

2m11.2705.3

*Université de Montréal*

*Caractérisation de gènes induits par la pollinisation et la fécondation  
chez Solanum chacoense Bitt.*

*Par*

*Sylviane L. Lantin*

*Département des Sciences biologiques*

*Faculté des Arts et sciences*

*Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)*

*Mars, 1999*

© Sylviane L. Lantin, 1999



QK  
3  
U54  
1999  
V.003



*Page d'identification du jury*

*Université de Montréal  
Faculté des études supérieures*

*Ce mémoire intitulé:  
Caractérisation de gènes induits par la pollinisation et la fécondation  
chez *Solanum chacoense* Bitt.*

*Présenté par:  
Sylviane L. Lantin*

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:*

*Dr Dwight U. Beebe, président-rapporteur*

*Dr Normand Brisson, membre du jury*

*Dr Daniel P. Matton, directeur de recherche*

*Mémoire accepté le: 3 mai 1999*

## SOMMAIRE

La pollinisation et la fécondation induisent, dans le pistil, l'expression de nombreux messagers. Certains de ceux-ci sont nouvellement produits tandis que d'autres voient leur expression augmenter. Ce mémoire expose les résultats obtenus pour trois de ces gènes induits par la pollinisation et/ou la fécondation chez *Solanum chacoense* Bitt., une pomme de terre sauvage. Le premier, SPP2, est une désoxygénase de fonction inconnue de la famille des 2-oxoglutarate dépendantes, que les identités de séquence rapprochent d'enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse d'alcaloïdes. Ce clone fut isolé simultanément de deux banques d'ADNc construites à partir de pistils pollinisés depuis 48 heures (banque PP48) et 96 heures (banque Ov96), par la méthode d'hybridation soustractive. Le second gène, l'ACC oxydase qui est l'enzyme responsable de transformer l'ACC en éthylène, fut isolé dans la banque d'ADNc PP48 par la méthode du criblage différentiel. Le corps de ce mémoire traite principalement de ces deux premiers gènes, le troisième nommé SPP30 étant présenté en annexe sous forme d'article manuscrit, afin de mieux cerner la discussion. Ce troisième gène, SPP30, est très fortement homologue à un antigène de surface de *Plasmodium falciparum*, l'agent causal de la malaria, et fut isolé dans la banque d'ADNc PP48 par hybridation soustractive.

L'ACC oxydase est un gène qui a déjà été caractérisé chez un grand nombre d'espèces de plantes. Depuis longtemps déjà il est établi que l'ACC oxydase est une importante enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène, et que ce dernier est connu pour ses effets au niveau de la sénescence des pièces florales, sénescence qu'induisent les événements de pollinisation et de fécondation chez les végétaux. Pour cette raison, nous n'avons pas poussé très avant sa caractérisation. Une hybridation d'ARN de type northern démontre tout de même que, chez *Solanum chacoense*, l'expression de l'ACC oxydase augmente fortement dans le pistil suite à une pollinisation de 48 heures.

L'intérêt du clone SPP2, quant à lui, nous est apparu grandissant au fur et à mesure que sa caractérisation progressait. Nous avons réussi, par le biais de nombreuses expérimentations, à démontrer que les ARNm de la désoxygénase SPP2 sont non

seulement induits dans les ovaires matures par la pollinisation (compatible ou non), mais également par la fécondation et la blessure du style. On ne peut détecter les ARNm de SPP2 dans le style des fleurs matures, car son patron d'expression régresse de l'extrémité du style jusqu'à l'ovaire, et cela en fonction du développement floral. On constate aussi que l'augmentation de l'expression de SPP2 que l'on peut observer dans les ovaires matures de *S. chacoense* suite à la pollinisation et la fécondation, n'est pas le résultat du développement floral normal des fleurs. De plus, la période durant laquelle l'expression de SPP2 est maximale, correspond en fait à la période de réceptivité de la fleur à la fécondation. Finalement, le patron d'expression de SPP2 coïncide avec la zone d'abscission du style.

Le patron d'expression de SPP2 nous laisse penser que cette enzyme pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse de métabolites secondaires pouvant jouer un rôle dans le guidage et la croissance des tubes polliniques vers les ovules. Aussi, la forme que prend l'expression des ARNm de SPP2 au niveau de la base du style, nous laisse penser que SPP2 pourrait également jouer un rôle de marqueur cellulaire entre le style et l'ovaire. Finalement, on sait que SPP2 est principalement exprimée au niveau du pistil, des feuilles et des fruits, et que son expression coïncide (dans les fleurs) avec la période pendant laquelle les fleurs de *S. chacoense* sont réceptives à la pollinisation et à la fécondation, alors que sa diminution coïncide avec la période à partir de laquelle la fécondation ne peut plus avoir lieu chez les fleurs. Tout ceci nous laisse penser que notre désoxygénase (présente de façon constitutive et induite par la pollinisation, la fécondation ou la blessure), pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire tels qu'un alcaloïde possédant des propriétés anti-microbiennes ou encore, anti-herbivores.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>SOMMAIRE</i>	iii
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	v
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	ix
<i>LISTE DES FIGURES</i>	x
<i>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</i>	xiii
<i>DÉDICACE</i>	xv
<i>1 INTRODUCTION: Les réponses découlant des événements de pollinisation et d'embryogenèse chez Solanum chacoense Bitt.</i>	1
<i>1.1 Les plantes à fleurs</i>	1
<i>1.2 La pollinisation</i>	2
<i>1.3 La fécondation</i>	5
<i>1.4 Les interactions pollen-pistil</i>	7
<i>1.4.1 Composition, structure et fonction du pistil avant la pollinisation</i>	8
<i>1.4.2 Le pistil après la pollinisation</i>	12
<i>1.4.2.1 Les gènes induits par la pollinisation dans le pistil</i>	14
<i>1.4.3 L'induction de la formation d'éthylène dans le pistil, en réponse à la pollinisation</i>	18
<i>1.4.3.1 La première vague de production d'éthylène</i>	18
<i>1.4.3.2 La deuxième vague de production d'éthylène</i>	20
<i>1.5 Présentation du projet de recherche</i>	21

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
2.1 Le système modèle	23
2.2 Soins, entretien et pollinisation des plantes	23
2.3 Construction des banques d'ADNc	24
2.3.1 Banque $\lambda$ -ZAP	24
2.3.2 Banque soustractive	24
2.4 Méthodes de criblage	25
2.4.1 L'hybridation soustractive	25
2.4.2 Le criblage différentiel	25
2.4.3 Conditions d'hybridation et de lavage	26
2.5 Séquençage	27
2.6 Extraction et quantification des ARN totaux et messagers	27
2.7 Extraction et quantification des ADN	28
2.8 Hybridations de type Southern et northern	28
2.9 Blessures	29
2.10 Traitements aux hormones	30
2.11 Hybridation in situ	30
2.12 Vecteur d'expression protéique	32
3. RÉSULTATS	33
3.1 Isolement des clones d'ADNc SPP2 et de l'ACC oxydase	33
3.2 Nombre de copies du gène SPP2	37
3.3 Analyse des identités de séquences	38
3.3.1 Identités de séquences pour le clone SPP2	38
3.3.2 Identités de séquences pour le clone de l'ACC oxydase	43
3.4 Expression des ARNm de l'ACC oxydase et de la désoxygénase SPP2, dans les différents tissus matures de <i>S. chacoense</i>	44
3.4.1 Expression des ARNm de l'ACC oxydase	44

3.4.2	<i>Expression des ARNm de la désoxygénase SPP2</i>	45
3.5	<i>La croissance des tubes polliniques induit une augmentation de l'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire</i>	49
3.6	<i>Induction par la blessure de l'expression des ARNm de SPP2 dans les ovaires</i>	51
3.7	<i>Effets des phytohormones sur l'expression des ARNm de SPP2</i>	53
3.8	<i>Expression développementale dans les tissus floraux; l'expression de SPP2 régresse de l'extrémité du style à la région ovarienne durant le développement du pistil</i>	55
3.9	<i>La fécondation induit une accumulation localisée des ARNm de SPP2 dans l'ovaire</i>	59
4.	<b>DISCUSSION</b>	61
4.1	<i>L'ACC oxydase</i>	61
4.2	<i>La désoxygénase SPP2</i>	62
4.2.1	<i>Les différences entre les patrons d'expression de la désoxygénase SPP2, et ses plus proches homologues</i>	62
4.2.2	<i>Contrôle développemental de l'expression de la désoxygénase SPP2 dans la fleur</i>	63
4.2.3	<i>La pollinisation, une blessure et la fécondation induisent l'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire</i>	65
4.2.4	<i>La désoxygénase SPP2 contient un site alternatif d'initiation de la transcription</i>	68
4.2.5	<i>Les désoxygénases sont impliquées dans de multiples voies métaboliques et dérivent probablement toutes d'un ancêtre commun</i>	70
5.	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	74

	viii
6. <i>MONOGRAPHIE</i>	77
7. <i>BIBLIOGRAPHIE</i>	78
8. <i>ANNEXES</i>	i
8.1 <i>Schéma du principe de construction de la banque soustractive PP48</i>	ii
8.2 <i>Article manuscrit sur le clone PP30; Pollination fertilization and wounding of the style induce the expression of a highly conserved plant gene homologous to a Plasmodium falciparum surface antigen in the wild potato Solanum chacoense Bitt.</i>	iv
9. <i>REMERCIEMENTS</i>	xxxv

*LISTE DES TABLEAUX**RESULTATS*

- Tableau 1: Pourcentages d'identité de séquences (similarités entre parenthèses) entre SPP2 et les cinq désoxygénases lui étant le plus apparentées.* 40
- Tableau 2: Pourcentages d'identité de séquences (similarités entre parenthèses) entre SPP2 et les cinq désoxygénases partageant avec elle moins de 33% d'identités.* 43

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

- Figure 1: Schéma d'une coupe longitudinale de fleur de *S. chacoense* et progression (en heures) des tubes polliniques dans le pistil, après pollinisation. 4
- Figure 2: Progression (en heures) des tubes polliniques (colorés au bleu d'aniline) dans le pistil de *S. chacoense* lors d'une pollinisation compatible. 5
- Figure 3: Schéma d'un ovule de *S. chacoense*. 6

### RÉSULTATS

- Figure 4: Séquence d'ADNc du gène *SPP2*, des acides aminés y correspondant, et du lieu d'hybridation des différentes amorces synthétisées utilisées. 35-36
- Figure 5: Hybridation de type Southern sur le gène *SPP2*. 38
- Figure 6: Alignement des identités de séquences des cinq désoxygénases les plus apparentées à *SPP2*. 39
- Figure 7: Alignement des identités de séquences des désoxygénases partageant moins de 33% d'identités avec *SPP2*. 42

- Figure 8: *Hybridation de type northern du gène de l'ACC oxydase sur différents tissus matures de S. chacoense.* 45
- Figure 9: *A- Hybridation de type northern du gène SPP2 sur différents tissus matures de S. chacoense.* 47-48  
*B- Hybridation de type northern du gène SPP2. sur différents tissus matures de S. chacoense (surexposition).*  
*C- Hybridation de type northern du gène SPP2.*
- Figure 10: *Hybridation de type northern de l'induction de SPP2 dans les pistils de S. chacoense suite à la pollinisation.* 50
- Figure 11: *Hybridation de type northern du gène SPP2, sur des pistils provenant de fleurs de S. chacoense.* 50
- Figure 12: *Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des tissus de S. chacoense blessés comparés aux mêmes tissus non blessés, et dans le cas des styles et des ovaires, à ces mêmes tissus pollinisés depuis 48 heures.* 52
- Figure 13: *A-Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des pistils de S. chacoense traités avec différentes phytohormones.* 54  
*B-Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des pistils de S. chacoense traités avec différentes concentrations de gibbérelline GA<sub>3</sub>.*

*Figure 14: Localisation des ARNm du gène SPP2 par hybridation in situ.* 57

*a-Mesures et stades de développement des bourgeons floraux et des fleurs de S. chacoense sur lesquelles ont été réalisées les hybridations in situ.*

*bà r- Hybridation in situ sur des bourgeons floraux et des pistils de fleurs de S. chacoense des six stades de développement.*

*Figure 15: Hybridation in situ sur des pistils de S. chacoense (stade 6) après pollinisation compatible, incompatible et suite à la fécondation.* 60

## DISCUSSION

*Figure 16: Séquence de l'extension 5' correspondant au messenger de taille supérieure pour le gène SPP2.* 69

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

*Figure 17: Induction de protéines (du gène SPP2) dans le vecteur d'expression bactérien PQE-30 en fonction du temps.* 76

## *LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS*

### *Abréviations générales*

$\alpha$ -dCTP-32	$\alpha$ -désoxycytosine tri-phosphate
°C	degré Celsius
$\mu$ Ci	microcurie
$\mu$ g	microgramme
$\mu$ m	micromètre
$\mu$ M	micromolaire
ABA	acide abscissique
ACC	acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ADN (ou DNA)	acide désoxyribonucléique
ADNc (ou cDNA)	acide désoxyribonucléique complémentaire
AIA (ou IAA)	acide indole acétique
AIB (ou IBA)	acide indole butyrique
ANA (ou NAA)	acide naphthalénique acétique
ARN (ou RNA)	acide ribonucléique
ARNm (ou mRNA)	acide ribonucléique messenger
ARNr (ou rRNA)	acide ribonucléique ribosomal
ARNt (ou tRNA)	acide ribonucléique de transfert
BSA	albumine de sérum bovin
CaMV	"cauliflower mosaic virus"; virus de la mosaïque du chou-fleur
cm	centimètre
CTAB	hexadecyltriméthyl ammonium bromide
dATP	désoxyadénosine tri-phosphate
dCTP	désoxycytosine tri-phosphate
Déox	désoxygénase
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide ethylènediamine tétraacétique
FAA	formaldéhyde acide acétique
Fig.	figure
Ga	"giberellic acid"; acide gibbérellique
HCl	acide chlorhydrique
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
kb	kilobase
M	molaire
mJ	millijoule
ml	millilitre
mM	millimolaire
N	normal
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	phosphate de sodium
NaCl	chlorure de calcium
nm	nanomètre

P.	page
PC	pistils contrôles; pistils non-pollinisés
PCR	"polymerase chain reaction"; réaction de polymérase en chaîne
Pfu	"plaque forming unit"
Rnase	ribonucléase
RT-PCR	"reverse transcriptase-PCR"
SDS	dodécyl sulphate de sodium
SDS-Page	"SDS-polyacrylamide gel electrophoresis"; gel d'électrophorèse de polyacrylamide au SDS
SSC	citrate de sodium salin
Tris-HCl	tris (hydroxyméthyle) aminométhane
UTR	"untranslated region"; région non-traduite
UV	ultraviolet

### Abréviations spécialisées

GAD2	"gibberellins down-regulated"
Ov96	ovaires provenant de pistils pollinisés depuis 96 heures
PP48	pistils pollinisés depuis 48 heures
SPP30	<i>Solanum</i> pistil pollinisé, clone #30
Pop-1	"pollen-pistil interactions"
Sf21	"sunflower cDNA"
CRH1-2	"calreticulin <i>hordeum</i> "
UBC-6	"ubiquitin-conjugating enzyme"
NTS-16	" <i>Nicotiana tabacum</i> style"
FLS	"flavonone synthase"
Ids 2-3	" iron deficiency-specific clones 2 et 3"

## DÉDICACE



*J'*

*Aujourd'hui, il reste sur les bords d'un grand lac une grande souche dans laquelle l'écureuil, un de ses vieux ami à lui, a fait son nid et projette, avec sa belle, d'élever ses petits. Chaque fois que j'en éprouve le besoin, c'est près de cette souche que je vais me recueillir et sentir à nouveau, dans les brumes qui embrassent les eaux, la présence et l'âme de mon grand-père, Louis-Philippe Létourneau.*

# 1. INTRODUCTION

## *Les réponses découlant des événements de pollinisation et d'embryogenèse chez *Solanum chacoense* Bitt.*

### 1.1 Les plantes à fleurs

Résultat de la sélection naturelle et de leur passage à travers le temps et l'évolution, c'est par le biais de leur mode de reproduction remarquable que les angiospermes nous permettent maintenant d'apprécier plus de 235 000 espèces connues de plantes à fleurs (Raven, Evert et Eichorn, 1986). Elles représentent donc, aujourd'hui, la plus grande portion du règne végétal, en nombre et en diversité. Et, lorsque l'on parle de diversité, on parle également d'adaptabilité. Conséquemment, les plantes à fleurs sont celles que l'on retrouve dans le plus grand nombre d'écosystèmes différents sur la planète.

Cette extraordinaire versatilité leur vient sans conteste de leur système de pollinisation qui, à travers les temps, s'est adapté aux conditions du milieu. Contrairement aux gymnospermes qui, encore aujourd'hui, sont majoritairement tributaires du bon vouloir des vents pour assurer leur descendance, les angiospermes ont su tirer parti de l'évolution conjointe du règne animal à travers les âges, notamment de celle des insectes. Ces derniers ont, via la sélection naturelle, développé des modes de reproduction particulièrement efficaces qui leur ont rapidement permis de conquérir le milieu terrestre. Ce faisant, ils devinrent pour les plantes à fleurs, des partenaires de choix pour développer de nouveaux moyens de pollinisation. Mais cette belle réussite n'est pas que le résultat d'une co-évolution réussie ayant permis une plus grande dissémination des gènes de ces plantes, elle est aussi due à leur mécanisme de reproduction en soi, mécanisme dont la pollinisation est l'étape première.

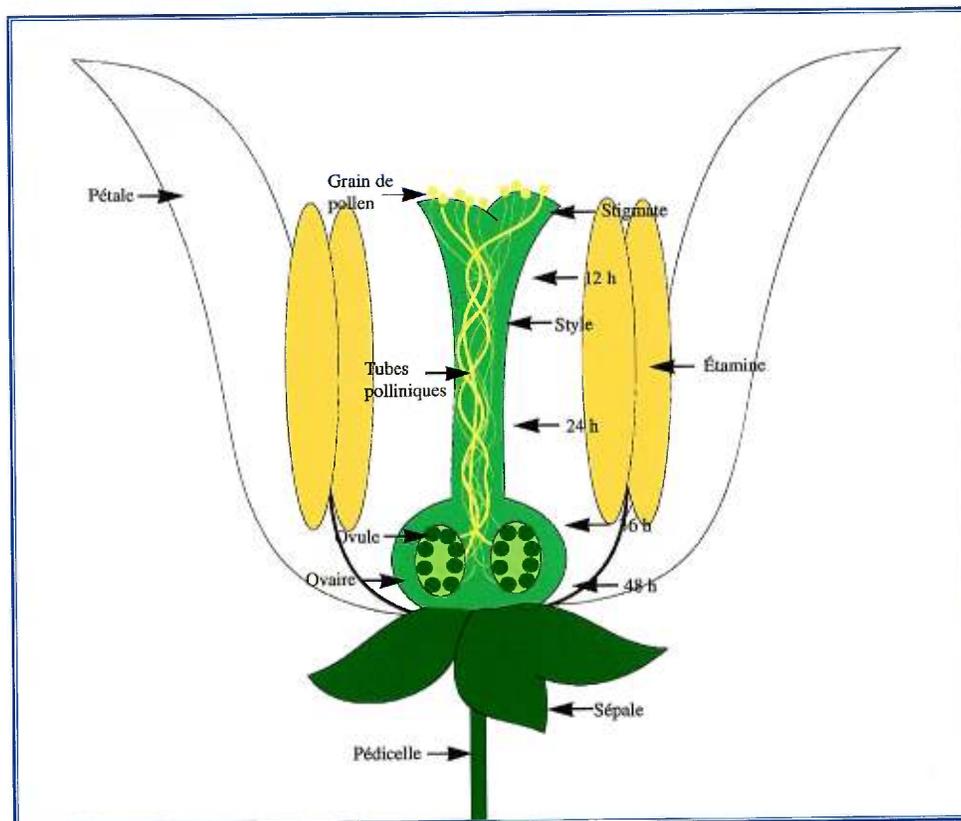
## 1.2 La pollinisation

Plusieurs mécanismes ont été développés chez les plantes pour empêcher certains types de pollinisation et en favoriser d'autres telle l'allogamie, le plus souvent dans le but de conserver ou de maximiser la diversité génétique des plantes, diversité nécessaire au maintien des espèces face aux pressions de sélection changeantes du milieu. Ces mécanismes peuvent être de nature temporelle et développementale comme dans le cas de la protandrie et de la protogynie, ou alors de nature physique comme dans le cas des plantes dioïques ou monoïques. Dans le cas des fleurs hermaphrodites (85% des angiospermes), on retrouve chez plus de la moitié des familles une barrière plus efficace encore, celle de l'auto-incompatibilité. Dans ce cas, le mécanisme de sélection agissant sur la pollinisation implique, au niveau du stigmate ou du style, la reconnaissance et le rejet spécifique de grain de pollen possédant le même allèle S d'auto-incompatibilité que la plante qui est pollinisée. Le résultat est le plus souvent un arrêt de croissance des tubes polliniques, et cela, bien avant que ces derniers n'aient pu rejoindre les ovules. Mais peu importe la nature de la barrière qui peut limiter l'accès du pollen au stigmate de la fleur; lorsque cette étape est franchie, les mécanismes sous-jacents qui sont enclenchés par la seule présence du pollen sur la papille stigmatique, sont sensiblement les mêmes chez toutes les espèces de plantes à fleurs.

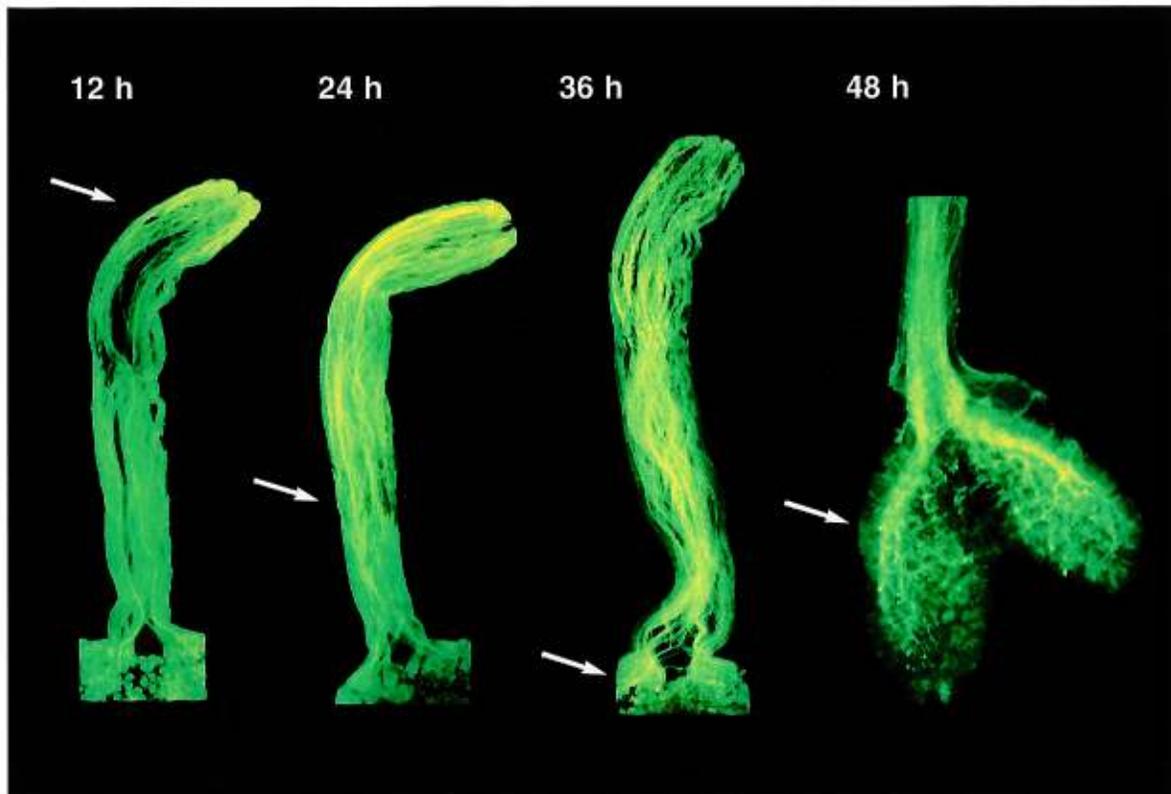
C'est lors de la microsporogénèse que le noyau de la microspore, (précurseur du grain de pollen mature) va se diviser mitotiquement pour donner naissance à deux cellules distinctes, mais présentes à l'intérieur de la même paroi cellulaire. La cellule générative (spermatogène) contient le noyau génératif (spermatif) qui, subséquentement, va se diviser pour donner naissance aux deux noyaux spermatiques qui seront responsables d'effectuer plus tard ce que nous appelons la double fécondation. La cellule végétative contient, quant à elle, le noyau végétatif et sera responsable du développement du tube pollinique qui finalement permettra aux deux noyaux spermatiques d'aller rejoindre la région ovarienne pour y effectuer la double fécondation. Le noyau végétatif et les deux noyaux spermatiques constituent l'appareil germinal mâle des végétaux (Mogensen, 1992). C'est généralement au moment de la germination du grain de pollen que s'effectue la division du noyau génératif pour donner naissance aux

deux noyaux spermatiques. Chez *S. chacoense*, lors d'une pollinisation compatible, les grains de pollen matures qui se déposent à la surface du stigmate doivent provenir d'anthères déhiscentes d'une plante dont l'allèle S d'auto-incompatibilité diffère de celui de la plante qui est pollinisée. Le stigmate, chez les *Solanaceae*, est enduit d'une substance mucilagineuse ayant pour effet de favoriser l'adhérence du pollen à sa surface. Une fois déposé, le grain de pollen va provoquer l'induction de signaux dans le stigmate ayant entre autres comme conséquences la production d'encore plus de ces substances mucilagineuses à sa surface (Sedgley, 1982). Un exemple de ce type d'interaction est illustré par le gène *pop-1* découvert chez *Arabidopsis thaliana*. Le gène *pop-1* est responsable, chez le pollen mature, de la présence de lipides à longues chaînes et de la tryphine, une des sous-couches de l'exine du pollen qui se compose de lipides et de protéines. Les plantes mutantes pour ce gène sont stériles, c'est-à-dire que leurs grains de pollen ne peuvent pas germer sur le stigmate d'une plante également mutante pour le gène *pop-1*, et n'en sont pas davantage capables sur le stigmate d'une plante de type sauvage. On croit donc que ce gène est essentiel aux mécanismes de germination du pollen, car c'est au contact de ces lipides de surface, qu'un signal serait envoyé au stigmate (de façon directe ou indirecte) pour y induire la synthèse de différents composés nécessaires à la germination du pollen (Preuss *et al.*, 1993). Donc, le grain de pollen va s'hydrater au contact de la papille stigmatique et germer pour développer un tube pollinique qui va croître dans le tissu transmetteur du style (Figure 1). Ce tissu spécialisé qui se situe au centre du style sécrète de grandes quantités de polysaccharides, glycolipides, glycoprotéines et sucres simples (Cheung, 1996-b). C'est lui qui assure une continuité physique entre le stigmate et les ovules. Les sécrétions de ce tissu composent la matrice extra-cellulaire dans laquelle les tubes polliniques croissent. Chez certaines espèces, le tissu transmetteur se compose de canaux creux, alors que chez d'autres comme chez *S. chacoense*, il est plein. Il en résulte donc que les tubes polliniques doivent se frayer un chemin entre les cellules ou alors passer à travers les parois des cellules qui composent le tissu transmetteur pour croître jusqu'à la région ovarienne.

Chez *S. chacoense* il faut environ 36 heures aux tubes polliniques pour atteindre les ovules et que la fécondation des plus accessibles de ceux-ci (situés dans la partie supérieure de la région ovarienne) débute (Figure 2).



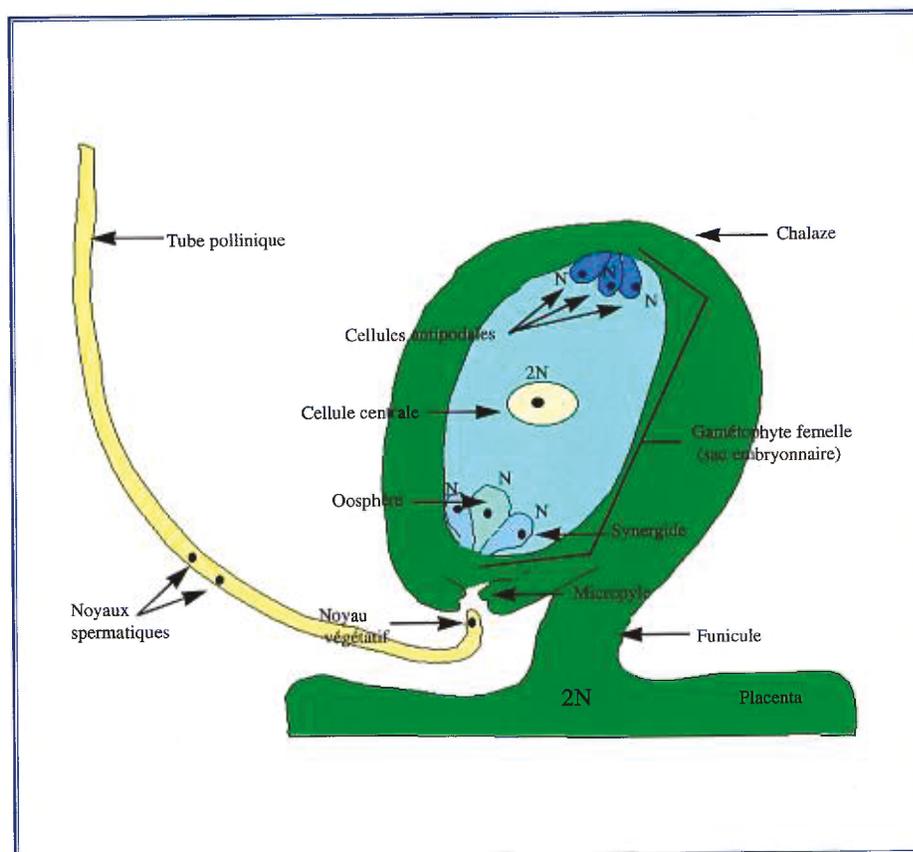
**Figure 1:** Schéma d'une coupe longitudinale de fleur de *S. chacoense*, et progression (en heures) des tubes polliniques dans le pistil après pollinisation.



**Figure 2:** Progression (en heures) des tubes polliniques (colorés au bleu d'aniline) dans le pistil de *S. chacoense* lors d'une pollinisation compatible.

### 1.3 La fécondation

Chez *S. chacoense*, les ovules sont anatropes et chacun d'eux contient un sac embryonnaire de type *Polygonum* (Strasburger, 1879) où sont disposés huit noyaux dans sept cellules (Figure 3). Il s'agit de la forme la plus courante de sac embryonnaire chez les Angiospermes (environ 70%) (Maheshwari, 1950) et que l'on croit être le type ancestral d'organisation du gamétophyte femelle (Huang et Russell, 1992).



**Figure 3:** Schéma d'un ovule de *S. chacoense*.

On retrouve au pôle chalazal du sac embryonnaire les trois cellules antipodales contenant chacune un noyau. À l'autre extrémité de l'ovule, au pôle micropylaire, on retrouve également trois cellules contenant chacune un noyau: les deux synergides et l'oosphère, c'est-à-dire la cellule oeuf à proprement parler. Ensemble, ces trois cellules constituent l'unité germinale femelle (Raven et al., 1986). Les deux noyaux restants, appelés noyaux polaires et qui sont situés au centre du gamétophyte femelle, sont à l'origine issus chacun d'une cellule distincte. Or, pendant la maturation de l'ovule, ces deux cellules centrales fusionnent en une seule ne contenant plus alors qu'un seul noyau, diploïde celui-là. Mentionnons ici que tous les autres noyaux du gamétophyte femelle sont haploïdes.

Lors de la fécondation, un tube pollinique entre dans l'ovule par l'ouverture du micropyle, où il transperce une des synergides libérant ainsi tout le calcium qu'elle contient. Il est bien connu que les synergides contiennent de grandes quantités de calcium (Chaubal et Reger, 1992). Or, c'est justement au contact de cette forte concentration de calcium que va se produire l'éclatement de l'extrémité du tube pollinique par lyse osmotique. Une ouverture (pore) se crée alors à cette extrémité pour libérer les deux noyaux spermatiques qui pourront alors effectuer la double fécondation. Un des deux noyaux ira fusionner avec l'oosphère, donnant ainsi naissance au zygote diploïde qui se développera subséquemment en pro-embryon, tandis que le second noyau ira fusionner avec le noyau polaire diploïde au centre du gamétophyte femelle. Cette deuxième fécondation produira le noyau primaire de l'albumen, noyau triploïde à l'origine de l'albumen nourricier de la future graine. Ce phénomène de la double fécondation est unique aux végétaux. Mais, fait intéressant, la découverte d'un mutant du gamétophyte femelle chez *Arabidopsis thaliana* a permis de constater que les mécanismes contrôlant l'initiation de l'embryogenèse et le développement de l'albumen sont en fait des mécanismes distincts. Dans les ovules mutant pour le gène *fie* (fertilization-independent endosperm), les noyaux polaires peuvent commencer à se diviser pour former l'albumen, et cela, sans que l'oosphère n'ait été fécondée. Cela suggère que le gène *fie*, chez le gamétophyte femelle, serait la source d'un signal responsable d'activer le développement des téguments de la graine et de fruits sporophytiques (Ohad *et al.*, 1996). Finalement, le noyau végétatif du tube pollinique ainsi que les synergides et cellules antipodales restantes, tous se désagrègeront rapidement suite à la fécondation.

#### 1.4 Les interactions pollen-pistil

Chez les fleurs, on connaît bien les gamétophytes mâle et femelle, puisque séparément et cela depuis fort longtemps, ils ont été largement étudiés et caractérisés (Drews *et al.*, 1998; Ylstra *et al.*, 1992). Par contre, ce qui est moins connu, ce sont les réponses moléculaires découlant de l'interaction de ces deux gamétophytes, soit la fécondation et son étape préliminaire, la pollinisation. Pendant longtemps, on a attribué

au pistil un rôle presque exclusivement passif dans les mécanismes de pollinisation et de fécondation. Maintenant, les découvertes effectuées dans ce domaine tendent à démontrer qu'il n'en est rien. En fait, c'est un nombre croissant de signaux de toutes sortes que l'on découvre et qui découlent des différentes interactions résultant des événements de pollinisation et de fécondation. Mais, avant d'entrer dans l'étude des interactions pollen-pistil, commençons d'abord par décrire le pistil au niveau moléculaire.

#### 1.4.1 Composition, structure et fonction du pistil avant la pollinisation

On peut considérer le pistil comme une terre d'accueil dans laquelle germeront, pousseront et fructifieront les gamétophytes mâles, soit les grains de pollen. Et comme toute bonne terre fertile, le pistil doit, par sa composition et sa structure, être bien adapté à son hôte pour permettre les plus belles récoltes, dans le cas qui nous occupe un fruit rempli de graines fertiles. Ces adaptations sont multiples.

Tout d'abord, la papille stigmatique, comme nous l'avons mentionné auparavant, est enduite chez *S. chacoense* de substances mucilagineuses, plus précisément des lipopolysaccharides (Raghavan, 1997) ayant pour fonction de permettre l'adhérence et la germination du pollen. Donc, déjà à cette étape, sans ces substances, point de fécondation possible.

Au niveau du style, on retrouve la matrice extracellulaire, matrice composée de différentes substances sécrétées par les cellules du tissu transmetteur. En plus d'offrir aux tubes polliniques en croissance un support physique pour croître, cette matrice leur servirait également de tissu nourricier. En effet, la croissance des tubes polliniques requiert la synthèse constante de membranes et de parois cellulaires (Steer et Steer, 1989) et les matériaux requis sont prélevés à même la matrice extracellulaire du style (Cheung, 1996-b). Les sécrétions stylaires qui composent cette matrice sont principalement des sucres, des acides aminés, des peptides, des composés phénoliques, des acides gras, des lipides et des glycolipides. Quant aux composantes de poids moléculaires plus élevés, on retrouve surtout des polysaccharides et des glycoprotéines (Sanders et Lord, 1992), appartenant majoritairement à la famille des arabinogalactanes

(AGP) et des glycoprotéines riches en proline (Cheung, 1996-a). Bien que plusieurs de ces protéines soient des protéines ayant un rôle de structure au niveau des parois cellulaires du style, d'autres seraient directement impliquées dans la croissance et le guidage des tubes polliniques dans la matrice extracellulaire du tissu transmetteur. C'est le cas des protéines TTS (transmitting tissue-specific) appartenant à la famille des AGP. Ces protéines stylaires codent pour des promoteurs de la croissance des tubes polliniques ayant de plus des propriétés d'attraction. Ces protéines adhèrent à la surface et aux extrémités des tubes polliniques, et sont glycosylées différemment selon qu'elles sont situées dans la partie supérieure ou inférieure du style (Wang *et al.*, 1996). Or, on sait que les protéines glycosylées sont souvent impliquées dans les processus de reconnaissance cellulaire (Lowe, 1994). En plus de jouer directement un rôle dans le guidage et la croissance des tubes polliniques, les protéines TTS contribuent donc à l'instauration d'un gradient de glycosylation basipète qui pourrait bien être également impliqué comme mécanisme d'attraction des tubes polliniques dans le style. Aussi, on a constaté que ce gradient basipète de glycosylation s'accompagne d'un gradient d'acidité, dirigé dans le même sens. Ce gradient croissant d'acidité aurait-il lui aussi un rôle à jouer dans le guidage des tubes polliniques?

Un autre gradient à concentration basipète fut découvert dans le style. Il s'agit d'un gradient de calcium. Or, le calcium semble être essentiel à la croissance des tubes polliniques *in vitro* (Pierson *et al.*, 1994) et cela pour nombre d'espèces (Cheung, 1996-b). Ce gradient pourrait donc jouer un rôle directeur sur les tubes polliniques *in vivo*, dirigeant ces derniers vers le bas du pistil, soit vers la région ovarienne. D'ailleurs, il a été démontré récemment qu'une vague lente de calcium serait responsable de régler la croissance des tubes polliniques chez le pavot. La propagation de cette vague de calcium serait induite par la présence de l'inositol 1,4,5-triphosphate dans le pollen (Franklin-Tong *et al.*, 1996).

Une autre manifestation d'adaptation du pistil à son rôle directeur pour les tubes polliniques tire son origine des ovules eux-mêmes. En fait, les micropyles de ces derniers sont généralement couverts d'exsudats glycosylés qui pourraient également avoir des propriétés attirantes pour les tubes polliniques (Franssen-Verheijen et Willemse, 1993) permettant à ceux-ci de pénétrer le gamétophyte femelle au bon

endroit. De plus, des recherches ont également démontré que les cellules gamétophytiques (par opposition aux cellules sporophytiques) du gamétophyte femelle lui-même, seraient responsable d'envoyer des signaux directeurs aux tubes polliniques (Ray *et al.*, 1997). Dans ce dernier cas les auteurs ont utilisé une méthode de translocation réciproque de chromosomes pour créer des ovules composés de cellules sporophytiques de type sauvage et, ou bien d'un gamétophyte femelle fonctionnel, ou bien d'un gamétophyte femelle non-fonctionnel. Après pollinisation, les tubes polliniques croissant dans le pistil des plantes contenant des ovules dont le gamétophyte femelle n'était pas fonctionnel, n'ont pu rejoindre le mycropyle des ovules, s'égarant en chemin. Les auteurs venaient ainsi de démontrer qu'un gamétophyte femelle doit être fonctionnel pour que les tubes polliniques puissent atteindre l'ovule; en d'autres mots, qu'un ou des signaux directeurs pour les tubes polliniques proviennent non pas des cellules sporophytiques, mais des cellules gamétophytiques du sac embryonnaire. Par contre, ils n'excluent pas la possibilité que ce signal, originaire des cellules gamétophytiques, passe par les cellules sporophytiques pour jouer son rôle directeur sur les tubes polliniques. En outre, la construction d'un autre mutant a permis de démontrer que les signaux originant des cellules gamétophytiques du sac embryonnaire seraient nécessaires mais non suffisants pour permettre un guidage approprié des tubes polliniques vers les ovules (Ray *et al.*, 1997).

Voici un exemple de protéine présente dans le pistil avant pollinisation (donc non-induite) et qui pourrait possiblement être impliquée subséquentement dans les interactions pollen-pistil. Il s'agit de la protéine SF21, une protéine qui a été localisée principalement au niveau du pistil chez le tournesol (Kräuter-Canham *et al.*, 1997). Le gène *sf21* est exprimé dans les cellules du tissu transmetteur et du phloème dans les fleurons jeunes et matures des inflorescences ouvertes. Chez le tabac, cette protéine est localisée également dans les cellules du tissu transmetteur, mais avec un gradient à concentration croissante allant du stigmate aux ovules, pour certains stades de développement des fleurs (Koltunow *et al.*, 1990). Suite à la pollinisation, les transcrits de *sf21* disparaissent des cellules du tissu transmetteur au fur et à mesure que les tubes polliniques progressent vers les ovules. Cette observation ainsi que la présence d'un gradient basipète de l'expression de SF21 dans le style, rappellent le cas de la protéine

TTS décrit auparavant. Cela semble indiquer que SF21 pourrait bien être une autre de ces protéines impliquées dans les signaux d'attraction des tubes polliniques vers les ovules (Kräuter-Canham *et al.*, 1997). Mentionnons ici que le gène *sf21* est homologue à celui de la protéine RTP (reducing agent and tunicamycin-responsive protein) chez l'humain et Ndr1 chez la souris, une protéine embryonnaire, toutes deux de fonctions inconnues (Kokame *et al.*, 1996; Shimono et Kondoh, 1996).

En opposition aux adaptations pistillaires de type chimiotropique impliquées dans le guidage des tubes polliniques que sont le gradient de calcium ou de glycoprotéines, le groupe de Sanders (Sanders et Lord, 1992) propose plutôt un gradient de substances liantes, les protéines SAM (substrate adhesion molecule). Connues pour être impliquées dans les mécanismes de mouvement cellulaire chez les cellules animales, ces protéines pourraient bien être de façon homologue impliquées dans le mécanisme de guidage des tubes polliniques vers les ovules. En effet, des billes de latex de diamètre comparable à des grains de pollen et appliquées sur le stigmate, descendent à travers la matrice extracellulaire du tissu transmetteur pour y rejoindre les ovules (Bronner-Fraser, 1985). Donc, sans que ne puissent interférer les signaux et molécules induits par une pollinisation compatible, la matrice est capable de diriger ces billes vers le bas du style. On peut donc penser qu'un mécanisme qui reste à élucider et qui implique des molécules d'adhésion est fort probablement présent dans la matrice extracellulaire du tissu transmetteur. Un gradient de ces molécules adhésives, distribuées tout au long du style, pourrait permettre aux tubes polliniques d'être tactilement orientés vers les ovules. D'ailleurs, une glycoprotéine d'adhésion de cette famille, la vitronectine, qui n'avait été découverte que chez les animaux, a récemment été localisée en abondance dans les cellules du tissu transmetteur chez les plantes (Sanders et Lord, 1992). On croit qu'elle pourrait jouer ce type de rôle tactile de guidage sur les tubes polliniques.

Un rôle pour ces protéines d'adhésion est suggéré par l'analyse des mutants *pop2* et *pop3* d'*Arabidopsis thaliana*. Les tubes polliniques provenant de plantes mutantes pour ces deux locus sont incapables de s'orienter correctement vers les ovules, dans le pistil d'une plante qui possède également la double mutation. On a finalement découvert que ces tubes polliniques étaient en fait incapables d'adhérer aux cellules du style pendant leur croissance (Wilhelmi et Preuss, 1996).

### 1.4.2 Le pistil après la pollinisation

Tous les exemples décrits dans la section précédente démontrent la remarquable adaptabilité du pistil à sa fonction, soit celle d'être un terrain propice favorisant au maximum les événements de pollinisation et de fécondation. De cette façon, la plante obtient la plus grande production de gènes disséminables possible, et cela aux moindres coûts. Et justement, pour ne pas gaspiller inutilement de l'énergie, les plantes ne synthétisent certaines molécules que lorsque ces dernières sont requises, leur présence étant en d'autres circonstances inutiles. C'est le cas pour de nombreuses protéines synthétisées dans le pistil, suite aux événements de pollinisation. Certaines de ces protéines ont un rôle qui est connu alors qu'il reste encore présumé pour plusieurs autres.

Dans la section précédente nous avons discuté de la matrice extracellulaire du tissu transmetteur comme tissu nourricier pour les tubes polliniques en croissance. Or, bien que beaucoup de ces substances aient déjà été sécrétées avant la pollinisation dans cette matrice et soient donc déjà potentiellement disponibles aux tubes polliniques, d'autres, présentes dans les cellules du tissu transmetteur, ne seront relâchées que suite à un signal résultant de la pollinisation. En fait, les cellules du tissu transmetteur tendent (après pollinisation et par des mécanismes qui restent à élucider), non seulement à se relâcher pour permettre une pénétration plus facile des tubes polliniques, mais également à se dégrader de manière à libérer les matériaux de synthèse et les substances nutritives qu'elles contiennent et qui seraient nécessaires à la croissance et au guidage des tubes polliniques vers les ovules (Wang *et al.*, 1996). De plus, cette mort cellulaire programmée des cellules du tissu transmetteur permet également de prévenir la pénétration du style par des agents pathogènes, et protège ainsi les événements subséquents de fécondation et de développement de l'ovaire en fruit (Herrero, 1992). Notons ici que seules les cellules du tissu transmetteur se dégradent en réponse à la pollinisation, et que les cellules corticales du style restent, elles, intactes.

Nous avons également discuté dans la section précédente, de la présence préalable aux événements de pollinisation de certains gradients de molécules se distribuant le long du pistil, tel le gradient basipète de glycosylation induit par les protéines TTS. Des études ont démontré que la pollinisation induit une réduction de la taille des queues de poly-A des ARNm pour trois grandes familles de protéines présentes dans le style, les protéines TTS, les  $\beta$ -1,3 glucanases (Ori *et al.*, 1990) et MG15, qui code pour une protéine semblable à l'extensine (Goldman *et al.*, 1992). Un tel raccourcissement a généralement pour conséquence la déstabilisation des ARNm, rendant ainsi moins efficace leur taux de traduction. De fait, dans le pistil du tabac, deux de ces familles de protéines (les  $\beta$ -1,3 glucanases et MG15) voient diminuer leur concentration suite à la pollinisation. Ce qui est surprenant, c'est que ce n'est pas le cas pour les protéines TTS. Leur concentration dans le style reste élevée, et cela malgré le fait qu'elles subissent elles aussi un important raccourcissement de la queue de poly-A de leurs ARNm. Comme on croit que le gradient de glycosylation qui découle de leur présence tout au long du style pourrait être impliqué dans le guidage des tubes polliniques vers les ovules, on pense que les ARNm des protéines TTS seraient, par un mécanisme inconnu, protégés de la dégradation. C'est donc dire que les cellules du tissu transmetteur du style pourraient distinguer les molécules nécessaires au bon déroulement des événements de pollinisation, d'entre celles qui ne le sont pas ou ne le sont plus, en les protégeant de la dégradation (Wang *et al.*, 1996).

Nous avons aussi discuté précédemment de la présence d'un gradient de calcium dans le style, que l'on pense être également important dans le guidage des tubes polliniques vers les ovules. Or, le calcium pourrait, encore une fois, être impliqué comme signal directeur pour les tubes polliniques, mais au niveau du micropyle des ovules cette fois. Un premier signal, induit par la pollinisation, commanderait la dégénérescence d'une des synergides, et cela bien avant que les tubes polliniques n'aient pu la rejoindre pour la transpercer, comme c'est normalement le cas lors de la fécondation (Chaubal et Reger, 1992). Cela suggère que le calcium agirait encore cette fois comme signal directeur pour guider l'extrémité des tubes polliniques directement dans l'ouverture du micropyle, permettant donc au tube pollinique d'aller transpercer

l'autre synergide, ce qui fera éclater son extrémité, et permettra la libération des noyaux spermatiques qui pourront à ce moment effectuer la double fécondation. Or, cette dégénérescence prématurée d'une synergide ne semble pas être un mécanisme universel chez les plantes. D'autres mécanismes fonctionnant en lieu et place ou encore de concert avec celui du calcium doivent exister pour régler ce fin guidage des tubes polliniques vers leur destination finale: l'ovule (Heslop-Harrison, 1986).

#### 1.4.2.1 *Les gènes induits par la pollinisation dans le pistil*

Nous donnerons dans cette section quelques exemples de gènes qui sont induits ou qui voient leur expression régulée par la pollinisation, dans le pistil.

Un exemple de gène induit suite aux événements de pollinisation dans le pistil, est l'alcool déshydrogénase (ADH). Les études ont démontré que l'expression du gène *adh* et l'activité de l'enzyme ADH se situent, après la pollinisation, dans la région du pistil où croissent les tubes polliniques (van Eldik *et al.*, 1997-c). Or, on sait que l'expression du gène *adh* est généralement induite en grande quantité par certains stress comme le manque d'oxygène (Hanson *et al.*, 1984). Donc, l'induction de l'expression du gène *adh* et l'activité de son enzyme après la pollinisation, indiquent que dans les pistils pollinisés, la fermentation anaérobique pourrait être utilisée comme mécanisme alternatif générateur d'énergie à la croissance des tubes polliniques. En effet, il semble que leur croissance dans le pistil de *Solanum tuberosum*, requiert plus d'énergie que ne peuvent en produire les mécanismes de synthèse aérobie. La fermentation serait donc l'alternative à cette demande supplémentaire d'énergie, ayant pour conséquence la production d'éthanol par les tubes polliniques, comme sous-produit de cette réaction anaérobique de production d'énergie (Bucher *et al.*, 1995). L'éthanol produit diffuserait alors dans les tissus proximaux du pistil. Le rôle de l'ADH et de certains autres enzymes du pistil serait alors de métaboliser cet éthanol, inhibant ainsi son effet toxique sur les cellules du pistil. Par contre, mentionnons ici que l'activité de l'ADH ne semble pas être essentielle aux mécanismes de reproduction chez les plantes, puisque celles d'entre-elles qui possèdent une mutation pour *adh* ne sont pas stériles (van Eldik *et al.*, 1997-c).

Par contre, les taux de croissance de leurs tubes polliniques en sont considérablement réduits.

Un autre gène induit par la pollinisation, mais de façon transitoire celui-là, est celui de l'ornithine décarboxylase (ODC) isolé dans les carpelles de tomate (Alabadí et Carbonell, 1998). Le gène *odc* peut également être induit par le 2,4-D et l'acide gibbérellique GA<sub>3</sub>. Par contre, la fonction exacte de ce gène reste à élucider chez les plantes, mais il semble que son expression soit liée à la présence de tissus cellulaires en croissance (Alabadí et Carbonell, 1998).

Deux clones d'ADNc isolés chez l'orge, CRH1 et CRH2 sont également induits par la pollinisation (Chen *et al.*, 1994). Leur expression débute dans les ovaires 24 heures après la pollinisation et se poursuit durant les événements primaires de l'embryogénèse. Mentionnons ici que chez l'orge, la fécondation et les premières divisions zygotiques s'effectuent dans les 24 heures suivant la pollinisation (Engell, 1988). CHR1 et CHR2 sont homologues à la calréticuline découverte chez les animaux, une importante protéine impliquée dans le stockage de calcium au niveau du lumen du réticulum endoplasmique (Milner *et al.*, 1991). Cette organelle est connue pour être responsable de moduler la concentration de calcium libre dans la cellule. Aussi, on sait que plusieurs types de cellules élèvent leur concentration cytosolique de calcium en réponse à certains stress ou stimuli (Chen *et al.*, 1994). D'ailleurs, on peut illustrer ce phénomène par l'induction d'une vague de calcium cytosolique suivant la fusion (et non pas seulement l'adhésion) des gamètes lors de la fécondation chez le maïs (Digonnet *et al.*, 1997). Or, il a été démontré chez plusieurs espèces animales que l'augmentation de calcium intracellulaire résultant de la fusion des gamètes est essentielle à l'activation de certains mécanismes préliminaires, dont dépend le développement subséquent du pro-embryon (Whitaker et Swann, 1993). De la même manière que chez les animaux, cette vague de calcium induite par la fusion des gamètes chez les plantes pourrait être impliquée dans les mécanismes préliminaires de développement de l'embryon dans la graine (Digonnet *et al.*, 1997). Donc, CRH1 et CRH2 pourraient être des protéines de liaison au calcium possiblement impliquées dans les différents mécanismes qui nécessitent la libération de calcium dans les cellules, comme lors de l'instauration du gradient basipète de calcium dans les cellules du tissu transmetteur du style, gradient

responsable de guider les tubes polliniques durant leur croissance vers les ovules.

UBC6, quant à lui, est un gène qui a été découvert chez *Arabidopsis thaliana* et qui code pour une protéine homologue à une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, qui serait présente en grande quantité dans le style après la pollinisation (Watts *et al.*, 1994). Or, on sait qu'après la pollinisation, de nombreuses protéines sont ubiquitinées suite aux processus de sénescence florale. UBC6 pourrait donc être impliqué dans des processus de dégradation et de recyclage des protéines suite à la sénescence des tissus (Watts *et al.*, 1994).

Autre gène modulé par la pollinisation, NTS16 a été découvert dans le style du tabac (Li et Gray, 1997). Ce gène est fortement homologue à des protéines kinases de type ser/thr possédant un domaine récepteur extracellulaire. Une augmentation de son accumulation serait induite par la pollinisation et atteindrait sa valeur maximale de 12 à 18 heures après celle-ci, pour ensuite diminuer. Ce gène est principalement exprimé dans le stigmate et le style mature, où son niveau d'expression s'intensifie fortement lors de la croissance des tubes polliniques. De plus, l'application d'éthylène à des fleurs non pollinisées induit la synthèse de NTS16, ce qui laisse croire que ce gène pourrait jouer un rôle dans la réponse du style à la pollinisation. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à son rôle exact (Li et Gray, 1997).

Un autre gène, *fls*, qui code pour une enzyme impliquée directement dans la biosynthèse des flavonols, la flavonone synthase, voit son expression augmenter dans le style de *Solanum tuberosum*, suite à la croissance des tubes polliniques (van Eldik *et al.*, 1997-a). Les flavonols sont des substances essentielles à la croissance des tubes polliniques chez plusieurs espèces de plantes, dont le pétunia, une *Solanaceae* tout comme la pomme de terre (van der Meer *et al.*, 1992). Sans ces flavonols, les grains de pollen sont incapables de développer correctement leurs tubes polliniques, et le résultat est la stérilité des plantes. Mais fait intéressant, de cette augmentation dans l'expression des transcrits de *fls* chez *Solanum tuberosum* il n'en résulte pas, comme chez le pétunia, une augmentation du contenu en flavonol dans le pistil pollinisé (van Eldik *et al.*, 1997-a). Cela laisse penser que contrairement au pétunia, les flavonols ne seraient pas nécessaires à la croissance des tubes polliniques dans les pistils de pomme de terre (van Eldik *et al.*, 1997-a). Des études conduites sur des plants de patates déficients en

flavonols pourront éventuellement démontrer cette hypothèse.

Un autre clone d'ADNc isolé chez *Solanum tuberosum* (*cp100*) démontre également une augmentation de son expression dans le pistil après la pollinisation, plus précisément entre 1 et 72 heures après cette pollinisation (van Eldik *et al.*, 1997-b). Les tubes polliniques chez *S. tuberosum* mettent 36 heures à rejoindre la région ovarienne, c'est dire que l'augmentation de l'expression de *cp100* se maintient pendant encore 36 heures après la fécondation. Ce clone, homologue à une isoflavone réductase de légumineuse, est également induit dans le pistil par le toucher du stigmate, indiquant que ce gène peut être induit par un stimulus mécanique qui pourrait précéder ou découler de la déposition des grains de pollen sur le stigmate (van Eldik *et al.*, 1997-b). Mentionnons que suite à cette stimulation mécanique, l'induction de *cp100* n'est pas seulement restreinte à la région touchée, mais s'étend à tout le style pour une période de 24 heures, et non pas de 72 heures comme lors de l'induction par la pollinisation. Ceci suggère qu'en plus de la pollinisation, la présence physique des tubes polliniques est requise pour maintenir cette élévation de l'expression de *cp100* dans le style, car 72 heures après la pollinisation, il ne reste dans le style que les tubes polliniques, l'extrémité de ces derniers ayant rejoint depuis longtemps les ovules et effectué la fécondation. Alternativement, la fécondation pourrait aussi être le signal permettant l'expression continue de l'isoflavone réductase. L'induction de *cp100* n'est donc probablement pas seulement le résultat de la croissance des tubes polliniques dans le style. Quant à la fonction de *cp100*, elle reste encore hypothétique, mais les identités de séquences suggèrent que ce gène pourrait jouer un rôle de défense contre des stress de nature oxydante (van Eldik *et al.*, 1997-b).

Mais entre tous, l'exemple d'induction le mieux connu découlant des interactions pollen-pistil est probablement celui de la formation de vagues d'éthylène dans le pistil en réponse à la pollinisation.

### 1.4.3 L'induction de la formation d'éthylène dans le pistil, en réponse à la pollinisation

La pollinisation engendre généralement deux vagues de production d'éthylène. La première s'effectue dans la papille stigmatique dans un très court laps de temps suivant la pollinisation (Whitehead *et al.*, 1984). Cette première vague de production d'éthylène, localisée au niveau du gynécée, influence plus particulièrement les événements qui sont directement impliqués dans la pollinisation et la fécondation des gamètes (induction de signaux de transduction et de communication intercellulaires dans le gynécée, croissance et développement de l'ovaire ainsi que parfois celui des ovules) (O'Neill, 1997). La deuxième vague, quant à elle, survient plusieurs heures après la pollinisation et est localisée non plus seulement dans les tissus directement impliqués physiquement dans les événements de pollinisation, mais s'étend également aux organes floraux situés en périphérie du gynécée, tels les pétales et les sépales (O'Neill, 1997). Cette deuxième vague est plutôt responsable de l'induction des conséquences secondaires de la pollinisation sur la fleur (changements dans la pigmentation des pétales et sépales, sénescence du périanthe, abscission de certains organes floraux). Or, cette deuxième vague n'aurait pas que des effets sur les organes floraux périphériques. On la croit également responsable de maintenir et d'amplifier les effets induits par la première vague de production d'éthylène (O'Neill, 1997).

#### *1.4.3.1 La première vague de production d'éthylène*

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'origine de l'induction des événements primaires de la pollinisation, qui sont responsables de la régulation de la biosynthèse de l'éthylène dans les tissus floraux. La première hypothèse voudrait que ce soit le contact physique entre le grain de pollen et le stigmate qui induirait la production d'éthylène dans le pistil (Gilissen, 1976). La seconde voudrait que ce soit plutôt la pénétration des tubes polliniques dans le stigmate qui soit responsable de la formation de l'éthylène (Hill *et al.*, 1987). Finalement, la troisième et dernière hypothèse veut que l'induction de la production de la première vague d'éthylène découlerait de la présence et du transport de messagers chimiques provenant des grains de pollen eux-mêmes

(Singh, 1992). Or, chez les *Solanaceae*, plus précisément chez le pétunia, la première vague de production d'éthylène survient bien avant la germination des grains de pollen, indiquant alors que ce serait plutôt le pollen (et ce qu'il apporte au stigmate) plutôt que le résultat de l'interaction pistil-tubes polliniques, qui serait responsable de cette première production d'éthylène (Gilissen, 1984). De fait, de ces trois hypothèses, c'est la troisième qui semble aujourd'hui majoritairement acceptée comme étant la plus probable (O'Neill, 1997).

La responsabilité de l'induction de la première vague d'éthylène dans le stigmate a été attribuée à plusieurs molécules à travers le temps et selon les différentes espèces végétales étudiées. Des nombreux messagers chimiques apportés par le pollen et reconnus pour être capables d'induire la production d'éthylène (ACC, auxines, oligosaccharides pectiniques, brassinostéroïdes et jasmonate de méthyle), l'ACC (précurseur direct de l'éthylène) et les auxines furent les plus largement étudiés (O'Neill, 1997).

De grandes quantités d'ACC sont présentes dans le pollen des *Solanaceae* (Whitehead *et al.*, 1983). On a longtemps cru que cet ACC provenant du pollen pouvait, au contact du stigmate, activer l'ACC oxydase présente dans ce dernier pour y induire la première vague d'éthylène. Or, il semble que la quantité d'ACC amenée par le pollen sur le stigmate ne puisse être suffisante pour être responsable de tout l'éthylène produit à ce moment dans le stigmate (Stead, 1992). On a alors supposé que l'ACC provenant du pollen servirait plutôt d'inducteur primaire au mécanisme endogène de production d'éthylène dans le stigmate. En effet, on sait que l'ACC oxydase et l'ACC synthase sont des enzymes auto-catalytiques. Donc, une fois enclenchée par l'application exogène d'ACC, la réaction endogène de biosynthèse de l'éthylène peut se poursuivre, et c'est de cette voie endogène que proviendrait en fait la majorité de l'éthylène produit lors de la première vague de production (O'Neill, 1997). L'ACC du pollen jouerait donc ici le rôle d'inducteur primaire dans cette production, plutôt que celui d'en être le substrat principal.

Chez certaines autres espèces de plantes tel les orchidées, les messagers chimiques responsables d'induire les multiples effets découlant de la pollinisation et de la synthèse de l'éthylène sont les auxines plutôt que l'ACC (O'Neill, 1997), ce dernier

se trouvant en quantité trop négligeable dans leur pollen pour qu'il puisse induire quoi que ce soit au niveau du stigmate. Mais ici également, aucune généralisation ne peut être faite, car dans le pollen de certaines orchidées, la concentration d'auxines serait trop infime pour pouvoir induire les différents effets observés décrits plus haut, découlant des événements primaires de pollinisation (O'Neill, 1997). Par contre, si le rôle des auxines du pollen reste controversé au niveau de l'induction de la production primaire d'éthylène dans la fleur, on sait que chez les *Solanaceae* elles peuvent induire des changements au niveau de la maturation de l'ovaire, puisqu'une application exogène de AIA ou de ANA en lieu et place de la pollinisation peut mener à la production de fruits parthénocarpiques (Gustafson, 1936).

Enfin, de plus en plus d'études tendent à démontrer que plusieurs substances différentes plutôt qu'une seule, et fonctionnant probablement de concert, seraient en fait responsables d'induire les effets découlant de la pollinisation, dont celui de l'induction de la première vague d'éthylène (Porat *et al.*, 1998).

#### 1.4.3.2 La deuxième vague de production d'éthylène

Le fait que la seconde vague de production d'éthylène n'est pas seulement localisée au gynécée pollinisé, mais s'étend également aux organes floraux périphériques, laisse supposer le transport d'un signal quelconque entre le gynécée (lieu de production de la première vague d'éthylène) et les organes floraux périphériques. Ce signal devrait donc être transmissible ou alors induit de façon secondaire par un ou des messagers, eux-mêmes induits lors des événements primaires de la pollinisation. Parce que les auxines, l'ACC et l'éthylène semblent être les signaux les plus souvent impliqués lors des événements primaires de la pollinisation chez les différentes espèces de plantes, ce sont les premiers à avoir été étudiés pour tenir ce rôle de messenger secondaire (O'Neill, 1997).

Or, du fait qu'elles ne semblent pas diffuser suffisamment rapidement hors du pistil pour pouvoir être responsable de la formation de la seconde vague d'éthylène, les chercheurs semblent avoir écarté l'hypothèse que ce ou ces messagers secondaires puisse être les auxines (O'Neill, 1997).

Quant à l'hypothèse d'un signal transmissible provenant du pistil, certains croient que l'éthylène (un gaz) pourrait lui-même être ce signal, et qu'il diffuserait par les espaces intersticiels inter-cellulaires pour ainsi être transporté dans les organes floraux périphériques. Il y amorcerait ainsi sa voie de biosynthèse, un peu à la façon d'un inducteur primaire, cette voie de biosynthèse étant autocatalytique comme nous l'avons mentionné auparavant. Or, cette hypothèse ne semble pas pouvoir s'appliquer à beaucoup d'espèces étudiées (O'Neill, 1997). Une autre possibilité en faveur d'un signal transmissible serait celle de la diffusion du précurseur direct de l'éthylène, l'ACC, qui est une hormone hydrosoluble et qui pourrait donc être la responsable des effets observés qui découlent de la vague secondaire de production d'éthylène (O'Neill, 1997). Plusieurs expériences semblent démontrer que cette hypothèse serait en fait la plus plausible (Nichols *et al.*, 1983; Reid *et al.*, 1984; Woltering, 1990; O'Neill *et al.*, 1993). Donc, l'ACC, l'inducteur primaire de la première vague de production d'éthylène, serait également ce messenger secondaire qui serait transporté du gynécée vers les organes floraux périphériques, pour aller y induire la voie endogène de biosynthèse de l'éthylène. Finalement, c'est cet éthylène qui est responsable des effets secondaires de la pollinisation que l'on observe au niveau des organes floraux périphériques, tels la sénescence du périanthe et la décoloration des pétales et des sépales.

### 1.5 Présentation du projet de recherche

Au moment d'amorcer mon projet de recherche, et tel que décrit dans l'introduction, peu de gènes avaient été caractérisés comme étant induits suite à la pollinisation. L'hypothèse de départ sur laquelle nous nous appuyions était celle d'un rôle actif (plutôt que passif) du pistil dans les événements découlant de la pollinisation et de la fécondation. Donc, dans le but d'élucider ces mécanismes actifs, nous avons opté pour une stratégie permettant d'isoler des gènes préférentiellement exprimés dans ces conditions. C'est par les approches d'hybridation soustractive et de criblage différentiel que nous avons caractérisé trois gènes, dont l'expression est modulée suite à la pollinisation. Une désoxygénase nommée SPP2, ainsi qu'un gène (SPP30) fortement homologue à un antigène de surface de *Plasmodium falciparum* (l'agent causal de la

malaria) furent isolés par hybridation soustractive. Le troisième clone, isolé par criblage différentiel, s'est révélé être l'ACC oxydase, impliqué dans la biosynthèse de l'éthylène. Dans ce mémoire, nous ne traiterons que des clones de la désoxygénase et de l'ACC oxydase, ces deux clones partageant certaines identités de séquences. Le clone SPP30 sera présenté en annexe sous la forme d'un article, de façon à pouvoir mieux cibler la discussion.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Le système modèle

Le système modèle choisi fut *Solanum chacoense* Bitt., une plante diploïde ( $2n=2x=24$ ) et auto-incompatible. Les génotypes d'auto-incompatibilité mis à profit lors de nos études incluaient la lignée IP 458314 (possédant les allèles d'incompatibilité  $S_{11}$  et  $S_{12}$ ) utilisée comme pollinisateur, et IP 230582 (possédant les allèles  $S_{13}$  et  $S_{14}$ ), utilisée comme plante pollinisée. Ces lignées ont été obtenues du Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, WI). La présence d'un système d'auto-incompatibilité chez notre système modèle évite l'émasculature pour prévenir les auto-pollinisations indésirables et nous permet donc de contrôler exactement les temps de pollinisation.

### 2.2 Soins, entretien et pollinisation des plantes

Les plantes des deux lignées citées ci-haut sont constamment et périodiquement bouturées par culture *in vitro*, puis transplantées en éprouvettes sur milieu stérile pour quelques semaines. Par la suite, ces boutures sont transplantées et acclimatées dans des chambres de croissance Conviron (modèle CMP 3244) à un taux d'humidité de 90% et un éclairage constant 16 heures par jour. Quelques semaines plus tard, ces plants sont transplantés à nouveau puis acclimatés en serres, endroit où les pollinisations sont effectuées. Il s'agit de récupérer des fleurs matures (anthères déhiscentes) de la lignée 314 desquelles nous récupérons le pollen, pour ensuite y tremper manuellement les stigmates des fleurs de la lignée 582. Après les temps choisis, les fleurs sont récoltées, disséquées et congelées dans de l'azote liquide, pour ensuite être conservées à  $-86^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation dans le cas des analyses de type northern et Southern. Par contre, les tissus utilisés pour l'hybridation *in situ* sont fixés immédiatement après leur récolte, et leur dissection, s'il y a lieu.

## 2.3 Construction des banques d'ADNc

### 2.3.1 Banque $\lambda$ -ZAP

Deux banques d'ADNc ont été construites, chacune à partir de 5  $\mu\text{g}$  d'ARNm poly(A)<sup>+</sup> isolé de pistils, pour l'une pollinisés depuis 48 heures (appelée banque PP48, construite par S. Lantin), et pour l'autre, pollinisés depuis 96 heures (appelée banque Ov96, construite par J. Poliquin). Les banques ont été construites dans le vecteur d'expression Lambda ZAP, suivant les instructions du manufacturier (Stratagene; LaJolla, CA). Deux banques pour chacun des deux temps de pollinisation (48 heures et 96 heures) ont été construites, car nous avons effectué deux encapsidations différentes des ADNc obtenus des ARNm par transcription inverse. Les titres des banques primaires de PP48 étaient de  $1 \times 10^6$  pfu/ml pour la première banque, et de  $1,2 \times 10^6$  pfu/ml pour la seconde. Ces banques ont, par la suite, été amplifiées. Les titres des banques amplifiées de PP48 se chiffrent à  $1,05 \times 10^{10}$  pfu/ml pour la première banque et de  $6 \times 10^9$  pfu/ml pour la seconde. Finalement, de façon à tester la qualité des banques d'ADNc primaires, nous avons excisé au hasard 6 phages pour chacune des deux banques de PP48, desquels nous avons excisé puis déterminé la longueur des inserts s'y trouvant. La longueur moyenne des inserts de la première banque de PP48 est de 1,728 kb, et celle de la seconde de 2,328 kb.

### 2.3.2 Banque soustractive

Les deux banques soustractives ont été construites par une méthode d'hybridation de suppression par soustraction (PCR-select, Clontech; Palo Alto, CA) (voir schéma en annexe, p. ii) à partir de 2  $\mu\text{g}$  d'ARNm poly(A)<sup>+</sup> provenant de pistils pollinisés depuis 48 heures ou 96 heures comme ARNm "tester", et 2  $\mu\text{g}$  d'ARNm poly(A)<sup>+</sup> provenant de pistils non-pollinisés (PC) comme ARNm "driver". La construction des banques a été effectuée selon les directives du manufacturier.

## 2.4 Méthodes de criblage

### 2.4.1 L'hybridation soustractive

L'ensemble des ADNc "soustraits " provenant des banques soustractives ont été amplifiés par PCR, marqués radioactivement et utilisés pour cribler les banques d'ADNc de PP48 et Ov96. Généralement, 50 000 pfu (5 X 10 000 pfu/pétri) ont été testés à chaque criblage. Un seul réplikat sur membrane de nylon (Hybond N<sup>+</sup>; Amersham Life Science; Arlington Heights, IL) de chaque pétri fut effectué et hybridé après avoir été fixé par irradiation aux UV (120mJ/cm<sup>2</sup>) avec un Hoefer UVC 500 UV Crosslinker. Les plages de lyse hybridant avec les sondes soustraites ont été prélevées à même le pétri, puis excisées *in vivo* selon le protocole proposé par le manufacturier (Stratagene; LaJolla, CA), à partir des plats de pétri correspondants (Sambrook *et al.*, 1989). L'intérêt de chaque clone isolé fut par la suite déterminé par hybridation d'ARN de type Slot blot (Sambrook *et al.*, 1989). De cette façon, nous voulions nous assurer d'obtenir pour chaque clone isolé, un patron d'induction où la quantité du transcrit augmentait suite aux événements de pollinisation ou de fécondation.

### 2.4.2 Le criblage différentiel

Les sondes, lors du criblage différentiel, sont le résultat de la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire, synthétisé à partir de 1 µg d'ARNm provenant de pistils non-pollinisés (PC) pour la sonde contrôle, et de pistils pollinisés depuis 48 heures ou depuis 96 heures pour les sondes "criblantes". (Sambrook *et al.*, 1989). Cette synthèse est effectuée à l'aide de la transcriptase inverse, et le brin d'ADNc est marqué radioactivement au α-P32 dCTP (ICN Biomedicals; CA). Généralement, 50 000 pfu (5 X 10 000 pfu/pétri) ont été testés à chaque criblage. Deux réplikats sur membranes de nylon (Hybond N<sup>+</sup>; Amersham Life Science; Arlington Heights, IL) de chaque pétri furent effectués et fixés par irradiation aux UV (120mJ/cm<sup>2</sup>) avec un Hoefer UVC 500 UV Crosslinker. Le premier réplikat était hybridé avec la sonde criblante, alors que le second l'était avec la sonde contrôle. L'hybridation de chaque série de réplikat était

effectuée avec un nombre égal de comptes radioactifs pour chacune des sondes. Après l'hybridation, les lavages et la révélation sur autoradiogramme, les plages de lyse hybridants avec la sonde criblante et pas avec la sonde contrôle ont été identifiées et excisées *in vivo* selon les directives du protocole du manufacturier (Stratagene; LaJolla, CA), à partir des plats de pétri correspondants (Sambrook *et al.*, 1989). Les patrons d'induction des clones présumés positivement induits, ont été comme pour le criblage soustractif, subséquemment vérifiés par hybridation d'ARN de type Slot blot (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.4.3 Conditions d'hybridation et de lavage

L'hybridation des membranes résultant du criblage des banques d'ADNc PP48 et Ov96 (que le criblage ait été réalisé par hybridation soustractive ou criblage différentiel), a le plus souvent été effectuée dans une solution phosphate (0,25 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% BSA, 7% SDS, 1mM EDTA) et à une température de 65°C pour une durée allant de 15 à 48 heures (Church et Gilbert, 1984). À noter que pour chaque hybridation effectuée, une pré-hybridation d'au moins 1 heure était faite dans la même solution d'hybridation, la sonde en moins. Les conditions de lavages étaient les suivantes: 2 x 30 minutes dans une solution de 2X SSC/0,1% SDS à température de la pièce; 2 x 30 minutes dans une solution de 1X SSC/0,1% SDS à 50°C; et un nombre suffisant de fois 15 minutes dans une solution de 0,1X SSC/0,1% SDS pour une température allant de 50°C à 65°C selon le niveau d'émissions radioactives des membranes vérifiées au compteur Geiger (Ludlum modèle 44-7). Par la suite, l'hybridation des plages de lyse était révélée par autoradiographie sur films Kodak Biomax MR, (Interscience, ONT.), à l'aide de cassettes d'exposition contenant un écran d'amplification, et cela pour une période également déterminée selon le niveau d'émissions radioactives des membranes.

## 2.5 Séquençage

La méthode de séquençage utilisée fut celle de Sanger *et al.* (1977), et les réactions de séquences furent synthétisées à partir de l'ADN purifié des clones SPP2, SPP30 et de l'ACC oxydase, puis marquées radioactivement au  $\alpha$ -S<sup>35</sup> dATP (ICN Biochemicals; CA) à l'aide du "T7 Sequencing Kit (Pharmacia Biotech; Baie d'Urfé, QC.) ou du "Sequenase 2.0 Kit" (Amersham Life Science; Arlington Heights, IL). Pour pouvoir séquencer les deux brins du clone SPP2 dans leur totalité, des amorces internes ont été construites à partir des premières séquences obtenues grâce aux amorces reverse, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> présentes dans le plasmide. Les séquences des amorces internes utilisées sont les suivantes: déox-1; 5'-TATGATTCAGAGGAGGCATCG-3'; déox-2; 5'-AGTACCAATGGAGGTTCGTG-3'. Dans le cas du clone de l'ACC oxydase, aucune amorce interne ne fut synthétisée, les premières séquences obtenues à l'aide des amorces T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> du plasmide nous donnant de très fortes identités de séquences pour un clone déjà entièrement séquencé chez la tomate (# accession X58273).

## 2.6 Extraction et quantification des ARN totaux et messagers

Les ARN totaux ont été isolés des tissus floraux tel que décrit par Jones *et al.*, (1985).

Les ARNm furent isolés des ARN totaux par chromatographie d'affinités, à l'aide de centri-colonnes contenant des billes d'oligo(dt) cellulose, et selon les directives du manufacturier (mRNA separator kit; Clontech; Palo Alto, CA).

De façon générale, la concentration des ARN a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant leur absorbance à 260 nm, concentration qui a été subséquemment vérifiée (et ajustée si nécessaire) sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

## 2.7 Extraction et quantification des ADN

L'ADN génomique a été extrait des feuilles de *S. chacoense* suivant un protocole modifié d'extraction au CTAB comme décrit par Reiter *et al.* (1992).

La quantification des ADN a été effectuée de la même façon que décrite auparavant pour les ARN.

## 2.8 Hybridations de type Southern et northern

Comme décrit par Sambrook *et al.* (1989), 10 µg d'ARN totaux ou d'ADN génomique des tissus étudiés ont été séparés sur gel d'agarose et transférés sur membrane (Hybond N; Amersham Life Science; Arlington Heights, IL) par buvardage humide puis fixés à cette dernière par irradiation aux UV (120mJ/cm<sup>2</sup>). Les sondes ayant servi à hybrider les membranes ont été synthétisées à partir des inserts d'ADN purifiés et d'amorces aléatoires, à l'aide du "High Prime DNA Labelling Kit" (Roche Diagnostic; Laval, QC.), selon les directives du protocole proposé par le manufacturier. Ces sondes étaient marquées avec 50 µCi de α-P32 dCTP (ICN Biochemicals; CA).

Les hybridations, dans le cas des hybridations de type Southern ou northern, ont été effectuées dans une solution à base de formamide (50% formamide, 6X SSC, 5X Denhardt's, 5% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon), à une température de 45°C pour les northern et 42°C pour les Southern, et pour une durée d'environ 15 heures. À noter que pour chaque hybridation, une préhybridation de la membrane d'au moins une heure fut réalisée dans la même solution, la sonde en moins. Les conditions de lavages étaient les suivantes: 2 x 30 minutes dans une solution de 2X SSC/0,1% SDS à température de la pièce; 2 x 30 minutes dans une solution de 1X SSC/0,1% SDS à 50°C; et un nombre suffisant de fois 15 minutes dans une solution de 0,1X SSC/0,1% SDS pour une température allant de 50°C à 55°C selon le niveau d'émissions radioactives des membranes au compteur Geiger (Ludlum, modèle 44-7). Par la suite, l'hybridation était révélée par autoradiographie sur films Kodak Biomax MR, (Interscience, ONT.), à l'aide de cassettes d'exposition contenant un écran

d'amplification, et cela pour une période également déterminée selon le niveau d'émissions radioactives des membranes.

Pour confirmer qu'une quantité égale d'ARN totaux avait été déposée dans chaque puits lors des hybridations de type northern, un fragment de 1 kb de l'ARNr 18S provenant d'ARN de *S. chacoense*, a été amplifié par RT-PCR (obtenu par Martin O'Brien) et utilisé comme sonde contrôle. Les amorces ayant servi à l'amplification (5'-TCGATGGTAGGATAGTGGC-3' et 5'-GCATAGCTAGTTAGCAGG-3'), ont été déterminées par comparaison des séquences conservées d'ARN de la sous-unité 18 S des espèces suivantes: *S. avicular*, *S. lycopersicon*, *S. melongena*, *S. petophylum* et *S. tuberosum*. Les différentes membranes ayant servi aux analyses de northern ont donc été subséquemment réhybridées avec cette sonde d'ARN contrôle, dans les mêmes conditions d'hybridation et de lavage que celles décrites précédemment pour les hybridations réalisées avec les clones d'intérêt.

### 2.9 Blessures

Les blessures ont été infligées en pinçant les feuilles et les styles des fleurs de *S. chacoense* à l'aide d'une pince n'infligeant que des blessures superficielles. Les tubercules, quant à eux, furent coupés en morceaux et incubés dans des pétris humides pour une période de 48 heures, à température ambiante. Quarante-huit heures après l'induction des blessures, les tissus blessés ont été récoltés. Notons ici que les styles et les ovaires ont été récoltés séparément avant d'être, tout comme les feuilles et les tubercules, congelés à l'azote liquide et gardés à  $-86^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. L'extraction d'ARN totaux et l'hybridation d'ARN de type northern qui ont été effectuées sur ces tissus ont été réalisées de la même façon que celle décrite précédemment aux sections 2.6 et 2.8.

### 2.10 Traitements aux hormones

Les traitements aux hormones ont été effectués sur les plantes entières, et plus spécialement sur les fleurs qui ont été vaporisées avec des solutions aqueuses contenant chacune une des hormones suivantes; l'acide indole-acétique (AIA), l'acide indole-butyrique (AIB), l'acide naphtalénique acétique (ANA), l'acide absicique (ABA), la gibbérelline GA<sub>3</sub>, l'etephon et la kinétine. Les solutions contenant ces hormones ont été vaporisées sur les plantes une fois par jour pendant deux jours consécutifs. Les pistils ont par la suite été récoltés, soit 48 heures après le premier traitement. Toutes les phytohormones utilisées ont été achetées chez Sigma (St-Louis, MN) sauf l'etephon (Union Carbide Agricultural Products; Calgary, ALB.), et ont toutes été utilisées à une dilution finale de 10 µM, sauf pour la gibbérelline GA<sub>3</sub> que l'on a également testée à 1µM et 100µM final. L'extraction d'ARN totaux et l'hybridation d'ARN de type northern qui ont été effectués sur ces tissus ont été réalisés de la même façon que décrite précédemment aux sections 2.6 et 2.8.

### 2.11 Hybridation in situ

Les tissus ont tout d'abord été fixés dans une solution de FAA (60% éthanol, 5% acide acétique et 5% formaline), à 4° C pendant une nuit pour les pistils, ou une période pouvant aller jusqu'à 2 jours pour les ovaires (coupés en deux) et les bourgeons floraux non disséqués. Après la déshydratation au butanol tertiaire, les tissus furent enrobés dans de la paraffine, sectionnés en coupes d'une épaisseur de 10 µm, puis montés sur des lames traitées au préalable à l'AES (aminopropyltriethoxy-silane, Sigma; MO). Les tissus furent ensuite déparaffinés dans le xylène et hydratés dans une succession de bains à concentration d'éthanol décroissante, puis soumis à la série de traitements suivants: 20 minutes à température de la pièce dans une solution à 0,2 N HCL, 30 minutes à 70° C dans du 2X SSC, 30 minutes à 37° C dans une solution contenant 2 µg/ml de protéinase K (Roche Diagnostic; Laval, QC.), 20 minutes à température de la pièce dans une solution de 4% paraformaldéhyde, et finalement 10 minutes à température de la pièce dans une solution de 10% triethanolamine et 0,25% acide acétique ou anhydride

acétique. Après ces traitements, les tissus furent déshydratés dans une succession de bains à concentration croissante d'éthanol, puis laissé sécher à l'air libre.

La synthèse des sondes sens et anti-sens fut effectuée à partir de l'ADN purifié du clone SPP2. C'est à partir de cet ADN et en utilisant la T3 ou la T7 ARN polymérase (RNA transcription kit, Stratagene; Palo Alto, CA) ainsi que le système de marquage à la digoxigénine-11-UTP (Roche Diagnostic; Laval, QC.), que les sondes d'ARNm sens et anti-sens ont été synthétisées. Finalement, la quantification des sondes a été faite sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, à l'aide d'un marqueur de quantification ("DNA mass ladder", Gibco BRL Life Technologies; Burlington, ONT.).

Les lames furent pré-hybridées pendant 1 heure à 50° C avec une solution contenant 40% de formamide déionisé, 10% de sulfate de dextran, 3mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM sodium phosphate ph 6.8, 5 mM EDTA, 0,01 M DTT, 1 mg/ml d'ARNt et 0,5 mg/ml de Poly(A)<sup>+</sup> (Roche Diagnostic; Laval, QC.) ainsi qu'avec 40 U d'inhibiteur de RNase (Promega; Madison, WI). Par la suite, les coupes furent hybridées dans cette même solution contenant entre 0,4 et 0,6 µg/ml de sonde d'ARN (en équivalent d'ADN tel que déterminé sur gel) marquée à la digoxigénine, pendant 15 heures, à 50° C. Après l'hybridation, les coupes furent plongées dans un bain contenant 60 µg/ml de Rnase A (Roche Diagnostic; Laval, QC.) pendant 30 minutes à 37° C, pour digérer les ARNm non hybridés. Les lames furent ensuite lavées à température de la pièce dans des bains de 2X SSC, 1X SSC et finalement 0,1X SSC, pendant 1 heure chaque fois.

Aux tissus hybridés, fut ajouté un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostic; Laval, QC.) pour une période de 2 heures à 37°C. Finalement, le lieu d'expression des sondes dans les tissus fut révélé par colorimétrie en baignant les tissus hybridés dans une solution contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Roche Diagnostic; Laval, QC.) et du bleu de tétrazolium (Roche Diagnostic; Laval, QC.), pour une période d'environ 15 heures. Après avoir été montées de façon permanente entre lame et lamelles, les coupes furent photographiées avec un microscope Olympus BH-2 (Olympus; New Hyde Park, NY) sur film Kodak Ektachrome 160 T.

### 2.12 Vecteur d'expression protéique

Un vecteur d'expression protéique (PQE-30; QIAexpress type IV kit, QIAGEN; Mississauga, ONT.) fut utilisé pour exprimer le clone SPP2. Tout d'abord, le clone SPP2 fut amplifié par PCR en utilisant des amorces complémentaires (déox-3 et déox-4) incorporant respectivement les sites de clonage Sac I et Pst I. Ces amorces (déox-3; 5'-ACTGAGCTCATGGCGAGCTGTCTCTCAAAC-3'; déox-4; 5'-ACTCTGCAGGACTTGATCCTTCTGGCACAC-3') ont été synthétisées à partir de la séquence du clone, de façon à ce que ce dernier soit en phase avec la queue d'histidine présente dans le vecteur. Les produits de PCR furent donc incorporés au plasmide PQE-30 préalablement digéré avec les enzymes de restriction Sac I et Pst I. Par la suite, nous avons vérifié par séquençage si le clone SPP2 introduit dans le vecteur PQE-30 était bien en phase avec ce dernier, rendant ainsi possible la traduction et donc l'expression de la protéine correspondante au gène SPP2. Finalement, le plasmide fut introduit par électroporation dans la bactérie *Escherishia coli* XL1-MRF' (Gibco BRL Life Technologies; Burlington, ONT.) L'expression de SPP2 fut induite dans les bactéries à l'aide d'IPTG à concentration finale de 1 µM. Un échantillon des bactéries fut récolté toutes les heures pendant 5 heures, puis les bactéries furent lysées selon le protocole 4 du livret d'instruction du "QIAexpress type IV kit", et les protéines s'y trouvant mises sur SDS-PAGE ("Mini-protean II electrophoresis cell"; BIO-RAD; Mississauga, ONT.) pour déterminer le meilleur temps d'induction. Par la suite, les protéines exprimées à ce temps d'induction furent purifiées sur colonnes par chromatographie d'affinité, à l'aide de billes de résine Ni-NTA (QIAexpress type IV kit, QIAGEN, Mississauga, ONT.). Les résultats des différentes fractions de purification récoltées furent également mises sur gel de polyacrylamide pour vérifier la qualité de la purification obtenue.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1 Isolement des clones d'ADNc SPP2 et de l'ACC oxydase

Dans le but de caractériser des gènes impliqués dans les interactions pollen-pistil et les événements de fécondation, nous avons utilisé une méthode de criblage différentiel et d'hybridation soustractive (Diatchenko *et al.*, 1996), pour cribler des banques d'ADNc construites dans le vecteur  $\lambda$ -ZAP, à partir de pistils pollinisés depuis 48 (banque PP48) ou 96 heures (banque Ov96). Lors du criblage différentiel, les plages de lyse hybridant avec la sonde synthétisée à partir d'ARNm de pistils pollinisés depuis 48 heures, et n'hybridant pas avec la sonde synthétisée à partir d'ARNm de pistils non pollinisés, furent isolées, et leurs plasmides excisés *in vivo*. Par la suite, l'intérêt des clones excisés fut vérifié par hybridation d'ARN de type Slot blot (résultats non présentés), pour confirmer qu'ils étaient induits suite à la pollinisation ou la fécondation. La méthode de criblage différentiel nous a permis d'isoler le gène de l'ACC oxydase, gène directement impliqué dans la biosynthèse de l'éthylène et connu pour être induit par la pollinisation.

Lors de l'hybridation soustractive, deux banques soustractives d'ADNc ont été construites. La première fut réalisée à partir de pistils pollinisés depuis 48 heures et la seconde à partir d'ovaires provenant de pistils pollinisés depuis 96 heures. De ces deux banques de tissus pollinisés, furent soustraits les ARNm de pistils matures, mais non pollinisés. C'est donc dire que les ARNm communs aux pistils pollinisés et non pollinisés ont de cette façon été éliminés, ne laissant plus "théoriquement" que les ADNc provenant des ARNm induits par les événements de pollinisation et de fécondation. C'est cet éventail d'ADNc résultant de la soustraction, qui ayant été amplifié par PCR, a servi de sonde pour cribler les banques d'ADNc PP48 et Ov96 construites dans  $\lambda$ -ZAP. Suite à l'hybridation, les plages positives furent isolées, et leurs plasmides excisés *in vivo*. Ensuite, dans le but de vérifier si les clones isolés étaient bel et bien induits par la pollinisation ou la fécondation, des hybridations d'ARN de type Slot blot furent réalisées pour chacun d'eux (résultats non présentés). Un clone appelé SPP2 (*Solanum* Pistil Pollinisé) a été isolé de cette façon, dans les deux banques d'ADNc, PP48 et Ov96. La

séquence de l'ADNc et de la protéine encodée sont présentées à la figure 4. SPP2 est un clone d'ADNc d'une longueur de 1210 pb (excluant la queue de poly A), possédant une courte région 5' non traduite de 43 nucléotides (nt) et une région 3' UTR de 141 nt. La taille de l'ADNc de SPP2 correspond exactement à la taille attendue, soit 1250 nt, telle que vérifiée par analyse d'ARN de type northern (Figure 9), suggérant que l'ADNc de SPP2 est pleine longueur, ou presque. La protéine codée par le gène SPP2 se compose de 341 acides aminés pour un poids moléculaire de 37.8 kD, et un point isoélectrique calculé de 5,6. L'analyse de la séquence des acides aminés de cette protéine suggère qu'elle est localisée dans le cytoplasme, puisqu'on ne retrouve pas de domaine hydrophobe à son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale pouvant servir de peptide signal.

**Figure 4:** Séquence d'ADNc du gène SPP2, des acides aminés y correspondant, et du lieu d'hybridation des différentes amorces synthétisées utilisées.

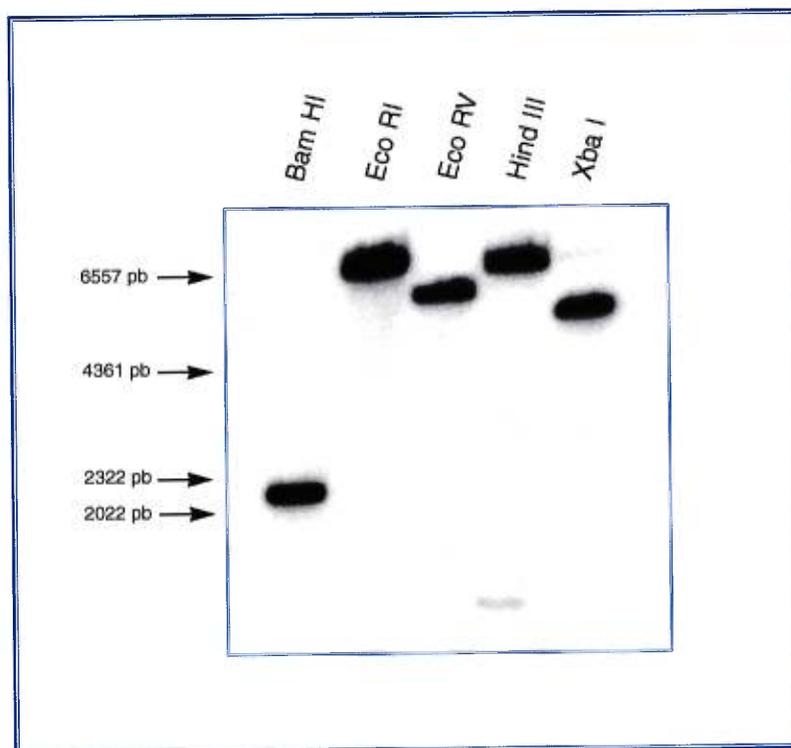
**Légende:** Les pointes de flèches inversées représentent le lieu d'insertion des introns dans la séquence.



La position et la séquence des introns dans la séquence de SPP2 (indiquée par des pointes de flèches dans la figure 4) ont été obtenus en amplifiant par PCR, l'ADN génomique de *S. chacoense* à l'aide d'amorces internes (Déox-1 et 2) et terminales (Déox-3 et 4) synthétisées à partir de la séquence du clone d'ADNc.

### 3.2 Nombre de copies du gène SPP2

Une hybridation de type Southern a été effectuée sur de l'ADN génomique de *S. chacoense*, avec pour sonde l'insert (cloné Eco RI, Xho I) complet de l'ADNc du gène SPP2 (Figure 5). On peut voir pour les digestions avec Bam HI, Eco RI, Eco RV et Xba I, qu'un seul fragment d'ADN génomique hybride avec la sonde SPP2, révélant respectivement des fragments de 2,1 kb; 6,6 kb; 5,5 kb et 5 kb. Deux fragments de 6,6 kb et 0,5 kb ont hybridé avec la sonde SPP2 pour la digestion Hind III. Or, on sait qu'un site de restriction pour l'enzyme Hind III est présent dans la séquence du clone d'ADNc de SPP2 (position 219, figure 4); cela suggère donc fortement que SPP2 est un gène à copie unique chez *S. chacoense*. De plus, une analyse de type Southern (appelée phytoblot) sur l'ADN génomique de certaines *Solanaceae* et des familles leur étant le plus apparentées phylogénétiquement a révélé que SPP2 est également présent chez d'autres espèces de *Solanaceae* (aubergine, tomate, cerise de terre et pétunia), mais pas chez des représentants de la famille des *Brassicaceae* tel *Arabidopsis thaliana* et *Brassica oleracea* (résultats non présentés). Notons toutefois qu'il est possible qu'une désoxygénase de nature semblable à SPP2 soit malgré tout présente dans la famille des *Brassicaceae*. On ne peut en effet exclure ici la possibilité que la sonde construite à partir de SPP2 ait été suffisamment dissemblable d'une possible désoxygénase chez les *Brassicaceae*, pour empêcher l'hybridation de la sonde sur la membrane contenant les ARNs d'*Arabidopsis thaliana* et *Brassica oleracea*.

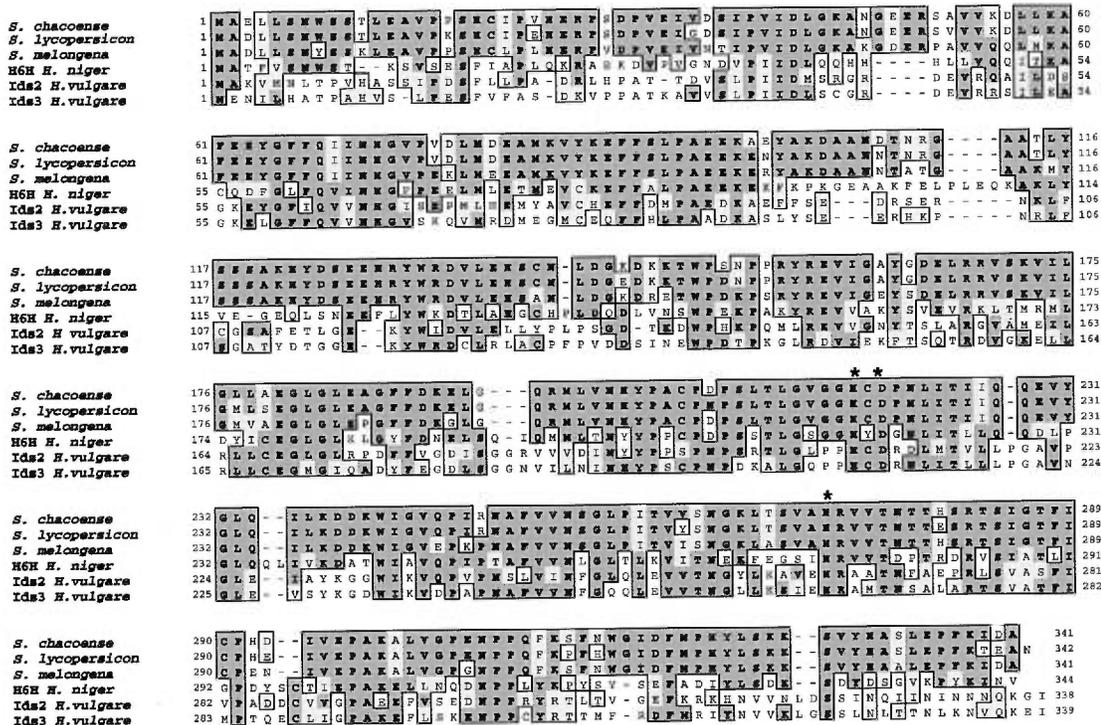


**Figure 5:** Hybridation de type Southern sur le gène SPP2.

### 3.3 Analyse des identités de séquences

#### 3.3.1 Identités de séquences pour le clone SPP2

Les recherches d'identités de séquences dans les banques de données de séquences nucléiques et protéiques, ont révélé pour SPP2 une forte similarité avec un sous groupe de la famille des désoxygénases chez les plantes, les "2-oxoglutarate dépendantes", appelés également "2-oxoacide dépendantes". La figure 6 montre l'alignement des désoxygénases les plus similaires au clone SPP2. Les pourcentages d'identité (au niveau des acides aminés) que partagent ces clones avec SPP2 sont présentés au tableau I. La plupart des désoxygénases apparentées à SPP2 appartiennent à la famille des *Solanaceae*. Cela inclut le clone partageant avec SPP2 la plus forte identité (94%), une désoxygénase exprimée dans le pistil de la tomate (Milligan et Gasser, 1995), elle-même identique à un clone partiel d'ADNc isolé d'une banque d'ADNc de feuilles de tomate, et codant pour une désoxygénase réprimée suite à un traitement avec la gibberelline GA<sub>3</sub> (GAD2; Jacobsen et Olszewski, 1996).



**Figure 6:** Alignements des identités de séquences des cinq désoxygénases les plus apparentées à SPP2.

**Légende:** Les astérisques correspondent aux acides aminés impliqués dans le site présumé de liaison du fer aux désoxygénases de la famille des 2-oxoglutarate dépendantes.

**Numéros d'accèsion:**

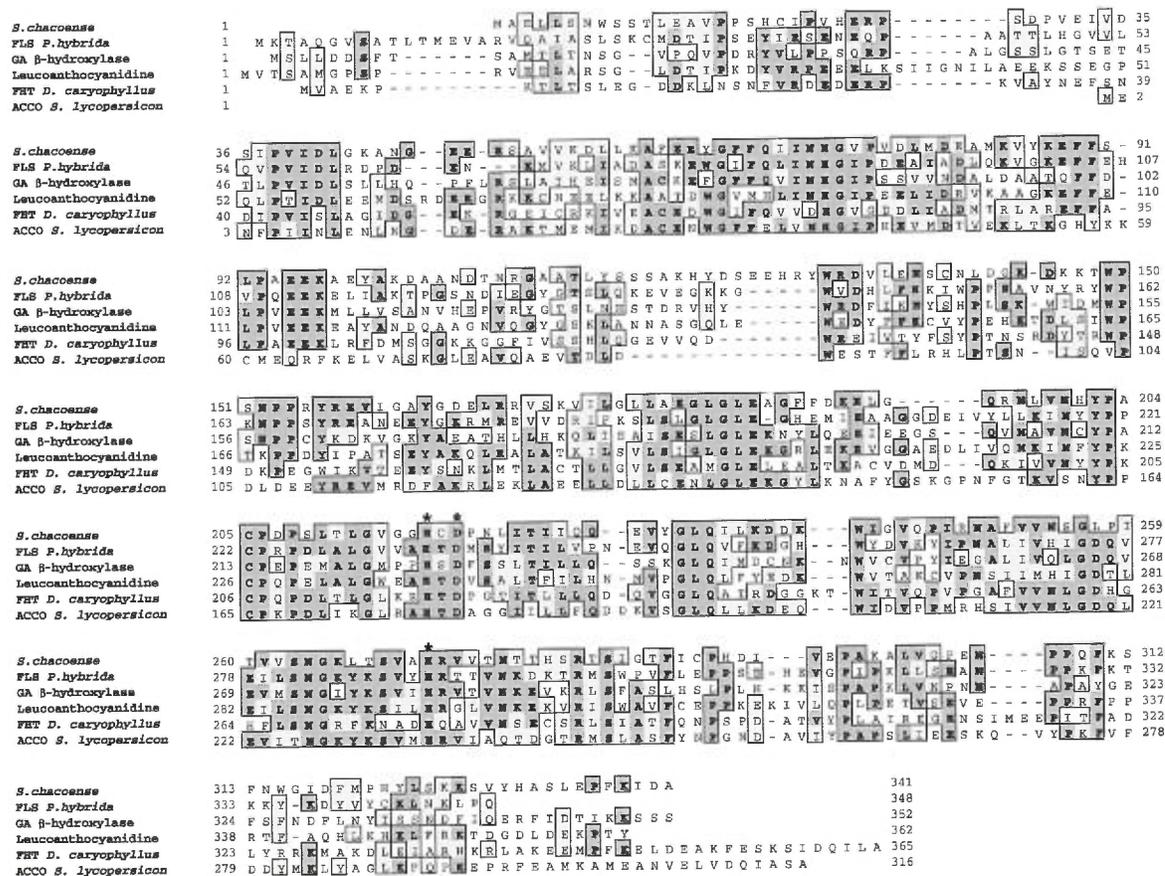
SPP2	<i>Solanum chacoense</i>	(AF104925)
TPP1	<i>Solanum lycopersicon</i>	(U20596)
	<i>Solanum melongena</i>	(X77368)
H6H	<i>Hyoscyamus niger</i>	(D26583)
Ids2	<i>Hordeum vulgare</i>	(D15051)
Ids3	<i>Hordeum vulgare</i>	(D37796)

	SPP2 <i>Solanum chacoense</i>	TPP1 <i>Solanum lycopersicon</i>	<i>Solanum melongena</i>	H6H <i>Hyoscyamus niger</i>	Ids2 <i>Hordeum vulgare</i>	Ids3 <i>Hordeum vulgare</i>
<b>SPP2</b> <i>Solanum chacoense</i>	100	94 (95)	86 (90)	44 (60)	34 (51)	34 (52)
<b>TPP1</b> <i>Solanum lycopersicon</i>		100	84 (88)	44 (59)	33 (51)	33 (51)
<i>Solanum melongena</i>			100	45 (61)	33 (52)	31 (52)
<b>H6H</b> <i>Hyoscyamus niger</i>				100	33 (49)	31 (48)
<b>Ids2</b> <i>Hordeum vulgare</i>					100	55 (74)
<b>Ids3</b> <i>Hordeum vulgare</i>						100

**Tableau I:** Pourcentages d'identité de séquences (similarités entre parenthèses) entre SPP2 et les cinq désoxygénases lui étant le plus apparentées.

Le deuxième clone partageant la plus forte identité de séquence avec SPP2 est une désoxygénase d'aubergine (Toguri, Genbank, 1994), qui partage avec elle 86% d'identité au niveau des acides aminés. Les désoxygénases de tomate et d'aubergine n'ont, à ce jour, aucun substrat connu. En outre, la désoxygénase partageant la plus grande identité de séquences (44% d'identité et 60% de similarité au niveau des acides aminés) avec SPP2 et ayant une fonction connue, est l'hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase (H6H) isolé chez *Hyoscyamus niger*. En effet, elle est impliquée dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes de la famille des tropanes. H6H catalyse, chez plusieurs espèces de *Solanaceae*, les réactions d'hydroxylation de l'hyoscyamine en 6 $\beta$ -hydroxyhyoscyamine et de l'époxydation subséquente de cette 6 $\beta$ -hydroxyhyoscyamine en scopolamine (Haschimoto *et al.*, 1993). Deux autres désoxygénases isolées chez l'orge, Ids2 et Ids3 (Nakanishi *et al.*, 1993; Okumura *et al.*, 1994) partagent des identités de séquences significatives au niveau des acides aminés avec SPP2. Ces deux

désoxygénases sont exprimées dans les racines, lors de conditions qui favorisent une déficience en fer. L'H6H de *H. niger* est, tout comme Ids2 et Ids3, principalement exprimée dans les racines, qui sont le site de biosynthèse des alcaloïdes tropanes chez les *Solanaceae* (Matsuda *et al.*, 1991). Des identités de séquences (au niveau des acides aminés) de l'ordre de 25% à 32% (Figure 7) sont également observées avec des désoxygénases provenant d'autres plantes, telles la flavonol synthase (FLS, 32%) du pétunia (Holton *et al.*, 1993), une présumée  $\beta$ -hydroxylase des gibbérellines (31%) chez *Arabidopsis thaliana* (Rounsley *et al.*, Genbank, 1998,), une désoxygénase de la leucoanthocyanidine (30%) chez *Perilla frutescens* (Gong *et al.*, Genbank, 1997), une flavonone-3-hydroxylase ou naringenine-3-désoxygénase (FHT, 28%) chez *Dianthus caryophyllus* (Britsh *et al.*, 1993), et finalement l'ACC oxydase (25) de *Solanum lycopersicon* (Kock *et al.*, 1991). Les pourcentages d'identité (similarités entre parenthèses) de séquences entre SPP2 et ces désoxygénases partageant avec elle moins de 33% d'identités, sont résumés au tableau II. Les acides aminés que l'on pense être impliqués dans le site de liaison du fer aux désoxygénases, sont présents et conservés chez toutes les désoxygénases mentionnées ci-haut (indiqués par des astérisques dans les séquences des figures 6 et 7 (Britsch *et al.*, 1993).



**Figure 7:** Alignements des identités de séquences des désoxygénases partageant moins de 33% d'identité avec SPP2.

**Légende:** Les astérisques correspondent aux acides aminés impliqués dans le site présumé de liaison du fer aux désoxygénases de la famille des 2-oxoglutarate dépendantes.

**Numéros d'accension:**

SPP2 <i>Solanum chacoense</i>	(AF104925)
FLS <i>Petunia hybrida</i>	(Z22543)
Ga β-hydroxylase <i>Arabidopsis thaliana</i>	(AC003672)
Leucoanthocyanidine <i>Perilla frutescens</i>	(AB003779)
FHT <i>Dianthus caryophyllus</i>	(X72592)
ACC oxydase <i>Solanum lycopersicon</i>	(X58273)

	SPP2 <i>Solanum chacoense</i>	Fls <i>Petunia Hybrida</i>	Ga $\beta$ - hydroxylase <i>A. thaliana</i>	Leucoantho- cyanidine <i>P. frutescens</i>	FHT <i>Dianthus caryophyllus</i>	Acc oxydase <i>Solanum lycopersicon</i>
SPP2 <i>Solanum chacoense</i>	100	33 (46)	31 (50)	31 (47)	29 (43)	25 (41)
Fls <i>Petunia Hybrida</i>		100	31 (50)	41 (59)	28 (46)	27 (42)
Ga $\beta$ - hydroxylase <i>A. thaliana</i>			100	30 (57)	25 (43)	23 (38)
Leucoantho- cyanidine <i>P. frutescens</i>				100	28 (44)	25 (39)
FHT <i>Dianthus caryophyllus</i>					100	25 (38)
Acc oxydase <i>Solanum lycopersicon</i>						100

**Tableau II:** Pourcentages d'identité de séquences (similarités entre parenthèses) entre SPP2 et les désoxygénases partageant avec elle moins de 33% d'identités.

### 3.3.2 Identités de séquences pour le clone de l'ACC oxydase

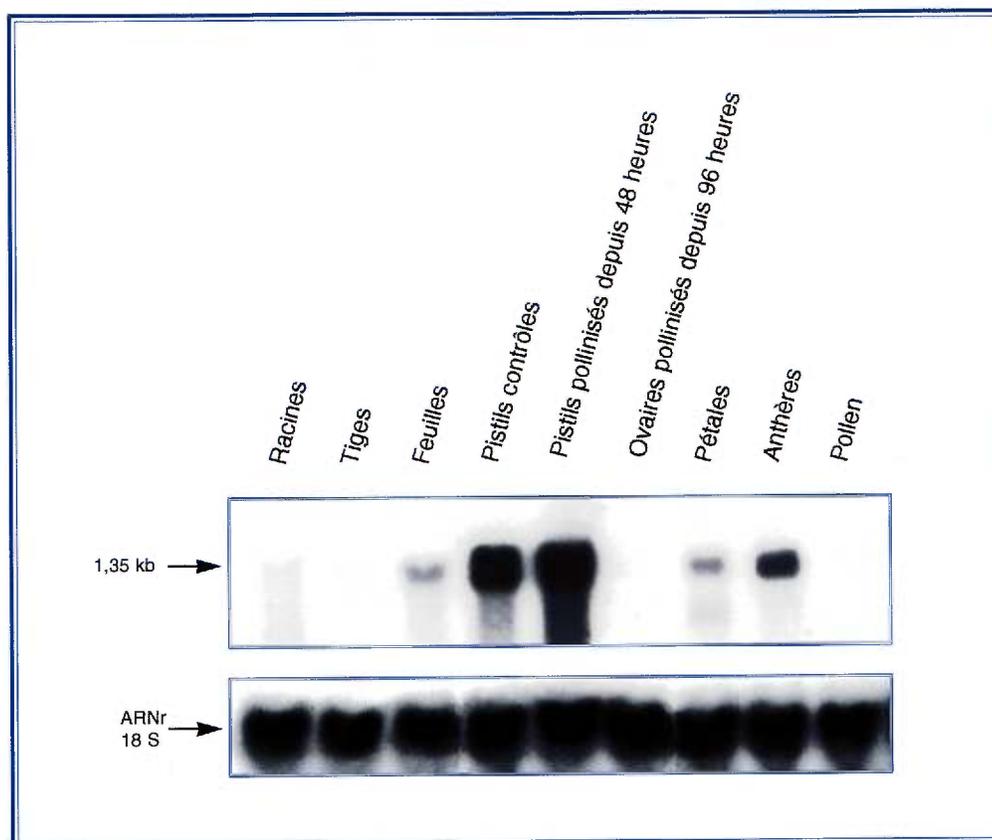
Comme cela vient tout juste d'être mentionné, SPP2 partage des identités de séquences avec l'ACC oxydase, gène que nous avons également isolé de la banque d'ADNc PP48. Nous n'avons que partiellement séquencé ce gène, car les identités que nous avons sorties de sa séquence préliminaire ne nous donnaient que des ACC oxydases. La plus forte homologie de séquences partagée avec notre ACC oxydase est l'ACC oxydase de la tomate, avec 91% d'identité (# accession: X58273). Viennent ensuite l'ACC oxydase du pétunia avec 89% d'identité (# accession: L21978), l'ACC oxydase du tabac avec 88% d'identité (# accession: Z46349), l'ACC oxydase de la vigne (77% d'identité, # accession: AB002667) et finalement celle de la papaye avec 76% d'identité (# accession: L76283). L'ACC oxydase, bien que n'ayant pas été isolée chez

*S. chacoense*, mais étant par ailleurs déjà fort connue et caractérisée chez de nombreuses espèces de plantes, nous avons décidé de ne pas compléter son séquençage.

### 3.4 Expression des ARNm de l'ACC oxydase et de la désoxygénase SPP2, dans les différents tissus matures de *S. chacoense*.

#### 3.4.1 Expression des ARNm de l'ACC oxydase

L'expression spécifique de l'ACC oxydase dans différents tissus matures de *S. chacoense*, fut déterminée par hybridation d'ARN de type northern (Figure 8). L'analyse des résultats obtenus démontre que l'ACC oxydase est fortement présente dans les pistils non pollinisés et qu'une pollinisation de 48 heures induit une augmentation de l'expression du gène dans les pistils. Par contre, on remarque qu'après 96 heures de pollinisation, aucune expression n'est détectée dans l'ovaire. Puisque le style se détache de l'ovaire environ trois jours après la pollinisation, l'expression de l'ACC oxydase est, soit confinée au style, soit fortement réprimée dans l'ovaire quatre jours après la pollinisation. On constate également que l'ACC oxydase est présente, mais à un degré moindre, dans les feuilles, les pétales et de façon un peu plus marquée dans les anthères. Un très faible signal est détecté dans les racines alors qu'il est quasi inexistant dans les tiges. Aucune trace d'expression de l'ACC oxydase n'est détectable dans le pollen.



**Figure 8:** Hybridation de type northern du gène de l'ACC oxydase sur différents tissus matures de *S. chacoense*.

### 3.4.2 Expression des ARNm de la désoxygénase SPP2

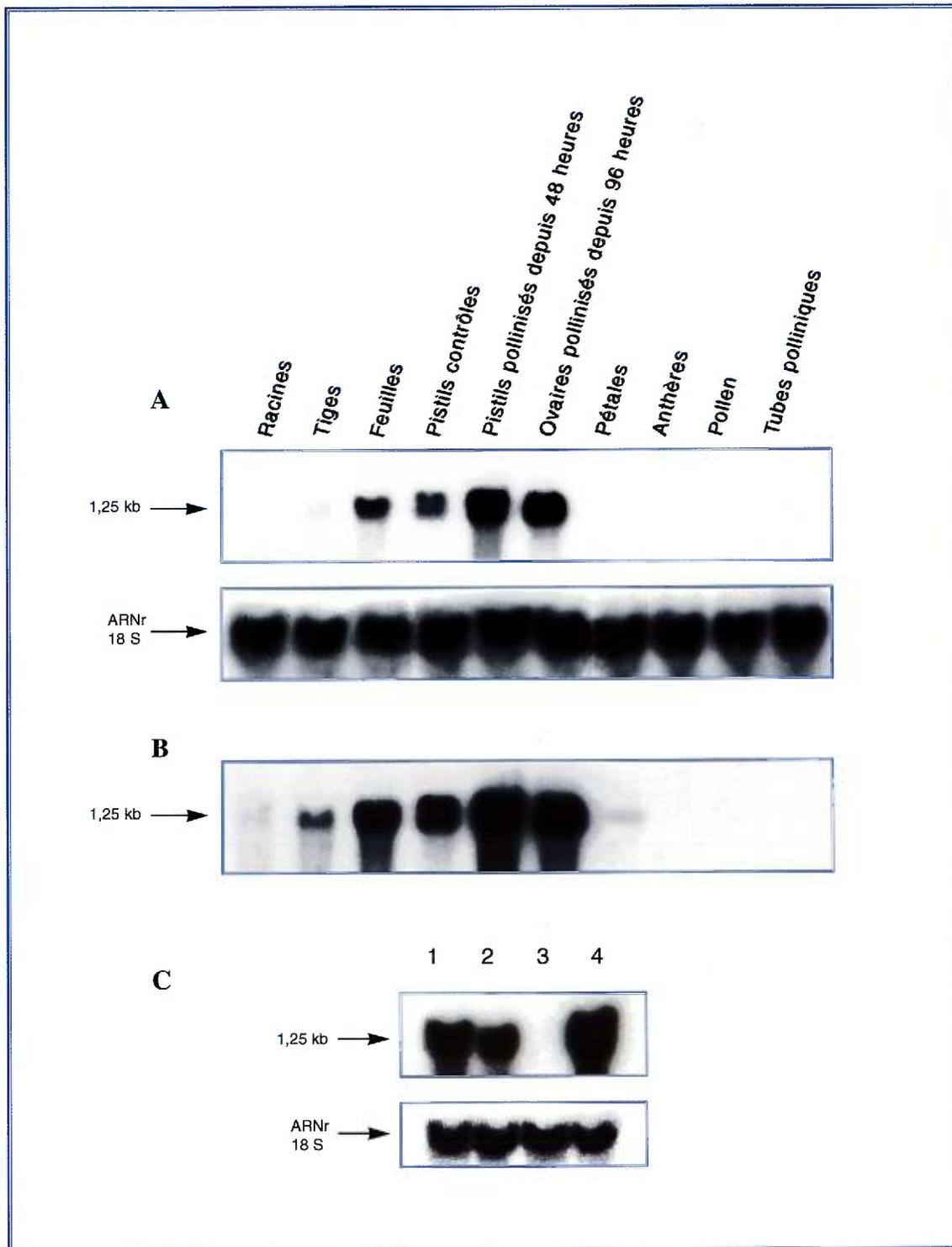
L'expression spécifique de la désoxygénase dans différents tissus matures de *S. chacoense* fut, tout comme dans le cas de l'ACC oxydase, déterminée par hybridation d'ARN de type northern (Figure 9). L'analyse des résultats démontre que SPP2 est exprimé de façon prédominante dans les pistils et les feuilles (Figure 9-A). Une augmentation de l'expression est induite, tout comme dans le cas de l'ACC oxydase, dans les pistils pollinisés depuis 48 heures. Contrairement à l'absence d'expression de l'ACC oxydase dans les ovaires pollinisés depuis 96 heures, SPP2 y est encore fortement induit. Le même northern surexposé (Figure 9-B) laisse clairement apparaître une expression dans les tiges matures de *S. chacoense*, et une très faible expression dans les racines et les pétales. Aucun signal d'hybridation n'est détectable dans les anthères, les tubes polliniques ou le pollen, et cela même sur le northern ayant été surexposé.

Une analyse densiométrique effectuée sur des films provenant de plusieurs expositions révèle que SPP2 est 30 fois moins présent dans les racines et six fois moins présent dans les feuilles et les pistils non pollinisés que dans les pistils pollinisés depuis 48 heures.

Pour déterminer si la pollinisation en soi (et/ou la fécondation) est responsable de l'induction des ARNm de SPP2 dans les pistils, une pollinisation incompatible fut effectuée sur ces derniers. *S. chacoense* est une espèce auto-incompatible de type gamétophytique exprimant des S-RNases dans le tissu transmetteur du style (Matton *et al.*, 1998). Ces S-RNases ont la propriété de reconnaître et de neutraliser le pollen qui partage le même allèle S d'auto-incompatibilité que le pistil de la fleur pollinisée (Matton *et al.*, 1997), empêchant ainsi la fécondation de se produire. Les niveaux d'expression des ARNm de SPP2 présents dans des pistils pollinisés depuis 48 heures pour des pollinisations compatibles et incompatibles sont comparés à la figure 9-C. On constate que les niveaux d'ARNm sont sensiblement les mêmes dans les deux cas de pollinisation. Mentionnons ici que dans le cas de la pollinisation incompatible, les tubes polliniques ne descendent jamais plus bas que les deux tiers du style, la plupart d'entre-eux voyant leur croissance s'arrêter dans la moitié supérieure du style. Aucune fécondation n'est donc possible. Ceci suggère fortement que la pollinisation, qu'elle soit compatible ou incompatible, induit l'expression du gène SPP2. Cependant, l'augmentation de la quantité d'ARNm observée pourrait être de nature développementale (voir section 3.5). Finalement, pour déterminer où le gène SPP2 est exprimé dans les pistils matures de *S. chacoense*, les styles et les ovaires de pistils pollinisés depuis 48 heures furent récoltés séparément. On constate alors que les ARNm de SPP2 ne sont pas exprimés dans les styles des fleurs matures (Figure 9-C), et cela même après une surexposition de la membrane hybridée. C'est donc dire que chez les fleurs matures de *S. chacoense*, l'expression des ARNm de SPP2 n'est présente dans les pistils, qu'au niveau des ovaires.

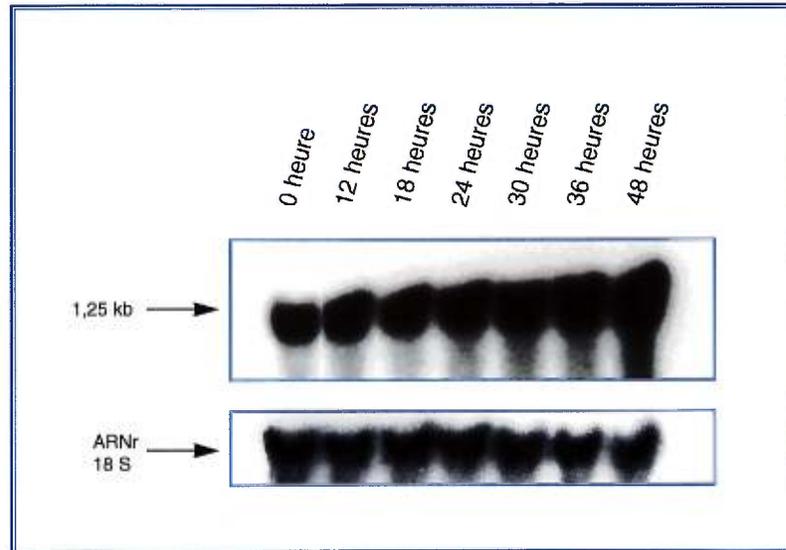
**Figure 9:** **A-** Hybridation de type northern du gène SPP2 sur différents tissus matures de *S. chacoense*.  
**B-** Hybridation de type northern du gène SPP2 sur différents tissus matures de *S. chacoense* (surexposition).  
**C-** Hybridation de type northern du gène SPP2.

**Légende:** **1-** Pistils pollinisés depuis 48 heures, pollinisation compatible; **2-** Pistils pollinisés depuis 48 heures, pollinisation incompatible; **3-** Styles pollinisés depuis 48 heures; **4-** Ovaires provenant de pistils pollinisés depuis 48 heures.

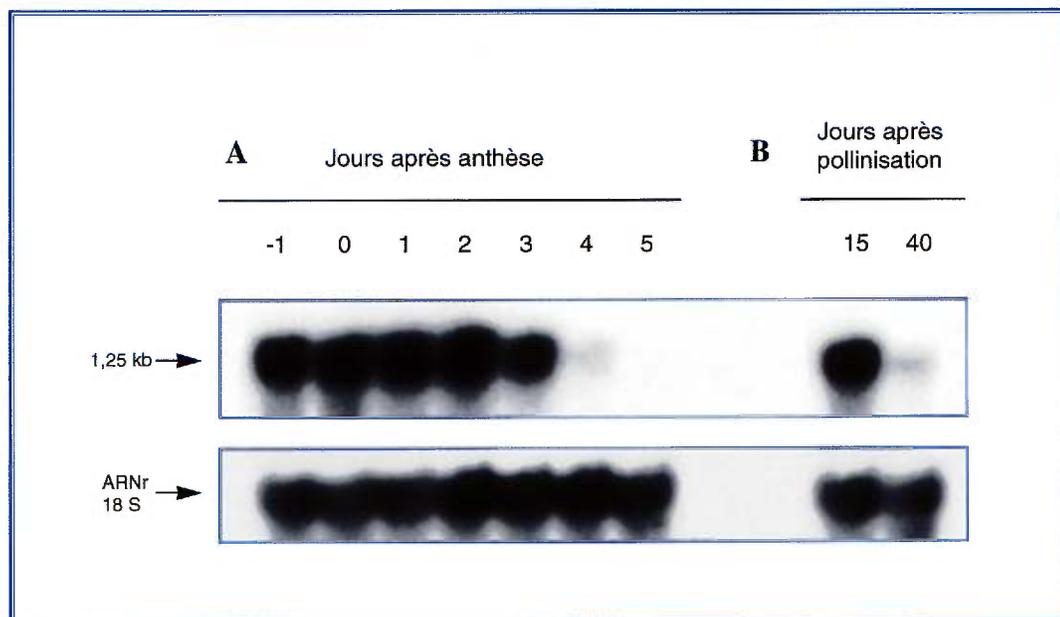


### 3.5 La croissance des tubes polliniques induit une augmentation de l'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire

Dans le but de déterminer si l'augmentation de l'expression de SPP2 détectée dans les pistils pollinisés depuis 48 heures (Figure 9) est véritablement induite par la pollinisation ou n'est simplement que le résultat du développement floral, une analyse de type northern sur des pistils pollinisés pour différentes périodes de temps (pollinisations compatibles, figure 10), a été comparée à une analyse semblable effectuée sur des pistils non pollinisés et récoltés de une journée avant, à cinq jours après l'anthèse (Figure 11). Mentionnons ici que, généralement, les pollinisations sont faites sur une population de fleurs allant du stade de l'anthèse, à 1 journée passé ce stade. On constate à la figure 10 que l'expression des ARNm de SPP2 augmente graduellement à partir du temps 0 (pistils non pollinisés) jusqu'à 48 heures après la pollinisation des pistils, et reste sensiblement stable dans les ovaires pollinisés depuis 96 heures (Figure 9-A et B). On ne note aucune augmentation du genre de celle observée dans les pistils pollinisés, dans les pistils non pollinisés de fleurs allant des stades de une journée avant anthèse à trois jours après celle-ci, délai durant lequel les fleurs sont réceptives à la fécondation (Figure 11). On remarque également que chez les fleurs plus âgées démontrant déjà des signes de sénescence, soit quatre jours après anthèse (les pétales sont fermés) et cinq jours après anthèse (la fleur tombe si elle est touchée), le niveau d'expression des ARNm de SPP2 décline drastiquement, en fait de 20 et 40 fois respectivement (selon des analyses densitométriques), comparé au niveau de base d'expression de SPP2 dans les fleurs à l'anthèse (Figure 11). Notons ici que les fleurs des stades de quatre et cinq jours après anthèse ne sont plus réceptives à la fécondation et tombent même si elles sont pollinisées. L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement que l'augmentation de l'expression de SPP2 dans les pistils est induite par la pollinisation et n'est donc pas seulement le résultat du développement floral normal. Aussi, on constate que la période durant laquelle l'expression de SPP2 est maximale, correspond à la période de réceptivité de la fleur à la fécondation.



**Figure 10:** Hybridation de type northern de l'induction de SPP2 dans les pistils de *S. chacoense* suite à la pollinisation.



**Figure 11:** Hybridation de type northern du gène SPP2, sur des pistils provenant de fleurs de *S. chacoense*.

**Légende:** A- Le stade 0 représente l'anthèse.

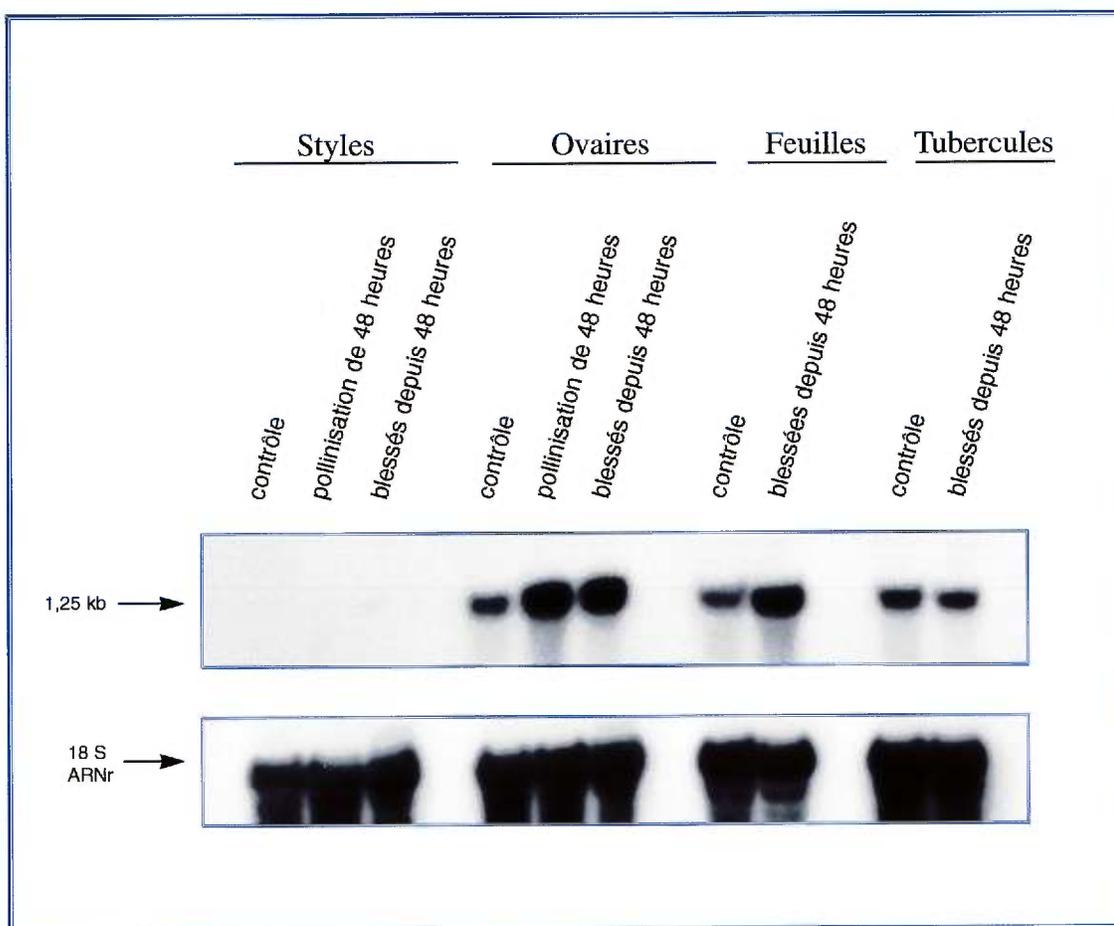
Par contre, cette augmentation de l'expression dans le pistil ne peut être imputable aux ARNm de SPP2 provenant des tubes polliniques, puisque dans une analyse de pollinisation des pistils en fonction du temps où les pistils et les ovaires ont été récoltés séparément (résultats non présentés), aucun signal d'hybridation ne fut détecté dans les styles pollinisés. De plus, aucune trace d'expression d'ARNm de SPP2 n'a été détectée dans des tubes polliniques de *S. chacoense* ayant poussé *in vitro* (Figure 9-A et B). Donc, il semble que la pollinisation induise l'accumulation des messagers de la désoxygénase SPP2, mais à distance dans l'ovaire, et cela même si les tubes polliniques n'atteignent pas la région ovarienne.

La figure 11 nous indique également que le niveau d'expression de SPP2 demeure élevé dans les jeunes fruits, mais décline fortement dans les fruits matures (environ 40 jours).

### 3.6 Induction par la blessure de l'expression des ARNm de SPP2 dans les ovaires

On sait que chez plusieurs espèces, le passage des tubes polliniques dans le style induit chez ce dernier une certaine dégradation. Cette dégradation affecte notamment des tissus et cellules spécialisés tels le tissu transmetteur du style et les cellules sécrétrices de la région stigmatique (Cheung, 1996-a). Dans le but de déterminer si une blessure infligée au style pouvait, de la même façon que la pollinisation, induire une augmentation de l'expression de SPP2 dans la région ovarienne, nous avons effectué une hybridation de type northern sur des pistils dont les styles avaient été légèrement blessés (Figure 12, réalisée par Daniel P. Matton). On constate qu'une blessure au niveau du style induit une augmentation de six fois (selon des analyses densitométriques) de l'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire, et cela avec la même efficacité qu'une pollinisation compatible de 48 heures. Aussi, tout comme dans le cas d'une pollinisation compatible de 48 heures, aucune induction de l'expression de SPP2 n'est notée dans les styles deux jours après la blessure. Donc, la détérioration ou la mort des cellules du style causées par la pollinisation (qu'elle soit compatible ou non) ou une blessure pourraient être le signal initial responsables de l'induction de l'augmentation de l'expression des

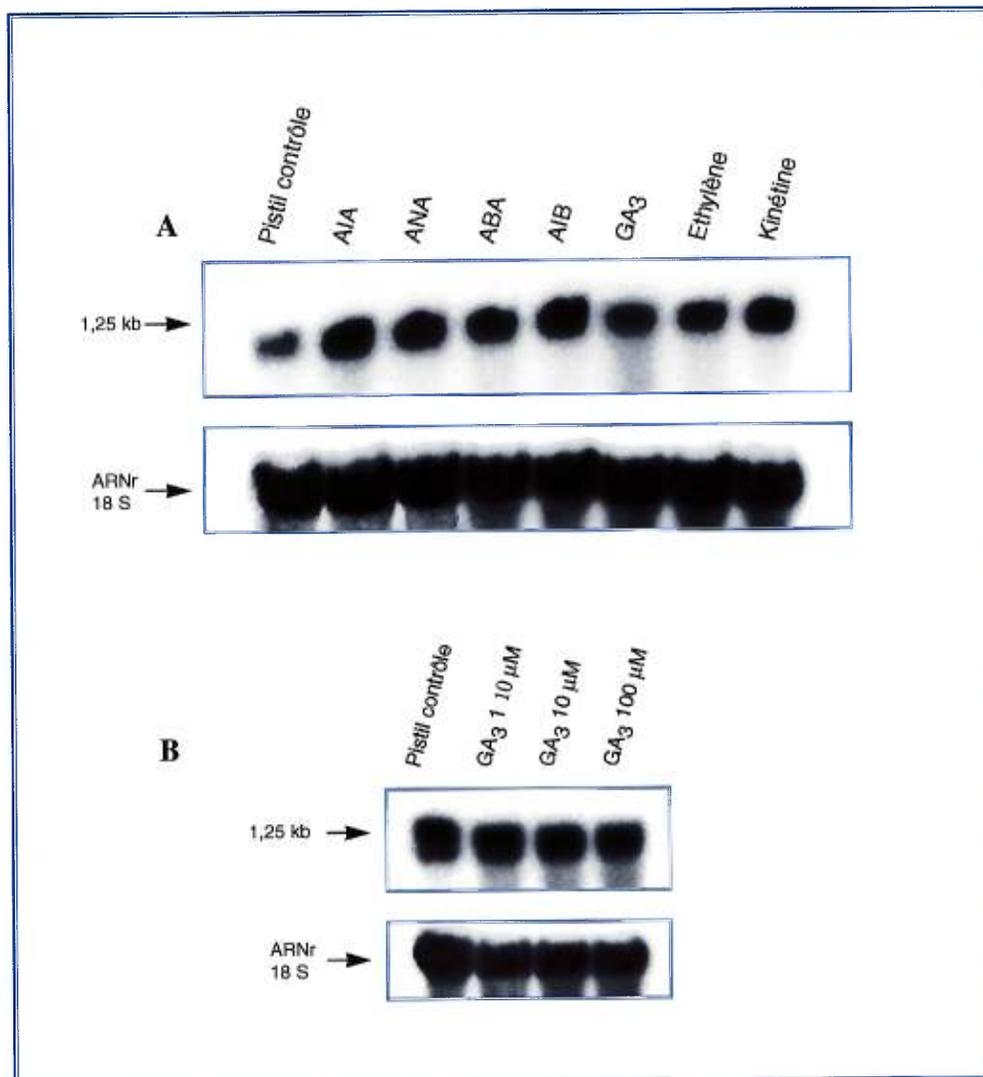
ARNm de SPP2 dans l'ovaire. Puisque la blessure modulait l'expression de SPP2 dans les ovaires, nous avons voulu savoir s'il en était de même au niveau des autres tissus où SPP2 était exprimé. On note, effectivement après blessure, une augmentation dans l'expression des ARNm de SPP2 au niveau des feuilles (Figure 12) si on compare ce niveau d'expression avec celui déjà présent normalement dans la plante. Par contre, une blessure au niveau des tubercules ne semble pas modifier le niveau d'expression normal de SPP2 dans ce tissu.



**Figure 12:** Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des tissus de *S. chacoense* blessés comparés aux mêmes tissus non blessés, et dans le cas des styles et des ovaires, à ces mêmes tissus pollinisés depuis 48 heures.

### 3.7 Effets des phytohormones sur l'expression des ARNm de SPP2

Les phytohormones sont connues pour leurs effets marqués sur le développement floral, la fécondation et le mûrissement des fruits. Pour déterminer si l'expression de SPP2 au niveau des ovaires pouvait être induite par des phytohormones, nous avons vaporisé sur des plants de *S. chacoense*, des solutions de quelques unes des phytohormones les plus couramment utilisées. Les plants vaporisés portaient des fleurs à tous les stades de développement; ils furent aspergés une fois par jour pendant deux jours consécutifs, avant que les fleurs matures ne soient récoltées, et les pistils de ces fleurs utilisés pour effectuer une analyse d'ARN de type northern (Figure 13-A). Toutes les hormones ont eu pour effet une légère induction (environ deux à trois fois) du niveau d'expression des ARNm de SPP2 dans les pistils. Cette augmentation, bien que modeste, ne fut pas observée pour un autre clone induit par la pollinisation, SPP30, qui fut également isolé par hybridation soustractive lors du criblage de la banque d'ADNc PP48 (résultats présentés en annexe, Lantin *et al.*, en soumission). Un clone d'ADNc partiel de feuille de tomate nommé GAD2 ("gibberellins down-regulated") a démontré un patron d'expression qui diminuait en réponse à des traitements à la gibbérelline GA<sub>3</sub> (Jacobsen et Olszewski; 1996). Ce clone partiel est identique à la désoxygénase TTP1 de la tomate qui partage 94% d'identité de séquences avec la désoxygénase SPP2. Donc, puisque les traitements de nos plants de *S. chacoense* ne semblaient pas modifier fortement l'expression des ARNm de SPP2 dans les pistils, nous avons décidé de tester différentes concentrations de la gibbérelline GA<sub>3</sub> sur nos plants. La figure 13-B montre que contrairement aux feuilles de tomate (Jacobsen et Olszewski; 1996) sur lesquelles la vaporisation d'une solution de GA à 50 µM supprimait complètement l'accumulation des ARNm de GAD2 de 12 à 24 heures après les traitements, les traitements hormonaux réalisés sur les plants de *S. chacoense* pour des concentrations de 1 µM, 10µM et 100 µM pendant 48 heures ne semblent pas avoir eu d'effets significatifs sur les niveaux d'expression des ARNm de SPP2 dans les pistils (Figure 13-B).



**Figure 13:** A- Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des pistils de *S. chacoense* traités avec différentes phytohormones.

**Légende:** AIA: Acide indole acétique (auxine); ANA: Acide naphthalénique (auxine); ABA: Acide abscissique; AIB: Acide indole butyrique (auxine); GA<sub>3</sub>: Acide gibbérellique (gibbérelline); Éthylène; Kinéline (cytokinine).

**B-** Hybridation de type northern du gène SPP2 sur des pistils de *S. chacoense* traités avec différentes concentration de gibbérelline GA<sub>3</sub>.

Or, nous avons mentionné précédemment que la gibbérelline GA<sub>3</sub> induisait l'expression de SPP2 d'un facteur de deux à trois fois, par rapport à son niveau d'expression de base dans les pistils (Figure 13-A). Des résultats obtenus ultérieurement ont démontré que SPP2 pouvait être induit par l'acide jasmonique et le jasmonate de méthyle. Le jasmonate de méthyle est un composé volatil dégagé par les plantes en réponse aux blessures, souvent provoquées par des insectes (Reinbothe *et al.*, 1994). Or, nous avons découvert que la blessure du style provoquait l'induction de SPP2 (Figure 12) via les jasmonates (Lantin *et al.*, en soumission). Il est donc possible que lors du rabattage de certains plants (impliquant des blessures) ou que le port de parfum contenant ces composés, aient pu faire varier le niveau de base d'expression de SPP2 dans les plants de *S. chacoense*, faussant ainsi les résultats.

### 3.8 Expression développementale dans les tissus floraux: l'expression de SPP2 régresse de l'extrémité du style à la région ovarienne durant le développement du pistil

Dans le but de localiser le patron d'expression de la désoxygénase SPP2 dans les tissus floraux, des hybridations *in situ* sur des coupes de bourgeons floraux ou de pistils, furent réalisées pour différents stades de développement. La figure 14-A montre la mesure et les stades de bourgeons floraux qui furent utilisés pour ces hybridations. Les bourgeons floraux du stade 1 ont été fixés directement, sans dissection préalable, alors que pour les stades suivants les pistils furent isolés des bourgeons avant d'être fixés, enrobés dans la paraffine et finalement sectionnés en coupes de 10 µm. On remarque chez les très jeunes bourgeons floraux où les carpelles ne sont pas encore fusionnés, que l'expression des ARNm de SPP2 est détectable dans les carpelles en fusion, les pétales, et l'épiderme des jeunes anthères (Figure 14-b). Une fois les carpelles fusionnés (Figure 14-c), l'expression est toujours détectable dans le pistil, les pétales en développement et l'épiderme des anthères. Par contre, aucun signal n'est identifiable dans le stigmate en formation. Chez les très jeunes anthères (Figure 14-d et e), les ARNm de SPP2 sont fortement exprimés dans les tissus du connectif ainsi que dans l'épiderme. Aucun signal n'est observable dans les faisceaux vasculaires desservant les anthères. On détecte

également clairement que les ARNm de SPP2 sont exprimés au niveau des cellules épidermiques de l'ovaire en développement et des cellules parenchymateuses entourant les loges carpellaires (Figure 14-e). Aux stades un peu plus avancés, un signal faible est observé dans les tissus des anthères, alors qu'un signal fort est présent dans les cellules épidermiques et parenchymateuses du style et de l'ovaire (Figure 14-g, h et j). Ici, comme pour les plus jeunes stades, aucun signal n'est détecté dans le stigmate et aucune expression d'ARNm n'est détectable dans le tissu transmetteur du style. Au 4<sup>ème</sup> stade de développement des fleurs (qui correspond à deux jours avant l'anthèse), on remarque un début de régression du signal dans les cellules épidermiques et parenchymateuses du cortex du style, partant de l'extrémité du style vers la région ovarienne (Figure 14-l). À ce moment, l'expression de SPP2 ne couvre plus que les deux tiers inférieurs du style et les cellules de la paroi ovarienne. Au stade 5, une journée avant l'anthèse, on constate que la régression s'est poursuivie jusqu'à n'être présente que dans le tiers inférieur du style, et l'ovaire (Figure 14-n). Finalement, au jour de l'anthèse (stade 6), plus aucun signal n'est détectable dans le style (Figure 12-p). À ce stade, l'expression de SPP2 ne se situe plus qu'au niveau des cellules parenchymateuses et épidermiques du cortex de l'ovaire, et très faiblement dans l'épiderme des ovules et les cellules entourant le placenta. Un agrandissement des ovules à ce stade démontre une expression des ARNm de SPP2 localisée dans la région du mycropyle des ovules, endroit par lequel, lors de la fécondation, les tubes polliniques entrent normalement pour y relâcher les noyaux spermatiques qui effectueront la double fécondation (Figure 14-r).



**Figure 14:** Localisation des ARNm du gène SPP2 par hybridation *in situ*.

**Légende:** Voir page suivante.

Le trait en bas à droite de chaque figure correspond à 100 $\mu\text{m}$ .

**Figure 14: a-** Mesures et stades de développement des bourgeons floraux et des fleurs de *S. chacoense* sur lesquels ont été réalisées les hybridations *in situ*.

Les stades 4 et 5 représentent les fleurs de deux jours et un jour avant l'anthèse, alors que les fleurs du stade 6 sont à l'anthèse.

**b à r-** Hybridation *in situ* sur des bourgeons floraux et des pistils de fleurs de *S. chacoense* des six stades de développement.

**Légende:** (b) Coupe longitudinale d'un très jeune bourgeon floral juste avant la fusion des carpelles (stade 1). Sonde anti-sens.

(c) Coupe longitudinale d'un très jeune bourgeon floral juste après la fusion des carpelles (stade 1). Sonde anti-sens.

(d) Coupe transversale d'un bourgeon floral (stade 1). Sonde anti-sens.

(e) Coupe transversale d'un bourgeon floral (stade 1). Sonde anti-sens.

(f) Coupe longitudinale d'un bourgeon floral (stade 1). Sonde sens.

(g) Coupe longitudinale d'un bourgeon floral (stade 2). Sonde anti-sens.

(h) Coupe longitudinale d'un bourgeon floral (stade 2). Sonde anti-sens.

(i) Coupe longitudinale d'un bourgeon floral (stade 2). Sonde sens.

(j) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 3). Sonde anti-sens.

(k) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 3). Sonde sens.

(l) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 4). Sonde anti-sens. La pointe de flèche indique le début de la régression de l'expression des ARNm de SPP2 dans le pistil.

(m) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 4). Sonde sens.

(n) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 5). Sonde anti-sens. La pointe de flèche indique que la régression de l'expression des ARNm de SPP2 se poursuit dans le style.

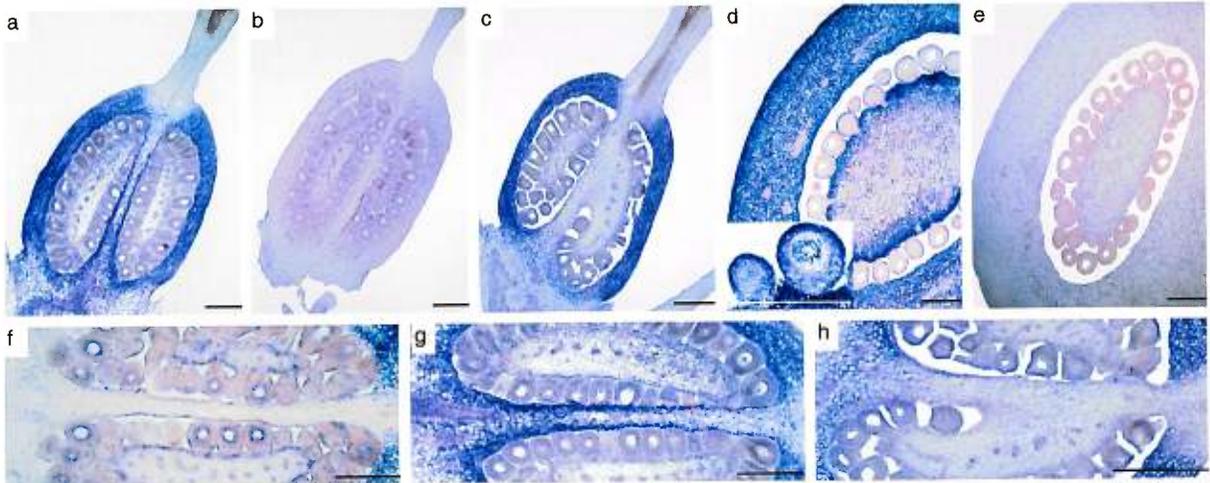
(o) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 5). Sonde sens.

(p) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 6). Sonde anti-sens. La pointe de flèche indique la limite supérieure qu'atteint l'expression des ARNm de SPP2 dans le pistil mature de *S. chacoense*.

- (q) Coupe longitudinale d'un pistil (stade 6). Sonde sens.
- (r) Agrandissement des ovules situés dans les pistils du stade 6 démontrant l'expression des ARNm de SPP2 au niveau de la région micropylaire. Sonde anti-sens.

### 3.9 La fécondation induit une accumulation localisée des ARNm de SPP2 dans l'ovaire

Tel que mentionné précédemment dans l'introduction, les tubes polliniques rejoignent les ovules en 36 heures chez la plupart des espèces de plantes du genre *Solanum* (Clarke, 1940; Williams, 1955 et figure 2), et la double fécondation survient entre 36 et 48 heures après la pollinisation. Dans les coupes de pistils pollinisés depuis 48 heures (figure 15 a et g), on remarque que l'expression des ARNm de SPP2 s'étend à une nouvelle région, soit celle de la colonne centrale située au centre des loges carpellaires, plus précisément au niveau des cellules parenchymateuses composant cette colonne. Ce patron d'induction n'est pas observé dans les coupes de pistils matures non pollinisés (Figure 14-p et 15-f). De façon à déterminer si cette nouvelle induction de l'expression de SPP2 est le résultat de la pollinisation ou de la fécondation, des hybridations *in situ* furent effectuées sur des coupes de pistils pollinisés depuis 48 heures, mais pollinisés de façon incompatible (Figure 15-c et h). Le patron d'expression au niveau de la colonne interlocaire présent dans les pistils pollinisés de façon compatible n'est pas détectable dans le cas d'une pollinisation incompatible. Cela confirme donc que ce nouveau patron d'expression des ARNm de SPP2 est en fait induit par la fécondation et non par la pollinisation. Finalement, un fort signal d'expression est détecté dans les coupes d'ovaires provenant de pistils pollinisés depuis 96 heures, plus précisément dans l'ensemble des cellules du péricarpe et des couches cellulaires du placenta adjacentes aux ovules (Figure 15-d). L'expression dans ces coupes d'ovaires pollinisés depuis 96 heures, peut également être détectée dans les couches tégumentaires des ovules (Figure 15-d, encadré).



**Figure 15:** Hybridation *in situ* sur des pistils de *S. chacoense* après pollinisation compatible, incompatible et suite à la pollinisation (stade 6).

- Légende:** (a): Coupe longitudinale d'un pistil pollinisé depuis 48 heures. Sonde anti-sens.  
 (b): Coupe longitudinale d'un pistil pollinisé depuis 48 heures. Sonde sens.  
 (c): Coupe longitudinale d'un pistil pollinisé depuis 48 heures. Pollinisation incompatible. Sonde anti-sens.  
 (d): Coupe longitudinale d'un ovaire provenant d'un pistil pollinisé depuis 96 heures. Sonde anti-sens. L'encart montre un agrandissement d'ovules provenant de cet ovaire.  
 (e): Coupe longitudinale d'un ovaire provenant d'un pistil pollinisé depuis 96 heures. Sonde sens.  
 (f): Agrandissement de la colonne interloculaire du pistil non pollinisé présenté à la figure 14-p.  
 (g): Agrandissement de la colonne interloculaire du pistil pollinisé depuis 48 heures (pollinisation compatible) présenté à la figure 15-a.  
 (h): Agrandissement de la colonne interloculaire du pistil pollinisé depuis 48 heures (pollinisation incompatible) présenté à la figure 15-c.

Le trait en bas à droite de chaque figure représente 100  $\mu\text{m}$ .

## 4. DISCUSSION

C'est par le criblage de banques d'ADNc construites à partir de pistils pollinisés, que nous avons isolé des gènes dont l'expression est induite par les événements de pollinisation et/ou de fécondation. Parmi ces clones, nous avons isolé le gène de l'ACC oxydase en employant la méthode de criblage différentiel. La méthode d'hybridation soustractive, quant à elle, nous a permis d'isoler une désoxygénase (nommée SPP2), partageant de fortes identités de séquences avec les désoxygénases de la sous-famille des 2-oxoacides dépendantes. Le criblage différentiel s'est avéré, dans notre cas, une alternative à la méthode d'hybridation soustractive. Cette dernière s'est révélée à l'usage être une méthode inefficace et biaisée, car la plupart des clones isolés n'étaient pas induits par la pollinisation ou la fécondation. Notre alternative du moment, le criblage différentiel, reste malgré tout une méthode peu sensible et avec laquelle il est difficile de bien discerner les clones induits. Des méthodes alternatives plus efficaces à employer seraient, aujourd'hui, la soustraction virtuelle ou la représentation différentielle des messagers, ou "differential display".

### 4.1 l'ACC oxydase

Nous ne nous sommes pas attardé à pousser plus avant la caractérisation de notre clone d'ACC oxydase, étant donné qu'une caractérisation complète de cet enzyme a déjà été effectuée, et cela chez de nombreuses espèces végétales. On sait que l'ACC oxydase est, dans la voie de biosynthèse de l'éthylène, l'enzyme responsable de l'oxydation de l'ACC, le précurseur direct de l'éthylène. Or, nous avons déjà présenté dans l'introduction de ce mémoire les nombreuses implications connues de l'éthylène dans les phénomènes de mûrissement des fruits et de sénescence du périanthe en réponse aux événements de pollinisation et de fécondation. Ayant donc déjà traité de ce sujet en détail dans l'introduction, nous ne nous y attarderons pas dans cette section. Par contre, comme nous l'avons mentionné dans la section résultats, le gène de l'ACC oxydase

partage 25% d'identité de séquences avec notre désoxygénase SPP2. C'est donc sur la caractérisation de cette désoxygénase que sera orientée la présente discussion.

## 4.2 La désoxygénase SPP2

### 4.2.1 Les différences entre les patrons d'expression de la désoxygénase SPP2, et ses plus proches homologues

Le gène SPP2 a été isolé par la méthode de l'hybridation soustractive de deux banques d'ADNc de pistils pollinisés de *S. chacoense* nommées PP48 et Ov 96. Le gène SPP2, une désoxygénase, est principalement exprimé au niveau des pistils, et la pollinisation, la blessure du style et la fécondation y augmentent son expression d'un facteur de 6 fois, et à distance dans l'ovaire (Figure 9-A et B). Dans un article publié par Milligan et Gasser (1995), on rapporte les caractérisations préliminaires de plusieurs clones exprimés préférentiellement dans les pistils, dont un clone nommé TPP1 (tomato pistil-predominant), presque identique à notre désoxygénase et s'exprimant principalement dans les tissus du pistil de la tomate, *Solanum lycopersicon*. Des hybridations d'ARN de type northern démontrent que TPP1 est fortement exprimé dans les anthères immatures et n'est plus présent dans les anthères matures, tout comme c'est le cas pour notre désoxygénase SPP2 (Figure 9-A). Le gène TPP1 est exprimé dans les pistils, et son niveau d'expression varie peu entre celui des pistils provenant de jeunes bourgeons floraux et celui des pistils provenant de fleurs matures. Aussi, aucune expression d'ARNm de TPP1 n'est détecté dans les racines et les fruits de la tomate, alors que SPP2 est très faiblement présent dans les racines adultes de *S. chacoense* (Figure 9-B), beaucoup plus fortement dans le péricarpe des jeunes fruits en développement (4 jours après pollinisation, figures 9-A et 15-d) ainsi que dans les fruits plus matures (15 et 40 jours après pollinisation, figure 11-B). De plus, TPP1 est exprimé aussi fortement dans les tiges que dans les pistils, alors que chez *S. chacoense*, SPP2 est faiblement détectable dans les tiges (Figure 9-A), et cela même sur l'autoradiogramme surexposé (Figure 9-B). Aussi, alors que le niveau d'expression de TPP1 est équivalent dans les feuilles et les tiges, l'expression de SPP2 chez *S. chacoense*, est sept fois moins

élevée dans les tiges que dans les feuilles. Donc, en dépit de leur très forte identité de séquences (94%) qui suggère que SPP2 soit l'homologue de TPP1 chez la pomme de terre sauvage, les profils généraux d'expression des deux gènes restent malgré tout plutôt différents. Ces différences observées au niveau des patrons d'expression pourraient provenir de ce que *Solanum lycopersicon* est une espèce cultivée résultant de nombreux croisements, alors que *Solanum chacoense* est une espèce sauvage produisant des fruits toxiques et des tubercules non comestibles.

Le gène TPP1 est également identique au gène GAD2 isolé d'une banque de feuilles de tomate provenant de plantes mutantes déficientes en gibbérelline GA<sub>3</sub>. Le traitement des parties aériennes de ces plants de tomate déficients en GA<sub>3</sub>, avec l'hormone GA<sub>3</sub>, cause une rapide diminution de la traduction des ARNm de GAD2 (Jacobsen *et al.*, 1994). En fait, l'expression de GAD2 devient pratiquement indétectable dans les feuilles entre 12 et 24 heures après le traitement de vaporisation aux GA<sub>3</sub>. L'expression de GAD2 est également réprimée en réponse à des traitements à l'éthylène (ethephon) et aux auxines (Jacobsen et Olszewski, 1996). Or, des traitements similaires effectués sur des fleurs de *S. chacoense* (Figure 13) n'ont pas donné de résultats comparables, au niveau des pistils, à ceux obtenus pour GAD2 chez la tomate. Toutefois, la régulation génique suite aux traitements à la gibbérelline GA<sub>3</sub> pourrait différer selon les tissus. Donc, les contrôles de l'expression de GAD2 *versus* ceux de SPP2 sont possiblement différents; l'expression de GAD2 pouvant être sous contrôle hormonal alors que le contrôle de SPP2 dans les pistils ne l'est pas.

#### 4.2.2 Contrôle développemental de l'expression de la désoxygénase SPP2 dans la fleur

Une hybridation d'ARN de type northern effectuée sur des fleurs non pollinisées allant de un jour avant, à cinq jours après anthèse (Figure 11-A), démontre que l'accumulation des ARNm de SPP2 est élevée et reste stable durant la période où les fleurs sont réceptives à la pollinisation et fertiles pour la fécondation, soit du jour précédant l'anthèse (si les fleurs sont ouvertes manuellement), à trois jours passés celle-ci. Par contre, pour les fleurs âgées de quatre jours après anthèse, le niveau d'expression des ARNm baisse rapidement jusqu'à devenir pratiquement indétectable dans les fleurs âgées de cinq jours passés l'anthèse. Les fleurs âgées de cinq jours passés l'anthèse ne

sont plus réceptives à la pollinisation et tendent à tomber si on les touche. Quant aux fleurs âgées de quatre jours passés l'anthèse, s'il est encore possible de les polliniser, elles tomberont de toute façon bien avant que la fécondation n'ait lieu. Donc, puisque l'expression de SPP2 semble pratiquement disparaître dans les fleurs qui ne sont plus fertiles, peut-on dire que la sénescence florale pourrait y jouer un rôle régulateur? Probablement, mais ce contrôle de l'expression de SPP2 ne peut être lié à l'éthylène, bien que l'on connaisse les implications majeures de cette hormone dans le processus de sénescence des fleurs, en réponse à la pollinisation et à la fécondation de ces dernières. En effet, des traitements des plantes et des fleurs de *S. chacoense* à l'éthylène (appliqué en vaporisant les plantes avec des solutions d'ethephon), n'ont pas induit de diminution de l'expression de SPP2 dans les pistils (Figure 13-A). Donc, la baisse du niveau d'expression des ARNm de SPP2 dans les fleurs sénescents non pollinisées de *S. chacoense*, semble être indépendante de l'action de l'éthylène.

La détection *in situ* des ARNm de SPP2 durant le développement floral a révélé un patron d'expression pour le moins inhabituel (Figure 14). Chez les jeunes fleurs des stades un à trois, les ARNm de SPP2 sont clairement exprimés dans le style et les cellules corticales de l'ovaire, alors qu'ils sont absents du stigmate et des cellules du tissu transmetteur du style (Figure 14-b, c, g, h et j). À partir du stade quatre, on remarque que l'expression des ARNm de SPP2 dans le style commence à régresser, et cela de l'extrémité stigmatique du style vers la région ovarienne. Donc, deux jours avant l'anthèse, l'expression des ARNm de SPP2 a disparu du tiers supérieur du style (Figure 14-n) et n'est plus présent qu'au tiers inférieur de ce dernier pour les fleurs du stade 5, soit une journée avant l'anthèse (Figure 14-n). A l'anthèse (stade 6 des fleurs, figure 14-a), les ARNm de SPP2 sont seulement exprimés dans le cortex de l'ovaire (épiderme et parenchyme) avec une démarcation très nette en forme de "V" au niveau de la zone d'abscission du style, située à la base de ce dernier (Figure 14-p). En effet, quand le pistil de la fleur est pollinisé, il tombe environ trois jours après la pollinisation, et la limite supérieure d'expression atteinte par les ARNm de SPP2 dans le pistil de fleurs à maturité, correspond justement à cette zone d'abscission. Or, quand SPP2 est exprimé au niveau de cette zone d'abscission, c'est à dire que la régression développementale de son patron d'expression dans le style est terminée, les fleurs sont à l'anthèse, mais non

encore pollinisées. En fait, la zone d'abscission n'est, à ce moment, qu'un *continuum* cellulaire dans les tissus faisant la jonction entre la base du style et la partie supérieure de l'ovaire. Ces résultats laissent supposer que le gène SPP2 pourrait, dans ce cas, servir de marqueur cellulaire, en ce qu'il pourrait délimiter cette zone d'abscission future du style pollinisé, et cela, à l'intérieur même de ce *continuum* cellulaire et tissulaire. Notons ici qu'en absence de pollinisation, c'est la fleur entière qui se détache du pédicelle.

Ce patron d'expression des ARNm de SPP2 qui régresse de l'extrémité stigmatique du style vers la région ovarienne en fonction du développement floral, peut laisser supposer l'instauration d'un gradient de métabolites secondaires qui pourraient diffuser du cortex vers les cellules du tissu transmetteur du style, et qui seraient impliqués dans la croissance et le guidage des tubes polliniques à travers le style et vers les ovules. En plus de ce patron d'expression qui régresse, on détecte dans les ovaires des fleurs matures, la présence des ARNm de SPP2 dans les cellules du placenta situées à proximité des ovules, ainsi que dans la région micropylaire de ces derniers (Figure 14-r). L'accumulation d'un métabolite secondaire spécifique au micropyle des ovules, pourrait indiquer pour ce métabolite, un rôle d'attraction ayant pour but de guider l'extrémité des tubes polliniques au micropyle des ovules. Puisque l'expression de SPP2 au micropyle des ovules est déjà présente avant que la fécondation n'ait lieu, il sera intéressant d'examiner si le guidage des tubes polliniques sera affecté par l'absence de cette expression au micropyle, dans des pistils provenant de plantes transgéniques dont le gène SPP2 aura été réprimé.

#### 4.2.3 La pollinisation, une blessure ou la fécondation induisent l'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire

En réponse à la pollinisation, l'expression des ARNm de SPP2 augmente graduellement dans l'ovaire en fonction du temps (Figure 10). Puisque chez *S. chacoense* les tubes polliniques ne rejoignent la partie supérieure de l'ovaire que 36 heures après la pollinisation, et parce qu'aucune expression d'ARNm de SPP2 n'est détectable dans le style, le pollen ou les tubes polliniques (Figure 9-A et B), on peut penser que l'augmentation de SPP2 localisée au niveau de l'ovaire, ne peut être qu'une

réponse induite par la croissance des tubes polliniques dans le style. La croissance des tubes polliniques dans le style est connue comme une des causes majeures de dégradation cellulaire, et ultimement de la mort des cellules du tissu transmetteur (Raghavan, 1997). Cheung (1996-a) a observé à l'aide du microscope électronique à transmission (MET), qu'une vacuolisation et une détérioration progressives des cellules du tissu transmetteur du style sont induits par la croissance des tubes polliniques dans le style du tabac. La croissance des tubes polliniques dans le style de fleurs de *S. chacoense* induit également cette désorganisation massive des cellules du tissu transmetteur, tel qu'observé sur des coupes transversales de styles pollinisés, au microscope électronique à transmission et au microscope photonique (résultats non présentés). Cette détérioration cellulaire induite par la pollinisation a précédemment été proposée comme mécanisme contribuant à la croissance des tubes polliniques dans le style. Elle permet, en effet, aux tubes polliniques de s'approvisionner en nutriments, calcium et autres molécules nécessaires à leur croissance, composés qui sont normalement présents dans la matrice extracellulaire du style, mais qui, suite à la rupture des cellules du tissu transmetteur, deviennent encore plus disponibles. De plus, le relâchement de certains de ces composés en réponse à la pollinisation, jouerait aussi un important rôle de guidage des tubes polliniques à travers le style (Cheung, 1996-a). Donc, si la dégradation des cellules du tissu transmetteur du style causée par la croissance des tubes polliniques est le signal responsable d'induire (à distance) dans l'ovaire une augmentation de l'expression des ARNm de SPP2, une blessure infligée au style d'une fleur non pollinisée devrait avoir le même effet d'induction sur SPP2 que celui découlant de la pollinisation. En effet, une blessure infligée au style d'une fleur non pollinisée produit le même effet d'amplification (augmentation de six fois) du patron d'expression de SPP2 au niveau de l'ovaire qu'une pollinisation de 48 heures (Figure 12). Et, tout comme dans le cas d'une pollinisation de 48 heures, SPP2 est induit par la blessure, dans l'ovaire et à distance, car aucun signal n'est détecté dans le style ayant été blessé (Figure 12). Les divers traitements hormonaux que nous avons fait subir à nos plants de *S. chacoense* n'ont pas eu cet effet d'induction sur l'expression des ARNm de SPP2 au niveau des pistils, comme l'ont eu la pollinisation et la blessure (Figure 13), suggérant du même coup que le signal (relayant l'effet de la pollinisation ou de la blessure) responsable de

l'augmentation de l'accumulation des ARNm de SPP2 au niveau de l'ovaire, n'est probablement pas une des phytohormones classique. Par contre, on ne peut écarter la possibilité qu'une application exogène de ces phytohormones sur nos plants n'engendre des résultats différents de ce qu'elles pourraient induire via une diffusion interne dans les tissus. Ces résultats nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle la mortalité cellulaire (causée par la croissance des tubes polliniques) pourrait induire dans le tissu transmetteur du style une cascade de signalisation, et/ou la production *de novo*, ou le relargage d'un métabolite, qui entraîneraient à distance l'accumulation des ARNm du gène SPP2 dans l'ovaire. Des résultats récents démontrent que les hormones du stress telles que l'acide jasmonique et le méthyl jasmonate seraient les médiateurs de cette augmentation à distance de l'expression de SPP2 dans les ovaires (Lantin *et al.*, en soumission).

Dans le but de vérifier si une part de l'augmentation dans l'expression de SPP2 que nous observons au niveau de l'ovaire pouvait être due à la fécondation, nous avons mis à profit le système d'auto-incompatibilité gamétophytique de *S. chacoense*. De l'hybridation *in situ* fut effectuée sur des coupes de pistils pollinisés de façon compatible et incompatible (Figure 15-a et c), et les résultats furent comparés à ceux obtenus pour des pistils non pollinisés (Figure 14-p et 15-g). On remarque sur les pistils pollinisés de façon compatible depuis 48 heures (Figure 15-a et g), qu'une nouvelle région d'expression des ARNm de SPP2 apparaît au niveau de la colonne placentaire située au centre des locules, *versus* les pistils non-pollinisés (Figure 14-p et 15-g) et les pistils pollinisés de façon incompatible depuis 48 heures (Figure 15-c et h), où aucune expression de SPP2 n'est détectée dans cette région interloculaire. C'est dire, qu'en plus de la pollinisation qui induit à distance l'expression de SPP2 dans les cellules corticales de la paroi ovarienne, la fécondation est responsable par la suite de la nouvelle induction très localisée des ARNm de SPP2 dans les cellules de la colonne placentaire interloculaire. Mais puisqu'une pollinisation incompatible engendre un niveau d'expression des ARNm de SPP2 similaire à celui obtenu pour une pollinisation compatible (Figure 9-C, 1 et 2), on peut aussi en déduire que ce nouveau lieu d'expression des ARNm de SPP2 induit par la fécondation, n'est pas suffisant pour élever de façon significative celui déjà fortement présent dans l'ovaire, et induit par la

pollinisation ou la blessure du style. Finalement, lors du développement et de la maturation du fruit, l'accumulation des ARNm de SPP2 semble être contrôlée de façon développementale (Figure 10) et peut, en plus d'être observable dans tout le péricarpe du fruit (Figure 15-d), être détectée dans les téguments internes des ovules en développement (Figure 15-d, encart).

#### 4.2.4 La désoxygénase SPP2 contient un site alternatif d'initiation de la transcription

Bien que l'hybridation de type Southern ait démontré que le gène SPP2 n'était présent qu'en un seul exemplaire dans le génome de *S. chacoense*, nous avons eu la surprise de constater sur certaines des hybridations de type northern effectuées, la présence d'une bande de taille légèrement supérieure hybridant aussi avec la sonde SPP (voir pistils contrôles, figure 9-A). En fait, la présence du plus long des deux ARNm ne semble pas pouvoir être expliquée par l'épissage alternatif, car des amorces construites à partir de la séquence d'ADNc de SPP2, n'amplifient dans nos banques d'ADNc que la séquence attendue de notre désoxygénase, soit 1250 nucléotides. De plus, une amorce interne utilisée conjointement avec une amorce en 3' provenant du vecteur de clonage, n'amplifie qu'un seul fragment dans nos banques d'ADNc, excluant ainsi la possibilité d'un site alternatif de poly A. Cependant, lorsqu'une amorce interne de SPP2 est utilisée conjointement avec une amorce en 5' dérivée du vecteur de clonage, deux fragments sont amplifiés de la banque d'ADNc PP48; le premier de la taille attendue pour notre désoxygénase, et le second, ayant environ 80 nucléotides de plus que le premier (données non présentées; réalisé par Daniel P. Matton). Il est fort probable que ce plus long fragment soit la bande supérieure du doublet que nous observons dans quelques unes de nos hybridations de type northern. Parce que SPP2 donne toujours un très fort signal lors de nos hybridations, et qu'en plus ces deux bandes sont en proximité relative dépendamment du temps de migration, il est possible que nous ne puissions pas toujours détecter si ce doublet est présent ou non. Nous avons cru possible que ce doublet puisse provenir de la sélection d'un site de départ alternatif situé en 5' de celui que nous avons déjà séquencé, ou alors qu'un intron non épissé soit présent dans la région en 5' UTR. Le séquençage du plus long des deux fragments allait confirmer notre première hypothèse.

En effet, la séquence du plus grand fragment révèle en fait qu'il comporte 68 nucléotides de plus que le fragment original de SPP2, et que cette extension contient un codon ATG en phase et en amont de celui déjà séquencé (Figure 16). Aucun codon stop ne fut trouvé dans cette extension. Nous ne savons pas si cette extension en 5' peut être traduite car elle est absente des clones d'ADNc des désoxygénases de tomate et d'aubergine. De plus, la présence de ce second codon d'initiation en amont n'est pas du tout optimale dans le contexte de traduction (Fütterer et Hohn, 1998). La sélection d'un site de départ alternatif pourrait être expliquée par la présence de plus d'une boîte TATA. En effet, un tel élément consensus responsable de générer le plus petit fragment de SPP2, est présent dans la région 5' UTR du plus long des deux ARNm de SPP2 (données non présentées). Cette seconde boîte TATA pourrait être utilisée de façon alternative lors de la sélection du site d'initiation dans la transcription du court messenger de SPP2.

```

ATGCAATTTTCTTCCCTATAAATGGCCCTCCATACCTCAAATGAGATATCGAGACAATTT 60
                        M A L H T S N E I S R Q F
AAAGTAATATTAACATTTAGAAGATTTCTTTCTTTTCGCAGATTCATTGACAATGCGGGAG 120
K V I L T F R R F L S F A D S L T M A E
CTTCTCTCAAACACTGGTCAAGCACATTAGAAGCAGTTCTCCAAGTCATTGCATCCCAGTG 180
L L S N W S S T L E A V P P S H C I P V

```

**Figure 16:** Séquence de l'extension 5' correspondant au messenger de taille supérieure pour le gène SPP2.

**Légende:** En souligné, la séquence de la présumée boîte TATA pouvant possiblement être utilisée pour la synthèse du plus court messenger du gène SPP2.

4.2.5 Les désoxygénases sont impliquées dans de multiples voies métaboliques et dérivent probablement toutes d'un ancêtre commun

Les désoxygénases sont impliquées dans les voies de biosynthèses de plusieurs composés hormonaux tels les gibbérellines, l'éthylène, l'acide abscissique, aussi bien que dans celles de plusieurs métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les flavonoïdes (Prescott, 1993; Prescott et John, 1996). La fonction d'une désoxygénase est d'incorporer à un substrat les deux atomes d'oxygène de l'O<sub>2</sub>. On connaît à ce jour deux grandes classes de désoxygénases chez les plantes: les lipoxygénases et les 2-oxoacide dépendantes (2-ODD). Toutes les 2-ODD sont des enzymes solubles qui nécessitent pour fonctionner, la présence de fer et d'ascorbate comme co-facteurs. Certaines ont un besoin absolu de l'ascorbate, alors que d'autres peuvent fonctionner sans, mais toutes sans exception ont besoin du fer pour être actives. Aussi, dans la plupart des cas, les 2-ODD requièrent le 2-oxoglutarate comme co-substrat. De là provient leur seconde appellation, les "2-oxoglutarate dépendantes".

Les identités de séquences obtenues pour SPP2 laissent fortement supposer qu'il appartient à la classe des désoxygénases 2-ODD. En effet, SPP2 partage 44% d'identité avec l'hyoscyamine 6-β-hydroxylase (H6H) isolée chez *Hyoscyamus niger*, qui est la seule désoxygénase apparentée à SPP2 chez les *Solanaceae* dont nous connaissons les substrats et les co-facteurs. H6H est effectivement une 2-ODD qui requiert le 2-oxoglutarate comme co-substrat et le fer et l'ascorbate comme co-facteurs (Matsuda *et al.*, 1991). En fait, H6H est encore aujourd'hui, la référence en terme de 2-ODD, et c'est sur elle que repose la classification de plusieurs désoxygénases. Donc, puisque SPP2 partage une identité de séquences significative avec H6H, et qu'en plus comme toutes les 2-ODD elle possède les trois acides aminés (histidine 219, acide aspartique 221, histidine 272, astérisques figures 6 et 7) que l'on soupçonne fortement d'être impliqués dans le site de liaison de l'enzyme au fer (Britsch *et al.* 1993), nous pensons que SPP2 doit elle aussi être une 2-ODD. Les 2-ODD en général catalysent plusieurs types de réactions chimiques, incluant l'oxydation, l'hydroxylation, l'époxydation et la désaturation de divers composés végétaux. Si on compare les identités de séquences pour les acides aminés de diverses 2-ODD ayant des fonctions différentes, on constate

que malgré un 27-32% d'identité, les positions de certains introns sont fortement conservées entre ces séquences, indiquant probablement une origine commune pour cette classe d'enzymes particulièrement diversifiée (Prescott, 1993; Prescott et John, 1996). Donc, il semble logique d'affirmer que plus l'identité de séquences est grande entre deux 2-ODD spécifiques, plus leurs liens fonctionnels et évolutifs sont étroits. Or, la désoxygénase SPP2 partage, comme nous venons de le mentionner, une identité de séquences significative avec H6H, et de façon un peu moins marquée avec Ids2 et Ids3 (Tableau I), toutes deux isolées de l'orge, et induites par des conditions de déficiences en fer. Fait intéressant, les trois introns présents dans la séquence de ces enzymes sont, tout comme chez SPP2, localisés exactement au même endroit (pointes de flèches inversées, figure 4), semblant indiquer un possible regroupement fonctionnel pour ces enzymes, tel que précédemment suggéré (Prescott et John, 1996).

De toutes les désoxygénases appartenant à la famille des *Solanaceae* avec lesquelles SPP2 partage de fortes identités de séquences tel que TPP1 chez la tomate, la désoxygénase de l'aubergine, et l'H6H de la jusquiame noire, H6H est, comme nous l'avons mentionné plus haut, la seule dont les substrats et les co-facteurs sont connus. Plusieurs alcaloïdes ayant des structures similaires au L-hyoscyamine, sont hydroxylés par H6H en position C-6 de la partie tropane (Hashimoto et Yamada, 1987). L'hyoscyamine, la scopolamine et leurs dérivés sont les plus importants alcaloïdes tropanes chez les *Solanaceae*, et la scopolamine est un important anti-cholinergique utilisé en médecine, et présent chez plusieurs espèces de plantes de *Solanaceae* (Yun *et al.*, 1992). Ces alcaloïdes sont des esters dérivés des tropanes et des acides tropiques, tirant leur origine respectivement de l'ornithine et de la phénylalanine (Hashimoto et Yamada, 1987). Même si H6H est elle-même exprimée dans les racines de *H. niger*, il a été démontré récemment que l'expression de l'ornithine décarboxylase (ODC) pouvait être augmentée, bien que de façon transitoire, par la pollinisation dans les ovaires de tomate (Alabadí et Carbonell, 1998). L'ODC catalyse la conversion de l'ornithine en putrescine. Or, les polyamines tels que la putrescine, la spermidine et la spermine sont impliquées dans une grande variété de processus développementaux et de croissance des fruits et des fleurs (Galston et Kaur-Shawney, 1995). Chez la pomme de terre, les fluctuations de polyamines libres ont été associées à différents stades de développement

du fruit ou de l'ovaire après la fécondation, stades caractérisés par une augmentation des activités mitotiques et de différenciation cellulaire (Olson et Nowak, 1988).

Plusieurs types de protéines sont reconnues pour le rôle de défense qu'elles jouent contre l'invasion du pistil par des agents pathogènes, tels les champignons, les bactéries et les virus. Les plantes ont donc développé des moyens de défense contre ces intrus qui, par leur présence indésirable aux lieux de la pollinisation et de la fécondation, risqueraient d'en compromettre la finalité. Ainsi, les protéines liées à la pathogénèse ("les PR proteins") telles les (1,3)- $\beta$ -glucanase (Sessa et Fluhr, 1995), les endochitinases (Wemmer *et al.*, 1994), de même que les inhibiteurs de protéases (Heath, *et al.*, 1995) et les protéines de type PR-1 (Lotan, Ori et Fluhr, 1989) et PR-10 (Constabel et Brisson, 1995), sont non seulement induites par la présence d'un agent pathogène (principalement au niveau des feuilles), mais également présentes de façon constitutive dans les tissus floraux. C'est donc dire que certaines protéines impliquées dans les mécanismes de défense sont déjà en place dans les tissus reproducteurs, pour y contrer les effets possibles de l'introduction d'agents pathogènes. La première ligne d'attaque des agents pathogènes étant le stigmate et le style, il est normal que ce soit dans ces tissus que la majorité des protéines de défense se trouvent, comme c'est le cas pour les exemples mentionnés ci-haut. Cependant, on sait que beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés anti-microbiennes ou anti-herbivores (Kutchan, 1995). Le fait que la désoxygénase SPP2 est fortement exprimée dans les fleurs, les fruits, les feuilles et les tubercules (de façon constitutive en général, mais également induite dans les ovaires par la pollinisation, la fécondation ou la blessure), pourrait refléter sa fonction dans la biosynthèse d'un alcaloïde conférant à la plante des propriétés de défense employées à la protection des organes reproducteurs et des fruits. Les différences majeures observées dans les patrons d'expression de SPP2 et TPP1 (section 4.0.1), pourraient indiquer que l'expression de TPP1 dans les fruits aurait été perdue lors de la sélection pour obtenir des tomates cultivées. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en comparant les profils d'expression de TPP1 chez la tomate cultivée et ceux de la tomate sauvage de laquelle elle provient.

Finalement, même si à l'heure actuelle des milliers d'alcaloïdes ont été isolés chez les végétaux, et que plusieurs d'entre eux possèdent des propriétés médicinales

intéressantes, leur rôle exact pour les plantes elles-mêmes reste encore, dans la majorité des cas, inconnu (Kutchan, 1995). C'est dire qu'on ne peut exclure la possibilité qu'un tel alcaloïde produit par la désoxygénase SPP2 puisse jouer un double rôle, tant dans les mécanismes de défense, que lors de la reproduction. Le fait que le gène SPP2 soit présent de façon constitutive dans les feuilles et les pistils (au moment où les fleurs sont réceptives à la fécondation), mais qu'il soit également inductible par la pollinisation, la blessure ou la fécondation, laisse supposer qu'il puisse produire un métabolite secondaire responsable de jouer un rôle de défense contre certains agents pathogènes, dans le but de protéger la fécondation et le développement des fruits. Le patron d'expression de SPP2 qui régresse dans le style des fleurs en développement, ainsi que sa présence au micropyle des ovules, laisse supposer que SPP2 puisse jouer un rôle au niveau de la croissance ou du guidage des tubes polliniques dans le style. Or, une classe de métabolites secondaires qui sont des substrats pour les désoxygénases, les flavonoïdes jouent justement ce double rôle au niveau de la reproduction et des mécanismes de défenses (Shirley, 1996). Les flavonols sont présents dans le pollen de plusieurs espèces de plantes supérieures, et sont essentiels à sa germination, en plus de promouvoir la croissance des tubes polliniques chez certaines espèces (Ylstra *et al.*, 1992; Vogt *et al.* 1994). On a découvert que des plants de maïs et de pétunia mutants pour la chalcone synthase, première enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes sont stériles après une auto-pollinisation (Mo *et al.*, 1992; van der Meer *et al.*, 1992, Ylstra *et al.*, 1994). Aussi, comme dans le cas des métabolites secondaires de la classe des flavonoïdes, les alcaloïdes pourraient également avoir des fonctions spécifiques liées à la reproduction des plantes, et agir comme métabolites antimicrobiens et anti-herbivores. Or, c'est seulement lorsque nous aurons réussi, avec une désoxygénase SPP2 fonctionnelle (c'est à dire avec ses co-facteurs que sont le fer et l'ascorbate et en plus le 2-oxoglutarate comme co-substrat), à en déterminer le ou les substrats, que nous pourrons identifier la ou les voies métaboliques à laquelle ou auxquelles elle participe, et ainsi mieux cerner son rôle dans les mécanismes de la reproduction et/ou de la défense de *S. chacoense*.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

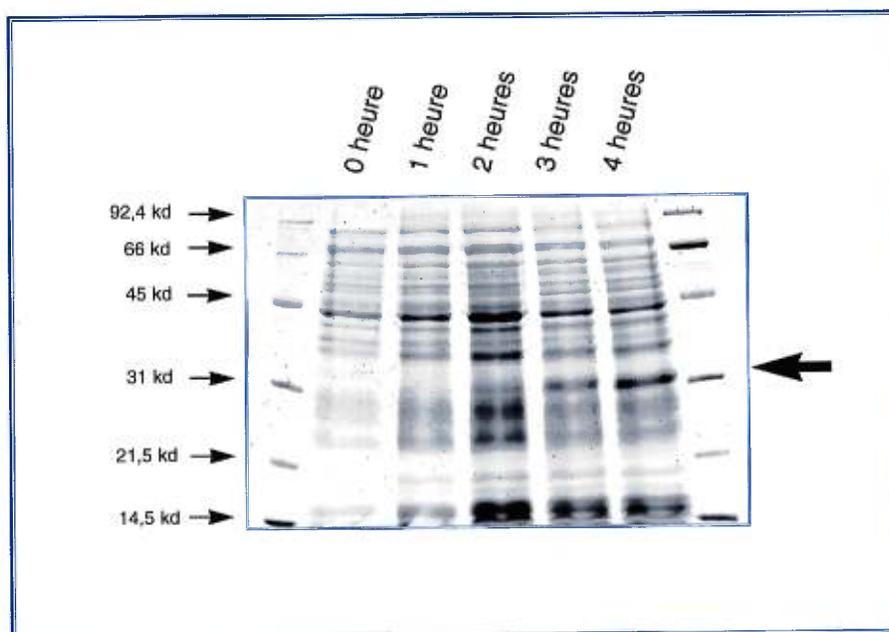
Nous avons démontré qu'une forte expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire, coïncide avec la période de réceptivité de la fleur à la fécondation, et que l'expression reste constante et élevée tant que la fleur peut encore être pollinisée, et mener à une fécondation fertile, engendrant le développement de l'ovaire en fruit et la production de nombreuses graines. Le déclin de l'expression des ARNm de SPP2 dans les pistils coïncide, lui, avec la sénescence de la fleur qui, même si elle peut encore être pollinisée, tombera avant que la fécondation n'ait lieu. A noter que l'application exogène d'éthylène, connu pour son rôle dans la sénescence, ne provoque pas cette diminution dans l'expression de SPP2. La pollinisation, tout comme une blessure infligée au style, induit à distance une augmentation de l'expression des ARNm de SPP2 dans la paroi ovarienne. La fécondation, quant à elle, induit un nouveau lieu d'expression des ARNm de SPP2 dans l'ovaire, que l'on ne retrouve lors des hybridations *in situ*, ni dans les coupes de pistils pollinisés de façon incompatible, ni dans celle des pistils non pollinisés. Les niveaux d'expression de SPP2 restent élevés dans les fruits en développement, mais lorsque ces derniers arrivent à maturité et que la différenciation et les divisions cellulaires au niveau de l'ovaire tirent à leur fin, le niveau d'expression de SPP2 commence alors à baisser de façon très importante.

L'analyse de la séquence du gène SPP2 suggère fortement qu'il s'agit d'une désoxygénase de la famille des 2-ODD, dont le gène n'est présent qu'en un seul exemplaire dans le génome de *S. chacoense*, et qui s'exprime surtout dans les pistils avec un patron singulier d'expression qui régresse de l'extrémité stigmatique du style à la région ovarienne, en fonction du développement floral. Le patron d'expression de SPP2 (sa régression dans le style ainsi que son expression micropylaire) nous laisse penser que cette enzyme pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse de métabolites secondaires pouvant jouer un rôle dans le guidage et la croissance des tubes polliniques vers les ovules. Aussi, la forme (en " V " ) que prend l'expression des ARNm de SPP2 au niveau de la base du style, nous laisse penser que SPP2 pourrait également jouer un rôle de marqueur cellulaire, en ce qu'il s'exprime en un lieu qui coïncide avec la zone d'abscission du style après la pollinisation, zone qui se trouve elle-même être à

ce moment, un *continuum* cellulaire et tissulaire entre le style et l'ovaire. Finalement, on sait que SPP2 est principalement exprimée au niveau du pistil, des feuilles et des fruits, et que son expression coïncide (dans les fleurs) avec la période pendant laquelle les fleurs de *S. chacoense* sont réceptives à la pollinisation et à la fécondation, alors que sa diminution coïncide avec la période à partir de laquelle la fécondation ne peut plus avoir lieu chez les fleurs. Cela nous laisse penser que notre désoxygénase (présente de façon constitutive et induite par la pollinisation, la fécondation ou la blessure), pourrait être impliquée dans la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire tel qu'un alcaloïde possédant des propriétés anti-microbiennes ou encore, anti-herbivores. Cela aurait pour effet de protéger le mécanisme de fécondation, et subséquemment, celui du développement de l'ovaire en fruit menant à la production de nombreuses semences fertiles.

Pour mieux comprendre le rôle joué par cette désoxygénase induite par la pollinisation et la fécondation, des plantes transgéniques sont en voie d'être produites. Nous induirons chez certaines d'entre elles, et ce sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur CaMV 35S), une surexpression des ARNm antisens de SPP2, et pour d'autres, une suppression fonctionnelle à l'aide de ribozymes ciblés contre différentes régions du message de SPP2. Ces plantes permettront, nous l'espérons, de mieux comprendre le rôle fonctionnel de SPP2 chez *S. chacoense*. Les plantes dont l'expression de SPP2 aura été supprimée, seront étudiées quant au comportement des tubes polliniques lors de la pollinisation, pour leur potentiel de fertilité, ainsi que pour leurs réponses face aux agents pathogènes et insectes herbivores comme le doryphore de la pomme de terre. De plus, l'isolement des alcaloïdes présents dans les ovaires permettra d'utiliser ces derniers comme substrat éventuel à l'enzyme SPP2, qui aura été produit à l'aide d'un vecteur d'expression bactérien (*Escherichia coli*), et par la suite, purifié en conditions natives. Par la suite, lors de tests effectués en conditions semi *in vitro*, il sera possible de déterminer le potentiel d'attraction des divers substrats de SPP2 sur des tubes polliniques en croissance (Higashiyama *et al.*, 1998).

À ce jour, le clonage du gène SPP2 dans le vecteur de transformation est terminé, et les plantes transgéniques devraient fleurir à la fin de l'été 1999. Quant à la méthode par ribozyme, les clonages sont actuellement en cours. SPP2 a déjà été cloné dans un vecteur d'expression bactérien, et son induction a de nombreuses fois été réalisée dans le but d'en déterminer le temps maximal (Figure 17). Quant à la purification de l'enzyme et à la détermination de son (ou ses) substrat(s) possible(s), elle fera l'objet de travaux futurs.



**Figure 17:** Induction de protéines (du gène SPP2) dans le vecteur d'expression bactérien PQE-30 en fonction du temps.

## 6. MONOGRAPHIE

**CAMPBELL, N. A.**, *Biology*, 4<sup>e</sup> édition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, 1946.

**JOHRI, B.M.**, *Embryology of angiosperms*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo, 1984.

**NULTSCH, W.**, *Botanique générale*, 10<sup>e</sup> édition, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1998.

**RAGHAVAN, V.**, *Molecular embryology of flowering plants*, Cambridge University Press, New-York, Melbourne, 1997.

**RAVEN, P., EVERT, R. F., EICHORN, S. E.** *Biology of plants*, 4<sup>e</sup> édition, Worth Publishers Inc., New-York, 1986.

**SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. ET MANIATIS, T.** *Molecular cloning; A laboratory manuel*, 2<sup>e</sup> édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- ALABADÍ, D. ET CARBONELL, J.** (1998) Expression of Ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-Dichlorophenoxyacid, and Gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant. Physiol.*, 118, 323-328.
- BRITSCH, L., DEDION, J., SAEDLER, H. ET FORKMANN, G.** (1993) Molecular characterization of flavonone 3  $\beta$ -hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *Eur. J. Biochem.* 217, 745-754.
- BRONNER-FRASER, M.** (1985) Guidance of neural crest migration. Latex beads as probes of surface-substratum interactions. *Dev. Biol.*, 108, 131-145.
- BUCHER, M., BRANDER, K. A., SBICEGO, S., MANDEL, T. ET KUHLEIMEIR, C.** (1995) Aerobic fermentation in tobacco pollen. *Plant Mol. Biol.*, 28, 739-750.
- CHAUBAL, R. ET REGER, B. J.** (1992) Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries. *Sex. Plant Reprod.*, 5, 34-46.
- CHEN, F., HAYES, P. M., MULROONEY, D. M. ET PAN A.** ( 1994) Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell*, 6, 835-843.
- CHEUNG, A. Y.** (1996-a) Pollen-pistil interactions during pollen tube growth. *Trends in Plant Science*, 1, 45-51.
- CHEUNG, A. Y.** ( 1996-b) The pollen tube growth pathway: its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sex. Plant Reprod.*, 9, 330-336.

- CHEUNG, A. Y.** (1995-a) Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl. Sci.*, 92, 3077-3080.
- CHEUNG, A. Y., WANG, H. ET WU, H-M.** (1995-b) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, 82, 383-393.
- CHURCH, A. E.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1991-1995.
- CLARKE, A. E.** (1940) Fertilization and early embryo development in the potato. *Am. Potato J.*, 17, 20-25.
- CONSTABEL, C. P. ET BRISSON, N.** (1995) Stigma and vascular specific expression of the PR-10a gene of potato: a novel pattern of expression of a pathogenesis related gene. *Molec. Plant Microb. Interac.*, 8 (1), 104-113.
- DIATCHENKO, L., CHRIS LAU, Y.-F., CAMPBELL, A. P., CHENCHILK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E. D. ET SIEBERT, P. D.** (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 6025-6030.
- DIGONNET, C., ALDON, D., LEDUC, N. , DUMAS, C. ET ROUGIER M.** (1997) First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization. *Development*, 124, 2867-2874.
- DREWS, G. N., LEE, D. ET CHRISTENSEN, C. A.** (1998) Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell*, 10, 5-17.
- ENGELL, K.** (1988) Embryology of barley II: Synergids and egg cell, zygote and embryo development. In *Sexual Reproduction in Higher Plants*, M. Cresti, P. Gori, et E. Pacini (eds) (Heidelberg: Springer-Verlag) pp 383-388.

- FRANKLIN-TONG, V. E., DRØBAK, B. K., ALLAN, A. C. , WATKINS, P. A. C. ET TREWAVAS, A. J.** (1996) Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by Inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant cell*, 8, 1305-1321.
- FRANSSEN-VERHEIJEN, A. A. W. ET WILLEMSE, M. T. M.** (1993) Micropylar exsudate in *Gasteria (Aloaceae)* and its possible function in pollen tube growth. *AM. J. Bot.*, 80, 253-262.
- FÜTTERER, J. ET HOHN, T.** (1996) Translation in plants-rules and exceptions. *Plant Mol. Biol.*, 32, 159-189.
- GALSTON, A. W. ET KAUR-SAWHNEY, R.** (1995) Polyamines as endogenous growth regulators. *Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology*. P. J. Davies, ed. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers). Pp. 158-187.
- GILISSEN, L.J.W.** (1976) The role of the style as a sens-organ in relation to wilting of the flower. *Planta*, 131, 201-202.
- GILISSEN, L. J. W. ET HOEKSTRA, F. A.** (1984) Pollination-induced corolla wilting in *Petunia hybrida* rapid transfer through the style of a wilting-inducing substance. *Plant. Physiol.*, 75, 496-498.
- 
- GOLDMAN, M. H. S., PEZZOTTI, M. SEURINCK, J. ET MARIANI, C.** (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell*, 4, 1041-1051.
- GUSTAFSON, F. G.** (1936) Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 22, 628-636.

- HANSON, A. D., JACOBSEN, J. V. ET ZWAR, J. A.** (1984) Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 75, 573-581.
- HASCHIMOTO, T., MATSUDA, J. ET YAMADA, Y.** (1993) Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase. *FEBS Lett.*, 329, 35-39.
- HASCHIMOTO, T. ET YAMADA, Y.** (1987) Purification and characterization of hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger*L. *Eur. J. Biochem.*, 164, 277-285.
- HEATH, R. L., BARTON, P. A., SIMPSON, R. J., REID, G. E., LIM, G. ET ANDERSON, M. A.** (1995) Characterization of the protease processing sites in a multidomain proteinase inhibitor precursor from *Nicotiana alata*. *Eur. J. Biochem.*, 230, 250-257.
- HERRERO, M.** (1992) From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regul.*, 11, 27-32.
- HESLOP-HARRISON, J.** (1986) Pollen-tube chemotropism: Fact or delusion. In: Cresti, M. et Dalai, R. (eds) *Biology of reproduction and cell motility in plants and animals*. University of Siena, Siena, pp 169-174.
- HILL, S. E., STEAD, A. D. ET NICHOLS, R.** (1987) Pollination-induced ethylene and production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by pollen of *Nicotiana tabacum* cv White Burley. *J. Plant Growth Regul.*, 6, 1-13.
- HOLTON, T., BRUGLIERA, F. ET TANAKA Y.** (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from Petunia. *Plant J.*, 4, 1003-1010.
- HUANG, B.-Q. ET RUSSEL, S.D.** (1992) Female germ unit: Organization, isolation, and function. *Int. Rev. Cytol.*, 140, 233-292.

- JACOBSEN, S. E. ET OLSZEWSKI N. E.** (1996) Gibberellins regulate the abundance of RNAs with sequence similarity to proteinase inhibitors, dioxygenases and dehydrogenases. *Planta*, 198, 78-86.
- JONES, J. D. G., DUNSMUIR, P. ET BEDBROOK J.** (1985) High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.*, 4, 2411-2418.
- KOCK, M., HAMILTON, A. ET GRIERSON, D.** (1991) eth1, a gene involved in ethylene synthesis in tomato. *Plant Mol. Biol.*, 17(1), 141-142.
- KOKAME, K., KATO, H. ET MIYATA, T.** (1996) Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis: GRP78/BiP and novels genes. *J. Biol. Chem.*, 271, 29659-29665.
- KOLTUNOW, A. M., TRUETTNER, J., COX, C., WALLROTH, M. ET GOLDBERG, R. B.** (1990) Different and temporal gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, 2, 1201-1224.
- KRÄUTER-CANHAM, R., BRONNER, R., EVRARD, J-L., HAHNE, G., FRIEDT, W. ET STEINMETZ, A..** (1997) A transmitting tissue- and pollen-expressed protein from sunflower with sequence similarity to the human RTP protein. *Plant Science*, 129, 191-202.
- KUTCHAN, T. M.** (1995) Alkaloid biosynthesis-the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7, 1059-1070.
- LI, H-Y. ET GRAY, J.** (1997) Pollination-enhanced expression of a receptor-like protein kinase related gene in tobacco styles. *Plant Mol. Biol.*, 33, 653-665.
- LOTAN, T., ORI, N. ET FLUHR, R.** (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell*, 1, 881-887.

- LOWE, J.B.** (1994) Carbohydrate recognition in cell-cell interaction. In: Kukuda, M., Hinds Gaul, O. Molecular glycobiology. IRL Press, New York, pp 163-205.
- MAHESHWARI, P.** (1950) An introduction to the Embryology of Angiosperms. (New York: McGraw-Hill).
- MATSUDA, J., OKABE, S., HASHIMOTO, T. ET YAMADA, Y.** (1991) Molecular cloning of Hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamine niger*. *J. Biol. Chem.*, 266, 15, 9460-9464.
- MATTON, D. P., BERTRAND, C., LAUBLIN, G. ET CAPPADOCIA, M.** (1998) Molecular aspects of self-incompatibility in tuber-bearing Solanum species. *Comprehensive Potato Biotechnology*. S. M. P. Khurana, R. Chandra and M. D. Upadhyya, eds. (New Delhi, India: Malhotra Publishing House), Pp. 97-113.
- MATTON, D. P., MAES, O., LAUBLIN, G., XIKE, Q., BERTRAND, C., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M.** (1997) Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*, 9, 1757-1766.
- MILLIGAN, S. B. ET GASSER, C. S.** (1995) Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. *Plant Mol. Biol.*, 28, 691-711.
- MILNER, R. E., BAKSH, S., SHEMANKO, C., CARPENTER, M. R., SMILLIE, L., VANCE, J. E., OPAS, M. ET MICHALAK, M.** (1991) Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 266, 7155-7165.
- MO, Y., NAGEL, C. ET TAYLOR, L. P.** (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonoids in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7213-7217.

**MOGENSEN, H. L.** (1992) The male germ unit: concept, composition, and significance. *Int. Rev. Cytol.* 140, 129-147.

**NAKANISHI, H., OKUMURA, N., UMEHARA, Y., NISHIZAWA, N.-K., CHINO, M. ET MORI, S.** (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol.*, 34, 401-410.

**NICHOLS, R., BUFLER, G., MOR, Y., FUJINO, D. W. ET REID, M. S.** (1983) Changes in ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of pollinated carnation flowers. *J. Plant Growth Regul.*, 2, 1-8.

**OHAD, N., MARGOSSIAN, L., HSU, Y.-c., WILLIAMS, C., REPETTI, P. ET FISCHER, R. L.** (1996) A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5319-5324.

**OKUMURA, N., NISHIZAWA, N.-K., UMEHARA, Y., OHATA, T., NAKANISHI, H., YAMAGUCHI, T., CHINO, M. ET MORI, S.** (1994) A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol.*, 25, 705-719.

**OLSON, A. R. ET NOWAK, J.** (1988) Free polyamines in postpollination placentae and ovules of potato. *Hortscience*, 23, 1042-1044.

**O'NEILL, S. D.** (1997) Pollination regulation of flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 547-74.

**O'NEILL, S. D., NADEAU, J. A., ZHANG, X. S., BUI, A. Q. ET HALEVY, A. H.** (1993) Interorgan of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell*, 5, 419-432.

**ORI, N., SESSA, G., LOTAN, T., HIMMELHOCH, S. ET FLUHR, R.** (1990) A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO*, 9, 3429-3426.

- PIERSON, E. S., MILLER, D. D., CALLAHAM, D. A., SHIPLEY, A. M., RIVERS, B. A., CRESTI, M. ET HEPLER, P. K.** (1994) Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell*, 6, 1815-1828.
- PORAT, R., NADEAU, J. A., KIRBY, J. A., SUTTER, E. G. ET O'NEILL, S. D.** (1998) Characterization of the primary pollen signal in the postpollination syndrome of *Phalaenopsis* flowers. *Plant Growth Regul.*, 24, 109-117.
- PRESCOTT, A. G.** (1993) A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Exp. Bot.*, 44, 849-861.
- PRESCOTT, A. G. ET JOHN, P.** (1996) Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 245-271.
- PREUSS, D., LEMIEUX, B., YEN, G. ET DAVIS, R.W.** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.*, 7, 974-985.
- RAY, S., PARK, S-S. ET RAY, A.** (1997) Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development*, 124, 2489-2498.
- REID, M. S., FUJINO, D. W., HOFFMAN, N. E. ET WHITEHEAD, C. S.** (1984) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: the transmitted stimulus in pollinated flowers? *Plant Growth Regul.*, 3, 189-196.
- REINBOTHE, S., MOLLENHAUR, B. ET REINBOTHE, C.** (1994) JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, 6, 1197-1209.

- REITER, R. S., YOUNG, R. M. ET SCOLNIK, P. A.** (1992) Genetic linkage of the Arabidopsis genome: methods for mapping with recombinant inbreds and random amplified polymorphic (RAPDs). *Methods in Arabidopsis Research*. C. Koncz, N.-H. Chua and J. Schell, eds. (Singapore: World Scientific Publishing Co.) pp 170-190.
- RUSSEL, S. D.** (1996) Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sex. Plant Reprod.*, 9, 337-342.
- SANDERS, C. L. ET LORD, E. M.** (1992) The extracellular matrix in pollen tube growth. *Int. Rev. Cytol.*, 140, 238-244.
- SANGER, F., NICKLEN, S. ET COULSON, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5463-5467.
- SEDGLEY, M.** (1982) Anatomy of the unpollinated and pollinated watermelon stigma. *J. Cell Sci.*, 54, 341-355.
- SESSA, G. ET FLUHR, R.** (1995) The expression of an abundant transmitting tract-specific endoglucanase (Sp41) is promoter-dependent and not essential for the reproductive physiology of tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 29, 969-982.
- SHIMONO, A., ET KONDOH, H.** (1996) Identification of a N-myc-downstream gene Ndr1 by direct subtraction of whole embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. Numéro d'accèsion: U60593.
- SHIRLEY, B. W.** (1996) Flavanoid biosynthesis: "new" functions for an old pathway. *Trends in Plant Science*, 1, 377-382.
- SINGH, A., EVENSEN, K. B. ET KAO, T.** (1992) Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollination in *Petunia inflata*. *Plant Physiol.*, 99, 38-45.

**STEAD, A. D.** (1992) Pollination-induced flower senescence: a review. *Plant Growth Regul.*, 11, 13-20.

**STEER, W.M. ET STEER, J.M.** (1989) Pollen tube tip growth. *New Phytol.*, 111,323-358.

**STRASBURGER, E.** (1879) Die Angiospermen und die Gymnospermen. (Jena, Germany: Verlag Von Gustav Fischer).

**Van der MEER, I. M., STAM, M., van TUNNEN, A. J., MOL, J. N. M. ET STUITJE, A. R.** (1992) Inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers by an anti-sense approach results in male sterility. *Plant Cell*, 4, 253-262.

**Van ELDIK, G. J., REIJNEN, W. H., RUITER, R. K., van HERPEN, M. M.A., SCHRAUWEN, J. A.M. ET WULLEMS, G. J.** (1997-a) Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J.*, 11(1), 105-113.

**Van ELDIK, G. J., RUITER, R. K., COLLA, P. H. W. N., van HERPEN, M. M.A., SCHRAUWEN, J. A.M. ET WULLEMS, G. J.** (1997-b) Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.*, 33, 923-929.

**Van ELDIK, G. J., RUITER, R. K., van HERPEN, M. M.A., SCHRAUWEN, J. A.M. ET WULLEMS, G. J.** (1997-c) Induced ADH gene expression and enzyme activity in pollinated pistils of *Solanum tuberosum*. *Sex. Plant Reprod.*, 10, 107,109.

**VOGT, T., POLLAK, P., TARLYN, N. ET TAYLOR, L. P.** (1994) Pollination- or wound-induced kaemferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell*, 6, 11-23.

**WANG, H., H-m. WU ET CHEUNG, A. Y.** (1996) Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant J.*, 9(5), 715-727

**WATTS, F. Z., BUTT, N., LAYFIELD, P., MACHUKA, J., BURKE, J. F. ET MOORE, A. L.** (1994) Floral expression of a gene encoding an E2-related ubiquitin-conjugating protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 26, 445-451.

**WEMMER, T., KAUFMANN, H., KIRCH, H.-H., SCHNEIDER, K., LOTTSPEICH, F. ET THOMPSON, R. D.** (1994) The most abundant soluble basic protein of the stilar transmitting tract in potato (*Solanum tuberosum* L.) is an endochitinase. *Planta*, 194, 264-273.

**WHITAKER, M. ET SWANN, K.** (1993) Lighting the fuse at fertilization. *Development*, 117, 1-12.

**WHITEHEAD, C.S., FUJINO, D.W. ET REID, M.S.** (1983) Identification of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in pollen. *Sci. Hortic.*, 21, 291-297.

**WHITEHEAD, C. S., HALEVY, A. H. ET REID, M. S.** (1984) Roles of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in pollination and wound-induced senescence of *Petunia hybrida* flowers. *Physiol. Plant.*, 61, 643-648.

**WILHELMI, L. K. ET PREUSS, D.** (1996) Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance. *Science*, 274, 1535-1537.

**WILLIAMS, E. J.** (1955) Seed failure in the Chippewa variety of *Solanum tuberosum*. *Bot. Gaz.*, 10, 10-15.

**WOLTERING, E.J.** (1990) Interorgan translocation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene coordinates senescence in emasculated *Cymbidium* flowers. *Plant Physiol.*, 92, 837-845.

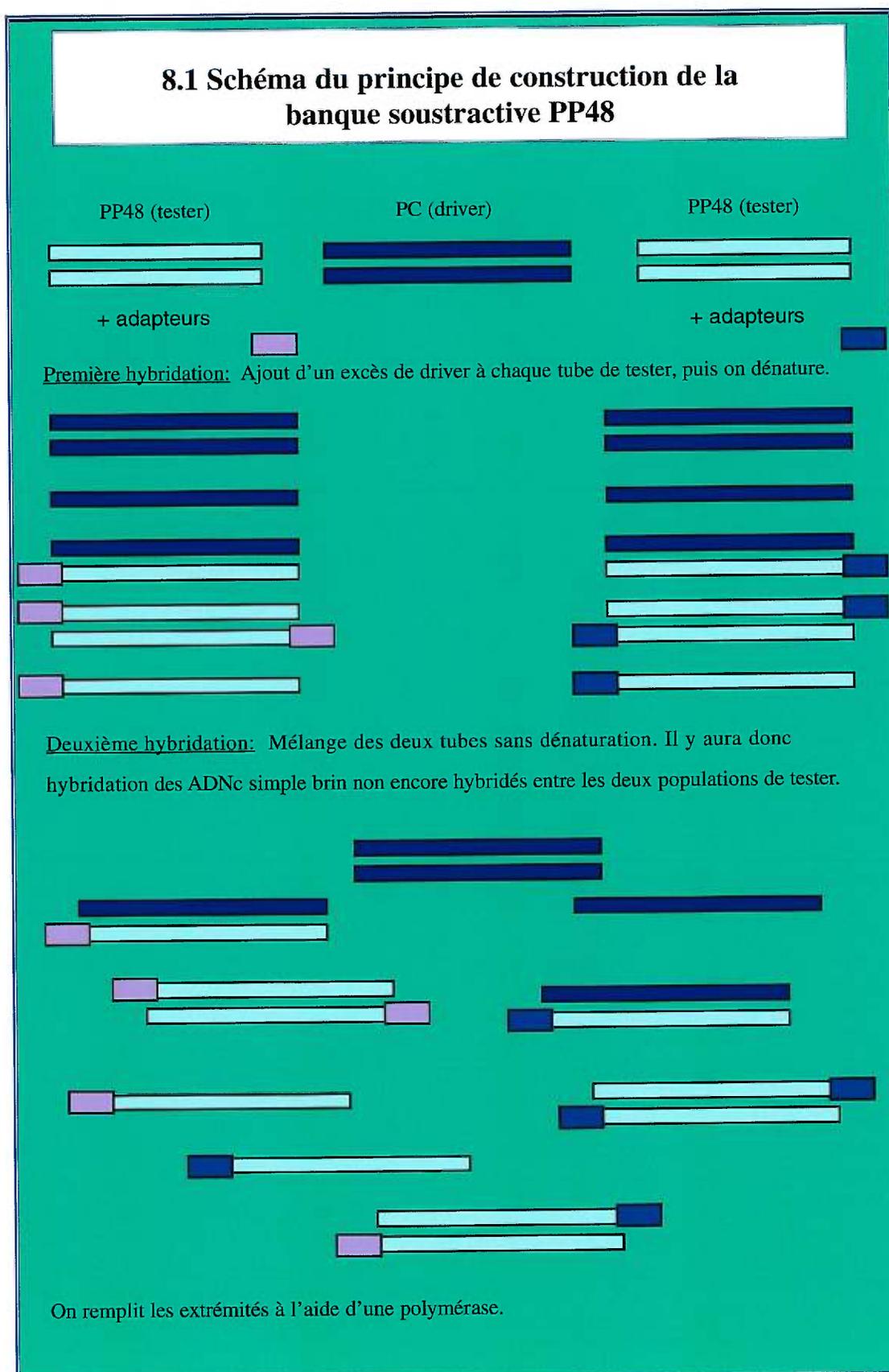
**YLSTRA, B., BUSSCHER, J., FRANKEN, J., HOLLMAN, P. C. H., MOL, J. N. M. ET VAN TUNEN, A. J.** (1994) Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant J.* 6, 201-212.

**YLSTRA, B., TOURAEV, A., MORENO, R. M. B., STÖGER, E., van TUNEN, A. J., VICENTE, O., MOL, J. N. M. ET HEBERLE-BORS, E.** (1992) Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.*, 100, 902-907.

**YUN, D.-J., HASCHIMOTO, T. ET YAMADA, Y.** (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11799-11803.

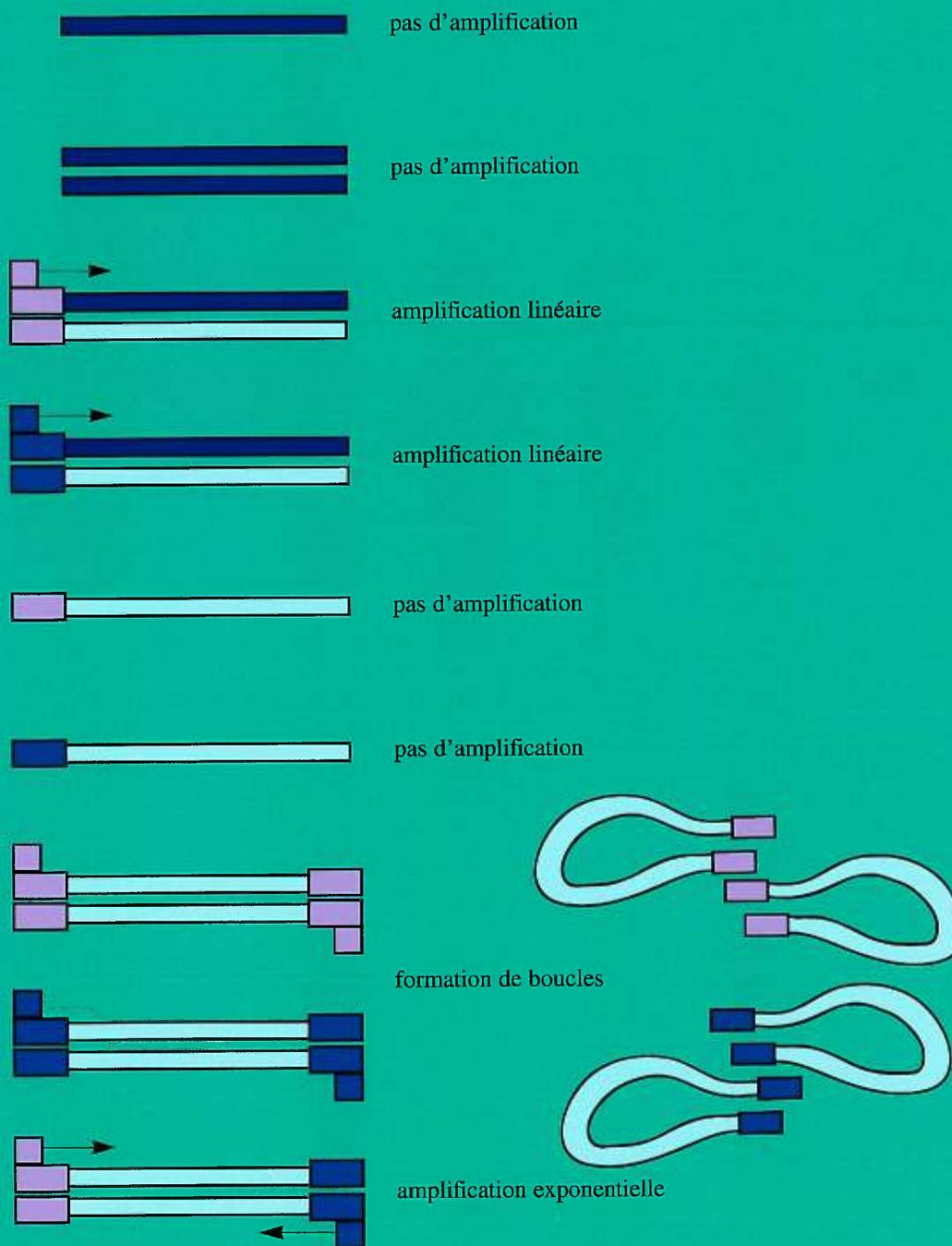
## 8. ANNEXES

## 8.1 Schéma du principe de construction de la banque soustractive PP48



## Schéma du principe de construction de la banque soustractive PP48 (suite)

Premier PCR:



Deuxième PCR: L'utilisation d'amorces internes permet une amplification plus spécifique des ADNc du tester ayant été soustraits des ADNc du driver, tout en réduisant le bruit de fond des amplifications linéaires.

**Pollination, fertilization and wounding of the style induce the expression of a highly conserved plant gene homologous to a *Plasmodium falciparum* surface antigen in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt.**

**Sylviane Lantin<sup>1</sup>, Martin O'Brien<sup>1</sup>, and Daniel P. Matton\***

Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques,  
Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada, H1X 2B2

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

\*Author for correspondance

Ph. [REDACTED]

Fax (514) 872-9406

Email [REDACTED]

GenBank Accession number for the SPP30 cDNA is AF136010

## ABSTRACT

Pistil tissues are actively involved in pollen tube growth and respond to the presence of the growing pollen tubes by modulating the expression of specific genes. Once fertilization has occurred, complex developmental programs lead to embryogenesis, ovary maturation, and seed set. In order to understand the early events that follow pollination and fertilization we have used a subtractive hybridization approach to characterize genes which are related to pollination and fertilization events. One cDNA clone isolated and named SPP30 (Solanum Pollinated Pistil) was found to share significant sequence identities with a *Plasmodium falciparum* (malaria parasite) surface antigen and a yeast gene of unknown function. Search in recent EST databases also revealed that SPP30 homologs are found in both monocot and dicot species. The presence of this conserved gene in evolutionary distant organisms such as yeast, *Plasmodium*, and plants, suggests that it codes for an essential cellular function. This is also strengthened by its extremely high sequence conservation in both monocots and dicots where virtually all substitutions tolerated are conservatives.

**ABBREVIATIONS:** DPA, days post-anthesis ; DPP, days post-pollination ; DPW, days post-wounding.

## KEYWORDS

*Solanum chacoense*, wild potato, reproduction, pollination- and fertilization-induced gene, wound-induced gene, subtractive hybridization, *Plasmodium falciparum* surface antigen.

## INTRODUCTION

Sexual reproduction in flowering plants involves multiple and successive interactions between the male gametophyte, the pollen grain, and the female reproductive structure, the pistil. After landing on the stigma surface where the pollen adheres and hydrates, the pollen grain grows a protruding tube which is most probably guided by both the physical architecture and chemotrophic cues originating from the style and the ovary [23, 28, 37]. The two sperm nuclei carried at the tip of each growing pollen tube then enter the ovule through the micropyle and fuse with the egg and the central cell nuclei of the embryo sac, therefore forming the zygote and the endosperm, respectively [26].

From pollen grain hydration on the stigmatic surface to the delivery of the sperm cells in the embryo sac, numerous cell-cell interaction events take place between the growing pollen tube and the extracellular matrix of the style transmitting tissue. During pollen tube growth, the pistil plays active roles including pollen tube guidance and nourishment [3, 35]. Furthermore, in self-incompatible species, like *Solanum chacoense*, the pistil acts as an efficient sieve, enabling only pollen tubes carrying an S-allele different from the ones expressed in the style to reach the ovary [16, 17]. Pollination itself induces multiple responses, the most dramatic being ovule development in orchid flowers [38]. The best characterized responses to pollination are the increase in ACC synthase and ACC oxidase gene expression leading to ethylene production and to perianth senescence [21]. Other pollination-induced events include cell deterioration and death of transmitting-tissue cells throughout the path of pollen tube growth, as well as the deglycosylation of stylar transmitting tissue-specific proteins and the poly(A) tail shortening from some transmitting tissue-specific mRNAs [31, 32]. Differential screening strategies have been recently used in potato [30] and apple [7] to isolate pollination-inducible genes. Genes involved in basic metabolic functions including ribosomal protein, histone H2B, translation elongation factor 1 $\alpha$ ,

and vacuolar ATPase were found to be up-regulated following pollination in apple [7]. Genes involved in flavonoid biosynthesis were also found to be up-regulated in both apple [7] and potato [29, 30] following pollination. Other pistil genes also characterized as being up-regulated following pollination include an *Arabidopsis* E2-related ubiquitin conjugating enzyme [34], two barley calreticulins [2], a peroxidase [1], a tobacco receptor-like protein kinase [15], and an apple homolog of the DAD1 (defender against cell death 1) gene an inhibitor of programmed cell death in *C. elegans* [8]. Although successful in isolating genes of moderate to high abundance, differential screening is not sensitive enough to isolate weakly expressed genes following pollination and fertilization. In vitro fertilization with isolated gametes would substantially enrich the up-regulated fraction of target genes, but production of a large number of isolated gametes is limiting, difficult to master and limited to a few amenable species [14].

In order to characterize the early responses following pollination and fertilization we have begun the isolation of pollination- and fertilization-induced genes through differential display, subtractive hybridization and virtual subtraction approaches in *Solanum chacoense*, a self-incompatible relative of the potato. In this study, we report the isolation of a ubiquitous and highly conserved plant gene which shows strong sequence identity with a *Plasmodium falciparum* (malaria parasite) surface antigen.

## RESULTS

### Isolation of the SPP30 cDNA

In order to characterize genes involved in pollen-pistil interactions and fertilization events we used a subtractive hybridization approach [6]. A subtracted cDNA library was made from pollinated pistils 48 h post-pollination from which were theoretically subtracted common mRNAs from mature unpollinated pistils. The pool of subtracted cDNAs was then PCR amplified and used to screen a 48 h post-pollination *Solanum chacoense* pistil cDNA library made in the  $\lambda$  Zap-pBK vector. Positives plaques were purified and plasmids were rescued by *in vivo* excision. cDNA clones were tested individually by RNA slot-blot hybridization to determine if they were up-regulated following pollination and/or fertilization events (data not shown). The nucleic acid sequence as well as the deduced amino acid sequence of one of the cDNA clones isolated are shown in Figure 1. The SPP30 clone (Solanum Pollinated Pistil) codes for a cDNA of 967 bp, including a short 5' untranslated leader of 46 nucleotides (nt) and a 315 nt 3' UTR. The size of the SPP30 cDNA corresponds to the size of the mRNA, as determined by RNA gel blot analyses (1.0 kb), suggesting that the SPP30 cDNA is full-length or near full-length. The SPP30 cDNA codes for a 21.8 kD protein with a predicted pI of 7.35. PCR amplification of *S. chacoense* genomic DNA with oligonucleotides complementary to the 5' and 3' ends of the SPP30 cDNA produced fragments of identical size, suggesting that the SPP30 gene is most probably intronless (data not shown).

### Gene copy number of SPP30

A Southern blot of genomic DNA isolated from *S. chacoense* leaves was probed with the Eco RI-Xho I complete SPP30 cDNA insert. Only one 12 kb hybridizing fragment can be detected from the Eco RI digested DNA and two hybridizing bands of 3.35 and 2.8 kb respectively are detected from the Sac I digestion.

Since there is one Sac I restriction site in the cDNA sequence (position 414), this strongly suggests that the SPP30 is a single copy gene in *S. chacoense*. A garden blot (data not shown) also indicates that weaker hybridizing fragments can be detected in other solanaceous plants (eggplant, tomato, ground cherry, petunia) as well as in the Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea*).

### Sequence analysis

Homology searches in DNA and protein databases revealed striking similarities with a *Plasmodium falciparum* (malaria parasite) blood stage antigen [13] and an unknown protein from yeast chromosome IV obtained from the Yeast Genome Sequencing Project (Genbank accession number U33050). An amino acid sequence comparison is shown in Figure 3. All three proteins share significant sequence identities throughout their entire sequence, except for a large insertion found in the yeast gene from amino acid position 106 to 170. In order to compare equivalent regions, the insertion from the yeast protein was removed to calculate amino acid identities. The SPP30 gene from *S. chacoense* shares 41% amino acid identities with the 41-2 antigen from *P. falciparum* (60% similarities) and 39% amino acid identities with the YDR472w protein from *S. cerevisiae* (57% similarities) while the 41-2 antigen and the YDR472w protein sequences share 33% amino acid identities (50% similarities). All three deduced proteins have similar isoelectric points, ranging from 6.34 to 8.11 and similar amino acid compositions. Hydrophilicity plots revealed the presence of a hydrophobic region of 11 amino acids flanked by negatively charged residues (D or E) in the N-terminal region for all three proteins (underlined in Fig. 3). This region was previously suggested to be a signal peptide targeting sequence for the *P. falciparum* 41-2 surface antigen [13].

A search in EST databases yielded four recently described plant gene sequences highly homologous to SPP30 from *Arabidopsis thaliana*, rice, maize and hybrid aspen.

Table I shows the nucleotide and amino acid sequence identities between these plant ESTs and SPP30. For amino acid sequence identities, the EST sequences were translated and amino acid sequence identities were determined with the open reading frame that could be assembled with these partial sequences. Nucleotide sequence identities between these ESTs and the SPP30 cDNA clone ranged from 74 to 80 % while amino acid sequence identities ranged from 87 to 96 %. Almost all amino acid substitutions between these sequences were found to be highly conservatives.

### **Abundance of SPP30 mRNA in mature tissues and time-course accumulation following compatible pollination**

Tissue-specific expression of SPP30 was determined in mature tissues of *S. chacoense*. An RNA gel blot analysis (Figure 4) indicates that SPP30 is expressed in all tissues to low levels, except pollen and pollen tubes, where no hybridization signal could be detected even after prolonged exposure. Highest expression is seen in floral tissues, mainly in pollinated pistils 48 hours post-pollination, as expected from our subtractive hybridization screen.

In order to determine if the increase in mRNA abundance seen 48h post-pollination (Figure 4) is pollination and/or fertilization dependant, we performed an RNA time-course analysis following pollination (Figure 5). SPP30 mRNA levels increased very slightly from 0 to 36 h post-pollination, reached a peak 48h post-pollination and declined to unpollinated levels by 96 h post-pollination. Since most pollen tubes reach the ovary 36 h post-pollination, and that fertilization occurs in *Solanum* spp. from 36 h onward [5, 36 and our unpublished results], the maximum SPP30 mRNA accumulation reached at 48 h post-pollination suggests that it is most likely a fertilization dependant event, although a slow response to pollination cannot be excluded. Alternatively, the transient increase observed in pollinated tissue may be developmentally regulated. To test this hypothesis, SPP30 mRNA abundance was also

determined in unpollinated pistils from the day before anthesis until five days post-anthesis (DPA). SPP30 mRNA levels were found to be unaffected by the age of the flower (not shown).

### **Wounding of the style triggers SPP30 mRNA expression at a distance in the ovary**

In many species, pollination is known to induce cellular deterioration of specific cells or tissues, including the secretory cells in the stigmatic region and the transmitting tissue of the style [3]. To determine if cell death caused by wounding could trigger SPP30 mRNA accumulation in the style or at a distance in the ovary, the styles of young flowers were slightly crushed with tweezers, and the styles and ovaries were collected separately 48 h later. Figure 6 shows that wounding of the style induced SPP30 mRNA accumulation in the style itself and at a distance in the ovary, to levels comparable to a 48 h compatible pollination. Pollination had almost no effect on SPP30 mRNA levels in the style. This suggests that the increase previously observed in pistils following pollination (Figure 5) is thus confined to the ovary tissue. Therefore, cellular deterioration and death caused by pollination or by wounding might be the initial trigger inducing SPP30 mRNA accumulation in the ovary, although in the style itself, pollination alone is not sufficient to trigger SPP30 mRNA accumulation. Since wounding of the style induced SPP30 mRNA accumulation in the ovary, we also tested if wounding could also induce SPP30 mRNA accumulation in leaves and tubers. Figure 6 also shows that SPP30 mRNA levels increase in wounded (sliced) tubers, but not in wounded leaves.

### **Hormonal control of mRNA expression**

The nature of the wound signal that triggers SPP30 mRNA accumulation in the ovary remains to be determined, but plant hormones have been implicated in many

physiological processes during flowering and fertilization. To test if SPP30 mRNA expression was under hormonal control, we sprayed *S. chacoense* flowers, bearing flowers at different developmental stages, once per day for two consecutive days, with various phytohormones. Pistils (stigma, style and ovary) were then collected from open mature flowers. An RNA gel blot analysis of the effect of hormonal treatments on SPP30 mRNA expression in pistils of treated flowers is shown in Figure 7. Of the auxins used, IBA had the strongest effect and induced a significant increase in SPP30 mRNA expression. Kinetin also induced SPP30 mRNA accumulation while ABA, GA<sub>3</sub>, and ethylene had little or no effect. To determine if stress hormones known to induce wound or defense responses could be mediating the SPP30 mRNA increase in style and ovary, flowers were individually sprayed with jasmonic acid (JA) or salicylic acid (SA), or treated in an airtight chamber with the volatile compound methyl jasmonate (MeJA). ABA, JA, and MeJA are well known mediators of wound-responsive genes [11, 22, 33], and jasmonates and SA are also involved in mediating defense gene expression [25]. None of the stress hormones used induced SPP30 mRNA accumulation in styles or ovaries (not shown).

## DISCUSSION

While searching for genes involved in pollen-pistil interactions and fertilization events, we have characterized a gene with strong sequence similarities to a blood surface antigen from the malaria parasite *P. falciparum*. Although no function has been attributed to this gene in *P. falciparum*, the presence of such a highly conserved gene in plants, yeast, and *P. falciparum*, (an *Apicomplexa*, a group of unicellular endoparasites), suggests an ancient and essential cellular function. Furthermore, the SPP30 homologs in *Arabidopsis*, maize, rice, and hybrid aspen are extremely similar (around 90 % amino acid identity) and almost all amino acid substitutions are highly conservative, again suggesting an essential function.

The SPP30 plant gene as well as the ESTs from *Arabidopsis*, maize, rice, and aspen are more closely related to the *P. falciparum* 41-2 antigen than to the yeast gene, which has two large insertions (one immediately N-terminal and a second one in the middle of the protein). Interestingly, Apicomplexan parasites, closely related to dinoflagellate algae, possess a vestigial plastid that has been hypothesized to be a non-photosynthetic derivative of the dinoflagellate plastid [18, 19]. The presence of this vestigial plastid in *P. falciparum* prompted us to verify if the 41-2 antigen was encoded within the *P. falciparum* 35 kb circular plastid DNA. No match could be found, thus, the 41-2 antigen in *P. falciparum* is nuclear encoded.

Hydrophilicity plots revealed the presence of a hydrophobic region of 11 amino acids flanked by negatively charged residues in the N-terminal region for all SPP30 homologs (underlined in Figure 3). This region was suggested to be a signal peptide targeting sequence for the *P. falciparum* 41-2 surface antigen, which is localized, by immunoelectron microscopy, mainly on the schizont membrane, on the internal surface of the parasitized erythrocyte, and on membranous structures in the erythrocyte cytoplasm [13]. Western blot analysis showed that the 41-2 antigen migrates at a molecular weight of 29 kD, suggesting that the protein is post-translationally modified.

N-glycosylation sites are present on both SPP30 and the 41-2 antigen, but are not conserved in their positions. In addition to the signal sequence, the 41-2 antigen has two other hydrophobic regions (amino acid region 73-85 and 130-147, 41-2 antigen numbering) that have been postulated to play a role in membrane anchoring, as the protein is localized mainly to membranes. These two hydrophobic domains are also present in the SPP30 deduced amino acid sequence at the corresponding positions in the protein.

Expression pattern of the SPP30 cDNA clone also indicates that it most probably encodes a very basic cellular function as it is expressed in all tissues with the exception of pollen and pollen tubes. SPP30 is highly expressed in very metabolically active tissues where cellular differentiation is taking place, as in fertilized pistils where SPP30 mRNA levels were transiently increased around fertilization time (Figure 4 and 5). Wounding which promotes the growth of new tissues, also induced SPP30 mRNA accumulation (Figure 6).

Phytohormones are known to have profound effects on floral development, fertilization and fruit development. Of the hormonal treatments, IBA had the strongest effect on SPP30 mRNA accumulation in pistils. Auxins, in general, are known to be capable of inducing parthenocarpic fruit development in many Solanaceous species [10]. In our hands, IBA treatment consisting of imbibing the stigma surface with a 1% IBA solution, consistently gave fruits, albeit of smaller than normal size, and absolutely seedless (data not shown). Of the phytohormone treatments, IBA had the strongest effect on SPP30 mRNA levels in pistils (Figure 7). Treatments with IAA were ineffective in promoting fruit development under the same experimental conditions, and only slightly increased SPP30 mRNA levels in sprayed pistils (Figure 7). These results suggests that cellular differentiation induced either by wounding, fertilization, or parthenocarpic fruit development might be triggering the accumulation of SPP30 mRNAs. Membrane localization of the 41-2 antigen in *P. falciparum* schizont and in

parasitized erythrocytes, as well as conservation of putative membrane anchoring domains with the SPP30 protein, suggest that the plant SPP30 protein might also be associated with membranes. Higher SPP30 mRNA levels in very active tissues, like ovaries following fertilization, would be consistent with a role in membrane synthesis or structure.

Although of unknown function, the very high level of sequence conservation among SPP30 plant homologs in both monocots and dicots, combined with the presence of a similar gene in both yeast and *Plasmodium falciparum*, suggest an ancient and essential cellular function for the SPP30 gene. To understand the role of this gene in plant development, transgenic plants overexpressing the SPP30 cDNA in either sense or anti-sense orientation are currently being produced.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *S. chacoense* SPP30 cDNA.

The sequence of the coding strand of the SPP30 cDNA insert is shown together with the deduced amino acid sequence. The start of translation was chosen as the first methionine in the sequence, which is also in good agreement with the plant and animal (ACAATGGC) initiation context [9].

### Figure 2

DNA gel blot analysis of the SPP30 gene.

Genomic DNA (10 µg) isolated from *S. chacoense* leaves was digested with Eco RI or Sac I restriction enzymes and probed with the complete Eco RI/Xho I SPP30 cDNA insert. Molecular weight markers appear on the left.

### Figure 3

Alignment of the SPP30 deduced protein sequence with the *Plasmodium falciparum* and yeast homologs (Genbank accession numbers J04656 and U33050 respectively). The underlined region correspond to the hydrophobic domain of 11 amino acids flanked by negatively charged residues (D or E) in the N-terminal region that was previously suggested to be a signal peptide targeting sequence for the *P. falciparum* 41-2 surface antigen [13].

**Figure 4**

RNA gel blot analysis of SPP30 transcript levels in mature tissues.

Upper panel. Ten  $\mu\text{g}$  of total RNA from various tissues were probed with the 1.0 kb complete Eco RI/Xho I SPP30 cDNA insert.

Lower panel. Same as upper panel except that the membrane was stripped and reprobed with an 18S ribosomal cDNA probe from *S. chacoense*.

**Figure 5**

Temporal expression pattern of SPP30 mRNA levels in pistil tissues during a compatible pollination.

SPP30 transcript levels were determined by RNA gel blot analysis following a compatible pollination (pollen from a  $S_{11}S_{12}$  genotype, female recipient from a  $S_{13}S_{14}$  genotype).

Upper panel. Ten  $\mu\text{g}$  of total RNA from whole pistil (stigma, style and ovary) were collected at various times after pollination and probed with the 1.0 kb SPP30 cDNA insert.

Lower panel. Same as upper panel except that the membrane was stripped and reprobed with an 18S ribosomal cDNA probe from *S. chacoense*.

**Figure 6**

Effect of pollination and wounding on SPP30 mRNA levels.

SPP30 transcript levels were determined by RNA gel blot analysis of wounded tissues two days post-wounding (DPW) or two days post-pollination (DPP). Ten  $\mu\text{g}$  of total RNA from various tissues were probed with the 1.0 kb SPP30 cDNA insert. Styles were either pollinated or slightly crushed with tweezers and collected two days later (DPP and DPW respectively). Unpollinated and unwounded styles served as controls.

Ovaries from the same pistils were also collected two days after either pollination (2 DPP) or wounding (2 DPW).

Lower panel. Same as upper panel except that the membrane was stripped and reprobed with an 18S ribosomal cDNA probe from *S. chacoense*.

### **Figure 7**

Effect of hormonal treatments on *S. chacoense* flowers.

Upper panel. SPP30 transcript levels were determined by RNA gel blot analysis of unpollinated pistil tissues collected 48 h after various hormonal spray treatments (10  $\mu$ M solutions). Ten  $\mu$ g of total RNA from whole pistil (stigma, style and ovary) were probed with the 1.0 kb SPP30 cDNA insert.

Lower panel. Same as upper panel except that the membrane was stripped and reprobed with an 18S ribosomal cDNA probe from *S. chacoense*.

**Table 1:** Percentage of nucleotide and amino acid sequence identities between the *S. chacoense* SPP30 cDNA and plant ESTs.

	<i>S. chacoense</i>	<i>Arabidopsis</i>	Aspen	Rice	Maize
<i>S. chacoense</i>	100	77 (87) <sup>1</sup>	80 (90) <sup>2</sup>	74 (87) <sup>3</sup>	78 (96) <sup>4</sup>
<i>Arabidopsis</i>		100	76	73	72
Aspen			100	73	76
Rice				100	84
Maize					100

The maize EST came from an inflorescence (immature ear) cDNA library (GenBank accession number AI065654). The rice EST came from a root cDNA library (GenBank accession number D24245). The *Arabidopsis thaliana* EST came from a mixed tissue cDNA library (GenBank accession number T88475). The hybrid aspen (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) EST came from a meristematic cambial zone cDNA library (GenBank accession numbers AI165198 and AI162891). <sup>1</sup>Partial sequence of 168 aa (5' and 3' regions of the EST combined). <sup>2</sup>Partial sequence of 80 aa. <sup>3</sup>Partial sequence of 97 aa. <sup>4</sup>Partial sequence of 124 aa.

## **METHODS**

### **Plant Material**

The diploid ( $2n=2x=24$ ) *Solanum chacoense* Bitt. self-incompatible genotypes used include line PI 458314 (which carries the  $S_{11}$  and  $S_{12}$  self-incompatibility alleles) and line PI 230582 (which carries the  $S_{13}$  and  $S_{14}$  alleles) were originally obtained from the Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, WI). Plants were grown in greenhouses with 14 h of light per day.

### **Library construction and screening**

The pollinated pistil cDNA library was made from 5  $\mu$ g of poly(A)<sup>+</sup> mRNA isolated from pistils 48 h post-pollination in the ZAP express pBK vector following the manufacturer's instructions (Stratagene, LaJolla, CA). The subtracted cDNA library was made by suppression subtractive hybridization (PCR-select, Clontech, Palo Alto, CA) with 2  $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup> mRNA from 48 h post-pollination pistils as tester mRNAs and 2  $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup> mRNA from unpollinated pistils as driver mRNAs. The subtracted cDNA pool was PCR amplified, radiolabeled and used to screen the ZAP-pBK 48 h post-pollination library. Hybridizing phage plaques were cored and after *in vivo* excision, tested individually by RNA slot blot analysis [27] to confirm their induction by pollination and fertilization.

### **Isolation and gel blot analysis of RNA and DNA**

Total RNA was isolated as described previously [12]. Polyadenylated RNA was prepared by Oligo (dT) spin column chromatography as described in the mRNA

separator kit protocol (Clontech, Palo Alto, CA). RNA concentration was determined by measuring its absorbance at 260 nm and verified (adjusted if necessary) by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. To confirm equal loading of total RNA on RNA gel blots, a 1 kb fragment of the *S. chacoense* 18S RNA was PCR amplified and used as a probe. The oligonucleotides used (5'-TCGATGGTAGGATAGTGGC-3' and 5'-GCATAGCTAGTTAGCAGG-3') were derived from highly conserved regions determined from a ClustalW alignment of 18S RNA sequences from *S. avicular*, *S. lycopersicon*, *S. melongena*, *S. petophyllum* and *S. tuberosum*. Genomic DNA isolation was performed via a modified CTAB extraction method [20, 24]. DNA gel blot analysis, including restriction, electrophoresis and capillary transfer to a positively charged nylon membrane, (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, QC) were performed as described in Sambrook *et al.* (1989). Hybridization of the membrane was performed under high stringency conditions at 65°C as described by Church and Gilbert [4] for 16 to 24 h and following hybridization, the membrane was washed at room temperature, once with 4X SSC / 0.1% SDS for an hour, twice with 1X SSC / 0.1% SDS at 50°C for 30 min. and twice with 0.1X SSC / 0.1% SDS at 55 °C for 30 min. (1X SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0). RNA gel blot analyses were performed as described in Sambrook *et al.* (1989), following the formaldehyde denaturing protocol. RNAs were capillary transferred to Hybond N+ nylon membranes and cross-linked (120 mJ/cm<sup>2</sup>) with a Hoefer UVC 500 UV Crosslinker. Hybridization of the membranes was performed under high stringency conditions at 45°C in 50% deionized formamide, 5X Denhardt solution, 0.5% SDS, 200 µg/ml denatured salmon sperm DNA and 6X SSC for 16 to 24 h. Following

hybridization, the membranes were washed at room temperature once with 2X SSC / 0.1% SDS for an hour, twice with 1X SSC / 0.1% SDS at 50°C for 30 min and twice with 0.1X SSC / 0.1% SDS at 55°C for 30 min. Probes for both DNA and RNA gel blot analysis were synthesized from random-labeled isolated DNA inserts (Roche Diagnostic, Laval, Qc) with  $\alpha$ -P<sup>32</sup> dCTP (ICN Biochemicals). The membranes were autoradiographed at -85°C with one intensifying screen on Kodak Biomax MR film (Interscience, Markham, Ont).

### **Phytohormone and wounding treatments**

Flowers were locally sprayed with aqueous solutions of either indole-acetic acid (IAA), indole-butyric acid (IBA), naphthalene-acetic acid (NAA), abscissic acid (ABA), gibberellin (GA<sub>3</sub>), etephon, or kinetin once per day on two consecutive days, and pistils were collected for total RNA isolation 48 h after the first treatment. All phytohormones were purchased from Sigma/Aldrich (Oakville, Ont) and sprayed as 10  $\mu$ M solutions. For wounding, a small forceps was used to slightly crush leaves and styles, and tissues were harvested 48 h after the wounding. Tubers were sliced and incubated in a moist petri dish also for 48 h.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by Le Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Québec). We thank Sylvain Lebourrier and Gabriel Téodorescu for plant care and maintenance, and Dr. Dwight U. Beebe for critically reviewing the manuscript.

1. Chandra-Sekhar KN, Heij EG: Changes in proteins and peroxidases induced by compatible pollination in the ovary of *Nicotiana tabacum* L. ahead of the advancing pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* 8: 369-374 (1995).
2. Chen F, Hayes PM, Mulrooney DM, Pan A: Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell* 6: 835-843 (1994).
3. Cheung AY: The pollen tube growth pathway: its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sex. Plant Reprod.* 9: 330-336 (1996).
4. Church GM, Gilbert W: Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995 (1984).
5. Clarke AE: Fertilization and early embryo development in the potato. *Am. Potato J.* 17: 20-25 (1940).
6. Diatchenko L, Chris Lau Y-F, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030 (1996).
7. Dong Y-H, Kvarnheden A, Yao J-L, Sutherland PW, Atkinson RG, Morris BA, Gardner RG: Identification of pollination-induced genes from the ovary of apple (*Malus domestica*). *Sex. Plant. Reprod.* 11: 277-283 (1998).
8. Dong Y-H, Zhan X-C, Kvarnheden A, Atkinson RG, Morris BA, Gardner RG: Expression of a cDNA from apple encoding a homologue of DAD1, an inhibitor of programmed cell death. *Plant Sci.* 139: 165-174 (1998).

9. Fütterer J, Hohn T: Translation in plants-rules and exceptions. *Plant Mol. Biol.* 32: 159-189 (1996).
10. Gustafson FG: Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 22: 628-636 (1936).
11. Hildmann T, Ebneith M, Pena-Cortés H, Sanchez-Serrano JJ, Willmitzer L, Prat S: General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170 (1992).
12. Jones JDG, Dunsmuir P, Bedbrook J: High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.* 4: 2411-2418 (1985).
13. Knapp B, Hundt E, Küpper HA: A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* transported to the erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 47-56 (1989).
14. Kranz E, Dresselhaus T: In vitro fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends in Plant Science* 1: 82-89 (1996).
15. Li H-Y, Gray JE: Pollination-enhanced expression of a receptor-like protein kinase related gene in tobacco styles. *Plant Molecular Biology* 33: 653-665 (1997).
16. 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. *Plant Cell* 9: 1757-1766 (1997).
17. Matton DP, Nass N, Clarke A, E., Newbigin E: Self-incompatibility: How plants avoid illegitimate offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1992-1997 (1994).
18. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N: Plastid in human parasites. *Nature* 381: 482 (1996).

19. McFadden GI, Waller RF, Reith ME, Lang-Unnasch N: Plastids in apicomplexan parasites. *Pl. Syst. Evol. Suppl.* 11: 261-287 (1997).
20. Murray MG, Thompson WF: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8: 4321-4325 (1980).
21. O'Neill SD, Nadeau JA, Zhang XS, Bui AQ, Halevy AH: Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell* 5: 419-432 (1993).
22. Pena-Cortés H, Sanchez-Serrano JJ, Mertens R, Willmitzer L, Prat S: Abscisic acid is involved in the woud-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9851-9855 (1989).
23. Ray S, Park S-S, Ray A: Pollen tube guidance by the female gametophyte. *Development* 124: 2489-2498 (1997).
24. Reiter RS, Young RM, Scolnik PA: Genetic linkage of the Arabidopsis genome: methods for mapping with recombinant inbreds and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). In: Koncz C, Chua N-H, Schell J (eds) *Methods in Arabidopsis Research*, pp. 170-190. World Scientific Publishing Co., Singapore (1992).
25. Reymond P, Farmer EE: Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current. Opin. Plant Biol.* 1: 404-411 (1998).
26. Russell SD: Double fertilization. *International review of cytology* 140: 357-388 (1992).
27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
28. Sanders LC, Lord EM: Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. *Science* 243: 1606-1608 (1989).

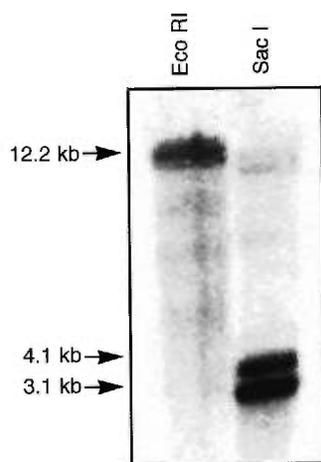
29. van Eldik GJ, Reijen WH, Ruiter RK, van Harpen MMA, Schrauwen JAM, Wullems GJ: Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant Journal* 11: 105-113 (1997).
30. van Eldik GJ, Ruiter RK, Colla PHWN, van Harpen MMA, Schrauwen JAM, Wullems GJ: Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. *Plant Molecular Biology* 33 (1997).
31. Wang H, Wu H-M, Cheung AY: Development and pollination regulated accumulation and glycosylation of a stylar transmitting tissue-specific proline rich protein. *Plant Cell* 5: 1639-1650 (1993).
32. Wang H, Wu H-m, Cheung AY: Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant Journal* 9: 715-727 (1996).
33. Wasternack C, Parthier B: Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* 2: 302-307 (1997).
34. Watts FZ, Butt N, Layfield P, Machuka J, Burke JF, Moore AL: Floral expression of a gene encoding an E2-related ubiquitin-conjugating protein from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 26: 445-451 (1994).
35. Wilhelmi LK, Preuss D: Blazing new trails. *Plant Physiology* 113: 307-312 (1997).
36. Williams EJ: Seed failure in the Chippewa variety of *Solanum tuberosum*. *Bot. Gaz.* 10: 10-15 (1955).
37. Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C: Lipids are required for directional pollen tube growth. *Nature* 392: 818-821 (1998).

38. Zhang XS, O'Neill SD: Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* 5: 403-418 (1993).

## Lantin, O'Brien &amp; Matton, Fig. 1

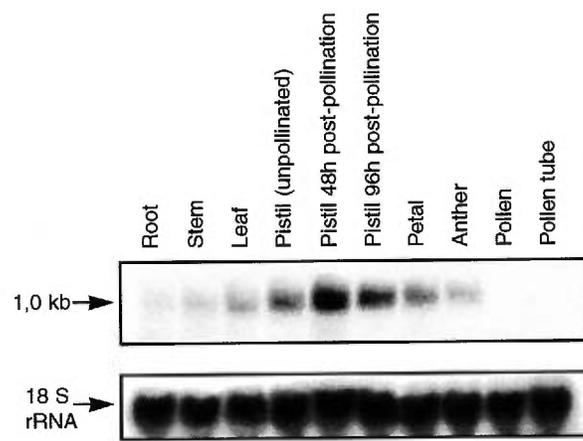
GACATTACAGTGCTAAGCGATCTAGAGAGAGAGTTGAAGGAAGAAGATGATAAAATGTAGG 60  
M I N V G  
GAAGATCAAACAGTACTCAAATGTTCTTGAGAGACCCCTCAGCAAAGGCAAACAAGAGGT 120  
K I K Q Y S N V L E R P L S K G K Q E V  
CAGTTTGAGTGCCTTTTGGCTTCTGTTTTTCGGAGCTTGTTCAGTACAATCAAACCTCAAGT 180  
S L S A F A F L F S E L V Q Y N Q T Q V  
GGACAACATTAAGTGAATTAGAGCGAAGGTTAGAGGATGCTGGCTATGCGGTTGGAGCCCG 240  
D N I T E L E R R L E D A G Y A V G A R  
AATTTTAGAATCTCTGCCATAGGGAAAAGGGAAACAGAAGGGAGACGGACTACTGGG 300  
I L E L L C H R E K G N R R E T R L L G  
TATATATCATTTTGTGCATAGCACACTATGGAAGTTTTGTTGGGAAGGTTGCTGACTC 360  
I L S F V H S T V W K V L F G K V A D S  
TCCTGAGAAAGGCACTGAACATGAAGATGAATATATGATAGTGAGAAGGAGCTCCTTGT 420  
L E K G T E H E D E Y M I S E K E L L V  
CAACAGATTCATTTCAATTCAAAAGATATGGGTGCTTTCAACTGCGGCAGTTTCGTTGC 480  
N R F I S I P K D M G A F N C G S F V A  
GGGTATTGTAAGGGGAGTTCTTGAAAATGCAGGTTTCCAGCAGTAGTGACAGCTCATT 540  
G I V R G V L E N A G F P A V V T A H F  
TGTTCTGTGGAGGGGCGACCGACCCCGGACAAATTTTGATAAAAATTTGCTGAAGA 600  
V P V E G Q H R P R T T I L I K F A E E  
GGTACTAAGAAGGGAAGCAACTAGGTTGATGTTTTATTGGCCATTTATTTGGTGCAAA 660  
V L R R E A T L G \*  
ATCCTTGAAACAACATTTATGATGAGATGACAAATGAAAGATCCCTTTGATTTGTTCAACACAT 720  
CTTAGGTTCAATGTCAAATCCTAAGATCATACAATTCGCCAGTTGTGACATATTTCTATAG 780  
TACTATAGTTGACTTGTTCATGCAATCTTAGGTTTACCCCGATAAATGTAATCAAAACAT 840  
CAAGCATTTATCTCTTTGGTGTAAAAATTTTGCACCTTGGAAAGGTGATTTCTGGAAT 900  
TTATCTTCTTGTGATGAGCTATGAGTAGAAAGTTATTTGAGACAAGTTAAAAAATTTTTAAAA 960

Lantin, O'Brien & Matton, Fig. 2

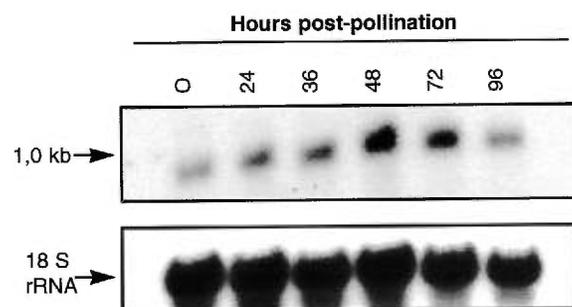




Lantin, O'Brien & Matton, Fig. 4

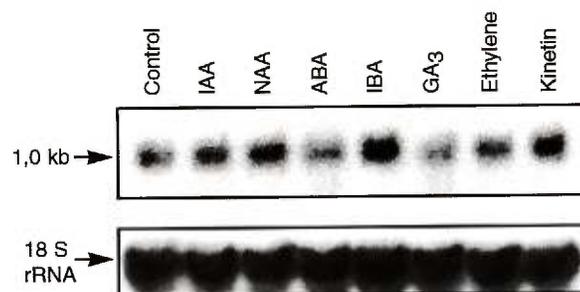


Lantin, O'Brien &amp; Matton, Fig. 5





Lantin, O'Brien & Matton, Fig. 7



## 9. REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon infatigable voisin de "bench", Martin O'Brien, avec qui j'ai eu tant de plaisir à partager la science avec ce qu'elle comporte d'expériences, mais aussi de vaisselle... Pour ton aide, toujours généreuse, mais aussi pour ta belle amitié, merci le "petit Martin".

Je remercie également M. Félix Forest, pour tous les merveilleux moments que nous avons passé ensemble à "plâtrer" dans les corridors de l'institut. Cette belle rencontre fut, nous en sommes convaincus, le début d'un rapprochement entre deux mondes que ne séparait pourtant qu'un escalier.

Un petit clin d'œil à notre intarissable Sylvain Lebeurrer, qui en plus de prendre bien soin de nos "patates", prenait le temps de nous raconter les gens et les cultures d'ailleurs. Merci de nous avoir fait profiter de votre si bel amour des plantes.

Merci également à mes parents pour leur appui et leurs encouragements, et spécialement à mon père qui plus d'une fois m'a ramassée à la petite cuillère et me rappelait que les plus grosses montagnes se gravissent toujours un pas à la fois. Votre amour est ce que j'ai de plus précieux.

Finalement, un merci tout particulier à mon professeur, Daniel Philippe Matton, auprès de qui j'ai appris l'amour de la science, parce que toujours par sa rigueur et ses exigences, il a su me faire me dépasser bien au-delà de ce que j'aurais parfois cru possible. C'est donc non seulement une solide formation technique que je garde de mon passage auprès de lui, mais également la fierté de pouvoir faire maintenant moi aussi, des "ARN de Boss"! Merci Daniel pour ta grande disponibilité, mais aussi pour ne jamais abandonner et ainsi nous laisser croire que le mot "impossible" n'existe pas.