) (de la pointe à la ligne bleue pointillée) des tubes polliniques. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SE,  $n > 15$ , \* $P < 0,01$  (ANOVA Post-Tukey).



**Tableau 4 : Heatmap de la superfamille des MAPKs dans le pollen sec, du tube pollinique après 30 minutes de croissance *in vitro* (PT 0,5 heure), du tube pollinique après 4 heures de croissance *in vitro* (PT 4 h) et du tube pollinique en croissance semi — *in vitro* (PT SIV).** La heatmap a été effectué à partir valeurs absolues d'expressions obtenues par la biopuce [229]. Plus la case est bleu moins le gène est exprimé et plus la case est rouge plus le gène est exprimé dans la condition testée.

Identifiants		Expression absolue			
Genbank	MAPK	Pollen sec	PT 0,5 h	PT 4 h	PT SIV
AT1G10210	MPK1	62	57	74	47
AT1G59580	MPK2	67	64	67	56
AT3G45640	MPK3	69	72	148	101
AT4G01370	MPK4	66	57	64	48
AT4G11330	MPK5	33	34	33	158
AT2G43790	MPK6	2304	2210	2120	955
AT2G18170	MPK7	67	75	82	112
AT1G18150	MPK8	1872	1820	1820	1458
AT3G18040	MPK9	1361	1342	1168	1075
AT3G59790	MPK10	149	169	133	91
AT1G01560	MPK11	68	56	34	59
AT2G46070	MPK12	67	57	61	29
AT1G07880	MPK13	21	21	22	14
AT4G36450	MPK14	36	40	31	30
AT1G73670	MPK15	666	639	516	428
AT5G19010	MPK16	45	40	39	45
AT2G01450	MPK17	3984	3875	3822	2195
AT1G53510	MPK18	70	76	83	184
AT3G14720	MPK19	205	286	596	1184
AT2G42880	MPK20	488	498	495	626
AT4G26070	MAPKK1	40	37	36	31
AT4G29810	MAPKK2	36	33	33	142
AT5G40440	MAPKK3	68	94	96	131
AT1G51660	MAPKK4	48	44	39	127
AT3G21220	MAPKK5	226	236	220	434
AT5G56580	MAPKK6	44	46	39	26
AT1G18350	MAPKK7	29	32	32	23
AT3G06230	MAPKK8	40	51	43	32
AT1G73500	MAPKK9	45	41	43	42
AT1G32320	MAPKK10	19	27	25	17
AT1G09000	MAP3K1	60	66	50	41
AT1G54960	MAP3K2	48	48	53	45
AT1G53570	MAP3K3	66	76	83	154
AT1G63700	MAP3K4	60	73	63	57
AT5G66850	MAP3K5	917	936	1067	1510
multiple	MAP3K6 et 7	78	101	90	269
AT4G08500	MAP3K8	168	214	176	254
AT4G08480	MAP3K9	23	28	29	17
AT4G08470	MAP3K10	70	73	78	77
AT3G06030	MAP3K12	101	137	146	229
AT1G07150	MAP3K13	44	46	46	37
AT2G30040	MAP3K14	73	66	53	57
AT5G55090	MAP3K15	20	18	16	17
AT4G26890	MAP3K16	21	24	22	18
AT2G32510	MAP3K17	109	101	94	71
AT1G05100	MAP3K18	68	75	46	49
AT5G67080	MAP3K19	592	596	635	989
AT3G50310	MAP3K20	2916	2721	2778	5518

**9.3 Annexes 3 : Les AtMAP3K19-20-21 sont impliquées lors de la germination et la croissance du TP chez *A.thaliana*.**

**Tableau 5 : Amorces utilisés pour réaliser les expériences présentées dans le chapitre IV.**

<b>Amorces utilisé pour la vérification de l'insertion T-DNA :</b>			
<b>Gène</b>	<b>Lignée T-DNA</b>	<b>LP primer</b>	<b>RP primer</b>
<b>AtMAP3K20</b>	SALK_021755	TCGGACAACATCTCTGG AATC	AATATCCGCTTTCATCACGTG
<b>AtMAP3K21</b>	SALK_149019	AGAGATTTTGAGCATGC ATGC	AGCTAAACTACCACCGGAAG C

<b>CRISP-Cas9 AtMAP3K19 :</b>		<b>Amorce F</b>	<b>Amorce R</b>
<b>gRNA séquence utilisé :</b>	TACGCCGTTGTACATGGCGC		
<b>Amorce pour séquençage du vecteur pKIR1.1 :</b>		GAACAATAGTATTTCTT ATATAGGCC	TCCTGTCAAACACTGATAGTT TAAAC
<b>Amorce pour rechercher une mutation dans le gène MAP3K19 :</b>		ATGGCTGTGAAATCTGC AGAC	TGGGCATCTCGGCGATGTC

<b>RT-PCR :</b>		
<b>Gène</b>	<b>Amorce F</b>	<b>Amorce R</b>
<b>AtMAP3K19</b>	GACGTTTGTACAAAGAAGAAGATTC	CCGTACGGTGACCCAGCTATT
<b>AtMAP3K20</b>	CCAGCGAAAAGATGGACGG	TCACCGACTGTAAGCCAATC
<b>AtMAP3K21</b>	AGATGGACGGCTGAGATGCTT	CCTGACGTTGACCCAATCACA
<b>Actine 2</b>	GCCATCCCAAGCTGTTCTCTC	CCCTCGTAGATTGGCACAGT

<b>Amorce pour la coloration GUS :</b>		
<b>Gène</b>	<b>Amorce F</b>	<b>Amorce R</b>
<b>AtMAP3K19</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTGGTTTATTTCTCCTTTTCTTTTGTGA A	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGAAGCAAATCTACGAC ACGG
<b>AtMAP3K20</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTGGGCAATCATGCCATTACGACC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGAAATTGAAACAAA GCTTTAAGA
<b>AtMAP3K21</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTGGTCACTACTCCTTATGGTGAAATT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGTTTAAACAGAGAAGA AGAAGAAGAAA

**Tableau 6 : Heatmap des *ATMAP3Ks* dans le pollen sec, du tube pollinique après 30 minutes de croissance *in vitro* (PT 0,5h), du tube pollinique après 4 heures de croissance *in vitro* (PT 0,5h) et du tube pollinique en croissance semi- *in vitro* (PT SIV).**

La heatmap a été effectuée à partir de la valeur absolue d'expressions obtenue par la bio-puce Li *et al.*, 2009. Plus la case est bleue moins le gène est exprimé et plus la case est rouge plus le gène est exprimé dans la condition testée.

Identifiants		Expression absolue			
Genbank	AtMAPK	Pollen sec	PT 0,5 h	PT 4 h	PT SIV
AT1G09000	AtMAP3K1	60	66	50	41
AT1G54960	AtMAP3K2	48	48	53	45
AT1G53570	AtMAP3K3	66	76	83	154
AT1G63700	AtMAP3K4	60	73	63	57
AT5G66850	AtMAP3K5	917	936	1067	1510
multiple	AtMAP3K6 et 7	78	101	90	269
AT4G08500	AtMAP3K8	168	214	176	254
AT4G08480	AtMAP3K9	23	28	29	17
AT4G08470	AtMAP3K10	70	73	78	77
AT3G06030	AtMAP3K12	101	137	146	229
AT1G07150	AtMAP3K13	44	46	46	37
AT2G30040	AtMAP3K14	73	66	53	57
AT5G55090	AtMAP3K15	20	18	16	17
AT4G26890	AtMAP3K16	21	24	22	18
AT2G32510	AtMAP3K17	109	101	94	71
AT1G05100	AtMAP3K18	68	75	46	49
AT5G67080	AtMAP3K19	592	596	635	989
AT3G50310	AtMAP3K20	2916	2721	2778	5518

**Tableau 7 : Délétion de 16 acide nucléique dans le gène *AtMAP3K19*.**

(A) Schéma illustratif de la délétion de 16 nucléotides dans le gène *AtMAP3K19*. (B) Séquence entière de la *AtMAP3K19* sans les 16 nucléotides. Le codon surligné en jaune est le codon STOP prématuré causé par la délétion. (C) Séquence entière de la *AtMAP3K19* muté montrant l'apparition d'un codon STOP prématuré. Le codon STOP surligné en jaune correspond au premier qui apparaît dû à la délétion des 16 nucléotides.

<p><b>A</b></p>	<p>MAP3K19      1 100 1 200 1 300 1 400 1 500      TTCATGTCGTTGTTGTTACGCATCGGTGTTGGTGACGAGGTTCCGATTCCCAGGAG      F M S L L L R I G V G D E V P M I P E</p> <p>gRNA-séq      TTGTTACGCATCGGTGT</p> <p>MAP3K19      -délétion      TTCATGTCGTTGTT <span style="border-bottom: 1px dashed black; padding: 0 20px;">16 acides nucléique</span> GGTGACGAGGTTCCGATTCCCAGGAG      F M S L L <span style="border-bottom: 1px dashed black; padding: 0 20px;"></span> T R F R * codon STOP prématurer</p>
<p><b>B</b></p>	<p>ATGGAGTGGATTTCGAGGAGAACTATCGGATACGGAACTTTTTCTACAGTAAGTCTAGCGAC          GCGGTCTAATAACGATTCCGGCGAGTTTCTCCGTTAATGGCTGTGAAATCTGCAGACTCATA          CGGCGCTGCTTCTCTGGCAAACGAGAAATCAGTTCTAGATAATCTCGGAGACGATTGCAACG          AGATCGTACGGTGTTCGGCGAGGATCGGACGGTTCGAAAACGGTGAAGAGATGCATAATTTG          TTCTTGAATACGCTTCTAGAGGAAGCTTAGAGAGTTATCTTAAGAAATTAGCCGGTGAAGG          TGTACCGGAATCCACCGTGCCTGCCACACAGGATCGGTGCTTAGAGGTCTACGACACATCC          ACGCTAACGGATTCGCTCACTGTGATTTAAACTCGGGAATATTCTGTTGTTCCGGTACGGCG          CCGTTAAGATTGCGGATTTTGGATTGGCGAAGAGAATTGGGGATTTAACGGCGTTAAATTAC          GGTGTGCAGATTAGAGGTACGCCGTTGTACATGGCGCCGGAATCTGTTAACGATAACGAGTA          CGGATCAGAAGGTGACGTGTGGGCTTTAGGATGCGTAGTAGTTGAGATGTTTAGTGGTAAAA          CGGCATGGAGTTTAAAAGAAGGGTCGAACTTCATGTCGTTGTTGGTGACGAGGTTCCGA <b>TGA</b>          TTCCCGAGGAGTTGTCGGAACAAGGAAGAGATTTTTTGTCAAAGTGTTCGTTAAAGATCCCA          AAAAGAGATGGACGGCTGAGATGCTTCTAAACCATCCATTTGTAACCGTCGATGTTGATCAC          GACGTTTTAGTCAAAGAAGAAGATTTTCGTTGTTAATATGAAAACAGAGGACGTCTCGACATC          GCCGAGATGCCCATTCGAATTTCCCGATTGGGTTTCGGTTTCTTCCGGTTCACAAACGATCGA          TTCGCCGATGAGAGAGTTGCTAGTTTGGTGACTGATATGATCCCTGATTGGTCTGTTACCAA          TAGCTGGGTCACCGTACGGTGA</p>
<p><b>C</b></p>	<p>MEWIRGETIGYGTFFSTVSLATRSNNDSEFPPLMAVKSADSYGAASLANEKSVDNLGDDCNEIV          RCFGEDRTVENGEEMHNLFLYASRGSLESYLKKLAGEGVPESTVRRHTGSVLRGLRHHANGFA          HCDLKLGNILLFGDGAVKIADFGLAKRIGDLTALNYGVQIRGTPLYMAPESVNDNEYGSEGDVW          ALGCVVEMFSGKTAWSLKEGSNFMSSLLVTRFR <b>*</b> FPRSCRNKEEIFCQSVSLKIPKRDGRLRCF*TI          HL*PSMLITF*SKKKISLLI*KQRTSRHRRDAHSNFPPIGFRFLPVHKRSIRRMRELLVW*LI*SLIGLL          PIAGSPYGX</p>

## 9.4 Annexes 4 : The ScRALF3 secreted peptide involved in sporophyte to gametophyte signaling.

**Authors:** Audrey Loubert-Hudon, Benjamin D. Mazin<sup>†</sup>, Éric Chevalier<sup>†</sup>, and Daniel P. Matton. <sup>†</sup>Contributed equally

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, H1X 2B2, Canada

### Author contribution statement

Audrey Loubert-Hudon, Éric Chevalier and Daniel P. Matton conceived and designed research. Audrey Loubert-Hudon and Éric Chevalier conducted experiments. Audrey Loubert-Hudon, Benjamin D. Mazin and Daniel P. Matton wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

### Abstract

Signalling events through small peptides are essential in multiple aspects of plant reproduction. The ScRALF3 *Solanum chacoense* Rapid Alkalinization Factor (RALF) peptide was previously shown to regulate multiple aspects of cell–cell communication between the surrounding sporophytic tissue and the female gametophyte during ovule development.

We analysed the global expression pattern of ScRALF3 with GUS reporter gene under control of the ScRALF3 promoter and validated it with *in situ* hybridisation. To better understand the role of ScRALF3 we used three different RNA interference (RNAi) lines that reduced the expression of ScRALF3 during pollen development.

Both expression methods showed the presence of ScRALF3 in different tissues, including stigma, style, vascular tissues and during stamen development. Down-regulation of ScRALF3 expression through RNAi showed drastic defects in early stages of pollen development, mainly on the first mitosis.

These results suggest that the ScRALF3 secreted peptide regulates the transition from sporogenesis to gametogenesis in both male and female gametophytes.

**Key words:** Rapid Alkalinization Factor 3 (ScRALF3), pollen development, cell-cell signaling, mitotic divisions.

**Abbreviations:** PMI: pollen mitosis I; RALF: Rapid Alkalinization Fact, WT: wild type plants, VG: vegetative cell

## Introduction

Cell communication is critical for adequate regulation of development through time and tissues from the sporophyte are therefore important for a successful male gametogenesis [159]. Pollen development in the Solanaceae family is well synchronized and can easily be linked to bud size. Male sporogenous cells differentiate and undergo meiosis occurring in buds from 2 to 2.5 mm. The resulting microspore tetrad is surrounded by an easily observable callose wall that quickly dissolves, leading to the release of the four microspores. Microsporogenesis duration is short and can usually be observed during a few hours only. Microsporogenesis is completed with the release of the haploid microspores [247]. Then, the cytoplasmic volume increases due to the formation of vacuoles. In other *Solanaceae*, such as *Solanum chacoense*, small vacuoles will eventually merge to form a single large one [257, 258]. As microgametogenesis begins, an exine wall starts to differentiate [216]. An asymmetrical division then occurs in 4.5 to 5 mm buds (pollen mitosis I; PMI), with one nucleus corresponding to the vegetative cell while the other (the generative cell) undergoes another division to become the sperm cells later. This takes place during pollen tube elongation since, contrary to Brassicaceous species like *Arabidopsis thaliana*, pollen from Solanaceous species are bicellular at floral maturity [259]. The morphology of the two cells is slightly different, even at the early bicellular stage, due to a lesser condensed DNA from the vegetative nucleus. Microspore maturation is accompanied by the accumulation of diverse essential reserves, like carbohydrates in starch vesicles. Male gametophyte development is tightly regulated by sporophytic factors that control differentiation, meiosis, and pollen wall formation [247]. Pollen grains develop inside the anthers in the cavities, which coated of tapetum. This antheral tissue brings substances of different natures like pectin, proteins or lipidic bodies and synchronizes pollen development. Mutants affecting formation/degeneration of the tapetum result in male sterility [260, 261]. In spite of the importance of the tapetum, the networks allowing this communication with the grains of pollen in development its little known [262].

In recent years, small secreted peptides including their major players, the cysteine-rich proteins (CRPs), have recently emerged as important peptides regulating various aspects of plant reproduction and development [263, 264]. One such small peptide family are the Rapid Alkalinization Factor (RALF), a 5 kDa ubiquitous polypeptide that represent a large multigenic cysteine-rich protein family [265, 266]. The first studied RALF peptide showed rapid alkalinization in tobacco suspension-cultured cells and was shown to arrest the growth of developing roots from tomato seeds as well in *Arabidopsis thaliana*, suggesting roles of RALF peptides in plant development [267].

Transcriptomic studies in different species have shown that several RAFLs are strongly expressed during the development of pollen and mature pollen [268]. The first occurrence of pollen-specific RALFs were in broccoli (*Brassica oleracea var. italica*), where *BoRALF1* was strictly expressed in mature pollen grains and anther cells [269], and in tomato (*Solanum lycopersicum*) with the *SIPRALF* that regulated pollen tube elongation [270]. In *A. thaliana*, *AtRALF4*, the closest *Arabidopsis* homolog of *SIPRALF*, was also shown to be a strong inhibitor of pollen germination when applied exogenously in an *in vitro* system [271]. More recently, *AtRALF4* and *AtRALF19* were shown to redundantly regulate pollen tube integrity and growth [272, 273]. On the other side, *AtRALF34* is expressed and secreted by the ovule. It was recently suggested that *AtRALF34* also served as an ovule-derived paracrine signal that could replace the autocrine *RALF4/19* signals, leading to pollen tube rupture and sperm release allowing fertilization [273].

A homologue of *AtRALF34* called *ScRALF3*, had been previously characterized in *S. chacoense*. *ScRALF3* is involve in female gametophyte development. In ovules, although *ScRALF3* expression is restricted to the sporophytic tissue surrounding the embryo sac, i.e., the integument and the nucellus, down-regulation of *ScRALF3* expression in the sporophytic tissues of the ovule leads to female gametophyte (embryo sac) developmental defects [49]. These include loss of nuclei polarization and asynchronous division of these nuclei, leading to premature embryo sac development arrest for most ovules and, consequently, severely reduced seed set. Movement of the *ScRALF3* peptide through the secretory pathway was also demonstrated, suggesting that following *ScRALF3* production in the sporophytic tissue of the ovule, secreted *ScRALF3* peptide affects the development of the female gametophyte, the embryo sac deeply buried inside the ovule [49]. *ScRALF3* was thus the first peptide specifically shown to be involved in sporophyte to gametophyte communication.

In this study, we describe the *ScRALF3* expression patterns from different organs and tissues at different stages of development. The high expression of *ScRALF3* in the tapetum and during pollen development led us to investigate the involvement of this peptide during gametogenesis. Using RNA interference lines, we show that *ScRALF3* is necessary for pollen development since decrease in *ScRALF3* mRNAs led to development arrest at the mitoses phase. Thus, down-regulation of *ScRALF3* expression not only affect the female gametophyte [49], but also the male gametophyte during early pollen development stages.

## **Materials and methods**

### **Plants Materials**

All plant material was collected from *S. chacoense* Bitt. (genotype G4,  $S_{12}S_{14}$  self-incompatibility alleles and V22  $S_{11}S_{13}$  self-incompatibility alleles) were derived from *S. chacoense* Bitt. lines PI458314 and PI230582 from the NRSP-6 United States Potato Genebank (Sturgeon Bay, Wisconsin). All plant were greenhouse-grown under long-day condition (16 h light/8 h dark) [49, 208].

### **GUS staining and *in situ* observations**

Transgenic plants, staining and *in situ* hybridizations were done as described before [49]. For GUS staining, tissues were kept in 70% ethanol until observation. Observations were performed using a ZEISS SteREO Discovery V.12 stereomicroscope and images were taken using a Zeiss AxioCam HRc camera (Zeiss, <http://www.zeiss.ca>). Clearing of flowers was performed by incubating tissues in 100% ethanol for 1 h and then transferred to a methyl salicylate/EtOH solution with increasing ratios of methyl salicylate for 30 min each (1:3, 1:1 and 3:1). The tissues were kept in 100% methyl salicylate (Sigma-Aldrich) at 4°C no more than 24 h to avoid discoloration. Sections were performed on buds by embedding samples in Paraplast® as described[208]. Samples were mounted in 8-10 µm sections on Histobond® microscope slides (VWR, VistaVision), deparaffinized (2 x 5 min 100% xylene) and rehydrated in decreasing ethanol solution (2 x 95%, 70%, 50% and 2 x H<sub>2</sub>O, 5 min each). The slides were dried at 40°C for 10 min and mounted with Permount®. Observations were performed using a Zeiss Axio Imager 1 microscope under bright or dark field.



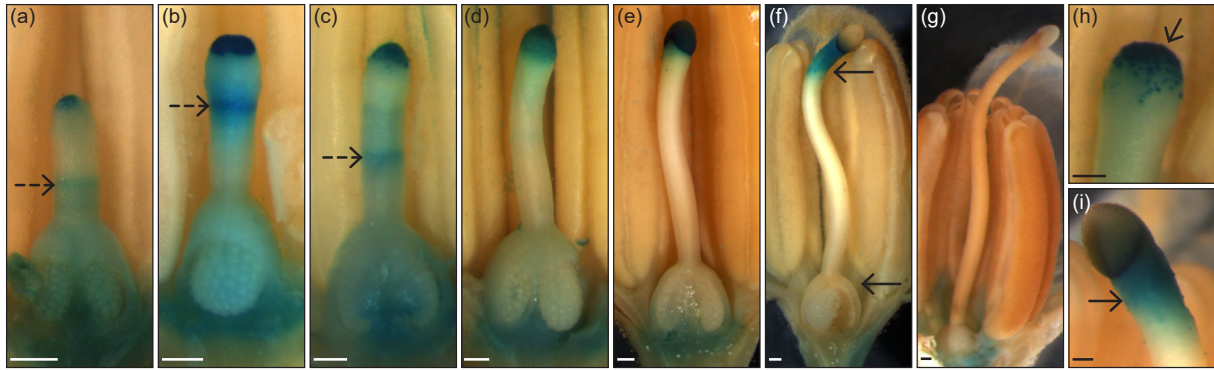
## Pollen observations

Morphology, viability, DNA condensation state and starch accumulation were observed during pollen development on fresh materials under 400x and 640x magnification using a Zeiss Axio Imager1 microscope under bright field. Viability and pollen morphology throughout development were observed with 1% acetocarmine solution in 45% glacial acetic acid. DNA condensation during all pollen development was observed with Hoechst 33342 fluorescent DNA dye (Invitrogen) and fluorescence microscopy were performed using a Zeiss Axio Imager M1 microscope. Starch accumulation was observed using Lugol's iodine stain on fresh pollen. Transversal sections were made on smaller buds to allow spreading pollen on microscopic slides. All pictures were taken using a Zeiss AxioCamHRc camera (Zeiss). Quantifications were done with ImageJ software (rsbweb.nih.gov) in at least three or more distinct areas of the slide for each replica.

## Results

### A broader expression pattern for the *ScRALF3* peptide

*ScRALF3* is crucial for female gametophyte development [49], however *ScRALF3* expression is not restricted to the ovule (**Figure 38**), suggesting broader functions in other tissues or organs. Visualization of the GUS reporter gene under the control of *ScRALF3* promoter (*pRALF3::GUS*) throughout flower bud development showed that *ScRALF3* is also expressed in stamens, stigma, style, and receptacle, in addition to the previously reported ovular expression in young buds (**Figure 38**). Coherently with ovules, a peak of *ScRALF3* expression in style and stigma is observed in young floral buds and decreases thereafter during flower development (<4-5 mm buds; corresponding to mega/microsporogenesis and first pollen mitosis, **Figure 38a-d**). *ScRALF3* is strongly and precisely expressed at the stigma apex during early stages of development (**Figure 38h**) and, afterward, on the entire surface of the stigma (**Figure 38e**). *ScRALF3* expression decreases in stigmas of 6 to 7 mm buds and is rather found in the style immediately below the stigma (**Figure 38f, i**). *ScRALF3* expression disappears in pistil at flower maturity (Fig. 1g), still linking a possible function with development rather than reproduction/fertilization *per se*.

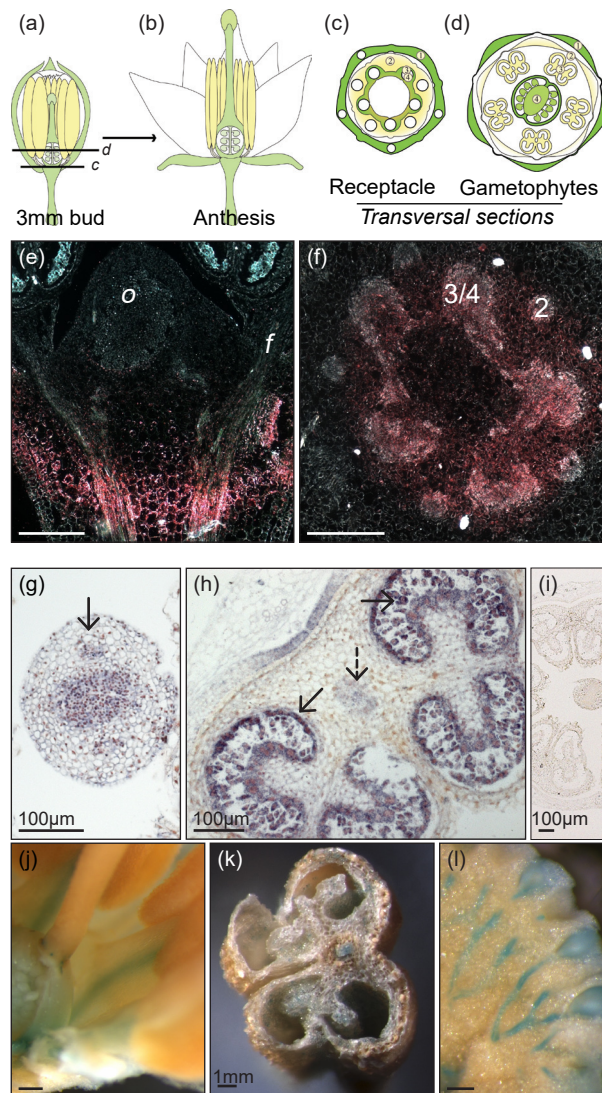


**Figure 38: *ScRALF3* expression in flower reproductive tissues.**

GUS reporter-gene expression under the control of the *ScRALF3* promoter in flower buds. (a) 2.5 mm bud; (b) 3.25 mm bud; (c) 4 mm bud; (d) 4.8 mm bud; (e) 6 mm bud; (f) 7 mm bud (g) mature style; (h-i) *ScRALF3* expression at the tip of developing stigma (4 mm bud) (h) and in the style just below the stigma one day before anthesis (7.25 mm bud) (i). Scale bar: 250  $\mu$ m, except for (h) and (i) 100  $\mu$ m.

As mentioned, a strong *ScRALF3* expression is also observed in the receptacle, the thickened part of the peduncle where floral organs are attached (**Figure 38 a-g**). To better define this receptacle expression and understand its implication, flower bud sections were analyzed. Longitudinal sections revealed a well-defined region of expression corresponding to the receptacle while transversal sections showed that this expression pattern corresponds more specifically to the conductive vessels of reproductive tissues, the ovary, and stamens (**Figure 39 e and f**, see **Figure 39a-d** for drawing references). Physiologically, the centermost row of vascular vessels visible in the peduncle will divide into two vascular vessels at the upper part of the receptacle level to serve both pistil and stamens. Here, these vessels showed the strongest *ScRALF3* expression. Transcript analysis by *in situ* hybridization of similar bud sizes showed coherent results and confirmed that *ScRALF3* mRNAs are present in stylar and anther vascular tissues of developing flowers (**Figure 39g-i**).

As for the placental expression observed previously [49], *ScRALF3* expression remains in most vascular tissues of the flower reproductive organs during development until complete maturation. *ScRALF3* expression then disappears almost completely in the receptacle and more drastically in the placenta (**Figure 39j-k**). Interestingly enough, vascular vessels of early growing fruits show expression of the peptide again (**Figure 39l**). This specificity to one precise functioning vascular tissues tends us to the assumption that the peptide is effectively specific to reproductive functions, even from a distance.

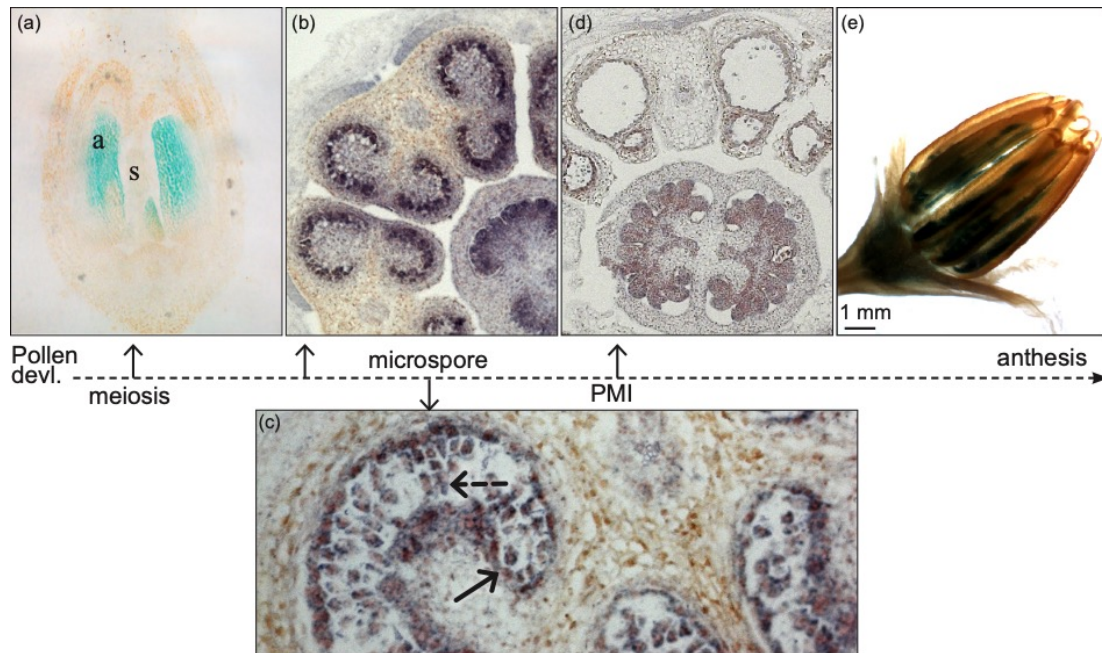


**Figure 39: *ScRALF3* expression in the receptacle and vascular tissues of reproductive whorls.**

(a-d) Illustration of longitudinal sections of a wild type flower bud (according to a  $\approx 3$  mm bud) and anthesis flower in Solanaceous species and corresponding transversal sections. (e) Longitudinal and (f) transversal sections of buds observed by dark field microscopy show precise *ScRALF3* expression in the receptacle and vascular vessels (GUS staining showed in pink due to dark field). The transversal section (f) shows vessels for different whorls: (1) calyx (nonvisible on the picture), (2) corolla, androecium and (4) gynoecium. (g-i) *In situ* hybridization analyses of *ScRALF3* transcripts confirm RNA presence both in the vascular tissues of the style (g) and anther (h, dashed arrow) of 3-4 mm buds. *ScRALF3* transcripts are also detected in the tapetum and pollen (h, solid arrows). (g-h, antisense probe; i, control sense probe). Expression analyses with *ScRALF3::GUS* at anthesis show staining in vascular tissues of mature stamens filaments (j) and anthers (k). (l) Placenta vasculature also presents *ScRALF3* expression during fruit development (8 days after pollination). Scale bar when not specified: 250  $\mu\text{m}$ .

Looking further, *ScRALF3* expression is also observed in stamens throughout flower development. *ScRALF3* expression is stronger in anthers from very young buds, which correspond to the end of meiosis and unicellular microspore maturation (Figure 40 a-c). Thereafter, transcript levels slowly decrease as the cell go through the first mitosis (PMI,

**Figure 40d).** *ScRALF3* expression is up again at anthesis (**Figure 40e**). A careful examination in younger buds showed that *ScRALF3* transcripts are also present in the tapetum lining the inside of the pollen sac and in the male gametophyte itself (**Figure 40c**). Older buds (> 4-5mm) did not show this expression in anthers (**Figure 40d**). Expression analyses via *pRALF3::GUS* and RNA localization both confirm this expression pattern.



**Figure 40: *ScRALF3* expression in anthers throughout flower development.**

Longitudinal (a) and (b-d) transversal sections of flower buds according to pollen development. Expression of the *ScRALF3* peptide was observed by GUS staining (*pScRALF3::GUS*; bright field; a and e) or by *in situ* RNA analysis (b-d). a) Expression can be observed in anthers of bud size corresponding to meiosis. b-c) Strong transcripts level can be observed during microspore maturation (marked by arrows in c), up to PMI where transcripts level decrease. Expression analyses with *pScRALF3::GUS* at anthesis show staining in pollen grain after clearing with a methyl salicylate solution. a: anther; s: style; PMI: first pollen mitosis; dashed arrow: microspore; plain arrow: tapetum.

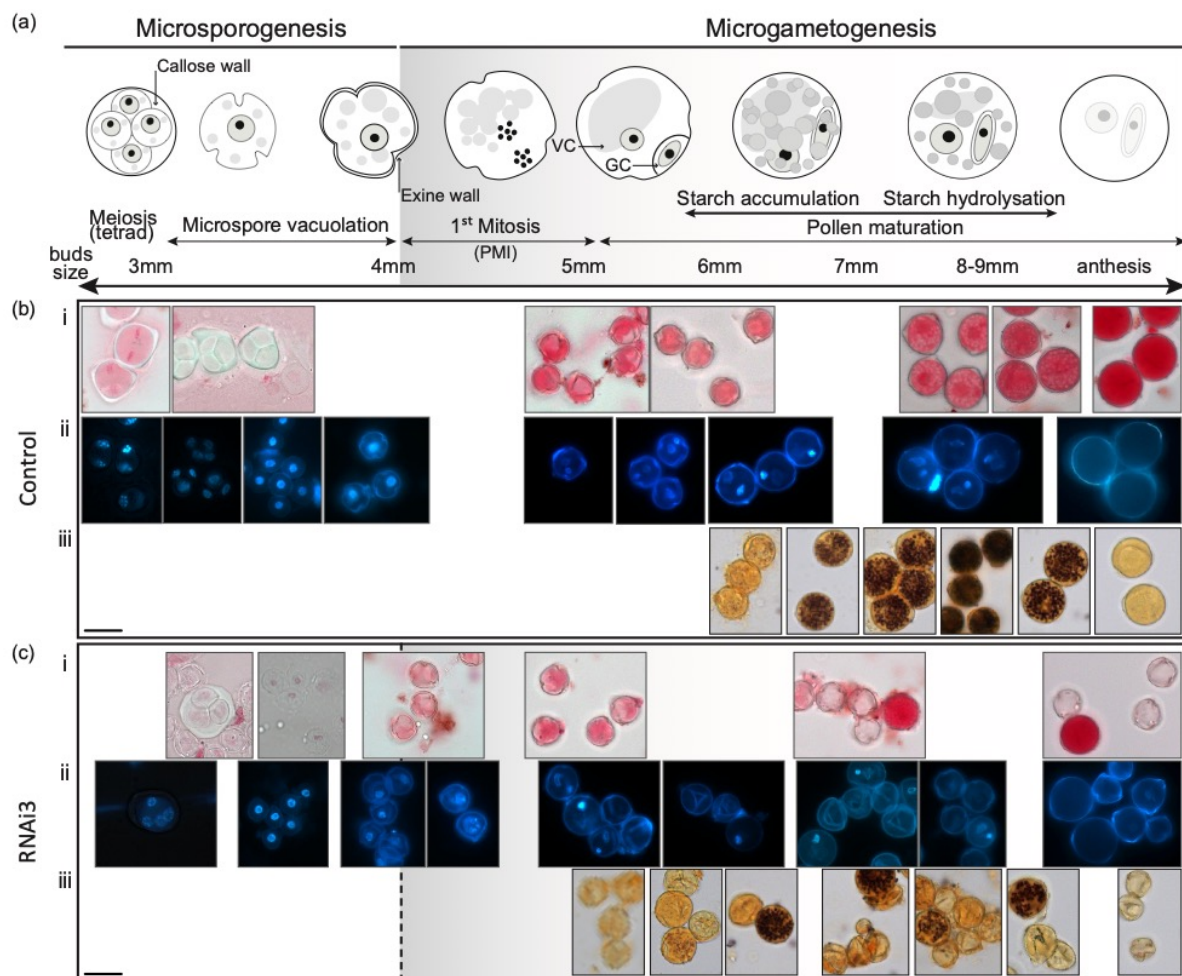
But, regardless of its clear and regulated expression pattern, the absence of the peptide during flower development of RNAi mutants [49] does not affect the macroscopic development of the flower (Supplemental **Figure 44**). Due to the expression of *ScRALF3* in the style during its development, elongation of the style at anthesis was measured in RNAi mutant, but no statistical differences were observed (Supplemental **Figure 44**).

### ***ScRALF3* affect male gametophyte development in Solanaceae**

Considering the clear female gametophyte developmental defects observed in all *S. chacoense RALF3* RNAi lines [49], and that *ScRALF3* transcripts were also detected in pollen



from various developmental stages, this prompted us to closely examine the effect of our ScRALF3 RNAi lines in male gametophyte development. As mentioned previously, pollen development in the Solanaceae family is well synchronized and is easily linked to bud size, facilitating comparisons between genotypes. Thus, pollen development was monitored in relation to flower bud size in control lines (carrying empty vector) and in the four ScRALF3 RNAi lines previously used previously [49]. Morphology, viability, DNA condensation state and metabolism (via starch accumulation) were observed during pollen development in order to cover all developmental defects possible (**Figure 41**).

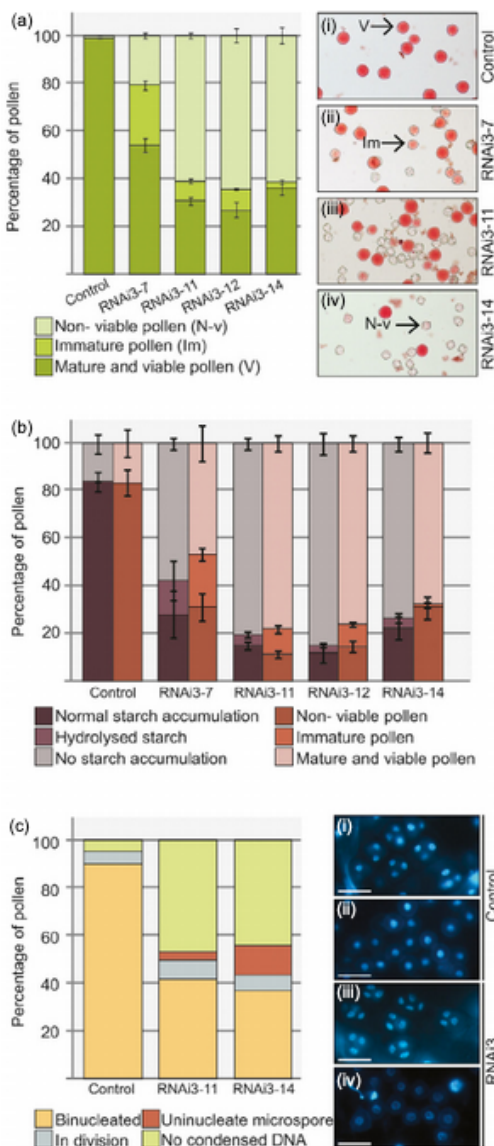


**Figure 41: Pollen development in wild type *S. chacoense* and RNAi-ScRALF3 mutant lines.**

(a) Illustration of wild type pollen development in Solanaceous species in relation to bud size. Microsporocytes undergo a meiotic division in buds of 2 to 2.5 mm to produce a tetrad of haploid microspores surrounded by a callose wall. Enzymes secreted by the tapetum allow the release of the microspores, which then go through vacuolation steps. The PMI marks the beginning of microgametogenesis. An asymmetric division produces a small germ cell contained in a larger vegetative cell (VG). Dispersed DNA of the vegetative nucleus after mitosis allows easy differentiation between the two nuclei. During the following pollen maturation steps, the vegetative cell accumulates essential reserves, like carbohydrates in starch vesicles. Carbohydrate hydrolysis occurs around two days before anthesis (7-8 mm). (b) Visualization of pollen development in empty vector control lines

and, (c) in RNAi-*ScRALF3* mutant lines with acetocarmine acid stain (i), DNA Hoechst 33342 fluorescent dye (ii) and Lugol's iodine stain (iii). Scale bar: 20  $\mu$ m.

As expected, observation of pollen viability at anthesis using acetocarmine acid stain was 98.9% in empty vector transgenic lines, which corresponds to previous observations from non-transformed wild type plants (WT). In *ScRALF3* RNAi mutant lines, pollen viability decreased significantly to 54.0% in RNAi3-7, to 30.6% in RNAi3-11, to 26.6% in RNAi3-12 and to 35.8% in RNAi3-14 mutant lines ( $p$ -value  $<0.003$ ) (Figure 42a). In addition to the highly significant increase of non-viable pollen, pollen showing only partial staining were observed (corresponding to what is observed in younger or immature pollen), ranging between 3% of total pollen in RNAi3-14 line up to 25% in RNAi3-7 line. These partially stained pollen grains were not classified as dead as they still are able to import some acetocarmine, but their morphology and size demonstrate a clear defect prior to the mature stage (Figure 42).



**Figure 42 : Quantification of pollen development phenotype in RNAi-*ScRALF3* mutant lines.**

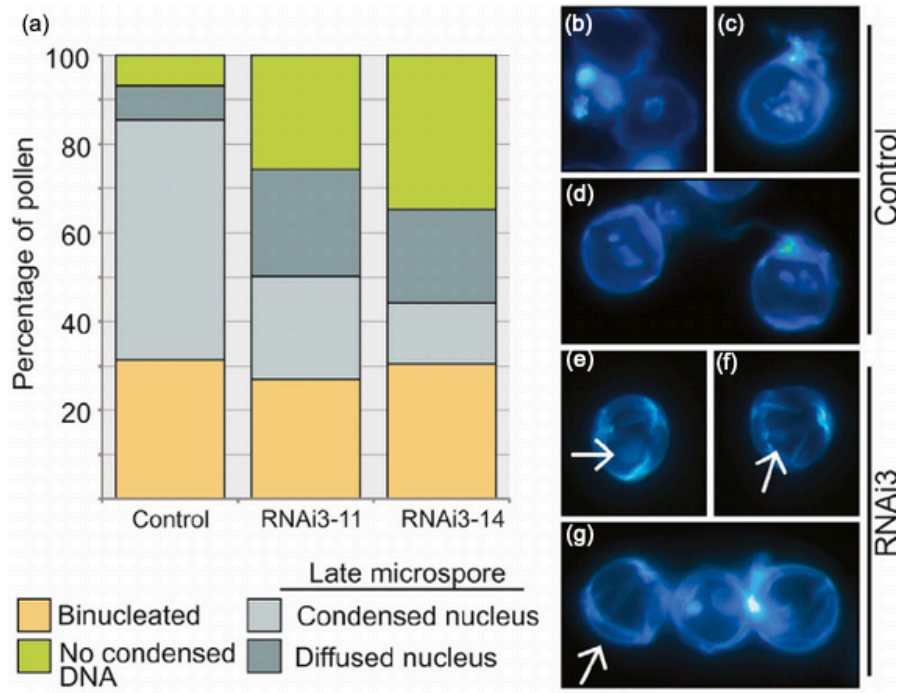
(a) Pollen viability at anthesis was observed with acetocarmine acid stain in three biological replicates from four *ScRALF3* RNAi mutant lines and an empty vector control line ( $n \geq 1000$  pollen grains per replica). Empty vector control line showed similar results to wild type plants (data not shown). Subfigures i-iv in (a) show standard observations for control and RNAi mutant lines. (b) To analyze pollen grain maturation, starch accumulation was observed with Lugol's iodine staining alongside viability staining in four distinct biological replicates from 7 to 8 mm buds for each RNAi mutant lines and empty vector control line ( $n \geq 500$  per replica). (c) Capacity to go through mitosis was observed in pollen from five distinct biological replicates of 6-6.5 mm buds for two distinct mutant lines and empty vector control line with the Hoechst 33342 fluorescent DNA dye ( $n \geq 50-100$  per replica). Pollen grains before mitotic stage were also observed. No perturbation was noted as summarized from meiotic stage (i and iii) and early microspores stage (ii and iv) results. Values in (a) and (b) are means standard deviation. Scale bar: 20  $\mu$ m.

As an indication of cell metabolism functionality, a similar analysis was performed on pollen from 7.25 mm to 8.25 mm buds corresponding to one day before anthesis where starch accumulation is maximal (**Figure 41 a, b**). Viability and starch accumulation were quantified by acetocarmine acid stain and Lugol's iodine stain, respectively, on pollen grains isolated from same anthers (pollens from each anther were divided on two slides, one for each stain). The results obtained with these younger pollens followed the same dead/disturbed/normal pollen ratio as observed for viability at anthesis (**Figure 42a, b**), suggesting that the dysfunction occurred before the maturation steps of pollen development (**Figure 41a**).

In order to verify if decrease expression of *ScRALF3* mRNAs affected microsporogenesis, mitosis I step (PMI) directly or the transition between PMI and those maturation steps, buds corresponding to male gametophyte stage that had just undergone their first division were chosen to monitor this transition in two representative *ScRALF3* RNAi lines using the Hoechst 33342 fluorescent DNA dye (**Figure 42c**). In control buds of 6 to 6.5 mm, 90% of the observed pollen had undergone division and had reached the bicellular stage as expected, while five percent were in transition between unicellular and bicellular microspores. The remaining 5 % showed no visible condensed DNA. Mutant lines showed a significant reduction in the number of pollens at the bicellular stage for similar bud sizes ( $p$ -value  $<0.0005$ ). In the RNAi lines tested, only ~40% of the pollen had gone through their first mitotic division. The proportion of pollen showing no visible condensed DNA reached a total of ~45%, a ten-fold increase compared to control lines. In addition, 8.0% of unicellular microspores were still observed. Meiosis and tetrad stages were also observed for these lines in smaller buds, but no dysfunction was detected (**Figure 42c, i-iv**). Thus, diminution of *ScRALF3* expression through RNAi seemed to affect male gametophyte development during the transition between unicellular microspore, which developed normally, and bicellular pollen stage maturation (marked by a gradient of gray in WT and a dashed line in **Figure 41a** and **c**, respectively). This result confirms the involvement of *ScRALF3* in pollen development.

Closer observations of pollen during the unicellular to bicellular microspore transition confirmed that the defect occurred just before or during the first mitosis (**Figure 43a**). In wild type conditions, a condensed or more intensely stained nucleus on the side of the pollen is expected, as seen in **Figure 43b**. Afterward, the first mitosis is marked by visible condensed chromosomes (as seen in **Figure 43c**), followed by binucleate pollen (**Figure 43d**). In RNAi

mutant lines, a diffused staining in nuclei (vegetative cell-like nuclei) are over-represented (**Figure 43a, e-f**; 21,0% to 24,0% vs 7,6% for the WT), as well as pollen showing no stainable DNA (a, g); confirming that mitosis I is indeed impaired, affecting later pollen development. Overall, our study of the development of the male gametophyte clearly show the importance of ScRALF3 to allow the microspores to entry into mitosis I.



**Figure 43 :Problematic pollen from ScRALF3 RNAi lines does not go through Mitosis I.**

(a) The transition through mitosis was observed in pollen from five distinct biological replicates of 5 mm buds with the Hoechst 33342 fluorescent DNA dye ( $n \geq 50-100$  per replica). Polarized microspore (b), dividing pollen (c) and binucleate pollen were observed in control line (d). Microspores with more diffusely stain DNA (arrows in e-f) and empty pollen grain (g) were over-represented among wild type-like pollen in mutants. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

The Rapid Alkalinization Factor peptide family has been implicated in various aspects of plant growth and development [266]. Some seem ubiquitously expressed while others show highly specific expression patterns, which will necessarily influence on their function in development. Expression of ScRALF3 is particularly high during pistil, ovule and pollen development (**Figure 38**; **Figure 39**; **Figure 40**) [49, 208].

Studies performed in *A thaliana* showed a strong expression of the closest homologue of ScRALF3 in mature ovules, AtRALF34. Phenotypic studies of AtRALF34 mutants showed no defect in ovules [273]. However, ScRALF3 secreted peptide is directly involved in the



regulation of communication between the female gametophyte and its surrounding sporophytic tissue during ovule development [49]. As for pollen, AtRALF34 is not expressed in dry pollen, nor during its development [273]. It is possible that ScRALF3/AtRALF34 peptides are involved in development/maturation of gametophytes, while other members control male/female interaction, like SIPRALF that inhibits pollen tube growth in a very specific developmental window [270]. AtRAFL4 and AtRAFL19 are part of the group close to ScRALF3, are redundantly regulate pollen tube integrity [272]. These results seem to show that in spite of a great conservation of the RALF in the vegetable kingdom, the function of the RALF has diverged during the evolution [274, 275].

The expression of the small secreted peptide in the pistil is clearly regulated as its expression is specific at certain development stages and circumscribe to only certain cells. However, diminution of ScRALF3 mRNA expression does not show a phenotype. Redundancy is unlikely since no modification in RNA level of other ScRALFs were observed in mutants [49]. That gives us two hypotheses to explain this: ScRALF3 is necessary in pistil development only under specific environments, or expression of the peptide is regulated by factors that are present in multiple tissues of the flower but the regulation of the others part of the signaling pathway restricts its function.

*ScRALF3* expression is detected early in anther tissues at the premeiotic stage (**Figure 40a**); later on, *ScRALF3* expression becomes more distinct and specific to the tapetum and conductive tissues (**Figure 40**). But, most important, *ScRALF3* RNAi lines do affect pollen development as maturation and viability are impaired in more than half pollen grain, which suggests an effect from the sporophyte-gametophyte communication disturbance than only from the loss of ScRALF3 in the pollen itself (**Figure 42**). Pollen development is governed by a multitude of factors such as tapetum development, suitable phytohormones balance, proper tapetum degradation, etc. [276]. One of the hormones controlling these factors is auxin. The hormone flow in anther filaments modulates filaments elongation and anther dehiscence. On the pollen side, progression through mitotic cell division of the microspore and later pollen maturation are also controlled by auxin as impaired transport of the hormone in these tissues results in defects in mitotic divisions but not in meiosis steps [277-279]; interestingly, it is specifically the stage affected by the *ScRALF3* mRNA due to the RNA interference. Although expressed very early on (during megasporogenesis), *ScRALF3* developmental defects were observed later during megagametogenesis, from the first mitosis steps onward. We have

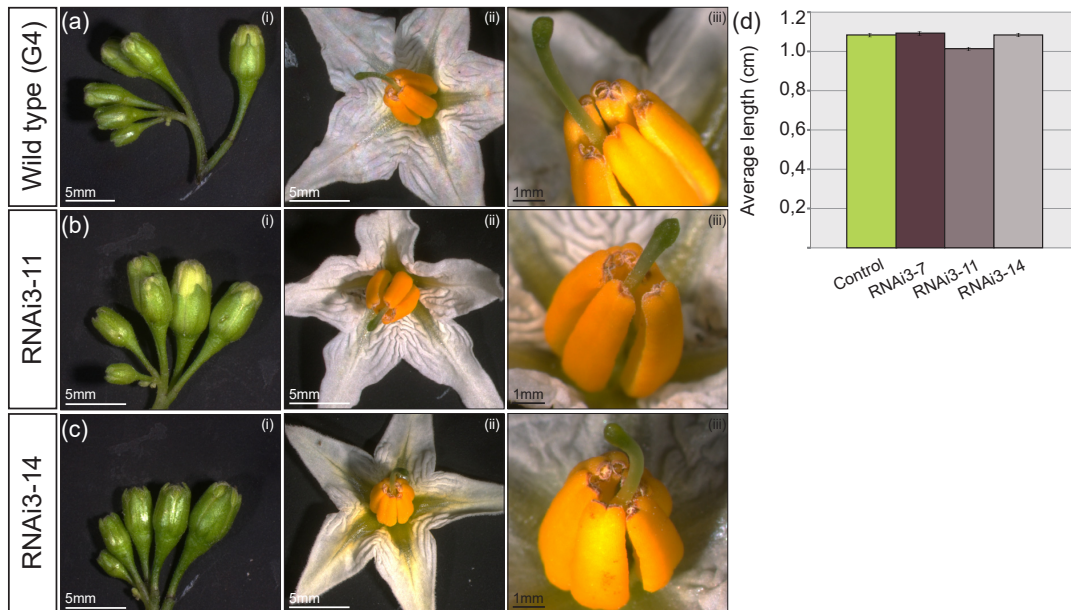
previously showed that *ScRALF3* expression is also regulated by auxin [49]. Externally applied auxin induces *ScRALF3* expression and, as expected, auxin cis-regulatory elements are found in the *ScRALF3* promoter. Flower development is known to depend, at least partly, on cell-cell communication fulfilled by auxin. In *Arabidopsis thaliana*, high conjugated IAA levels are found in young buds, in vascular tissues and in gametophytes, among others. Furthermore, pistil accumulates auxin to assure xylem formation and water transport subsequently [280, 281]. The expression pattern observed under the *ScRALF3* promoter in flowers is consistent with what is expected for a gene partially under auxin control and diminution of *ScRALF3* expression in the male gametophyte of RNAi lines can therefore also be linked to auxin.

In this report, we have shown that *ScRALF3* exerts a similar function in male and female gametophyte development by allowing mitosis to proceed. Despite its mostly sporophytic expression during the meiosis steps, mitotic divisions are disturbed due to perturbation in *ScRALF3* expression, resulting in partial male and female sterility in RNAi mutant lines. Therefore *ScRALF3* is an excellent example of a peptide involved in cell-cell signaling that allows polarization and synchronization of the germline development, with a potential link with auxin signaling pathway and microtubule functions.

The recent characterization of some CrRLK1L (*Catharanthus roseus* *RLK1-like* subfamily) receptor, like FERONIA and ANXUR1/ANXUR2, interact with RALF peptide for allow the cell expansion, the cell integrity and function in pollen tube reception at the contact with female gametophyte. AtRALF34 is secreted by ovules allowing pollen tube rupture to release sperm cells leading to plant fertilization. Thus, implication of a secreted RALF peptide in gametophyte development is more than likely and *ScRALF3* in solanaceous species or its orthologues in other species are even more serious candidate for sporophyte to gametophyte communication.

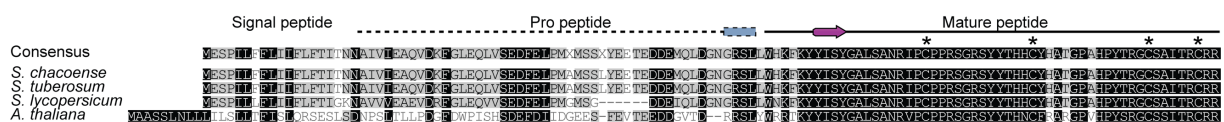
References : Voir la partie bibliographie.

Supplementary figure legends :



**Figure 44: ScRALF3 perturbation in RNAi mutant does not affect non-reproductive tissues of the flower, nor pollen tube growth.**

Macroscopic analyses of buds (i), whole flower (ii) and close up on pistil and stamen (iii) from wild type (G4 genotype) (a) two different interference mutants (b-c). These analyses do not indicate other perturbation than during gametophytes development. d) Quantitative analysis of style average length. No statistical difference between wild type, RNAi3-7 and RNAi3-14 were observed (p-value of 0.2638 and 0.9491 respectively) while RNAi3-11 is considered slightly different (p-value of 0.001). (n ≥ 40-60 per genotype).



**Figure 45: Proteins alignment of ScRALF3 orthologues.**

Amino acid alignments of ScRALF3, two other orthologous *Solanum* species (*S. tuberosum* and *S. lycopersicum*) and the only potential *Arabidopsis thaliana* orthologue (AtRALF34; At5G67070). Signal peptide, propeptide, and mature peptide are indicated. Dashed box represents the predicted mature peptide cleavage site, arrow conserved YIXY motif and asterisks conserved cysteine residues involved in the formation of disulfide bridges.