

2 mil. 2824. 3

Université de Montréal

**Recherche du gène *Pollen S* des *Solanaceae* par une
représentation différentielle des ARNm et caractérisation de la
S-RNase S₁₄ chez *Solanum chacoense* Bitt.**

Par

Martin O'Brien

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.)

Août 2000

© Martin O'Brien, 2000



QK

3

U54

2000

V.006



Page d'identification du jury

*Université de Montréal
Faculté des études supérieures*

Ce mémoire intitulé:

***Recherche du gène Pollen S des Solanaceae par une
représentation différentielle des ARNm et caractérisation de la
S-RNase S₁₄ chez Solanum chacoense Bitt.***

Présenté par:

Martin O'Brien

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Normand Brisson, président-rapporteur

Dr Vincenzo De Luca, membre du jury

Dr Mario Cappadocia, directeur de recherche

Dr Daniel P. Matton, directeur de recherche

Mémoire accepté le: 13 octobre 2000

SOMMAIRE

Au cours de l'évolution, certaines plantes ont évolué de manière à exclure l'apport de leur propre pollen lors de leur reproduction sexuée. En augmentant le brassage du matériel génétique de sa descendance, ce type de plante aura donc, comme avantage, la possibilité de coloniser des niches écologiques plus vastes et diversifiées. Les plantes ont recours à diverses stratégies afin d'augmenter la variabilité génétique: La séparation des sexes dans l'espace (dioécie) et dans le temps (protandrie et protogynie) sont des exemples de mécanismes favorisant les fécondations croisées. Chez les solanacées, un système basé sur la reconnaissance biochimique du pollen et du pistil, l'auto-incompatibilité, permet le maintien de l'hétérogénéité génétique. Effectivement, une protéine à la propriété ribonucléasique (S-RNase) est exprimée au niveau de l'organe femelle, le style, et y agirait comme barrière en provoquant le rejet systématique du pollen provenant d'une même plante ou d'une plante génétiquement identique. Le gène codant pour la S-RNase se retrouve sous une forme pluri-allélique, c'est à dire que plus d'une forme du même gène existe dans une population de cette plante. Plus il y a de formes alléliques, plus la possibilité de croisement avec d'autres individus est accrue. Il a été démontré que cette protéine était suffisante et nécessaire, dans le style, pour permettre la reconnaissance du pollen portant un même allèle d'auto-incompatibilité. La S-RNase agit de manière à empêcher la croissance du tube pollinique dans le style. Cette reconnaissance biochimique implique nécessairement qu'il existe également une contrepartie pollinique exprimée au niveau du pollen (le gène Pollen-S) et qui se retrouverait, elle aussi, sous une forme multi-allélique. Malgré des efforts considérables dans plusieurs laboratoires, aucun candidat n'a été isolé. Au niveau génomique, ces deux parties doivent nécessairement se trouver à proximité l'une de l'autre, afin de minimiser les chances de ségrégation des deux allèles par crossing-over des chromosomes.

Mon projet de maîtrise s'inscrit dans cette problématique d'isolement du gène Pollen-S. Pour se faire, nous avons utilisé une technique de représentation différentielle des ARN afin de trouver des candidats possibles pour les diverses formes alléliques de

Pollen-S. Les ARNm de tubes polliniques *in vivo* et *in vitro*, de deux génotypes portant des allèles S différents, ont été comparés les uns aux autres. De cette expérimentation, 518 candidats ont montré un patron d'expression différentiel entre les deux génotypes à l'étude, ces candidats devront passer par des séries d'expérimentations qui auront pour but d'éliminer tous les faux positifs. Premièrement, près de 90% des candidats les plus probables ont pu être éliminés par analyse de type reverse northern. Cette technique se résume par l'adhésion sur membranes, en duplicata, des candidats, suivie d'une hybridation avec une sonde d'ARNm de tube polliniques provenant de l'un ou l'autre génotype à l'étude. Les candidats montrant une expression différentielle ou une absence d'expression, 47 en tout, sont par la suite analysés par analyse de type northern. Un seul candidat démontrait une expression différentielle à cette étape. Ce dernier, le candidat Gt 123, est uniquement exprimé dans les tissus reproducteurs mâles, mais n'est pas lié au locus S, c'est à dire qu'au niveau d'une population d'individus, ce gène n'est pas spécifiquement associé à une ou l'autre des S-RNases. Étant donné que le gène Pollen-S doit être lié au locus S, Gt 123 n'est donc pas le déterminant mâle, et ce, malgré le fait que ce gène ont montré un polymorphisme au sein de cette même population.

Nous décrivons également la caractérisation d'une S-RNase S₁₄, un allèle pour lequel seul un petit fragment d'ADN génomique était disponible dans le laboratoire. Suite à l'obtention d'un clone pleine longueur, nous avons pu constater que ce gène répondait de la même manière que d'autres S-RNase décrites dans la littérature. Effectivement, l'allèle S₁₄ est exprimé dans le style de manière développementale montrant un pic d'expression un jour avant l'anthèse. Le transcrit de ce gène est faiblement exprimé dans l'ovaire et démontre un plus grand niveau d'expression dans la portion stigmatique du style. De plus, nous avons constaté que l'expression de ce gène était maintenue constante suite à une pollinisation incompatible. L'allèle S₁₄ montre une forte homologie de séquences avec un allèle non-fonctionnel d'une espèce de tomate sauvage. Nous aborderons les aspects évolutifs de cette ressemblance.

TABLe DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLe DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
DÉDICACE	xvii
1 INTRODUCTION;	1
1.1 Conquête du milieu par la reproduction sexuée	1
1.2 Accroissement de l'hétérogénéité génétique par l'auto-incompatibilité	1
1.3 Les types d'auto-incompatibilité homomorphiques	3
1.3.1 Modèles génétiques et moléculaires de l'incompatibilité sporophytique	3
1.3.2 L'incompatibilité gamétophytique chez certaines Monocotylédones	4
1.3.3 L'incompatibilité gamétophytique des Papavéracées	4
1.3.4 Incompatibilité gamétophytique et modèle génétique des Solanaceae	5
1.4 Caractéristiques et propriétés moléculaires des S-RNases	7
1.5 Modèles théoriques du gène Pollen-S	9
1.6 Caractère évolutif du locus S	11
1.6.1 Organisation du locus S	11

1.6.2	<i>Origine de l'auto-incompatibilité chez les plantes à fleurs</i>	12
1.6.3	<i>Origine de la diversité allélique</i>	13
1.6.4	<i>Genèse de nouveaux allèles S</i>	13
1.6.5	<i>Ressemlance avec les mécanismes de défense contre les pathogènes</i>	15
1.6.6	<i>Hypothèse sur les protéines recrutées par le système d'auto-incompatibilité</i>	16
1.7	<i>Présentation du projet de recherche</i>	17
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
2.1	<i>Matériel végétal</i>	18
2.2	<i>Soins et entretien des plantes</i>	18
2.3	<i>Pollinisations des plantes</i>	18
2.4	<i>Culture in vitro de tubes polliniques</i>	19
2.5	<i>Fixation, préparation et observation au microscope des tissus pollinisés</i>	19
2.6	<i>Extraction d'ADNg, quantification et amplification par PCR</i>	20
2.7	<i>Séquençage</i>	21
2.8	<i>Analyse de type Southern</i>	21
2.8.1	<i>Transfert de l'ADN sur membrane</i>	21
2.8.2	<i>Pré-incubation et incubation des membranes</i>	22
2.8.3	<i>Lavage et exposition des membranes</i>	22
2.9	<i>Extraction des ARN totaux et des ARN messagers</i>	23
2.10	<i>Analyse de type northern</i>	23
2.10.1	<i>Transfert de l'ARN sur membrane</i>	23

2.10.2	<i>Pré-hybridation et hybridation des northernns</i>	23
2.10.3	<i>Lavage et exposition des northernns</i>	24
2.10.4	<i>Évaluation de la quantité équivalente d'ARN entre les échantillons</i>	24
2.11	<i>Analyse de type slot blot</i>	25
2.12	<i>Obtention du clone complet de l'allèle S_{14}</i>	25
2.13	<i>Représentation différentielle des ARNm</i>	25
3.	RÉSULTATS	27
3.1	CHAPITRE 1 <i>Caractérisation d'une S-ribonucléase</i>	27
3.1.1	<i>Isolement d'un clone d'ADNc homologue à une S ribonucléase</i>	27
3.1.2	<i>Le clone SV3B-G12 est l'allèle S_{14} de <i>S. chacoense</i></i>	27
3.1.3	<i>Le clone S_{14} est un gène à copie unique</i>	29
3.1.4	<i>Identité et homologie de séquences avec la protéine S_{14}</i>	34
3.1.5	<i>Expression de S_{14} dans les tissus matures</i>	34
3.1.6	<i>L'expression de S_{14} décroît suite à une pollinisation compatible</i>	37
3.1.7	<i>S_{14} est régulé de manière développementale et graduelle</i>	37
3.2	CHAPITRE 2 <i>Analyse différentielle des ARNm et criblage des candidats</i>	40
3.2.1	<i>Logistique reliée à la représentation différentielle des messagers</i>	40
3.2.2	<i>Détermination du génotype des lignées utilisées</i>	41
3.2.3	<i>Établissement des conditions liées à la pollinisation</i>	42
3.2.4	<i>Représentation différentielle des ARNm</i>	42

3.2.5 Criblage des candidats	44
3.2.5.1 Première étape : Analyse globale de type slot blot	44
3.2.5.2 Deuxième étape : Analyse individuelle de type northern	50
3.2.5.3 Troisième étape : Analyse northern à sensibilité accrue	50
3.2.6 Le candidat Gt 123 n'est pas lié au locus S	52
3.2.7 Le candidat V 6 n'est pas lié au locus S	54
4. DISCUSSION	56
4.1 L'allèle S_{14} de <i>Solanum chacoense</i>	56
4.1.1 Séquençage et homologie de séquences du clone S_{14}	56
4.1.2 Expression tissulaire du clone S_{14}	57
4.1.3 Expression développementale du clone S_{14}	58
4.1.4 Expression différentielle du clone S_{14} selon le type de pollinisation	59
4.2 Recherche du gène Pollen-S	61
4.2.1 Représentation différentielle des ARNm	61
4.2.2 Criblage des candidats obtenus	61
4.2.3 Hypothèses sur les causes d'échecs de la technique	63
4.2.4 Le gène Pollen-S (SCR) chez <i>Brassica campestris</i>	64

4.2.5 Proposition d'une approche expérimentale pour isoler Pollen-S de <i>Solanum chacoense</i>	64
4.2.6 Représentation différentielle des ARNm chez les Brassicaceae	65
5. CONCLUSION	67
6. MONOGRAPHIE	69
7. BIBLIOGRAPHIE	70
8. REMERCIEMENTS	83

LISTE DES TABLEAUX

RÉSULTATS

CHAPITRE 1

Tableau 1: <i>Génotype des divers individus composant les populations P, SP, RA et RB.</i>	33
---	----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

- Figure 1:** **A-** Modèle génétique de l'incompatibilité gamétophytique des *Solanaceae*. 6
B- Modèle génétique de l'incompatibilité sporophytique des *Brassicaceae*.
- Figure 2:** Modèles hypothétiques du gène Pollen-S. 10
A- Récepteur spécifique.
B- Inhibiteur spécifique.

RÉSULTATS

CHAPITRE 1

- Figure 3:** Séquence de l'ADNc du clone S_{14} et traduction de ce dernier. 28
- Figure 4:** Prédiction du site de clivage, en N terminal, du peptide signal de la S-RNase S_{14} de *Solanum chacoense*. 30

- Figure 5:** **A-** Hybridation de type Southern, avec le clone S_{14} , sur quatre populations différentes. 31-32
B- Hybridation de type Southern, avec le clone S_{13} , sur quatre populations différentes.
- Figure 6:** Alignement de séquences peptidiques des cinq S-RNases les plus similaires au clone S_{14} de *Solanum chacoense*. 35
- Figure 7:** **A-** Dendogramme de l'alignement peptidique des allèles d'auto-incompatibilité semblables au clone S_{14} de *Solanum chacoense*. 36
B- Pourcentage d'identité des séquences peptidiques semblables au clone S_{14} de *Solanum chacoense*.
- Figure 8:** Hybridation de type northern de l'induction de S_{14} dans divers tissus de *Solanum chacoense*. 38
A- Induction de S_{14} dans des tissus matures.
B- Induction de S_{14} dans des styles pollinisés.
C- Induction de S_{14} dans des styles pollinisés avec du pollen compatible ou incompatible.

Figure 9: Hybridation de type northern de l'induction de S_{14} dans des tissus non-pollinisés de *Solanum chacoense*. 39

A- Induction de S_{14} dans le style et l'ovaire selon le stade d'anthèse.

B- Induction de S_{14} dans la portion inférieure et supérieure du style deux jours et un jour avant l'anthèse.

CHAPITRE 2

Figure 10: Progression des tubes polliniques (colorés au bleu d'aniline) dans le style de la lignée JP 230582 après six heures de pollinisation. Migration sur gel et détection, au bromure d'éthidium, de l'amplification par PCR qui a permis de confirmer le génotype des plantes mâles et femelles. 41

Figure 11: Hybridation de type northern de l'induction du gène $P1$ dans des tissus matures de *Solanum chacoense*. 43

Figure 12: Portion d'un gel de représentation différentielle des ARN messagers montrant quelques patrons d'expression typiques. 43

- Figure 13:** *Analyse de type slot blot de tous les candidats de l'analyse de représentation différentielle des messagers.* 45-49
- Figure 14;** *Hybridation de type northern sur tous les 47 candidats testés positifs suite à l'analyse précédente de type slot blot.* 51
- Figure 15:** *Hybridation de type northern sur les 3 candidats ayant démontré aucune expression suite à l'analyse précédente de mini-northern.* 52
- Figure 16:** **A-** *Hybridation de type Southern avec le clone Gt 123 (fragments de 1,9 et 2,5 kb) et S₁₄ (fragment de 1,6 kb), digestion avec Eco RV.* 53
B- *Hybridation de type northern de l'induction de Gt 123 dans des tissus matures de Solanum chacoense.*
C- *Séquence et traduction du fragment partiel du cDNA de Gt 123.*
- Figure 17:** *Hybridation de type Southern avec le clone V 6 et S₁₄ (fragments de 1,6 kb), digestion avec Eco RV.* 55

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Abréviations générales

α -dATP ³²	α -désoxyadénosine tri-phosphate
α -dCTP ³²	α -désoxycytosine tri-phosphate
°C	degré Celsius
μ g	microgramme
μ l	microlitre
μ M	micromolaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr 18S	acide ribonucléique ribosomal 18S
BAC	chromosome artificiel de bactéries
BSA	albumine de sérum bovin
CA	Californie
cm	centimètre
dATP	désoxyadénosine tri-phosphate
dNTP	désoxynucléotide tri-phosphate
Eco RV	endonucléase de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
Hind III	endonucléase de <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
M	molaire
MA	Manitoba
mJ	millijoule
ml	millilitre
mM	millimolaire
N	normal
Na ₂ HPO ₄	phosphate de sodium dibasique
NaCl	chlorure de sodium
ng	nanogramme
NH	New Hampshire
nm	nanomètre
NaOH	hydroxyde de sodium
ON	Ontario
PCR	"polymerase chain reaction"; réaction de polymérase en chaîne
pM	picomolaire
PVP	polyvinylpyrrolidone

QC	Québec
RNase	ribonucléase
RT-PCR	PCR avec rétro-transcription
SDS	dodécyl sulphate de sodium
SSC	citrate de sodium salin
Taq	polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TN	Tennessee
TX	Texas
UV	ultraviolet
WI	Wisconsin
YAC	chromosome artificiel de levure

Abréviations spécialisées

3'	extrémité 3' hydroxide (OH)
5'	extrémité 5' phosphate
ARC1	«arm repeat containing»
HT	«small asparagine-rich protein»
Hva	région hypervariable a
HVb	région hypervariable b
N	acide aminé asparagine
PP48	pistils pollinisés depuis 48 heures
S	acide aminé serine
S ₁₁	haplotype 11
S ₁₂	haplotype 12
S ₁₃	haplotype 13
S ₁₄	haplotype 14
SCR	«S-locus cystein rich protein»
SLG	«S-locus glycoprotein»
Sli	«S locus inhibitor»
SRK	«S-locus receptor kinase»
S-RNase	«self-incompatibility ribonuclease»; ribonucléase du système d'auto-incompatibilité
T	acide aminé thréonine
X	acide aminé quelconque
Wak1	«cell wall associated receptor kinase»

DÉDICACE

*Il me ferait un grand plaisir de dédier ce mémoire de maîtrise à une grand-maman des plus adorables. Pour son cœur en or, sa générosité et sa gentillesse :
un million de «je t'aime»!*

1. INTRODUCTION

1.1 Conquête du milieu par la reproduction sexuée

Afin d'assurer leur survie et la dispersion de leurs gènes, les plantes ont su innover en matière de reproduction, et ce, en adoptant des stratégies de propagation les plus diverses. Le brassage génétique, par la reproduction sexuée, permet le maintien de l'espèce dans un milieu en changement ainsi que la colonisation de nouvelles niches écologiques. Dans un premier temps, le brassage des gènes est rendu possible par la formation des gamètes lors de la méiose, à la ségrégation des chromatides et à l'échange de portions chromosomiques, via les « crossing over », ce qui permet une diversité étonnante de possibilités. Ce brassage des gènes est rendu optimal lorsqu'il y a fécondation de gamètes entre individus génétiquement différents.

De manière à propager leurs gènes sur de longues distances, la dispersion du pollen par le vent et les animaux, assure à certaines espèces la propriété d'effectuer un brassage des gènes avec des membres de la même espèce ou d'une espèce relativement proche. Quant à la dispersion des graines, issues de la fécondation, certaines plantes ont également évolué de façon à bénéficier d'agents de propagation permettant de conquérir des milieux éloignés. Quelle que soit la stratégie de reproduction sexuée adoptée par une plante, elle se résume toujours à un apport adaptatif qui assurera le maintien du patrimoine génétique de cette dernière.

1.2 Accroissement de l'hétérogénéité génétique par l'auto-incompatibilité

Au cours de l'évolution, certaines espèces végétales ont opté pour différentes stratégies favorisant les croisements entre individus génétiquement différents. Ces dernières ont évolué de manière à exclure l'apport de leur propre pollen lors de leur reproduction sexuée. En augmentant le brassage du matériel génétique de sa descendance, ce type de plante aura donc, comme avantage, la possibilité de coloniser des niches écologiques plus vastes et diversifiées, d'augmenter la vigueur de sa

progéniture et d'éviter l'accumulation de tares génétiques (Hosaka et Hanneman, 1998a). Ces plantes ont recouru à diverses stratégies afin d'augmenter la variabilité génétique : la séparation des sexes dans l'espace (dioécie et monoécie) et dans le temps (protandrie et protogynie) sont des exemples de mécanismes favorisant les fécondations croisées. Par ailleurs, d'autres espèces ont élaboré des stratégies biochimiques par lesquelles certaines molécules du pollen et du style permettent la reconnaissance du soi (de Nettancourt, 1977).

Chez les plantes à fleurs, plus de cinquante pour cent de toutes les familles contiennent des espèces qui sont stériles lorsqu'elles sont pollinisées par leur propre pollen, alors que leur fécondation est possible quand le pollen provient d'un autre individu de la même espèce. Les systèmes de reconnaissance du pollen génétiquement semblable sont appelés systèmes d'auto-incompatibilité. On distingue deux types principaux d'auto-incompatibilité, et ce, par l'apparence que prend la fleur dans une même espèce (de Nettancourt, 1977). Chez les espèces hétéromorphiques, comme *Fagopyrum esculentum*, où la distylie assure une barrière contre les croisements réciproques (Björkman, 1995), la longueur des organes reproducteurs mâles et femelles de la fleur différencie des formes distinctes entre individus. Une plante, portant une des morphologies florales possibles, ne peut recevoir le pollen d'une autre plante ayant le même type de morphologie. L'hétéromorphie est présente chez 24 familles et plus de 164 genres différents et implique plusieurs loci. Dans le cas des espèces à fleurs parfaites, homomorphiques, les fleurs au sein d'une espèce ont une morphologie identique. Ce système d'auto-incompatibilité regroupe plus de la moitié des angiospermes, représentées par six familles : *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Papaveraceae* et *Poaceae*. À l'exception des Poacées, une monocotylédone, un locus unique régule la reconnaissance du pollen génétiquement semblable. Le taux élevé de polymorphismes à ce locus, jusqu'à plus de 50 allèles différents chez *Brassica oleracea* (Brace *et al.*, 1994), assure, lors de la fécondation, l'hétérogénéité génétique d'une population. L'auto-incompatibilité serait à l'origine du succès évolutif des angiospermes, un succès caractérisé par le maintien de la diversité génique via la fécondation croisée.

1.3 Les types d'auto-incompatibilité homomorphiques

Deux types d'auto-incompatibilité sont rencontrés chez les espèces présentant des fleurs homomorphes. Chez les espèces qui démontrent un système d'auto-incompatibilité sporophytique, le pollen, quoique haploïde, porte les deux spécificités du parent diploïde d'origine (Figure 1b). Quant à l'auto-incompatibilité gamétophytique, l'identité du pollen est déterminée par un ou l'autre des allèles contenus chez le parent pollinisateur, et donc par le génotype du pollen même (Figure 1a).

1.3.1 Modèles génétiques et moléculaires de l'incompatibilité sporophytique

Chez les Brassicacées, l'auto-incompatibilité est de type sporophytique, où tous les composants participant à la reconnaissance sont liés à un locus unique. Le pollen porte les deux formes alléliques d'une protéine riche en cystéines (SCR, S-locus Cystein Rich protein). Il est à noter que cette découverte du déterminant mâle (Pollen-S) est toute récente et elle a été accomplie par marche chromosomique (Schopfer *et al.*, 1999) et par représentation différentielle des ARNm (Takayama *et al.*, 2000). Le stigmate, quant à lui, sécrète les deux formes alléliques d'une protéine glycosylée (SLG, S-Locus Glycoprotein) dans la paroi cellulaire et porte un récepteur trans-membranaire kinase de type sérine/thréonine (SRK, S-locus Receptor Kinase) (Figure 1b). Ces protéines stigmatiques présentent toutes deux différentes formes alléliques (Mc Cormick, 1998). Si l'une ou l'autre des formes alléliques de SCR, contenue dans la paroi du pollen, correspond à une forme allélique exprimée par le stigmate, il n'y a alors aucune hydratation du pollen, et le tube pollinique ne peut germer. Il semblerait que seule la contrepartie stigmatique SRK serait suffisante pour la reconnaissance de SCR (Takasaki *et al.*, 2000), cette reconnaissance s'effectuerait via le domaine récepteur extracellulaire, et aurait pour résultante la phosphorylation, par le domaine kinase, d'une protéine ARC1 (Arm Repeat Containing) (Stone *et al.*, 1999 et Gu *et al.*, 1998). Cette dernière serait le premier maillon connu d'une chaîne de signalisation ayant pour but l'activation de mécanisme d'inhibition de la germination du pollen génétiquement semblable. Quoique la protéine SRK soit suffisante pour une réponse d'auto-incompatibilité, la protéine SLG

accentuerait la reconnaissance (Tukasaki *et al.*, 2000) et faciliterait le mécanisme d'adhésion du pollen (Luu *et al.*, 1999).

1.3.2 L'incompatibilité gamétophytique chez certaines Monocotylédones

Déterminé par deux loci multi-alléliques (S et Z), le système d'auto-incompatibilité gamétophytique des Poacées se caractérise par le rejet du pollen lorsque ses deux allèles S et Z sont identiques à ceux du style. Le rejet du tube pollinique se fait dans la portion stigmatique du pistil (Li *et al.*, 1997). Les mécanismes génétiques et moléculaires de ce système particulier d'incompatibilité sont peu connus. Des patrons différentiels de protéines peuvent être observés entre les contenus protéiques de styles portant des allèles différents, mais sans pour autant en connaître leur identité (Tan et Jackson, 1988). On a longuement cru qu'on avait découvert l'une des deux contreparties polliniques, la protéine S de *Phalaris coerulescens* (Li *et al.*, 1994 et 1997). Il a été démontré dernièrement que ce gène, codant pour un peptide ayant une activité thioredoxine (Li *et al.*, 1995) n'est pas lié au locus S (Langridge *et al.*, 1999). Li *et al.* (1996) avaient pu associer la déficience de l'activité enzymatique, du domaine thioredoxine, chez un mutant naturel, qui a perdu ses mécanismes de reconnaissance au niveau du pollen et du style. Mais puisque ce gène se retrouve à environ deux centimorgans du locus S et que la portion N terminal de la protéine, qui semblait contenir le site hypervariable de reconnaissance (Li *et al.*, 1997), ne se retrouve pas dans tous les haplotypes, ce gène n'est plus considéré comme étant le déterminant S du pollen (Langridge *et al.*, 1999).

1.3.3 L'incompatibilité gamétophytique des Papavéracées

Le système gamétophytique d'auto-incompatibilité chez *Papaver rhoeas* est contrôlé par un locus unique et multi-allélique, qui serait composé d'un déterminant stylaire et d'un déterminant pollinique. Seule la contrepartie stylaire est présentement connue, cette dernière est une glycoprotéine très hydrophile qui serait sécrétée dans la matrice extracellulaire du style (Walker *et al.*, 1996). Aucune similarité de séquences n'a

été détectée (Humphrey *et al.*, 1994) et son fonctionnement reste encore inconnu (Kakeda *et al.*, 1998). Un des sept domaines de surface, le sixième, semblerait médier la reconnaissance spécifique (Kakeda *et al.*, 1998). À part ces travaux préliminaires de transgénèses le fonctionnement de reconnaissance demeure un mystère chez les *Papaveraceae*. Par contre, les cascades de transductions de signaux qui véhiculent l'information de reconnaissance à même le tube pollinique sont mieux caractérisées. En effet, le calcium est un élément important lié à la réponse d'auto-incompatibilité chez *Papaver rhoeas* (Franklin-Tong *et al.*, 1993), de plus, on sait que plusieurs protéines sont phosphorylées suite à cet événement (Rudd *et al.*, 1996 et 1997). À ce jour, on ne connaît pas la réponse la plus en aval qui provoque la mort cellulaire du tube pollinique suite à une pollinisation incompatible. Dans le même ordre d'idée, l'élément le plus en amont (Pollen-S) demeure également éluif, quoi que plusieurs indices laissent entrevoir un récepteur membranaire.

1.3.4 Incompatibilité gamétophytique et modèle génétique des *Solanaceae*

Chez les *Solanaceae*, les *Scrophulariaceae* et les *Rosaceae* le système d'auto-incompatibilité est de type gamétophytique. Le locus S, unique et polymorphique, est composé d'un gène codant pour une contrepartie stytaire aux propriétés ribonucléasiques (S-RNase) et un autre gène, exprimé dans le pollen, qui demeure encore inconnu (Pollen-S). Il y a reconnaissance et arrêt de la croissance du tube pollinique quand celui-ci porte le même allèle S que l'une ou l'autre des deux copies exprimées au niveau du style (Figure 1a) (Mc Cormick, 1998). Cet événement de reconnaissance se fait dans le premier tiers du style qui résulte en la déposition de callose à l'extrémité basale du tube pollinique suivi d'un gonflement et de l'éclatement de ce dernier (Matton *et al.*, 1994 et Kao et Mc Cubbin, 1996). Le pollen d'une plante $S_{11}S_{12}$ peut soit contenir l'une ou l'autre des deux allèles S_{11} ou S_{12} . Lorsque ceux-ci sont déposés sur la même plante ou une autre plante qui porte les mêmes allèles, il y a alors germination et croissance des tubes polliniques, mais ces derniers sont reconnus avant le premier tiers du style et y sont détruits (Figure 1a). Il est donc impossible de féconder les ovules dans ce type de

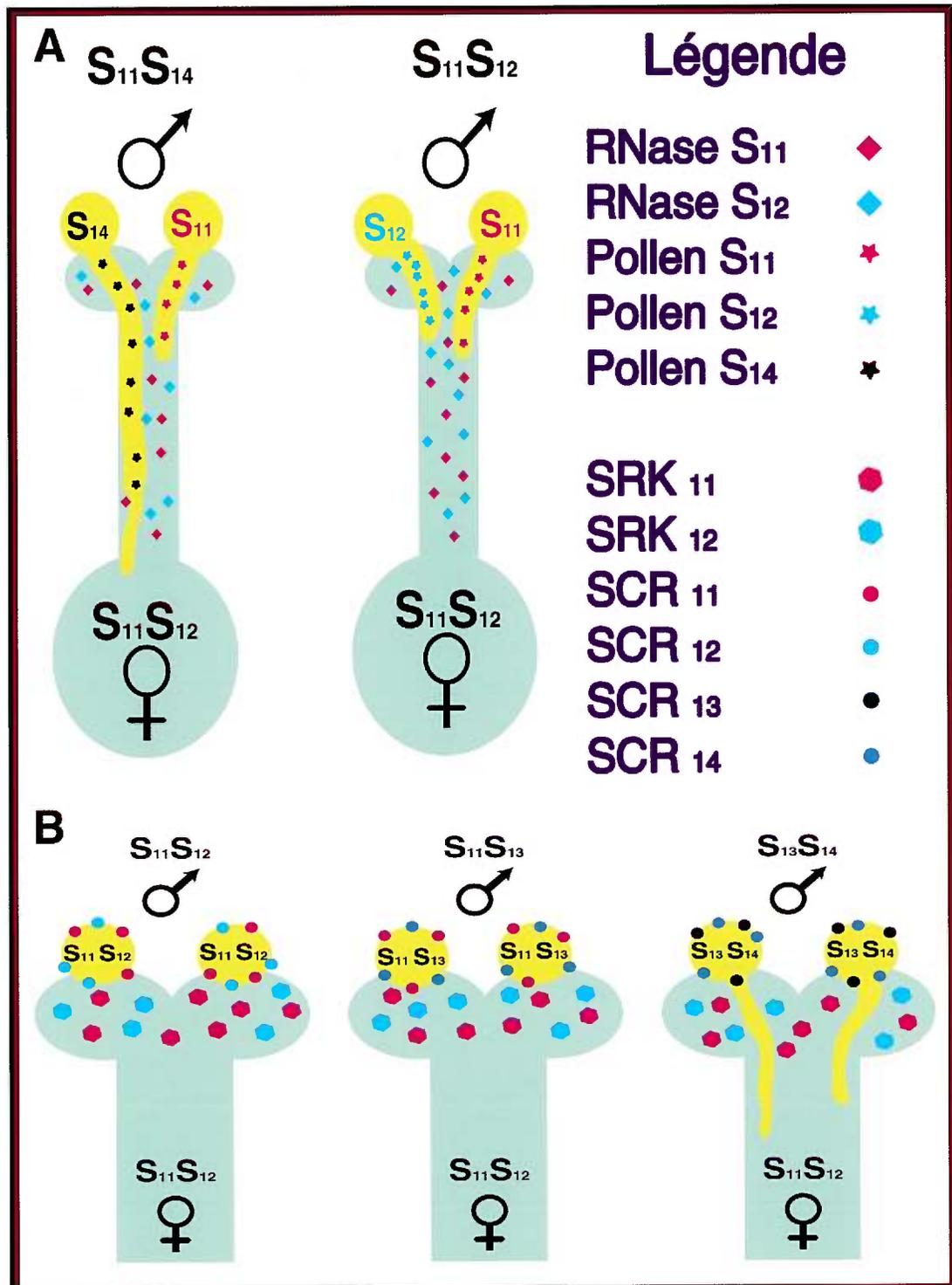


Figure 1: A- Modèle génétique de l'incompatibilité gamétophytique des *Solanaceae*.

B- Modèle génétique de l'incompatibilité sporophytique des *Brassicaceae*.

pollinisation, sauf pour des pollinisations forcées sur des styles immatures (Gradziel et Robinson, 1989). Dans le cas du pollen provenant d'une plante $S_{11}S_{14}$, ceux-ci ont soit une identité S_{11} ou S_{14} . Lorsque ce pollen est déposé sur le stigmate d'une plante $S_{11}S_{12}$, le pollen portant l'allèle S_{11} sera reconnu comme nous l'avons décrit précédemment. Par contre, le pollen qui dispose de l'allèle S_{14} pourra germer et la progression de la croissance du tube pollinique se fera sans obstacles, ce qui permettra ainsi la double fécondation dans l'ovule (Figure 1a). Les individus issus de ce croisement semi-compatible seront soit $S_{11}S_{14}$ ou $S_{12}S_{14}$. Dans le cas d'une pollinisation parfaitement compatible de pollen provenant d'un individu $S_{13}S_{14}$ par un parent récepteur femelle $S_{11}S_{12}$ il y aurait alors possibilité de fécondation par tous les tubes polliniques (non présentée). La composition allélique de la progéniture issue de ce croisement se présenterait sous quatre formes : $S_{11}S_{13}$, $S_{11}S_{14}$, $S_{12}S_{13}$ ou $S_{12}S_{14}$.

1.4 Caractéristiques et propriétés moléculaires des S-RNases

Clonées pour la première fois en 1986 (Anderson *et al.*, 1986), les glycoprotéines S, sécrétées à même la matrice extracellulaire du style, ont une masse moléculaire d'environ 30 kDa ainsi qu'un point isoélectrique basique. Le poids moléculaire de la protéine peut varier selon le nombre de sites de glycosylation, ces chaînes de glucides étant présentes sur les résidus asparagines de la protéine dans un contexte N-X-S/T (Woodward *et al.*, 1989 et Broothaerts *et al.*, 1991). Il a été démontré que les chaînes de sucres de la S-RNase ne sont pas nécessaires à la reconnaissance spécifique (Karunanandaa *et al.*, 1994). Les S-RNases sont exprimées abondamment dans la portion stigmatique du style et ce, quelques jours avant l'anthèse (Anderson *et al.*, 1986 et Mau *et al.*, 1986). Ce n'est qu'en 1989 que l'activité ribonucléasique de cette glycoprotéine a été démontrée (Mc Clure *et al.*, 1989 et 1990). Elle montre des ressemblances à la famille de RNases T2 présentes chez certains membres du règne des mycètes tel qu'*Aspergillus oryzae* et *Rhizopus niveus* (Kawata *et al.*, 1988 et Horiuchi *et al.*, 1988, respectivement). Toutes les S-RNases possèdent un peptide signal en N-terminal, ce dernier n'est pas présent dans la protéine mature sécrétée dans la matrice extracellulaire du style. Il a été démontré, par expression sens et anti-sens, que la

S-RNase est nécessaire et suffisante pour médier la réponse de reconnaissance spécifique de l'auto-incompatibilité. Le gain et la perte de fonction de cette protéine ont été testés chez *Petunia hybrida* (Lee *et al.*, 1994), *Nicotiana glauca* (Murfett *et al.*, 1994) et *Solanum chacoense* (Matton *et al.*, 1997).

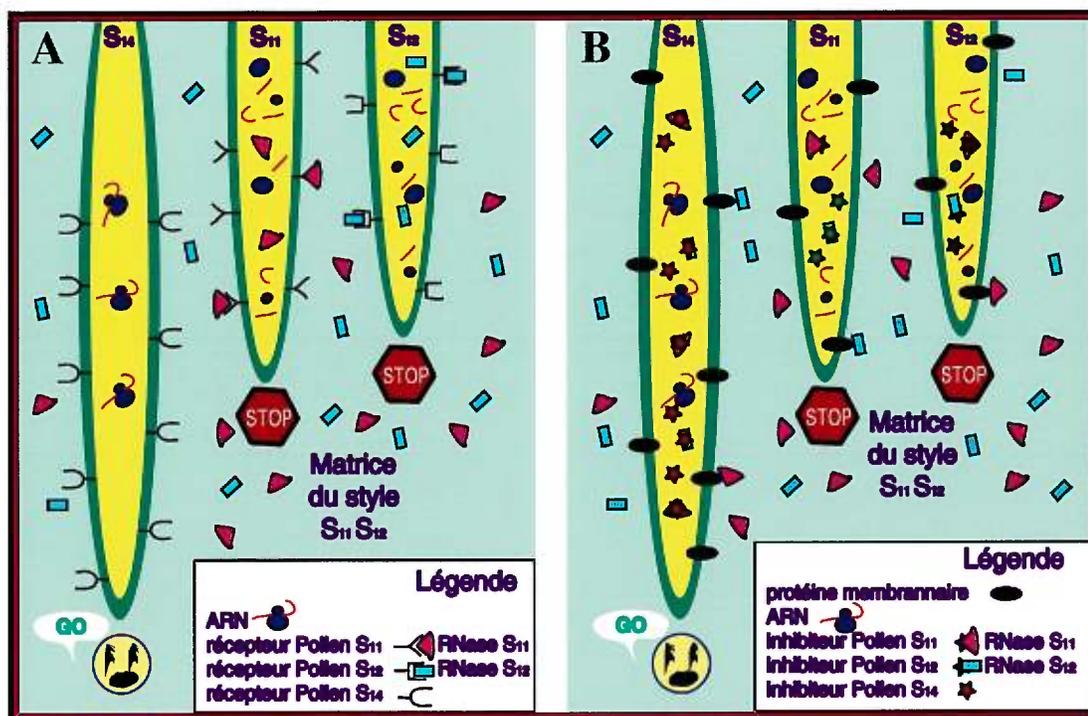
L'alignement peptidique de diverses S-RNases provenant de trois représentants de la famille des Solanaceae et de deux RNases fongiques a permis de déterminer les structures primaires de cette contrepartie stylaire (Ioerger *et al.*, 1991). Cette dernière serait composée de deux régions hypervariables (HVa et HVb) où l'identité de séquences est la plus faible. De plus, ces régions sont très hydrophiles et se situeraient donc à la surface de la protéine, ce qui permettrait la reconnaissance spécifique de la contrepartie pollinique. Cinq autres régions sont très conservées entre les S-RNases (régions C1 à C5), trois d'entre elles sont hydrophobes (C1, C4 et C5) et participeraient à l'édification de la structure tridimensionnelle de la protéine (Ioerger *et al.*, 1991 et Kao et Mc Cubbin, 1996). Alors que les régions C2 et C3 formeraient le site actif de l'enzyme nécessaire à la réaction de rejet du pollen génétiquement semblable (Huang *et al.*, 1994). Ces deux régions portent chacune une histidine importante pour l'activité de la ribonucléase (Royo *et al.*, 1994 pour l'histidine de la région C2 et Mc Cubbin *et al.*, 1997 pour l'histidine de la région C3).

L'activité ribonucléasique de la contrepartie stylaire jouerait un rôle cytotoxique une fois véhiculée dans le cytoplasme du tube pollinique. Elle y dégraderait tous les ARN présents ce qui empêcherait la synthèse de protéines nécessaires au tube pollinique (Mc Clure *et al.*, 1990). Le rôle de dégradation des ARNr est très disputé puisque des observations microscopiques des ribosomes ont démontré que ceux-ci demeurent intacts suite à une auto-pollinisation (Wallis et Han, 1998). Ces auteurs proposent que le substrat de la S-RNase serait plutôt de nature spécifique. D'autres gènes, non liés au locus S, ont été démontrés comme étant importants pour la réaction d'auto-incompatibilité. Ces gènes sont nommés « modifier genes » et rendent la plante auto-compatible. Lorsqu'il se retrouve sous forme hétérozygote, le locus Sli (S locus inhibitor) de *Solanum chacoense* inactive l'allèle pollinique relié à l'auto-

incompatibilité (Hosaka et Hanneman, 1998a et b) alors que chez *Petunia hybrida* le locus « modifier » impliqué agit sur le style sans pour autant affecter l'activité ribonucléasique des S-RNases (Ai *et al.*, 1991). Récemment, un de ces « modifier » a été cloné chez *Nicotiana*. Ce gène code pour une protéine très acide riche en asparagines qui, lorsqu'elle est absente, rend la plante auto-compatible. Cette dernière pourrait médier le transport de la S-RNase en formant un complexe protéique neutre qui favoriserait le transport vers le cytoplasme du tube pollinique pour y effectuer son rôle cytotoxique (Mc Clure *et al.*, 1999), qu'il soit au niveau des ARNr ou d'un substrat spécifique.

1.5 Modèles théoriques du gène Pollen-S

Malgré le fait que la contrepartie pollinique demeure encore inconnue, deux modèles peuvent expliquer le fonctionnement hypothétique de Pollen-S. Ces hypothèses sont inférées des connaissances jusqu' alors acquises sur les propriétés fonctionnelles et moléculaires des S-RNases. Dans un premier temps, Pollen-S pourrait prendre la forme d'un transporteur transmembranaire spécifique qui permettrait le transport unique de la S-RNase correspondante vers le cytoplasme du tube pollinique et où elle pourrait alors jouer son rôle cytotoxique (Mc Cormick, 1998 et Figure 2a). Lors d'une pollinisation semi-compatible provenant de pollen d'une plante $S_{11} S_{14}$ ou $S_{12} S_{14}$ à même le style d'une plante $S_{11} S_{12}$, seules les RNases S_{11} et S_{12} entrent dans le tube pollinique qui porte le transporteur spécifique S_{11} ou S_{12} . Le tube pollinique qui porte la forme allélique S_{14} de la protéine peut continuer son chemin sans entrave vers les ovules puisque celui-ci ne peut véhiculer de S-RNases à même son cytoplasme (Figure 2a). Malgré le fait que cette hypothèse est relativement simple, plusieurs groupes, dont le nôtre, ont démontré, par immuno-histochimie, la présence des deux allèles de la S-RNase à l'intérieur du tube pollinique (Luu *et al.*, soumis), l'hypothèse d'un transporteur spécifique perd alors de sa validité. Une seconde hypothèse propose la présence, à l'intérieur du tube pollinique, d'un inhibiteur spécifique de la S-RNase. Dans ce cas, toutes les S-RNases ont la possibilité d'entrer dans le cytoplasme. Pollen-S inhibe l'activité ribonucléasique de



Note: Le domaine inhibiteur de la protéine Pollen-S inhibe la S-RNase (étoile par dessous le triangle).
 Le domaine spécifique de reconnaissance de la S-RNase par la protéine Pollen-S (étoile en dessous du triangle empêche la S-RNase d'être inhibée).

Figure 2: Modèles hypothétiques du gène Pollen-S.
A- Récepteur spécifique.
B- Inhibiteur spécifique.

toutes les S-RNases à l'exception de l'allèle spécifique de la S-RNase (Mc Cormick, 1998 et Figure 2b). Dans le même exemple de pollinisations mentionnées ci-haut, les tubes polliniques S_{11} , S_{12} et S_{14} permettent le transport des RNases S_{11} et S_{12} dans leur cytoplasme. Dans le tube pollinique S_{14} toutes les S-RNases sont inhibées par le Pollen- S_{14} . Par contre, dans le tube pollinique S_{11} , seule la ribonucléase S_{12} est inhibée alors que la RNase S_{11} ne l'est pas (Figure 2b). Dans cette hypothèse, la protéine Pollen-S reconnaît toutes les S-RNases et modifie leur conformation afin d'inhiber leur activité ribonucléasique. Dans le cas d'une S-RNase incompatible, celle-ci serait quand même reconnue, mais sans pour autant en changer l'activité. Ce dernier modèle est présentement le plus approprié afin d'expliquer le fonctionnement de la protéine Pollen-S. Ce modèle est soutenu par des évidences génétiques. Effectivement, le pollen diploïde provenant d'une plante tétraploïde n'est pas reconnu même si celui-ci possède un allèle S commun au style qui le reçoit (de Nettancourt, 1977 et Kao et Mc Cubbin, 1996). Chawla *et al.* (1997) ont démontré que seuls les grains de pollen diploïdes ayant deux locus S différents (pollen hétérogénique) pouvaient former des graines lors d'une auto-pollinisation. Uniquement le caractère mâle est modifié dans ce type de plante, de plus, le pollen homogénique diploïde se comporte comme un grain de pollen haploïde normal (Chawla *et al.*, 1997). Donc, un tube pollinique qui porte les allèles Pollen S_{11} et S_{12} et dont la croissance évolue dans une matrice stylaire contenant les S-RNases S_{11} et S_{12} ne sera pas détruit puisque dans ce cas, la protéine Pollen S_{11} inhibera la S-RNase S_{12} et la protéine Pollen S_{12} inhibera quant à elle la S-RNase S_{11} .

1.6 Caractère évolutif du locus S

1.6.1 Organisation du locus S

Les deux composantes qui permettent la reconnaissance du soi (S-RNase et Pollen-S) sont toutes deux situées au même locus (locus S). Ces deux gènes doivent être suffisamment proches l'un de l'autre afin d'éliminer la possibilité de crossing-over entre les contreparties lors de la méiose, ce qui aurait pour conséquence de briser l'unité génétique du locus et par le fait même, l'auto-incompatibilité. L'existence de

mécanismes inhibant la recombinaison pourrait également être une autre possibilité pour conserver le locus intacte. Alors que *Lycopersicon peruvianum* et *Solanum chacoense* portent le locus S sur le chromosome 1 (Tanksley et Loaiza-Figueroa, 1985 et Rivard *et al.*, 1996), chez *Petunia hybrida* il se retrouve sur le chromosome 3 (Hoopen *et al.*, 1998). Ce locus peut atteindre des dimensions considérables, Mc Cubbin et Kao (1999) estiment sa taille à quelques mégabases. Il a été démontré que les régions qui bordent le gène de la S-RNase contiennent des séquences répétitives qui peuvent être différentes d'un allèle à l'autre (Coleman et Kao, 1992 et Matton *et al.*, 1995). Ces régions auraient pour fonction de contrecarrer toute recombinaison entre le locus S porté par l'autre chromosome homologue ce qui conserverait l'intégrité du locus.

1.6.2 Origine de l'auto-incompatibilité chez les plantes à fleurs

On considère la compatibilité au sein d'une famille de plantes comme étant primitive, alors que l'auto-incompatibilité, chez près de 320 familles d'angiospermes et quelques familles de gymnospermes, serait un caractère évolutif qui aurait été à l'origine du succès de leur diversité (Bateman, 1952 et de Nettancourt, 1977). On croit que l'incompatibilité serait apparue relativement tôt au cours de l'évolution, ce qui expliquerait la réussite de l'irradiation de ce type de plantes (Read *et al.*, 1995 et de Nettancourt, 1997). Puisque les *Solanaceae*, les *Scrophulariaceae* (*Asteridae*) et les *Rosaceae* (*Rosidae*) partagent le même système gamétophytique basé sur des RNases et que ces sous-ordres de plantes sont tout de même très divergeants au niveau évolutif, ce mode d'auto-incompatibilité est probablement l'un des plus anciens (Matton *et al.*, 1994). Par contre, les *Scrophulariaceae* et les *Rosaceae* ne semblent pas posséder de régions conservées C4 (Xue *et al.*, 1996), ce qui, pour certains, laisse supposer que les systèmes utilisant les S-RNases auraient pu évoluer de manière individuelle selon les familles (Matton *et al.*, 1994). La littérature suggère que ces derniers auraient apparu de manière indépendante (Read *et al.*, 1995) et non pas issus d'un système d'auto-incompatibilité primitif qui aurait donné naissance aux systèmes que l'on connait aujourd'hui, comme il l'a été proposé par Bell (1995). Les molécules impliquées dans les divers systèmes de reconnaissance étant différentes, tant au niveau de leur fonction

que leur séquence, ceci vient infirmer l'hypothèse d'un ancêtre commun (Read *et al.*, 1995). En effet, les molécules SRK et SLG des *Brassicaceae*, les S-RNases des *Solanaceae* et les glycoprotéines hydrophiles des *Papaveraceae* n'ont rien en commun à part le fait d'être des protéines glycosylées, ce qui est le cas pour beaucoup de protéines sécrétées.

1.6.3 Origine de la diversité allélique

Chez les *Brassicaceae* et les *Solanaceae*, il a été démontré qu'il y a parfois plus de variations entre les allèles S d'une même espèce qu'entre ceux de différentes espèces. Le polymorphisme au locus S précéderait alors la spéciation au sein de ces familles (Dwyer *et al.*, 1991, Ioerger *et al.*, 1990 et Rivers *et al.*, 1993). Dans certaines espèces, les variations peuvent atteindre 60 % (Tsai *et al.*, 1992 et Xue *et al.*, 1996). Chez *Solanum chacoense*, deux allèles très similaires (S₁₁ et S₁₃) se distinguent de seulement dix acides aminés dont quatre dans les régions hypervariables (Saba-El-Leil, 1994 et Matton *et al.*, 1997), cette variation est la plus faible observée jusqu'à présent. Les allèles S₁₁ et S₁₃ ont probablement divergé d'un allèle commun après la spéciation des *Solanaceae*.

1.6.4 Genèse de nouveaux allèles S

De cinq familles différentes d'angiospermes, l'analyse de séquences de S-RNases et de RNases semblables à ces dernières, a démontré que ces gènes ont probablement une origine commune et que l'apparition de nouvelles S-RNases serait un phénomène plutôt rare (Xue *et al.*, 1996). Lorsqu'un nouvel allèle est généré dans une population, sa propagation à travers cette dernière est favorisée étant donné que sa fréquence est limitée à quelques individus seulement (Kao et Mc Cubbin, 1996). De nouveaux allèles serait créés par un réarrangement structurel du gène (Pandey, 1972) ou par un phénomène de conversion génique (Ebert *et al.*, 1989) et non pas par des mutations ponctuelles (de Nettancourt, 1977). Cette hypothèse est toutefois contestée par Matton *et al.* (1997 et 1999). Afin de générer un nouvel allèle S, à partir d'une copie

initiale, il faut inévitablement que les deux contreparties du locus S mutent de manière à ce que la reconnaissance spécifique soit toujours possible. La façon par laquelle ces deux contreparties communiquent leur modification structurelle réciproque a donné naissance à trois hypothèses pour expliquer le phénomène.

D'abord, une mutation dans l'un des deux gènes entraînerait une perte de l'auto-incompatibilité d'un individu et de fortes pressions de sélection, exercées sur les descendants de ce dernier, favoriseraient ceux qui ont reçu une mutation complémentaire à l'autre gène. Dans ce cas, la reconnaissance entre les molécules est rétablie et l'on génère ainsi un nouvel allèle S (Mc Cubbin et Kao, 1999).

Une deuxième hypothèse propose qu'il existerait une évolution concertée entre les deux gènes et que des mutations simultanées occasionneraient l'apparition de nouveaux allèles. Les individus qui auraient subi un changement dans un seul allèle, donc auto-compatible, seraient rapidement éliminés d'une population par un phénomène nommé « inbreeding depression » causant une perte de vigueur chez les descendants (Mc Cubbin et Kao, 1999).

Une hypothèse beaucoup plus plausible a récemment été proposée par Matton *et al.* (1999), quoi que très controversée (Verica *et al.*, 1998, Charlesworth, 2000 et Uyenoyama et Newbiggin, 2000), elle explique de manière élégante le passage d'un allèle à l'autre (Matton *et al.*, 1999 et Matton *et al.*, 2000). *Solanum chacoense* possède deux allèles, S₁₁ et S₁₃, qui ne diffèrent que de dix acides aminés, dont trois dans la région hypervariable HVa et un dans HVb (Saba-El-Leil *et al.*, 1994). Il a été démontré que la modification de ces quatre acides aminés était suffisante pour transformer la reconnaissance de l'allèle S₁₁ en S₁₃ (Matton *et al.*, 1997). Alors que la mutation de trois d'entre eux chez l'allèle S₁₁ permettait la double spécificité de la ribonucléase qui reconnaît maintenant le pollen S₁₁ et S₁₃ (Matton *et al.*, 1999). Les auteurs proposent que la production d'un nouvel allèle passerait donc par une étape de double spécificité de l'une des deux contreparties. Une première mutation engendrerait une contrepartie capable de reconnaître l'ancien partenaire et le nouveau qui n'est pas encore disponible.

Un deuxième événement de mutations, cette fois-ci dans l'autre contrepartie, permettrait l'évolution d'une spécificité S_a vers S_b . En dernier lieu, la contrepartie qui a une double reconnaissance mute une deuxième fois afin d'assurer une modification complète vers le nouvel allèle (Matton *et al.*, 1999 et Matton *et al.*, 2000). D'autres groupes ont également tenté une approche de mutagenèses par permutation afin de créer des allèles S chimériques. Ces permutations à l'extérieur des régions hypervariables ne permettaient pas la reconnaissance d'un nouvel allèle ou de l'allèle original (Kao et Mc Cubbin, 1996 et Zurek *et al.*, 1997). Ces auteurs en conclurent que les régions hypervariables sont nécessaires à la reconnaissance spécifique, mais ne sont pas suffisantes. Ces permutations massives auraient pu créer des modifications au niveau de la structure de la S-RNase, ce qui aurait pu empêcher la reconnaissance d'être opérationnelle (Matton *et al.*, 1998b). Ces expériences confirment que des mutations ponctuelles pourraient jouer un rôle important dans la création d'un nouvel allèle S. Étant donné que le gène de la S-RNase n'est présent qu'en une seule copie dans le génome, l'hypothèse des mutations ponctuelles serait plus plausible que la conversion génique ou les recombinaisons.

1.6.5 Ressemblance avec les mécanismes de défense contre les pathogènes

Chez les angiospermes, les protéines nécessaires à l'auto-incompatibilité auraient probablement été recrutées des systèmes de mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes (Hodgkin *et al.*, 1988). Ces mécanismes de défense se comportent en quelque sorte de même façon qu'une réponse d'incompatibilité entre style et pollen. En effet, certaines souches de pathogènes sont incapables d'infecter certains génotypes d'un hôte, la réaction est alors appelée incompatible, alors que cette même souche demeurerait infectieuse pour d'autres génotypes de cette espèce végétale hôte, dans ce cas, la réaction est compatible. Les mécanismes de reconnaissance du pathogène par la plante agissent sensiblement de la même manière que le style et le pollen interagissent. Une réponse dite gène pour gène est ici mise en jeu (Stahl et Bishop, 2000). Une protéine de la plante reconnaît une protéine du pathogène ce qui amorce les mécanismes de défense contre celui-ci en déclenchant une réponse d'hypersensibilité qui cause la mort des cellules environnantes à la zone d'infection, le pathogène ne peut donc pas se

propager. Le pathogène possède une protéine qui est reconnue, ce gène subi donc des pressions de sélections et les individus possédant une mutation qui leur permettra d'échapper à la reconnaissance seront ainsi sélectionnés. Le gène de la plante doit également emboîter le pas sinon celle-ci sera à la merci du pathogène. Ce cycle perpétuel de modifications a amené à la création d'un locus (le locus R) multi-allélique au sein des espèces.

1.6.6 Hypothèse sur les protéines recrutées par le système d'auto-incompatibilité

Le système d'auto-incompatibilité ressemble à l'interaction gène pour gène puisque un système de reconnaissance déclenche les deux types de réactions. Les deux systèmes sont génétiquement simples et sont basés sur la reconnaissance de gènes exprimés entre les deux cellules. Lors d'une réaction compatible, il y a soit fécondation des ovules ou une infection systémique de la plante pour ce qui concerne la réponse hôte/pathogène. Quant à elle, une réponse incompatible avorte la croissance du tube pollinique ou active une réponse d'hypersensibilité (Matton *et al.*, 1994). De plus, certaines similarités existent entre les molécules utilisées par les deux systèmes. Chez *Arabidopsis thaliana*, une *Brassicaceae*, une protéine réceptrice kinase associée à la paroi cellulaire, Wak1 (cell Wall Associated receptor Kinase), est induite suite à une infection par un pathogène (He *et al.*, 1998). Cette protéine kinase est encrée à la paroi et possède un domaine extracellulaire comme c'est le cas de SRK chez le système d'auto-incompatibilité des *Brassicaceae* (Mc Cormick, 1998). Chez le tabac, des RNases de type T₂, similaires aux S-RNases, sont induites suite à une attaque provenant d'un pathogène. Ces RNases préviennent la croissance du pathogène fongique (Galiana *et al.*, 1997) tout comme c'est le cas des S-RNases dans l'incompatibilité gamétophytique des *Solanaceae* (Mc Clure *et al.*, 1989 et Murfett *et al.*, 1994). La similarité de ces deux systèmes de reconnaissance suggère que ces RNases auraient été recrutées par le système d'auto-incompatibilité afin d'exclure les tubes polliniques indésirables (Hodgkin *et al.*, 1988 et Kao et Mc Cubbin, 1994).

1.7 Présentation du projet de recherche

Dans l'optique de cerner la contrepartie pollinique du système d'auto-incompatibilité des *Solanaceae*, nous avons mis au point une stratégie de représentation différentielle des ARNm de tubes polliniques *in vivo* et *in vitro*. Cette approche nous permettra d'isoler des gènes liés aux tissus reproducteurs mâle qui démontrent un patron d'expression différentielle entre deux lignées de *Solanum chacoense*. Ces deux lignées portent un locus S différent et par le fait même un gène Pollen-S différent. Les candidats potentiels seront caractérisés afin de déterminer leur expression différentielle, leur séquence, leur polymorphisme ainsi que leur lien au locus S. Nous croyons que cette technique est prometteuse puisque les allèles d'auto-incompatibilité démontrent de faible similarité de séquences au sein même d'une espèce (Ioerger *et al.*, 1990, Dwyer *et al.*, 1991 et Rivers *et al.*, 1993). De plus, la représentation différentielle des ARNm s'est avérée efficace pour trouver le déterminant mâle des *Brassicaceae* (Takayama *et al.*, 2000).

L'étude des composants assurant l'auto-incompatibilité auront des impacts importants tant au niveau de la compréhension des interactions cellule/cellule chez les végétaux qu'au niveau de l'agriculture pour la production de semences hybrides. Nous tenterons donc de mieux comprendre les éléments liés au locus S, et ce, par la caractérisation complète de l'allèle S₁₄ (Chapitre 1), dont seul une courte séquence incorrecte était disponible, et par la recherche du gène Pollen S par une approche de représentation différentielle des ARNm (Chapitre 2).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel végétal

Quatre lignées auto-incompatibles de *Solanum chacoense* Bitt., une Solanacée diploïde ($2n=2x=24$ chromosomes), ont été utilisées lors de cette étude. Le choix de ces dernières s'est établi selon les allèles d'incompatibilité présents dans le génotype des plantes à l'étude. Obtenue du Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, WI), la lignée IP 230582 (possédant les allèles S_{13} et S_{14}) a servi de parent femelle (receveur du pollen). Issue d'un croisement entre IP 230582 et IP 458314 (portant les allèles S_{11} et S_{12} , cette lignée n'est pas à l'étude du présent mémoire), le pollen des lignées G_4 (allèles S_{12} et S_{14}) (Van Sint Jan *et al.*, 1996) et V_4 (allèles S_{12} et S_{13}) (Véronneau *et al.*, 1992) a servi pour la culture de tubes polliniques *in vitro* et comme parent mâle. De plus, la lignée VF60 (deux allèles S_{12}), provenant d'un auto-fécondation de la lignée IP 458314 a aussi servi de parent mâle pour la pollinisation de la lignée IP 230582.

2.2 Soins et entretien des plantes

Les quatre lignées mentionnées ci-haut sont constamment bouturées stérilement en éprouvettes. Lorsque les plantules ont atteint une taille d'environ dix centimètres, celles-ci sont transplantées et acclimatées durant un mois dans une chambre de croissance CMP 3244 (Convion, Winnipeg, MA) programmée pour un cycle de luminosité de seize heures à faible niveau d'incandescence et de luminescence, une température de 22°C ainsi que 90 % d'humidité. Après l'acclimatation, les plantules sont transplantées dans des pots de 20 centimètres de diamètre.

2.3 Pollinisations des plantes

Le pollen des lignées de plantes G_4 , V_4 et VF60 a été récolté individuellement en secouant manuellement les anthères déhiscentes au-dessus d'un verre de montre, pour être en suite appliqué délicatement sur le stigmate des plantes de la lignée IP 230582.

Après deux, quatre et six heures de pollinisation, les fleurs de la plante réceptrice sont prélevées pour des fins d'observations microscopiques et une cinquantaine de styles sont broyés, dans un mortier en présence d'azote liquide afin d'y extraire ultérieurement les ARN totaux. Les tissus fixés sont maintenus à 4°C alors que les tissus broyés sont conservés à -85°C.

2.4 Culture in vitro de tubes polliniques

Après avoir récupéré manuellement le pollen des lignées G₄ et V₄, celui-ci est uniformément saupoudré sur une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). Cette dernière est préalablement déposée sur un milieu de culture solide (10 % sucrose, 1 % agar, 0,03 % chlorure de sodium et 0,01 % d'acide borique) contenu dans des pétris de 10 cm de diamètre. Les pétris sont scellés et incubés 24 heures à la température de la pièce. Les tubes polliniques sont récupérés avec une lame de rasoir stérile, broyés dans l'azote liquide et entreposés à -85°C.

2.5 Fixation, préparation et observation au microscope des tissus pollinisés

Les fleurs pollinisées ont été prélevées et immergées dans une solution fixatrice Carnoy (un volume d'acide acétique glacial pour trois volumes d'éthanol). Après deux jours de fixation, les tissus sont lavés abondamment avec de l'eau. Ceux-ci subissent alors un traitement d'une heure à l'hydroxyde de sodium (NaOH) 8N à 60°C et sont rincés de nouveau afin d'éliminer toute trace d'hydroxyde de sodium. Le style est alors disséqué et placé entre une lame et une lamelle en présence de bleu d'aniline 0,01 %. Une faible pression est exercée sur la lamelle afin d'écraser légèrement le style. La croissance des tubes polliniques dans les styles est observée au microscope par épifluorescence à l'aide d'un microscope Ortholux II (Leitz, Heerbrugg, Suisse) avec une source d'illumination UV à 400 nm.

2.6 Extraction d'ADNg, quantification et amplification par PCR

De jeunes feuilles des lignées IP 230582, G₄, V₄ et VF60 ont été finement broyées dans l'azote liquide. À partir de la poudre de feuilles, l'ADNg a été isolé à l'aide de la trousse DNeasy (Qiagen, Mississauga, ON) selon les recommandations du manufacturier. La concentration en ADN a été déterminée par spectrophotométrie (DU-65, Beckman Instruments, Mississauga, ON) en mesurant leur absorbance à 260 nm et, contre vérifiée, sur gel d'agarose en colorant les acides nucléiques au bromure d'éthidium.

Le génotype des cinq lignées utilisées à été confirmé par PCR à partir de 100 ng d'ADNg pour chaque plante. Les divers allèles d'auto-incompatibilité ont été amplifiés à l'aide des amorces DPM-3 : 5'-TCCTTTGGATAGTGGGCGATG-3' et DPM-13 : 5'-GAATTCTAGGTAATATGAAAT-3' pour l'allèle S₁₁, L12 : 5'-GGCACCATGTTTAATCACTCGCGT-3' et R12 : 5'-TGGAAATGTAACCCCGGTAGTTCCT-3' pour l'allèle S₁₂, DPM-1 : 5'-CTGTAAAATTTACTGAATCGA-3' et DPM-2 : 5'-CGAGATCTACTGAAAATGG-3' pour l'allèle S₁₃ et DPM-5 : 5'-CGTTACATTAAGATCGAGGT-3' et DPM-6 : 5'-GAGATATTGTTTATCTATGC-3' pour l'allèle S₁₄. En présence de 1 µM de chacune des deux amorces appropriées pour l'amplification d'un allèle S, quatre réactions de polymérisation en chaîne, dans un volume de 40 µl, ont été effectuées pour chaque lignée. Deux unités de DNA polymérase TAQ (Qiagen, Mississauga, ON), 1 mM de dNTP et 4 µl de tampon 10X pour la polymérase ont été utilisés sous des conditions d'amplification de cinq minutes de dénaturation initiale à 95°C suivis de trente cycles de polymérisation et pour terminer, cinq minutes d'élongation à 72°C. Chaque cycle comporte trente secondes de dénaturation à 95°C suivis d'un temps d'hybridation des amorces de trente secondes à 55°C pour les amorces servant à amplifier S₁₁, 58°C pour S₁₂, 52°C pour S₁₃ et 47°C pour S₁₄ ainsi que trente secondes d'élongation à 72°C. Dix micro litres sur les quarante sont chargés sur un gel d'agarose 1 %. La détection de l'ADN amplifié se fait par une coloration au bromure d'éthidium.

2.7 Séquençage

Nous avons utilisé la trousse de séquençage cyclique BigDye Terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Mississauga, ON) selon les recommandations du fabricant. Cependant, quelques modifications ont été apportées au protocole d'amplification suggéré par le fournisseur. Nous avons réduit de huit fois la quantité d'enzyme prescrite, nous avons donc également modifié la concentration des autres composants inclus dans la réaction de PCR linéaire. En effet, nous avons utilisé 200 ng d'ADN des clones à séquencer contenus dans le vecteur pBs (Stratagene, La Jolla, CA), 1,8 pM de l'amorce SK' : 5'-CAAAAGCTGGAGCTCCAC-3', ainsi que 3,5 µl d'un tampon de séquençage 5X. Suite à l'amplification, le traitement des réactions de séquençage a été appliqué tel que mentionné dans le protocole du fabricant pour être par la suite déchiffré dans un séquenceur automatique de type ABI Prism 310 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Mississauga, ON).

2.8 Analyse de type Southern

2.8.1 Transfert de l'ADN sur membrane

L'ADNg de quatre populations de plantes a été isolé par Sylvain Rivard (1994). La population RA, composée de 27 individus, est issue d'un croisement entre IP 230582 comme parent mâle et IP 458314 comme parent femelle. La population RB, composée de 45 individus, est quant à elle issue d'un croisement réciproque à la population RA. La troisième (composée de 37 individus) et quatrième population (composée de 23 individus) sont toutes deux issues de la lignée IP 458582. Ces deux dernières proviennent soit d'une culture d'anthères pour la population P ou d'un auto-croisement à un stade précoce du développement en ce qui concerne la population SP. Dix microgrammes d'ADNg de chacun de tous ces individus ont été digérés avec cinquante unités d'endonucléase Eco RV ou HindIII. Suite à la migration sur gel d'agarose 0,8 %, l'ADNg digéré est transféré par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement Super Charge (Schleicher and Schuell, Keene NH). Suite au transfert, les

acides nucléiques sont fixés covalentiellement à la membrane à 120 mJ/cm^2 dans un four à UV (Hofer UVC 500 UV crosslinker). Le transfert de type Southern est décrit par Sambrook *et al.* (1989).

2.8.2 Pré-incubation et incubation des membranes

Suite à la fixation des acides nucléiques, les membranes sont pré-hybridées trois heures en présence d'une solution de $0,25 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, 1% BSA, 7% SDS et 1 mM EDTA dans un four à hybridation (Hybridization Incubator 400, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) à 65°C . L'hybridation s'effectue durant une quinzaine d'heures à la même température, en présence d'une sonde radioactive et de solution d'hybridation fraîche. Les sondes ayant servi pour l'hybridation ont été synthétisées à partir d'un fragment d'ADN du clone S_{14} ou bien des produits de PCR, en ce qui concerne les candidats pour le gène pollen S. Le marquage radioactif de l'ADN s'est effectué à l'aide d'une trousse de marquage aléatoire Strip EZ DNA kit (Ambion, Austin, TX) en incorporant du αATP^{32} (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA).

2.8.3 Lavage et exposition des membranes

Après la période d'hybridation, les membranes sont soumises à une suite de lavages à stringence croissante. Le premier lavage s'effectue à 35°C dans une solution $0,9 \%$ NaCl, $0,1 \%$ citrate de sodium et $0,1 \%$ SDS (2X SSC), et ce, pendant une heure. Le second lavage se déroule également durant une heure avec une solution à $0,45 \%$ NaCl, $0,05 \%$ citrate de sodium et $0,1 \%$ SDS (1X SSC), le tout chauffé à 45°C . Cette étape est suivie de dix minutes de lavage à 55°C dans une solution $0,09 \%$ NaCl, $0,01 \%$ citrate de sodium et $0,1 \%$ SDS (0,1X SSC). Les signaux radioactifs sont décelés par autoradiographie avec des films New RX (Groupe Christie, St-Eustache, QC) dans une cassette d'exposition munie d'un écran réfléchisseur (Inter Science, Markham, ON). Le temps d'exposition à -85°C est évalué, par l'expérimentateur, selon le niveau du signal émis par la membrane radioactive tel que détecté à l'aide d'un compteur Geiger (Dosimeter Corporation VWR, Ville Mont-Royal, QC).

2.9 Extraction des ARN totaux et des ARN messagers

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

Cinq cents micro-grammes d'ARN de tubes polliniques *in vitro* des lignées G₄ et V₄ ont été traités par chromatographie d'affinité, tel que proposé par le manufacturier de la trousse mRNA separator kit (Clonetech, Palo Alto, CA), afin d'y isoler les ARNm. Des billes d'oligo (dT) cellulose type 7 (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC) ont servi de matrice dans une colonne à centrifuger (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Les ARN ont été quantifiés de la manière décrite précédemment.

2.10 Analyse de type northern

2.10.1 Transfert de l'ARN sur membrane

Dix microgrammes d'ARN totaux ou un microgramme d'ARNm ont été chargés dans les puits d'un gel dénaturant, le protocole de transfert des ARN sur membrane est tiré de l'ouvrage de Sambrook *et al* (1989) qui a été respecté dans son intégrité. Les acides ribonucléiques ont été fixés sur la membrane comme il a été préalablement décrit.

2.10.2 Pré-hybridation et hybridation des northern

Les northern sont incubés trois heures dans un four à hybridation (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA) à 45°C en présence d'une solution composée de 50 % formamide, 200 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé par millilitre de solution d'hybridation, 1 % SDS, 0,9 % NaCl, 0,1 % de ficoll, 0,1 % de PVP, 0,1 % de BSA et 30% de citrate de sodium salin (20X SSC). L'hybridation s'effectue avec de la solution d'hybridation fraîche pendant une quinzaine d'heures à 45°C. Les sondes ont été synthétisées à partir d'un fragment d'ADN du clone S₁₄, ou d'un clone partiel de l'ARNr

18S, ou bien des produits de PCR, en ce qui concerne les candidats pour le gène pollen S. Le marquage radioactif de l'ADN a déjà été décrit antérieurement (section 2.8.2).

2.10.3 Lavage et exposition des northern

À l'instar de l'analyse de type Southern, les northern nécessitent également des lavages suite à l'hybridation. Le premier et le deuxième lavages s'effectuent dans une solution 0,9 % NaCl, 0,1 % citrate de sodium et 0,1 % SDS (2X SSC) à une température de 25°C et 35°C respectivement. La solution de lavage, pour les deux lavages suivants, est composée de 0,45 % NaCl, 0,05 % citrate de sodium et 0,1 % SDS (1X SSC) à une température de 45°C et 55°C respectivement. Le dernier lavage, à 55°C, se déroule dans une solution de 0,09 % NaCl, 0,01 % citrate de sodium et 0,1 % SDS (0,1X SSC). La durée des lavages est de trente minutes pour les quatre premiers et de dix minutes pour le suivant. Les membranes sont exposées à -85°C comme il a déjà été mentionné ultérieurement.

2.10.4 Évaluation de la quantité équivalente d'ARN entre les échantillons

Afin de s'assurer qu'une quantité égale d'ARN a bel et bien été utilisée pour chacun des échantillons présent sur les northern, ceux-ci ont été hybridés avec une sonde provenant d'un fragment de l'ARNr 18S. Ce fragment a été obtenu par PCR à partir de l'ADNg de *Solanum chacoense* et en utilisant les amorces 18S-1 : 5'-TCGATGGTAGGATAGTGGC-3' et 18S-2 : 5'-GCATAGCTAGTTAGCAGG-3' et cloné dans un vecteur-T (Marchuk *et al*, 1991). Les amorces utilisées ont été déterminées par l'alignement de séquence d'une portion très conservée du gène de l'ARNr 18S de cinq espèces du genre *Solanum* : *S. avicular*, *S. lycopersicon*, *S. melongena*, *S. petophylum* et *S. tuberosum*. La température d'hybridation pour ces amorces est de 52°C, alors que les conditions de PCR sont les mêmes que celles déjà décrites ultérieurement.

2.11 Analyse de type slot blot

Les analyses de type slot blot ont été réalisées avec l'appareil Slot Blot PR648 (Hoefler, San Francisco, CA) selon les instructions proposées par Sambrook *et al* (1989). Un duplicat de chaque membrane a été produit avec une quantité égale d'ADN pour chacun des échantillons. Des sondes de premiers brins ont été synthétisées à partir d'un microgramme d'ARNm provenant de tubes polliniques des lignées G₄ ou V₄. La trousse 1st strand synthesis kit (Roche, Laval, QC) a été utilisée avec 20 µM de l'amorce 5'-(T)₂₀-3' selon les recommandations suggérées par le manufacturier. Les conditions de pré-hybridation, d'hybridation, de lavage et d'exposition sont les mêmes que celles qui sont mentionnées pour l'analyse de type Southern (sections 2.8.2 et 2.8.3).

2.12 Obtention du clone complet de l'allèle S₁₄

Le clone incomplet de l'allèle S₁₄, isolé par Corine Zotti, provient d'une banque d'ADNc (ZAP express cDNA synthesis kit, Stratagene, La Jolla, CA) de pistils pollinisés après 48 heures construite par Sylviane Lantin. Le bout 5' manquant du clone a été obtenu par une amplification sur cette même banque avec une amorce interne au clone S₁₄; S14-1 : 5'-AATTGGTCGTCGTCTAGAGC-3' et l'amorce T3 du phagemide. Les conditions d'amplification sont les mêmes que décrites précédemment, à l'exception que la température d'hybridation de l'amorce S14-1 se chiffre à 58°C. Afin de rendre l'ADN plus accessible, la lyse des capsides phagiques est nécessaire, la réaction de PCR est donc préalablement chauffée à 95°C pendant dix minutes avant l'ajout de TAQ DNA polymérase. Le produit de PCR correspondant a été ligué dans un vecteur-T (Marchuk *et al*, 1991) et séquencé avec l'amorce S14-1.

2.13 Représentation différentielle des ARNm

Originellement décrit par Liang et Pardee (1992) et légèrement modifié par Liang *et al.* (1994), le protocole d'analyse différentielle des ARNm, suggéré par le manufacturier dans la trousse de RNAimage (GenHunter, Nashville, TN) a été respecté

en partie. Nous avons apporté quelques modifications. Premièrement, le gel d'acrylamide contenant les échantillons a été séché directement sur la plaque de verre servant à la migration. Afin de se débarrasser de l'urée contenu dans le gel, celui-ci est rincé abondamment avec de l'eau pour être par la suite séché de nouveau. En deuxième lieu, l'ADNc contenu dans la portion de gel a été isolé en chauffant cette dernière une heure à 70 °C, la diffusion de l'ADNc hors du gel est ensuite favorisée par une incubation de plusieurs heures à température de la pièce. Finalement, la troisième modification apportée consistait à resuspendre l'ADNc dans 12 µl au lieu du 10µl proposé dans le protocole initial du fabricant.

Le matériel de base, sous forme d'ARN totaux, utilisé pour cette analyse, provenait : de styles contrôles de la lignée IP 230582, des styles de la lignée IP 230582 pollinisés après deux, quatre et six heures avec le pollen de la lignée VF60, ou de la lignée G₄, ou la lignée V₄. De plus, les tubes polliniques *in vitro* des lignées G₄ et V₄ ont également été ajoutés à l'analyse. La rétro-transcription de ces ARNm s'est produite en présence de αdCTP³² (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA).

3. RÉSULTATS

3.1 CHAPITRE 1

Caractérisation d'une S-ribonucléase

3.1.1 Isolement d'un clone d'ADNc homologue à une S ribonucléase

Le clone d'ADNc SV3B-G12 a été isolé suite à la soustraction virtuelle de gènes d'ovaires fortement et moyennement exprimés dans les pistils quarante-huit heures après leur pollinisation. Le but de cette expérience était de cibler des gènes rares impliqués dans le déroulement hâtif de la fécondation. Après un séquençage partiel de l'extrémité 5' (figure 3, nucléotides 47 à 469), ce clone démontre une forte identité de séquences avec des S-RNases. Malgré le fait que le transcrit des S-RNases soit très abondant dans le pistil (Cornish *et al.*, 1987 et figure 8a), le clone d'ADNc de SV3B-G12 n'a pas été soustrait de la banque puisque ce dernier se retrouve presque exclusivement dans le style (figures 8 et 9). Les gènes spécifiques au style, n'ayant pas été soustraits lors de la première étape, ont été ultérieurement sélectionnés par une hybridation à l'aide de premier brin d'ADNc synthétisé à partir d'ARNm de style.

3.1.2 Le clone SV3B-G12 est l'allèle S_{14} de *S. chacoense*

Le séquençage complet du clone SV3B-G12 (figure 3, position 41 à 915) a démontré qu'il s'agissait en fait de la S-RNase S_{14} de la lignée IP 230582 dont une séquence partielle a déjà été publiée (Després *et al.*, 1994, numéro d'accèsion L36666) et provenait d'une amplification de type PCR sur de l'ADNg. Pour obtenir un clone pleine longueur de S_{14} (la terminologie SV3B-G12 ne sera plus utilisée), une amorce interne et inverse (S_{14} -1, figure 3) a été synthétisée afin d'amplifier l'extrémité 5' manquant du cDNA (position 41 à 47 de la figure 3) à partir de l'ADNc contenu dans les phages λ de la banque PP48. Après clonage et séquençage, trois clones sur douze

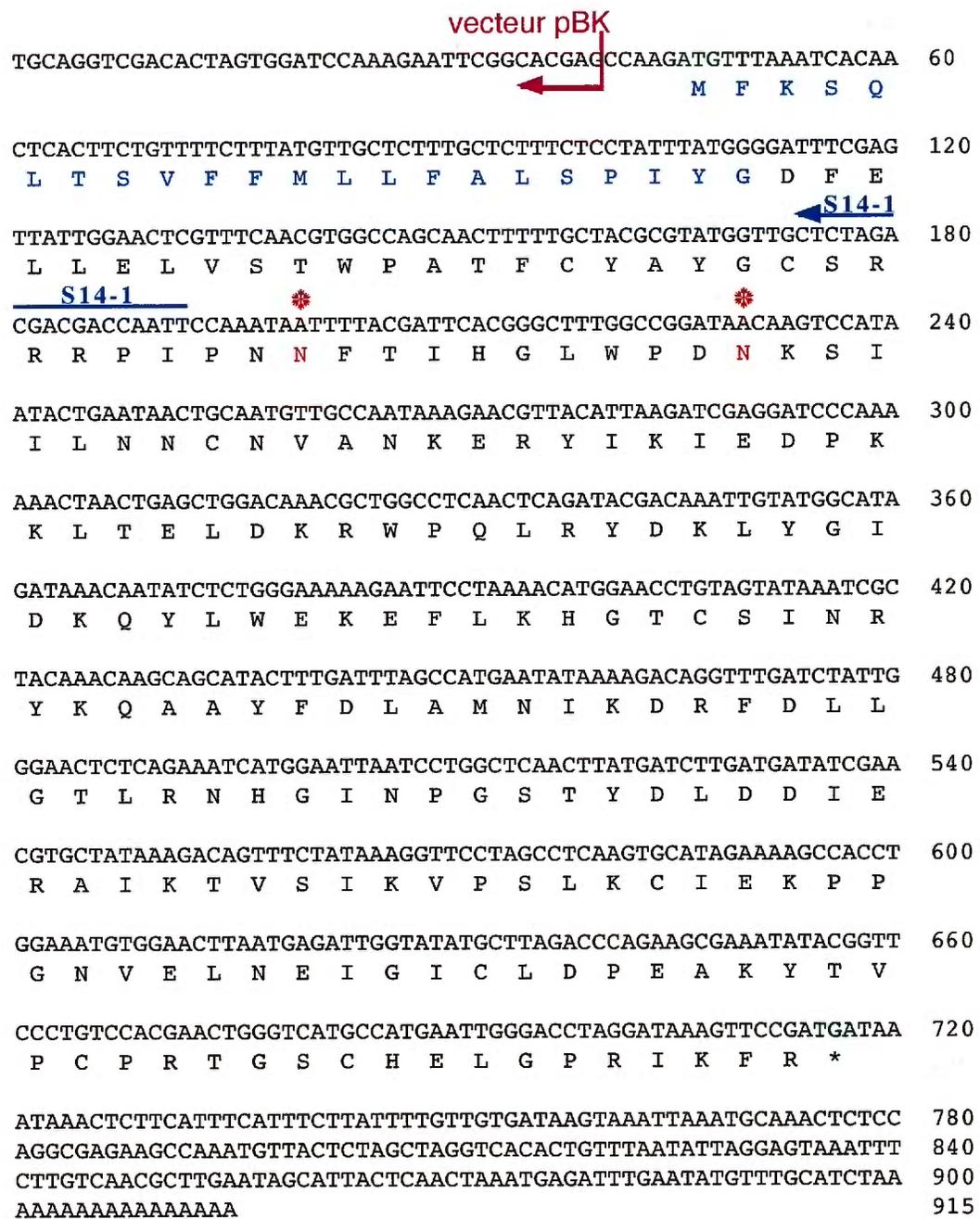


Figure 3: Séquence de l'ADNc du clone S₁₄ et traduction de ce dernier.

Légende: Le codon ATG de départ et le codon TGA terminal sont indiqués en vert.
 La flèche représente l'amorce synthétisée pour l'obtention du clone complet.
 L'étoile représente les sites de glycosilations hypothétiques.
 Le peptide signal est indiqué en lettrage bleu

possédaient une extrémité 5' plus longue que le clone original et contenait un cadre de lecture complet et ininterrompu (figure 3). La séquence complète de S_{14} (numéro d'accèsion AF232304) a de plus permis de corriger le fragment publié (Després *et al.*, 1994) et de détecter deux sites hypothétiques de glycosilation N-X-S/T (représentés par une étoile à la figure 3).

Le logiciel SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) prédit le site de clivage du peptide signal de la S-RNase S_{14} mature entre la glycine (G22) et l'acide aspartique (D23) (figure 4). Le peptide signal (en bleu à la figure 3), nécessaire pour le passage de la protéine vers le milieu extracellulaire (Teasdale et Jackson, 1996, Anderson *et al.*, 1986 et Anderson *et al.*, 1989), comporterait 22 acides aminés dont quatorze hydrophobes permettant son ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique avant son clivage. Le logiciel SignalP permet la reconnaissance d'un peptide signal et son site de clivage (score S et C respectivement, figure 4), et ce, en combinant deux banques de données dont une reconnaît le site de clivage et l'autre distingue entre des peptides signaux et des non-peptides signaux. La combinaison de ces deux banques de données permet au logiciel de calculer le score Y en fonction des deux autres scores (Nielsen *et al.*, 1997).

3.1.3 Le clone S_{14} est un gène à copie unique

L'analyse de type Southern sur quatre populations d'individus ségrégeant pour l'allèle S_{14} (figure 5a et tableau 1) a démontré que le clone S_{14} est un gène à copie simple, comme l'indique la présence d'un seul fragment de digestion pour les coupures de l'ADNg avec EcoRV (1,6 kb) ou Hind III (1,4 kb) (figure 5a). En comparant la figure 5a et 5b, on constate également que, pour les populations RA et RB, S_{14} est uniquement présent là où les individus ne contiennent pas de copie du gène S_{13} . Puisqu'un seul des deux allèles est hérité à la méiose, cela va donc de soi. En ce qui concerne les populations P (issue d'une culture d'anthères) et SP (issue d'auto-fécondation), certains individus possèdent les deux formes alléliques (figure 5 et tableau 1). Pour la population P, nous expliquons le phénomène par la possibilité d'avoir des individus provenant de gamètes non-réduites.

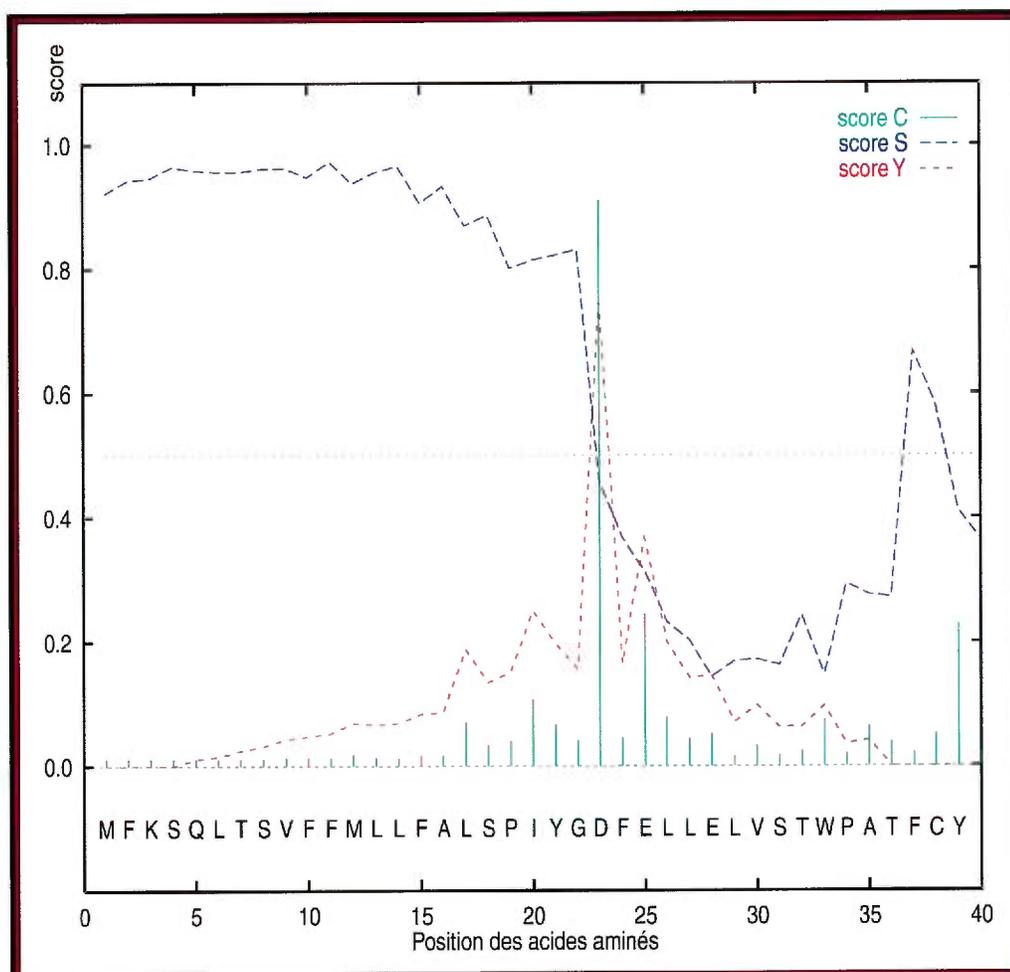


Figure 4: Prédiction du site de clivage, en N terminal, du peptide signal de la S-RNase S_{14} de *Solanum chacoense*.

Légende: Score C: site de clivage brute
 Score S: position du peptide signal
 Score Y: score combiné de clivage et de position du peptide signal

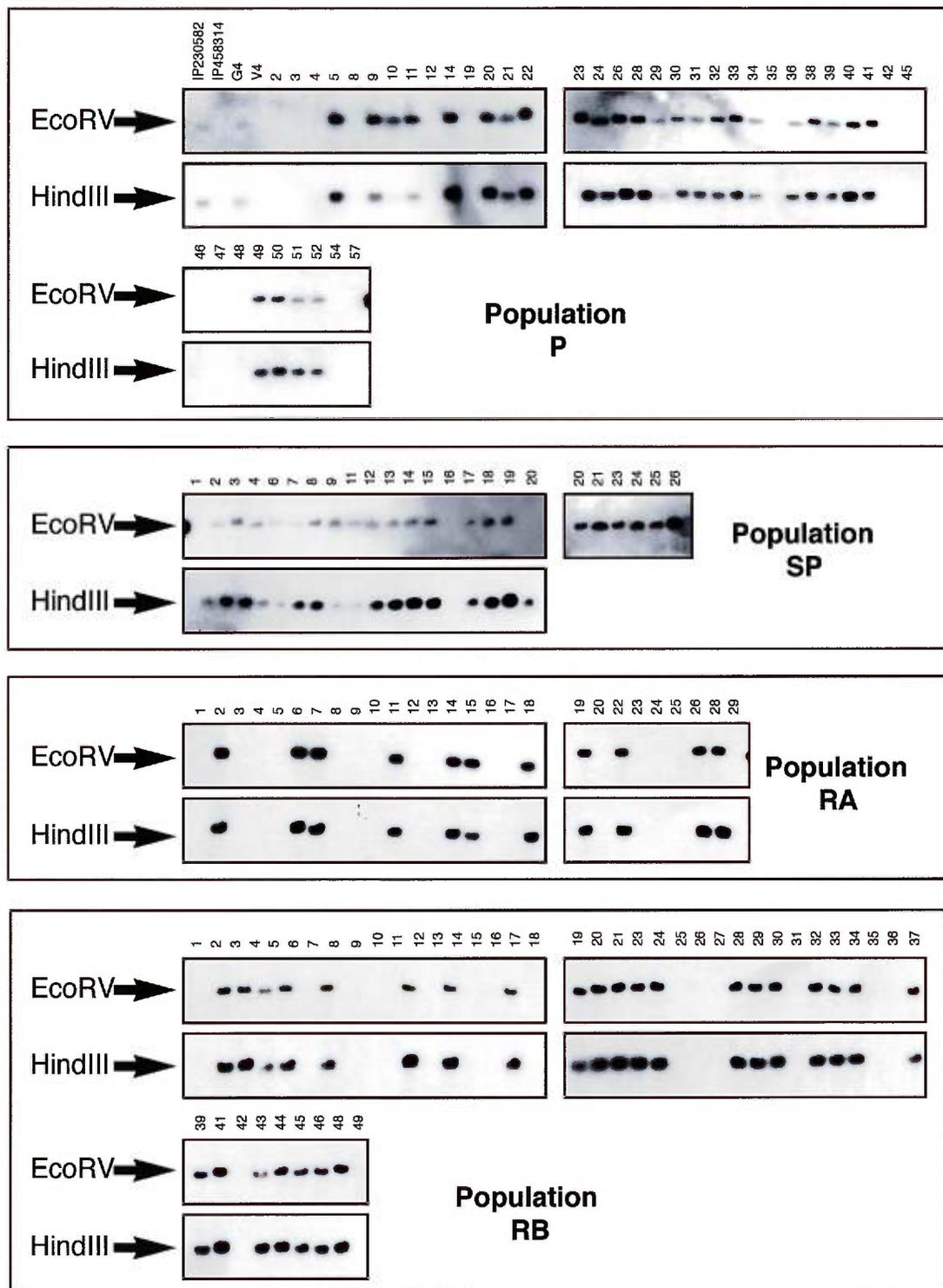


Figure 5A: Hybridation de type Southern, avec le clone S₁₄, sur quatre populations différentes. Dix microgrammes d'ADNg ont été digérés avec EcoRV (fragment de 1,6 kb) ou HindIII (fragment de 1,4 kb), et ce, pour chaque individu d'une population.

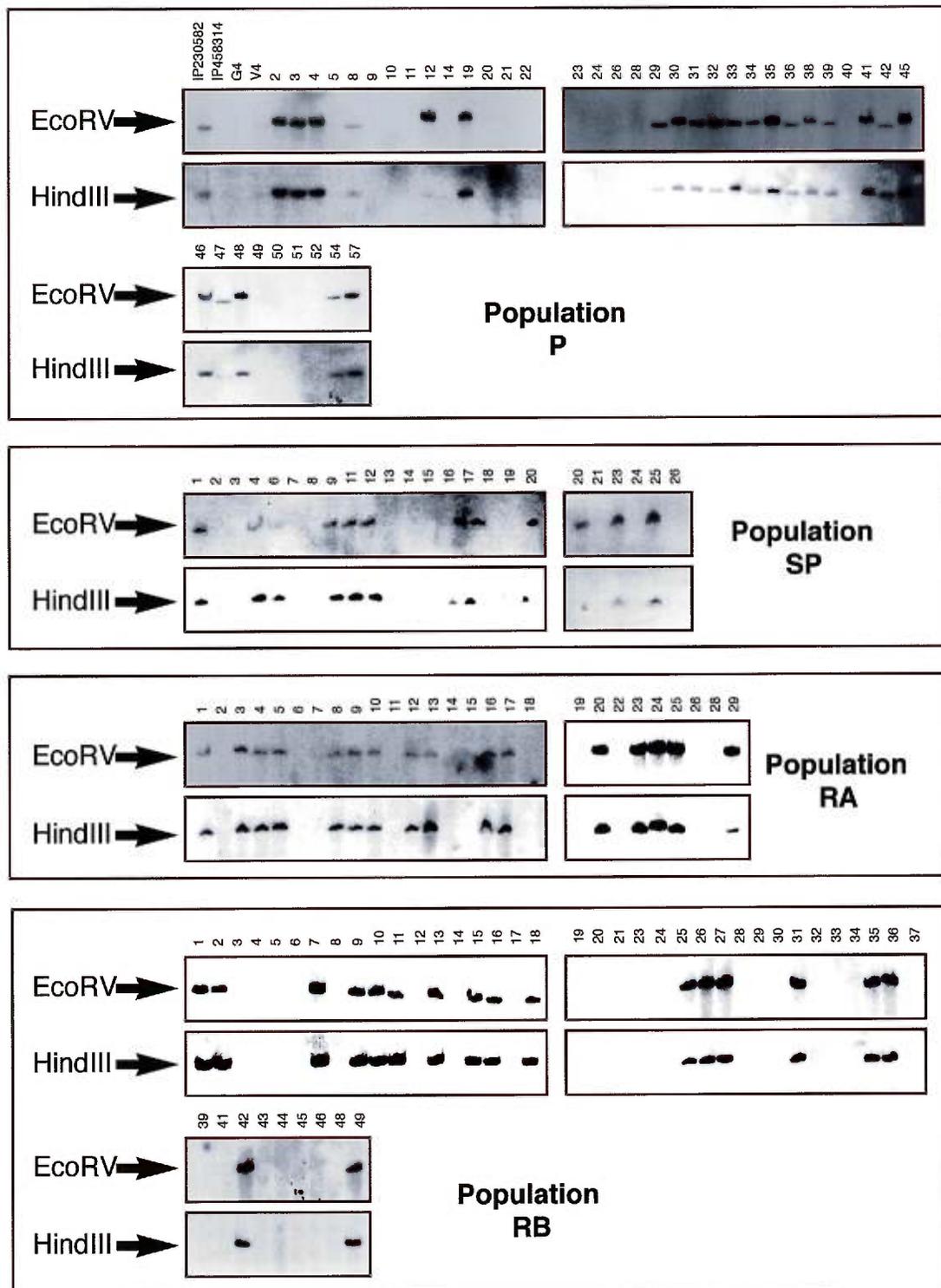


Figure 5B: Hybridation de type Southern, avec le clone S₁₃, sur quatre populations différentes. Dix microgrammes d'ADNg ont été digérés avec Eco RV (fragment de 12,1 kb) ou Hind III (fragment de 6,1 kb et 2,0 kb, seul le fragment de 6,1 kb est présenté), et ce, pour chaque individu d'une population.

	Population P	Population SP	Population RA	Population RB
1	-	13-14	11-13	12-13
2	13	14	11-14	11-13
3	13	14	12-13	11-14
4	13	13-14	12-13	12-14
5	14	-	12-13	11-14
6	-	13-14	12-14	11-14
7	-	14	12-14	12-13
8	13	14	11-13	12-14
9	14	13-14	11-13	11-13
10	14	-	11-13	12-13
11	14	13-14	11-14	12-13
12	13	13-14	11-13	12-14
13	-	14	11-13	12-13
14	14	14	11-14	12-14
15	-	14	12-14	12-13
16	-	13	12-13	12-13
17	-	13-14	11-13	11-14
18	-	14	12-14	11-13
19	13	14	11-14	12-14
20	14	13	11-13	12-14
21	14	13-14	-	11-14
22	14	14	11-14	-
23	14	13-14	11-13	11-14
24	14	14	11-13	11-14
25	-	13-14	12-13	12-13
26	14	14	11-14	11-13
27	-	-	-	11-13
28	14	-	12-14	12-14
29	13-14	-	12-13	11-14
30	13-14	-	-	12-14
31	13-14	-	-	11-13
32	13-14	-	-	11-14
33	13-14	-	-	12-14
34	13-14	-	-	11-14
35	13	-	-	12-13
36	13-14	-	-	11-13
37	-	-	-	12-14
38	13-14	-	-	-
39	13-14	-	-	12-14
40	14	-	-	-
41	13-14	-	-	12-14
42	13	-	-	11-13
43	-	-	-	11-14
44	-	-	-	11-14
45	13	-	-	11-14
46	13	-	-	11-14
47	13	-	-	-
48	13	-	-	11-14
49	14	-	-	12-13
50	14	-	-	-
51	14	-	-	-
52	14	-	-	-
53	-	-	-	-
54	13	-	-	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	13	-	-	-

Tableau 1: Génotype des divers individus composant les populations P, SP, RA et RB.

Légende: - Individu non disponible ou inexistant.

3.1.4 Identité et homologie de séquence avec la protéine S₁₄

Un alignement de la séquence peptidique des cinq clones ayant le plus haut taux d'identité avec la S-RNase S₁₄, est présenté à la figure 6. On constate que les cinq domaines caractéristiques aux ribonucléases S (C1 à C5, Figure 6) sont fortement conservés. De plus, il en est de même pour le domaine hypervariable HVb ainsi que les deux histidines (position 56 et 120), alors que la portion de l'alignement entre la position 64 et 92, contenant la région hyper-variable HVa, montre le plus haut taux de différences. La S-RNase S₁₄ présente curieusement une forte identité de séquences avec une S-RNase non-fonctionnelle de *Lycopersicon peruvianum* (numéro d'accèsion Z26581). En effet, 84 % d'identité et 89 % de similarité existent entre ces deux S-RNases (Figure 7b). Quoique différentes, la composition en acides aminées des régions hypervariables est tout de même très semblable entre ces deux allèles (Figure 6). La déficience de l'activité fonctionnelle de l'allèle S_c découle de l'absence d'une histidine dans le domaine C1 (position 56 de la Figure 6), cette dernière étant nécessaire à l'activité ribonucléasique (Huang *et al.*, 1994, Royo *et al.*, 1994 et Mc Cubbin *et al.*, 1997). L'allèle S_e (numéro d'accèsion Z26583) de cette même plante présente lui aussi un taux élevé d'identité avec le clone S₁₄ (78 %). Ces trois derniers allèles forment un groupe différencié se démarquant des trois autres allèles les plus proches de S₁₄ (Figure 7a). S_x de *Petunia hybrida* (numéro d'accèsion M81685), S₂ de *Solanum tuberosum* (numéro d'accèsion X62727) et l'allèle relique S_r de *Nicotiana sylvestris* (numéro d'accèsion AJ002296) montrent 51, 46 et 49 % d'identité de séquences respectivement avec le clone S₁₄ (Figure 7b). Ayant moins d'homologie qu'avec les trois précédents, les trois derniers allèles présentent peu d'affinité entre eux, comme le démontre la longueur des branches à la Figure 7a et le faible pourcentage d'identité à la Figure 7b.

3.1.5 Expression de S₁₄ dans les tissus matures

L'expression du clone S₁₄ se limite aux tissus reproducteurs femelles du pistil, aucune expression n'est observée dans les autres tissus floraux comme les pétales, les anthères, le pollen et les tubes polliniques en croissance *in vitro* (Figure 8a). De plus,

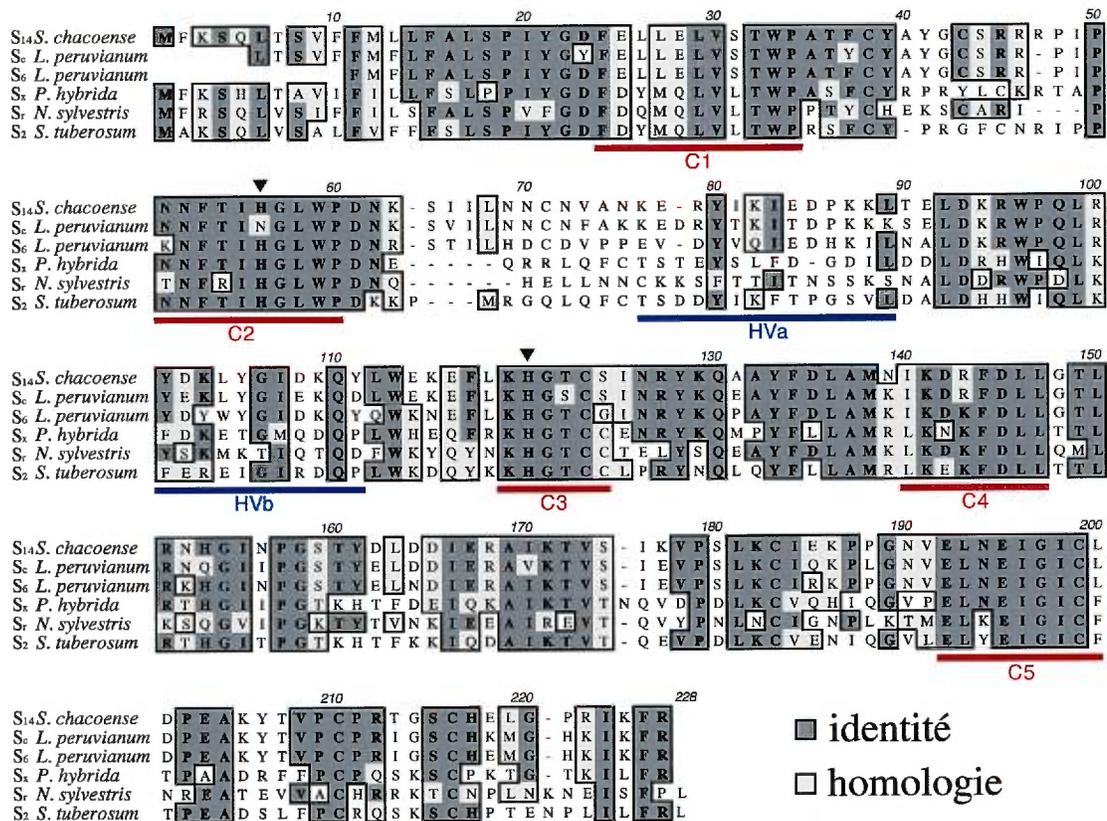


Figure 6 : Alignement de séquences peptidiques des cinq S-RNases les plus similaires au clone S₁₄ de *Solanum chacoense*.

Légende: Les triangles vert correspondent aux deux acides aminés histidine nécessaire à la fonction ribonucléasique de la protéine.

Numéros d'accèsion:

S ₁₄ <i>Solanum chacoense</i>	(AF232304)
S _c <i>Lycopersicon peruvianum</i>	(Z26581)
S ₆ <i>Lycopersicon peruvianum</i>	(Z26583)
S _x <i>Petunia hybrida</i>	(M81685)
S _r <i>Nicotiana sylvestris</i>	(AJ002296)
S ₂ <i>Solanum tuberosum</i>	(X62727)

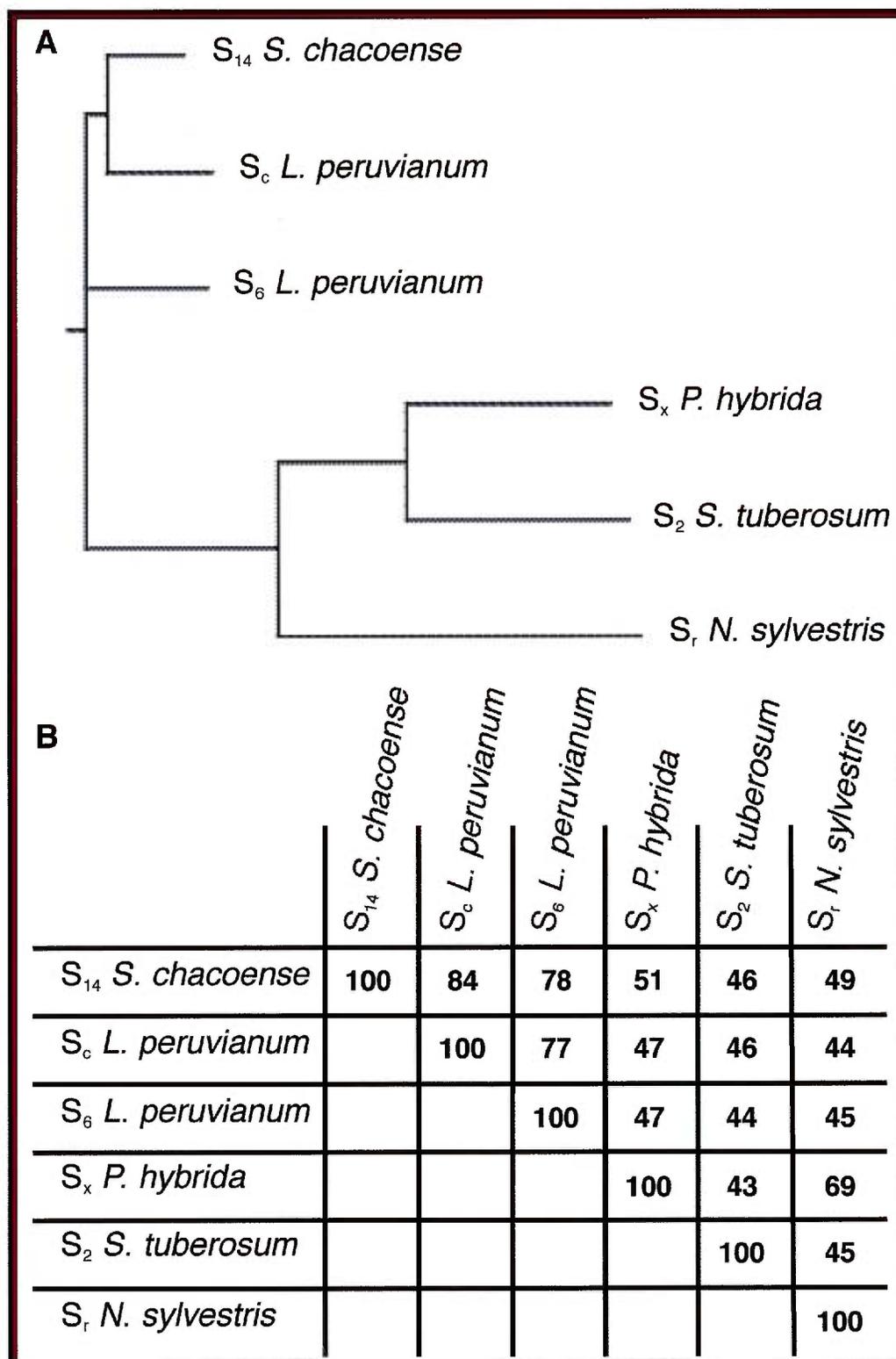


Figure 7: A- Dendrogramme de l'alignement peptidique des allèles d'auto-incompatibilité semblables au clone S_{14} de *Solanum chacoense*.
B- Pourcentage d'identité des séquences peptidiques semblables au clone S_{14} de *Solanum chacoense*.

aucun signal n'est détecté dans les parties végétatives de la plante, ces dernières représentées par les racines, la tige, les feuilles (Figure 8a) et les tubercules (données non présentées).

3.1.6 L'expression de S_{14} décroît suite à une pollinisation compatible

Au niveau du pistil, l'expression de la RNase S_{14} décroît suite à une pollinisation compatible (Figure 8a). Étant donné que le taux d'expression est plus élevé dans le style que dans l'ovaire (Figure 9a), nous avons raffiné l'analyse temporelle et spatiale en prélevant des styles pollinisés (au lieu de pistils) durant des intervalles de temps plus courts (Figure 8b). On peut y observer une perte graduelle du niveau d'expression du clone S_{14} , résultant en une absence de signaux vers 42 heures après la pollinisation compatible. Puisque S_{14} est régulé de manière développementale et que le signal persiste 48 heures après l'anthèse (Figure 9a), on pourrait croire que la perte d'expression lors de la pollinisation serait due à un apport développemental naturel du style. Afin de vérifier ce fait, nous avons cherché à comprendre s'il en était de même lors d'une auto-pollinisation. Après 48 heures de pollinisation incompatible, on remarque que l'expression de S_{14} est conservée et à un taux d'ARNm égal au contrôle (Figure 8c). La pollinisation compatible aurait donc pour effet de réprimer l'expression de cette S-RNase (Figure 8).

3.1.7 S_{14} est régulé de manière développementale et graduelle

La régulation du clone S_{14} dans le style et l'ovaire s'effectue de manière développementale, ayant, pour les deux types de tissus, un pic d'expression un jour avant l'anthèse (Figure 9a). La différence d'expression, à ce temps, a été déterminée par densitométrie, et le style contiendrait 240 fois plus de transcrits que l'ovaire. La membrane de la Figure 9a a été hybridée une demi-heure pour le style et 16 heures pour détecter le signal de l'ovaire. Le clone S_{14} est exprimé plus fortement dans la portion stigmatique du style (Figure 9b). On remarque également que lors du développement du style, la portion la plus près de l'ovaire ne semble pas répondre de la même manière

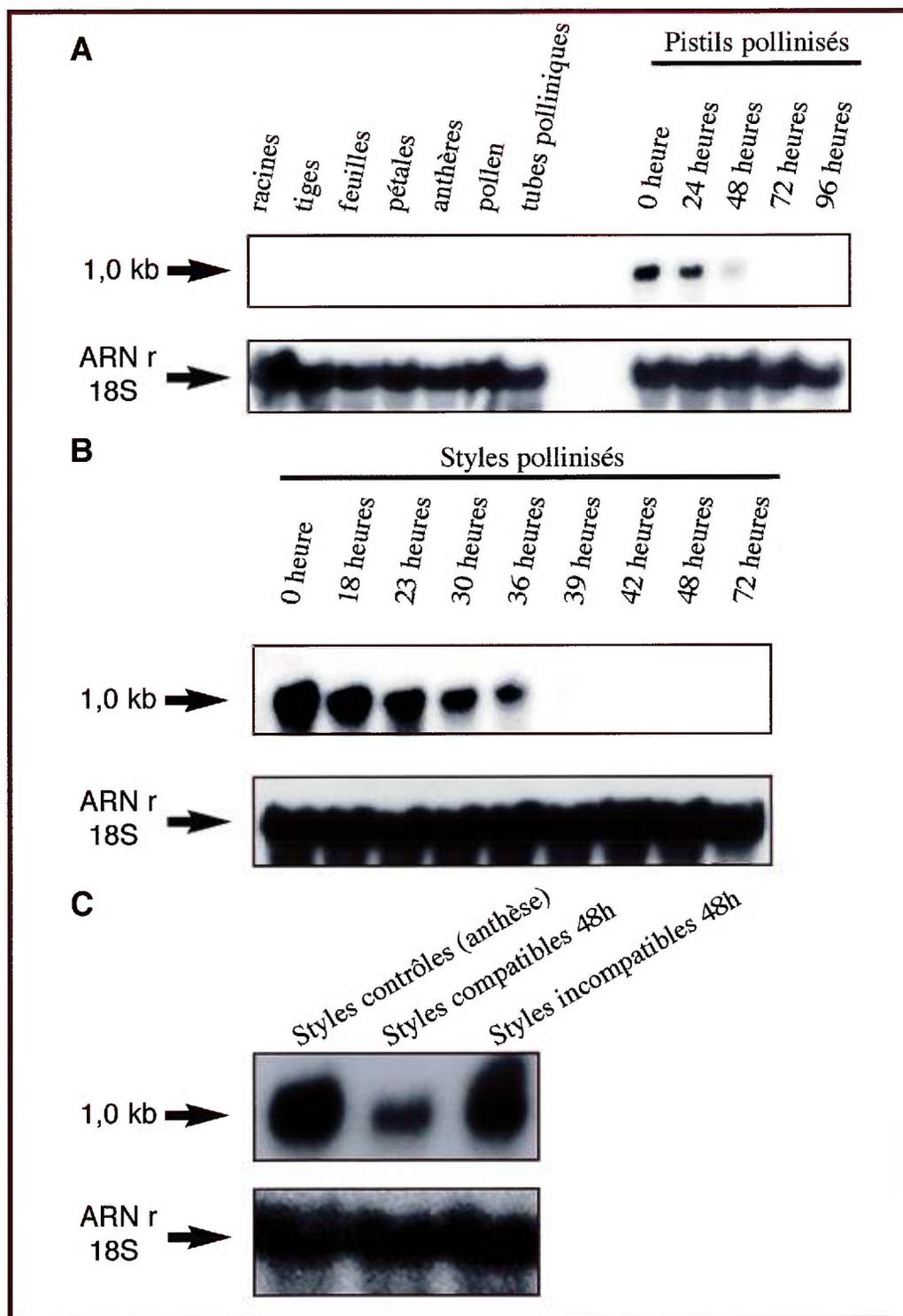


Figure 8: Hybridation de type northern de l'induction de S_{14} dans divers tissus de *Solanum chacoense*.

A- Induction de S_{14} dans des tissus matures.

B- Induction de S_{14} dans des styles pollinisés.

C- Induction de S_{14} dans des styles pollinisés avec du pollen incompatible.

développementale que l'ensemble du style (comparer la Figure 9a et b). Noter que ceci coïncide avec le mode de rejet des tubes polliniques dans le premier tiers du style.

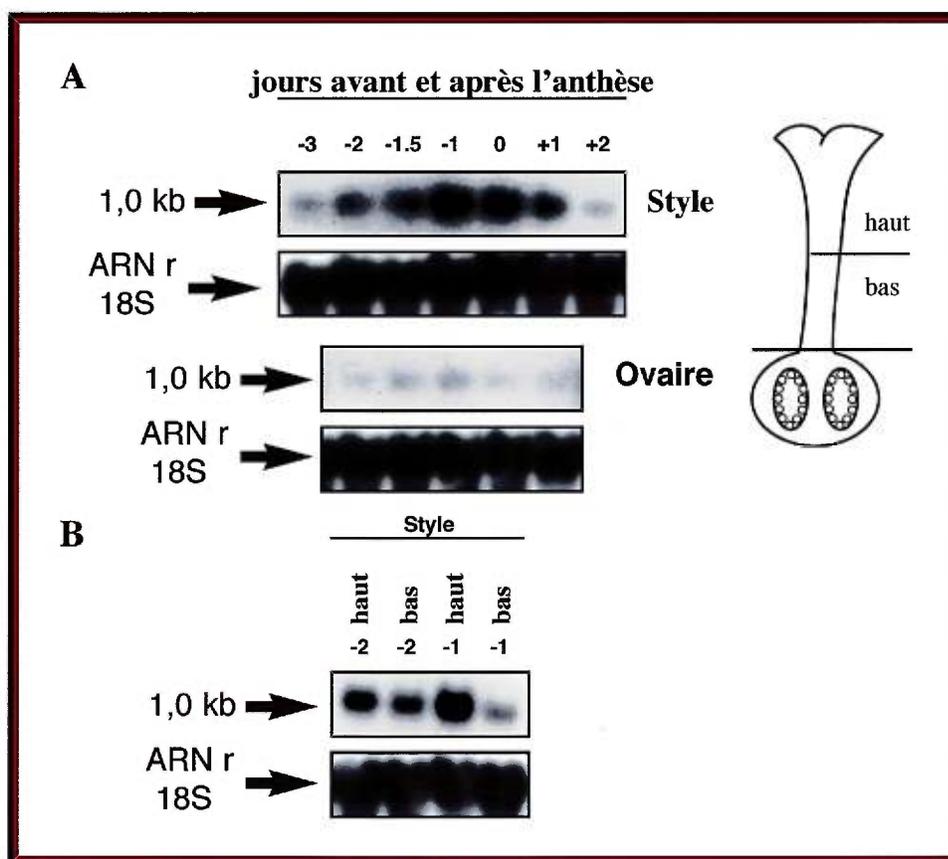


Figure 9: Hybridation de type northern de l'induction de S_{14} dans des tissus non-pollinisés de *Solanum chacoense*.
A- Induction de S_{14} dans le style et l'ovaire selon le stade d'anthèse.
B- Induction de S_{14} dans la portion inférieure et supérieure du style deux jours et un jour avant l'anthèse.

3.2 CHAPITRE 2

Analyse différentielle des ARNm et criblage des candidats

3.2.1 Logistique reliée à la représentation différentielle des messagers

Dans le but de trouver le gène Pollen-S, nous avons opté pour l'utilisation d'une technique de représentation différentielle des ARNm (Liang et Pardee, 1992). À l'aide de cette technique, nous comparerons le profil d'expression des gènes de tubes polliniques provenant de lignées comportant un allèle d'auto-incompatibilité différent. Les candidats de Pollen-S₁₃, pour V₄, et de Pollen-S₁₄, pour G₄, seront discriminés sur gel de polyacrylamide. Le choix de ces deux allèles, pour l'analyse comparative, est basé sur le fait que dans le laboratoire nous disposons de quatre allèles d'auto-incompatibilité différents chez *Solanum chacoense*. Deux d'entre eux sont évolutivement trop proches (Saba-El-Leil *et al.*, 1994) pour être logiquement utilisés lors de cette étude, puisque les deux S-RNases sont trop semblables, il est fort probable que les Pollen-S correspondants le soient également (Matton *et al.*, 1997 et 1999). Et finalement, quoique nous disposons de plusieurs plantes avec des combinaisons différentes d'allèles, seules quelques-unes produisent des fleurs fertiles en abondance. Notre choix s'est donc arrêté sur la lignée IP 230582 comme parent femelle, les deux lignées mâles mentionnées ci-haut, qui seront, dans le cas présent, semi-incompatibles. La lignée VF60 servira de pollinisateur contrôle par le fait qu'elle sera parfaitement compatible et qu'elle dispose de l'allèle S₁₂, l'allèle qu'ont en commun les deux lignées qui sont comparées l'une à l'autre. À cette approche *in vivo* nous ajouterons une comparaison entre les tubes polliniques en croissance *in vitro* de ces deux mêmes lignées. Dans l'alternative où les d'ARNm des tubes polliniques seraient dilués dans l'abondance de ceux du style, l'étude *in vitro* aura alors pour avantage de nous permettre de palier à ce problème en enrichissant les transcrits du gamétophyte mâle.

3.2.2 Détermination du génotype des lignées utilisées

Afin de nous assurer du génotype associé aux lignées utilisées, nous avons déterminé leur composition allélique par PCR génomique. Dans des conditions de polymérisation en chaîne, l'ADNg, des lignées à l'étude, a été mis en présence de quatre jeux d'amorces spécifiques à chacun des quatre allèles disponibles au laboratoire. La Figure 10 illustre le génotype des plantes suite à une migration sur gel et une coloration au bromure d'éthidium des produits de PCR. Caractérisé par un fragment de 0,8 kb pour S_{12} , 0,72 kb pour S_{13} et de 0,25 kb pour S_{14} (Figure 10), nous pouvons conclure que les lignées utilisées portent les allèles qui répondent aux conditions fixées pour notre approche expérimentale.

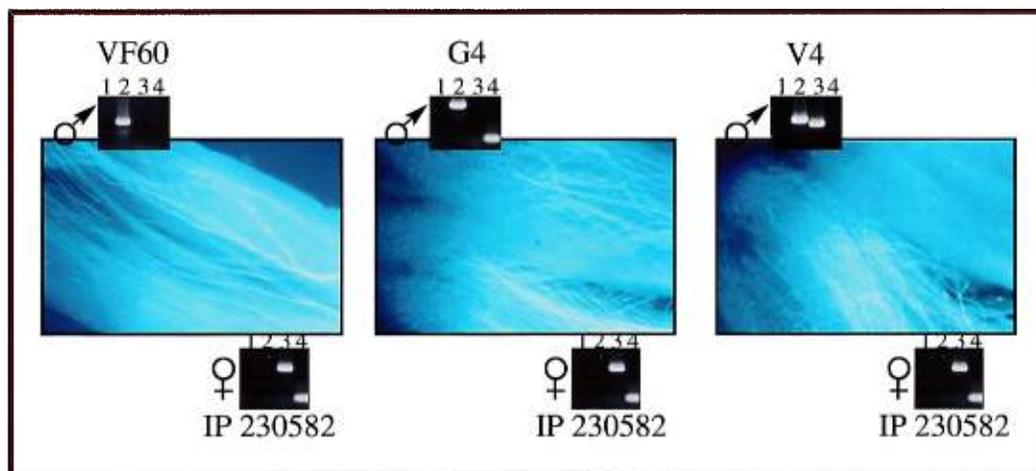


Figure 10: Progression des tubes polliniques (colorés au bleu d'aniline) dans le style de la lignée IP 230582 après six heures de pollinisation. Migration sur gel et détection au bromure d'éthidium de l'amplification par PCR qui ont permis de confirmer le génotype des plantes mâles et femelles.

Légende: piste 1: Amplification avec les amorces DPM-3 et DPM-13 (spécifique à S_{11}).
 piste 2: Amplification avec les amorces L12 et R12 (spécifique à S_{12}).
 piste 3: Amplification avec les amorces DPM-1 et DPM-2 (spécifique à S_{13}).
 piste 4: Amplification avec les amorces DPM-5 et DPM-6 (spécifique à S_{14}).

3.2.3 Établissement des conditions liées à la pollinisation

Afin de mener à bien l'étude comparée des patrons d'expression des ARNm, nous avons cherché à connaître le temps de pollinisation pour lequel la majorité des tubes polliniques était conservée intact lors d'un croisement semi-compatible. Suite à la coloration au bleu d'aniline et à une observation par épifluorescence, nous avons constaté qu'après 10, 12, 14 et 16 heures de pollinisation, que la majorité des tubes polliniques avaient été reconnus, par le style, comme étant génétiquement semblables (données non-présentées). Dans l'optique où l'état intact du tube pollinique incompatible est important, afin de conserver les ARNm non dégradés, nous avons donc orienté l'expérimentation sur des temps plus courts de pollinisation. Deux, quatre et six heures de pollinisation semblaient répondre à cette condition, la Figure 10 illustre ce croisement semi-compatible après six heures de pollinisation. On constate, que, peu importe la lignée utilisée, le taux de croissance de la portion mâle semble être le même. Plus important encore, on observe l'absence de tubes polliniques pour lesquels une déposition de callose à leur extrémité indique l'événement de reconnaissance.

3.2.4 Représentation différentielle des ARNm

Pour nous assurer de la sensibilité de la technique de représentation différentielle des ARNm, nous avons, par cette dernière, isolé un gène qui semblait démontrer un profil d'expression lié au pollen, gène que nous avons nommé P1. Une caractérisation préliminaire par analyse northern confirma son expression spécifique aux organes reproducteurs mâles (Figure 11), alors que le séquençage nous révéla une forte identité de séquences (56 %) (données non présentées) avec une pectine méthylestérase (numéro d'accèsion Y13285) exprimé spécifiquement dans le pollen de *Zea mays* (Wakeley *et al.*, 1998).

Trois amorces ancrées ont permis de subdiviser la population d'ARNm, alors que 80 amorces arbitraires (GenHunter, Nashville, TN) ont été utilisées pour générer le profil d'expression des différents tissus à l'étude. La figure 12 illustre les différents

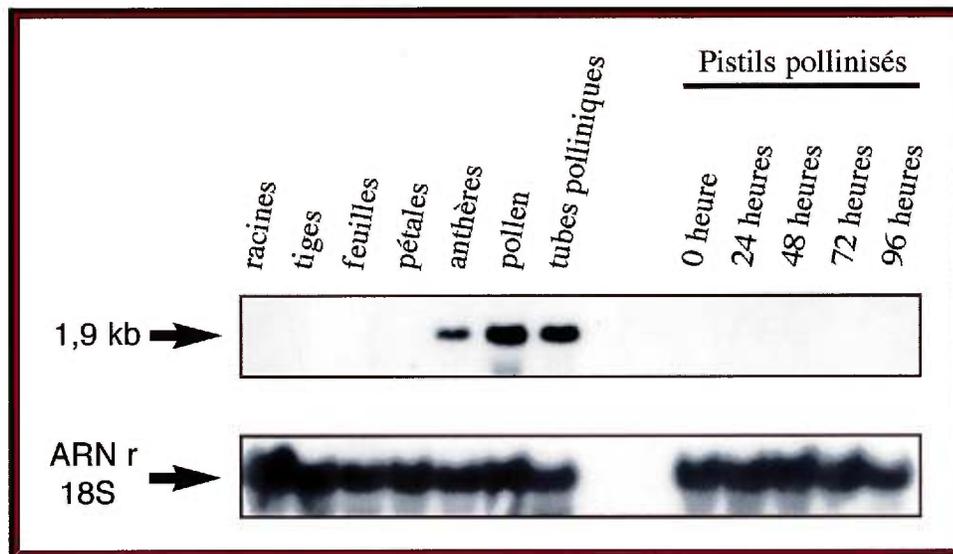


Figure 11: Hybridation de type northern de l'induction du gène P1 dans des tissus matures de *Solanum chacoense*.

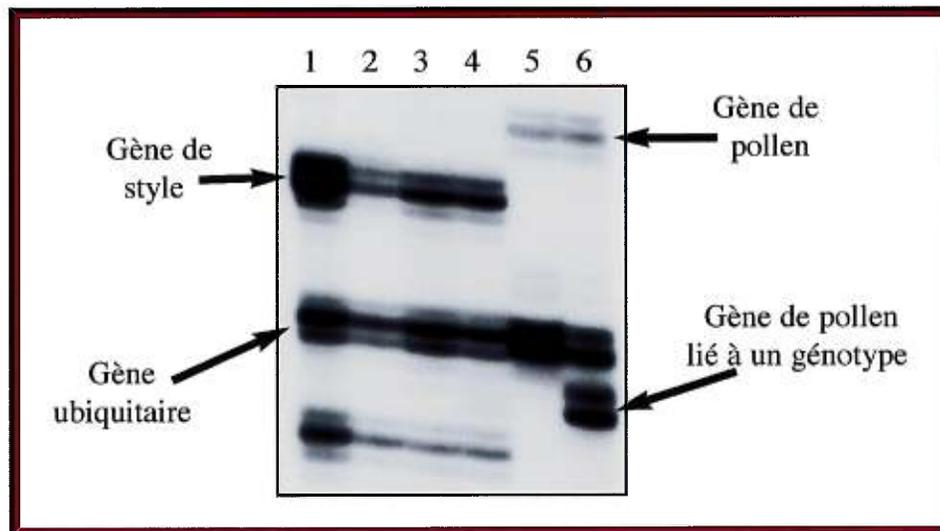


Figure 12: Portion d'un gel de représentation différentielle des messagers montrant quelques patrons d'expression typiques.

Légende: Piste 1: Styles contrôles de la lignée IP 230582.
 Piste 2: Styles pollinisés avec la lignée VF60 pendant 6 heures.
 Piste 3: Styles pollinisés avec la lignée G4 pendant 6 heures.
 Piste 4: Styles pollinisés avec la lignée V4 pendant 6 heures.
 Piste 5: Tubes polliniques *in vitro* de la lignée G4.
 Piste 6: Tubes polliniques *in vitro* de la lignée V4.

types de patrons observés. Les pistes 1 à 4 représentent l'expérimentation *in vivo*, alors que les pistes 5 et 6 représentent le volet expérimental *in vitro*.

Les 240 possibilités de jeux d'amorces ont permis de déceler 518 bandes montrant un patron différentiel pour l'un ou l'autre des deux génotypes à l'étude. La nomenclature utilisée, pour décrire l'ensemble des candidats, se résume à une inscription numérique précédée d'une annotation particulière caractérisant l'origine du génotype et du tissu. Les préfixes Gt et Vt indiquent un candidat provenant du profil des tubes polliniques *in vitro* des lignées G₄ et V₄ respectivement, alors que G et V déterminent les tubes polliniques en croissance *in vivo*. Nous avons trouvé davantage de candidats pour les tissus *in vitro*, et une représentation légèrement plus élevée de la lignée V₄ pour l'ensemble de tous les candidats (données non présentées).

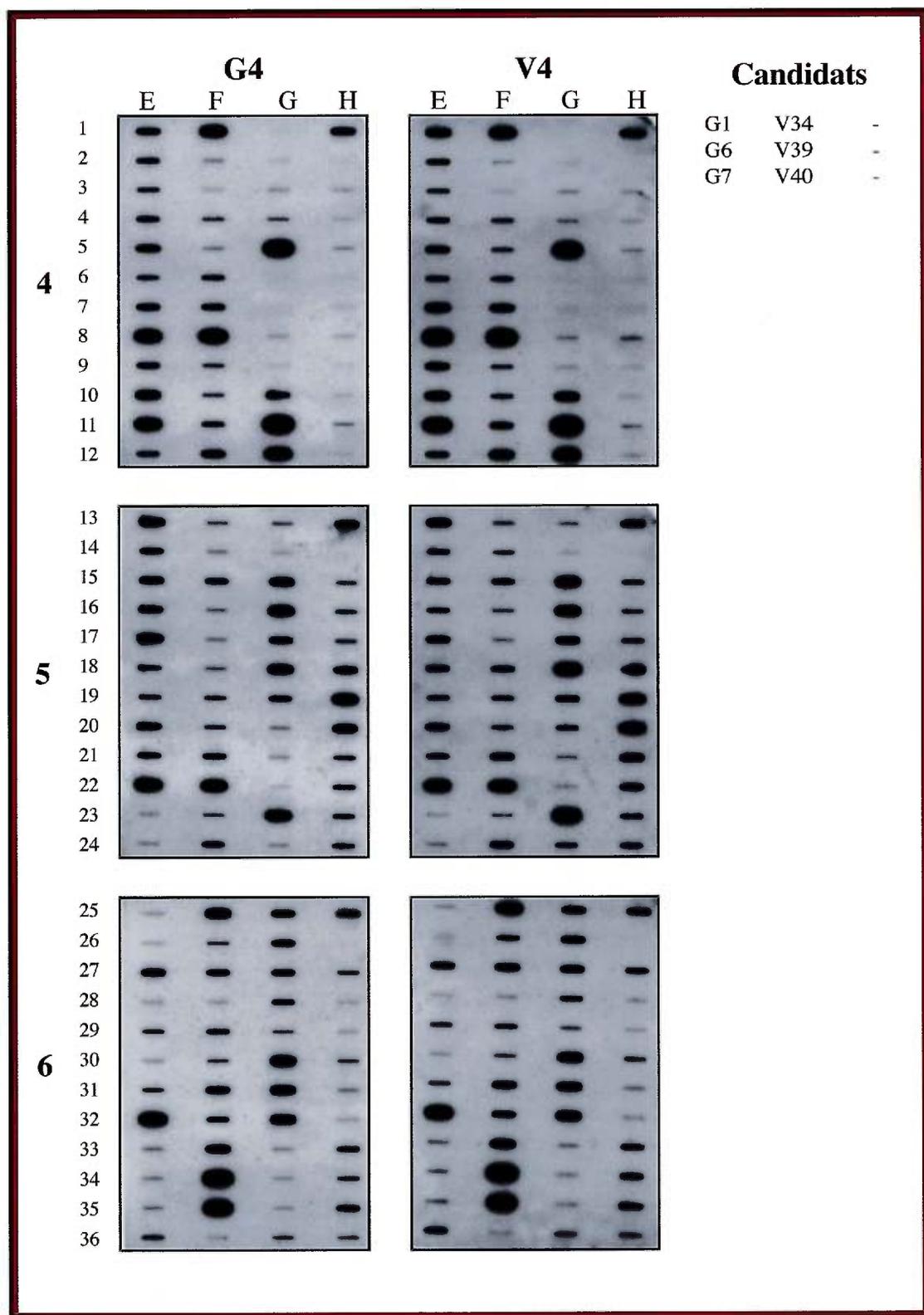
3.2.5 Criblage des candidats

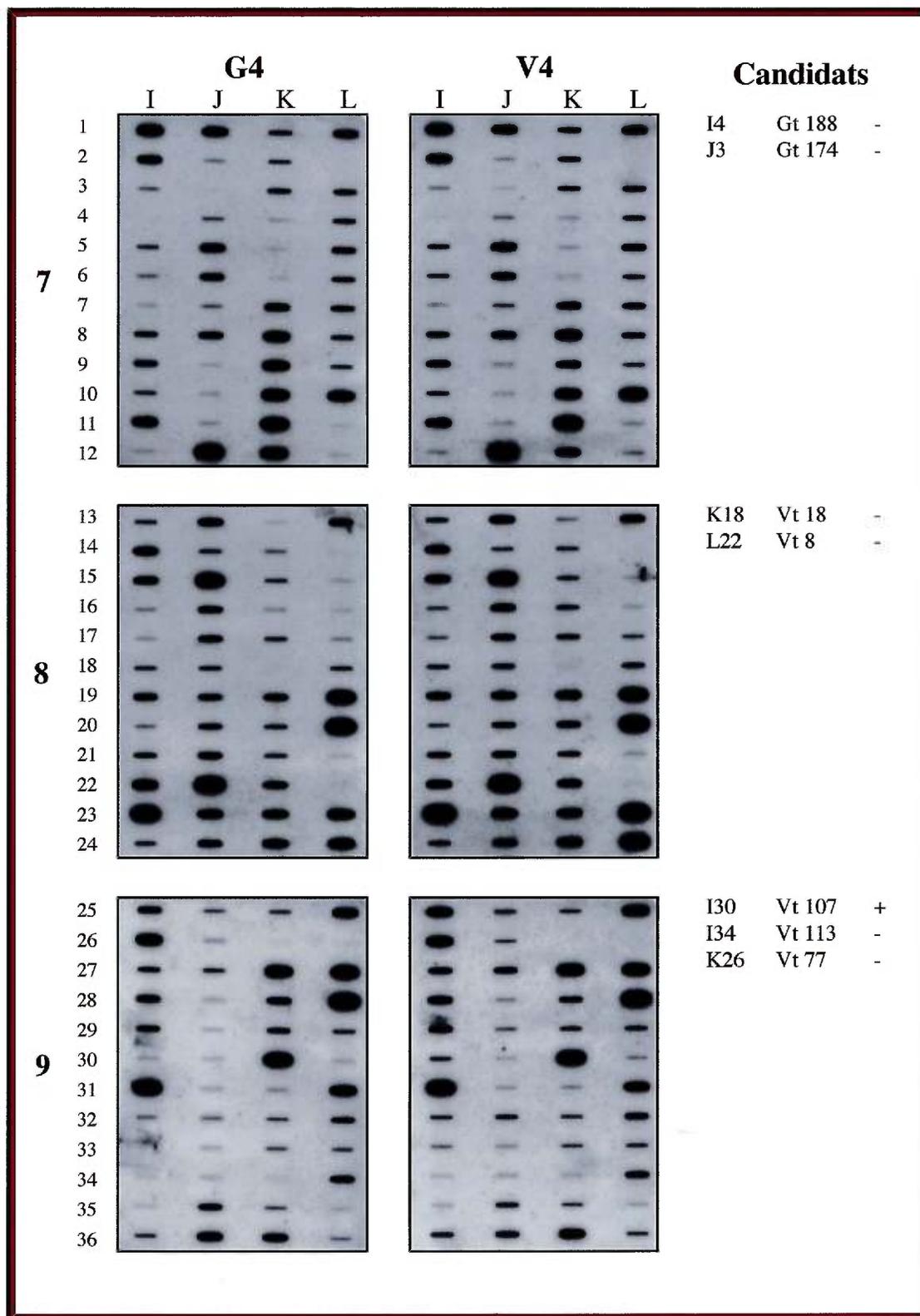
3.2.5.1 Première étape : Analyse globale de type slot blot

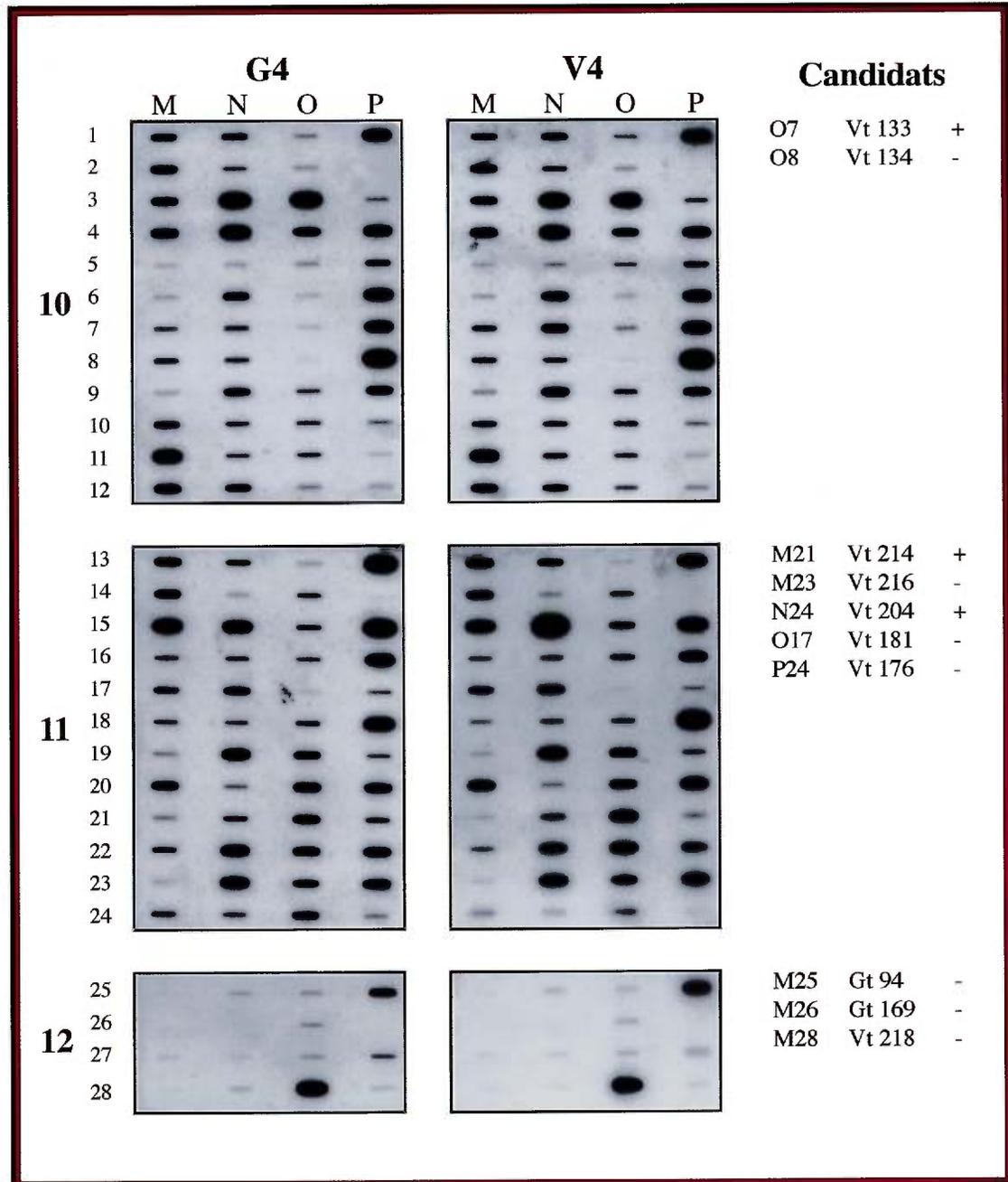
Étant trop nombreux pour justifier une analyse de cas par cas, nous avons donc élaboré une stratégie de northern inverse afin de cribler l'ensemble des 518 candidats en une seule expérience simple et efficace. Tous les candidats ont été amplifiés avec leur jeux d'amorces respectif. Les produits de PCR correspondant ont été fractionnés en deux volumes égaux pour être par la suite fixés sur membrane en duplica par une technique de slot blot. Une série de douze membranes a été hybridée avec une sonde radioactive de premier brin d'ADNc provenant de la transcription inverse d'ARNm de tubes polliniques *in vitro* de la lignée G₄. Quant au réplica, il a subi le même type de traitement avec une sonde de la lignée V₄. Les deux séries de membranes ont été comparées (Figure 13), 47 candidats se sont démarqués soit par leur absence d'expression (-) (37 candidats) soit par une expression différentielle (+) (10 candidats). Ceux-ci sont indiqués dans la colonne de droite de la Figure 13. Il y a de fortes possibilités que le gène Pollen-S soit faiblement exprimé, nous avons donc conservé les candidats qui démontreraient une absence d'expression, étant donné que cette technique de criblage manque de sensibilité.

Figure 13: Analyse de type slot blot de tous les candidats de l'analyse de représentation différentielle des messagers. Hybridation avec une sonde de premier brin d'ARNm de tubes polliniques *in vitro* G₄ (à gauche) ou V₄ (à droite). Les candidats, retenus pour des analyses ultérieures, sont inscrits à l'extrême droite avec les coordonnées du slot blot qui correspondent ainsi que l'information quant à leur expression différentielle (+) ou leur absence d'expression sur les deux membranes (-).

Légende: Gène contrôle S₁₃: D2, D14, D26, H2, H14, H26, L2, L14, L26, P2, P14 et P26 (pour les membranes V₄).
 Gène contrôle S₁₄: D2, D14, D26, H2, H14, H26, L2, L14, L26, P2, P14 et P26 (pour les membranes G₄).
 Gène contrôle P1: D1, D13, D25, H1, H13, H25, L1, L13, L26, P1, P13 et P26 (pour les membranes G₄ et V₄).







3.2.5.2 Deuxième étape : Analyse individuelle de type northern

L'ADN de chacun des candidats, 47 au total, a été marqué radioactivement afin d'être hybridé individuellement sur des northern contenant 10 ug d'ARN totaux de styles contrôles (non-pollinisés), de tubes polliniques *in vitro* de la lignée G₄ et dans une troisième piste ceux de la lignée V₄. Cinq types de patrons ont été observés (Figure 14) : les gènes à expression ubiquitaire, les gènes spécifiques aux grains de pollen ou aux tubes polliniques, les gènes exprimés dans le style, les gènes sans expression détectable et un gène à expression différentielle. Les deux derniers patrons ont été retenus pour les raisons qui ont déjà été mentionnées. Ces candidats à potentiel élevé sont V 6, Gt 174 et Vt 169 pour ceux qui montrent une absence d'expression et Gt 123 pour le candidat démontrant un patron d'expression spécifique pour la lignée G₄ (Figure 14).

3.2.5.3 Troisième étape : Analyse northern à sensibilité accrue

Afin de cerner le patron d'expression des candidats V 6, Gt 174 et Vt 169, nous les avons marqués radioactivement et les avons hybridés individuellement sur un northern contenant 1 ug d'ARNm de styles contrôles, de tubes polliniques *in vitro* de la lignée G₄ et dans une troisième piste ceux de la lignée V₄, ce type d'analyse devrait être dix fois plus sensible que la précédente. Le candidat Vt 169 montre un patron d'expression ubiquitaire alors que Gt 174 semble se limiter aux tissus reproducteurs mâles, quant à V 6, nous n'avons pu détecter de signal, et ce, même après une surexposition de la membrane (Figure 15). Nous conserverons donc les candidats Gt 123 et V6 pour une caractérisation plus approfondie.

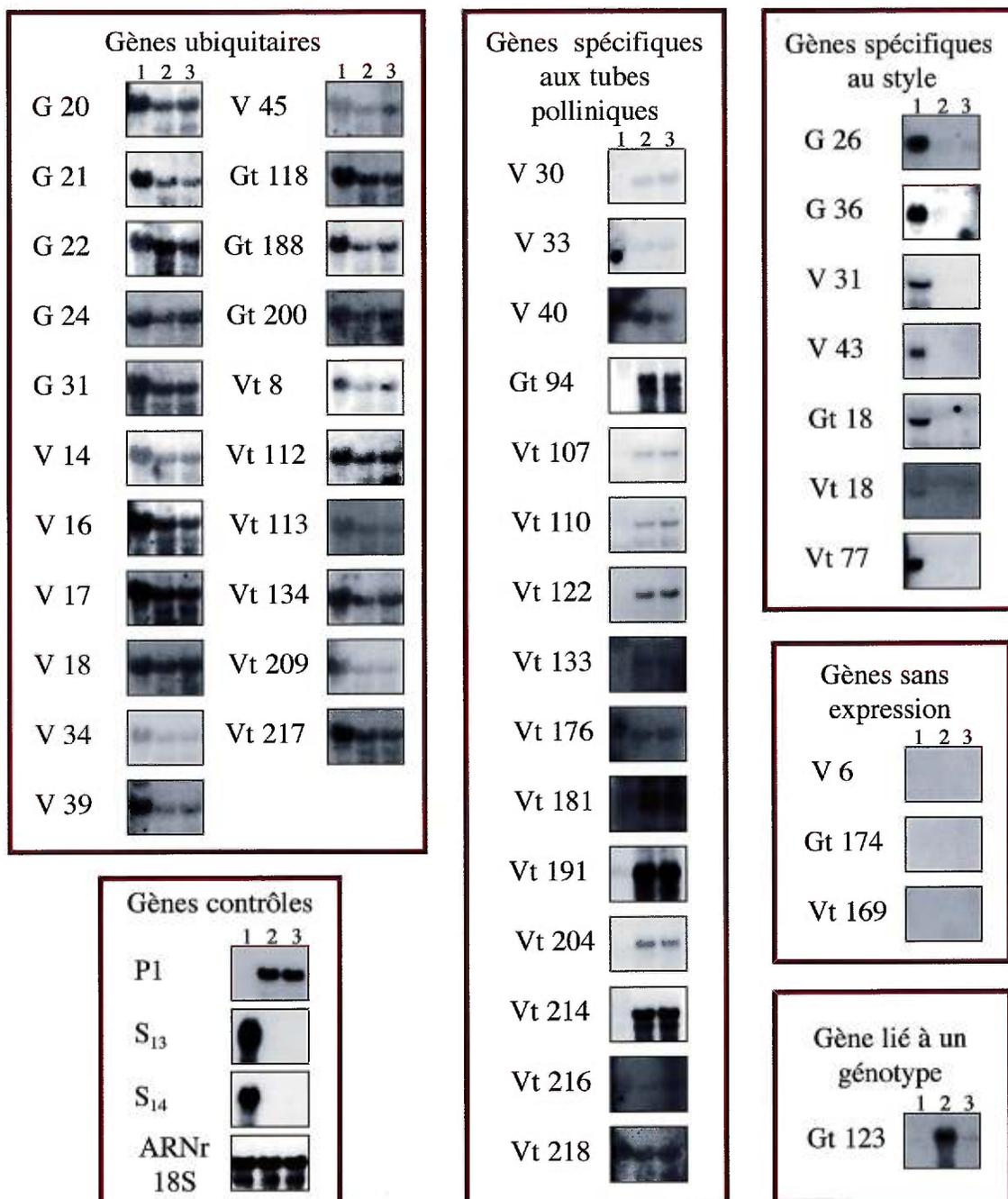


Figure 14: Hybridation de type northern sur tous les 47 candidats testés positifs suite à l'analyse précédente de type slot blot. Les candidats sont classés selon leurs similarités d'expression, alors que les gènes contrôles sont présents à type d'exemple.

Légende: piste 1: 10 ug d'ARNtot de styles contrôles 0h de la lignée IP23058.
piste 2: 10 ug d'ARNtot de tubes polliniques *in vitro* de la lignée G4.
piste 3: 10 ug d'ARNtot de tubes polliniques *in vitro* de la lignée V4.

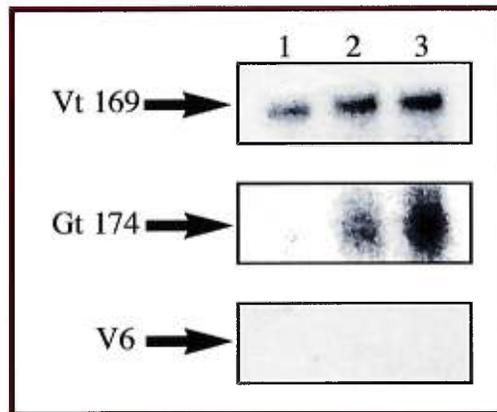


Figure 15: Hybridation de type northern sur les 3 candidats ayant démontré aucune expression suite à l'analyse précédente de mini-northern.

Légende: piste 1: 1 ug d'ARNm de styles contrôles de la lignée IP230582.
 piste 2: 1 ug d'ARNm de tubes polliniques *in vitro* de la lignée G4.
 piste 3: 1 ug d'ARNm de tubes polliniques *in vitro* de la lignée V4.

3.2.6 Le candidat Gt 123 n'est pas lié au locus S

Étant donné que le gène Pollen-S doit nécessairement être polymorphique et lié au locus S, nous avons testé le candidat différentiel Gt 123 par analyses Southern de populations d'individus ségréguants pour les allèles S₁₃ et S₁₄ (population RA et RB de la Figure 5). Nous pouvons constater que Gt 123 n'est pas lié au locus S (Figure 16a). En effet, un test χ^2 (seuil de signification de 5 %) nous informe que ce gène serait situé sur un autre chromosome. Par contre, une digestion de l'ADNg avec l'endonucléase Eco RV (fragment de 2,5 kb pour certains individus seulement, Figure 16a) et Hind III (données non présentées) démontre que ce dernier possède diverses formes polymorphiques.

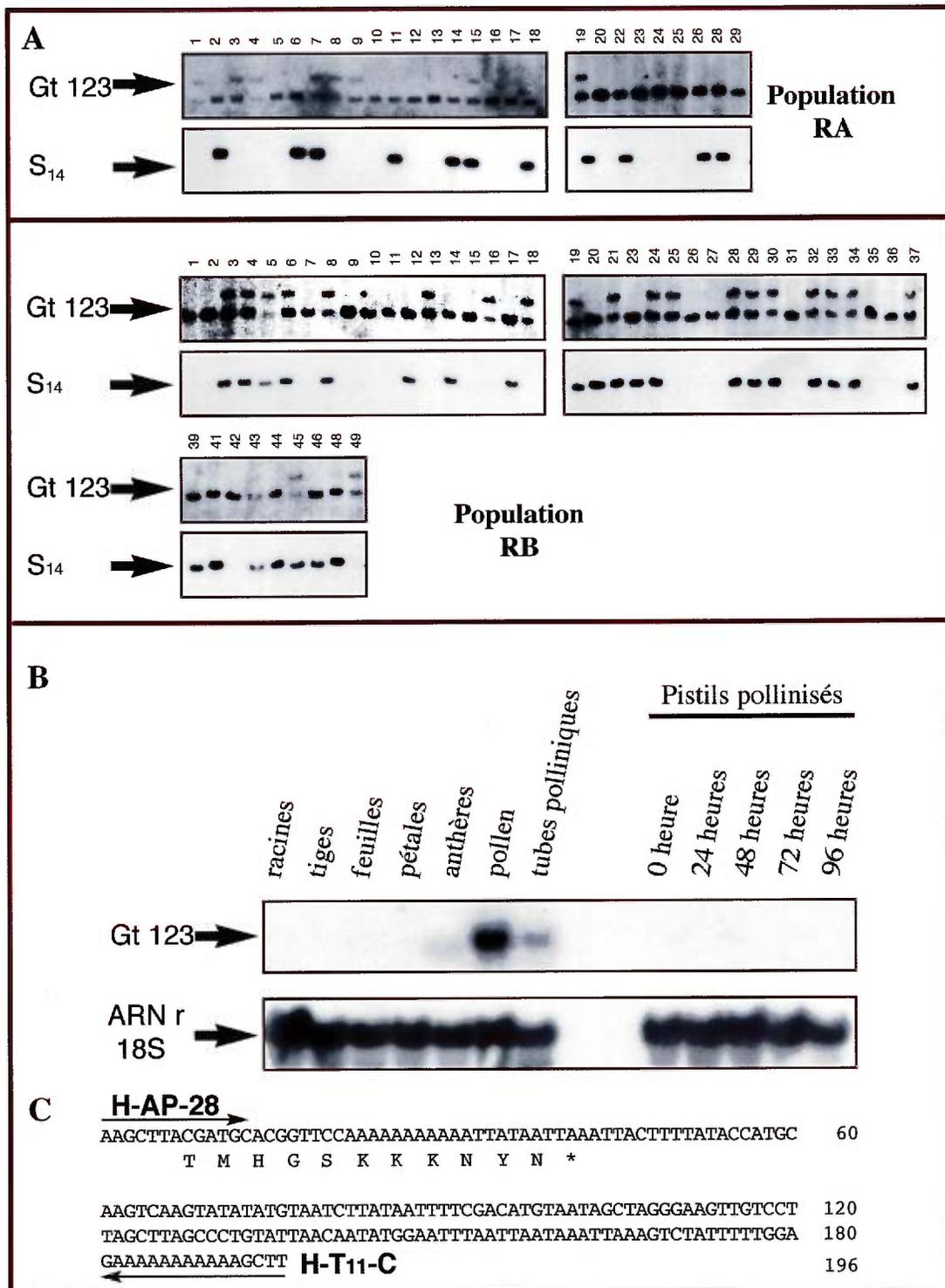


Figure 16: A- Hybridation de type Southern avec le clone Gt 123 (fragment de 1,9 et 2,5 kb) et S₁₄ (fragment de 1,6 kb), digestion avec EcoRV.
 B- Hybridation de type northern de l'induction de Gt 123 dans des tissus matures de *Solanum chacoense*.
 C- Séquence et traduction du fragment partiel du cDNA de Gt 123.

Malgré le fait que ce candidat ne soit pas lié au locus S, nous avons tout de même cherché à effectuer une caractérisation sommaire par séquençage du fragment de PCR et par analyse northern sur les différents tissus de la plante. Ce gène génotype spécifique ne montre aucune similarité de séquences au niveau des banques de données (la dernière recherche sur GenBank date du 2 août 2000), la séquence en nucléotides nous a permis de détecter un cadre de lecture possible (Figure 16c). Le clone Gt 123 est uniquement exprimé dans les organes reproducteurs mâles. Les anthères, le pollen et les tubes polliniques sont les seuls endroits où nous avons détecté un signal d'hybridation (Figure 16b).

3.2.7 Le candidat V 6 n'est pas lié au locus S

Étant donnée l'impossibilité de détecter un signal radioactif par analyse northern (Figure 14 et 15), nous avons voulu déterminer le lien au locus S du clone V 6. Treize bandes faibles ont pu être détectées suite à une analyse de type Southern, où l'ADNg des individus de la population RA et RB avait été digéré avec l'endonucléase Eco RV (Figure 17, seulement quelques individus sont présentés). On constate que le clone V 6 ne semble pas être lié au gène S₁₄, par le fait que le patron de bandes multiples a été observé chez tous les individus de la population (données non présentées). Ce type de patron semble correspondre à de l'ADN répétitif. Le séquençage, du fragment de PCR du clone V 6, n'a démontré aucune homologie au niveau des banques de données informatiques (données non présentées, la dernière recherche sur GenBank date du 2 août 2000).

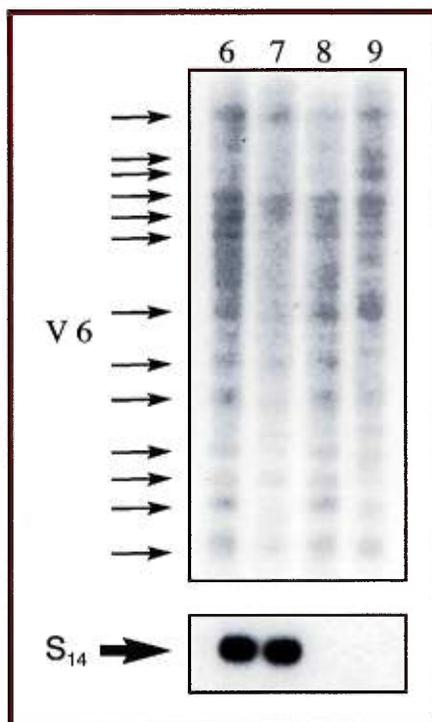


Figure 17: Hybridation de type Southern avec le clone V 6 et S₁₄ (fragment de 1,6 kb), digestion avec Eco RV.

4. DISCUSSION

4.1 L'allèle S_{14} de *Solanum chacoense*

Le clone SV3B-G12, isolé d'une banque de pistils pollinisés après 48 heures par une technique de soustraction virtuelle, est la S-RNase S_{14} de *Solanum chacoense*. La caractérisation et le séquençage complet de cet allèle ont été effectués puisque ces informations étaient incomplètes ou absentes.

4.1.1 Séquençage et homologie de séquences du clone S_{14}

Le séquençage de l'allèle S_{14} a révélé un clone incomplet, que nous avons complété par l'obtention du fragment 5' manquant par le criblage de la banque d'origine par PCR avec l'amorce inverse S14-1. Ce clone, qui contient un cadre de lecture complet, possède 898 nucléotides et code pour une protéine de 223 acides aminés (Figure 3) contenant un peptide signal de 22 acides aminés (Figure 3 et 4) et deux sites potentiels de glycosylation (Figure 3). Dans les populations RA et RB (Figure 5), il est présent uniquement dans les individus qui ne portent pas l'allèle S_{13} , confirmant l'identité de l'allèle S_{14} du clone SV3B-G12.

L'alignement de la séquence peptidique avec les cinq S-RNases les plus similaires à l'allèle S_{14} a démontré que seule la région hypervariable HVa avait un haut degré de diversité (Figure 6). La S-RNase qui présente le plus de similarité avec S_{14} est l'allèle S_c de *Lycopersicon peruvianum* (numéro d'accèsion Z26581) avec 84 % d'identité de séquences suivie de 78 % pour l'allèle S_6 de la même espèce (numéro d'accèsion Z26583) (Figure 7). On pourrait croire que les allèles les plus similaires origineraient d'espèces plus évolutivement rapprochées. Et donc, que les allèles du genre *Solanum* auraient montré une plus grande homologie à l'allèle S_{14} que celles des genres *Lycopersicon*, *Nicotiana* et *Petunia* (Figure 6 et 7). Ces observations confirment l'hypothèse de Ioerger *et al.* (1990) où l'apparition de l'allélisme au locus S précéderait

la spéciation au sein de la famille des *Solanaceae*. Dans le même ordre d'idées, le très fort pourcentage d'homologie de S_{14} avec l'allèle non fonctionnel S_c vient appuyer cette hypothèse. En effet, la population péruvienne de plantes compatibles partage le même territoire qu'une population S_6S_7 de la même espèce, de plus les individus de ces deux populations sont morphologiquement identiques, tant au niveau de la structure de leurs feuilles, leurs tiges et leurs fleurs (Kowyama *et al.*, 1994) alors que des plantes ayant un génotype particulier ont souvent des apparences morphologiques distinctes (Rick, 1963). Partageant la même niche écologique, la même morphologie (Kowyama *et al.*, 1994) et 77 % d'identité de séquences (Royo *et al.*, 1994, Figure 7b) avec S_6 , S_c originerait probablement de cette population suite à une perte de la fonctionnalité de la S-RNase par mutation de l'histidine du site actif dans le domaine C2 (H33N, Royo *et al.*, 1994). Puisque S_{14} de *Solanum chacoense* montre plus de similarité avec S_c (84 %) que les allèles S_c et S_6 de *Lycopersicon peruvianum* (77 %), cela confirmerait que le polymorphisme au locus S se serait établi avant l'établissement des espèces chez les *Solanaceae* (Ioerger *et al.*, 1990), comme il a également été démontré chez les *Brassicaceae* (Dwyer *et al.*, 1991).

4.1.2 Expression tissulaire du clone S_{14}

Le clone S_{14} est exprimé uniquement dans le gynécée (Figure 8 a et b). Un groupe de chercheurs a démontré que les transcrits de S-RNases se retrouvent faiblement exprimés dans les anthères en développement de *Nicotiana glauca* et *Lycopersicon esculentum*, et ont de plus détecté la présence de la protéine dans le pollen par immunolocalisation (Dodds *et al.*, 1993), sans pour autant que cette dernière n'ait d'influence sur le phénotype (Dodds *et al.*, 1999). Chez *Solanum chacoense*, il nous a été impossible de détecter un signal relié à l'expression de S_{14} dans les tissus reproducteurs mâles, et ce, même après une surexposition de la membrane (données non-présentées). Il n'est pas à exclure, que l'expression de S_{14} , soit tout de même activée dans ce tissu, comme c'est le cas chez les deux membres de la famille des Solanacées mentionnés précédemment. Il est possible que les techniques de laboratoires utilisées ne

sont pas suffisamment sensibles. Cependant, l'expression au niveau de l'anthère chez *Nicotiana glauca*, a été détectée par analyses northern habituelles (Dodds *et al.*, 1993).

4.1.3 Expression développementale du clone S₁₄

La régulation développementale du clone S₁₄ (Figure 9a) démontre un pic d'expression un jour avant l'anthèse alors qu'à trois jours avant l'ouverture de la fleur et deux jours après, le taux de messagers est très faible. Anderson *et al.* (1986) avaient, eux aussi, démontré ce type d'expression développementale de la S-RNase S₂ chez *Nicotiana glauca*. Le taux peu élevé de ce transcrit à ce stade précoce du développement permet les pollinisations incompatibles mécaniques qui résultent en la production de graines. Le taux maximal d'expression du transcrit se situant avant l'anthèse, cela a pour conséquence une accumulation de S-RNases assurant la mise en place, dès le tout début de la réceptivité de la fleur pour le pollen, des barrières nécessaires à la détection des tubes polliniques génétiquement semblables. Il a été démontré, tout dernièrement, que les S-RNases ne sont pas suffisantes pour causer le rejet du pollen (Mc Clure *et al.*, 1999). Effectivement, une protéine riche en asparagines, dont l'expression stylaire est développementale, mais retardée par rapport à la S-RNase, serait nécessaire au rejet spécifique du pollen. L'expression retardée du gène HT expliquerait la raison pour laquelle il est possible d'effectuer des auto-croisements à un stade précoce du développement du bourgeon floral (2 jours avant l'anthèse) alors que le niveau d'expression de la S-RNase serait suffisamment élevé pour causer le rejet du pollen (Figure 9a). Ht ne participerait pas à la reconnaissance spécifique du pollen, mais serait nécessaire, d'une quelconque manière, à l'aspect fonctionnel de la S-RNase (Mc Clure *et al.*, 1999).

Au niveau spatial, la S-RNase montre une expression plus prononcée à l'extrémité stigmatique (Figure 9b). Anderson *et al.* (1986) et Mau *et al.*, (1986) ont également démontré ce type de patron d'expression des S-RNases chez *Nicotiana glauca* et *Lycopersicon peruvianum* respectivement. Une expression différentielle plus élevée dans cette région expliquerait la reconnaissance et le rejet du pollen génétiquement

semblable dès le premier tiers du style. La portion basale du style semble être déphasée, au niveau développementale, par rapport à l'extrémité portant le stigmate (Figure 9b).

La présence, quoi que très faible, du transcrit du clone S_{14} au niveau de l'ovaire (Figure 9a) (Matton *et al.*, 1998a, par hybridation *in situ*) peut paraître paradoxale, étant donné que les tubes polliniques génétiquement semblables sont reconnus et détruits dans le premier tiers du style, région où l'expression de S_{14} est également plus prononcée (Figure 9b et Anderson *et al.*, 1986). L'expression, dans la zone ovarienne, semblerait alors inutile, surtout à des concentrations 240 fois moins élevées que dans le style. Chez *Nicotiana alata*, la détection de S-RNases, tant au niveau de l'ARNm (Cornish *et al.*, 1987) qu'au niveau protéique (Anderson *et al.*, 1989), ont démontré la présence de celle-ci dans l'épiderme du placenta et sur une couche de cellules entourant les ovules (voir aussi Matton *et al.*, 1998a). La fonction physiologique de ce débordement de l'expression des S-RNases dans la portion basale du gynécée, s'expliquerait par le développement ontogénétique commun du stigmate, du tissu transmetteur et de l'épiderme du placenta lors de la maturation du style (Satina, 1944). Certaines plantes, munies d'un système gamétophytique, sont sans style ou bien avec un style creux. Ces dernières sont caractérisées par l'inhibition de la croissance du tube pollinique au niveau même de l'ovaire (Brewbaker et Gorrez, 1967). On pourrait donc croire, que pour les Solanacées, l'expression des S-RNases dans cette région, serait associée à un vestige évolutif qui serait maintenu pour intercepter les tubes polliniques qui auraient réussi à franchir les premières barrières de reconnaissance du soi (Cornish *et al.*, 1987).

4.1.4 Expression différentielle du clone S_{14} selon le type de pollinisation

Quant à l'expression temporelle, elle démontre une nette inhibition suite à une pollinisation compatible (Figure 8). Puisqu'une majorité de tubes polliniques ont déjà atteint les ovules après 36 heures de pollinisation (données non publiées), le pistil semblerait détecter cette condition et supprimerait l'expression de la S-RNase rendue alors inutile. Soutenue par le fait qu'une pollinisation incompatible n'influence en rien l'expression de S_{14} (Figure 8c), cette hypothèse semble, pour l'instant, répondre aux

résultats observés. Cette dernière pourrait être vérifiée par le même type d'expérience présentée à la Figure 8b, mais où la pollinisation serait semi-incompatible. Dans le cas où l'expression du transcrit chuterait, on serait porté à croire qu'une quantité suffisante de pollen compatible aurait atteint la portion basale du style ce qui aurait pour conséquence d'amorcer le processus d'inhibition de la S-RNase. Ultérieurement, on pourrait effectuer ces mêmes types de pollinisations, mais avec des concentrations beaucoup plus faibles de pollen, et ainsi chercher à savoir si la quantité de tubes polliniques aptes à féconder les ovules serait en quelque sorte comptabilisée par le style. Lorsque celui-ci détecterait que la presque totalité des ovules seront fécondés par un tube pollinique génétiquement différent, il pourrait alors enclencher les mécanismes de suppression de la reconnaissance du soi. Ce type de communication à distances a été décrit dernièrement par Lantin *et al.*, (1999), où le gène SPP2, codant pour une dioxygénase, était induite à distance dans l'ovaire suite à une blessure mécanique à même le style. Il serait possible qu'une communication de ce type s'établisse entre l'ovaire et le style, ce qui aurait pour fonction de réguler l'expression des S-RNases.

4.2 Recherche du gène Pollen-S

4.2.1 Représentation différentielle des ARNm

Afin d'isoler la contrepartie évasive liée au gamétophyte mâle, nous avons utilisé une approche de représentation différentielle des ARNm de tubes polliniques *in vivo* et *in vitro* provenant de deux lignées génétiquement distinctes (Figure 10). Ces dernières ont en commun le locus S_{12} et diffèrent pour leur deuxième locus, S_{14} pour G_4 et S_{13} pour V_4 . Pour s'assurer de la sensibilité de la technique, nous avons cherché à savoir s'il était possible d'isoler des gènes de pollen à partir de tubes polliniques en croissance *in vivo* dans le style. Une bande montrant un patron d'expression pollinique a été excisée, clonée et séquencée, de plus, nous avons démontré son expression spécifique au pollen par une analyse northern (Figure 11). Ce gène, nommé P1, est homologue à une pectine méthylestérase du maïs dont l'expression est elle aussi limitée au gamétophyte mâle (Wakeley *et al.*, 1998).

4.2.2 Criblage des candidats obtenus

À l'aide des trois amorces ancrées et des 80 amorces arbitraires, nous avons isolé, sur gel de polyacrylamide, 518 candidats montrant un patron différentiel (exemple de patrons à la Figure 12). L'intensité du signal radioactif de ces candidats variant de très faible à très fort. Étant donné l'impossibilité d'évaluer tous ces candidats par une approche individuelle, nous avons opté pour une analyse de type northern inverse, qui s'est avérée très efficace. En effet, plus de 90 % des candidats ont été éliminés lors de cette étape puisqu'ils démontraient peu ou pas d'expression différentielle (Figure 13) et ses faux-positifs provenaient donc de polymorphismes à base unique (single sequence polymorphism). Plus particulièrement, les 47 candidats restants présentaient soit une absence d'expression pour les deux lignées (37), ou alors, avaient un degré d'expression différentielle appréciable (10) (Figure 13). Une analyse individuelle de type northern a donc pu être effectuée sur ceux-ci (Figure 14). Vingt-et-un candidats montrent un patron d'expression ubiquitaire, quinze sont exprimés spécifiquement dans les tubes polliniques

et sept au niveau du style. Quant aux quatre derniers, trois d'entre eux sont sous le seuil de détection du northern avec ARN totaux, alors que l'autre démontre une expression liée à la lignée G₄. C'est sur ces quatre derniers, que nous avons poursuivi une caractérisation plus approfondie.

L'expression dans le gamétophyte mâle, le polymorphisme du gène dans une population ainsi que sa présence au locus S sont trois critères importants pour qu'un candidat du gène Pollen-S soit retenu. Dans le cas où un candidat répondrait à toutes ces conditions, la perte et le gain de fonction dans des plantes transgéniques nous informeraient alors de son déterminisme comme contrepartie pollinique au système d'auto-incompatibilité.

L'analyse tissulaire du candidat différentiel Gt 123 présente une expression dans les tissus reproducteurs mâles (Figure 16b), de plus le gène est polymorphique mais n'est pas lié au locus S (Figure 16a). Malgré le fait que ce candidat soit exprimé préférentiellement dans la lignée G₄, il ne peut être un candidat potentiel pour le gène Pollen-S. Sans que nous ayons d'information fonctionnelle pour Gt 123 (Figure 16c), il demeure tout de même intrigant par son expression différentielle tout en semblant être lié à la biologie de la reproduction par son expression dans le pollen (Figure 16b).

Des trois candidats qui n'avaient aucun niveau d'expression lors des analyses northern habituelles (Figure 14), deux d'entre eux présentent maintenant soit un patron d'expression ubiquitaire, en ce qui concerne Vt 169, ou une spécificité aux tubes polliniques pour Gt 174 suite à une analyse de type northern avec 1 µg d'ARNm (Figure 15). Par contre, le candidat V 6 demeure toujours sans expression par ce type d'approche (Figure 15). Le candidat V 6 ne semble pas lié au locus S et montre un patron d'hybridation contenant une douzaine de bandes correspondant à de l'ADN répétitif (Figure 17), ce qui exclue également ce candidat. L'analyse Southern de la population RA (Figure 17) et l'absence d'expression de V 6 (Figure 15) nous porte à croire que ce fragment de PCR, sans homologie de séquences (données non présentées), pourrait être

une contamination d'ADN lors des premières étapes du RT-PCR ou représente de l'ARNm transcrit et ayant de l'homologie avec de l'ADNg répétitif.

4.2.3 Hypothèses sur les causes d'échecs de la technique

Étant donné l'échec dans notre recherche du gène Pollen-S, nous croyons que l'analyse par représentation différentielle des ARNm, telle qu'utilisée dans la présente étude, n'est pas suffisamment sensible. À la lumière de nos expérimentations, la technique semble inadéquate pour certaines raisons. Premièrement, le grand nombre de faux positifs sur le gel de polyacrylamide, plus de 90 %, vient ralentir le processus d'analyse des candidats, soit par le temps nécessaire à la gestion de ces bandes supplémentaires ou bien par l'ajout d'étape de criblage (analyse de northern inverse). Quoique reconnu pour avoir un haut taux de faux positifs (Zegzouti *et al.*, 1997), nous croyons que, pour notre approche, ces derniers origineraient de polymorphismes d'une seule base entre les deux copies d'un gène. Plutôt que de comparer un génotype par rapport à l'autre, il aurait été préférable d'utiliser une population comme RA ou RB et ainsi de réunir les ARNm des tubes polliniques des individus qui partageaient les mêmes allèles et de les comparer aux individus possédant l'autre allèle. Cette approche permettrait de palier au problème de polymorphisme à base unique; malheureusement, ce type de population n'était plus disponible dans le laboratoire. Dans un deuxième temps, cette technique montre un biais moins élevé pour les gènes qui sont fortement exprimés, comme c'est le cas de l'hybridation soustractive (Martin et Pardee, 2000). Par contre, la technique semblerait moins efficace pour les gènes exprimés faiblement (données non publiées). Puisqu'il est impossible de distinguer des formes alléliques de Pollen-S sur gel bidimensionnel, comme il est possible de le faire pour les formes alléliques de S-RNases (Jahnen *et al.*, 1989 et Matton *et al.*, 1997), le transcrit de ce dernier est probablement peu abondant, ce qui aurait pour effet de limiter la représentation différentielle des ARNm. En dernier lieu, la technique permettrait de cribler environ 95 % d'un génome eukaryotique (Liang et Pardee, 1992, GenHunter, Nashville, TN), il suffirait que la séquence des amorces arbitraires utilisées ne soit pas présente dans le gène Pollen-S pour expliquer notre manque de chance. Il semble peu

probable que ce soit le cas, puisque les formes alléliques des S-RNases peuvent être très différentes d'un allèle à l'autre, jusqu'à 40 % (Tsai *et al.*, 1992), il va de soi que les formes alléliques de Pollen-S soient aussi dissemblables.

4.2.4 Le gène Pollen-S (SCR) chez *Brassica campestris*

La représentation différentielle des ARNm, les interactions protéine/protéine du double hybride dans la levure, les patrons de protéines bidimensionnelles, sont des types de techniques très modernes, mais qui ont toutes échoué dans la caractérisation de la contrepartie pollinique liée à l'auto-incompatibilité (données non publiées). Des méthodes plus traditionnelles, comme la marche chromosomique et le séquençage du locus S, auront probablement plus de succès, puisque le gène Pollen-S est indubitablement présent à proximité de la S-RNase. En effet, par ce type d'approche le déterminant mâle du système d'incompatibilité sporophytique des *Brassicaceae* a récemment été identifié chez *Brassica campestris* (Schopfer *et al.*, 1999). Le séquençage complet de la région séparant SLG et SRK avait aussi été entrepris par le groupe de Rothstein (Cui *et al.*, 1999), mais ceux-ci n'ont pu déceler la présence du cadre de lecture du gène SCR, d'autant plus que celui-ci fait à peine 75 acides aminés de long (Schopfer *et al.*, 1999). Un échec lié à la structure inhabituelle du gène SCR. Effectivement, le premier exon de 110 bases et le deuxième de 300 bases sont séparés par un intron d'une longueur peu commune de 4,1 kb (Schopfer *et al.*, 1999), ce qui peut laisser place à interprétation lors de la recherche de cadres de lecture sur un BAC génomique.

4.2.5 Proposition d'une approche expérimentale pour isoler Pollen-S de *Solanum chacoense*

Puisque chez les *Solanaceae* le déterminant mâle n'est pas encore trouvé, une cartographie fine du locus S semblerait appropriée. Étant donné qu'aucune espèce modèle pour l'étude de l'auto-incompatibilité n'est actuellement utilisée pour des approches génomiques à grande échelle, cela augmente donc la tâche de travail pour

établir une marche chromosomique au locus S, McCubbin et Kao (1999) proposent une approche classique de cartographie fine au locus S, et ce, par une marche chromosomique. Dans notre laboratoire, nous ne disposons pas encore d'une banque d'ADNg de *Solanum chacoense*. L'obtention et la digestion d'ADNg de haut poids moléculaire, pour la construction de ce type de banque, se sont avérées infructueuses (données non présentées). Nous croyons qu'il serait possible d'obtenir une banque d'ADNg de plus petite taille, cette banque d'ADNg de type λ , composée de fragments de 9 à 22 kb, ne pourrait servir pour une approche de marche chromosomique au locus S. Par contre, nous pourrions tout de même compléter le potentiel de cette banque à celui d'une technique de criblage de banque d'ADNc. Le principe de cette approche consisterait à établir un petit contig au locus S. Par la suite, à l'aide d'une banque d'ADNc de tubes polliniques ou d'anthères, on pourrait étaler cette dernière sur un tapis bactérien et transférer l'ADN phagique sur membrane. Cette dernière serait hybridée avec les clones λ du contig. Les gènes qui émettraient un signal radioactifs seraient des candidats potentiels, leur expression tissulaire au niveau du pollen ainsi que leur polymorphisme seraient alors des étapes subséquentes afin de contrôler les faux positifs. À l'exception de la construction des deux types de banques, ce projet serait économique et pourrait largement s'inscrire dans un projet de maîtrise. Nous croyons que cette approche posséderait de bonnes chances de réussite. Par contre, si les limites physiques du locus S s'étendent sur plus d'un mégabase (Mc Cubbin et Kao, 1999), l'approche aurait alors un sérieux handicap et nécessiterait la construction de banques de BAC ou de YAC.

4.2.6 Représentation différentielle des ARNm chez les Brassicaceae

En ce qui concerne notre approche de recherche, il semble que la représentation différentielle des ARNm possède quelques limitations. Par contre, Takayama *et al.* (2000) ont également isolé le gène SCR des *Brassicaceae*, et ce, non pas par une marche chromosomique au locus S, mais par une représentation différentielle fluorescente des ARNm d'anthères de plantes possédant deux différents haplotypes. Quoi que plus sensible que notre approche non fluorescente, il n'en demeure pas moins qu'une

technique basée sur le PCR a tout de même pu caractériser le déterminant mâle du système d'incompatibilité sporophytique. Dans notre cas, nous pouvons parler d'un semi-succès de la technique, puisque malgré le fait qu'aucun candidat lié au locus S n'a pu être détecté, nous avons pu isoler un gène qui démontre un patron d'expression différentielle spécifique à un génotype.

5. CONCLUSION

Dans ce mémoire, nous avons démontré que l'allèle S_{14} de *Solanum chacoense* est exprimé uniquement dans le pistil, et de manière très prononcée dans le style et surtout à son extrémité stigmatique alors que l'ovaire ne comportait qu'un très faible niveau d'expression. Il est également régulé de manière développementale et montre un pic d'expression un jour avant l'anthèse de la fleur. Alors qu'une pollinisation compatible régule négativement l'expression de cette S-RNase, une pollinisation incompatible ne semble pas affecter son niveau d'expression. En outre, elle partage plus d'homologie de séquences avec une S-RNase non fonctionnelle de *Lycopersicon peruvianum* (84 % avec S_c) qu'avec tout autre S-RNase ce qui soutient l'hypothèse que le polymorphisme au locus S précéderait la spéciation au sein de la famille des *Solanaceae* (Torger *et al.*, 1990).

La caractérisation de cet allèle confirme les données que plusieurs autres équipes ont, par le passé, dévoilées au sujet des S-RNases. Nous ajoutons par contre le rôle d'une pollinisation incompatible sur l'expression stable du messenger de S_{14} . Nous proposons l'hypothèse où le pistil pourrait, en quelque sorte, évaluer la condition dans lequel il se trouve et d'ajuster alors son niveau d'expression des molécules nécessaires à la reconnaissance du soi. Suite à une pollinisation abondante avec du pollen compatible, le pistil n'exprimerait plus la S-RNase, devenue alors inutile. Par contre, dans le cas d'une pollinisation incompatible, le niveau du transcrit est maintenu afin de maintenir les barrières de reconnaissances pour s'assurer qu'ultérieurement aucun tube pollinique génétiquement semblable ne puisse féconder un ovule. Nous avons suggéré quelques expérimentations simples pour tenter d'expliquer le phénomène.

Nous avons également tenté d'isoler le gène Pollen-S, et ce, par une représentation différentielle des ARNm de tubes polliniques *in vivo* et *in vitro* provenant de deux lignées génétiquement distinctes. Malgré le fait qu'aucun candidat ne semblait lié au locus S, nous avons tout de même pu isoler un gène (Gt 123) dont l'expression

spécifique au gamétophyte mâle est restreinte à la lignée G₄. Aucune fonction ou homologie de séquences ne sont connues présentement. Étant donné les nombreux échecs de plusieurs laboratoires depuis les dernières années, nous croyons fortement qu'une marche chromosomique au locus S nous permettrait d'isoler le déterminant mâle lié à la reconnaissance du soi chez le système d'auto-incompatibilité gamétophytique des *Solanaceae*. Une comparaison de la région physique du locus S entre la tomate comestible (*Lycopersicon esculentum*) et sauvage (*Lycopersicon peruvianum*) pourrait apporter énormément d'informations sur ce locus, ce type d'analyse a déjà été effectué entre *Arabidopsis thaliana* et *Brassica campestris* (Conner *et al.*, 1998). Cette comparaison s'est avérée plutôt fructueuse puisque ce même groupe isolait, un an plus tard, le déterminant mâle de ce système sporophytique (Schopfer *et al.*, 1999).

Malgré le fait que le système d'incompatibilité des *Solanaceae* est l'un des mieux compris, après le système sporophytique des *Brassicaceae*, beaucoup de travail reste à accomplir, et ce, pour les deux côtés de l'interaction entre le pollen et le style. Un rôle cytotoxique, dans le tube pollinique, de la S-RNase est actuellement proposé (Mc Clure *et al.*, 1990, Huang *et al.*, 1994 et Royo *et al.*, 1994), mais aucune information n'est connue sur le transport de cette dernière, que celui-ci soit spécifique ou non. L'ajout tout dernièrement d'un autre élément stytaire, la protéine HT (Mc Clure *et al.*, 1999), complexifie le mécanisme de reconnaissance et ce, même si cette dernière n'a pas directement de rôle sur la spécificité. Alors que le déterminant mâle demeure toujours aussi élué malgré les nombreuses tentatives de plusieurs laboratoires. La découverte de ce dernier apportera énormément de compréhension sur le rôle de la S-RNase et peut-être même sur son transport. Pour le moment, nous savons avec assurance que celui-ci doit se trouver au locus S, et que, là où plusieurs stratégies de recherche ont échouées, la marche chromosomique et le séquençage à ce locus semblent les approches à privilégier pour le futur.

6. MONOGRAPHIE

MATTON, D. P., BERTRAND, C., LAUBLIN, G. ET CAPPADOCIA, M. *Molecular aspects of self-incompatibility in tuber-bearing Solanum species.*, *Comprehensive Potato Biotechnology*. Malhotra Publishin House, New Delhi, 1998a.

De NETTANCOURT, D. *Incompatibility in angiosperms*. Springer, Berlin Heidelberg New York.. 1977.

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

7. BIBLIOGRAPHIE

- AI, Y., KRON, E. ET KAO, T.-h. (1991) S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*, 230, 353-358.
- ANDERSON, M. A., CORNISH, E. C., MAU, S.-L., WILLIAMS, E. G., HOGGART, R., ATKINSON, A., BONIG, I., GREGO, B., SIMPSON, R., ROCHE, P. J., HALEY, J. D., PENSCHOW, J. D., NIALL, H. D., TREGEAR, G. W., COGHLAN, J. P., CRAWFORD, R. J. ET CLARKE A. E. (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 321, 38-44.
- ANDERSON, M. A., McFADDEN, G. I., BERNATZKY, R., ATKINSON, A., ORPIN, T., DEDMAN, H., TREGEAR, G., FERNLEY, R. ET CLARKE, A. E. (1989) Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *Plant Cell*, 1, 483-491.
- BATEMAN, A. J. (1952) Self-incompatibility systems in angiosperms. *Heredity*, 6, 285-310.
- BELL, P. R. (1995) Incompatibility in flowering plants : Adaptation of an ancient response. *Plant Cell*, 7, 5-16.
- BJÖRKMAN, T. (1995) The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. *Sex. Plant Reprod.*, 8, 143-146.
- BRACE, J., KING, G. J. ET OCKENDON, D. J. (1994) A molecular approach to the identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.*, 7, 203-208.
- BROOHAERTS, W., VANVINCKENROYE, P., DECOCK, B., VAN DAMME, J. ET VENDRIG, J. C. (1991) *Petunia hybrida* S-proteins : ribonuclease activity and the role of their glycan side chains in self-incompatibility. *Sex Plant Reprod.*, 4, 258-266.

CHARLESWORTH, D. (2000) How can two-gene models of self-incompatibility generate new specificities? *Plant Cell*, 12, 309-310.

CHAWLA, B., BERNATZKY, R., LIANG, W. ET MARCOTRIGIANO, M. (1997) Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum* : inheritance and expression of S-related proteins. *Theor. Appl Genet.* 95, 992-996.

COLEMAN, C. E. ET KAO, T.-h. (1992) The flanking regions of two *Petunia inflata* S alleles are heterogeneous and contain repetitive sequences. *Plant Mol. Biol.*, 18, 725-737.

CONNER, J. A., CONNER, P., NASRALLAH, M. E. ET NASRALLAH, J. B. (1998) Comparative mapping of the Brassica S locus region and its homeolog in *Arabidopsis* : Implication for the evolution of mating systems in the *Brassicaceae*. *Plant Cell*, 10, 801-812.

CORNISH, E. C., PETTITT, J. M., BONIG, I. ET CLARKE, A. E. (1987) Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 326, 99-102.

CUI, Y., BRUGIÈRE, N., JACKMAN, L., BI, Y. M. ET ROTHSTEIN, S. J. (1999) Structural and transcriptional comparative analysis of the S locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell*, 11, 2217-2231.

DÉSPRÉS, C., SABA-EL-LEIL, M., RIVARD, S. R., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M. (1994) Molecular cloning of two *Solanum chacoense* S-alleles and a hypothesis concerning their evolution. *Sex. Plant Reprod.*, 7, 169-176.

DODDS, P. N., BÖNIG, I., DU, H., RÖDIN, J., ANDERSON, M. A., NEWBIGIN, E. ET CLARKE, E. A. (1993) S-RNase gene of *Nicotiana glauca* is expressed in developing pollen. *Plant Cell*, 5, 1771-1782.

DODDS, P. N., FERGUSON, C., CLARKE, A. E. ET NEWBIGIN, E. (1999) Pollen-expressed S-RNases are not involved in self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Sex. Plant Reprod.*, 12, 76-87.

DWYER, K. G., BALENT, M. A., NASRALLAH, J. B. ET NASRALLAH, M. E. (1991) DNA sequence of self-incompatibility genes from *Brassica campestris* and *B. oleracea* : polymorphism predating speciation. *Plant Mol. Biol.*, 16, 481-486.

EBERT, P., ANDERSON, M., BERNATZKY, R., ALTSCHULER, M. ET CLARKE, A. E. (1989) Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell*, 56, 255-262.

FRANKLIN-TONG, V. E., RIDE, J. P., READ, N. D., TREWALAS, A. J. ET FRANKLIN, F. C. H. (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.*, 4, 163-177.

GALIANA, E., BONNET, P., CONROD, S., KELLER, H., PANABIÈRE, F., PONCHET, M., POUPET, A. ET RICCI, P. (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in Tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol.*, 115, 1557-1567.

GRADZIEL, T. M. ET ROBINSON, R. W. (1989) Breakdown of self-incompatibility during pistil development in *Lycopersicon peruvianum* by modified bud pollination. *Sex Plant Reprod.*, 2, 38-42.

GU, T., MAZZURCO, M., SULAMAN, W., MATIAS, D. D. ET GORING, D. R. (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *PNAS*, 95, 382-387.

HE, Z. H., HE, D. ET KOHORN, B. D. (1998) Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J.*, 14, 55-63.

HODGKIN, T., LYON, G. D. ET DICKINSON, H. G. (1988) Recognition in flowering plants : A comparison of the Brassica self-incompatibility system and plant pathogen interactions. *New Phytol.*, 110, 557-569.

ten HOOPEN, R., HARBORD, R. M., MAES, T., NANNINGA, N. ET ROBBINS, T. P. (1998) The self-incompatibility (S) locus in *Petunia hybrida* is located on chromosome III in a region, syntenic for the Solanaceae. *Plant J.*, 16, 729-734.

HORIUCHI, H., YANAI, K., TAKAGI, M., YANO, K., WAKABAYASHI, E., SANDA, A., MINE, S., OHGI, K. ET IRIE, M. (1988) Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.*, 103, 408-418.

HOSAKA, K. ET HANNEMAN, R. E. (1998a) Genetics of self-incompatibility wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 1. Detection of an S locus inhibitor (Sli) gene. *Euphytica*, 99, 191-197.

HOSAKA, K. ET HANNEMAN, R. E. (1998b) Genetics of self-incompatibility wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 2. Localization of an S locus inhibitor (Sli) gene on the potato genome using DNA markers. *Euphytica*, 103, 265-271.

HUANG, S., LEE, H. S., KARUNANANDAA, B. ET KAO, T.-h. (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, 6, 1021-1028.

HUMPHREY, C., FOOTE, C., RIDE, J. P., FRANKLIN-TONG, V. E., WALKER, E. A., LAWRENCE, M. J. ET FRANKLIN, F. C. H. (1994) Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *PNAS*, 91, 2265-2269.

IOERGER, T. R., CLARK, A. G. ET KAO, T.-h. (1990) Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *PNAS*, 87, 9732-9735.

IOERGER, T. R., GOHLKE, J. R., XU, B. ET KAO, T.-h. (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in *Solanaceae*. *Sex Plant Reprod.*, 4, 81-87.

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.

KAKEDA, K., JORDAN, N. D., CONNER, A., RIDE, J. P., FRANKLIN-TONG, V. E. ET FRANKLIN, F. C. H. (1998) Identification of residues in a hydrophilic loop of the *Papaver rhoeas* S protein that play a crucial role in recognition of incompatible pollen. *Plant Cell*, 10, 1723-1731.

KAO, T.-h. ET Mc CUBBIN, A. G. (1996) How flowering plants discriminate between self and non-self-pollen to prevent inbreeding. *PNAS*, 93, 12059-12065.

KARUNANANDAA, B., HUANG, S. ET KAO, T.- h. (1994) Carbohydrates moiety of the *Petunia inflata* S₃ protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell*, 6, 1933-1940.

KAWATA, Y., SAKIYAMA, F. ET TAMAOKI, H. (1988) Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* 176, 683-697.

LANGRIDGE, P., BAUMANN, U., JUTTNER, J. ET OSMOND, G. (1999) Revisiting and revising the Self-incompatibility genetics of *Phalaris coerulescens*. *Plant Cell*, 11, 1826.

LANTIN, S., O'BRIEN, M. ET MATTON, D. P. (1999) Pollination, wounding and jasmonate treatments induce the expression of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Plant Mol. Biol.*, 41, 371-386.

LEE, H. S., HUANG, S. ET KAO, T.-h. (1994) S protein control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 367, 560-563.

LI, X., NIELD, J., HAYMAN, D. ET LANGRIDGE, P. (1994) Cloning a putative self-incompatibility gene from the pollen of the grass *Phalaris coerulescens*. *Plant Cell*, 6, 1923-1932.

LI, X., NIELD, J., HAYMAN, D. ET LANGRIDGE, P. (1995) Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris* S protein. *Plant J.*, 8, 133-138.

LI, X., NIELD, J., HAYMAN, D. ET LANGRIDGE, P. (1996) A self-fertile mutant of *Phalaris* produces an S protein with reduced thioredoxin activity. *Plant J.*, 10, 505-513.

LI, X., PAECH, N., NIELD, J., HAYMAN, D. ET LANGRIDGE, P. (1997) Self-incompatibility in the grasses : evolutionary relationship of the S gene from *Phalaris coerulescens* to homologous sequences in other grasses. *Plant Mol. Biol.*, 34, 223-232.

LIANG, P. ET PARDEE, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.

LIANG, P., ZHU, W., ZHANG, X., GUO, Z., O'CONNELL, R. P., AVERBOUKH, L., WANG, F. ET PARDEE, A. B. (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Research*, 25, 5763-5764.

LUU, D.-T., MARTY-MAZARS, D., TRICK, M., DUMAS, C. ET HEIZMANN, P. (1999) Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell*, 11, 251-262.

MARCHUK, D., DRUMM, M., SAULIONO, A. ET COLLINS F. S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*, 19, 1154.

MATTON, D. P., NASS, N., CLARKE, A. E. ET NEWBIGIN, E. (1994) Self-incompatibility : How plants avoid illegitimate offspring. *PNAS*, 91, 1992,1997.

MATTON, D. P., MAU, S., OKAMOTO, S., CLARKE, A. E. ET NEWBIGIN, E. (1994) The S locus of *Nicotiana alata* : Genomic organization and sequence analysis of two S RNase alleles. *Plant Mol. Biol.* 28, 847-858.

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.

MATTON, D. P., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M. (1998b) Reply to :Are the hypervariable regions of S RNases sufficient for allele-specific recognition of pollen. *Plant Cell*, 10, 316-317.

MATTON, D. P., LUU, D.-T., XIKE, Q., LAUBLIN, G., O'BRIEN, M., MAES, O., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M. (1999) Production of an S-RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new S alleles. *Plant Cell*, 11, 2087-2097.

MATTON, D. P., LUU, D.-T., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M. (2000) Establishing a paradigm for the generation of new S alleles. *Plant Cell*,12, 313-315.

MAU, S.-L., WILLIAMS, E. G., ATKINSON, A., ANDERSON, M. A., CORNISH, E. C., GREGO, B., SIMPSON, R.J., KHEYR-POUR, A. ET CLARKE, A. E. (1986) Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. *Planta*, 169, 184-191.

MARTIN, K. J. ET PARDEE A. B. (2000) Identifying expressed genes. *PNAS*, 97, 3789-3791.

MURFETT, J., ATHERTON, T. L., MOU, B., GASSER, C. S. ET Mc CLURE, B. A. (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 367, 563-566.

Mc CLURE, B. A., HARING, V., EBERT, P. R., ANDERSON, M. A., SIMPSON, R. J., SUKIYAMA, F. ET CLARKE, A. E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonuclease. *Nature*, 342, 955-957.

Mc CLURE, B. A., GRAY, J. E., ANDERSON, M. A. ET CLARKE, A. E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347, 757-760.

Mc CLURE, B., MOU, B., CANEVASCINI, S. ET BERNATZKY, R. (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *PNAS*, 96, 13548-13553.

Mc CORMICK, S. (1998) Self-incompatibility and other pollen-pistil interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 18-25.

Mc CUBBIN, A. G., CHUNG, Y. Y. ET KAO, T.-h. (1997) A mutant S₃ RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *Plant Cell*, 9, 85-95.

Mc CUBBIN, A. ET KAO, T.-h. (1999) The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci. *Sex Plant Reprod.*, 12, 1-5.

De NETTANCOURT (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod.*, 10, 185-199.

NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. ET von HIJNE, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6.

PANDEY, K. (1972) Origin of genetic variation : Regulation of genetic recombinaison in higher organisms. A theory. *Theor. Appl. Genet.*, 42, 250-261.

READ, S. M., NEWBIGIN, E., CLARKE, A. E., Mc CLURE, B. A. ET KAO, T.-h. (1995) Disputed ancestry : Comments on a model for the origin of incompatibility in flowering plants. *Plant Cell*, 7, 661-664.

RICK, C. M. (1963) Barriers to interbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. *Evolution*, 17, 216-232.

RIVARD, S. R., SABA-EL-LEIL, M. K., LANDRY, B. S. ET CAPPADOCIA, M. (1994) RFLP analyses and segregation of molecular markers in plants produced by in vitro culture, selfing, and reciprocal crosses of two lines of self-incompatible *Solanum chacoense*. *Genome*. 37, 775-783.

RIVARD, S. R., CAPPADOCIA, M. ET LANDRY, B. S. (1996) A comparison of RFLP maps based on anther culture derived, selfed, and hybrid progenies of *Solanum chacoense*. *Genome*, 39, 611-621.

RIVERS, B. A., BERNATZKY, R., ROBINSON, S. J. ET JAHNEN-DECHENT, W. (1993) Molecular diversity at the self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) *Mol. Gen. Genet.*, 238, 419-427.

ROYO, J., KUNZ, C., KOWYAMA, Y., ANDERSON, M., CLARKE, A. E. ET NEWBIGIN, E. (1994) Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *PNAS*, 91, 6511-6514.

RUDD, J. J., FRANKLIN, F. C. H., LORD, J. M. ET, FRANKLIN-TONG, V. E. (1996) Increased phosphorylation of a 26-kd protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell*, 8, 713-724.

RUDD, J. J., FRANKLIN, F. C. H. ET, FRANKLIN-TONG, V. E. (1997) Ca²⁺-independent phosphorylation of a 68 kDa pollen protein is stimulated by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant J.*, 12, 507-514.

SABA-EL-LEIL, M., RIVARD, S., MORSE, D. ET CAPPADOCIA, M. (1994) The S11 and S13 self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense* Bitt. Are remarkably similar. *Plant Mol. Biol.*, 24, 571-583.

SCHOPFER, C. R., NASRALLAH, M. E. ET NASRALLAH, J. B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286, 1697-1700.

STAHL, E. A. ET BISHOP, J. G. (2000) Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 299-304.

STONE, S. L., ARNOLDO, M.-A. ET GORING, D. R. (1999) A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*, 286, 1729-1731.

TAKASAKI, T., HATAKEYAMA, K., SUZUKI, G., WATANABE, M., ISOGAI, A. ET HINATA, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature*, 403, 913-916.

TAKAYAMA, S., SHIBA, H., IWANO, M., SHIMOSATO, H., CHE, F.-S., KAI, N., WATANABE, M., SUZUKI, G., HINATA, K. ET ISOGAI, A. (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *PNAS*, 97, 1920-1925.

TAN, L. W. ET JACKSON, J. F. (1988) Stigma proteins of the two loci self-incompatible grass *Phalaris coerulescens*. *Sex. Plant Reprod.*, 1, 25-27.

TANKSLEY, S. D. ET LOAIZA-FIGUEROA, F. (1985) Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *PNAS*, 82, 5093-5096.

TEASDALE, R. D. ET JACKSON, M. R. (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12, 27-54.

TSAI, D. S., LEE, H. S., POST, L. C., KREILING, K. M. ET KAO, T.-h. (1992) Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex Plant Reprod.*, 5, 256-263.

UYENOYAMA, M. K., ET NEWBIGIN, E. (2000) Evolutionary dynamics of dual-specificity self-incompatibility alleles. *Plant Cell*, 12, 310-312.

VAN SINT JAN, V., LAUBLIN, G., BIRHMAN, R. ET CAPPADOCIA, M. (1996) Genetic analysis of leaf explant regenerability in *Solanum chacoense*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 47, 9-13.

VERICA, J. A., Mc CUBBIN, A. G. ET KAO T.-h. (1998) Are the hypervariable regions of S-RNases sufficient for allele-specific recognition of pollen? *Plant Cell*, 10, 314-316.

VÉRONNEAU, H., LAVOIE, G. ET CAPPADOCIA, M. (1992) Genetic analysis of anther and leaf disc culture in two clones of *Solanum chacoense* Bitt. And their reciprocal hybrids. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 30, 199-209.

WAKELEY, P. R., ROGERS, H. J., ROCYCKA, M., GREENLAND, A.J. ET HUSSEY, P. J. (1998) A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol. Biol.*, 37, 187-192.

WALKER, E. A., RIDE, J. P., KURUP, S., FRANKLIN-TONG, V. E., LAWRENCE, M. J. ET FRANKLIN, F. C. H. (1996) Molecular analysis of two functional homologues of the S₃ allele of the *Papaver rhoeas* self-incompatibility gene isolated from different populations. *Plant Mol. Biol.*, 30, 983-994.

WALLES, B. ET HAN, S. P. (1998) Ribosomes in incompatible pollen tubes in the *Solanaceae*. *Physiologia Plantarum*, 103, 461-465.

WOODWARD, J. R., BASIC, A., JAHNEN, W. ET CLARKE, A. E. (1989) N-linked glycan chains on S-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*, 1, 511-514.

XUE, Y., CARPENTER, R., DICKINSON, H. G. ET COEN, E. S. (1996) Origin of allelic diversity in *Anthirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell*, 8, 805-814.

ZEGZOUTI, H., MARTY, C., JONES, B., BOUQUIN, T., LATCHE, A., PECH, J. C. ET BOUZAYEN, M. (1997) Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and isolation of weakly expressed messages. *Plant Mol. Biol. Report*, 15, 236-245.

ZUREK, D., MOU, B., BEECHER, B. ET Mc CLURE, B. (1997) Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *Plant J.*, 11, 797-808.

8. REMERCEMENTS

J'aimerais remercier une amie toute particulière qui m'a fait réaliser que les choses agréables de la vie passent souvent par l'amitié. Le support en science c'est parfois la solidarité, la confiance, l'entraide et l'écoute, à une personne qui a souvent fait office de grande sœur, merci Sylviane (Sylviane Lantin).

J'aimerais également remercier Félix Forest pour avoir partagé avec moi les fins de semaines à travailler à l'institut. Pour avoir hanté les corridors de l'IRBV très tard les soirs de semaine. Viendra le jour Félix où l'on pourra se reposer, après tout un doc ça dure juste quatre ans!

Merci également à Maman et Papa pour leurs constants encouragements ainsi que de m'avoir offert, gamin, mon tout premier microscope et mon «kit du petit chimiste» et ainsi de m'avoir permis d'ouvrir les yeux sur le monde merveilleux de la science. Pour m'avoir soutenu toutes ces années, un merci tout spécial rempli d'amour!

Je remercie mon directeur de recherche, Mario Cappadocia, pour avoir permis la réalisation du projet tant au niveau financier qu'en me laissant entrevoir ce projet avec beaucoup de liberté.

Pour m'avoir inculqué la confiance en soi, pour m'avoir fait partager l'amour de la littérature scientifique, pour m'avoir épaulé sans relâche, pour m'avoir donné le goût d'engendrer de multitudes de projets, merci Daniel (Daniel Matton, directeur de recherche)!

Finalement, à tous ceux qui ont fait de mon passage à la maîtrise un moment agréable et inoubliable, merci!