

Université de Montréal

Implication du peptide ScRALF3
dans le développement du
gamétophyte femelle chez *Solanum*
chacoense

par
Audrey Loubert-Hudon

Institut de Recherche en Biologie Végétale
Sciences biologiques
Faculté des Arts et des Sciences

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

Août 2012

© Audrey Loubert-Hudon, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Implication du peptide ScRALF3 dans le développement du
gamétophyte femelle chez *Solanum chacoense*

Présenté par :
Audrey Loubert-Hudon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mario Cappadocia, président-rapporteur
Daniel P. Matton, directeur de recherche
Hugo Germain, membre du jury

Résumé

La coordination du développement par les communications intercellulaires est essentielle pour assurer la reproduction chez les plantes. Plusieurs études démontrent qu'une communication entre le sac embryonnaire et le tissu maternel, le sporophyte, est essentielle au bon développement des gamètes. Les molécules, peptides ou autres protagonistes impliqués dans ces voies de signalisation ainsi que leur mode d'action restent toutefois nébuleux. Les gènes de type RALF codent pour des petits peptides sécrétés retrouvés de manière spécifique ou ubiquitaire dans la plante. Leur structure en font de parfaits candidats pour permettre ces communications cellule-cellule entre les différents tissus. Treize gènes de type RALF ont été isolés actuellement chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense*. Maintenant, nous montrons qu'un de ceux-ci, *ScRALF3*, est impliqué dans la polarisation du sac embryonnaire et dans la synchronicité des divisions mitotiques assurant la formation d'un gamétophyte femelle mature fonctionnel. Étant exprimé de manière spécifique au niveau des téguments de l'ovule, *ScRALF3* est un candidat idéal pour réguler les communications cellule-cellule entre le sporophyte et le sac embryonnaire.

Mots-clés : *Rapid alkalisation factors* (RALF), communication cellule-cellule, développement, gamétophyte femelle, sac embryonnaire, division cellulaire, polarité, synchronicité, *Solanum chacoense*.

Abstract

Development coordination through intercellular communication is essential for plant reproduction. Several studies show that communication between embryo sac and maternal tissue, the sporophyte, is essential to the development of gametes. These molecules, peptides or other actors involved in these signaling pathways and their mode of action remains unclear. Genes encoding small secreted RALF peptides specifically or ubiquitously expressed throughout the plant are good candidates to allow these cell-cell communications. Thirteen RALF-like genes have been isolated at present from the wild potato *Solanum chacoense*. Now, we show that one of these, *ScRALF3*, is involved in the polarization of the embryo sac and the synchronicity of mitotic divisions to ensure the formation of a functional mature female gametophyte. Since it is specifically expressed in the integument of the ovule, *ScRALF3* is an ideal candidate to regulate cell-cell communication between the sporophyte and the gametophyte, e.g., the embryo sac.

Keywords : *Rapid alkalisation factors* (RALF), cell-cell communication, development, female gametophyte, embryo sac, cell division, polarity, synchronicity, *Solanum chacoense*.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements.....	xv
1. Introduction.....	1
1.1 Les peptides chez les plantes	1
1.2 <i>Rapid alkalisation factor</i>	2
1.2.1 Les peptides de type RALF	2
1.2.2 Fonctions des peptides de type RALF	7
1.2.3 La famille des peptides de type RALF chez <i>Solanum chacoense</i>	12
1.3. Développement du gamétophyte femelle.....	14
1.3.1 Développement de la fleur	14
1.3.2 Développement de l'ovule.....	16
1.3.3 Implication des signaux dans le développement du gamétophyte femelle.....	21
1.4 Tenants et aboutissants du projet de recherche	29
2. Matériels et méthodes	30
2.1 Matériel végétal	30
2.1.1 <i>Solanum chacoense</i>	30
2.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.2 Obtention de plantes transgéniques chez <i>Solanum chacoense</i>	31
2.2.1 Clonage des différentes constructions d'intérêt	31
2.2.2 Transformation bactérienne par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.2.3 Transformation de disques foliaires et régénération de cals	32
2.3 Obtention de plantes transgéniques chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.4 Analyses des patrons d'expression	34

2.4.1	Analyse de type Northern	34
2.4.2	Analyse de type RT-PCR	35
2.4.3	Analyse <i>in situ</i>	35
2.4.4	Analyses colorimétriques de la β -glucuronidase (GUS).....	36
2.4.5	Expression en présence d'hormones.....	37
2.4.6	Inhibiteur du transport de l'auxine.....	37
2.5	Observations microscopiques	37
2.5.1	Observation des sacs embryonnaires	37
2.5.2	Analyse des phénotypes chez les plantes mutantes	38
2.5.3	Viabilité du pollen	39
2.6	Analyses de séquences des gènes de la famille des RALFs	39
2.6.1	Transcriptome de l'ovaire de <i>Solanum chacoense</i>	39
2.6.2	Comparaison avec le génome de <i>Solanum tuberosum</i>	40
2.6.3	Isolement du promoteur de <i>ScRALF3</i> par <i>Genome Walking</i>	40
2.6.4	Analyse de la séquence promotrice du gène <i>ScRALF3</i>	41
2.6.5	Comparaison de la séquence promotrice.....	41
3.	Section résultats	42
3.1	Des gènes de la famille des RALFs sont exprimés au niveau de l'ovule chez <i>Solanum chacoense</i>	42
3.2	Le peptide ScRALF3 est impliqué dans les évènements post-fécondation.....	45
3.2.1	Les mutants d'interférence pour <i>ScRALF3</i> démontrent une taille et un nombre de graines significativement réduit.....	45
3.2.2	L'expression de <i>ScRALF3</i> est associée aux évènements post-fécondation sous le contrôle de l'auxine.....	47
3.2.3	Le promoteur du gène <i>ScRALF3</i> contient plusieurs sites de régulation reliés à diverses hormones et au développement	48
3.3	<i>ScRALF3</i> est exprimé dans la fleur	62
3.3.1	<i>ScRALF3</i> est exprimé au niveau des tissus somatiques de la fleur	62
3.3.2	<i>ScRALF3</i> est exprimé chez l'anthere au niveau du gamétophyte mâle	68
3.3.3	L'interférence de <i>ScRALF3</i> affecte la viabilité du gamétophyte mâle	68

3.3.4 Le transcrit de <i>ScRALF3</i> est caractéristique aux tissus maternels et varie avec le stade de développement du gamétophyte femelle.	68
3.3.5 <i>ScRALF3</i> est exprimé dans le fruit en développement et au niveau de l'embryon.....	71
3.4 La perturbation de <i>ScRALF3</i> affecte le développement du sac embryonnaire	73
3.4.1 La surexpression de <i>ScRALF3</i> n'affecte pas la taille des fruits et le nombre de graines.....	73
3.4.2 La cellularisation du sac embryonnaire est modérément perturbée par la surexpression de <i>ScRALF3</i>	74
3.4.3 Le synchronisme des divisions mitotiques et la polarité du sac embryonnaire sont affectés chez les mutants d'interférence pour <i>ScRALF3</i>	76
3.4.4 <i>ScRALF3</i> est nécessaire à la différenciation de la mégaspore fonctionnelle et aux étapes de mitoses	82
3.5 La famille des Rapid alkalisation factor chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
3.5.1 Plusieurs gènes de type RALF sont exprimés au niveau du gamétophyte femelle chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
3.5.2 Des peptides de type RALF sont spécifiques au gamétophyte mâle chez <i>A. thaliana</i>	87
3.5.3 L'orthologue en séquence de <i>ScRALF3</i> chez <i>A. thaliana</i> a un patron d'expression semblable	88
4. Discussion	92
4.1 Diversification de la famille des RALFs retrouvée chez <i>Solanum chacoense</i>	93
4.1.1 Comparaison de la famille des peptides de type RALF isolés chez <i>S. chacoense</i> et chez <i>S. tuberosum</i>	93
4.1.2 Mise en contexte des peptides RALFs isolés chez <i>S. chacoense</i> et ceux déjà caractérisés	98
4.1.3 Qu'en est-il de <i>ScRALF3</i> ?.....	100
4.2 <i>ScRALF3</i> est exprimé de manière polarisée lors du développement.....	101
4.2.1 L'expression de <i>ScRALF3</i> est régulée de manière indirecte à la présence d'auxine.....	105
4.3 La présence de <i>ScRALF3</i> est essentielle lors du développement du gamétophyte femelle	107

4.4 ScRALF3 est un candidat dans la communication cellule-cellule permettant la communication entre le sporophyte et le gamétophyte.....	111
5. Conclusion et perspectives.....	113
5. Bibliographie.....	114
6. Annexes	A-i
6.1 Figure et tableau supplémentaires	A-i
6.2 Séquences en acides aminés des <i>Rapid alkalinisation factors</i> retrouvés chez <i>Solanum chacoense</i>	A-iii
6.3 Séquences en nucléotides des cadre de lecture des <i>Rapid alkalinisation factors</i> retrouvés chez <i>Solanum chacoense</i>	A-v

Liste des tableaux

Tableau I Caractéristiques de peptides de type <i>Rapid alkalisation factor</i> chez <i>S. chacoense</i>	44
Tableau II Motifs reliés à la réponse à diverses hormones présents dans le promoteur connu de <i>ScRALF3</i>	53
Tableau III : Motifs reliés à la régulation de l'expression par des facteurs de transcription présents dans le promoteur connu de <i>ScRALF3</i>	55
Tableau IV : Motifs reliés à la réponse au milieu présents dans le promoteur connu de <i>ScRALF3</i>	58
Tableau V : Motifs reliés aux spécificité-tissulaire présents dans le promoteur de <i>ScRALF3</i>	61
Tableau VI : Distribution du développement des sacs embryonnaires selon la taille du bourgeon pour le type sauvage (G4) et les mutants d'interférence pour <i>ScRALF3</i> (RNAi)	84
Tableau VII : Familles des peptides de type <i>Rapid alkalisation factor</i> chez <i>S. tuberosum</i>	94

Liste des figures

Figure 1 : Arbre consensus de la famille des peptides de type RALF chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figure 2 Morphologie de la fleur et de l'ovule.....	15
Figure 3 Développement du sac embryonnaire chez <i>Solanum chacoense</i> (type sauvage G4).....	18
Figure 4 : Développement des téguments et de l'ovule chez des espèces unitégumentées et bitégumentées.....	20
Figure 5 : Signalisation cellulaire inter-couche cellulaire lors de l'initiation des téguments médiée par STRUBELLIG (SUB).....	21
Figure 6: Voies de signalisation impliquées dans la mégagamétogenèse.....	24
Figure 7 : Communications cellule-cellule impliquées dans le développement du sac embryonnaire et de l'établissement du destin cellulaire.....	28
Figure 8 : Arbre de distance de la famille des peptides de type RALF présents chez <i>Solanum chacoense</i> et <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
Figure 9 : La perturbation de l'expression de <i>ScRALF3</i> chez les mutants d'interférence cause un phénotype de petits fruits et une réduction du nombre de gaines.	46
Figure 10: L'expression de <i>ScRALF3</i> est induite par l'auxine lors de l'initiation du fruit	47
Figure 11 : Graphiques de ressemblance (dotplot) de la séquence promotrice des homologues de <i>ScRALF3</i> chez la pomme de terre et la tomate.....	49
Figure 12 : Analyses de motifs retrouvés dans la séquence promotrice de <i>ScRALF3</i>	51
Figure 13 : Séquence-logo des sites de liaison possible des facteurs de transcription WRKY et DOF présents dans la séquence promotrice de <i>ScRALF3</i>	56

Figure 14: Analyse colorimétrique de l'expression de <i>ScRALF3</i> dans les bourgeons floraux en développement.	64
Figure 15: Analyse colorimétrique de l'expression de <i>ScRALF3</i> dans les tissus non reproducteurs.....	65
Figure 16: Localisation du transcrit de <i>ScRALF3</i> et de son expression dans les tissus vasculaires.....	66
Figure 17 : Analyse de l'expression de <i>ScRALF3</i> au niveau du pollen et viabilité du pollen des plantes d'interférence.	67
Figure 18 : Analyse Northern et <i>in situ</i> de la localisation du transcrit de <i>ScRALF3</i> dans l'ovaire en développement.	69
Figure 19 : Analyse colorimétrique de l'expression de <i>ScRALF3</i> lors du développement du fruit.....	72
Figure 20 : Analyse colorimétrique de l'expression de <i>ScRALF3</i> lors du développement de l'ovule.....	72
Figure 21 : La surexpression de l'expression de <i>ScRALF3</i> a peu d'effet visible sur le développement du fruit.	74
Figure 22 : La surexpression de <i>ScRALF3</i> perturbe légèrement la cellularisation du sac embryonnaire.....	75
Figure 23 : La perturbation de <i>ScRALF3</i> affecte le développement du sac embryonnaire chez les mutants d'interférence.....	79
Figure 24 : Les mutants d'interférence présentent des problèmes de polarité lors du développement du sac embryonnaire.	80
Figure 25 : Les mutants d'interférence présentent des problèmes de synchronicité des divisions lors du développement du sac embryonnaire.	81

Figure 26 : Analyse colorimétrique de l'expression de certains <i>AtRALFs</i> spécifiques aux tissus de l'ovaire chez <i>A. thaliana</i>	85
Figure 27 : La surexpression d' <i>AtRALF14</i> affecte le développement de la plante et du sac embryonnaire.....	86
Figure 28 : Analyse colorimétrique de l'expression de certains <i>AtRALFs</i> spécifiques au pollen chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
Figure 29 : La germination n'est pas affectée par la perturbation de l'expression d' <i>AtRALF34</i>	88
Figure 30 : Analyse colorimétrique de l'expression d' <i>AtRALF34</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
Figure 31 : L'expression d' <i>AtRALF34</i> est modulée par le transport polaire de l'auxine.	91
Figure 32 : Arbre de distance de la famille des peptides de type RALF	95
Figure 33 : Matrice de similarité entre les peptides de type <i>Rapid Alkalinisation factor</i> présents chez <i>S. tuberosum</i> et <i>S. chacoense</i>	96
Figure 34 : La perturbation de l'expression de <i>ScRALF3</i> et sa surexpression affecte le développement du sac embryonnaire	108
Figure supplémentaire 1 : La perturbation de l'expression de <i>ScRALF3</i> chez les mutants d'interférence est spécifique.	A-i
Figure supplémentaire 2 : Liste des amorces spécifiques relatives à l'analyse RT-PCR chez les mutants d'interférence à <i>ScRALF3</i>	A-ii

Liste des sigles et abréviations

Note : les abréviations normalement employées dans les publications de langues anglaises ont été conservées pour faciliter la compréhension du lecteur et éviter les malentendus

RALF : *Rapid alkalisation factor*

a.a : Acide aminé

ABA : Acide abscissique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BA : 6-benzylaminopurine

bZip : *Basic Leucine Zipper Domain*

CRP : *Cysteine-Rich Protein*

DIC : Contraste interférentiel différentiel (*Differential interference contrast*)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOF : *DNA-binding with one finger*

ES : Sac embryonnaire (*embryo sac*)

EtOH : Éthanol

FG: Gamétophyte femelle (*female gametophyte*)

FM : Mégaspore fonctionnelle (*functional megaspore*)

GA3 : Gibbérelline

GFP : *Green fluorescence protein*

h = Heure

Hex : trans-2-hexenal

j = Jour

LRX : *Leucine-Rich eXtensin*

LTR : *Long tandem repeat*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MAPKKK : *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MeJa : Jasmonate de méthyle (*Methyl jasmonate*)

mm : Millimètre

mM: Millimolaire

MMC : Cellule de la mégaspore mère (*megaspore mother cell*)

MPSS : Séquençage massivement parallèle (*Massively parallel signature sequencing*)

NAA : Acide naphtalène acétique

NBT/BCIP: 4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

NPA : Acide 1-N-naphthylphthalamique

pb : Paire de bases

RNAi : Mutant d'interférence

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse (*Reverse transcription - polymerase chain reaction*)

ScR3 : *ScRALF3*

T-DNA : Mutant d'insertion

um : Micromètre

uM : Micromolaire

UTR : Région non transcrite (*Untranslated Region*)

Remerciements

Merci à Daniel de m'avoir fait confiance dès le début. Merci d'avoir toujours confiance.

Merci à Éric d'avoir bien voulu partager un peu son projet avec moi. J'espère avoir été à la hauteur. Peu importe la fin, je crois qu'on a réussi à écrire une belle histoire à *Ralf*. Chapeau !

Merci aux filles du *cubicule*, Caroline, Yang, Evgenia et Afsaneh d'avoir été là. Votre présence m'est précieuse.

Merci à tous ceux qui m'ont permis de devenir une Scientifique. Je ne suis pas où je croyais que j'allais être, mais j'ai été honorée de pouvoir faire ce bout de chemin avec vous. À bientôt.

1. Introduction

1.1 Les peptides chez les plantes

La signalisation cellulaire est un vaste sujet! L'implication de petites protéines sécrétées dans la communication cellulaire est connue depuis longtemps chez les animaux. Depuis la découverte de l'insuline en 1922, on sait que ces peptides peuvent jouer un rôle similaire aux hormones et qu'ils peuvent être impliqués dans tous les aspects de la vie de l'organisme : du développement à la défense (Irving et Gehring, 2012; Matsubayashi et Sakagami, 2006). Même chez les organismes unicellulaires tels que les bactéries, la présence de communications intercellulaires via des peptides sécrétés est de plus en plus documentée. Le phénomène de *quorum sensing* dépend entre autres de la présence d'une quantité suffisante de certains peptides dans l'environnement (Ng et Bassler, 2009).

Chez les plantes, la découverte des peptides est plus récente. Il a fallu attendre jusqu'au début des années 1990 pour que le premier phytopeptide soit isolé. Clarence A. Ryan, Gregory Pearce et leurs collègues ont mis à jour l'existence d'une hormone polypeptidique impliquée dans les mécanismes de défense chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), la systémine, ainsi que de son précurseur, la prosystémine (Pearce et al., 1991). Depuis, plusieurs gènes ont été identifiés comme codant pour des petits peptides bioactifs jouant un rôle tant dans les réponses à des facteurs biotiques ou abiotiques que dans différents aspects du développement (Germain et al., 2006; Irving et Gehring, 2012; Katsir et al., 2011; Matsubayashi et Sakagami, 2006).

Les peptides sécrétés vont jouer un rôle de ligand ou de signal dans une multitude de voies de signalisation. Une coévolution des diverses composantes de la voie permet ainsi une régulation précise d'une multitude de réponses à des stress, à l'environnement ou au développement. La compréhension de ces facteurs sur la vie des végétaux passe donc par l'étude des acteurs de ces voies parfois complexes.

Les peptides peuvent ainsi déclencher une voie de signalisation présente dans tout le règne végétal ou encore avoir une action spécifique à certaines familles seulement. C'est d'ailleurs le cas de la systémine qui est retrouvée seulement chez les *Solanaceae* et est absente chez plusieurs plantes modèles telles qu'*Arabidopsis thaliana* ou les espèces céréalières.

En tentant de découvrir des homologues de la systémine chez le tabac, Pearce *et al.* ont, en plus de réussir à isoler deux *systemin-like*, identifié un autre peptide de 5-kDa (49 acides aminés) provoquant l'alcalinisation du milieu (2001). L'alcalinisation de la suspension cellulaire induit par ce nouveau peptide étant plus rapide que pour les deux systémines, ils l'ont désigné RALF pour *Rapid alkalization factor*. Ils ont réussi à isoler une portion du peptide, à identifier une séquence correspondante dans une banque d'EST de feuilles de tomate et ensuite isoler l'ADNc correspondant chez le tabac. La présence de protéines similaires fortement conservées chez d'autres espèces permettait alors d'espérer un rôle important pour ce nouveau peptide (Pearce *et al.*, 2001). Tout comme la systémine, NtRALF induit une voie MAP kinase et semble résulter du clivage d'un précurseur. Mais contrairement aux peptides caractérisés à l'époque, NtRALF n'induit pas l'accumulation de l'inhibiteur de trypsine ce qui laisse penser qu'il n'est pas impliqué dans la réponse de défense. L'ajout du peptide dans le milieu bloque cependant la croissance racinaire chez *Arabidopsis thaliana* et chez la tomate (Pearce *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que ce nouveau groupe de peptide bioactifs serait impliqué dans le développement, ce qui sera prouvé à plusieurs reprises par la suite.

1.2 Rapid alkalisation factor

1.2.1 Les peptides de type RALF

Contrairement à la systémine, les peptides de type *Rapid alkalization factor* sont retrouvés dans tout le règne végétal et forment une large famille au sein des CRP (*cystein-rich protein*). Bien que leur nombre soit plus important chez les angiospermes, des gènes de type RALF sont retrouvés dans le génome de lignée ancienne telle que chez le lycophyte *Selaginella moellendorffii*. Cependant, l'expansion de la famille se situe

principalement suite à la divergence des monocotylédones et des eudicotylédones. Le nombre de gènes de type RALF retrouvé dans le génome varie fortement selon l'espèce, mais n'est pas proportionnel à la taille totale prévue du génome. Le nombre de gènes semble plutôt lié aux événements de duplication, que ce soit du génome complet ou de manière plus restreinte (plus particulièrement des duplications en tandem)(Cao et Shi, 2012). Par exemple, chez la plante modèle *A. thaliana*, une analyse PSI-BLAST à partir du domaine C-terminal de NtRALF et une deuxième analyse TBLASTN ont permis d'identifier plus de 34 gènes comportant plusieurs caractéristiques communes ainsi que des motifs conservés (Olsen et al., 2002). Depuis, de nouveaux gènes comprenant le domaine RALF ont aussi été identifiés. En comparaison, 23, 16 et 19 gènes de type RALF sont retrouvés dans le génome du peuplier, du riz et du maïs respectivement, bien que ces trois espèces aient un génome de taille supérieur à *A. thaliana* (Cao et Shi, 2012). Plusieurs paralogues issus d'évènements probables de duplication peuvent d'ailleurs être identifiés chez les RALFs retrouvés chez *A. thaliana*. Treize paires de paralogues possédant une structure très similaire sont comptabilisées, représentant plus de 78,8 % de la famille des RALFs chez cette plante modèle. Ces événements de duplication sont vraisemblablement à la base de l'expansion de cette famille chez *A. thaliana* (Cao et Shi, 2012).

La structure globale des gènes de type RALF est très similaire et un seul large domaine caractérise les gènes de cette famille. Cependant, on constate la présence de plusieurs particularités plus spécifiques présentes chez la majorité ou une partie des membres de la cette famille.

Tout d'abord, tous sont formés d'un seul exon et possèdent un peptide signal en N-terminal, signifiant qu'ils transitent tous par la voie de sécrétion. Le peptide mature inclut un motif plus fortement conservé en C-terminal et quatre cystéines formant deux ponts disulfures chez 33 des 37 peptides identifiés. Les deux dernières cystéines sont absentes chez deux de ces peptides (AtRALF14 et AtRALF18) alors que deux autres peptides montrent une très faible conservation du domaine conservé, ce qui affecte aussi les ponts disulfures (AtRALF17 et AT4G14020).

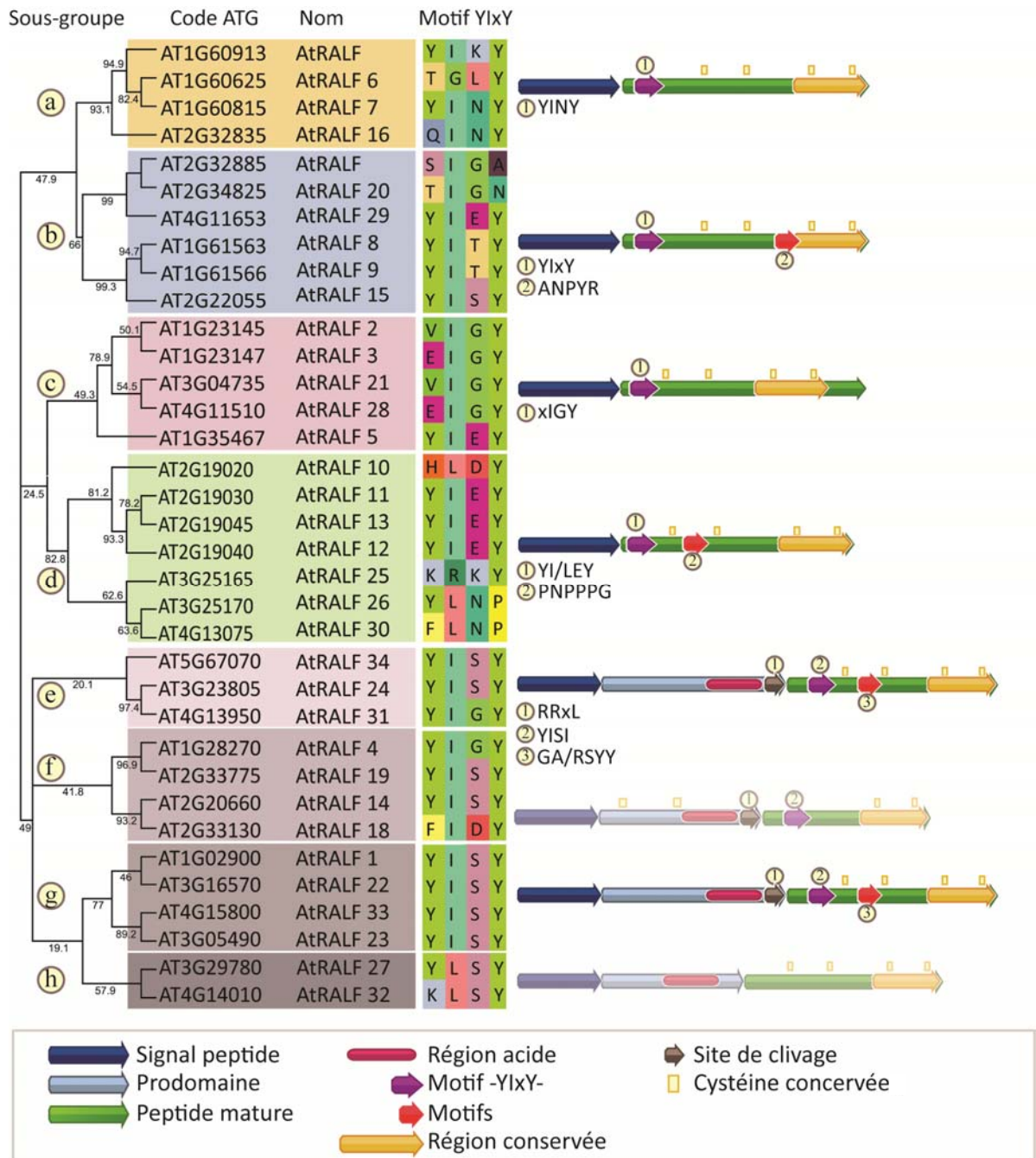


Figure 1 : Arbre-consensus de la famille des peptides de type RALF chez *Arabidopsis thaliana*.

Arbre-consensus basé sur la séquence en acide aminé des peptides de type RALF retrouvés chez *A. thaliana*. Les valeurs Bootstrap supportant chaque branche proviennent de 1000 réplicats. Les peptides sont divisés en huit sous-groupes (nommés de *a* à *h*). Les motifs communs au sous-groupe et les régions spécifiques sont mis en évidence et la composition du motif -YlxY- est détaillée.

Un deuxième motif fortement conservé se trouve au début du peptide mature : le motif - YIxY - est présent chez plus de la moitié des peptides de type RALF chez *A. thaliana* (20/37). L'isoleucine située en deuxième position, présente chez 28 des 37 AtRALF, est essentielle à l'activité du peptide puisque sa substitution en alanine diminue fortement le pouvoir alcalinisant du peptide dans une suspension cellulaire (Pearce et al., 2010). Le caractère hydrophobe de l'isoleucine semble être le point important puisque les substitutions observées chez les membres de la famille chez *A. thaliana* ainsi que chez d'autres espèces gardent le caractère hydrophobe de l'acide aminé (substitution par une leucine ou une valine par exemple)(Pearce et al., 2010). La dernière tyrosine du motif est aussi fortement conservée (31/37) malgré le fait qu'une mutation de cet acide aminé n'affecte pas l'activité du peptide mature SIRALF chez la tomate (Pearce et al., 2010).

Une deuxième caractéristique partagée par une portion seulement des peptides de type RALF est la présence d'un propeptide ou d'un précurseur. L'absence de prodomaine chez certains serait peut-être le résultat d'une délétion interne lors de la diversification de cette famille (Olsen et al., 2002). Des domaines ou motifs caractéristiques sont présents dans les prodomaines malgré le fait que le niveau de conservation de séquence entre les divers membres soit plutôt faible. L'ensemble du propeptide est principalement formé d'acides aminés chargés, mais une région composée d'acides aminés acides est retrouvée chez tous les peptides comportant un prodomaine (Olsen et al., 2002).

Un second motif (-RRxL-) est conservé chez les peptides possédants un prodomaine et correspond à un site reconnu de manière générale par des protéases de la famille des subtilisines impliquées dans la maturation de prohormones chez les animaux et les levures. Plus de 56 subtilases sont annotées dans le génome d'*A. thaliana* (Rautengarten et al., 2005). La mutation de la protéase à sérine de la famille des subtilisines AtS1P chez *A. thaliana* affecte justement la maturation d'AtRALF23 (Srivastava et al., 2009). La présence du site dibasique formé généralement de deux arginines juste avant le début du peptide mature semble essentielle à la maturation des peptides de type RALF puisque la substitution de la deuxième arginine chez AtRALF1 empêche l'accumulation du peptide mature dans un extrait de feuilles (Matos et al., 2008).

L'analyse phylogénétique des peptides de type RALF chez *A. thaliana* permet de les classer en trois grands groupes et huit sous-groupes (nommés de *a* à *h*, figure 1). Le premier sous-groupe (sous-groupe *a*, représenté en orange) est composé de quatre peptides sans prodomaine, mais possédant le motif –YIxY-. L'isoleucine et la tyrosine en quatrième position sont bien conservées et la troisième position est majoritairement occupée par une asparagine. La région conservée en C-terminal est présente et aucun autre motif particulier n'est observé.

Le deuxième sous-groupe (sous-groupe *b*, représenté en bleu) est relativement similaire au premier groupe excepté la troisième position du motif –YIxY- qui ne semble pas montrer de préférence pour un acide aminé en particulier. En plus de la région C-terminal conservée, un motif –ANPYR- est conservé entre la deuxième et la troisième cystéine.

Le troisième sous-groupe (sous-groupe *c*, représenté en rose) possède aussi un signal peptide, mais pas de prodomaine. Le motif habituel –YIxY- est principalement représenté par les acides aminés –xIGY-. L'isoleucine est donc conservée. Une deuxième particularité est la présence d'une queue C-terminal après la région conservée chez quatre des cinq peptides du groupe (excepté AtRALF3).

Le quatrième sous-groupe (sous-groupe *d*, en vert) est principalement caractérisé par la substitution de l'isoleucine dans le motif –YIxY-. Quatre des sept peptides vont avoir un autre acide aminé en deuxième position de ce motif. Un deuxième motif -PNPPPG-, est aussi observé chez les membres de ce groupe entre la première et la deuxième cystéine.

Les quatre derniers sous-groupes sont rassemblés en un plus grand groupe (sous groupes *e* à *h*, représentés en mauve) ayant conservé plusieurs caractéristiques communes. Celui-ci comprend d'ailleurs le plus de membres et la majorité des peptides qui ont été caractérisés chez les autres espèces. Les membres de ce groupe possèdent tous un prodomaine entre le signal peptide et le peptide mature. Si la majorité contient le motif reconnu en règle générale par les subtilases (-RRxL-), certains ont un motif légèrement altéré (AtRALF18 et AtRALF24) ou totalement absent (AtRALF32 et

AT4G14020). Le groupe formé par AtRALF14 et AtRALF18 diffère aussi des autres RALFs par leur peptide mature. Plus court que la moyenne, la portion mature du peptide ne contient qu'un seul pont disulfure situé dans la région conservée en C-terminal. Le motif –Ylxl- est plus fortement conservé dans ce groupe et la troisième position est surtout occupée par une sérine. La majorité (sous-groupe *e*, *f* et *g*, excepté AtRALF14 et AtRALF18) vont de plus posséder un deuxième motif conservé (-GASY-) entre la première et la deuxième cystéine.

1.2.2 Fonctions des peptides de type RALF

Le mode d'action des peptides de la famille des RALFs impliquerait l'interaction du facteur avec un récepteur. Plusieurs indices mènent à cette conclusion bien que la nature réelle de ce récepteur reste encore à déterminer. Des analyses par photoaffinité d'un analogue de SIRALF (précédemment appelé LeRALF) ont permis d'établir que le peptide lie un complexe protéique membranaire via l'apoplaste. Les analyses de cinétiques de cette liaison sont caractéristiques d'une interaction entre une hormone ou un peptide avec un récepteur. Ces analyses par photoaffinité ont de plus permis d'isoler une protéine de 120 kDa chez la tomate, le tabac et la luzerne interagissant avec SIRALF. Une deuxième protéine de taille variable a aussi été décelée : 25 kDa chez la tomate, 35 kDa chez le tabac et 45 kDa chez la luzerne (Scheer et al., 2005). L'interaction du peptide photomarqué (125I-azido-LeRALF) avec le complexe membranaire est totalement défaite lors de lavages à pH acides, indiquant que l'interaction se fait à la surface de la cellule et que le peptide ne serait vraisemblablement pas internalisé.

Ensuite, RALF cause l'alcalinisation d'une suspension cellulaire, ce qui est une réponse connue suite à l'interaction avec un récepteur membranaire suite à l'inhibition des pompes à protons ATPase (Meindl et al., 1998; Stratmann et al., 2000). C'est d'ailleurs la raison principale à la base de l'essai qui a permis d'isoler le peptide RALF chez le tabac (Pearce et al., 2001). En outre, l'application de suramine, une drogue inhibant l'interaction signal/récepteur, empêche l'augmentation du pH de la suspension cellulaire (Scheer et al., 2005). Toujours chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), l'interaction entre un RALF présent spécifiquement chez le pollen (SIPRALF) et une protéine de type LRX

(*Leucine-Rich eXtensin*) présente dans la paroi est ressortie d'une analyse double hybride (Covey et al., 2010). L'interaction des peptides de type RALF avec des protéines de la paroi cadre bien avec la présence du peptide mature *NtRALF* fusionné à la GFP au niveau de la paroi et de l'apoplaste suite au transit du peptide par le réticulum endoplasmique (Escobar et al., 2003).

Du point de vue fonctionnel, une dizaine de peptides ont été étudiés plus ou moins en détail. Tous, à l'exception d'un seul, font partie du dernier groupe phylogénétique et possèdent donc ses attributs (propeptide, motifs -RRxL- et -YlxY- ...). Tous semblent aussi bel et bien impliqués dans le développement comme d'abord suggéré (Pearce et al., 2001).

Le *Rapid alkalization factor* trouvé chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), *NtRALF*, fut d'abord caractérisé pour sa capacité à provoquer l'alcalinisation d'une suspension cellulaire et à induire l'activité d'une MAP kinase. L'ajout de *NtRALF* dans le milieu de culture de plantules d'*Arabidopsis* entraîne un arrêt de la croissance racinaire. La zone d'élongation et le méristème racinaire sont alors fortement perturbés (Pearce et al., 2001). Dans un même ordre d'idée, des plantes d'interférence pour *NaRALF* chez *Nicotiana attenuata* mènent à une augmentation de la vitesse de croissance de la racine ainsi qu'un accroissement de la taille de la zone d'élongation. La croissance des poils racinaires est aussi perturbée, entre autres dû à un problème dans la modulation du pH extracellulaire nécessaire à leur croissance (Wu et al., 2007).

MtRALF1 chez la luzerne (*Medicago truncatula*) amène l'attention sur une autre fonction des RALFs au niveau de la racine. Cette fois-ci, c'est du côté de la nodulation et de l'interaction symbiotique avec les bactéries du rhizome. La surexpression de *MtRALF1* mène à une perturbation de la formation des nodules suite à l'inoculation de *Sinorhizobium meliloti* sur les racines. Les relations symbiotiques normalement établies avec la bactérie sont fortement perturbées et les rares nodules formés ne deviennent jamais matures. Mais, contrairement au RALF trouvé chez le tabac, la croissance racinaire n'est pas affectée (Comber et al., 2008).

Tout comme chez le tabac, un peptide RALF chez *Solanum lycopersicum* RALF (SIRALF) exprimé dans les tissus végétatifs cause lui aussi une alcalinisation rapide d'une suspension cellulaire et arrête la croissance racinaire (Scheer et al., 2005). La présence du peptide dans le milieu de croissance semble affecter la division cellulaire puisqu'une réduction de H³-thymidine, généralement incorporé à l'ADN lors des divisions mitotiques, est observée chez les cellules racinaires (Moura et al., 2006). Un deuxième peptide de type RALF, spécifique au pollen mature et à l'anthere cette fois, a été étudié chez la tomate. Ce dernier aurait un rôle dans l'élongation du tube pollinique. La présence de SIPRALF dans le milieu de croissance lors de la germination du pollen, bloque partiellement la croissance du tube pollinique à des concentrations aussi basses que 0,01 µM et totalement lorsque 0,1 µM du peptide synthétique est ajouté. L'effet est irréversible chez les tubes polliniques allant de 5 µm à environ 60 µm malgré leur transfert dans un milieu exempt de SIPRALF. Les tubes polliniques de plus de 70 µm sont quant à eux insensibles au peptide. L'intervalle de sensibilité du pollen correspond au moment de la migration des noyaux du grain de pollen au tube pollinique en formation. (Covey et al., 2010)

Un autre peptide de type RALF spécifique au pollen a été identifié chez le brocoli (*B. oleracea var. italica*). Alors que SIPRALF est plus similaire en séquence à AtRALF4 (Covey et al., 2010), BoRALF1 est quant à lui le plus proche orthologue d'AtRALF9, lui aussi spécifique au pollen. BoRALF1 ne semble pas impliqué dans le développement du tube pollinique comme peut l'être SIPRALF puisque son expression semble circonscrite au cytoplasme du grain de pollen. Cependant, aucune fonction précise n'a été démontrée pour BoRALF1 (Zhang et al., 2010).

L'effet de l'ajout de SacRALF1 dans le milieu de croissance de cals chez la canne à sucre (*Saccharum spp.*, cv. hybrides) semble soutenir l'implication des peptides RALF dans l'expansion cellulaire plutôt qu'à ce qui touche la division. La présence du peptide en petite quantité (0,1 µM) dans le milieu de croissance inhibe l'élongation des cellules des microcals. De plus, les peptides de type RALF semblent circonscrits aux zones d'expansion

cellulaire, telle que la zone d'élongation dans la racine ou les jeunes feuilles (Mingossi et al., 2010).

Chez *Arabidopsis*, la surexpression de deux membres de la famille des RALFs induit un phénotype de nanisme chez les plantes (Matos et al., 2008; Srivastava et al., 2009). La croissance semble affectée très tôt par AtRALF1 puisque l'ajout du peptide deux jours après la germination dans le milieu de culture inhibe la croissance de l'hypocotyle (Mingossi et al., 2010). En plus de ce phénotype, AtRALF1 amène une augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} des cellules de la racine de manière très rapide (Haruta et al., 2008). Par contre, AtRALF23, exprimé plus spécifiquement à la racine, va avoir un effet complètement différent. Son expression est modulée par les brassinostéroïdes. Les plantules surexprimant AtRALF23 ont une croissance ralentie et leurs racines démontrent une capacité réduite à acidifier le milieu. Les plantes démontrent finalement un phénotype similaire à une insensibilité aux brassinostéroïdes. L'hypothèse qu'AtRALF23 soit impliqué dans le ralentissement de la croissance de la plante, en opposition avec les brassinostéroïdes, est avancée (Srivastava et al., 2009).

L'expression d'autres peptides de type RALF est modulée par la présence d'hormone. Chez le peuplier (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoïdes*), *PtdRALF2* est sous-régulé suite au traitement avec du jasmonate de méthyle (MeJa) (Haruta et Constabel, 2003). Le jasmonate de méthyle affecte aussi l'expression de certains RALFs chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense*. L'expression de *ScRALF1* est induite par MeJa après six et 48 heures dans les feuilles, l'ovaire et le style. Le trans-2-hexenal (HEX) induit lui aussi l'expression de *ScRALF1* au niveau des feuilles (Germain et al., 2005).

Plusieurs études ont eu pour but de déterminer les gènes spécifiques au gaméophyte femelle à l'aide de données transcriptionnelles et de divers mutants sans sac embryonnaire tels que *sporocytless (spl)*, *coatlicue (coa)* ou *determinant infertile1 (dif1)*. Ces études ont fait entre autres ressortir la présence d'*AtRALF14* et d'*AtRALF18* au niveau du sac embryonnaire (Johnston et al., 2007; Wuest et al., 2010; Yu et al., 2005). *AtRALF18* est aussi identifié comme fortement réprimé chez le mutant *ino (inner no outer)* ne possédant pas de tégument extérieur, laissant croire à sa présence dans ceux-ci (Skinner

et Gasser, 2009). Mais les analyses d'expression montrent qu'*AtRALF18* semble plutôt exprimé dans le sac embryonnaire et en particulier au niveau de la cellule centrale (Wuest et al., 2010). *AtRALF14* est quant à lui sous-régulé dans le mutant *myb98* perturbant les cellules synergides et l'attraction du tube pollinique (Jones-Rhoades et al., 2007). La surexpression d'*AtRALF32* et *AtRALF33* au niveau du carpelle est aussi remarquée lors d'analyses chez les mutants *sporocytless* et *coatlicue* (Johnston et al., 2007). Une nouvelle analyse du mutant *sporocytless (spl)* à l'aide de la technique MPSS (*Massively parallel signature sequencing*) a permis de situer *AtRALF19* et *AtRALF24* au niveau de l'ovule. Les deux peptides ne sont pas détectés dans le mutant sans sac embryonnaire alors qu'ils sont présents chez le type sauvage (Sanchez-Leon et al., 2012). Bien que toutes ces données ne nous permettent pas d'établir la fonction des peptides de type RALF chez le gamétophyte femelle, leur présence spécifique dans cet organe permet de croire à un rôle important de ces facteurs dans le développement des organes reproducteurs.

En dépit des nombreuses études faites chez plusieurs espèces différentes, aucune fonction précise n'a donc été identifiée. Leur implication dans le développement ne fait cependant aucun doute, quoique qu'un rôle additionnel au niveau de la défense contre les herbivores et/ou les pathogènes nécrotrophes ne puisse être totalement exclu tel qu'en témoigne l'induction par le MeJa (Germain et al., 2005; Haruta et Constabel, 2003). De plus, leurs activités semblent plutôt liées à l'expansion cellulaire qu'à la division cellulaire (Covey et al., 2010; Mingossi et al., 2010; Pearce et al., 2001; Wu et al., 2007). Mais le *comment* reste assez nébuleux jusqu'à maintenant. La capacité de moduler le pH pourrait bien être une façon d'influencer les phénomènes décrits plus haut. La modulation du pH apoplastique permettrait entre autres d'influencer des protéines présentes à la paroi, telle que les pectines méthylesterase, les exo- α -glucanase et les expansines. La modulation du pH intracellulaire pourrait aussi avoir une influence sur les implications des peptides. Chez le pollen par exemple, où certains RALFs semblent y être spécifiquement exprimés et y jouer un rôle important, une zone alcaline à l'apex du tube pollinique est essentielle à la croissance normale de ce dernier (Feijo et al., 1999). La transmission du signal induit par les RALFs peut aussi déclencher une voie de signalisation

intracellulaire par l'activation d'une voie MAPKinase (Pearce et al., 2001) ou d'une voie dépendante du calcium (Haruta et al., 2008).

1.2.3 La famille des peptides de type RALF chez *Solanum chacoense*

Une banque d'EST de gènes faiblement exprimés dans les ovules et ovaires après fécondation chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense* fut criblée pour trouver des gènes homologues au peptide de type RALF retrouvé chez le tabac par Germain et al. (2005). De cette analyse, cinq gènes sont ressortis. Tous les peptides ScRALF-like partagent les motifs retrouvés chez les autres RALFs à quelques différences près. Tous vont avoir un peptide signal en N-terminal ainsi qu'un prodomaine comme la majorité des RALFs caractérisés jusqu'à maintenant (excepté BoRALF1 (Zhang et al., 2010)). Seulement deux des cinq peptides identifiés, ScRALF1 et ScRALF2, présentent un site de reconnaissance -RRxL- avant le peptide mature. ScRALF3 possède plutôt un site -GRSL- alors que ScRALF4 et 5 ont un site -TRIL- à cet endroit. Quant au motif -YIxY-, il se retrouve normalement chez les trois premiers ScRALF. Le motif est cependant modifié chez ScRALF4/5 (-KLSY- et -KLNy- respectivement). Finalement, tous possèdent les quatre cystéines nécessaires aux ponts disulfures malgré que le domaine en C-terminal soit moins bien conservé chez ScRALF4 et 5.

Comme les autres gènes de type RALF, ceux caractérisés chez *S. chacoense* montrent un patron d'expression spécifique à certains tissus. *ScRALF1* est exprimé presque exclusivement dans les ovaires, plus particulièrement dans le placenta lors du développement tardif des fruits. *ScRALF2* est le plus proche homologue de NtRALF trouvé chez *N. tabacum* et est exprimé dans plusieurs tissus, tout comme *ScRALF4* et *ScRALF5*. Le peptide *ScRALF3* est quant à lui aussi exprimé dans les ovaires, mais on détecte tout de même une faible expression dans d'autres tissus : feuille, pétale, style et pollen. La plus forte expression est détectée juste après la fécondation et le niveau décline au niveau du fruit après huit jours. *S. chacoense* étant une espèce auto-incompatible de type gamétophytique, les événements liés à la pollinisation ont lieu même lors d'autopollinisation malgré l'impossibilité de fécondation. L'absence d'expression du peptide observée dans ce cas permet de conclure que *ScRALF3* est bel et bien induit par

la fécondation et non par les évènements liés à la pollinisation seule (Germain et al., 2005).

Des traitements avec des hormones reliées à divers stress vont induire une faible variation chez certains des *ScRALFs*. Comme mentionnée ci-haut, l'expression de *ScRALF1* est induite par MeJa après six et 48 heures dans les feuilles, l'ovaire et le style alors que le trans-2-hexenal (HEX) induit lui aussi l'expression de *ScRALF1* au niveau des feuilles. Cependant, ces modulations de l'expression semblent peu importantes en comparaison à celles produites lors des différentes étapes de développement.

Tous semblent être induits lors du développement du fruit alors qu'on les retrouve en minime quantité au stade mature du développement de l'ovaire avant fécondation. Mais puisque leurs maximums d'expression dans le fruit et leurs patrons d'expression globale diffèrent, il est plus que probable que leurs rôles et fonctions soient aussi différents et possiblement complémentaires, particulièrement lors du développement du fruit. (Germain et al., 2005)

1.3. Développement du gamétophyte femelle

Peu importe le moyen utilisé, la signalisation cellulaire est essentielle pour coordonner le développement. C'est entre autres vrai pour les organes reproducteurs qui assureront la pérennité de la lignée génétique. Tout doit être au bon endroit au bon moment pour permettre chaque étape de la reproduction, de l'attraction du pollinisateur à la formation des gamétophytes.

1.3.1 Développement de la fleur

L'embranchement des angiospermes est constitué des plantes produisant des fleurs et représente la grande majorité des végétaux avec au-delà de 250 000 espèces. Contrairement aux gymnospermes dont les graines nues favorisent le dispersement par le vent, les angiospermes produisent des fleurs complexes et généralement hermaphrodites qui ont coévoluées avec les pollinisateurs pour maximiser leurs capacités reproductrices.

Généralement composée de quatre verticilles concentriques, la fleur est un mélange de tissus non reproducteurs, composés du calice et de la corolle, situés vers l'extérieur de la fleur et de tissus reproducteurs, les étamines et le pistil, situés vers le centre. Le premier verticille est le calice formé des sépales qui a pour fonction notamment de protéger le bourgeon en développement. Le deuxième verticille est formé des pétales et joue un rôle important dans l'attraction des pollinisateurs. Les gamétophytes mâles et femelles assurant la reproduction se retrouvent dans les troisième et quatrième verticilles respectivement. Les étamines vont être formées d'un filet supportant l'anthère, une structure en forme de sac qui contient le pollen, le gamétophyte mâle. À la maturité de la fleur, soit à l'anthèse, les anthères s'ouvrent, ce qui permet de libérer le pollen. Les ovules comprenant le gamétophyte femelle sont retrouvés dans le dernier verticille au centre de la fleur : le pistil. Ce dernier est formé du stigmate qui assure la réception et parfois la réhydratation des grains de pollen, du style constitué principalement de tissus conducteurs laissant passer le tube pollinique en croissance et finalement de l'ovaire qui englobe et protège les ovules. Le nombre d'organes compris dans chaque verticille varie chez les monocotylédones (22 % des angiospermes) et chez les eudicotylédones (74 %

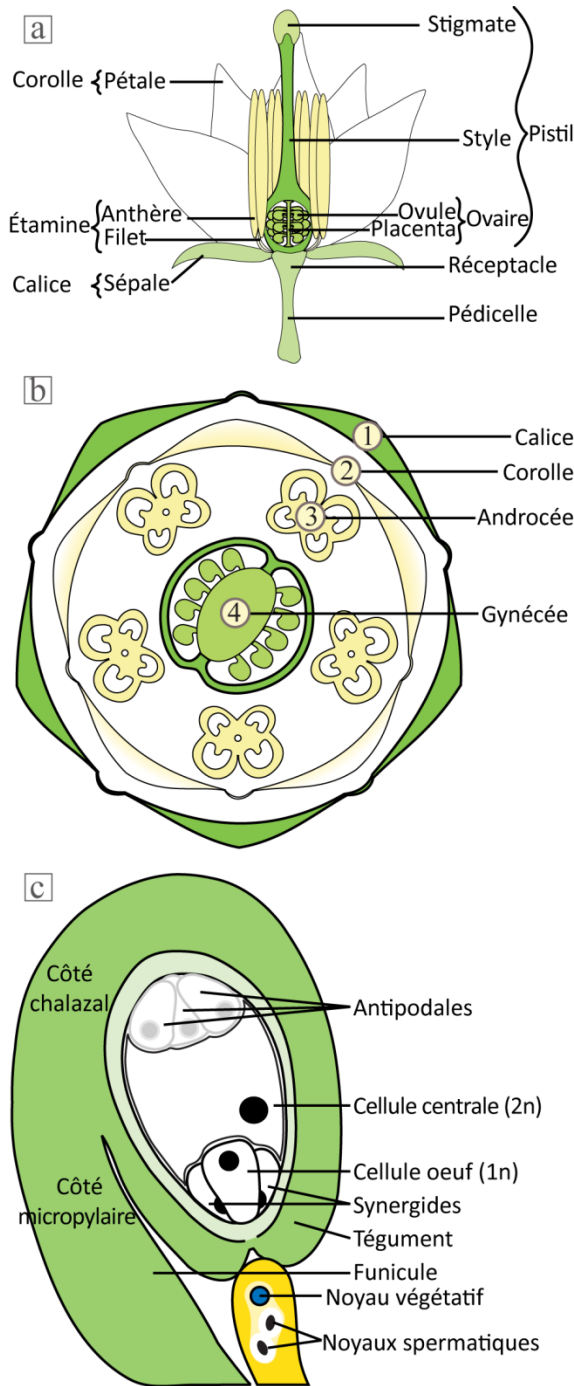


Figure 2 Morphologie de la fleur et de l'ovule.

(a) Détail de la morphologie typique d'une fleur retrouvée chez les Solanacées comportant des portions végétatives et reproductives. (b) Diagramme floral caractéristique des Solanacées détaillant les quatre verticilles typiques. (c) Le gamétophyte femelle mature est une structure à sept cellules formée selon un axe chalazale-micropylaire. Trois cellules antipodales, une cellule centrale, deux synergides et la cellule œuf composent le sac embryonnaire qui est recouvert des téguments. Le tube pollinique doit passer par l'ouverture du micropyle pour décharger les deux noyaux spermatisés et permettre la double fécondation. Adaptée de Chevalier et al. (2011).

des angiospermes). Les verticilles vont être retrouvés dans un multiple de trois chez les monocotylédones et dans un multiple de quatre ou cinq chez les eudicotylédones. Les fleurs des magnoliidées, dernier clade des angiospermes (4%), présentent une organisation plus primitive des organes floraux. Ces derniers sont disposés en spirale à la surface d'un réceptacle conique.

Bien que les fleurs aient évolué sous des formes très diversifiées, les mécanismes moléculaires permettant le développement de la fleur restent plutôt similaires (résumé par Bemer et Angenent, 2010; Krizek et Fletcher, 2005). La partie femelle de la fleur ne fait pas exception et a évolué de manière très diverse selon les familles, le type de pollinisateur et l'environnement. Chez les espèces du genre *Solanum*, telle que *S. chacoense* qui nous intéresse ici, l'ovaire est formé de deux carpelles et est dit

supère. Il est surmonté d'un style d'environ un centimètre avec un stigmate humide. Les ovules se développent en grappe, accrochés au placenta au centre de l'ovaire par le funicule qui relie par ses tissus vasculaires l'ovule au reste de la fleur. L'ovule est formé de tissus sporophytiques formés par les téguments (un ou deux, selon l'espèce) et le nucelle qui recouvrent un sac embryonnaire. Ce dernier est le gamétophyte femelle et renferme à maturité la cellule œuf ainsi que la cellule centrale qui formeront respectivement l'embryon et le tissu nourricier suite à la double fécondation. Le développement de l'ovule lui-même est un processus complexe et particulièrement contrôlé. Le développement des téguments doit être synchronisé avec celui du sac embryonnaire par des communications cellule-cellule et le développement du sac embryonnaire est lui-même influencé par plusieurs signaux hormonaux ou autres en provenance des tissus sporophytiques de l'ovule.

1.3.2 Développement de l'ovule

Trois modèles de développement de l'ovule sont les plus fréquemment observés chez les végétaux. Tous débutent par la formation d'un primordium à même le placenta. Trois éléments sont alors observables au long de l'axe proximal-distal : le funicule qui relie le primordium au placenta, la chalaze et ensuite le nucelle où une cellule acquiert le destin cellulaire de la mégaspore mère (Schneitz et al., 1995). La différence entre les modèles de développement se situe notamment lors de la première phase du développement de cette cellule mère : la mégasporogénèse. Suite à la division méiotique de cette cellule, il y aura la formation ou non d'une membrane (ou plaque cellulaire). Cette étape influencera le nombre de noyaux contenus dans la mégaspore fonctionnelle : un noyau (monosporique), deux noyaux (bisporique) ou quatre noyaux (tetrasporique). Le modèle le plus observé est le type monosporique décrit en premier lieu chez le genre *Polygonum* et se retrouve chez plus de 80 % des angiospermes (Friedman et Ryerson, 2009; Palser, 1975). Le sac embryonnaire de *S.chacoense* se développe selon ce modèle.

1.3.2.1 Description du développement selon le modèle *Polygonum*

Le sac embryonnaire mature est produit suite à plusieurs étapes de différenciation et de division. Tout d'abord, tel que mentionné ci-haut, une seule cellule du primordium, plus

précisément du nucelle, se différencie en cellule de la mégaspore mère (MMC). La MMC entre ensuite en méiose, menant ainsi à la formation de quatre mégaspores séparées par des plaques cellulaires. Chez les espèces dont le développement se fait selon le modèle de type *Polygonum*, trois de ces mégaspores dégénèrent et seule la mégaspore fonctionnelle (FM), toujours située à l'extrémité chalazale, demeure. Dès la différenciation de la cellule de la mégaspore mère (MMC), des signes de polarité sont déjà visibles : la position des organelles, l'arrangement du cytosquelette ainsi que la disposition spécifique de callose du côté sont nécessaires à la poursuite de la mégasporogénèse (Bajon et al., 1999; Schneitz et al., 1995). L'importance de cette polarité est vérifiée chez le mutant *switch1/dyad* qui produit deux mégaspores mères, mais seulement celle située du côté chalazal exprime les marqueurs de la MMC (Motamayor et al., 2000; Ravi et al., 2008). Cette polarité dans l'arrangement du cytoplasme aboutit à la formation de mégaspore légèrement différente en taille lors de la formation de la tétrade. La mégaspore située du côté chalazal est plus petite que les trois autres (Bajon et al., 1999; Estrada-Luna et al., 2004). Suite à la dégénérescence programmée des mégaspores situées vers le pôle micropylaire, la mégaspore la plus chalazale augmente de taille et c'est ce qui marque la fin de la mégasporogénèse (Christensen et al., 1997; Estrada-Luna et al., 2004).

La mégagamétogénèse débute et la mégaspore fonctionnelle subit alors une série de trois mitoses successives produisant un total de huit noyaux. Ces mitoses se produisent de manière synchrone dans le temps et les noyaux se positionnent de manière quasi symétrique dans l'espace : quatre noyaux du côté chalazal et quatre noyaux du côté micropylaire. Un noyau de chaque pôle migre alors vers le centre du sac embryonnaire (ES) et finiront par fusionner; on désigne ces noyaux comme les noyaux polaires. On observe concomitamment une cellularisation et le sac embryonnaire mature devient une structure à 7 cellules : trois cellules antipodales situées à l'extrémité chalazale, la cellule centrale formée des noyaux polaires (2n) et deux synergides ainsi que la cellule œuf (1n) du côté micropylaire. Dans bien des cas, les cellules antipodales dégénèrent. Chez la plante modèle *A. thaliana*, les cellules antipodales subsistent jusqu'au moment où les noyaux polaires fusionnent et un peu après (Christensen et al., 1997). Chez les espèces du

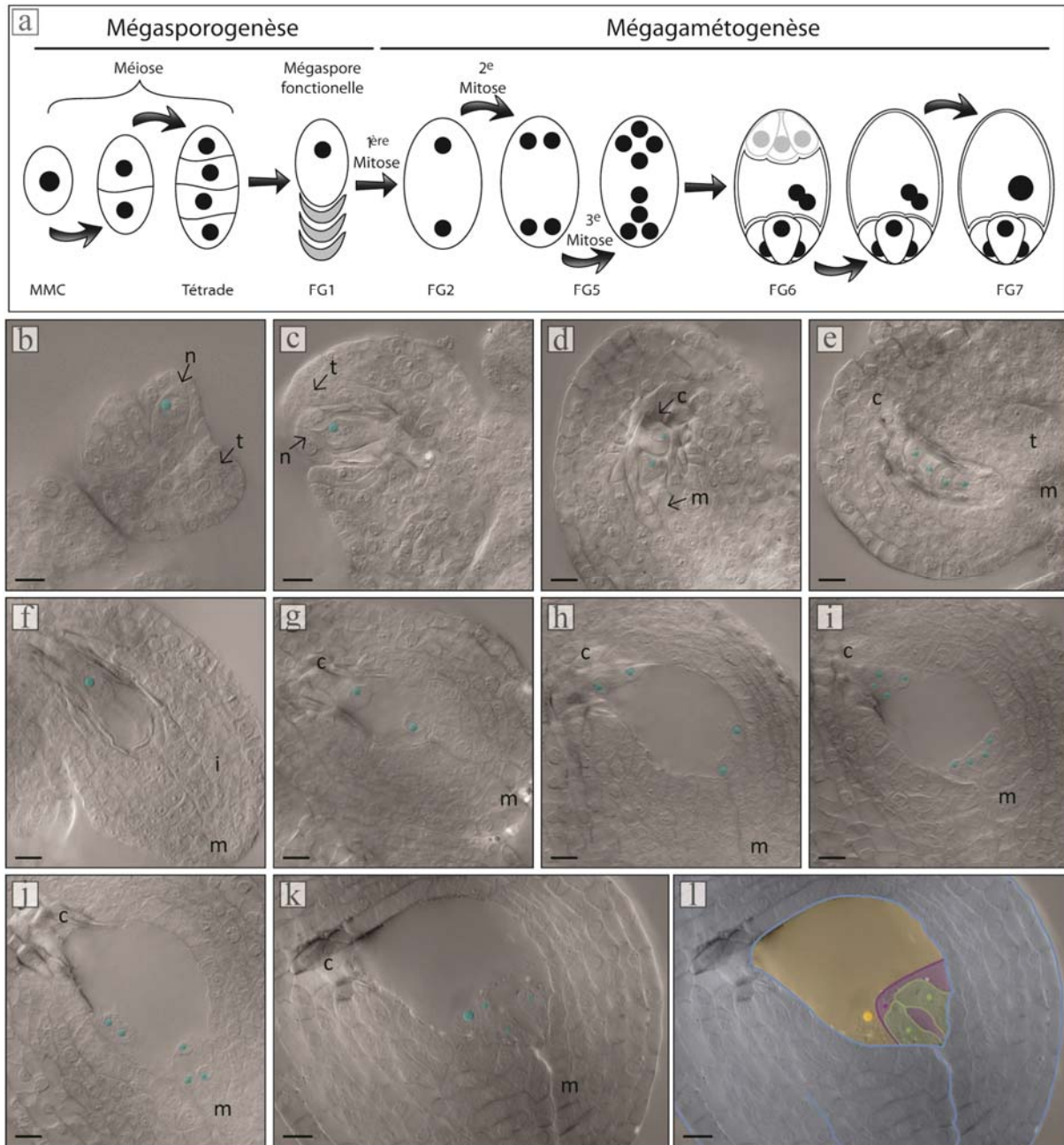


Figure 3 Développement du sac embryonnaire chez *Solanum chacoense* (type sauvage G4).

(a) Détail graphique du développement du sac embryonnaire de type *Polygonum*. (b) Différenciation d'une cellule du nucelle en cellule archésporiale (c) Développement de la cellule mégaspore mère (MMC) (d) Diade formée de deux spores haploïdes (e) Tétrade formée de quatre spores haploïdes (f) Mégaspore fonctionnelle (g) Stade deux noyaux suite à la Mitose I (h) Stade quatre noyaux suite à la deuxième mitose (i) Stade huit noyaux suite à la troisième et dernière mitose (j) Sac embryonnaire cellularisé sans fusion des noyaux polaires (k) Sac embryonnaire mature (l) Sac embryonnaire mature avec fausses couleurs *Bleu*: tissu sporophytique (téguments); *Jaune*: cellule centrale; *Vert*: synergides; *Mauve*: cellule œuf; n: nucelle; t: tégument; c: chalaze; m: micropyle; noyaux colorés artificiellement pour faciliter la visualisation. Images provenant d'un empilement de sections optiques (Z-stack) assemblées manuellement.

genre *Solanum*, la durée de vie des cellules antipodales est très brève et elles sont rarement observées bien que les noyaux polaires restent non fusionnés parfois jusqu'à l'anthèse ou à la fécondation (Estrada-Luna et al., 2004). Les cellules du sac embryonnaire sont fortement vacuolées et leur position dans le gamétophyte précisément contrôlée.

Les synergides vont posséder une large vacuole située dans le haut de la cellule repoussant le noyau et le cytoplasme vers le micropyle. Leur forme est plutôt allongée en comparaison avec la cellule œuf. Celle-ci est relativement plus grosse que les synergides et possède une forme de poire inversée. Sa vacuole est située vers le pôle micropylaire, ainsi le noyau et le cytoplasme de la cellule œuf sont alors localisés vers le centre du sac embryonnaire. La cellule centrale est elle aussi composée d'une vaste vacuole. Les noyaux (fusionnés ou seulement à proximité l'un de l'autre) vont être circonscrits à la membrane plasmique. Ils vont être situés généralement proche de la cellule œuf et des synergides, mais peuvent aussi se retrouver à proximité de la chalaze (Christensen et al., 1997; Estrada-Luna et al., 2004).

Simultanément, à la fin de la mégagaméto-genèse, la fleur entière atteint sa maturité et éclot; la fleur est alors à l'anthèse. Il peut maintenant y avoir pollinisation et, suivant la double fécondation, il y a la formation du zygote ($2n$), résultant de la fusion d'un noyau spermatique et de la cellule œuf, et de l'albumen ($3n$) qui est le résultat de la fusion de la cellule centrale et d'un noyau spermatique. L'albumen deviendra le tissu nourricier permettant la croissance de l'embryon.

Chacune de ces étapes menant à la formation du sac embryonnaire mature et ensuite de l'embryon nécessite un contrôle tout particulier. C'est ce qui fait du développement du gamétophyte femelle un magnifique modèle pour étudier la différenciation, la polarité, la division cellulaire et la communication entre les différents tissus (Christensen et al., 1997).

1.3.2.2 Description du développement des téguments

Dès le début du développement du sac embryonnaire, il y a formation des téguments qui protégeront le sac embryonnaire et finiront par devenir l'enveloppe extérieure de la

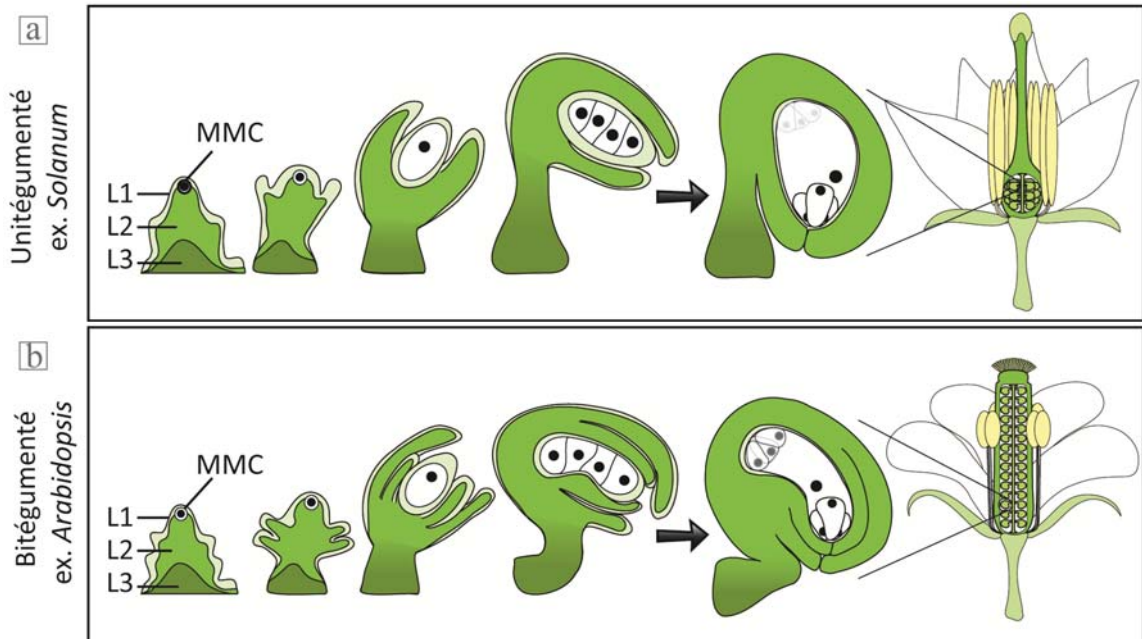


Figure 4 : Développement des téguments et de l'ovule chez des espèces unitégumentées et bitégumentées.

L'initiation des téguments se fait de manière concomitante à la mégasporogénèse (voir figure 3a). Une seule série de téguments est initiée chez les espèces unitégumentées telles que les espèces du genre *Solanum* (a) alors que deux téguments superposés se développent chez les espèces bitégumentées telles qu'*Arabidopsis* (b). Chez les deux types d'ovules, la formation des téguments va se terminer avec la mégasporogénèse et les téguments vont alors envelopper totalement le sac embryonnaire avant le stade FG1. Ainsi le micropyle se forme à la rencontre des téguments, autant chez les espèces unitégumentées que bitégumentées.

graine. Ce tissu maternel en contact direct avec le gamétophyte assure aussi la communication entre les deux générations et est essentiel au développement du sac embryonnaire (Bencivenga et al., 2011). Les téguments se développent autour du sac embryonnaire à partir de la première couche cellulaire du primordium (L1) au niveau de la chalaze (qui sépare le funicule de l'apex et du nucelle à ce moment). Les téguments entourent alors le nucelle et laissent une ouverture à l'endroit où ils se rencontrent, ce qui forme le micropyle où passera le tube pollinique pour accomplir la fécondation. Chez plusieurs espèces, dont la plante modèle *A. thaliana*, il y a la formation de deux séries de téguments (interne et externe) qui débute avant même la différenciation de la mégaspore mère, on parle alors d'ovule bitégumenté. Chez d'autres familles, dont les *Solanaceae*, une seule série de téguments est formée et on parle alors d'ovule

unitégumenté (McAbee et al., 2005). Leur croissance se complète lors de la mégasporogénèse (figures 3 et 4). Des ovules atégumentés (nus) sont aussi observés, entre autres chez certaines espèces de la famille des *Santalaceae* (Brown et al., 2010). Peu importe leur nombre, la formation des téguments permet de positionner l'ovule de telle sorte que le micropyle soit orienté vers le placenta, vers la base du gynécée ou vers le style (Estrada-Luna et al., 2004).

Le développement des téguments est influencé par des communications cellule-cellule dès leurs initiations. Un récepteur-like kinase présent dans les couches internes du primordium (L2 et L3) chez *A. thaliana* le démontre bien puisqu'il est nécessaire à la différenciation des téguments externes à partir de la couche L1. La mutation de *STRUBBELLIG* (*sub-1*) mène à la formation de téguments externes altérés qui ne recouvrent pas totalement le nucelle (Chevalier et al., 2005).

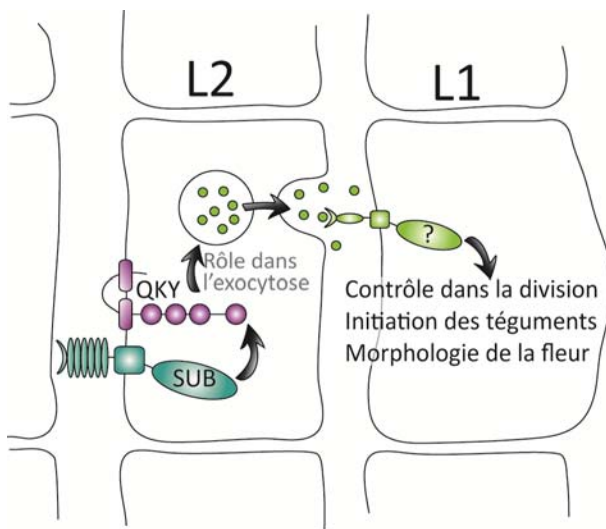


Figure 5 : Signalisation cellulaire intercouche lors de l'initiation des téguments médiée par STRUBELLIG (SUB).

L'interaction entre le récepteur SUB et QUIRKY (QRY) dans la deuxième couche cellulaire du primordium d'ovule permet l'exocytose d'un médiateur apoplastique important dans l'initiation des téguments à partir de la première couche cellulaire. Adaptée de Chevalier et al. (2011)

1.3.3 Implication des signaux dans le développement du gamétophyte femelle

Plusieurs preuves de l'existence d'une communication à double sens entre le tissu maternel et le sac embryonnaire ont été mises en évidence par l'analyse de mutants du développement regroupés en deux classes : sporophytique et gamétophytique (résumé par Chevalier et al., 2011; Drews et Yadegari, 2002; Robinson-Beers et al., 1992). Les mutants gamétophytiques vont être sous-divisés en deux catégories selon qu'ils soient affectés lors de la mégasporogénèse ou lors de la mégagamétogénèse.

1.3.3.1 Mutants sporophytiques

Les mutants affectant le développement des téguments vont souvent résulter en un arrêt du développement du sac embryonnaire lors des premiers stades (Baker et al., 1997; Elliott et al., 1996; Robinson-Beers et al., 1992; Schneitz et al., 1995).

L'absence de téguments chez les mutants *bel1* et *aintegumenta (ant)* provoque l'arrêt du développement du sac embryonnaire au niveau de la mégaspore fonctionnelle (FG1) (Baker et al., 1997; Robinson-Beers et al., 1992). *BEL1* et *ANT* codent tous deux pour des facteurs de transcription spécifiques au tissu sporophytique impliqués très tôt dans le développement (Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996; Reiser et al., 1995). La seule présence du tégument interne chez le mutant *ino (inner no outer)* ne permet pas un développement normal du sac embryonnaire. Bien que ce dernier se développe à un stade plus avancé que la mégaspore fonctionnelle, les sacs embryonnaires ne passent pas à travers les étapes de mitose (FG5) (Schneitz et al., 1995). Les deux téguments d'*A. thaliana* semblent donc avoir des rôles différents, mais tous deux sont essentiels au développement du sac embryonnaire.

L'évidence de la communication du sporophyte vers le gamétophyte est donc sans conteste bien qu'aucun signal précis n'ait été isolé jusqu'à maintenant. La réalité d'une communication dans le sens du gamétophyte femelle vers les téguments est cependant plus discrète puisque les mutations affectant le sac embryonnaire lui-même n'affectent pas l'intégrité des téguments pour autant.

1.3.3.2 Mutants gamétophytiques

S'il est évident qu'une communication se fait des téguments vers le sac embryonnaire, le contraire est aussi vrai malgré les apparences. La majorité des mutants gamétophytiques développent effectivement des téguments d'apparence normale. Néanmoins, au niveau transcriptionnel, l'absence de sac embryonnaire amène une régulation positive de plusieurs gènes chez le tissu sporophytique (Johnston et al., 2007; Skinner et Gasser, 2009; Wuest et al., 2010; Yu et al., 2005).

Mais puisque l'absence de gamétophyte n'affecte pas outre mesure le développement du sporophyte, la communication dirigée vers celui-ci semble contrôler négativement les événements de signalisation jouant un rôle sur le développement du sac embryonnaire lui-même (Chevalier et al., 2011).

Plusieurs voies de signalisation semblent impliquées dans le déroulement de la mégagamétogenèse. La perturbation de certaines portions de voie MAPK induit plusieurs problèmes à l'intérieur du sac embryonnaire. Par exemple, la protéine FRK1, une MAPKKK retrouvée chez *S. chacoense*, est essentielle pour que le sac embryonnaire passe le stade FG1 (Gray-Mitsumune et al., 2006; Lafleur, 2009).

La voie de signalisation induite par le récepteur transmembranaire CYTOKININ INDEPENDENT 1 (CKI1) est un autre exemple de voie essentielle au développement du gamétophyte femelle (figure 6 a). CKI1 est un récepteur histidine-kinase (famille des AHK) associé avec un phénotype de réponse constitutive à la cytokinine (Hwang et al., 2002; Kakimoto, 1996; Zheng et al., 2006) bien qu'il soit incapable de lier l'hormone (Yamada et al., 2001). Cependant, CKI1 semble utiliser les composantes de la voie de réponse à la cytokinine (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN (AHPs) et ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs) pour contrôler l'intégrité de la vacuole du sac embryonnaire au stade FG5 (Deng et al., 2010; Pischke et al., 2002). Les mutants d'insertions homozygotes *cki1-5* et *-6* dans le troisième exon et en amont du site d'initiation respectivement sont létaux pour la plante. Les mutants hétérozygotes *cki1-5/CKI1* et *cki1-6/CKI1* sont toutefois viables et l'allèle mutant est transmissible seulement via le gamétophyte mâle dû à des problèmes importants survenant lors de la mégagamétogenèse, laissant supposer que cette voie de signalisation est bel et bien essentielle au bon développement du sac embryonnaire. Suite à la perturbation de la vacuole, le positionnement des noyaux à l'intérieur du sac embryonnaire est aussi affecté et certains gamétophytes finissent par dégénérer complètement au stade FG7 (Hejátko et al., 2003; Pischke et al., 2002). Toutefois, les récepteurs de la cytokinine, présents dans le tissu sporophytique, semblent tout aussi essentiels au développement du sac embryonnaire que CKI1. L'analyse du gamétophyte femelle des triples mutants

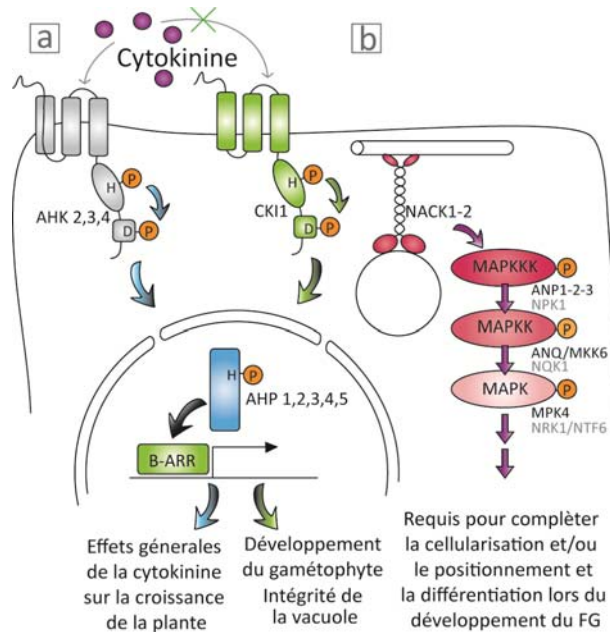


Figure 6: Voies de signalisation impliquées dans la mégagamétogenèse.

(a) Au cours de mégagamétogenèse, CKI1 agit de manière indépendante aux récepteurs de la cytokinine (AHK2-4), mais utilise la même voie de phosphorelais. (b) Chez le tabac, la voie NACK-PQR est impliquée dans la cytokinèse sporophytique. Chez *A. thaliana*, les kinésines homologues AtNACK1-2 sont également impliquées au stade FG5 de la mégagamétogenèse. Adaptée de Chevalier et al. (2011).

cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3 à l'anthèse montre une grande proportion de sacs embryonnaires absents ou bloqués dans la mégagamétogenèse bien que les téguments semblent normaux (Kinoshita-Tsujimura et Kakimoto, 2011).

Une deuxième voie MAPK apparaît comme cruciale lors du stade FG5 du développement du gamétophyte femelle. La voie retrouvée chez *A. thaliana* et chez le tabac est une cascade MAPK reliée à l'activité d'une protéine kinésine impliquée, entre autres, dans la cytokinèse des tissus sporophytiques (Soyano et al., 2003) (figure 6 b). La mutation des composantes de la voie permet d'observer la redondance des divers acteurs de la voie dans le développement du gamétophyte femelle et leur importance. Le triple mutant *anp1anp2anp3* des protéines MAPKKK de la voie n'est pas transmis via les gamètes mâles ni les gamètes femelles, établissant leur empreinte sur la viabilité des gamétophytes, alors que les simples mutants ne démontrent aucun phénotype particulier (Krysan et al., 2002). La viabilité du gamétophyte femelle est aussi sévèrement affectée chez le mutant *mkk6-2/anq2* perturbant la suite de la voie à phosphorelais (Takahashi et al., 2010). Dans le même ordre d'idée, le double mutant hétérozygote pour *AtNACK1-2*, codant tous deux pour des kinésines, montre 25 % des sacs embryonnaires avec un amas de noyaux au centre lors du stade FG5, bloquant ainsi le développement normal (Tanaka

et al., 2004b). Tous ces exemples démontrent bien l'aspect essentiel des voies de signalisation dans tous les aspects du développement du sac embryonnaire.

Tout au long de la mégagaméto-genèse, la polarité du sac embryonnaire et le positionnement des noyaux sont un enjeu principal. La perturbation du cytosquelette à l'intérieur du sac embryonnaire entraîne d'une migration anormale des noyaux lors du développement du gamétophyte chez le mutant *indeterminate gametophyte 1* du maïs. Ceci résulte, en plus d'une migration anormale des noyaux, à une perturbation de la synchronicité des divisions mitotiques qui est une caractéristique importante du développement de l'ovule (Huang et Sheridan, 1996). De plus, le destin cellulaire des noyaux du sac embryonnaire est déterminé de manière localisation-spécifique. En effet, l'étude de certains mutants entraînant un problème de positionnement des noyaux montre que ceux-ci expriment des marqueurs généralement spécifiques des cellules présentes à cette position dans le sac embryonnaire. L'exemple du mutant *eostre* chez *A. thaliana* démontre bien cette caractéristique. L'expression du gène *BLH1* dans le gamétophyte entraîne le positionnement du noyau d'une des synergides à la hauteur du noyau de la cellule œuf vers le centre du sac embryonnaire plutôt que juxtaposé aux tissus du micropyle. Cette dernière, suite à la cellularisation, exprime des marqueurs moléculaires reconnus pour être spécifiquement exprimés à la cellule œuf plutôt qu'aux synergides. Suite à la fécondation, deux zygotes peuvent parfois être observés (Pagnussat et al., 2007). Les problèmes observés chez le mutant *indeterminate gametophyte 1* entraînent une phase de division nucléaire allongée menant à la production de grand nombre de noyaux surnuméraires. Ces noyaux vont adopter le destin cellulaire corrélé à leur position par rapport au sac embryonnaire (Guo et al., 2004). Une des explications possibles à cette caractéristique est l'implication de l'auxine dans le développement du gamétophyte femelle; l'hormone étant essentielle à l'établissement du destin cellulaire des divers noyaux du sac embryonnaire. En effet, si l'action des facteurs de réponse à l'auxine (*Auxin Response Factor*) est bloquée au niveau du gamétophyte femelle, malgré le bon positionnement des noyaux, les diverses cellules vont finalement exprimer des marqueurs généralement spécifiques à d'autres cellules du sac embryonnaire (Pagnussat et al., 2009). Une deuxième voie de signalisation impliquant une communication

intercellulaire pourrait être en jeu dans le destin cellulaire et permettre une inhibition latérale assurant la singularité de la cellule œuf. La mutation de gènes codant pour des composantes de l'épissosome dans les mutants *lachesis (lis)*, *clotho* et *atropos* chez *A. thaliana* induit une délocalisation des marqueurs de la cellule œuf dans les synergides et la cellule centrale. Bien que les ARN messagers affectés par ces particules d'épissage ne soient pas connus pour l'instant, ils codent certainement pour des molécules importantes dans l'inhibition de la différenciation en gamète via une communication cellule-cellule à l'intérieur du sac embryonnaire (Gross-Hardt et al., 2007; Moll et al., 2008). L'idée que les cellules gamétiques influencent le destin cellulaire des cellules environnantes est de plus supportée par le mutant *agamous-like61/diana* chez *A. thaliana*. Les noyaux polaires dégénèrent rapidement après leur fusion chez ce mutant ce qui est suivi d'une modification de l'expression des marqueurs cellulaires à l'intérieur du sac embryonnaire. Les marqueurs spécifiques aux synergides et à la cellule œuf se retrouvent alors dans les cellules normalement positionnées à la chalaze et à l'inverse, les marqueurs spécifiques aux antipodales sont retrouvés dans les cellules normalement positionnées au micropyle (Bemer et al., 2008). En plus d'affecter le destin cellulaire, la communication intercellulaire influence aussi d'autres aspects de l'homéostasie des cellules du sac embryonnaire. Le mutant *fiona/syco-1* toujours chez *A. thaliana* affecte l'intégrité des mitochondries de la cellule centrale. Ceci résulte en la perturbation de la fusion des noyaux polaire sans affecter l'expression des marqueurs cellulaires. Cependant, un deuxième effet est observé chez les cellules antipodales qui acquièrent une durée de vie allongée, bien que leur destin cellulaire ne semble pas affecté. La fusion des noyaux polaires apparaît donc avoir une importance dans le programme de mort cellulaire des cellules antipodales (Kagi et al., 2010).

Les communications cellule-cellule et les événements de signalisation à l'intérieur du sac embryonnaire sont donc d'une importance capitale pour assurer le bon développement de ce dernier et son passage à travers la mégagamétogenèse. Que ce soit la polarité du sac embryonnaire ou le déroulement des divisions mitotiques, le tout doit être soigneusement contrôlé via les communications inter et intracellulaires.

1.3.3.3 Implication d'hormones dans la communication sporophyte- sac embryonnaire

Les hormones jouent un rôle essentiel dans la coordination du développement dans l'ensemble de la plante tout au long de sa vie. Le développement du gamétophyte femelle n'y fait pas exception et certaines phytohormones sont connues pour influencer le développement du sac embryonnaire.

Connu entre autres pour être impliqué au niveau du développement du fruit, de la maturation et de la sénescence, l'éthylène semble aussi jouer un rôle dans le développement du gamétophyte femelle, entre autres chez le tabac. Les mutants d'interférence pour le gène de l'*ACC oxidase* impliqué dans la synthèse de l'hormone ou encore l'application d'inhibiteur de l'éthylène provoque un arrêt du développement du sac embryonnaire lors de la mégasporogénèse. L'application exogène d'éthylène chez les mutants de la voie de synthèse permet de renverser le phénotype et d'avoir une division méiotique fonctionnelle (De Martinis et Mariani, 1999). Le lien entre le développement de l'ovule et l'éthylène est moins clair chez la plante modèle *A. thaliana*. La mutation du gène *CTR1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*) étant essentiel à la signalisation de l'éthylène est plus faiblement transmise par le côté maternel, ce qui suppose un problème dans le développement du gamétophyte femelle (Drews et al., 1998).

L'auxine semble être importante dans l'établissement du destin cellulaire lors du développement du gamétophyte femelle. L'auxine forme un gradient à l'intérieur du sac embryonnaire, ayant une concentration plus élevée au pôle micropylaire et moins élevée au pôle chalazal. Une surexpression du gène *YUC1*, une enzyme clé de la biosynthèse de l'auxine, seulement au niveau du sac embryonnaire permet de bouleverser le gradient. Le destin cellulaire de diverses cellules du gamétophyte est en effet troublé, comme mentionné plus haut, prouvant l'action de l'hormone (Pagnussat et al., 2009).

La cytokinine est une autre hormone fortement impliquée dans le développement, particulièrement au niveau de la division cellulaire. Les divers éléments de sa voie de signalisation sont importants dans le développement du sac embryonnaire. Comme mentionnés plus tôt, les récepteurs de la cytokinine, présents au niveau des téguments,

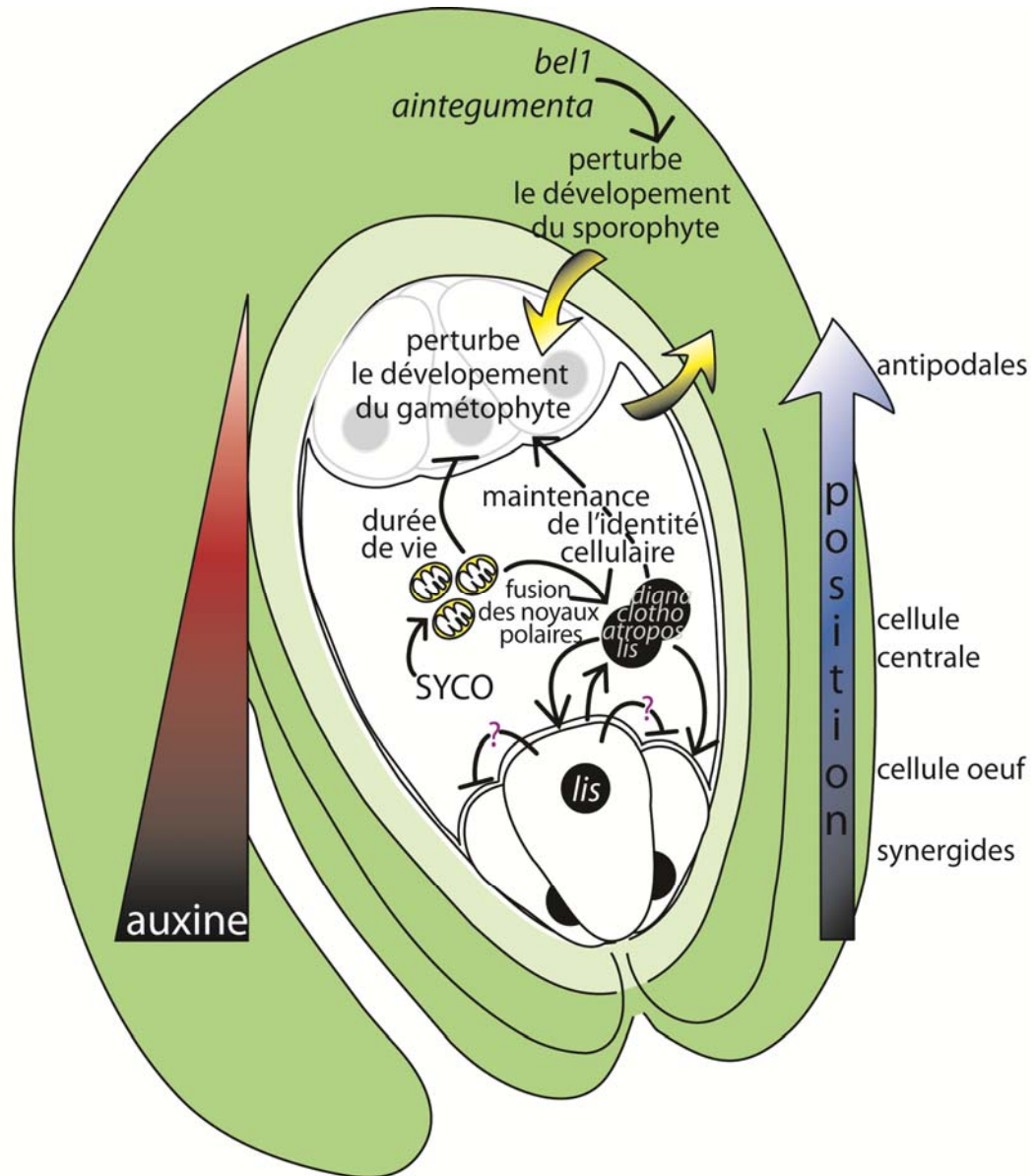


Figure 7 : Communications cellule-cellule impliquées dans le développement du sac embryonnaire et de l'établissement du destin cellulaire.

La caractérisation phénotypique de plusieurs mutants révèle une certaine communication cellule-cellule au sein du sac embryonnaire et que cette communication gamétophyte-sporophyte est réciproque (flèche jaune). Suite au positionnement des noyaux dans le sac embryonnaire, un gradient d'auxine contribue à la différenciation des cellules. En outre, une communication à double sens se produit entre les cellules gamétiques (la cellule œuf et la cellule centrale), tandis que la cellule d'œuf produit également un signal pour bloquer la différenciation en cellule œuf des cellules voisines. La cellule centrale communique aussi avec les antipodales et les synergides pour maintenir leur identité cellulaire. Un signal contrôlé par l'intégrité des mitochondries de la cellule centrale va de plus influencer la durée de vie des cellules antipodales. Adaptée de Chevalier et al. (2011).

sont nécessaires au développement du gamétophyte. Les triples mutants des récepteurs de l'hormone *cre1-12/ahk2-2tk/ahk3-3* démontrent un problème de développement du sac embryonnaire à l'anthèse (Kinoshita-Tsujimura et Kakimoto, 2011).

1.4 Tenants et aboutissants du projet de recherche

La formation du gamétophyte femelle chez les angiospermes est un processus complexe, mais particulièrement passionnant. Son développement est donc un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de mécanismes tel que les communications cellule-cellule, l'établissement de la polarité tissulaire, la différenciation cellulaire ou encore la division cellulaire.

Mais si les communications cellulaires sont manifestement présentes et essentielles entre le tissu maternel et le gamétophyte, les messagers spécifiquement impliqués restent encore à déterminer. C'est dans ce contexte que ScRALF3, retrouvé chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense*, semble se positionner. Les gènes de la famille des *Rapid alkalisation factors* codent pour des petits peptides sécrétés retrouvés de manière ubiquitaire ou spécifique dans la plante et sont de parfaits candidats pour permettre ces communications cellule-cellule. Précédemment, Germain et al. (2005) ont isolé cinq gènes de type RALF exprimés chez l'ovaire de *S. chacoense*. L'analyse du transcriptome de l'ovule a permis d'augmenter ce nombre à 14 gènes de type RALF. Maintenant, nous présentons un modèle où ScRALF3 est impliqué dans la polarisation du sac embryonnaire et à la progression de ce dernier à travers la mégagamétogenèse; assurant la formation d'un gamétophyte femelle mature fonctionnel. La présence du peptide étant majoritairement dans les téguments au niveau de l'ovule, ScRALF3 est sans aucun doute un prétendant idéal pour le rôle de molécule signal entre les différents tissus permettant le contrôle et la synchronisation du développement du gamétophyte femelle.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel végétal

2.1.1 *Solanum chacoense*

Toutes les analyses présentées dans ce mémoire sont réalisées à l'aide de plants de la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense* Bitt. ($2n=2x=24$) du génotype G4 (allèles d'auto-incompatibilité $S_{12}S_{14}$). Pour les événements de fécondation, des plants de génotypes V22 (allèles d'auto-incompatibilité $S_{11}S_{13}$) sont utilisés comme donneur de pollen. La taille des bourgeons est toujours mesurée de sa base, soit entre le bourgeon et le pédicelle, et la partie supérieure où la corolle est soudée. La taille des fruits est mesurée selon le diamètre le plus large, soit celui perpendiculaire au pédicelle.

Les plantes sont d'abord maintenues dans un environnement *in vitro* stérile sur des milieux $\frac{1}{2}$ MS au charbon (2,15g sels de Murashige & Skoog (MS), 1ml vitamines MS, 20g saccharose, 7g agar et 5g de charbon activé par litre; pH 5,7). L'environnement fermé permet un taux d'humidité d'environ 100% à l'intérieur des tubes de croissance. Les chambres de croissance sont maintenues à une température ambiante d'environ 22-24°C et soumis à un cycle d'éclairage de 16 h suivi de 8 h d'obscurité. Les plantes matures sont ensuite cultivées dans les serres du Jardin botanique de Montréal. Lorsque les plantules ont développé assez de racines, elles sont transférées des chambres de croissance *in vitro* à un module d'acclimatation situé dans les serres pour trois semaines. Le taux d'humidité est d'abord conservé à un niveau élevé correspondant à la situation *in vitro* et est diminué graduellement vers un niveau normal. La température ambiante est d'environ 22-26 °C (bien qu'elle puisse être plus élevée selon la saison). L'éclairage (14-16 h/jour) est composé de lumière naturelle additionnée d'un éclairage artificiel. Les lignées sont ensuite maintenues par bouturage.

2.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Les analyses effectuées avec des plants d'*Arabidopsis thaliana* ont pour base l'écotype Columbia. Les graines sont d'abord stérilisées à l'aide d'une solution d'éthanol 70% et de

0,05% Tween 20 dans laquelle une petite quantité de graines agite environ cinq minutes. Trois lavages de cinq minutes à l'éthanol 95-100 % sont ensuite faits. Après quoi les graines sèchent complètement sous une hotte stérile à flux laminaire.

Les graines stériles sont de manière générale disposées sur un milieu ½ MS sans charbon similaire à ce qui est décrit ci-haut (sauf indication contraire). Une stratification des graines est effectuée en plaçant les pétris à 4°C et à la noirceur, pendant deux à cinq jours. Les graines sont par la suite transférées en chambre de croissance *in vitro* selon les conditions décrites plus haut. Si des plants matures sont nécessaires, les plantules d'une ou deux semaines sont transférées en terre et conservées dans des chambres de croissance de type Conviron selon des conditions environnementales traditionnelles (température ambiante de 22°-26°C et durée de luminosité de 16 heures).

2.2 Obtention de plantes transgéniques chez *Solanum chacoense*

Les plantes transgéniques ont été obtenues par agroinfiltration de disques foliaires et régénération de cals comme décrit par Horsch et al. (1985).

2.2.1 Clonage des différentes constructions d'intérêt

La technologie GATEWAY® a été utilisée pour obtenir les constructions désirées avec le vecteur d'entrée pDONRtm/Zeo (Invitrogen). Les vecteurs de destination varient selon la construction désirée.

Pour le projet des plantes d'interférence, la séquence codante de *ScRALF3* fut insérée de manière antisens::sens dans le vecteur d'expression *pK7GWIWG2(I)* (Karimi et al., 2002) à l'aide des amorces 5'-GGGGACAAGTTTGTAC AAAAAAGCAGGCTATGTGGCACAAATCAAGTACTAC-3' et 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACGGCAACGAGTGATAGCA-3'.

Pour le projet des plantes de surexpression, la séquence codante ainsi que les régions 5'UTR et 3'UTR ont été insérés dans le vecteur d'expression pGWB2 (Nakagawa et al., 2007) sous le contrôle du promoteur constitutif du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV35S) à l'aide des amorces suivante : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT ACCATTTTTTTTTGCATACAACCT-3' et 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCACAAGTAAAAATCACTT-3'.

Pour les analyses de localisation du lieu d'expression du gène *ScRALF3* à l'aide d'un gène rapporteur, ici la β -glucuronidase (*uidA*), 1160 nt du promoteur de *ScRALF3* (voir section 2.6.3) ont été inséré devant le gène de la dans le vecteur d'expression pMDC162 (Curtis et Grossniklaus, 2003) à l'aide des amorces suivante : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTGCATGAACCATTCGGAGGTA-3' et 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGGTTGTATGCAAAAAA AAATGGTG-3'.

2.2.2 Transformation bactérienne par *Agrobacterium tumefaciens*

D'abord, la souche bactérienne *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 a été transformée par électroporation (Cell Porator, Life Technologies) avec les différentes constructions d'intérêts. Les bactéries sont ensuite recueillies dans un milieu YEP (1% extrait de levure, 1% peptone, 0,5% NaCl) et sont agitées une heure à 30°C. Les bactéries transformées sont ensuite sélectionnées sur un milieu solide YEP (10g tryptone, 5g d'extrait de levure, 5g NaCl et 15g agar par litre) contenant l'antibiotique pour la sélection du plasmide et de la streptomycine pour la sélection de la bactérie. Une pré-culture de 5 ml estensemencée et incubée entre trois et quatre jours à 28-30 °C. Une culture exponentielle peut ensuite être obtenue pour infecter les disques foliaires.

2.2.3 Transformation de disques foliaires et régénération de cals

Des morceaux de tissus foliaires découpés de manière stérile sont en premier lieu déposés sur un milieu d'induction solide (milieu A : 4,3 g sels Murashige & Skoog (MS), 1ml vitamines MS, 30g saccharose, 9 mg 6-benzylaminopurine (BA), 1 mg acide naphthalène acétique (NAA), 100 μ M acétosyringone et 7g agar par litre; pH 5,8) et conservés 24 h à l'obscurité à température ambiante. Les disques foliaires sont ensuite incubés environ une heure avec légère agitation dans une suspension d'*A. tumefaciens* préalablement transformée maintenue dans du milieu d'induction A liquide dépourvu d'acétosyringone. Les disques foliaires sont alors transférés sur un nouveau milieu d'induction A pour une durée de deux jours. Les contrôles négatifs ne doivent en aucun cas être mis en contact avec les bactéries.

Les disques foliaires sont ensuite transférés sur un deuxième milieu d'induction solide (milieu B : 4,3 g sels Murashige & Skoog (MS), 1ml vitamines MS, 30g saccharose, 9 mg 6-benzylaminopurine (BA), 1 mg acide naphthalène acétique (NAA) et 7 g agar par litre; pH 5,8) auquel 500 mg de céfotaxime (Claforan) et l'antibiotique spécifique au vecteur d'expression sont ajoutés.

Lorsque les disques foliaires montrent des signes de génération de cals, ces disques sont transférés sur un milieu de régénération (4,3 g sels Murashige & Skoog (MS), 1ml vitamines MS, 30g saccharose, 5 mg 6-benzylaminopurine (BA) et 7g agar par litre; pH 5,8; auquel on ajoute 200 mg de céfotaxime, 5mg de gibbérelline GA₃ et l'antibiotique spécifique au vecteur d'expression). Les plantules sont subséquemment transférées sur un milieu ½MS sans charbon auquel on ajoute 250mg/L de céfotaxime et 250mg/L de carbénicilline et maintenues comme décrit précédemment. Une trentaine de plantules sont ensuite présélectionnées par analyse PCR selon l'amplification du gène de résistance du vecteur d'expression et mises en serres. Une analyse de type Northern ou RT-PCR est ensuite effectuée pour confirmer la présence du transgène d'intérêt chez chaque lignée.

2.3 Obtention de plantes transgéniques chez *Arabidopsis thaliana*

Les plantes transgéniques chez *Arabidopsis thaliana* ont été obtenues selon la méthode dite du « floral dipping » telle que décrite par Zhang et al. (2006). Le clonage des constructions d'intérêt et la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* (LBA-4404) ont été effectués de la même manière que décrite précédemment.

Les lignées d'insertion (T-DNA) proviennent de la banque de mutants créée par le SALK Institute (Alonso et al., 2003). La position de l'insertion a été confirmée par séquençage utilisant le système BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystem) sur la plateforme de séquençage automatique Applied biosystems 3730 à la Plateforme Génomique (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal, QC, Canada). Les promoteurs -1000nt et les 5'UTR ont été utilisés dans chaque cas pour les constructions avec la β -glucuronidase (GUS) et la même technique ainsi que le même vecteur ont été utilisés que pour la construction de promScRALF3:: β -glucuronidase.

2.4 Analyses des patrons d'expression

2.4.1 Analyse de type Northern

L'ARN total de 50-100 mg de tissus broyé à l'azote liquide fut isolé selon la méthode d'Invitrogen^{MC} utilisant le TRIzol[®] Reagent (Invitrogen).

Dix microgrammes d'ARN furent chargés sur gel d'agarose/formaldéhyde (1,5% agarose, tampon MOPS/EDTA 1X, 5,92% formaldéhyde). La migration est effectuée dans un tampon d'électrophorèse-MOPS/EDTA qui est changé au cours de la migration. Une fois la migration terminée, le gel est lavé 3x2 minutes avec de l'eau distillée. Deux lavages de 15 minutes sont effectués dans une solution de 50mM NaOH et 10mM NaCl suivis de deux autres lavages de 15 minutes dans une solution de Tris-HCl 100mM pH 7,5. Un dernier lavage de 30 minutes est réalisé dans du SSC 20X (3M NaCl et 300mM citrate de sodium; pH 7,0). Les ARN sont transférés par capillarité sur membrane de nylon Hybond[®] N+ (GE Healthcare, Amersham). Un lavage de quelques minutes de la membrane obtenue est fait dans une solution de SSC 6X. L'ARN est ensuite fixé de manière covalente à l'aide de rayons UV (120 mJ/cm²) avec un Ultraviolet Crosslinker (Hoefer UVC 500).

Une sonde radioactive est produite selon le kit *High Prime DNA labeling* (ROCHE[®]) et du dATP [α -P³²] (PERKIN ELMER[®]).

La préhybridation de la membrane est effectuée dans une solution d'hybridation (un tampon 50% formamide deionisé, 5X solution Denhardt, 0.5% SDS, 200 µg/ml ADN de sperme de saumon et 6X SSC) à 45°C pendant au moins une heure. La membrane est ensuite hybridée avec la sonde radioactive durant 16-18 heures dans une nouvelle solution d'hybridation. Une série de lavages est ensuite faite : un premier lavage de 30 minutes à température pièce avec une solution 2X SSC et 0,1% SDS; un deuxième lavage de 30 minutes à 45°C dans une solution 1X SSC et 0,1% SDS et un dernier lavage de dix minutes à 55°C dans une solution de 0,1X SSC et 0,1% SDS. La membrane est ensuite scellée et exposée à un écran au phosphore photosensible à l'émission radioactive pour être lue à l'aide de l'appareil *PhosphorImager Typhoon 9200* (GE Healthcare).

2.4.2 Analyse de type RT-PCR

Les analyses semi-quantitatives par RT-PCR ont été effectuées sur 600ng d'ARN de tissus provenant d'ovaires quatre jours après pollinisation. Les instructions pour la *M-MLV envers transcriptase* (Invitrogen, [invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) ont été suivies. Quarante-deux cycles de PCR ont été effectués pour amplifier *ScRALF3* (amorces : 5'-TTTGATACAACCTATGGAGTC-3' et 5'-CCATTTCCATCTAACTGCATC-3') et l'ubiquitine comme contrôle (amorces : 5'-GCTGGCAAGCAGTTGGAAGAT-3' et 5'-TGGATGTTGTAGTCCGCCAGA-3') avec l'enzyme HOTSTART Taq (Biosphop Canada inc.).

2.4.3 Analyse *in situ*

Les hybridations *in situ* ont été effectuées selon ce qui a déjà été décrit par Lantin et al. (1999).

Des bourgeons floraux complets de différentes tailles du génotype G4 de *S. chacoense* ont été préalablement fixés dans une solution de FAA (60% éthanol, 5% acide acétique glacial et 1,85 % formaldéhyde) deux jours à 4°C. Les bourgeons sont ensuite déshydratés dans une série croissante de solutions d'alcool butylique (70%, 1 heure; 85%, 1 heure; 95% + 1% eosinY, 2 heures; 100%, 2 heures et *tert*butanol pur, 16 heures). Les bourgeons sont alors enrobés dans la paraffine de manière graduelle. Les blocs de paraffine sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Des coupes de 8-10 µm des différents échantillons ont été effectuées et montées sur des lames commerciales Histobond® (VWR VistaVision). Les tissus sont ensuite déparaffinés 2x15 minutes dans un bain de xylène, réhydratés par une série décroissante de bains à l'éthanol/eau distillé de cinq minutes (100%, 95%, 70%, 50% et terminé avec deux bains d'eau distillée pure) et traités comme décrit précédemment (Lantin et al., 1999).

Des sondes ARN sens et antisens ont été synthétisées à partir de l'ADNc complet de *ScRALF3* (Germain et al., 2005) avec de l'UTP marqué à la digoxigénine avec le kit MAXIscript T7/T3 (Invitrogen).

Les tissus sont finalement hybridés avec la sonde sens ou la sonde antisens. Pour optimiser la quantité de sondes nécessaires, 25ng, 50ng et 100ng de sondes ont été utilisés. Une concentration de 50ng par lame à hybrider fut considérée comme adéquate. L'hybridation fut réalisée telle que décrite par Lantin et al. (1999). Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-digoxigénine (anti-DIG) dans une chambre humide à 4°C pendant 16 heures. La réaction de coloration avec le substrat le NBT/BCIP (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) a été faite pendant une période de 8 heures, à température ambiante et à l'obscurité. Les lames ont été montées au Permount® (Fisher Scientific) et incubées 16 heures à 37°C.

2.4.4 Analyses colorimétriques de la β -glucuronidase (GUS)

Les analyses colorimétriques par la β -glucuronidase ont été effectuées selon le protocole publié dans le manuel *Arabidopsis – A Laboratory Manual* (Weigel et Glazebrook, 2002).

Les tissus sont récoltés et mis dans de l'acétone 90% à 4°C jusqu'à ce que tous les échantillons soient récoltés. Une incubation de 20 minutes à température pièce est ensuite réalisée. Un lavage est exécuté avec un tampon de coloration (0,5 M tampon sodium phosphate pH 7,2, 10% Triton X-100, 500mM potassium ferrocyanide et 500mM potassium ferricianide) pour enlever toute trace d'acétone. Puis les échantillons sont infiltrés sous vide durant 20 minutes dans une nouvelle solution de tampon de coloration à laquelle 2mM de X-Gluc a été ajouté. Une incubation d'un temps variable (entre une et 16 heures) est ensuite effectuée à 37°C. Les bourgeons complets de *S. chacoense* ont été incubés environ 16 heures alors que les colorations effectuées chez les plants d'*A. thaliana* étaient plutôt de deux à trois heures. Une série de lavage de 30 minutes à l'éthanol (20%, 35% et 50%) et à température pièce est pratiquée par la suite. Une fixation des tissus est alors pratiquée à l'aide d'une incubation de plus de 30 minutes dans une solution de FAA (50% éthanol, 10% acide acétique glacial et 5% formaldéhyde). Le FAA est retiré après quoi les échantillons sont entreposés dans une solution d'éthanol de 70% ou plus jusqu'à leur observation au microscope.

Les bourgeons floraux de *S. chacoense* ont été disséqués après l'étape de coloration pour éviter un effet de la blessure sur l'expression et la coloration. Les observations ont été faites dans une solution de 70% à 100% éthanol pour éviter l'assèchement des tissus.

Pour l'observation des ovules, la coloration a d'abord été réalisée sur les bourgeons complets puis l'ovaire déparicarpé a été isolé. Les ovules ont été éclaircis comme décrit ci-dessous (*observation des sacs embryonnaires*) et laissés au plus une journée dans le salicylate de méthyle à 4°C avant leur observation pour éviter la perte de la coloration.

2.4.5 Expression en présence d'hormones

Les traitements avec hormones ont consisté à appliquer 2µl de la solution appropriée sur le dessus de l'ovaire à l'anthèse (adapté de de Jong et al., 2009; Vriezen et al., 2008). Vingt fleurs ont été sélectionnées pour chaque traitement. Les ovaires ont ensuite été isolés de six heures à trois jours après le traitement initial et l'extraction de l'ARN fut effectuée selon la méthode d'Invitrogen^{MC} utilisant le TRIzol® Reagent (Invitrogen). Quelques fruits ont été gardés pour vérifier la production de fruits parténocarpiques.

2.4.6 Inhibiteur du transport de l'auxine

Les plantules d'*A. thaliana* transformées avec la construction *promAtRALF34::β-glucuronidase* ont germé sur milieu ½ MS (2,15g sels Murashige & Skoog, 10g saccharose et 8g agar par litre; pH 5,7) auxquels ont été ajoutés 5µM de l'acide naphthylphthalamique (NPA), préalablement dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) sous forme de 10x stock. Les pétris contrôles contiennent un même volume de DMSO seulement. Une analyse colorimétrique de la β-glucuronidase fut ensuite effectuée sur les plantules d'une semaine.

2.5 Observations microscopiques

2.5.1 Observation des sacs embryonnaires

Pour permettre l'observation des sacs embryonnaires, les ovules doivent être préalablement éclaircis au salicylate de méthyle et ensuite observés au microscope en contraste interférentiel différentiel (DIC). Les ovaires sont d'abord extraits des bourgeons

manuellement à l'aide de pince de précision et pour ce faire, le péricarpe est en premier lieu entaillé pour permettre son retrait. L'ovaire ainsi libéré du péricarpe est extrait et fixé dans une solution de FAA (1% formaldéhyde, 0,5 % acide acétique glacial et 50% éthanol) pour la durée de la nuit (de 16 à 18 heures, à 4°C de préférence). Les ovaires dépéricarpés sont ensuite incubés dans une solution d'éthanol 95-100% pour une heure et transférés dans des solutions croissantes de salicylate de méthyle et d'éthanol toutes les 30 minutes (1 :3, 1 :1, 3 :1). Les ovules sont finalement transférés dans une solution 100% salicylate de méthyle jusqu'à leur observation.

L'observation microscopique en contraste interférentiel différentiel (DIC ou de Nomarski) des ovules éclaircis a été faite à l'aide d'un microscope Axio Imager M1 de Zeiss et les photographies ont été prises avec une caméra AxioCam HRc de Zeiss sous forme d'empilement de sections optiques (ou z-stack), où plusieurs images ont été prises à différent plan focal pour chaque ovule. Pour faciliter la lisibilité et la compréhension des images obtenues, celles-ci ont été regroupées manuellement en un seul plan à l'aide d'un logiciel de traitement d'image standard (Adobe® Photoshop®, versions CS3 ou CS4). Aucune modification de l'image n'a été effectuée autre que l'ajustement des niveaux et des contrastes. Toujours par souci de lisibilité de l'image, les noyaux ont été colorés artificiellement par traitement d'image. Les différentes couleurs correspondent à différent plan focal lorsqu'il y a lieu.

2.5.2 Analyse des phénotypes chez les plantes mutantes

Les sacs embryonnaires ont été analysés pour vérifier la polarité de ceux-ci et la synchronisation des divisions nucléaires.

Pour vérifier la polarité, les 100 premiers sacs embryonnaires arrêtés à la mitose II (stade quatre noyaux) des plantes d'interférence ont été comptabilisés. Des bourgeons de cinq à six millimètres du génotype G4 ont été sélectionnés comme contrôle et seul les sacs embryonnaires à un stade de quatre noyaux ont été considérés. Pour vérifier la synchronicité, un processus similaire a été suivi. Le nombre de noyaux et leur position dans les 50 premiers sacs embryonnaires arrêtés à un stade entre cinq et huit noyaux

(correspondant à la mitose III) ont été comptabilisés. Les sacs embryonnaires des bourgeons de six millimètres du type sauvage (G4) ont été observés et les 50 premiers étant au stade de la mitose III ont été comptabilisés.

2.5.3 Viabilité du pollen

La viabilité des grains de pollen à l'anthèse a été observée suite à leur coloration au carmin acétique (acide acétique glacial 45%, carmin acétique 1%).

2.6 Analyses de séquences des gènes de la famille des RALFs

Les séquences utilisées dans ce mémoire sont toutes disponibles sur la banque de données GenBank® par NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) excepté celles provenant de l'analyse du transcriptome de *S. chacoense* (séquences en nucléotides et en acides aminés disponibles en annexe). De plus, les séquences provenant du séquençage du génome complet d'un clone homozygote double-monoploïde de *Solanum tuberosum* du groupe Phureja (clone DM1-3 516R44 (DM)) sont disponibles par la base de données Sol Genomic Network (solgenomics.net/)(PGSC, 2011). Les noms relatifs aux séquences de celui-ci proviennent du dataset : *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 516R44 (CIP801092) Genome Annotation v3.4 (based on v3 superscaffolds); fichier PGSC_DM_v3.4_cds.

2.6.1 Transcriptome de l'ovaire de *Solanum chacoense*

Les ARNm d'ovules deux jours avant anthèse, d'ovule à l'anthèse, de tube pollinique *in vitro* et d'ovule provenant du mutant sans sac embryonnaire *frk1* ont été extraits et envoyé au centre TCAG (The Center for Applied Genomics) à Toronto. Par pyroséquençage selon la technique à haut débit dite 454, ces derniers ont été séquencés et assemblés de façon à obtenir le transcriptome de chaque tissu séparément ou ensemble. Une base de données regroupant les assemblages de chaque tissu a ensuite été créée.

Afin de vérifier la présence de peptides de type *Rapid alkalinisation factor* dans ces tissus, la séquence codante des gènes déjà isolés chez *S. chacoense* ont été soumis à une analyse BLASTN (nucléotides contre nucléotides) sur cette base de données via le logiciel

Geneious® selon les options de bases (matrice Blosum62). La totalité des résultats a été comptabilisée et soumise à une nouvelle analyse BLASTN sur la base de données GenBank® par NCBI pour vérifier la nature des gènes isolés. Les isotigs possédant le domaine connu RALF et ceux dont les séquences les plus similaires étaient des gènes de type RALF ont été retenues.

2.6.2 Comparaison avec le génome de *Solanum tuberosum*

Une analyse BLASTN en ligne directement sur le site du groupe Sol Genomic Network a été effectuée dans l'espoir de mettre en évidence les gènes de type RALF présent dans le génome de la pomme de terre. Les séquences codantes des gènes de type RALF connus chez *S. chacoense* et *A. thaliana* ont été soumis à la base de données comprenant les régions codantes seulement et à la base de données regroupées en *superscaffold*. Les résultats ont été comparés et les gènes distincts comprenant le domaine reconnu RALF ont été isolés et comptabilisés.

La matrice de similarité et d'identité entre les séquences retrouvées dans le génome de *S. tuberosum* et celles du transcriptome de *S. chacoense* a été faite à partir d'un alignement selon un *cost-matrix* Blosum62. Cet alignement a été vérifié manuellement pour s'assurer du bon alignement des motifs et régions spécifiques aux RALFs. La matrice de similarité elle-même a été faite à partir du logiciel MacVector®. Les couleurs ont été ajoutées par la suite dans Excel® (Microsoft Office 2010).

2.6.3 Isolement du promoteur de *ScRALF3* par *Genome Walking*

Le promoteur de *ScRALF3* a été isolé selon le protocole du *GenomeWalker™ kit* (Clontech). L'ADN génomique a préalablement été extrait grâce au *Plant DNA extraction Kit* (Qiagen). Les enzymes de restriction *DraI* et *EcoRV* (New England Biolabs inc.) ont été utilisées pour créer des bibliothèques génomiques différentes. Les amorces utilisées pour isoler le promoteur sont celles fournies avec le kit (Adaptor_Primer (AP1): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' et Nested_Adaptor_Primer (AP2): 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3') et celles spécifiques à la séquence connue de *ScRALF3* (GSP1_ScRALF3: 5'-GCCATTGGCAACTCAAATCTTCACTCA-3' et GSP2_ScRALF3 5'-CACAAATTGCATTGTTGGTGATGGTGAA-3').

Les PCR ont été réalisées avec l'ADN polymérase Phusion (New England Biolabs inc.). Le second produit PCR a été purifié sur gel grâce au kit MinElute (Qiagen) et cloné avec le kit TOPO TA cloning kit pCR4-TOPO (Invitrogen). Le fragment inséré ensuite été séquencé avec les amorces T3/T7 utilisant le système BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystem) sur la plateforme de séquençage automatique Applied biosystems 3730 à la Plateforme Génomique (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal, QC, Canada).

2.6.4 Analyse de la séquence promotrice du gène *ScRALF3*

L'analyse de la séquence promotrice isolée de *ScRALF3* a été faite avec la base de données de PLACE (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) regroupant les motifs de régulation en *cis* retrouvés chez les promoteurs des végétaux (Higo et al., 1999). Chaque résultat fut vérifié et les motifs pertinents ont été comptabilisés.

Le résumé de la figure 12 a été fait à l'aide du logiciel Geneious® puis modifié pour permettre une meilleure lisibilité au moyen d'un logiciel de traitement graphique (Adobe® Illustrator®, versions S3 et CS4).

2.6.5 Comparaison de la séquence promotrice

La séquence promotrice des homologues de *ScRALF3* chez *S. tuberosum* et *S. lycopersicum* sont disponible sur la base de données Sol Genomic Network. Les séquences relatives à la section codante de *ScRALF3* ont d'abord été cherchées sur les bases de données regroupées en *superscaffold*. Environ 1250 nucléotides avant la séquence codante ont été sélectionnés pour faire des comparaisons. Suite aux premières analyses, ce nombre a été diminué à 800nt puisque c'était amplement suffisant.

Les graphiques de ressemblance (dotplot) entre les séquences promotrice ont été faits par Geneious® basés sur l'outil dotmatcher développé par EMBOSS. Les graphiques ont été modifiés pour permettre une meilleure visibilité au moyen d'un logiciel de traitement graphique (Adobe® Illustrator®, version CS3 et CS4) sans modifier les éléments de l'analyse.

3. Section résultats

3.1 Des gènes de la famille des RALFs sont exprimés au niveau de l'ovule chez *Solanum chacoense*

Outre les cinq gènes initialement isolés de la banque d'EST de gènes faiblement exprimés dans l'ovaire après fécondation chez la pomme de terre sauvage *S. chacoense* (Germain et al., 2005), l'analyse du transcriptome de l'ovaire et du tube pollinique permet de déterminer la présence d'autres membres de la famille des RALFs chez *S. chacoense*. Les ARN messager de tissus provenant d'ovaires déparicarpés pris à l'anthèse et deux jours avant l'anthèse ainsi que de tubes polliniques ont été isolés et séquencés selon la méthode de pyroséquençage 454. Cette analyse a permis d'ajouter sept nouveaux membres comprenant un domaine RALF reconnu et deux autres gènes très près en séquence à la famille des RALFs connus.

L'analyse phylogénétique de ces nouveaux membres permet de les associer aux peptides déjà étudiés et à ceux retrouvés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Un arbre de distances Jukes-Cantor basé sur la séquence complète des peptides en acides aminés selon le modèle de Neighbor-Joining permet de regrouper les peptides de type RALF dans les mêmes sous-groupes précédemment détaillés (figure 8). La majorité des isotig identifiés dans le transcriptome sont concentrés dans le dernier groupe (sous-groupes e à h). La séquence en acide aminé des peptides de ce groupe présente certaines caractéristiques spécifiques dont la présence a été vérifiée chez les nouveaux peptides identifiés : un prodomaine comprenant une région d'acides aminés acides, un site dibasique correspondant à un site reconnu par les subtilases avant le peptide mature (-RRxL-), quatre cystéines formant des ponts disulfures ainsi que les motifs -YlXY- et -GASY- au début du peptide mature et entre les deux premières cystéines, respectivement. Les peptides ayant le domaine RALF identifiés dans le transcriptome possèdent en grande partie toutes ces caractéristiques. La caractéristique la plus variable est le motif -YlXY- mais cette variation représente bien ce qui est retrouvé chez *A. thaliana* bien que le dernier groupe présente une plus grande conservation de ce motif

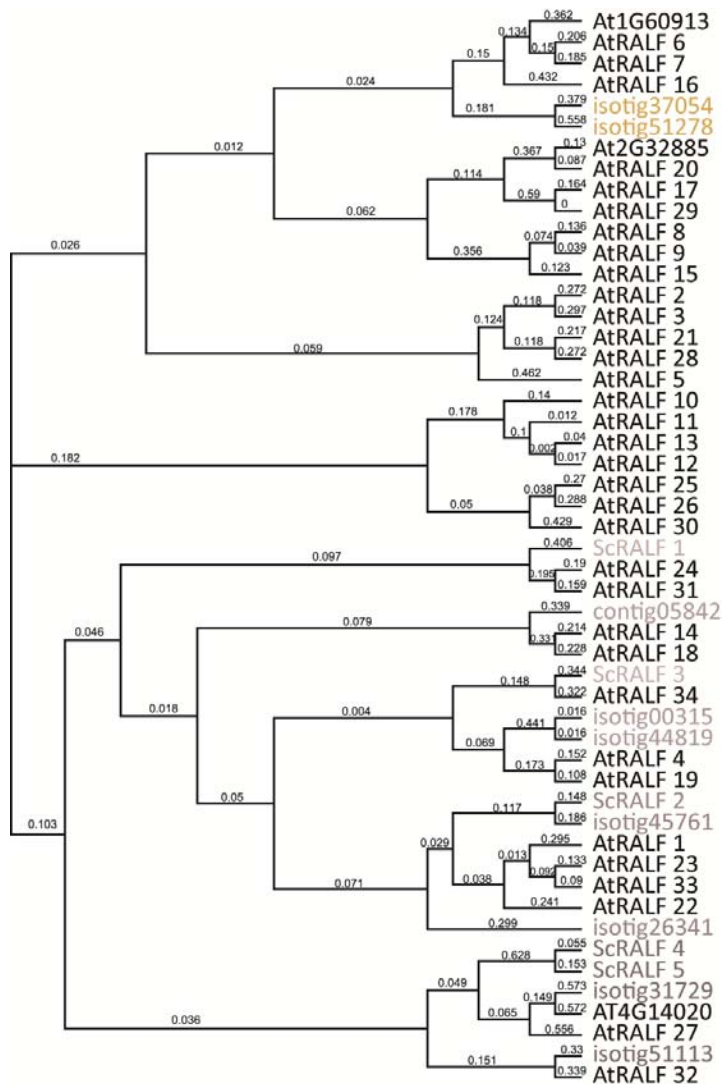


Figure 8 : Arbre de distance de la famille des peptides de type RALF présents chez *Solanum chacoense* et *Arabidopsis thaliana*.

Arbre de distance Jukes-Cantor basé sur la séquence en acide aminé des peptides de type RALF retrouvé chez *S. chacoense* et *A. thaliana* selon le modèle de Neighbor-Joining. Le nombre de substitutions par site est indiqué sur les branches.

en compte et ils sont considérés comme un seul gène, bien qu'analysé séparément. Toutefois, l'isotig45761 est quant à lui plus proche de ScRALF2 (62,1 % de similitude) que des peptides formant le sous-groupe *g* (AtRALF1, AtRALF22, AtRALF23 et AtRALF33) avec lequel ils sont rassemblés (figure 8).

(figure 1). Malgré la possibilité de relier chaque nouveau peptide retrouvé chez *S. chacoense* à ceux de la famille d'*A. thaliana*, la similitude entre les possibles homologues est plutôt faible de manière générale (table I). Des duplications géniques semblent avoir eu lieu et certains isotigs sont plus apparentés à d'autres membres présents chez *S. chacoense* que d'homologues probables chez la plante modèle (figure 8). C'est entre autres le cas pour les isotigs 00315 et 44819 possédant 96,1 % de similitude entre eux alors que ce chiffre baisse à 48,4 % et 56,0 % respectivement avec les plus proches peptides retrouvés chez *A. thaliana* (AtRALF4 et AtRALF19).

En raison de leur très grande similitude, la possibilité que ces deux isotigs soient des allèles d'un même gène est prise

en compte et ils sont considérés comme un seul gène, bien qu'analysé séparément.

Toutefois, l'isotig45761 est quant à lui plus proche de ScRALF2 (62,1 % de similitude) que des peptides formant le sous-groupe *g* (AtRALF1, AtRALF22, AtRALF23 et AtRALF33) avec lequel ils sont rassemblés (figure 8).

En outre, six des huit nouveaux peptides identifiés possèdent un prodomaine similaire à celui retrouvé chez les RALFs des sous-groupes *e* à *h*. Seuls l'isotig37054 et l'isotig51278 ne possèdent aucun domaine entre le signal peptide et le peptide mature et sont réunis avec les peptides du sous-groupe *a* bien qu'ils soient génétiquement plus éloignés (Tableau I).

Tableau I Caractéristiques de peptides de type *Rapid alkalisation factor* chez *S. chacoense*

# isotig	Motifs caractéristiques					Similitude de séquence		
	Propeptide		Peptide mature		Homologie de séquences <i>A. thaliana</i>	Pourcentage de similitude (%)		
		Site de clivage	s-s	YIXY		Prepropeptide complet	Peptide mature	
ScRALF1 (isotig41985)	<i>e</i>	55 a.a	RRVL	2	YISY	AtRALF24/31	50,6 (50,6/50,6)	70,0 (66,7/61,4)
ScRALF2 (isotig44034)	<i>g</i>	42 a.a	RRIL	2	YISY	AtRALF1/ 22/23/33	51,9 (52,2/52,3 /52,6/52,3)	82,7 (79,6/81,6 /82,7/83,7)
ScRALF3	<i>e</i>	48 a.a	GRSL	2	YISY	AtRALF34	47,7	80,0
ScRALF4 (isotig47682)	<i>h</i>	40 a.a	TRVL	2	KLSY	AT4G14020/ AtRALF27	25,3 (25,3/25,2)	24,2 (30,8/7,4)
ScRALF5	<i>h</i>	40 a.a	TRIL	2	KLNY	AT4G14020/ AtRALF27	25,3 (25,3/25,2)	24,5 (26,9/9,3)
Contig05842	<i>f</i>	47 a.a	RRVL	2	YVSY	AtRALF14/ AtRALF18	37,5 (37,6/25,2)	43,0 (43,0/43,0)
isotig00315	<i>f</i>	60 a.a	RRAL	2	HISY	AtRALF4/ AtRALF19	48,4 (35,4/52,7)	64,7 (62,6/62,6)
isotig26341	<i>g</i>	62 a.a	RRML	2	YISY	AtRALF1/ 22/23/33	48,9 (48,9/49,0 /48,9/49,0)	79,4 (80,0/74,0 /80,0/80,0)
isotig37054	<i>a</i>	-	-	2	EISY	AtRALF6/7/16 AT1G60913	38,9 (32,6/27,2 /32,6/32,8)	31,4 (31,6/31,6 /30,2/32,1)
isotig44819	<i>f</i>	59 a.a	RRAL	2	HISY	AtRALF4/ AtRALF19	56,0 (52,7/52,7)	64,7 (62,6/62,6)
isotig45761	<i>g</i>	43 a.a	RRIL	2	YISY	AtRALF1/ 22/23/33	50,5 (50,5/50,6 /50,5/50,6)	80,4 (81,2/81,2 /74,0/81,2)
isotig51113	<i>h</i>	28 a.a	RFLA	2	YISP	AtRALF32	45,4	61,8
isotig31729	<i>h</i>	23 a.a	-	2	YLSF	AT4G14020/ AtRALF27	17,8 (18,8/26,4)	24,9 (25,0/25,8)
isotig51278	<i>a</i>	-	-	1	YIKF	AtRALF6/7/16 AT1G60913	33,4 (32,5/32,5 /32,5/32,6)	31,1 (31,1/31,1 /29,7/31,5)

Tout comme les peptides du sous-groupe *h*, les isotigs51113 et 31729 ne possèdent pas le motif -GASY- retrouvé chez les autres sous-groupes du dernier groupe (figure 1). Une deuxième caractéristique de ce sous-groupe était la faible conservation du motif -YIXY- et particulièrement l'isoleucine en deuxième position. Les deux isotigs chez *S. chacoense* ne font pas exception. La tyrosine en quatrième position qui est généralement bien conservée est substituée par une proline chez l'isotig51113 alors que le motif entier est modifié chez l'isotig31729. Une troisième particularité au niveau du site possiblement reconnu pour clivage est observée chez les deux isotigs : l'isotig51113 présente une seule arginine, tel qu'observé chez ScRALF3, ScRALF4 et ScRALF5 (Germain et al., 2005), alors que l'isotig31729 ne possède aucun site relatif aux subtilases.

3.2 Le peptide ScRALF3 est impliqué dans les événements post-fécondation

3.2.1 Les mutants d'interférence pour *ScRALF3* démontrent une taille et un nombre de graines significativement réduit.

Nous nous sommes attardés plus attentivement au cas de *ScRALF3*, préalablement isolé chez l'ovaire et le fruit en développement chez *S. chacoense* dû à son patron d'expression intéressant variant en fonction du temps. Le gène semble plus spécifiquement exprimé au niveau des ovules et du péricarpe, malgré une légère expression dans les autres tissus de la plante, suggérant un rôle dans la reproduction (Germain et al., 2005).

Dans l'optique de déterminer la fonction de ce peptide d'intérêt dans le développement de la plante, des mutants d'interférence (RNAi) ont été produits (Chevalier, 2012; Chevalier et al., 2012). Une construction antisens::sens de la région codante de notre gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur viral constitutif 35S permet ainsi d'induire la dégradation de l'ARN messager de *ScRALF3* et de cette façon diminuer la quantité de peptide traduit au niveau des tissus. Douze plantes indépendantes montrant une réduction de l'expression de *ScRALF3* dans la T1 ont été sélectionnées par RT-PCR. Compte tenu de l'expression élevée de *ScRALF3* lors du

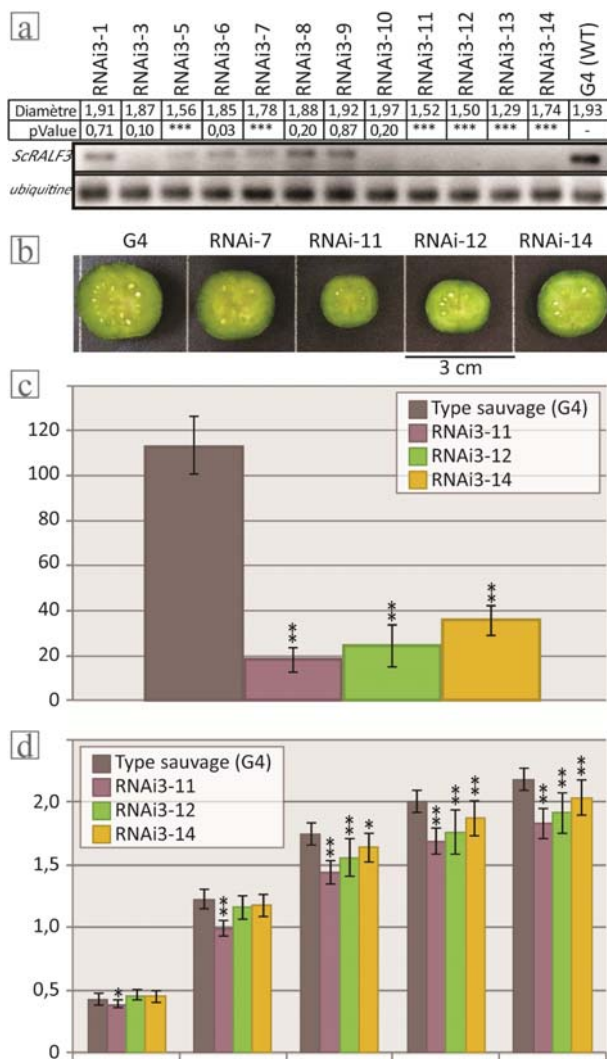


Figure 9: La perturbation de l'expression de *ScRALF3* chez les mutants d'interférence cause un phénotype de petits fruits et une réduction du nombre de graines.

(a) Diamètre moyen (cm) des fruits matures (24 jours) chez 12 mutants d'interférence (RNAi) et quantité d'ARNm de *ScRALF3* chez les mutants vérifiée par RT-PCR. (b) Coupe transversale du fruit mature (30 jours) (c) Time-course de la taille du fruit suivant la pollinisation. n=25-10 fruits (d) Nombre moyen de graines par fruits chez des fruits de 25 jours (n=15). *: $p_{\text{value}} < 0,05$; **: $p_{\text{value}} < 0,0001$; les barres indiquent l'écart-type.

développement du fruit (Germain et al., 2005), la taille du fruit fut choisie comme deuxième caractère de sélection (figure 9 a-b). L'expression des autres membres de la famille des *RALFs* n'est pas affectée par la présence du transgène (Figure supplémentaire 1).

Le diamètre de 26 fruits récoltés chez les plantes d'interférence *ScRALF3* fut mesuré tout au long de leurs croissances et comparé au type sauvage (G4). Des analyses statistiques t-Student ($H1 : x \neq x_{G4}$) permettent de déterminer que les fruits mutants sont significativement plus petits dès 5 jours pour la lignée la plus affectée et après 15 jours pour toutes les plantes testées. Après 25 jours, le fruit est considéré comme mature. À ce stade, le diamètre moyen d'un fruit de type sauvage est de 2,18 cm. Les fruits des plantes d'interférence pour *ScRALF3* ont un diamètre moyen de 1,83 cm (RNAi3-11), 1,91 cm (RNAi3-12) et 2,03 cm (RNAi3-14) (figure 9 c). Comme attendu, le nombre de graines retrouvées chez les fruits des plantes mutantes corrèle avec la taille

observée à maturité (25 jours). Chez les trois lignées indépendantes, la réduction du nombre de graines est extrêmement significative. D'une moyenne de 113 graines par fruit chez le type sauvage, le nombre de graines diminue jusqu'à 18 graines par fruits chez les plantes d'interférences (figure 9 d).

3.2.2 L'expression de *ScRALF3* est associée aux évènements post-fécondation sous le contrôle de l'auxine

Dans l'espoir de déterminer si l'expression de *ScRALF3* est liée à la croissance du fruit lui-même ou plutôt aux évènements post-fécondation, l'expression du peptide chez des fruits parthénocarpiques fut comparée à celle retrouvée chez les fruits suivant la pollinisation. Les phytohormones gibbérellines et auxines sont reconnues pour induire la formation de fruits sans fécondation chez plusieurs espèces dont la tomate (de Jong et al., 2009; Vriezen et al., 2008). C'est effectivement ce qui se produit après l'application de 1 mM GA₃ et de 1 mM NAA sur l'ovaire des fleurs de *S. chacoense*. Nous avons confirmé

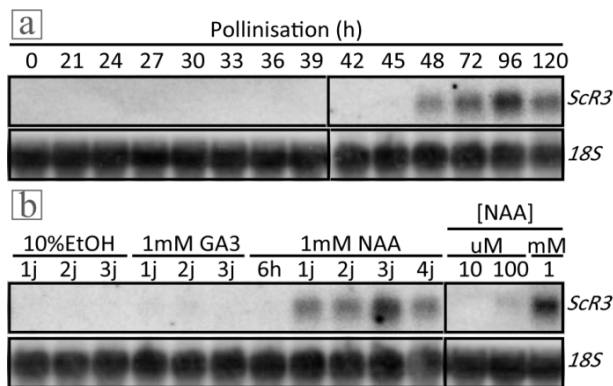


Figure 10: L'expression de *ScRALF3* est induite par l'auxine lors de l'initiation du fruit

(a) Variation de l'expression de *ScRALF3* dans le temps suite à la pollinisation. Le début de l'expression suit la fécondation (36-42 h). (b) Variation de l'expression du peptide selon l'application d'auxine et de gibbérelline. Comme témoin de chargement des ARNm, une sonde s'hybridant à l'ARN ribosomal 18S est utilisée. EtOH, témoin à l'éthanol; GA₃, Gibberellin A₃; NAA, acide naphthalène acétique; h, heure(s) ou j, jour(s) après traitement ou pollinisation.

que la pollinisation induit bel et bien l'expression de *ScRALF3* après deux jours, ce qui correspond environ au moment de la fécondation qui se produit entre 36 heures et 42 heures après la pollinisation (Lantin et al., 1999). Malgré la formation d'un fruit suite au traitement avec 1 mM GA₃, l'expression de *ScRALF3* reste nulle (figure 10 b). Ceci confirme que l'expression du peptide n'est pas liée à la formation du fruit, mais est bel et bien rattachée aux évènements suivant la fécondation. Toutefois, l'application de 1mM d'auxine (NAA) permet aussi d'induire l'expression de

ScRALF3 un jour après l'application, indiquant que l'expression du gène est sous le contrôle de l'hormone puisque l'expression est plus rapide que lorsqu'induit par la fécondation (figure 10 b).

3.2.3 Le promoteur du gène *ScRALF3* contient plusieurs sites de régulation reliés à diverses hormones et au développement

Avec le but résolu de mieux comprendre la régulation de l'expression de *ScRALF3*, deux fragments du promoteur ont pu être isolés selon la méthode du *Genome Waking*. Cette technique de «marche sur le chromosome» permet d'isoler un fragment d'ADN génomique précédant une séquence connue à l'aide d'adaptateurs liant les fragments de l'ADN génomique suite à la digestion de celui-ci à l'aide d'enzymes de restriction. L'amplification de fragments d'ADN au moyen d'amorces spécifiques à la séquence d'intérêt connue et spécifiques aux adaptateurs permet le séquençage de la portion en amont de notre séquence connue. Cette technique est idéale pour isoler le promoteur de gènes d'abord extrait d'une banque de cDNA. Dans le cas présent, deux enzymes ont permis d'isoler des fragments : *Dra1* et *EcoRV*. Le fragment isolé avec l'enzyme *Dra1* (298 pb) est totalement compris dans celui isolé avec l'enzyme *EcoRV* (1216 pb). Puisque ces fragments comprennent la portion 5'UTR de notre gène d'intérêt, la région promotrice isolée comporte environ 1,2 kb (1196 pb). Il est possible d'établir la présence de deux différents allèles possédant 89,7 % d'identité. La majorité des différences entre les deux allèles consiste en la modification d'une base ici et là, mais la dissemblance principale est l'absence de certaines sections de 18 à 38 bases dans le deuxième allèle. Ces sections se situent dans une région comportant plusieurs répétitions de séquence (-897 pb à -735 pb) et dans le 5' UTR. Lorsque comparé à lui-même, le promoteur de *ScRALF3* montre une région fortement répétée entre -733 pb à -909 pb (figure 11 a).

La comparaison de la séquence promotrice retrouvée chez *S. chacoense* à celles retrouvées chez les homologues en séquence chez la pomme de terre (*S. tuberosum*) et la tomate (*S. lycopersicum*) permet de déterminer que les portions proximale et distale du promoteur sont plutôt bien conservées (figure 11 b-d). Cependant, on retrouve chez *S. chacoense* une insertion d'environ 710 pb au centre du promoteur (figure 11 b-c).

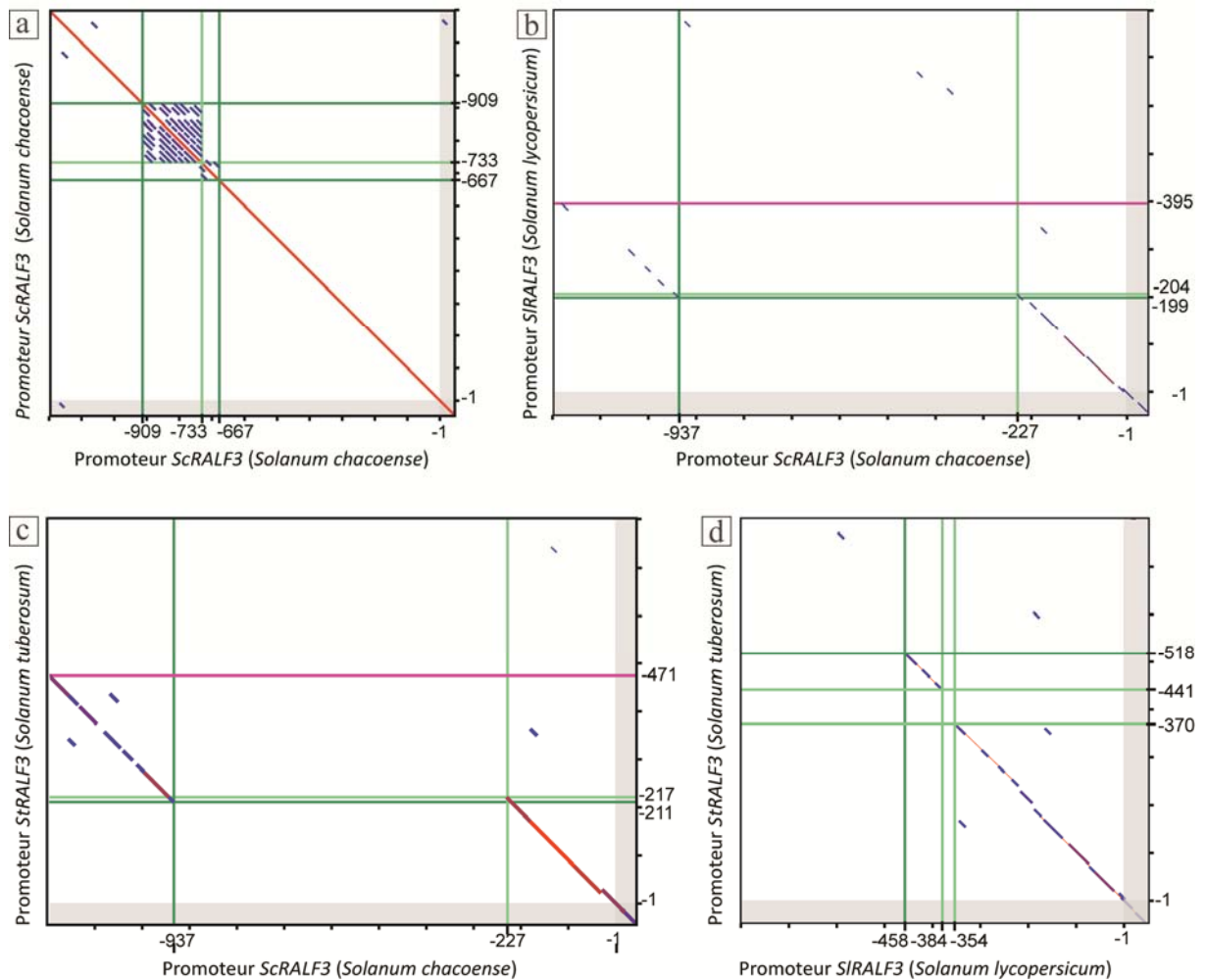


Figure 11 : Graphiques de ressemblance (dotplot) de la séquence promotrice des homologues de *ScRALF3* chez la pomme de terre et la tomate.

(a) Graphique de ressemblance contre lui-même de la séquence promotrice isolée de *ScRALF3*. (b) Graphique de ressemblance des 800 nucléotides en amont de *SIRALF3* et le promoteur isolé chez *S. chacoense*. (c) Graphique de ressemblance des 800 nucléotides en amont de *StRALF3* et le promoteur isolé chez *S. chacoense*. (d) Graphique de ressemblance des séquences promotrice des homologues de *ScRALF3* chez *S. tuberosum* et *S. lycopersicum*. Zone grise, 5'UTR; graphique effectué sur Geneious (<http://www.geneious.com/>)

Cette séquence se trouve associée à des éléments transposables dans le reste du génome de la pomme de terre et de la tomate, mais les éléments codant du transposon ne sont pas présents, signifiant le retrait du transposon par recombinaison intra-élément. Ce type de recombinaison plutôt fréquente laisse généralement comme trace une séquence terminale longue répétée (LTRs) (Kejnovsky et al., 2012), correspondant à la région fortement répétée qu'on retrouve dans le promoteur de *ScRALF3* (-679 pb à -912 pb). Une région non répétée associée au LTR est de même est présente en 3' de l'insertion.

En plus de permettre l'identification d'une région relative à des évènements de recombinaison, le séquençage du génome de la pomme de terre et de la tomate permet d'établir la longueur probable du promoteur des homologues chez les trois espèces. La portion commune entre *S. tuberosum* et *S. lycopersicum* se poursuit jusqu'à -518 pb du 5' UTR pour le premier et à -458 pb pour le deuxième (figure 11 d). Ceci permet d'émettre l'hypothèse que le promoteur de *ScRALF3* est complet ou quasi complet en comparant celui-ci aux promoteurs des deux autres Solanacées. Ainsi, les 1196 pb analysés sont raisonnablement représentatifs du promoteur complet du gène à l'étude.

L'analyse de la séquence promotrice de *ScRALF3* permet d'ailleurs l'identification de plusieurs sites de régulation en *cis* de l'expression du gène (Higo et al., 1999). Ces motifs peuvent être regroupés dans quatre catégories générales : régulation de l'expression par des hormones, motifs de liaison de facteurs de transcription, régulation de l'expression selon l'environnement/stress et régulation de l'expression de manière tissu-spécifique. L'insertion relative au transposon a été analysée malgré son absence chez les homologues puisqu'elle peut certainement influencer l'activité de nombreux régulateurs de l'expression de *ScRALF3*. Un résumé des motifs retrouvés est présenté à la figure 12 et dans les tables II à V.

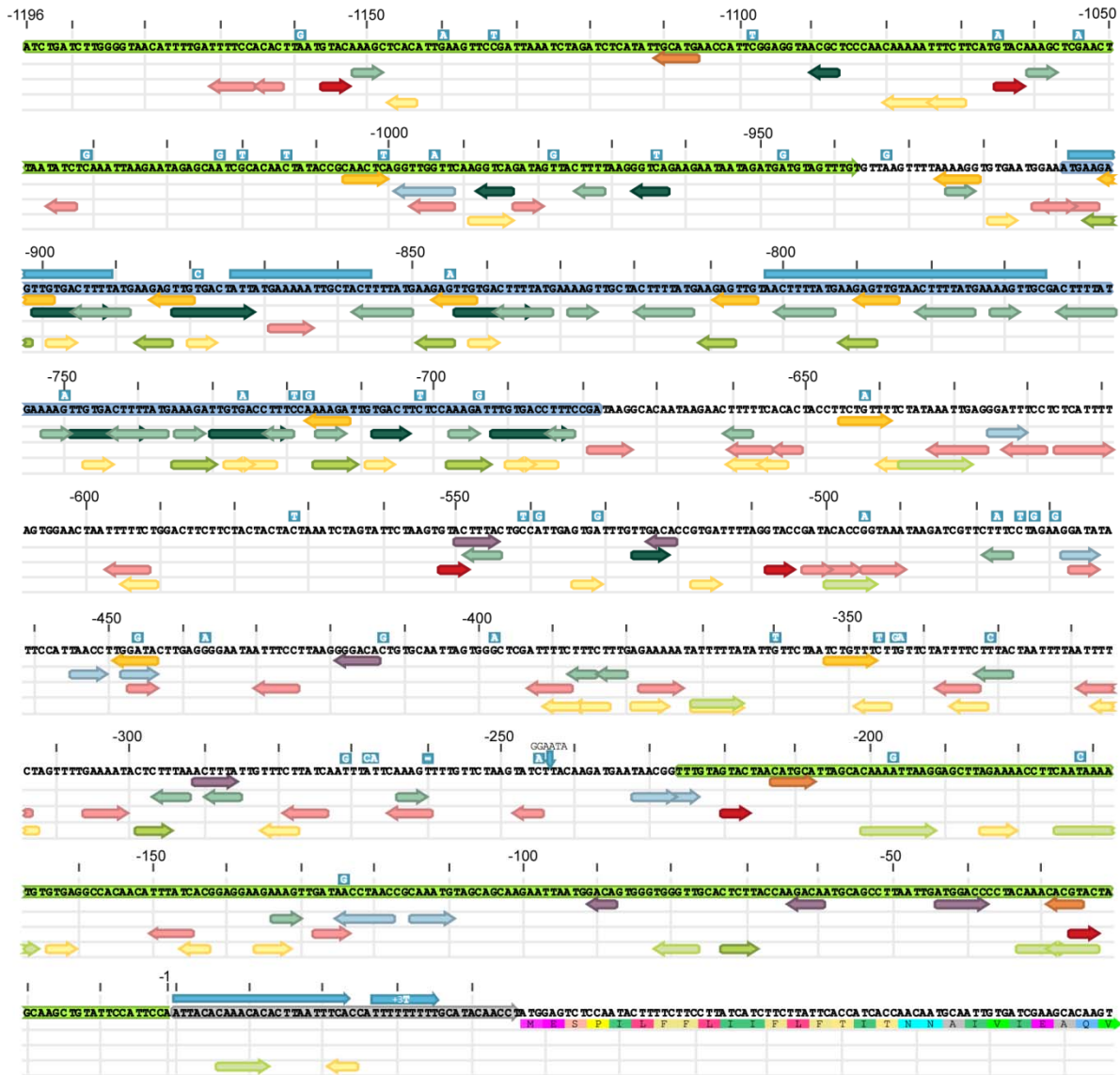


Figure 12 : Analyses de motifs retrouvés dans la séquence promotrice de *ScRALF3*.

Sélection des motifs pertinents retrouvés dans la séquence promotrice de *ScRALF3* selon la base de données PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>, (Higo et al., 1999)). Liste détaillée des motifs et de leurs positions dans les tableaux II à V. Les variations entre les allèles isolés, les régions spécifiques aux promoteurs des trois solanacées, la région de répétition liée au transposon et la région 5'UTR sont représentées sur la séquence promotrice de *ScRALF3*.

3.2.3.1 Le promoteur de *ScRALF3* contient des sites partiels de régulation directe à l'auxine, à la gibbérelline et à l'acide abscissique

De manière générale, les gènes sous le contrôle d'hormones possèdent des sites *cis*-régulateurs caractéristiques des réponses pour ces hormones dans leur promoteur.

Puisque *ScRALF3* répond à l'auxine *in vivo*, le promoteur de *ScRALF3* a donc été analysé pour trouver plus spécifiquement des éléments de régulation connus de l'auxine tels que les éléments TGA (-AACGAC-), les AuxRR-core (-GGTCCAT-) et les AuxRE Auxin Response Element, -TGTCTC-) (Xing et al., 2011). Un seul élément AuxRR-core complet est retrouvé dans le promoteur (-44 pb à -38 pb). Cependant, des éléments partiels (3x-TGTC- and 1X-TGTCCC-) sont aussi retrouvés. Les quatre motifs sont situés dans une portion proximale au début du gène (-523 pb à +1) et trois de ces motifs sont situés dans la première portion du promoteur spécifique au gène.

Ensuite, malgré le fait que l'expression de *ScRALF3* n'est pas induite par la gibbérelline (GA_3) *in vivo*, plusieurs sites reconnus pour être reliés à la réponse à la gibbérelline sont présents dans le promoteur du peptide. Le motif CARE (-CAACTC-) est retrouvé à huit reprises dans la région du promoteur pouvant être relié aux éléments transposables (-1006 pb à -346 pb). Un deuxième motif relié à la réponse aux gibbérellines, la boîte pyrimidine, est retrouvé à deux reprises dans la même région. Cependant, aucun site GARE (-TAACAR-) n'est retrouvé dans le promoteur de *ScRALF3* et sa présence dans le promoteur semble essentielle à l'expression du gène en réponse à l'hormone (Sutoh et Yamauchi, 2003). Un seul motif CARE est retrouvé dans la deuxième région du promoteur spécifique au gène.

Une autre hormone reliée au développement est l'acide abscissique (ABA) et quelques motifs de régulation en *cis* reconnus pour jouer un rôle dans sa réponse sont présents dans les régions spécifiques au promoteur. Un motif ABRE (G-box) (-ACGTG-) reconnu par des facteurs de transcription de type *leucine zipper* est retrouvé près du 5'UTR et un site de liaison du facteur de transcription de type bZip, ABI5, impliqué dans le développement de l'embryon est quant à lui situé dans la région reliée à l'élément transposable. Deux

éléments RY, souvent impliqués spécifiquement au niveau du développement de la graine (Guerriero et al., 2009), sont aussi retrouvés dans la région promotrice de *ScRALF3*. Ces derniers sont retrouvés dans seulement 3% des promoteurs chez *A. thaliana* et 7% des promoteurs du riz (Berendzen et al., 2012) et lient des facteurs de transcription de type B3 tels qu'ABI3 et ABI5 impliqués dans la réponse à l'ABA (Suzuki et al., 1997). Leur présence est de plus accentuée dans les promoteurs de gènes de réponse à l'auxine; la possibilité qu'ils permettent une régulation de l'expression génique en présence de l'hormone par la liaison de facteurs de transcription ARF (aussi de la famille de type B3) ou de facteur de type bZIP n'est donc pas à exclure (Berendzen et al., 2012).

Tableau II Motifs reliés à la réponse à diverses hormones présents dans le promoteur connu de *ScRALF3*.

	Motifs	Séquence	Intervalle	Direction
Éléments de réponse à l'auxine ←	AuxRE partiel	TGTC	-524 -521	brin antisens
	AuxRE partiel	TGTCCC	-419 -414	brin antisens
	AuxRE partiel	TGTC	-91 -88	brin antisens
	AuxRE partiel	TGTCT	-64 -60	brin antisens
	AuxRR	ATGGACC	-44 -38	brin sens
	Ste de liaison DOF (NtBBF1)	ACTTTA	-550 -545	brin sens
	Ste de liaison DOF (NtBBF1)	ACTTTA	-291 -286	brin sens
Inductible à la gibbérelline ←	CARE	CAACTC	-1006 -1001	brin sens
	Pyrimidine box	CCTTTT	-926 -921	brin antisens
	CARE	CAACTC	-904 -899	brin antisens
	CARE	CAACTC	-885 -880	brin antisens
	CARE	CAACTC	-847 -842	brin antisens
	CARE	CAACTC	-809 -804	brin antisens
	CARE	CAACTC	-790 -785	brin antisens
	Pyrimidine box	TCTTTT	-717 -712	brin antisens
	CARE	TCTGTTT	-645 -639	brin sens
	CARE	TCTGTTT	-353 -347	brin sens
Réponse à l'acide abscissique ←	Élément RY	CATGCA	-1111 -1106	brin antisens
	Élément RY	CATGCA	-213 -208	brin sens
	ABRE	ACGTG	-29 -25	brin antisens
	Site de liaison d'ABI5	ACACCGG	-500 -494	brin sens




3.2.3.2 Le promoteur de *ScRALF3* contient des sites de liaisons à certains facteurs de transcription

Des motifs reconnus pour permettre la liaison de certaines familles de facteurs de transcription sont aussi présents dans le promoteur du peptide. Ces facteurs de transcription en question sont d'autre part aussi connus pour être impliqués dans la réponse à certaines hormones.

Des motifs connus pour permettre la liaison à des facteurs de transcription de type MYB sont retrouvés dans la séquence promotrice de *ScRALF3*. Ces facteurs sont impliqués dans plusieurs processus de base de la cellule, du destin cellulaire, du développement et de la réponse aux stress via la présence d'hormone, dont l'ABA et l'auxine (Abe et al., 1997; Dubos et al., 2010; Shin et al., 2007). Huit éléments de réponse aux facteurs de type MYB MRE2 (-GGWTW-) sont présents chez le promoteur, certains reliés à des facteurs de transcription précis, d'autres non. Deux d'entre eux sont superposés à un des deux éléments MRE1 ou p-box (-AMCWAMC-) aussi retrouvés. Ces motifs semblent faire partie d'éléments bipartites ou tripartites impliqués dans la réponse à l'auxine. Leur présence est enrichie dans les promoteurs de plusieurs gènes de réponse à l'hormone (Berendzen et al., 2012). Un motif de type E-box (-CANNTG-) généralement relié aux facteurs MYB est aussi présent.

Par la suite, dix éléments W-box contenant le motif de base -TGAC- sont retrouvés dans la portion distale du promoteur (-1196 pb à -521 pb). Ces éléments sont reconnus pour permettre la liaison à l'ADN des facteurs de transcription de type WRKY (Rushton et al., 2010; Ulker et Somssich, 2004). Toutefois, seulement deux d'entre eux sont situés dans la portion spécifique au promoteur. Mais, l'alignement des bases proximales permet de faire ressortir un motif permettant probablement une plus grande spécificité entre le facteur de transcription et la séquence promotrice (figure 12, figure 13 b). La séquence -TTGTGACYWTT- semble plus présente au niveau de la région liée au transposon alors que la séquence -TCTGACCYT- semble plutôt caractériser les deux motifs spécifiques au promoteur. Les facteurs de transcription de type WRKY sont plus particulièrement connus pour être impliqués dans les réactions de défense, mais plusieurs d'entre eux semblent plutôt reliés au développement (Ulker et Somssich, 2004).

Tableau III : Motifs reliés à la régulation de l'expression par des facteurs de transcription présents dans le promoteur connu de *ScRALF3*.

	Motifs	Séquence	Intervalle	Direction
Facteur de transcription MYB/MYC 	P-box(MRE1)	AACCAACC	-999 -992	brin antisens
	Élément de réponse à Myb (MRE2)	GGATT	-625 -620	brin sens
	Motif minimal de MybSt1 (MRE2)	GGATA	-468 -464	brin sens
	Élément de réponse à Myb (MRE2)	TAACC	-455 -450	brin antisens
	Motif minimal de MybSt1/OsMYBS (MRE2)	TGGATA	-448 -444	brin sens
	Élément de réponse à Myb (rd22)(MRE2)	TAACGG	-232 -227	brin sens
	Élément de réponse à Myb (MRE2)	GGTTT	-228 -223	brin sens
	Site de liaison Myb26 (p-box)(MRE1)	GTTAGGTT	-125 -118	brin antisens
	E-box	CAAATG	-115 -110	brin sens
Facteur de transcription DOF 	Motif minimal DOF	AAAG	-1152 -1149	brin sens
	Motif minimal DOF	AAAG	-1061 -1058	brin sens
	Motif minimal DOF	AAAG	-975 -972	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-925 -922	brin sens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-896 -889	brin antisens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-858 -851	brin antisens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-839 -832	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-829 -826	brin sens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-820 -813	brin antisens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-801 -794	brin antisens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-782 -775	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-772 -769	brin sens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-763 -756	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-753 -750	brin sens
	Site de liaison DOF	ATAAAAGT	-744 -737	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-735 -732	brin sens
	Motif minimal DOF	AAAG	-723 -720	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-716 -713	brin sens
	Motif minimal DOF	AAAG	-698 -695	brin sens
	Motif minimal DOF	AAAG	-685 -682	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-661 -658	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-479 -476	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-388 -385	brin antisens
	Motif minimal DOF	AAAG	-384 -381	brin antisens
	trans-acting StDof1	TAAAG	-333 -329	brin antisens
	trans-acting StDof1	TAAAG	-297 -293	brin antisens
Motif minimal DOF	AAAG	-264 -261	brin sens	
Motif minimal DOF	AAAG	-134 -131	brin sens	
Facteur de transcription WRKY 	W-box	TGACC	-988 -984	brin antisens
	W-box	TGACC	-967 -963	brin antisens
	W-box	TTGTGACTTTT	-901 -891	brin sens
	W-box	TTGTGACTATT	-882 -872	brin sens
	W-box	TTGTGACTTTT	-844 -834	brin sens
	W-box	TTGTGACTTTT	-749 -739	brin sens
	W-box	TTGTGACCTTT	-730 -720	brin sens
	W-box	TGACT	-708 -704	brin sens
	W-box	TTGTGACCTTT	-692 -682	brin sens
	W-box	TTGAC	-526 -522	brin sens

Plusieurs gènes de type WRKY sont d'ailleurs retrouvés dans le transcriptome de l'ovaire à l'anthèse de *S.chacoense* ou lors du développement de l'embryon. *ScWRKY1* entre autre est exprimé spécifiquement lors du stade tardif de torpille au cours du développement de l'embryon (Lagacé et Matton, 2004).

Un deuxième motif retrouvé à plusieurs reprises dans le promoteur de *ScRALF3* reconnu pour être un site de liaison pour des facteurs de transcription de type DOF (*DNA-binding with one finger*). En tout, 30 motifs -AAAG- sont présents dans toute la séquence connue du promoteur. Ces facteurs de transcription sont connus pour réguler la réponse à plusieurs facteurs environnementaux et à certaines hormones dont l'auxine et la gibbérelline (Shuichi, 2002). Encore une fois, une séquence consensus -ATAAAAGT- est retrouvée à huit reprises dans la région liée à l'élément transposable (plus

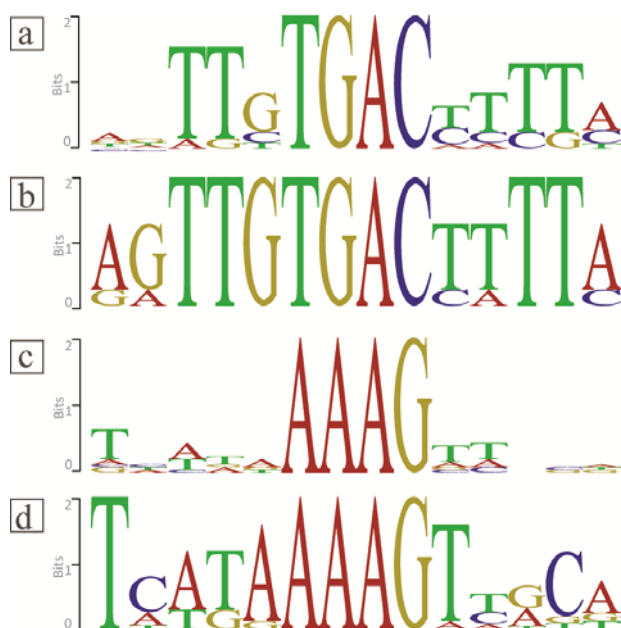


Figure 13 : Séquence-logo des sites de liaison possible des facteurs de transcription WRKY et DOF présents dans la séquence promotrice de *ScRALF3*.

Comparaison des nucléotides en amont et en aval des motifs de liaison reconnus par les facteurs de transcription WRKY (a) et DOF (c) dans toute la séquence isolée et spécifiquement à la région relative à l'élément transposable (b)(d).

particulièrement entre les bases -897 et -735) (figure 13 d), impliquant probablement une spécificité entre un membre particulier de la famille des DOF. De plus, le motif -ACTTTA-, reconnu pour être le site de liaison à l'ADN du facteur de transcription de type DOF NtBBF1 chez le tabac (*N. tabacum*), est retrouvé à deux reprises dans le promoteur de *ScRALF3*. Il a été démontré que NtBBF1 est impliqué dans la réponse lente à l'auxine (Baumann et al., 1999).

Les facteurs de transcription de type DOF sont reconnus pour interagir avec d'autres familles de facteurs de transcription pour contrôler l'expression génique (Shuichi, 2002).

Malgré l'attrait de poser l'hypothèse d'une interaction spécifique entre un facteur de transcription de la famille des DOF ainsi que WRKY et le promoteur de *ScRALF3*, la présence des sites étendus seulement dans la région relative au transposon semble plutôt relié cette spécificité à la région génomique de départ de l'élément transposable. Néanmoins, des sites sont aussi présents dans les régions plus ou moins conservées au promoteur chez les trois espèces de Solanacées analysées. Leur présence non négligeable dans la séquence promotrice reste donc plus qu'intéressante. Malheureusement, ces deux familles de facteurs de transcription étant impliquées dans une vaste variété de réponses ajoutée au manque d'information plus concrète, il est difficile d'établir un lien quelconque entre ces nombreux motifs et une réponse probable de l'expression de *ScRALF3*.



3.2.3.3 L'expression de ScRALF3 semble être régulée par le milieu

La régulation de l'expression de *ScRALF3* pourrait être affectée par son environnement en plus des réponses aux hormones puisque plusieurs motifs connus pour être impliqués dans la réponse aux stress du milieu sont présents dans le promoteur de *ScRALF3*.

Tout d'abord, six motifs CuRE (copper-response element, -GTAC-) sont retrouvés dans le promoteur de *ScRALF3* laissant croire à une implication du cuivre dans sa régulation (Quinn et al., 2000; Quinn et Merchant, 1995). Le cuivre est entre autres impliqué dans la régulation du développement du pollen, de l'apex racinaire et des trichomes (Sancenón et al., 2004). Quatre d'entre eux sont dans les sections communes aux autres *Solanum*.

Par la suite, plusieurs sites de régulation à la lumière sont aussi présents dans le promoteur. La majorité est située dans la partie reliée à l'élément transposable, mais certains motifs sont dans les sections spécifiques au promoteur. Le motif composé de la séquence -GATA- est retrouvé à trois reprises dans ces deux portions du promoteur et une boîte I (-GATAAG-) représentant des séquences conservées chez les gènes régulés par la lumière est présente dans la séquence promotrice (Martínez-Hernández et al., 2002). Deux autres motifs conservés chez les promoteurs des gènes régulés par la lumière se retrouvent dans le promoteur de *ScRALF3* : une boîte T (-ACTTTG-) ainsi que le motif

Tableau IV : Motifs reliés à la réponse au milieu présents dans le promoteur connu de *ScRALF3*.

	Motifs	Séquence	Intervalle	Direction
Élément de réponse au cuivre 	CuRE	GTAC	-1065 -1062	brin sens
	CuRE	GTAC	-1156 -1153	brin sens
	CuRE	GTAC	-552 -549	brin sens
	CuRE	GTAC	-508 -505	brin sens
	CuRE	GTAC	-220 -217	brin sens
	CuRE	GTAC	-26 -23	brin sens
Réponse à la lumière 	GATA	GATA	-1046 -1043	brin antisens
	Site consensus GT-1	GGAAAA	-1171 -1166	brin antisens
	REalpha	AACCAA	-997 -992	brin antisens
	GATA	GATA	-983 -980	brin sens
	Site consensus GT-1	GGAAAT	-913 -908	brin sens
	Inr (initiator)	TTCATTTT	-912 -905	brin antisens
	Site consensus GT-1	GAAAAA	-869 -864	brin sens
	Boîte-I	GATAAG	-679 -674	brin sens
	Site consensus GT-1	GAAAAA	-660 -655	brin antisens
	Inr (initiator)	CTCAATTT	-633 -626	brin antisens
	Site consensus GT-1	GGAAAT	-623 -618	brin antisens
	Inr (initiator)	CTCATTTT	-616 -609	brin sens
	Site consensus GT-1	GAAAAA	-597 -592	brin antisens
	GATA	GATA	-503 -500	brin sens
	Site consensus GT-1	GGTAAA	-495 -490	brin sens
	GATA	GATA	-467 -464	brin sens
	GATA	GATA	-447 -444	brin sens
	Site consensus GT-1	GGAAAT	-430 -425	brin antisens
	Site consensus GT-1	GAAAAT	-393 -388	brin antisens
	Site consensus GT-1	GAAAAA	-378 -373	brin sens
	Site consensus GT-1	GAAAAT	-338 -333	brin antisens
	Site consensus GT-1	GAAAAT	-319 -314	brin antisens
	Site consensus GT-1	GAAAAT	-306 -301	brin sens
	Boîte-I	GATAAG	-279 -274	brin antisens
	Boîte-T	ACTTTG	-265 -260	brin antisens
	GATA	GATA	-248 -245	brin antisens
Site consensus GT-1	GATAAA	-150 -145	brin antisens	
GATA	GATA	-148 -145	brin antisens	
GATA	GATA	-128 -125	brin sens	

REalpha (-AACCAA-) (Terzaghi et Cashmore, 1995). Ensuite, trois sites d'initiation riche en pyrimidine (Inr, -YTCANTYY-) sont aussi retrouvés dans la région reliée à l'élément transposable. Ces sites sont généralement essentiels à la transcription de gènes sans boîte TATA en présence de lumière (Nakamura et al., 2002). Finalement, le site consensus de liaison de GT-1 est aussi souvent relié à la régulation de l'expression par la lumière, bien que parfois impliqué dans d'autres processus (Kaplan-Levy et al., 2012). Quatorze sites GT-1 sont retrouvés dans le promoteur de *ScRALF3*, mais seulement deux de ceux-ci sont situés dans les régions spécifiques au promoteur.

3.2.3.4 Le promoteur de *ScRALF3* contient des sites de régulation tissu-spécifique

Finalement, d'autres types de motifs présents dans la séquence promotrice de *ScRALF3* sont plutôt reliés à la spécificité tissulaire de l'expression. Entre autres, des motifs conservés chez les promoteurs des gènes exprimés chez l'embryon et la graine en général. Le motif GARG (-C(A/T)8G-), spécifiquement reconnu par AGAMOUS-like 15 impliqué dans le développement de l'embryon chez *Arabidopsis* (Tang et Perry, 2003), est retrouvé à trois reprises dont deux fois dans la région proximale partagée avec la pomme de terre et la tomate. Trois autres sites de liaison de facteurs de transcription connus pour être reliés au développement de l'embryon sont aussi identifiés dans le promoteur de *ScRALF3*, comme mentionné précédemment. Un site de liaison pour le facteur de transcription ABI5 impliqué dans l'embryogenèse médiée par l'acide abscissique est identifié ainsi que deux motifs RY. De plus, deux motifs reconnus chez le soya pour être impliqués dans le développement de la graine se retrouvent également dans le promoteur de *ScRALF3* (SEF3 et SEF4, pour Soybean Embryo Factor). Finalement, deux éléments (CA)_n retrouvés chez les gènes de stockage de l'albumen sont retrouvés dans la portion proximale spécifique au promoteur.




Plusieurs motifs reconnus pour être liés à l'expression chez le pollen sont aussi retrouvés à plusieurs reprises dans le promoteur du peptide *ScRALF3*, autant dans les sections partagées avec les promoteurs des gènes homologues que dans la région insérée. Quatorze motifs -GTGA- et douze motifs POLLEN1LAT52 (-AGAA-) sont dispersés dans toute la séquence promotrice. Toutefois, il est à noter que le motif -AGAA- fait

généralement partie d'un motif bipartite dont la deuxième partie n'est pas retrouvée dans le promoteur de *ScRALF3* (Bate et Twell, 1998). De plus, trois motifs Q (quantitative)-élément connu pour moduler l'expression lorsqu'associé à d'autres motifs reliés à l'expression dans le pollen (Hamilton et al., 1998) sont aussi présents dans le promoteur.

Pour terminer, dix motifs retrouvés généralement chez les gènes exprimés dans les nodules sont de même repérés dans le promoteur de *ScRALF3*. Cependant, un seul est situé dans la région spécifique au promoteur.

La présence d'un motif ne garantit pas nécessairement une réelle régulation de l'expression de notre gène d'intérêt. Les motifs identifiés sont souvent plutôt petits et la probabilité de leur présence par hasard doit être prise en compte. Pourtant, plusieurs exemples de la nécessité de ces courts fragments dans la réponse à la régulation de l'expression de certains gènes nous permettent de croire à leur importance. S'il ne faut pas prendre l'unique présence de chaque motif comme une garantie de régulation, leur occurrence dans la séquence promotrice de *ScRALF3* permet de figurer un peu mieux, si ce n'est la fonction, du moins le contexte dans lequel le peptide joue un rôle et de diriger de futures recherches.

Tableau V : Motifs reliés aux spécificités tissulaires présents dans le promoteur de *ScRALF3*.

	Motifs	Séquence	Intervalle	Direction
Développement embryonnaire 	Motif CARG	CTATAAATTG	-637 -628	brin sens
	Site de liaison de SEF4	ATTTTTA	-371 -365	brin sens
	Motif CARG	CAAAATTAAG	-201 -192	brin sens
	Motif CARG	CAATAAAATG	-175 -166	brin sens
	Site de liaison de SEF3	AACCCA	-82 -77	brin antisens
Spécificité de l'expression à l'albumen	Amplificateur spécifique de la gaine	GTTTTTA	-1174 -1180	brin antisens
	Élément (CA) _n	CAAACAC	-33 -27	brin sens
	Élément (CA) _n	GTACGTG	-29 -23	brin antisens
Expression spécifique au pollen 	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-1074 -1070	brin antisens
	Q(quantitative)-element	AGGTCA	-989 -984	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-919 -916	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-899 -896	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-880 -877	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-842 -839	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-747 -744	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-728 -725	brin sens
	Q(quantitative)-element	AGGTCA	-727 -722	brin antisens
	Motif GTGA	GTGA	-709 -706	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-690 -687	brin sens
	Q(quantitative)-element	AGGTCA	-689 -684	brin antisens
	Motif GTGA	GTGA	-656 -653	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-640 -636	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-595 -591	brin antisens
	Motif GTGA	GTGA	-534 -531	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-518 -515	brin sens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-391 -387	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-387 -383	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-379 -375	brin sens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-349 -345	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-336 -332	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-317 -313	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-282 -278	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-185 -181	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-164 -161	brin sens
	Motif GTGA	GTGA	-146 -143	brin antisens
	POLLEN1LELAT52	AGAAA	-136 -132	brin sens
Expression spécifique aux nodules 	NODCON2GM	CTCTT	-906 -902	brin antisens
	NODCON2GM	CTCTT	-887 -883	brin antisens
	NODCON2GM	CTCTT	-849 -845	brin antisens
	NODCON2GM	CTCTT	-811 -807	brin antisens
	NODCON2GM	CTCTT	-792 -788	brin antisens
	NODCON1GM	AAAGAT	-735 -730	brin sens
	NODCON1GM	AAAGAT	-716 -711	brin sens
	NODCON1GM	AAAGAT	-698 -693	brin sens
	NODCON2GM	CTCTT	-299 -295	brin sens
	NODCON2GM	CTCTT	-73 -69	brin sens

3.3 *ScRALF3* est exprimé dans la fleur

L'analyse de l'expression de *ScRALF3* fut principalement faite à l'aide du gène rapporteur *β -glucuronidase* sous le contrôle du promoteur de *ScRALF3* (1160pb à partir du codon de départ ATG). Cette construction permet la formation d'un composé bleu au site d'expression du peptide suite à l'ajout du substrat de l'enzyme (le X-GLUC). Le promoteur étant pour ainsi dire complet lorsque comparé à *S. tuberosum* et *S. lycopersicum*, ajouté au fait que la coloration est tranchée et précise, la véracité de l'information sur l'expression du peptide fourni par la coloration semble convaincante.

La visualisation de l'expression sous le promoteur de *ScRALF3* suggère que le peptide est principalement exprimé au niveau du pistil et plus particulièrement au niveau de l'ovaire lors du développement de la fleur (figure 14), ce qui confirme de manière plus approfondie ce qui avait été établi préalablement par analyse de type Northern (Germain et al., 2005). La coloration des bourgeons complets montre que l'expression de *ScRALF3* varie en fonction du développement et est spécifique à certaines structures (figure 14 a). Tel que présumé, le peptide semble fortement exprimé dans l'ovaire des jeunes bourgeons tant au niveau des ovules que du placenta et diminue avec l'âge du bourgeon jusqu'à quasiment rien à l'anthèse (figure 14 a-h). À partir de cinq millimètres, l'ovaire présente une trop faible expression pour être véritablement détecté dans le bourgeon complet (figure 14 e-i). Outre l'ovaire, le style et le stigmate présentent une forte coloration lors de leur développement. Dans les jeunes bourgeons (<4-5 mm), l'expression de *ScRALF3* est restreinte à l'apex du stigmate (figure 14 j) pour ensuite être présente sur toute la surface du stigmate (figure 14 k). Lorsque le bourgeon mesure entre six et sept millimètres, la coloration diminue au niveau du stigmate et se retrouve plutôt dans le style tout juste sous le stigmate (figure 14 l). Cette expression disparaît à l'anthèse (figure 14 h).

3.3.1 *ScRALF3* est exprimé au niveau des tissus somatiques de la fleur

Le patron d'expression de *ScRALF3* au niveau de la corolle est très défini. Tout d'abord, la base du bourgeon montre une expression du peptide qui diminue avec l'âge, mais qui

ne disparaît jamais totalement (figure 15 a). Une deuxième ligne d'expression bien définie est observée au niveau des pétales à la délimitation des sépales (figure 15 b-e). Lors du développement du bourgeon, le ratio entre la taille totale du bourgeon et celle du calice diminue. Les pétales restent soudés ensemble à leur apex jusqu'à l'anthèse alors que les sépales, qui gardent la même taille, deviennent de plus en plus petits en comparaison au bourgeon qui grandit. L'endroit délimitant deux sépales va être caractérisé d'une coloration bleue sur la corolle suite au traitement pour la *β -glucuronidase*, peu importe l'âge du bourgeon. Cette expression est donc retrouvée à l'apex du bourgeon lorsque celui-ci est jeune et se rapproche de la base avec le temps (figure 15 c-d). En plus, *ScRALF3* est exprimé à l'apex même du pétale (figure 15 e-f). Cette expression disparaît au moment où la corolle n'est plus soudée, soit à l'anthèse. *ScRALF3* semble de plus sensible aux blessures. L'analyse colorimétrique de son expression sur des bourgeons floraux préalablement ouverts démontre un patron fortement induit par les stress mécaniques ou de blessures (figure 15 g, les flèches indiquant les endroits touchés par le scalpel). L'analyse *in situ* du transcrite réalisée au moyen d'une sonde ARN correspondant à l'antisens de notre gène marquée à l'aide de la digoxigenin-11-UTP (DIG) permet aussi de déterminer que *ScRALF3* est spécifique au contour des pétales. La fusion de l'*Alkaline Phosphatase* aux anticorps de la digoxigenin permet la formation d'un composé mauve en présence de son substrat, le NBT/BCIP. Seuls les côtés des pétales montrent la présence de *ScRALF3* en coupes transversales (figure 15 h-i).

D'autre part, tout au long du développement du bourgeon, une forte expression de *ScRALF3* est observée au niveau du réceptacle qui supporte l'ovaire (figure 14 a-i, figure 15 a et e). Des coupes longitudinales de bourgeons permettent de déterminer que cette expression est extrêmement localisée et bien définie (figure 16 a). Des coupes transversales quant à elles montrent que cette expression serait plus caractéristique au tissu vasculaire spécifique aux tissus reproducteurs, soit l'ovaire et les étamines (figure 16 a-d). Trois rangées de cinq regroupements de tissus vasculaires sont observées dans le pétiole et le réceptacle des bourgeons de *S. chacoense*. Le rang le plus externe est destiné au calice alors que le deuxième, qui est décalé par rapport aux deux autres rangés, est relié aux pétales.

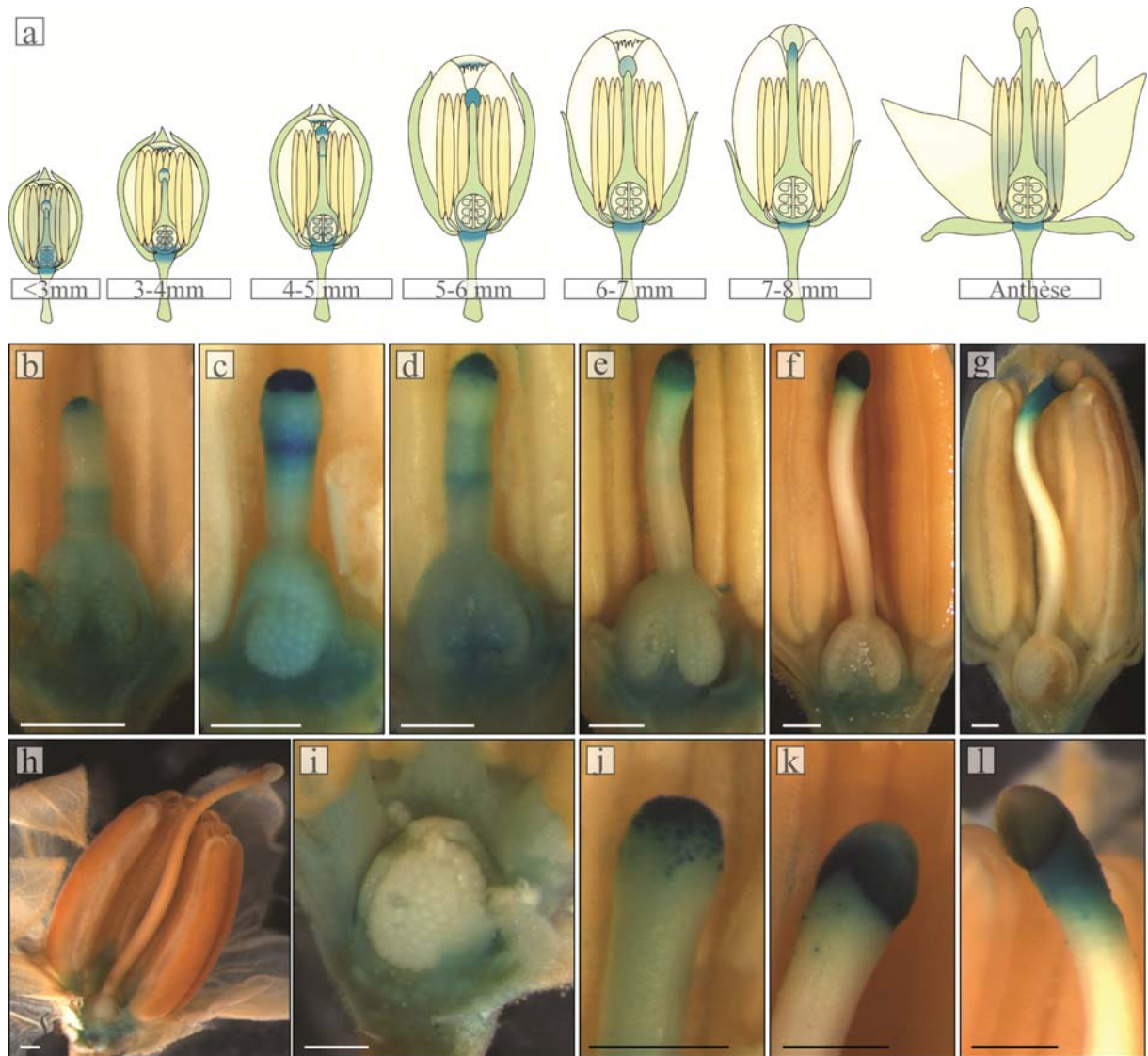


Figure 14: Analyse colorimétrique de l'expression de *ScRALF3* dans les bourgeons floraux en développement.

(a) Résumé graphique de l'analyse de l'expression par la β -glucuronidase sous le promoteur de *ScRALF3* (-1160 pb). Coloration GUS des bourgeons floraux de 2,5 mm (b), de 3,25 mm (c), de 4,0 mm (d), de 4,8 mm (e), 6,0 mm (f), de 7,0 mm (g) et à l'anthèse (h et i). Vue rapprochée du stigmate de bourgeons floraux de 4,0 mm (j), de 6,0 mm (k) et de 7,25 mm (l). Barre de mesure = 500 μm

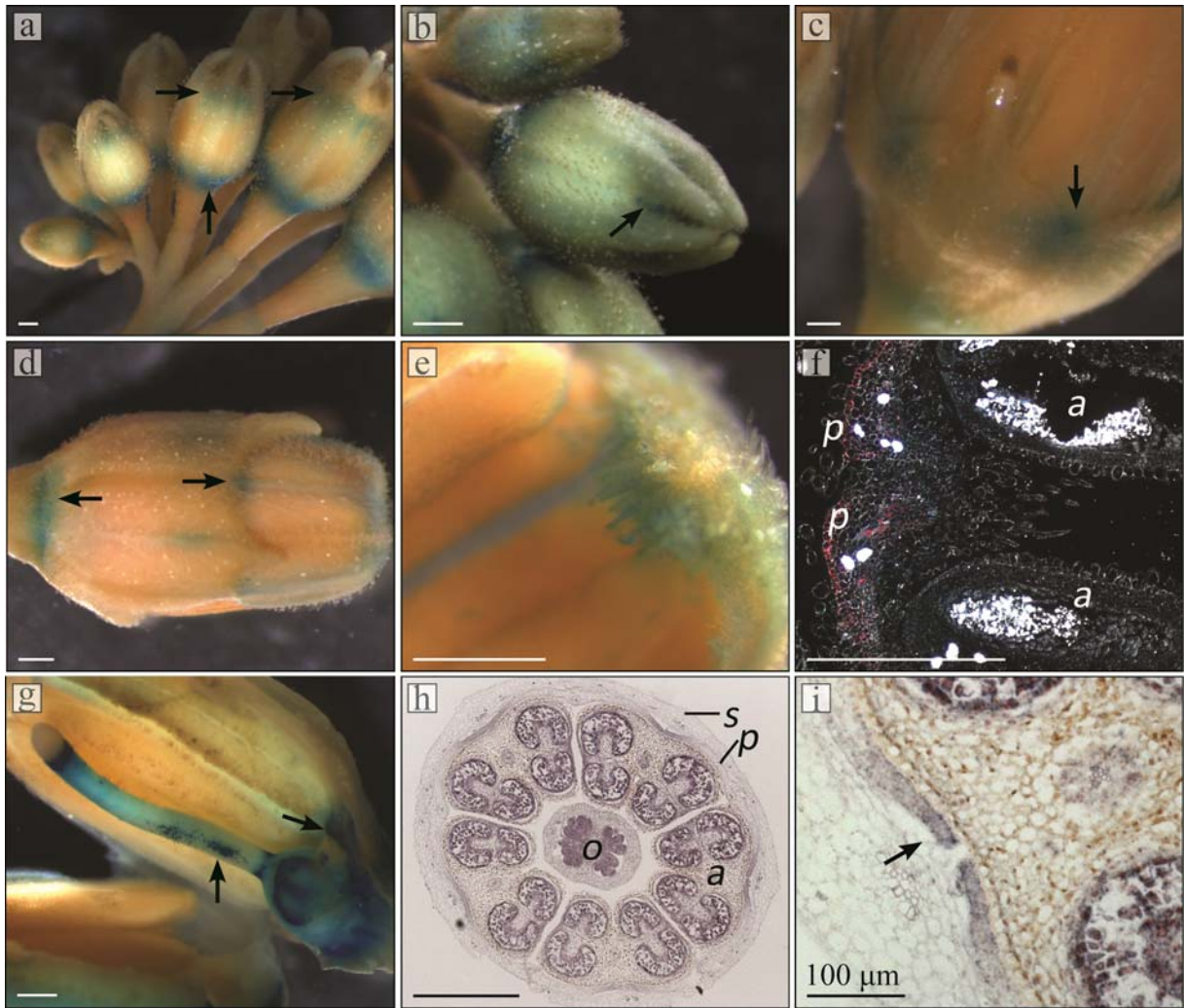
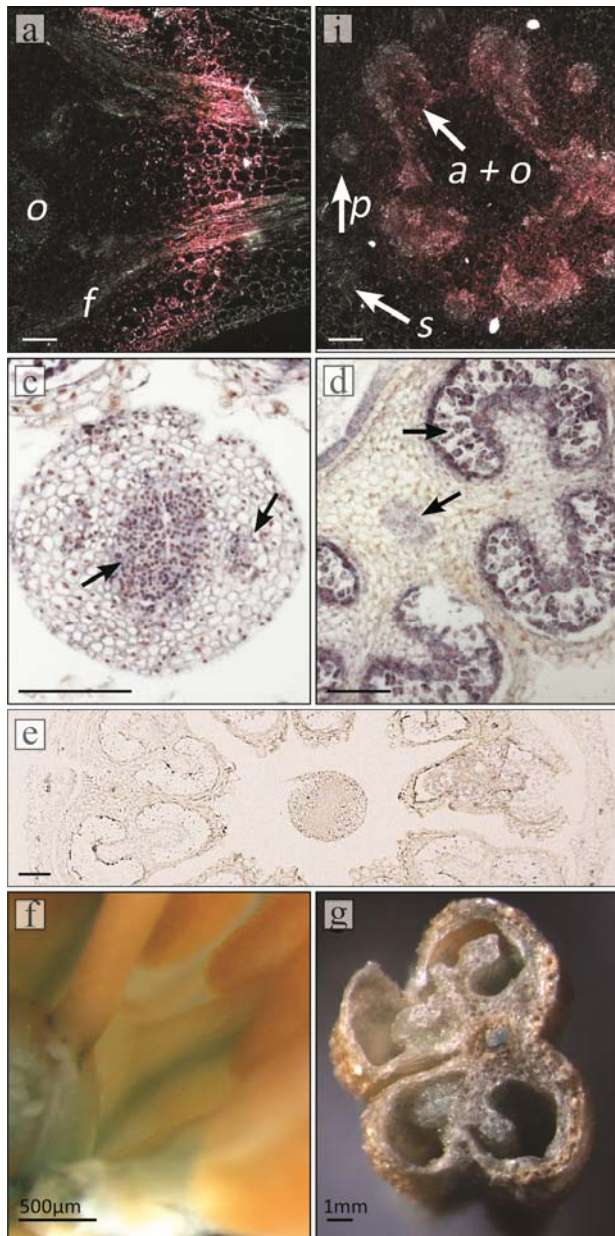


Figure 15: Analyse colorimétrique de l'expression de *ScRALF3* dans les tissus non reproducteurs.

(a-e) Coloration GUS de bourgeons floraux à différent stade de développement, les flèches mettant l'accent sur les régions montrant une expression spécifique. (f) Coupe longitudinale de bourgeons en microscopie sur fond noir (coloration par la β -glucuronidase est alors de couleur rose). L'expression est spécifique à l'épiderme externe des pétales (g) Coloration GUS de bourgeon préalablement blessé. Analyse *in situ* du transcrite avec 50 ng de sonde anti-sens sur des coupes transversales de bourgeons de 3-4 mm (h) et vue rapprochée du pétale (i) (contrôle sonde sens, voir figure 16 e). p, pétale; a, anthère; s, sépale; o, ovaire. Barre de mesure, 500 μ m (sauf indication contraire).

La rangée le plus au centre, celle qui présente la plus forte coloration, se divise en deux au niveau du réceptacle pour desservir l'ovaire et le style via le placenta ainsi que les



anthères via le filet (figure 16 b). Le transcrite de *ScRALF3* est d'ailleurs présent dans les tissus vasculaires du placenta des bourgeons inférieurs à cinq millimètres (figure 14 b-h). La présence de *ScRALF3* n'est plus détectable par la suite, mais revient au niveau du fruit en développement (figure 20). Après avoir traversé l'ovaire, les tissus vasculaires continuent alors dans le style et encore une fois il est possible de détecter le transcrite de *ScRALF3* en hybridation *in situ* dans le tissu transmissif (figure 16 c). Du côté de l'anthère, l'expression de *ScRALF3* est décelée tout au long du tissu vasculaire qui passe par le centre du filet (figure 16 f) jusqu'à l'intérieur de l'anthère (figure 16 d et g).

Figure 16: Localisation du transcrite de *ScRALF3* et de son expression dans les tissus vasculaires.

Coupe longitudinale (a) et transversale (b) de bourgeons floraux de coloration GUS en microscopie en fond noir. Analyse *in situ* avec 50 ng de sonde *ScRALF3* antisens. Localisation du transcrite au niveau du tissu transmissif et des vaisseaux vasculaires du style (c) ainsi qu'au niveau du pollen et des vaisseaux vasculaires de l'anthère (d). Témoin, sonde sens (50 ng) du gène complet de *ScRALF3* (e). Coloration GUS des vaisseaux vasculaire du filet (f) et de l'anthère (g). Barre de mesure 100 μm (sauf indication contraire).

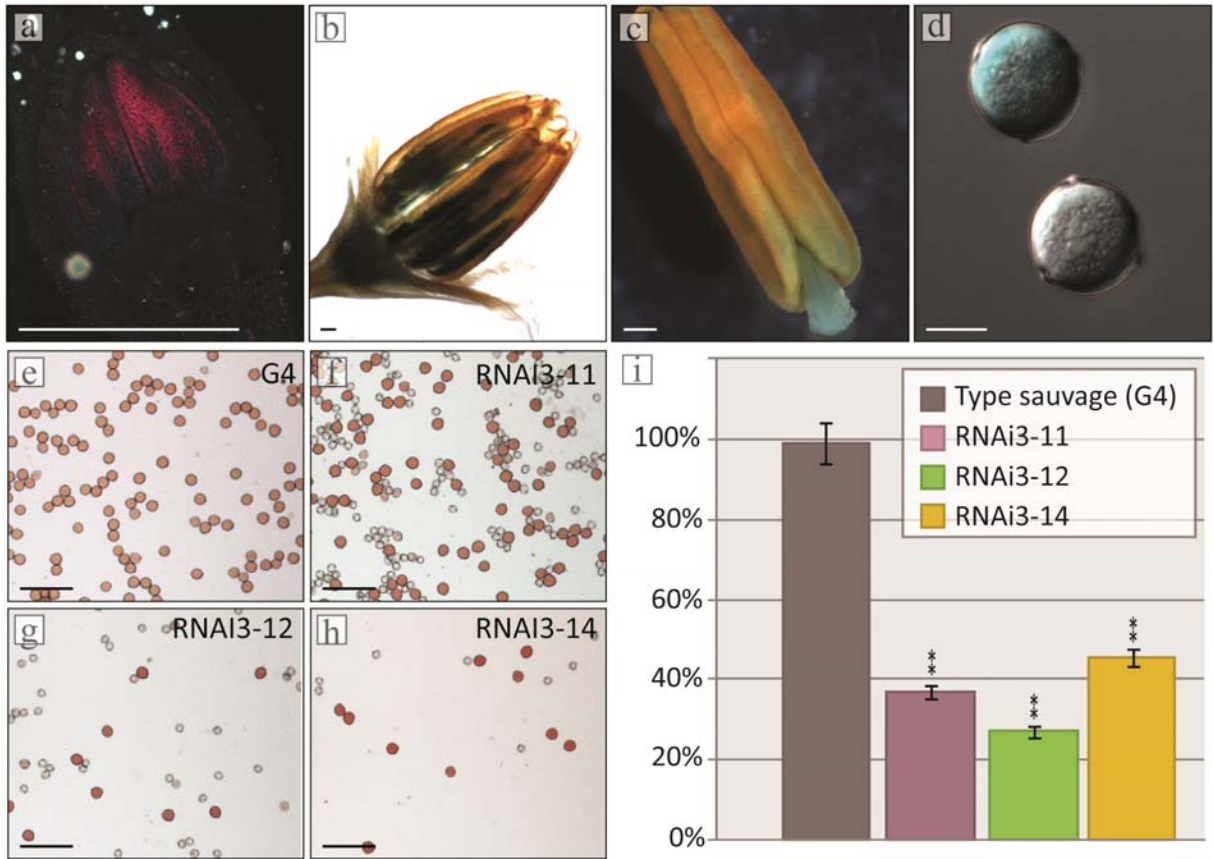


Figure 17 : Analyse de l'expression de *ScRALF3* au niveau du pollen et viabilité du pollen des plantes d'interférence.

Expression de *ScRALF3* dans les anthères de bourgeons inférieurs à 3 mm en microscopie sur fond noir (coloration par la β -glucuronidase en rose) (a). Coloration du pollen et du réceptacle chez une fleur à l'anthèse éclaircis au salicylate de méthyle (b). Expression de *ScRALF3* dans le filet de l'étamine (c) et au niveau du pollen (en DIC)(d). Viabilité des grains pollen à l'anthèse chez le type sauvage (e) et les mutants d'interférence (f-h). Graphique du pourcentage de viabilité du pollen chez les mutants d'interférence (i). Barre de mesure, 500 μ m.

3.3.2 *ScRALF3* est exprimé chez l'anthère au niveau du gamétophyte mâle

Bien que l'expression de *ScRALF3* soit plus élevée du côté femelle de la fleur tel qu'observé dans les bourgeons complets, son expression est aussi partiellement localisée au niveau du pollen, comme le laissent présager les premières analyses (Germain et al., 2005).

L'expression de *ScRALF3* dans le pollen va aussi varier en fonction du développement. Tout comme du côté femelle, le peptide va être exprimé dans les premiers stades de développement du pollen (figure 17 a). L'expression diminue ensuite pour ne plus être détectable. Cependant, contrairement au côté femelle, le pollen mature présent à l'anthèse présente à nouveau une expression de *ScRALF3* (figure 17 b-d). De plus, contrairement au gamétophyte femelle, une mitose doit encore s'effectuer à ce stade puisque la deuxième mitose se produit suite à l'élongation du tube pollinique chez les espèces de la famille des *Solanaceae* (McCormick, 1993).

3.3.3 L'interférence de *ScRALF3* affecte la viabilité du gamétophyte mâle

Puisque *ScRALF3* est présent au niveau du gamétophyte mâle, l'hypothèse que l'interférence du peptide ait une incidence également sur le développement du pollen fut vérifiée. La coloration au carmin acétique du pollen de trois lignées indépendantes de plantes d'interférence pour *ScRALF3* montre que la viabilité du pollen est affectée par la perturbation du peptide. Le pollen du type sauvage (G4) est viable à 98,96 % (figure 17 e-i). Suite à la diminution de la présence de *ScRALF3*, ce chiffre passe à 36,73 % chez le mutant RNAi3-11, 27,05 % chez RNAi3-12 et 45,38 % chez RNAi3-14 (figure 17 i).

3.3.4 Le transcrit de *ScRALF3* est caractéristique aux tissus maternels et varie avec le stade de développement du gamétophyte femelle.

Bien qu'on retrouve *ScRALF3* à plusieurs endroits dans la plante et plus particulièrement dans la fleur, le patron d'expression du peptide est particulièrement caractéristique au cours du développement des ovules. Pour mieux comprendre l'importance de *ScRALF3* dans le gamétophyte femelle, une analyse Northern a permis de préciser le degré d'expression du peptide à différents stades de développement des

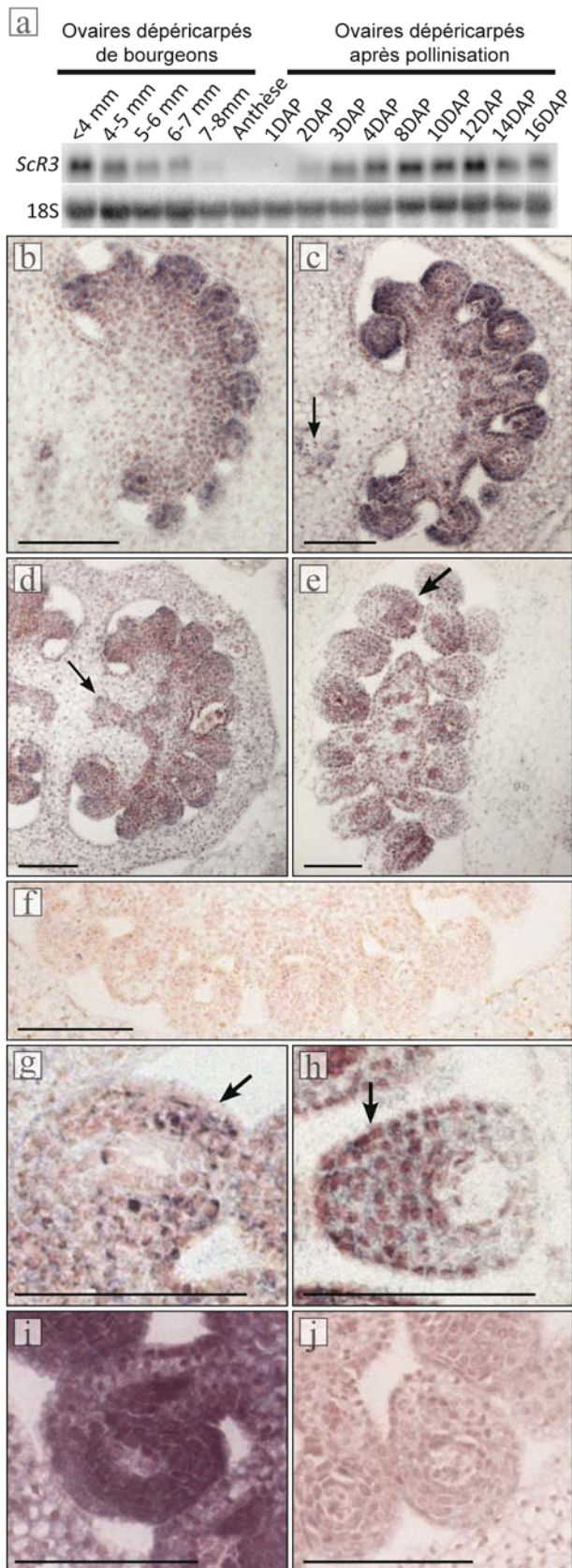


Figure 18 : Analyse Northern et *in situ* de la localisation du transcrite de *ScRALF3* dans l'ovaire en développement.

(a) Analyse Northern de l'ARNm de *ScRALF3* dans le temps chez l'ovaire dépéricarpé avant et après pollinisation. Contrôle de l'ARN total par puits avec une sonde contre l'ARN ribosomal 18S. Analyse *in situ* de la localisation du transcrite de *ScRALF3* avec 50ng de sonde anti-sens sur des coupes transversales de bourgeons de moins de 3 mm (b), de 3-4 mm (c), de 4-5 mm (d) et 5-6 mm (e). Contrôle de 50ng de sonde sens (f). Vue rapprochée d'ovules provenant de bourgeons de 4-5 mm (g) et de 5-6 mm (h) hybridés avec 50 ng de sonde anti-sens. Vue rapprochée d'ovules provenant de bourgeons de 3-4 mm hybridés avec 200 ng de sonde anti-sens (i) ou sens (j). DAP, jours après pollinisation. Barre de mesure = 100 µm

ovules (selon la taille des bourgeons). Comme attendu, le transcrite de *ScRALF3* est plus fortement retrouvé dans les ovaires dépéricarpés des jeunes bourgeons (<4 mm) et diminue graduellement pour n'avoir plus aucune présence du peptide à l'anthesis (figure 18 a). Suite à la fécondation (entre 36 h et 48 h après pollinisation (Lantin et al., 1999), l'expression de *ScRALF3* augmente graduellement pour atteindre un maximum d'expression entre huit et douze jours après pollinisation et la quantité de transcrite retrouvée diminue ensuite (Figure 18 a) ce qui confirme et précise les résultats obtenus précédemment (Germain et al., 2005).

L'analyse d'hybridation *in situ* du transcrite sur des coupes transversales d'ovaire à différents stades converge avec ce qui est observé dans l'analyse Northern et permet d'explicitier le patron d'expression du peptide dans le temps. Cinquante nanogrammes de sonde représentant le gène complet permettent d'observer la présence du transcrite de *ScRALF3* principalement dans les tissus sporophytiques qui entourent le sac embryonnaire : le tégument et le nucelle (figure 18 b-j). Dans les jeunes bourgeons (trois à quatre millimètres), le transcrite est également présent dans le placenta (figure 18 b), mais *ScRALF3* devient plus circonscrit à l'ovule avec l'avancement du stade de développement (figure 18e). La localisation de *ScRALF3* semble d'ailleurs polarisée vers l'extrémité du tégument formant alors le micropyle (figure 18d-e, g-h). Cette polarité est en outre plus prononcée avec l'avancement du stade de développement du sac embryonnaire.

En regardant de plus près l'expression suite au traitement pour la *β -glucuronidase*, une certaine polarité de l'expression est encore une fois observée tout au long du développement de l'ovule. Au stade MMC, l'expression de *ScRALF3* est localisée spécifiquement sous la MMC différenciée au départ (figure 19 a) et devient spécifique au tégument extérieur lors de son développement (figure 19 b-d). La localisation de l'expression de *ScRALF3* reste plus spécifique à la couche externe du tégument avec le développement. Une coloration peut parfois aussi être observée au niveau du nucelle une fois le tégument fermé (figure 19 d). Avec le début de la mégagamétogenèse, l'expression est déjà beaucoup plus faible, mais reste avant tout au bout du tégument, sur la couche

extérieure du tégument externe et à l'intérieur du funicule (figure 19 e). Lorsque l'ovule est mature à l'anthèse, une très faible coloration peut parfois être encore observée de manière spécifique à l'apex des téguments (figure 19 f).

3.3.5 *ScRALF3* est exprimé dans le fruit en développement et au niveau de l'embryon

L'analyse du transcrit par Northern avait déjà démontré que *ScRALF3* était présent suite à la fécondation (Germain et al., 2005). C'est typiquement à ce moment que l'expression de *ScRALF3* augmente graduellement jusqu'à un certain maximum entre huit et douze jours après pollinisation (figure 18 a). L'analyse de l'expression suite au traitement pour la *β -glucuronidase* montre que *ScRALF3* semble présent au niveau des tissus vasculaires du placenta reliés à chaque ovule huit jours après pollinisation (figure 20a-b). Bien que l'expression de *ScRALF3* soit légèrement décelée au niveau du tégument de la graine en développement (figure 20 c), l'expression du peptide semble plus spécifique au micropyle (figure 20 d). Chez la graine mature, *ScRALF3* va être fortement présent au niveau de l'embryon. Le peptide est exprimé partout dans la plantule excepté au niveau de l'apex racinaire (figure 20 e)

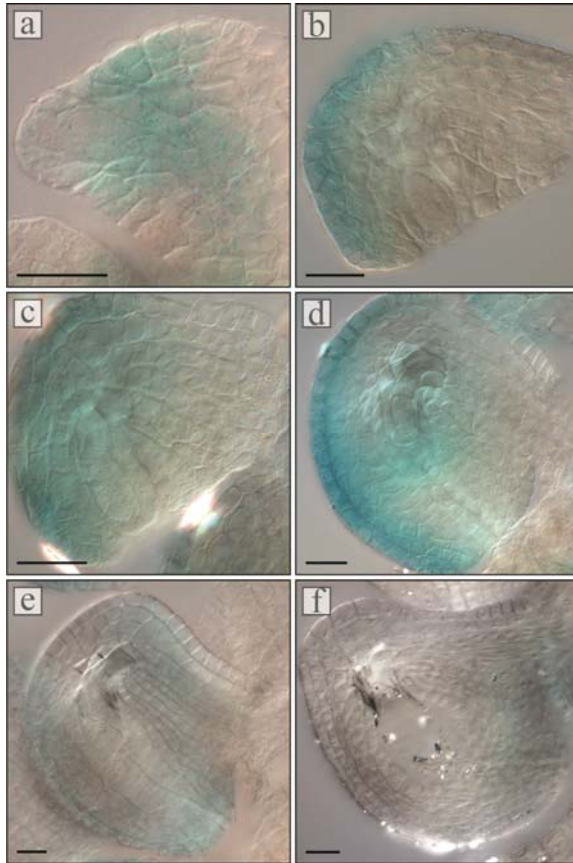


Figure 20 : Analyse colorimétrique de l'expression de *ScRALF3* lors du développement de l'ovule.

Ovules à différents stades de développement éclaircis au salicylate de méthyle suite à la coloration par la β -glucuronidase sous le promoteur de *ScRALF3*. (a) Stade primordium (différenciation de la MMC). (b) Stade MMC, initiation du tégument. (c) Stade diade de la mégasporogénèse. (d) Jeune mégaspore fonctionnelle. (e) Mégaspore fonctionnelle plus âgée. (f) Stade mature (anthèse). Barre de mesure = 20 μ m

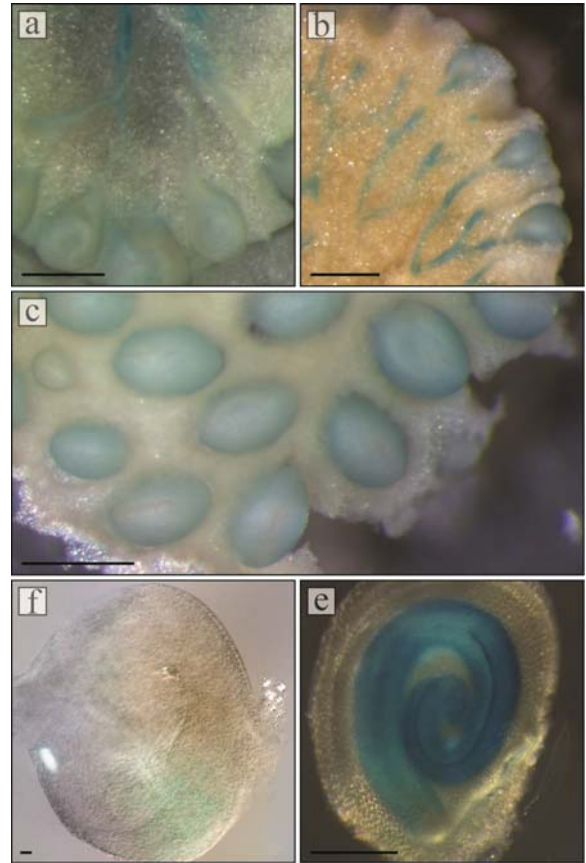


Figure 19 : Analyse colorimétrique de l'expression de *ScRALF3* lors du développement du fruit.

(a-c) Expression de la β -glucuronidase sous le promoteur de *ScRALF3* dans la couche externe des graines en formation huit jours après pollinisation. (b) Coloration des tissus vasculaires du placenta du fruit à huit jours après pollinisation. (c) Localisation plus spécifique de l'expression dans les téguments du côté micropylaire huit jours après pollinisation chez les graines éclaircies au salicylate de méthyle. (e) Expression de la β -glucuronidase sous le promoteur de *ScRALF3* dans l'embryon 30 jours après pollinisation. Graines éclaircies avec la solution d'Hoyer. Barre de mesure = 500 μ m

3.4 La perturbation de *ScRALF3* affecte le développement du sac embryonnaire

3.4.1 La surexpression de *ScRALF3* n'affecte pas la taille des fruits et le nombre de graines

L'analyse préalable de l'expression du peptide démontre que *ScRALF3* est absent de l'ovaire lorsque la fleur est à l'anthèse et lors de la fécondation. Puisque la perte de *ScRALF3* affecte bel et bien le développement du fruit, nous nous sommes demandé quels étaient les effets de sa présence à la fin du développement de l'ovule en surexprimant notre gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur viral constitutif CaMV35S avec l'espoir que ceci permettrait d'éclaircir la fonction du peptide. Le promoteur constitutif 35S provenant du virus de la mosaïque du chou-fleur est le plus utilisé à cause de son fort niveau d'expression et de son uniformité à travers la plante (Holtorf et al., 1995).

Une série de 15 plantes indépendantes a d'abord été sélectionnée et dix d'entre elles ont été ensuite choisies selon leur degré d'expression de *ScRALF3* suivant l'analyse du transcrit par hybridation Northern sur l'ARN extrait de jeunes feuilles (figure 21 a). Cinq d'entre-elles montrant les phénotypes les plus représentatifs suite à des analyses préliminaires ont été choisies pour des analyses plus poussées. La taille moyenne des fruits fut donc mesurée chez ces mutants sept jours, 14 jours et 25 jours après pollinisation. Cependant, la taille moyenne des fruits des plantes surexprimant *ScRALF3* n'est pas significativement différente du type sauvage même après 25 jours de croissance, excepté pour la lignée 8 qui montre des fruits significativement plus grands selon les analyses statistiques t-Student ($H1 : x \neq xG4$) (figure 21 b). Néanmoins, un nombre similaire de graines au type sauvage se développent chez les fruits mutants (figure 21 c). La taille des fruits variant légèrement d'une plante à l'autre chez le type sauvage, associée au fait que le phénotype chez la lignée 8 ne correspond pas à la plus forte expression de *ScRALF3*, la différence significative de la taille du fruit chez une seule lignée ne va pas à l'encontre de l'hypothèse du développement normal du gamétophyte femelle et de l'embryon.

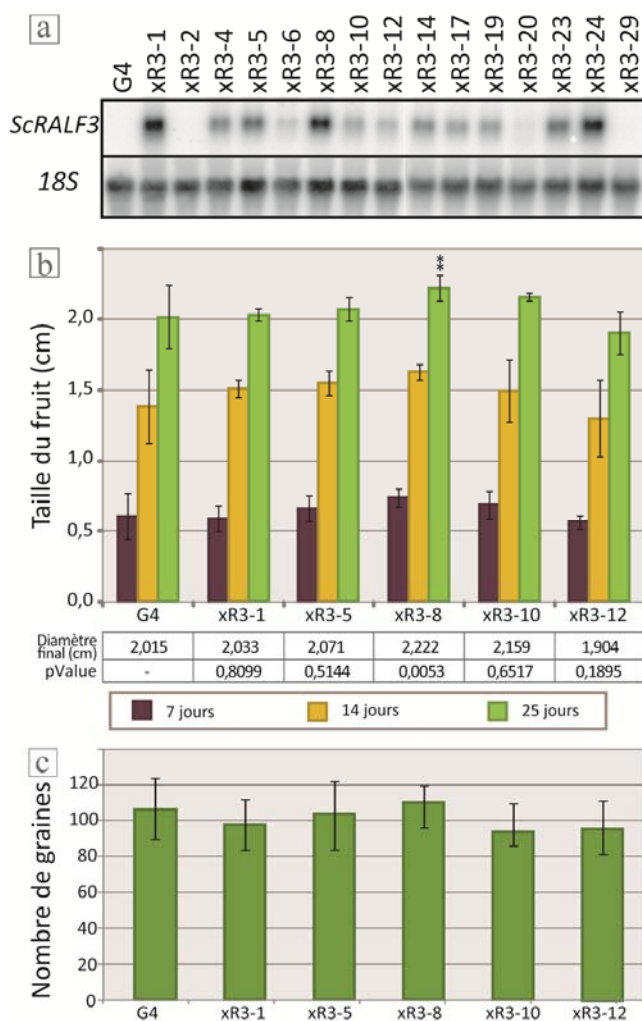


Figure 21 : La surexpression de l'expression de *ScRALF3* a peu d'effet visible sur le développement du fruit.

(a) Analyse Northern de la quantité d'ARNm de *ScRALF3* présent dans 12,5 µg d'ARN totaux extraits de feuilles chez 15 lignées indépendantes. Contrôle de l'ARN total par puits avec une sonde contre l'ARN ribosomal 18S. (b) Diamètre moyen des fruits chez cinq lignées sélectionnées 7, 14 et 25 jours après pollinisation (n=10-15). (c) Nombre moyen de graines par fruit chez les cinq lignées sélectionnées 25 jours après pollinisation (n=8-10).

Les perturbations observées chez les mutants de surexpression sont aussi présentes chez notre type sauvage, mais la proportion de sacs embryonnaires affectés est supérieure

3.4.2 La cellularisation du sac embryonnaire est modérément perturbée par la surexpression de *ScRALF3*

Malgré le fait que le gamétophyte femelle semble fonctionnel, l'hypothèse que la présence de *ScRALF3* à la fin du développement du sac embryonnaire causerait des perturbations a tout de même été vérifiée. Les sacs embryonnaires de fleurs à l'anthesis préalablement éclaircis au salicylate de méthyle furent vérifiés au microscope en contraste interférentiel différentiel (DIC). Et effectivement, la surexpression de *ScRALF3* semble affecter légèrement l'intégrité de la cellularisation (figure 22). Par exemple, plusieurs sacs embryonnaires vont présenter une cellule œuf qui n'est pas située tout à fait au micropyle ou certaines cellules vont être absentes; à quelques exceptions près, les cellules manquantes vont être une ou les deux synergides (figure 22a-c).

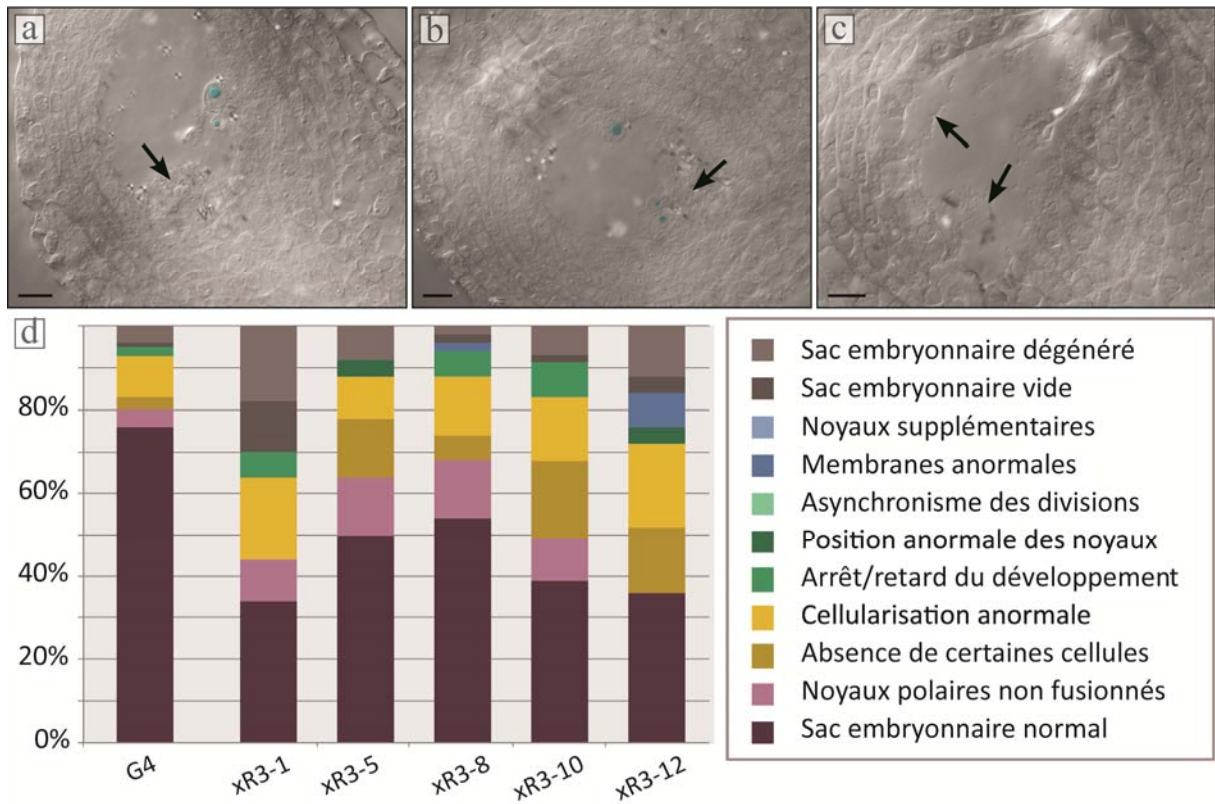


Figure 22 : La surexpression de *ScRALF3* perturbe légèrement la cellularisation du sac embryonnaire.

Exemples de problèmes observés chez les sacs embryonnaires des mutants surexprimant *ScRALF3*, éclaircis au salicylate de méthyle. Les problèmes observés sont mis en évidence par les flèches (a) Problème de positionnement de la cellule œuf. (b) Absence de cellule. (c) Formation d'amas de membranes dans le sac embryonnaire. (d) L'analyse phénotypique des problèmes observés chez cinq lignées indépendantes montre une légère perturbation de la cellularisation (n=50). Images provenant d'un empilement de sections optiques (Z-stack) assemblées manuellement. Noyaux colorés artificiellement pour faciliter la visualisation. Barre de mesure = 10 μ m.

chez les plantes exprimant *ScRALF3* à l'anthèse (figure 22 d). La présence de tissus membraneux au micropyle est aussi fréquemment observée, affectant l'intégrité du sac embryonnaire mature, mais également l'observation de celui-ci.

Malgré les quelques anicroches rencontrées, la surexpression de *ScRALF3* et sa présence au cours de la mégasporogénèse ne semblent pas avoir d'incidence sur la fonctionnalité du sac embryonnaire.

3.4.3 Le synchronisme des divisions mitotiques et la polarité du sac embryonnaire sont affectés chez les mutants d'interférence pour *ScRALF3*

Si une surabondance du peptide n'affecte que très peu le développement de l'ovule, l'interférence de l'ARN messager perturbe à l'évidence le développement de l'ovule ou de la graine puisqu'un nombre significativement réduit de graine est observé suite à la pollinisation (figure 9). La perturbation de l'expression de *ScRALF3* n'ayant aucun effet sur le développement du pistil ou sur la germination ainsi que la croissance du tube pollinique suite à la pollinisation avec du pollen de type sauvage (données non présentées) malgré l'expression de *ScRALF3* dans le style, le problème semblait donc spécifique au gamétophyte femelle. Ces résultats nous poussèrent à émettre entre autres l'hypothèse que *ScRALF3* serait nécessaire au développement du gamétophyte femelle considérant son expression particulière à l'ovule. Pour valider cette hypothèse, les sacs embryonnaires de fleurs à l'anthèse furent observés. Les tissus préalablement éclaircis au salicylate de méthyle ont été observés au microscope en contraste interférentiel différentiel (DIC) et cette fois plusieurs problèmes de développement ont été constatés. Les sacs embryonnaires des plantes d'interférence pour *ScRALF3* montrent des signes de dégénérescence (figure 23 a-c), des problèmes de polarité (figure 23 d) et des problèmes de synchronisme lors des différentes étapes de mitoses (figure 23 e-i). Ces perturbations provoquent finalement l'arrêt du développement empêchant ainsi le sac embryonnaire d'atteindre le stade mature. Le nombre de sacs embryonnaires matures et similaires au type sauvage corrèle avec le nombre de graines matures préalablement observé chez les fruits de mêmes lignées mutantes (figure 23 j). Ce qui laisse croire que le phénotype

observé lors du développement du fruit est dû aux problèmes de développement de l'ovule et du sac embryonnaire plutôt qu'à un problème survenant chez l'embryon.

Des ovules sans sac embryonnaire, mais avec un tégument bien développés (figure 23 a) suggèrent un problème suite aux étapes de méioses, le développement du tégument étant complet seulement au stade de la tétrade (figure 3). Un nombre important de sacs embryonnaires dégénérés est observé chez les mutants d'interférence pour *ScRALF3* comparé au type sauvage (4 %), ce nombre variant selon la lignée : 16,2 % pour RNAi3-7, 40,4 % pour RNAi3-11, 26,7 % pour RNAi3-12 et 54,5 % pour RNAi3-14 (figure 23 j). Plusieurs observations de mégaspore fonctionnelle montrant des caractéristiques de mort cellulaire telles que la formation de plusieurs amas de chromatine condensée caractérisés par la formation de petites formes sphériques visibles en microscopie DIC (figure 23 b, encadré c.) appuies le scénario que la dégénérescence des sacs embryonnaires survient après l'étape de méiose, possiblement lors de la mort programmée de trois de quatre mégaspores.

D'autres perturbations du développement du sac embryonnaire surviennent lors des étapes de mitoses. Jusqu'à 50 % des sacs embryonnaires arrêtent leur développement lors de ces étapes (figure 23 j). Chez le mutant RNAi3-7, 49,5 % des sacs embryonnaires à l'anthèse se trouvent à un stade correspondant à une des trois mitoses. Ce chiffre passe à 38,5 % chez RNAi3-11, 46,7 % chez RNAi3-12 et 18,2 % chez le mutant RNAi3-14.

Le premier type de perturbation observé est un problème de polarité dans le positionnement des noyaux. Le développement normal du sac embryonnaire nécessite que les noyaux soient correctement positionnés dans le sac embryonnaire; dès la première mitose, les deux noyaux produits se dirigent vers les deux pôles, on observe ensuite deux divisions bien synchronisées qui produisent deux noyaux de chaque côté et ensuite quatre noyaux (figure 3). Une dépolarisation du sac embryonnaire va inévitablement à l'encontre de la maturation normale puisque le positionnement des noyaux déterminera le destin des différentes cellules du sac embryonnaire. Ces problèmes de positionnement sont facilement observables et caractérisables chez les sacs embryonnaires arrêtés au stade de la mitose II. On s'attend alors à voir deux noyaux

du côté chalazal et deux noyaux du côté micropylaire (figure 24 a-e). Afin de déterminer si les problèmes de polarité montraient une «préférence» des noyaux pour le côté chalazal (figure 24 f-j) ou micropylaire (figure 24 k-o), plus de 100 sacs embryonnaires arrêtés au stade quatre noyaux ont été caractérisés chez deux lignées indépendantes. Chez 95 % des sacs embryonnaires de types sauvages observés à la mitose II (correspondant à des bourgeons de cinq à six millimètres, tableau VI), les noyaux présentent un positionnement normal. Chez le mutant RNAi3-7, seulement 33 % des sacs embryonnaires présentent des noyaux bien polarisés et 42 % chez le mutant RNAi3-12. Cependant, les noyaux ne montrent aucune préférence pour un pôle en particulier (figure 24 p).

En plus de ce problème de positionnement, un problème de synchronicité des divisions mitotiques est observé chez les mutants d'interférence. Comme déjà mentionnées, les divisions se font de manière synchrone, excluant la possibilité d'observer cinq, six ou sept noyaux. Des analyses plus approfondies des sacs embryonnaires arrêtés à la mitose III (entre 5 et 8 noyaux) permettent de définir ce problème d'asynchronicité. Chez le type sauvage, près de 75 % des sacs embryonnaires observés à la mitose III (bourgeons de 5,5 à 7 mm) présentent huit noyaux polarisés aux deux pôles (figure 25 a-e). Ce pourcentage de sac embryonnaire normal diminue à 30 % chez le mutant RNAi3-7 et à 46,5 % chez le mutant RNAi3-12 (figure 25 u). Bien qu'un nombre pair de noyaux soit plus fréquemment observé chez ces plantes mutantes, un nombre anormalement élevé de sacs embryonnaires comportant cinq, six ou sept noyaux est présent. Une large gamme de problèmes peut être observée. Quelques exemples sont présentés à la figure 25. Certains sacs embryonnaires vont présenter un cas simple où un seul noyau est entré en division après le stade de la mitose II donnant un gamétophyte à cinq noyaux (figure 25 f-j, i plus précisément). Cependant, certains sacs embryonnaires montrent des perturbations plus complexes, qu'il y est un problème de polarité à la base (figure 25 k-o) ou non (figure 25 p-t). Encore une fois, les sacs embryonnaires furent classés selon la position des noyaux et une légère préférence pour le côté micropylaire en ressort (figure 25 u).

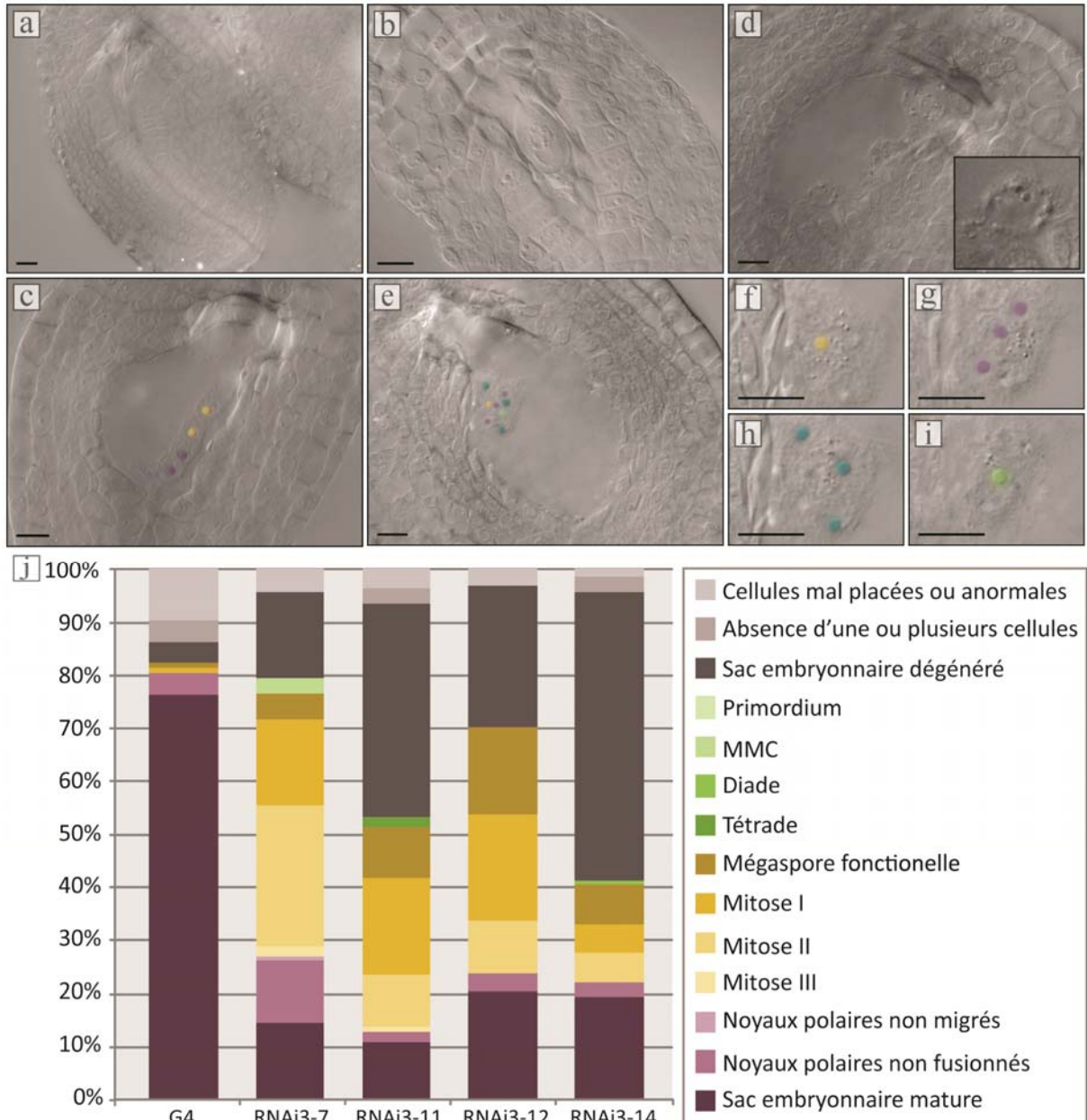


Figure 23 : La perturbation de *ScRALF3* affecte le développement du sac embryonnaire chez les mutants d'interférence.

Exemple de problèmes observés chez les sacs embryonnaires des mutants d'interférence pour *ScRALF3* à l'anthèse (a) Sac embryonnaire dégénéré après la mégasporogénèse. (b) Sac embryonnaire arrêté au stade de mégaspore fonctionnelle. (c) Sac embryonnaire arrêté au stade quatre noyaux montrant des signes de dégénérescence (voir encadré). (d) Sac embryonnaire arrêté au stade de la mitose II. (e-j) Sac embryonnaire arrêté au stade de la mitose III avec sept noyaux. Vue rapproché des noyaux par plan focal (f-i). (j) Résumé des stades de développement observés chez les ovules à l'anthèse des mutants d'interférence (n=100). Images provenant d'un empilement de sections optiques assemblées manuellement. Noyaux colorés artificiellement par plan focal pour faciliter la visualisation. Barre de mesure = 10 μ m.

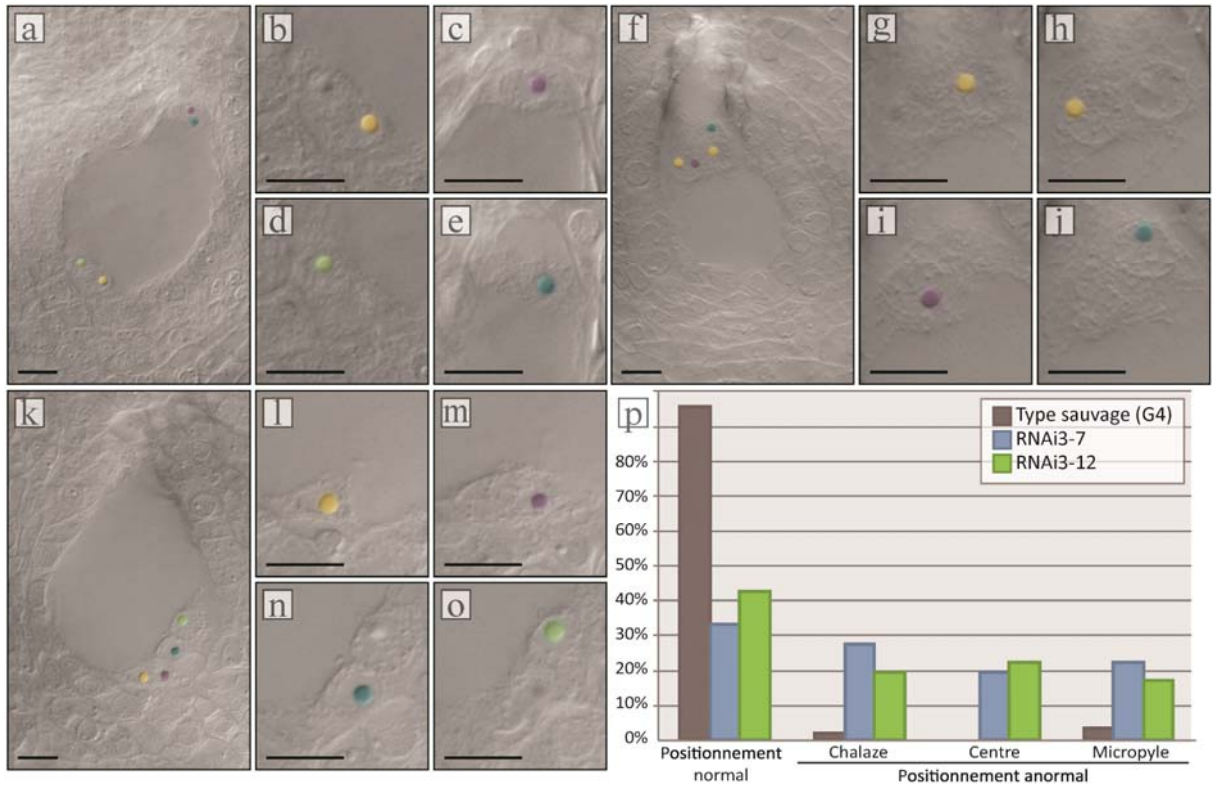


Figure 24 : Les mutants d'interférence présentent des problèmes de polarité lors du développement du sac embryonnaire.

(a-e) Sac embryonnaire de type sauvage (G4) au stade mitose II. Noyaux bien polarisés selon l'axe chalazal-micropylaire. Vue rapprochée par plan focal (b-e). (f-j) Noyaux positionnés au pôle chalazal sans polarité. Vue rapprochée par plan focal (g-j). (k-o) Noyaux positionnés au pôle micropylaire sans polarité. Vue rapprochée par plan focal (l-o). (p) L'analyse phénotypique des sacs embryonnaires mutants arrêtés au stade quatre noyaux ne montre aucune préférence dans le positionnement des noyaux. (n=100). Images provenant d'un empilement de sections optiques assemblées manuellement. Noyaux colorés artificiellement par plan focal pour faciliter la visualisation. Barre de mesure = 10 μ m.

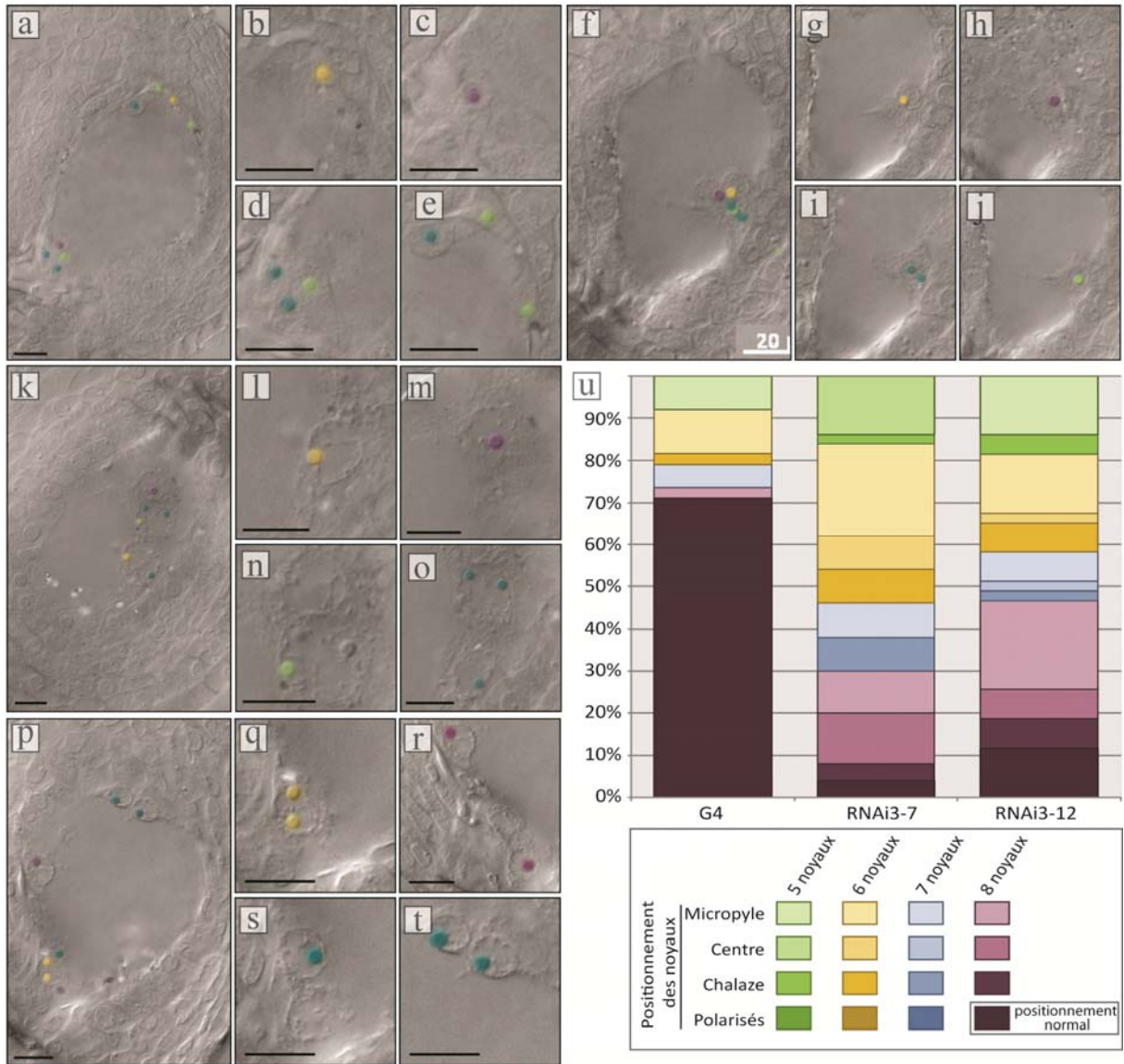


Figure 25 : Les mutants d'interférence présentent des problèmes de synchronicité des divisions lors du développement du sac embryonnaire.

(a-e) Sac embryonnaire de type sauvage (G4) au stade mitose III. Noyaux bien polarisés selon l'axe chalazal-micropylaire. Vue rapprochée par plan focal (b-e). (f-j) Sac embryonnaire comprenant cinq noyaux non polarisés. Vue rapprochée par plan focal (g-j). Sac embryonnaire comprenant six noyaux non polarisés. Vue rapprochée par plan focal (l-o). (p-t) Sac embryonnaire comprenant sept noyaux, disposé de manière polarisée. Vue rapprochée par plan focal (q-t). (u) Analyse phénotypique des sacs embryonnaires arrêtés au stade de la mitose III (entre 5 et 8 noyaux) classés par nombre de noyaux et leur positionnement dans le sac embryonnaire (n=40-50). Images provenant d'un empilement de sections optiques assemblées manuellement. Noyaux colorés artificiellement par plan focal pour faciliter la visualisation. Barre de mesure = 10 µm.

3.4.4 *ScRALF3* est nécessaire à la différenciation de la mégaspore fonctionnelle et aux étapes de mitoses

Dans l'espoir de pouvoir déterminer un moment précis du développement affecté par l'absence de *ScRALF3*, des sacs embryonnaires provenant de bourgeons pris à différents stades (déterminé selon la taille du bourgeon) ont été observés (Tableau VI). Chez le type sauvage (G4), il est possible de lier chaque taille de bourgeons à un certain stade du développement du sac embryonnaire. Chez les bourgeons de 3-4 mm, la majorité des sacs embryonnaires se retrouvent au stade de la mégaspore mère (MMC) et certains ont commencé les étapes de méioses. Chez les bourgeons de 4-5 mm, les divisions méiotiques sont presque terminées et la majorité des sacs embryonnaires sont observés au stade de la mégaspore fonctionnelle bien que les divisions mitotiques aient déjà commencé pour certains. Les trois mitoses vont se produire plus particulièrement chez les bourgeons de 5-6 mm. À ce stade, la dégénérescence des antipodales suite aux trois mitoses est déjà observée chez certains ovules, mais c'est chez les bourgeons de 6-7 mm qu'on retrouve le plus de sacs embryonnaires comprenant cinq noyaux. La migration du noyau polaire chalazal se produit chez les sacs embryonnaires de bourgeons de 6-7 mm. Chez les bourgeons de 7-8 mm, la majorité des sacs embryonnaires va présenter une cellularisation complète et des noyaux polaires non fusionnés (mais côte à côte) ou un sac embryonnaire totalement mature.

Une comparaison entre les sacs embryonnaires provenant des mutants d'interférence et ceux du type sauvage pour chaque taille de bourgeons permet de cibler l'impact de *ScRALF3* sur le développement du gamétophyte femelle. Pour les bourgeons pris entre 3-4 mm, les stades observés sont sensiblement les mêmes entre les mutants et le G4, les sacs embryonnaires semblent même un peu plus avancés dans le développement (Tableau VI), RNAi3-11 et RNAi3-14). Comme anticipés, les problèmes semblent survenir au stade de la mégaspore fonctionnelle et lors des mitoses. Chez les bourgeons de 4-5 mm, la majorité des sacs embryonnaires ont atteint le stade de mégaspore fonctionnelle, tout comme chez le type sauvage. C'est aussi à partir de ce moment que plus de sacs embryonnaires dégénérés sont observés. Le pourcentage de sacs embryonnaires

dégénérés reste alors assez comparable. Ensuite, chaque stade de développement est atteint relativement dans les mêmes temps que pour le type sauvage (G4), mais les sacs embryonnaires des mutants d'interférence semblent avoir de plus en plus de difficulté et arrêtent leur développement, laissant peu de gamétophytes femelles atteindre le stade mature.

Ceci permet de déterminer que les perturbations observées chez les mutants d'interférence de *ScRALF3* ne mènent pas à un retard dans le développement, mais bien un arrêt du développement. Les problèmes de polarité, de synchronisation des divisions et plus drastiquement de dégénérescence sont autant d'embûches qui bloquent le déroulement de la mégagamétogenèse.

Tableau VI : Distribution du développement des sacs embryonnaires selon la taille du bourgeon pour le type sauvage (G4) et les mutants d'interférence pour *ScRALF3* (RNAi)

	Taille (mm)	Prim.	MMC	Mel	Mell	FM	MI	MII	MIII	Deg. antip.	NP nfus	ES mat.	Deg
G4	3-<4	7	50	23	13	7	-	-	-	-	-	-	-
	4-<5	-	-	4	6	57	25	8	-	-	-	-	-
	5-<6	-	-	-	-	5	17	39	9	15	12	3	-
	6-<7	-	-	-	-	-	-	17	21	44	15	3	-
	7-<8	-	-	-	-	-	-	2	1	10	48	39	-
RNAi3-7	3-<4	19	60	10	11	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-<5	-	-	8	18	53	16	5	-	-	-	-	-
	5-<6	-	-	2	7	20	33	19	5	10	3	1	-
	6-<7	-	-	3	4	14	33	23	3	5	12	3	-
	7-<8	-	-	-	-	4	24	25	-	4	27	16	-
RNAi3-11	3-<4	8	33	7	12	28	1	1	-	-	-	-	10
	4-<5	-	1	4	8	55	15	3	-	-	-	-	14
	5-<6	-	4	-	2	29	22	19	-	2	-	-	22
	6-<7	3	2	3	2	25	25	17	2	3	2	-	16
	7-<8	-	1	1	2	19	25	15	2	8	5	7	16
RNAi3-14	3-<4	-	17	22	33	16	1	-	-	-	-	-	11
	4-<5	-	2	3	16	36	3	1	-	-	-	-	39
	5-<6	-	-	1	6	30	11	9	1	2	-	-	40
	6-<7	-	-	1	2	21	6	12	6	6	5	-	41
	7-<8	-	-	1	1	12	4	3	6	12	12	3	46

Prim.: stade primordium; MMC: cellule mégaspore mère; Mel: méiose I (stade diade); Mell : méiose II (stade tétrade); FM: mégaspore fonctionnelle; MI-II-III: Mitose I (2 noyaux), -II (quatre noyaux), -III (huit noyaux); Deg. antip.: dégénérescence des antipodales (cinq noyaux) sans migration des noyaux polaires; NP nfus : noyaux polaires non fusionnés mais après migration; ES mat. : sac embryonnaire mature

Les barres de couleurs indiquent la distribution du développement des sacs embryonnaires du type sauvage (G4) pour chaque taille de bourgeons (plus de 95%).

3.5 La famille des Rapid alkalisation factor chez *Arabidopsis thaliana*

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, l'analyse du génome a permis d'isoler environ 37 gènes de type *RALF* (Olsen et al., 2002). Bien que la majorité fasse partie d'analyse à grande échelle de micropuces ou autres analyses du genre, peu ont été caractérisés et aucun de ceux-ci ne semble impliqué dans la reproduction jusqu'à maintenant. Pourtant, plusieurs sont exprimés dans les organes floraux et reproductifs. L'analyse de l'expression de certains d'entre eux grâce à des constructions exprimant la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur de différents

AtRALFs permet de ce faire une idée de l'importance de cette famille de peptides sécrétés au niveau de la fleur.

3.5.1 Plusieurs gènes de type *RALF* sont exprimés au niveau du gamétophyte femelle chez *Arabidopsis thaliana*

Quatre membres de la famille des *RALFs* sont exprimés du côté femelle

de la fleur. Les plus proches orthologues en similitude de séquences de *ScRALF1*,

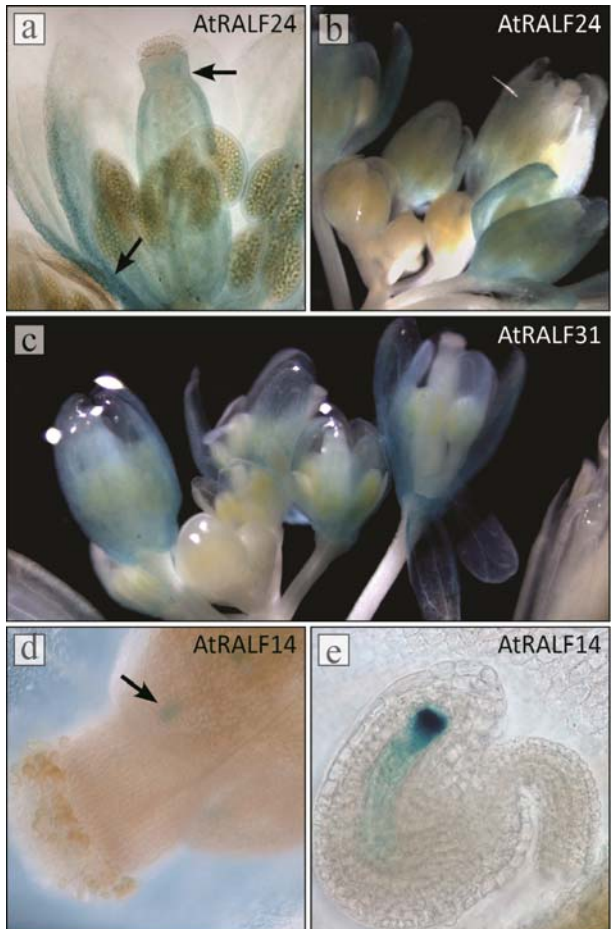


Figure 26 : Analyse colorimétrique de l'expression de certains *AtRALFs* spécifiques aux tissus de l'ovaire chez *A. thaliana*.

(a-b) Expression par la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur d'*AtRALF24* chez des bourgeons floraux. (c) Expression par la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur d'*AtRALF31* chez des bourgeons floraux. (d-e) Expression par la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur d'*AtRALF14* au niveau du style (d) et de l'ovule éclairci au salicylate de méthyle (e).

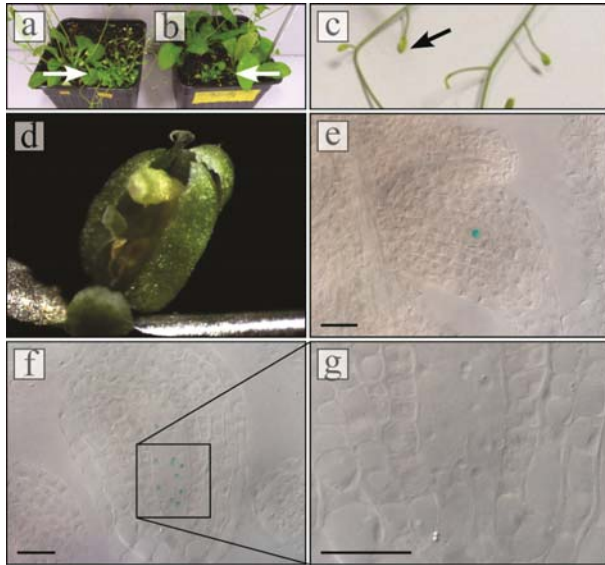


Figure 27 : La surexpression d'*AtRALF14* affecte le développement de la plante et du sac embryonnaire.

Phénotype de semi-nanisme suite à la surexpression d'*AtRALF14* chez la lignée oxR14-14 (a) et oxR14-16 (b). Formation de bourgeons floraux avortés chez la lignée oxR14-7 (c,d) avec des ovules dont le développement est arrêté (FGO, équivalent à un stade floral 11 montré à la figure e). Division nucléaire anormale chez les sacs embryonnaires de la lignée-14 (f-g). Noyaux colorés artificiellement pour faciliter la visualisation. Barre de mesure = 20µm

AtRALF24 et *AtRALF31*, sont principalement exprimés au niveau basal du calice. Cependant, les deux peptides sont aussi détectables au niveau du péricarpe de l'ovaire et du style (figure 26 a-c). L'orthologue en séquence de *ScRALF3*, *AtRALF34*, est aussi retrouvé de manière importante au niveau des ovules chez *A. thaliana*. Une analyse plus détaillée de son expression est présentée ci-dessous.

Des analyses transcriptomiques chez *A. thaliana* ont aussi permis de faire ressortir deux autres peptides de type RALF présents au niveau de l'ovule et non reliés aux RALFs préalablement isolés chez *S. chacoense* : *AtRALF14* et *AtRALF18* (Johnston et al., 2007; Wuest et al., 2010; Yu et al., 2005). L'analyse des patrons d'expression de la β -glucuronidase sous le contrôle du

promoteur d'*AtRALF14* permettent de confirmer la présence d'*AtRALF14* spécifiquement au niveau micropylaire à l'intérieur du sac embryonnaire. Excepté une faible coloration plutôt diffuse à l'intérieur de la cellule centrale, seul ce qui semble être les synergides montre un signe de l'expression du peptide (figure 26 d-e). L'analyse préliminaire de plantes exprimant *AtRALF14* sous le contrôle du promoteur viral constitutif CaMV35S a permis d'identifier certains problèmes survenant chez les plantes de surexpression. Des problèmes de développement ont été observés chez trois lignées indépendantes de la deuxième génération : deux lignées démontrent un phénotype de semi-nanisme alors qu'une troisième lignée montre un problème plus spécifiquement dans le développement

des bourgeons floraux (figure 27 a-d). Chez ce dernier, le développement du bourgeon semble être arrêté à la fin du stade de développement floral 11 : le pistil semble développé, mais les filets supportant les anthères ne sont pas encore allongés (figure 27 d)(Robinson-Beers et al., 1992). L'observation des ovules préalablement éclaircis au salicylate de méthyle au microscope en contraste interférentiel différentiel permet de déterminer que l'ovule semble être affecté au même moment. Des ovules montrant des téguments à peine initiés et une mégaspore mère (MMC) sont observés (figure 27 e). Les deux autres lignées de surexpression vont présenter des phénotypes légèrement

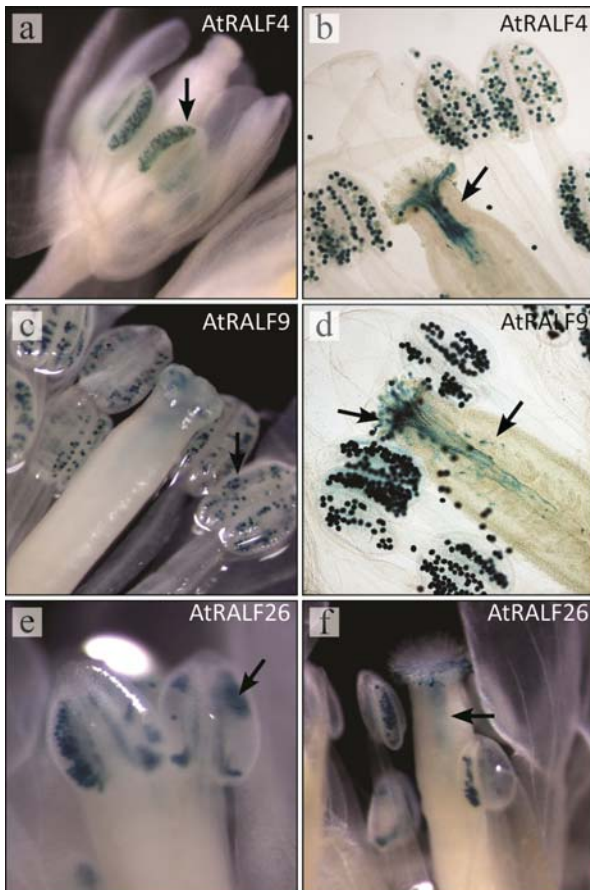


Figure 28 : Analyse colorimétrique de l'expression de certains *AtRALFs* spécifiques au pollen chez *Arabidopsis thaliana*.

(a-b) Expression par la β -glucuronidase sous le promoteur d'*AtRALF4*, *AtRALF9* et *AtRALF26* chez des bourgeons floraux spécifique au pollen (a, c et e) et au tube pollinique (b, d et f). Figures b et c éclaircies au salicylate de méthyle.

différents. La plante entière semble alors affectée par l'expression constitutive d'*AtRALF14* et aucune silique n'est produite quoi que le développement des bourgeons floraux ne soit pas compromis à première vue. Toutefois, l'analyse des ovules de fleur à l'anthèse en contraste différentiel permet d'observer des sacs embryonnaires comprenant un nombre anormalement élevé de noyaux (figure 27 f-g). Ces résultats préliminaires doivent être approfondis, mais l'implication d'*AtRALF14* dans le développement de l'ovule semble sans équivoque.

3.5.2 Des peptides de type RALF sont spécifiques au gamétophyte mâle chez *A. thaliana*

Si plusieurs membres de la famille des peptides de type RALF sont présents et possiblement impliqués dans le

développement du gamétophyte femelle, le gamétophyte mâle est aussi marqué par la présence de plusieurs RALFs. Des membres de la famille des RALFs sont d'ailleurs spécifiques au pollen et au tube pollinique. Les analyses à l'aide de la β -glucuronidase montrent une localisation de l'expression des peptides AtRALF4, AtRALF9 et AtRALF26 seulement au niveau du pollen (figure 28 a, c, e). Suite à l'auto-pollinisation, les tubes polliniques en croissance montrent aussi une forte coloration jusqu'à la fécondation (figure 28 b, d, f).

3.5.3 L'orthologue en séquence de *ScRALF3* chez *A. thaliana* a un patron d'expression semblable

Nous avons porté attention au gène le plus similaire en séquence à *ScRALF3* (80 % d'identité de la partie mature, tableau I) en espérant obtenir plus d'information sur la fonction de ce dernier. Trois mutants d'insertion (T-DNA) différents pour *AtRALF34* ont été analysés. L'insertion d'un fragment d'ADN connu à l'intérieur de l'ADN génomique a généralement comme

conséquence de perturber l'expression des gènes à proximité de cette insertion, le but ultime étant d'obtenir des mutants *perte-de-fonction* totale. Une banque de mutant d'insertion ayant été créée, il est relativement facile d'obtenir des plantes mutantes pour un gène particulier (Alonso et al., 2003). Les mutants utilisés dans cette étude possèdent une insertion à l'ADN génomique perturbant le promoteur à trois endroits différents : la lignée Salk_00097 (position -69pb), la lignée Salk_102494 (position-126pb) et la lignée Salk_55591 (position -382pb). Malgré une diminution de la quantité de transcrite d'*AtRALF34* détecté par analyse Northern (figure 29 a), aucun phénotype important n'est observé quant à la germination et la croissance (figure 29 b-d)(Chevalier, 2012).

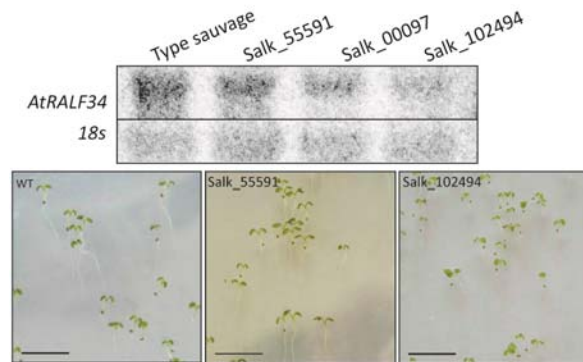


Figure 29 : La germination n'est pas affectée par la perturbation de l'expression d'*AtRALF34*.

(a) Analyse Northern d'*AtRALF34* présent dans 10 μ g d'ARN totaux extrait de plantules. Contrôle de l'ARN totale par puits avec une sonde contre l'ARN ribosomal 18S. Germination des plantules sur milieu MS des types sauvage (Col.) (b), de la lignée SALK_55591 (c) et de la lignée SALK_102494 (d). Barre de mesure = 1cm.

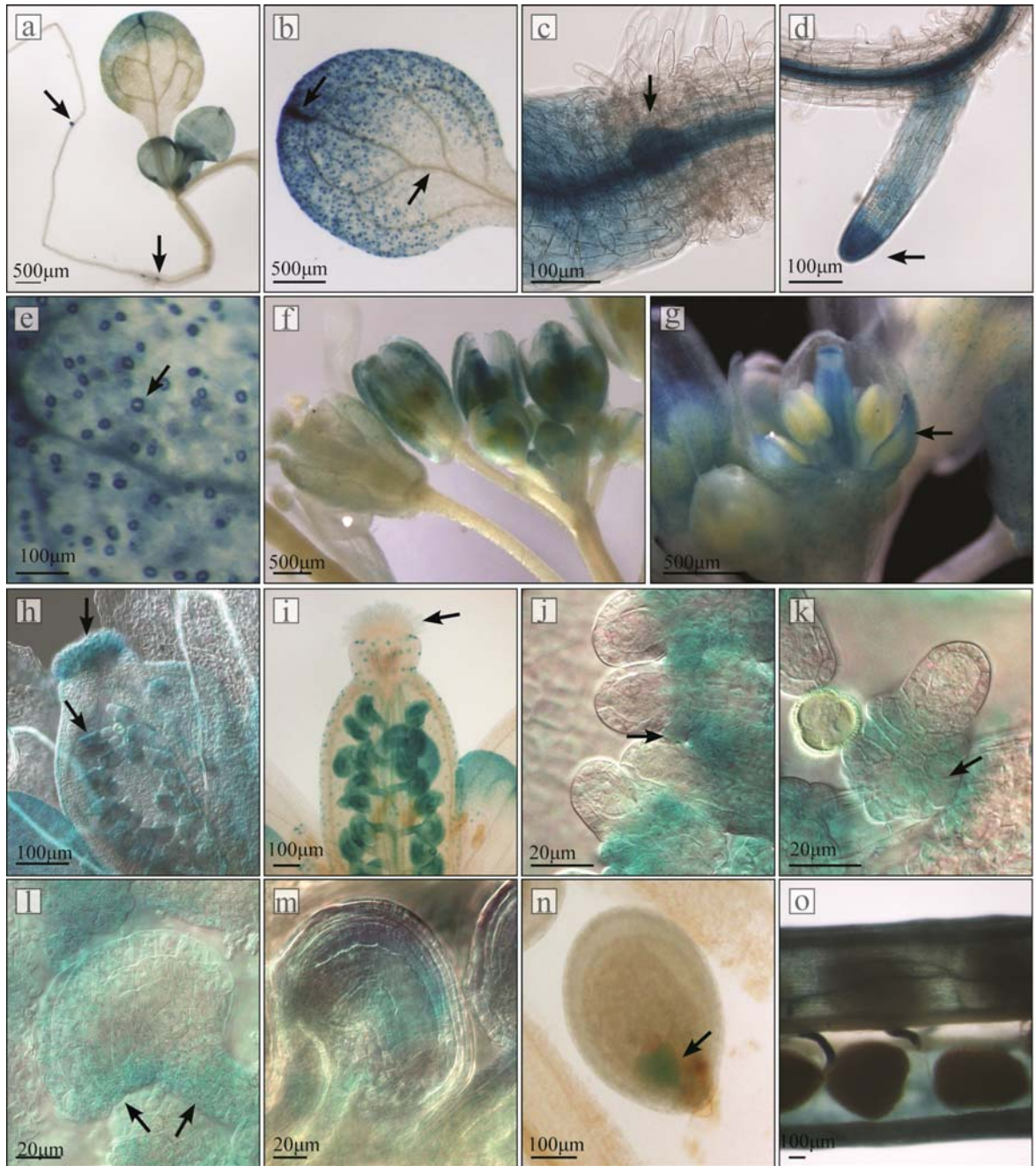


Figure 30 : Analyse colorimétrique de l'expression d'*AtRALF34* chez *Arabidopsis thaliana*.

Expression par la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur d'*AtRALF34* chez la plantule permet de voir l'expression du gène au niveau de l'initiation des racines latérales (a), de l'apex du cotylédon (b), de l'intersection entre l'hypocotyle et la racine (c), à l'apex de la racine latérale (d) ainsi qu'au niveau des stomates (e). Coloration des pétales et du pistil chez les bourgeons floraux (f-g). Suite au traitement au salicylate de méthyle, localisation spécifique de l'expression au niveau du jeune stigmate (h) et de l'ovule (h-i). Expression localisée à l'initiation des téguments chez les primordium d'ovule (j-k). L'expression reste au niveau des téguments, du nucelle et du funicule lors du développement de l'ovule (l-m). Expression au niveau de l'embryon (n) et des valves de la silique ainsi que du funicule lorsque mature (o). Figures h, j, k, l et m observées en microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC)

En dépit du peu d'impact de la perturbation de l'expression d'*AtRALF34* sur le développement, la production de plantes transgéniques comprenant la *β-glucuronidase* sous le promoteur d'*AtRALF34* à permet de déterminer qu'*AtRALF34* à tout de même un patron d'expression intéressant et très similaire à ce qui est observé pour *ScRALF3*.

AtRALF34 est exprimé de façon assez homogène à travers le temps chez la plantule (figure 30 a). Le peptide est exprimé chez les cotylédons et les feuilles et cette expression est plus intense à l'apex de la feuille (figure 30 b). Un point distinct entre l'hypocotyle et la racine apparaît dès le deuxième jour (figure 30 c). L'initiation et l'élongation des racines latérales sont aussi marquées par l'expression d'*AtRALF34* (figure 30 d). En observant les cotylédons de plus près, on peut voir que l'expression du gène est plus marquée au niveau des cellules de garde des stomates (figure 30 e).

En ce qui concerne les bourgeons floraux, *AtRALF34* est plus fortement exprimé dans les jeunes bourgeons (figure 30 f). Tout comme *ScRALF3*, *AtRALF34* est exprimé spécifiquement au niveau des pétales, du stigmate et des ovules (figure 30 g-i). L'expression d'*AtRALF34* semble circonscrite aux téguments. Chez les ovules à des stades très jeunes (MMC), le peptide est exclusivement présent sous la mégaspore mère (figure 30 j) et au niveau du primordium des téguments (figure 30 k). Lorsque l'ovule a atteint un stade mature, *AtRALF34* est toujours exprimé au niveau de l'apex des téguments ainsi qu'au niveau du funicule (figure 30 l-m). Suite à la fécondation, le peptide est exprimé chez l'embryon en développement (figure 30 n), mais aussi au niveau des valves de la silique (figure 30 o).

Le patron d'expression observé pour *AtRALF34* est très similaire à ce qu'on observe généralement pour les gènes de réponse à l'auxine : expression à l'apex des feuilles, à l'initiation et à l'apex des racines latérales, au niveau du stigmate de la fleur immature ... (résumé par Aloni et al., 2006; Teale et al., 2006). Pour vérifier l'effet de l'hormone sur l'expression du peptide, des traitements pour la *β-glucuronidase* sous le contrôle du promoteur d'*AtRALF34* furent fait sur des plantules d'une semaine ayant germé sur un milieu contenant du acide 1-N-Naphthylphthalamique (NPA), un inhibiteur du transport polaire de l'auxine. Sans le transport polaire, l'auxine ne peut être distribuée aux sites

habituels où elle induit l'expression des gènes de réponse et reste aux sites de biosynthèse. Les plantules ayant germé sur un milieu contenant l'inhibiteur vont présenter une plus forte expression d'*AtRALF34* au niveau des feuilles, particulièrement à l'apex, région de biosynthèse de l'auxine, et au niveau des tissus vasculaires en comparaison au contrôle (avec DMSO) (figure 31 a-b). L'inhibition du transport de

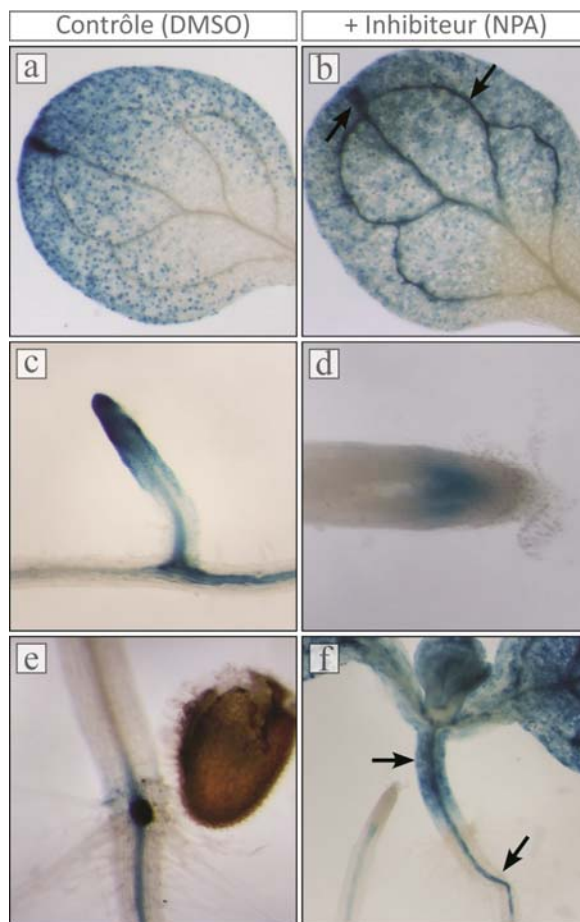


Figure 31 : L'expression d'*AtRALF34* est modulée par le transport polaire de l'auxine.

L'application d'un inhibiteur du transport polaire dans le milieu de germination (MS + NPA) affecte l'expression d'*AtRALF34* chez les plantules (b, d et f). Contrôle avec milieu de germination comprenant du DMSO (MS+DMSO). L'expression d'*AtRALF34* est induite aux lieux d'accumulation de l'auxine : dans les vaisseaux vasculaires de la feuille et à son l'apex (b), au niveau du méristème racinaire (d) et dans l'hypocotyle (f).

l'auxine empêche la formation des racines latérales, *AtRALF34* n'est donc plus localisé au site d'initiation des racines comme observé chez le contrôle (figure 31 c), mais une expression est parfois visible au niveau de l'apex de la racine principale (figure 31 d). Le point caractéristique entre l'hypocotyle et la racine disparaît avec l'effet de l'inhibiteur de transport de l'auxine. L'expression d'*AtRALF34* est alors retrouvée au niveau de l'hypocotyle, encore une fois où l'auxine se situe en absence de transport polaire (figure 31 e-f). Tous comme il était observé chez l'orthologue *ScRALF3*, *AtRALF34* semble être exprimé en réponse à l'auxine.

Malgré une absence de phénotype suite à la perturbation de l'expression d'*AtRALF34*, le peptide semble bel et bien être l'homologue de *ScRALF3*. Son patron d'expression similaire et leur réponse commune à l'auxine sont de bons indices appuyant cette hypothèse.

4. Discussion

La coordination du développement s'appuie principalement sur les communications entre cellules. Ces communications sont particulièrement importantes lors de la reproduction où plusieurs tissus différents doivent croître de manière synchronisée pour assurer la fonction reproductive. Pour assurer une descendance viable et assurer la survie de l'espèce, la plante doit pouvoir contrôler sa croissance au niveau cellulaire, du développement du sac embryonnaire et des téguments à celui du fruit et de l'embryon suite à la fécondation. Comme mentionnées précédemment, plusieurs preuves de ces communications ont été fournies par la communauté scientifique au fil des années. Si les hormones telles que l'auxine et la gibbérelline sont grandement impliquées dans le développement tant au niveau de l'ovule que du fruit, nous savons aujourd'hui que d'autres molécules signaux telles que des microARN ou des peptides sécrétés prennent part à cette coordination de la croissance (résumé par Chevalier et al., 2011).

Les peptides de la famille des RALFs et spécialement ScRALF3 et ses homologues s'inscrivent parfaitement dans ce contexte. Des peptides déjà caractérisés montrent déjà bien leur importance dans plusieurs aspects du développement. Les membres de cette famille isolés chez *S. chacoense* sont assez similaires à ceux déjà connus pour qu'on puisse poser l'hypothèse que leurs fonctions seront aussi semblables. Les données recueillies sur ScRALF3 permettent d'aller un peu plus loin et d'émettre l'hypothèse que ScRALF3 est un parfait candidat de molécule signalé impliquée dans cette coordination entre tissus en assurant la communication cellule-cellule particulièrement lors du développement de l'ovule.

4.1 Diversification de la famille des RALFs retrouvée chez *Solanum chacoense*

4.1.1 Comparaison de la famille des peptides de type RALF isolés chez *S. chacoense* et chez *S. tuberosum*

ScRALF3 fait tout de même partie d'une famille de gènes pour laquelle peu d'informations fonctionnelles sont connues. Les gènes de type RALF ont des rôles visiblement essentiels et variés dans le développement des végétaux. On retrouve des membres de cette famille à travers tout le règne végétal, des espèces plus anciennes (telle que chez le lycophyte *Selaginella moellendorffii*) aux espèces apparues plus récemment dans l'évolution (tel que plusieurs des angiospermes). Leur nombre augmente cependant de manière significative chez les angiospermes, et particulièrement chez les espèces eudicotylédones, après la séparation des monocotylédones et des eudicotylédones. L'ancêtre commun des eudicots aurait possédé environ cinq gènes de type RALF et une expansion de la famille aurait ensuite eu lieu avec les évènements de différenciations (Cao et Shi, 2012). Ceci permet de présumer des rôles similaires entre les différentes espèces, mais, aussi la présence de gènes et de fonctions plus spécifiques à certains groupes phylogénétiques.

Les données transcriptomiques obtenues chez la pomme de terre sauvage *S. chacoense* permettent d'identifier au moins 14 gènes de type RALF présents au niveau de l'ovule mature et du tube pollinique chez cette espèce (tableau 1, figure 8). Compte tenu de la nature de notre base de données formée à partir d'ARNm de tissus particuliers, il est impossible de déterminer si les gènes trouvés représentent l'entièreté de la famille ou seulement une partie des gènes retrouvés chez notre plante d'étude. Toutefois, le séquençage du génome complet d'un clone homozygote double-monoploïde de *S. tuberosum* du groupe Phureja (clone DM1-3 516R44 (DM)) permet de comparer les gènes trouvés chez notre plante d'étude et ceux trouvés chez la pomme de terre (PGSC, 2011). L'analyse BLASTN des gènes RALF connus chez *S. chacoense* et *A. thaliana* sur ces données de séquençage génomique permet d'isoler 15 gènes de type RALF chez

S. tuberosum. Chaque gène isolé chez *S. chacoense* peut être associé à une séquence retrouvée dans le génome de *S. tuberosum*, avec quelques réserves (figure 32). L'isotig31729 est par exemple regroupé avec deux gènes distincts. De plus, *ScRALF4* et *ScRALF5* forment plutôt un groupe avec les séquences PGSC0003DMC400002462 et PGSC0003DMC400002463 ainsi que les isotig00315 et 44819 forment un deuxième groupe avec les séquences PGSC0003DMC400021948 et PGSC0003DMC400026937 sans présenter une homologie unique évidente. Ces légères différences sont vraisemblablement dues à des événements de duplications plus récentes dans l'évolution des espèces. Mais de manière générale, le degré de similitude de séquence entre les orthologues potentiels chez les deux espèces est assez élevé (figure 33, tableau VIII)

Tableau VII : Familles des peptides de type *Rapid alkalisation factor* chez *S. tuberosum*

Sequences <i>S.tuberosum</i> (cds)	Orthologue chez <i>S.chacoense</i>	Similarité (%)	Identité (%)
PGSC0003DMC400002462	ScR5/ScR4/2463	59,3/60,5/63,5	51,3/50/53,9
PGSC0003DMC400002463	ScRALF4	91,3	89,6
PGSC0003DMC400007208	ScRALF3	100	100
PGSC0003DMC400008250	ScRALF1	88,8	87,5
PGSC0003DMC400017694	isotig51278	89,5	86,8
PGSC0003DMC400020130	isotig45761	100	100
PGSC0003DMC400021948	isotig44819	100	100
PGSC0003DMC400024278	Contig05842	100	100
PGSC0003DMC400026937	isotig44819/00315	63,8/65,4	53,1/53,8
PGSC0003DMC400034554	isotig37054	100	97,3
PGSC0003DMC400039616	isotig26341	97,8	97
PGSC0003DMC400042880	ScRALF2	99,1	0,991
PGSC0003DMC400045916	isotig51113	98,2	98,2
PGSC0003DMC400046167	isotig31729	68,7	58,6
PGSC0003DMC400046168	isotig31729	93,9	91,9

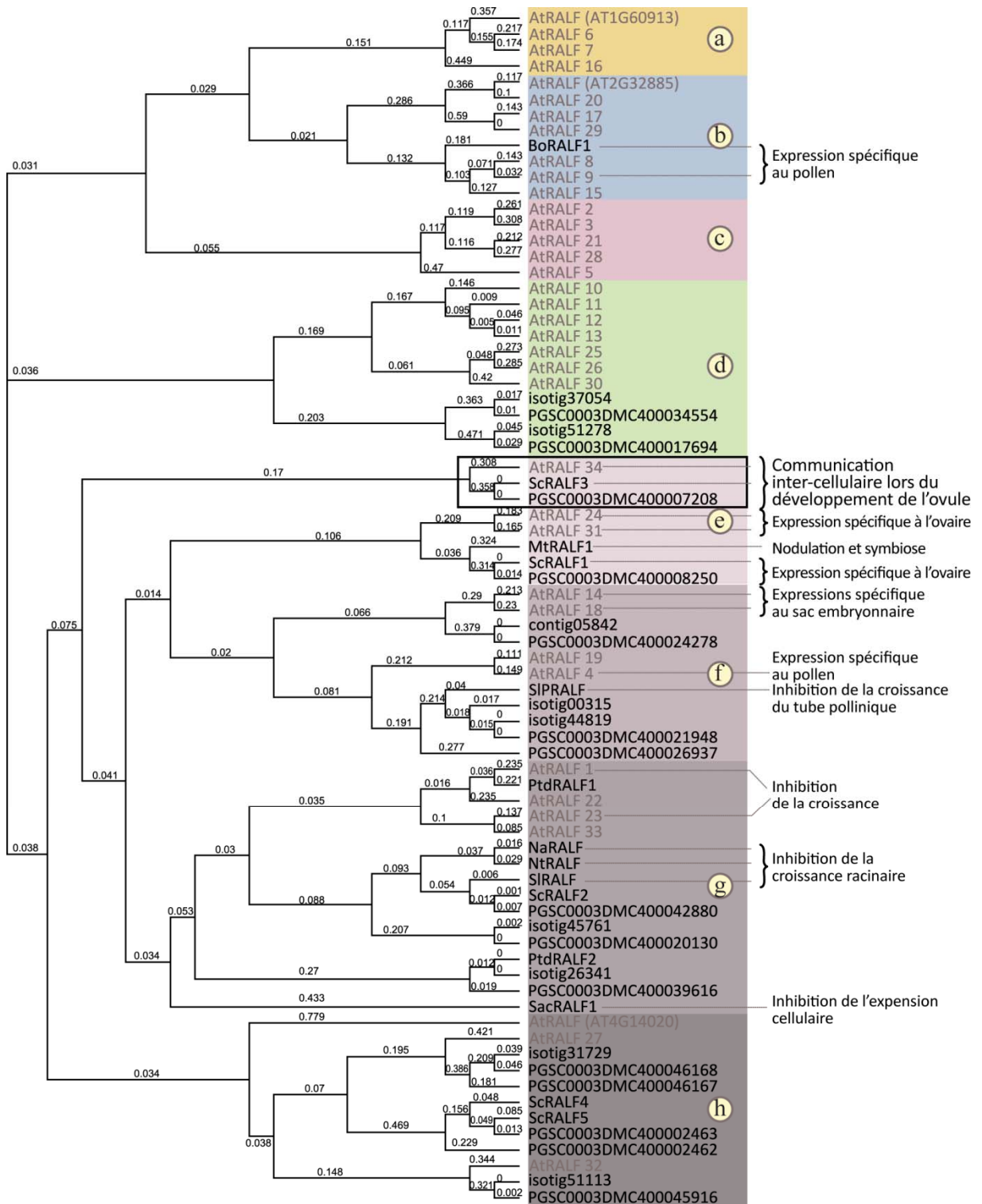


Figure 32 : Arbre de distance de la famille des peptides de type RALF

Arbre de distance Jukes-Cantor basé sur la séquence en acide aminé des peptides de type RALF retrouvé chez *S. chacoense*, *S. tuberosum*, *A. thaliana* et les peptides caractérisés selon le modèle de Neighbor-Joining. Le nombre de substitutions par site est indiqué sur les branches. Les sous-groupes indiqués correspondent à ceux de la figure 1 (p.15). Les fonctions connues sont indiquées à droite de l'image.

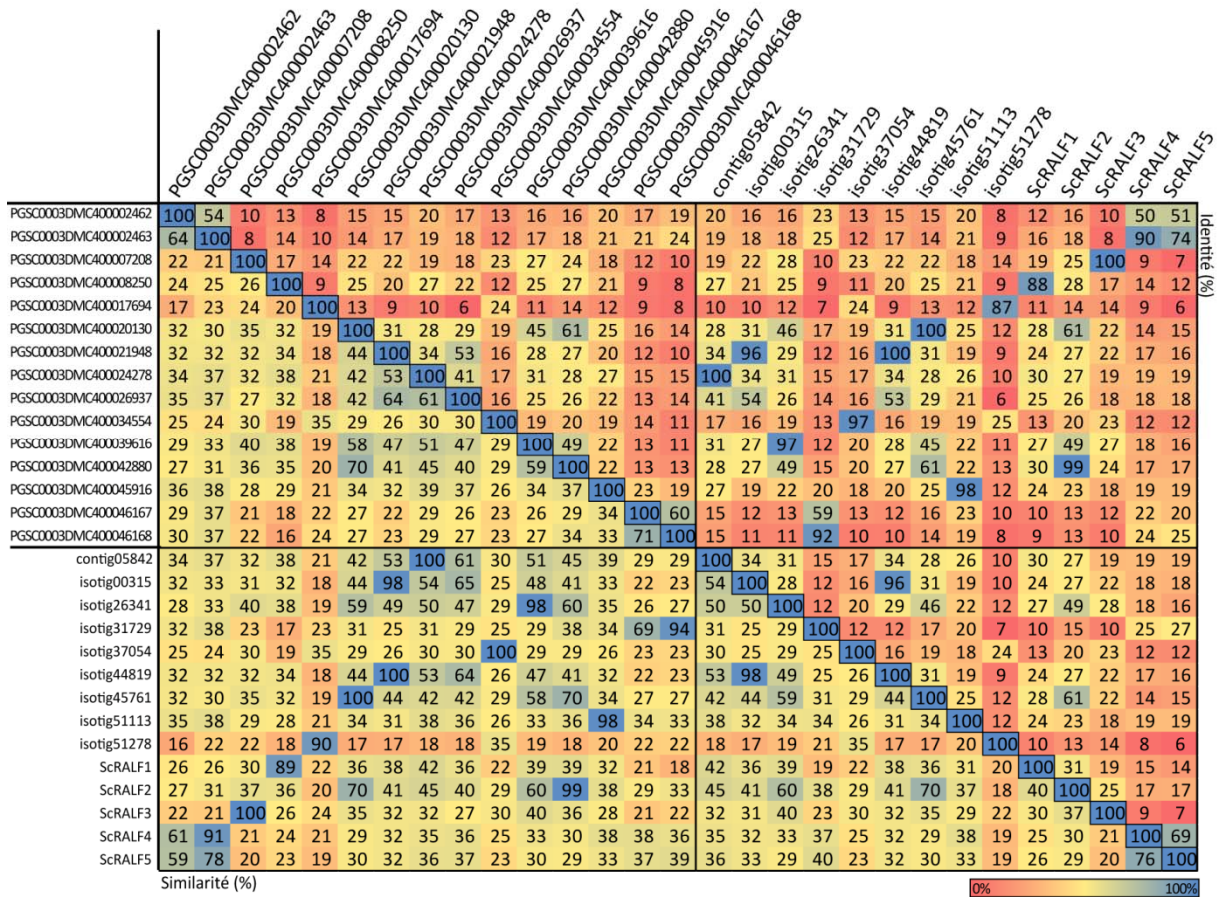


Figure 33 : Matrice de similarité entre les peptides de type *Rapid Alkalinisation factor* présents chez *S. tuberosum* et *S. chacoense*

Matrice de similarité et d'identité entre les séquences retrouvées dans le génome de *S. tuberosum* et celles du transcriptome de *S. chacoense* selon un *cost-matrix* Blosum62. Les séquences provenant du séquençage du génome complet d'un clone homozygote double-monoploïde de *Solanum tuberosum* du groupe Phureja (clone DM1-3 516R44 (DM)) sont disponibles par la base de données Sol Genomic Network (solgenomics.net/)(PGSC, 2011). Les noms relatifs aux séquences de celui-ci proviennent du dataset : *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 516R44 (CIP801092) Genome Annotation v3.4 (based on v3 superscaffolds); fichier PGSC_DM_v3.4_cds.

En comparaison, la plante modèle *A.thaliana* possède entre 34 et 37 gènes de type RALF malgré un génome plus petit (Olsen et al., 2002)(NCBI). L'expansion de la famille chez *A. thaliana* (et possiblement les autres Brassicacées dans la mesure où il y a homologie entre BoRALF1 et AtRALF8/AtRALF9) a visiblement mené à la formation, ou du moins fortement à l'enrichissement, des sous-groupes a, b et c, absent chez les deux espèces de *Solanum* (figure 32). Le sous-groupe *D* est de plus surreprésenté chez *A. thaliana*. Les relations phylogénétiques entre les RALFs de plusieurs espèces montrent clairement la formation de sous-groupes qui sont espèces-spécifiques (Cao et Shi, 2012).

Les peptides exprimés sous forme de proprotéines forment la grande majorité des RALFs retrouvés chez *S. chacoense*, seulement deux des peptides identifiés ne possèdent pas de propeptide alors que plus de 62 % des RALFs chez *Arabidopsis* (23/37) ne détiennent que le peptide mature à la suite du peptide signal. Ceci reflète aussi ce qui est observé chez le riz, le maïs et le peuplier où peu ou même aucun gène de type RALF des sous-groupes *A*, *B*, *C* et *D* sont répertoriés (Cao et Shi, 2012).

La présence de prodomaine présuppose le clivage du peptide pour permettre la production du peptide mature et fonctionnel. Comme déjà mentionné, le motif -RRxL- est un site reconnu de manière générale par des protéases de la famille des subtilisines qui est retrouvée chez la majorité des propeptides. Si le site dibasique formé des deux arginines suivies d'une leucine un acide aminé plus loin est bien conservé chez les RALFs avec propeptides d'*Arabidopsis* (seulement deux exceptions sur 14 protéines, AtRALF18 et AtRALF32), le motif est cependant moins bien conservé chez *S. chacoense*. L'isotig31729 ne possède aucun site dibasique lié aux motifs pouvant être reconnu par une subtilisine et quatre peptides vont plutôt afficher un motif -xRxL-. Ce dernier motif est cependant reconnu par S1P chez l'humain et fort probablement par ses orthologues tels qu'AtSBT6.1 chez *Arabidopsis* qui est effectivement essentiel à la maturation d'AtRALF23 et possiblement d'AtRALF1 (Matos et al., 2008; Schaller et al., 2012; Srivastava et al., 2009). Ces légères modifications au site canonique généralement reconnu par les orthologues de S1P peuvent signifier que plus d'une subtilisine est impliquée dans le clivage et la maturation des peptides de type RALF, ajoutant ainsi un

deuxième degré de contrôle et de spécificité de l'action de ces molécules signaux. Considérant la taille de la famille des subtilisines chez les plantes et la spécificité de leur substrat, cette hypothèse est plus que plausible. Cinquante-six subtilases sont identifiées chez *A. thaliana*, regroupées en six sous-familles et ayant tous des patrons d'expression spécifique (Rautengarten et al., 2005; Schaller et al., 2012). Une deuxième possibilité, quoi que moins probable, est que la subtilisine impliquée dans la maturation des peptides de type RALF chez *S. chacoense* possède une moins grande spécificité quant au site de clivage.

4.1.2 Mise en contexte des peptides RALFs isolés chez *S. chacoense* et ceux déjà caractérisés

Les relations identifiées par analyses phylogénétiques entre les peptides de type RALF connu et ceux retrouvés chez *S. chacoense* permettent d'émettre des hypothèses quant à leur fonction chez notre plante d'étude. Par exemple, le contig05842 est rattaché aux gènes spécifiques du sac embryonnaire chez *A. thaliana*, AtRALF14 et AtRALF18 (figure 32), on peut supposer que ce serait aussi le cas pour le peptide de *S. chacoense*. Cependant, l'analyse de la séquence de ces peptides démontrent une importante délétion dans la partie mature du peptide chez ceux d'*A. thaliana* alors que le contig05842 et son homologue chez la pomme de terre semblent complet. Une étude complète serait donc nécessaire pour déterminer l'activité de chacun. Dans un même ordre d'idée, les isotig00315 et isotig44819 sont plutôt liés aux peptides spécifiques au pollen chez *A. thaliana*, mais aussi chez la tomate. SIPRALF est nécessaire à la régulation de la croissance du tube pollinique (Covey et al., 2010). Un rôle similaire pourrait être envisagé pour les deux peptides présents chez la plante d'étude.

ScRALF2 est quant à lui très similaire en séquence aux peptides impliqués dans la croissance racinaire retrouvés chez la tomate et les espèces de tabac (figure 32). Ayant un patron d'expression assez ubiquitaire dans la plante (Germain et al., 2005), il n'est pas farfelu de croire en un rôle similaire pour ScRALF2. Si on ajoute les autres peptides caractérisés du sous-groupe g, aussi impliqué dans la régulation de la croissance, on pourrait aller jusqu'à supposer un rôle plus global de ce sous-groupe dans la croissance générale de la plante.

Néanmoins, il faut rester vigilant lors qu'on extrapole ainsi des fonctions ou des rôles possibles basés seulement sur les similarités de séquence. L'exemple de ScRALF1 est probant dans ce sens. Il a déjà été démontré que ce dernier est spécifique à l'ovaire (Germain et al., 2005), tout comme ces orthologues chez *A. thaliana* (figure 26). Malgré tout, ScRALF1 est mis en relation avec MtRALF1, qui lui a été identifié comme impliqué dans les interactions symbiotiques lors de la nodulation chez la luzerne (Combiér et al., 2008) alors que *ScRALF1* n'est pas exprimé dans le système racinaire.

Bien que tout ceci ne reste que spéculation, il est intéressant de pouvoir tisser ainsi des liens entre les différents membres de la famille des RALFs issus de différentes espèces. Si la fonction de ces derniers reste encore assez nébuleuse, un dessin global est clairement en train d'émerger des recherches sur le sujet. Par exemple, la présence de plusieurs peptides différents dans l'ovaire et le gamétophyte femelle pique certainement l'intérêt. Chez la plante modèle *A. thaliana*, au moins cinq peptides de type RALF différents y sont exprimés spécifiquement. De plus, leurs patrons d'expression semblent complémentaires. *AtRALF24* et *AtRALF31*, les plus proches orthologues en séquence de *ScRALF1*, sont exprimés plus spécifiquement dans le péricarpe de l'ovaire (figure 26). *AtRALF34*, l'orthologue de *ScRALF3*, est quant à lui moins caractéristique de l'ovaire seulement, mais possède un patron d'expression particulièrement distinctif au niveau de l'ovule et des tissus sporophytiques (figure 30). Et pour finir, *AtRALF14* et *AtRALF18* sont quant à eux exprimés spécifiquement dans le sac embryonnaire (figure 26 et Wuest et al., 2010). On observe quelque chose de semblable du côté du gamétophyte mâle où plusieurs *AtRALF* y sont spécifiquement exprimés (figure 28). Jusqu'à maintenant, les rôles suggérés pour les *Rapid alkalisation factor* sont plutôt liés à la croissance générale ou plus spécifiquement au niveau de la racine (figure 32). Toutefois, il est évident que certains de ces peptides ont des rôles beaucoup plus spécifiques et jouent un rôle dans le développement des gamétophytes mâle et femelle. La présence de plusieurs peptides de la même famille est souvent reliée à une certaine redondance fonctionnelle, telle que c'est le cas avec les familles où l'expansion est due à des événements de duplication. Des gènes de structure similaire peuvent alors se seconder suite à la déficience d'un autre bien que chacun ait fort probablement un rôle spécifique. C'est par exemple le cas pour les gènes *CLE* qui

codent aussi pour de petits peptides. Seul le mutant *clv3* produit un phénotype visible sur les 32 membres de cette famille. *CLE40*, qui est exprimé faiblement dans tous les tissus de la plante, réussit d'ailleurs à compléter le mutant *clv3* lorsque mis sous le contrôle du promoteur de *CLV3*. Le faible taux d'expression endogène de *CLE40* expliquerait son incapacité à compléter la mutation de *CLV3* (Hobe et al., 2003; Wang et Fiers, 2010). C'est possiblement aussi le cas pour les peptides de type RALF impliqués dans le développement des gamétophytes.

4.1.3 Qu'en est-il de *ScRALF3* ?

Et c'est justement dans le développement du gamétophyte femelle où semble s'inscrire la fonction première de *ScRALF3*. Les analyses phylogénétiques classent *ScRALF3* et ses homologues de séquence de manière assez distincte et en retrait des autres membres du dernier groupe (figure 32). Des analyses plus poussées permettent de déterminer que ce groupe semble spécifique aux eudicotylédones puisqu'aucun orthologue en séquence n'est retrouvé chez le riz ou le maïs. *ScRALF3* ainsi que ses homologues sont donc classés dans un groupe à part (groupe VIII) par Cao et Shi (2012).

En ce qui a trait à la séquence en acide aminé du gène *ScRALF3*, ce dernier correspond tout à fait à ce qu'on trouve chez les autres membres du dernier groupe phylogénétique. *ScRALF3* possède un peptide signal, un prodomaine et un peptide mature composé des caractéristiques habituelles, excepté deux petits bémols. Le site dibasique possiblement reconnu par la subtilase permettant la maturation du peptide a subi une mutation R->G (GRSL). Cette mutation, absente chez l'homologue d'*A. thaliana*, est aussi présente chez l'homologue en séquence de la pomme de terre. Toutefois, cette mutation ne semble pas affecter la maturation du peptide. *ScRALF3* est bel et bien maturé via le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion classique. L'expression transitoire de la construction *ScRALF3-HDEL-GFP* dans des cellules d'oignon permet de prouver le passage du peptide par le réticulum endoplasmique (Chevalier, 2012; Chevalier et al., 2012). Tel que mentionné auparavant, le motif -xRxL- est aussi reconnu par la subtilase S1P humaine (Rautengarten et al., 2005). La deuxième différence se situe au niveau du motif -GASSY-

où une mutation A-> R semble avoir eu lieu. Cette mutation est aussi visible chez AtRALF34 ainsi qu'AtRALF4 et AtRALF19.

Outre l'analyse phylogénétique, l'étude de la séquence promotrice du gène permet d'avoir une meilleure idée des régions et des circonstances dans lesquelles *ScRALF3* pourrait avoir un impact important. La comparaison de la séquence promotrice isolée chez *S. chacoense* à celle retrouvée chez la pomme de terre et chez la tomate mène à la conclusion que cette dernière est scindée en deux par un élément provenant d'un évènement de recombinaison (figure 11). Suite au retrait d'un transposon par recombinaison intraélément, une séquence terminale longue répétée (LTRs) est généralement retrouvée (Kejnovsky et al., 2012). C'est ce qu'on observe à l'intérieur du promoteur de *ScRALF3*. Cette insertion ne semble toutefois pas perturber l'expression du gène d'intérêt outre mesure. L'analyse du patron d'expression de *ScRALF3* et de son homologue chez *A. thaliana*, *AtRALF34*, par analyses colorimétriques avec la β -glucuronidase permet de visualiser que celui-ci est très similaire malgré la divergence des espèces et l'élément transposable (figures 14 à 19 et figures 30 et 31). Deux hypothèses sont alors possibles : soit l'insertion ne perturbe pas la liaison des facteurs de transcription et autres facteurs de régulations sur la séquence promotrice de *ScRALF3*, soit seule la partie proximale au gène revêt une réelle importance dans la régulation de l'expression. Des analyses plus précises seraient nécessaires pour démystifier l'importance des différentes régions du promoteur, et donc de tous les motifs identifiés (figure 12). Ceux-ci semblent toutefois relier fortement la régulation de *ScRALF3* en fonction du développement et de la présence de certaines hormones particulières; ce qui est prouvé par de plus amples analyses expérimentales, tel que démontré dans ce mémoire.

4.2 *ScRALF3* est exprimé de manière polarisée lors du développement

Les peptides de la famille *Rapid alkalisation factor* sont impliqués dans le développement et la croissance. *ScRALF3* ne fait pas exception. Son patron d'expression, déterminé tant par analyses Northern, par analyses colorimétriques de l'expression ou

par la localisation du transcrit, démontre que *ScRALF3* est très présent dans plusieurs tissus en développement. Et bien qu'il soit présent dans plusieurs tissus différents (racines, feuilles, plusieurs parties de la fleur (Germain et al., 2005), son expression est polarisée au niveau de tous ces tissus.

La croissance de tout tissu, reproductif ou non, nécessite un contrôle étroit pour assurer la morphologie et surtout la fonction de ce tissu. Plusieurs voies de signalisation intra- ou intercellulaire assurant la coordination du développement sont caractérisées. L'auxine en est un exemple probant, bien qu'elle ne soit pas la seule. La présence des transporteurs de l'hormone de manière précise à travers la plante permet l'accumulation de l'auxine aux apex de celle-ci et dirige ainsi la croissance. L'observation la plus convaincante de ce phénomène est la concentration de l'hormone aux sites d'initiation des racines auxiliaires ou encore des futurs cotylédons chez l'embryon (résumé par Moller et Weijers, 2009; Teale et al., 2006). Ceci permet alors d'avoir une action précise et d'induire la croissance de manière méthodique à certaines cellules seulement.

L'expression de *ScRALF3* est finement régulée tout au long du développement du bourgeon floral et spécialement au niveau de l'ovaire et des ovules. L'expression du peptide est élevée dès le début de la mégasporogénèse et diminue lors de la mégagamétogénèse pour atteindre un niveau quasi nul à l'anthèse. Suite à la pollinisation, l'expression de *ScRALF3* augmente de nouveau pour atteindre un maximum de huit à douze jours après la fécondation et diminue par la suite (figure 18 a). Ce patron d'expression dans le temps ressemble à ce que l'on peut observer pour l'auxine lors du développement de l'ovaire et du fruit (Mapelli et al., 1978). La localisation de l'expression du peptide est d'ailleurs très similaire à celui des gènes de réponse à l'auxine en plusieurs endroits dans la fleur. Chez la plante modèle *Arabidopsis*, les jeunes bourgeons floraux renferment un haut taux d'auxine conjuguée et la concentration d'hormone libre augmente graduellement à partir de l'apex des divers organes (particulièrement au niveau des pétales et des sépales), lors de la formation des tissus conducteurs et dans les gamétophytes en développement (Aloni et al., 2006).

C'est ce qui est observé aussi en ce qui concerne *ScRALF3* chez la corolle où le peptide est exprimé à l'apex des pétales lors de leur développement tant que ceux-ci sont soudés (figure 15 e-f). À la différence de ce qui est attendu cependant, le calice ne montre pas vraiment d'expression polarisée du peptide. On observe plutôt une expression à la jonction des sépales sur le pétale, ce qui n'est pas caractéristique des gènes de réponse à l'auxine. D'autres indices laissent pourtant supposer l'importance de *ScRALF3* à l'apex d'organes en croissance. L'orthologue en séquence chez *A. thaliana* (*AtRALF34*) possède un patron d'expression comparable au peptide de *S. chacoense* au niveau de la fleur. On retrouve aussi une expression très marquée à l'apex de la feuille ainsi qu'au site d'initiation et à l'apex de la racine latérale (figure 30 a-d), comme observé chez les gènes de réponse à l'auxine (Benková et al., 2003; Mattsson et al., 2003).

L'endroit le plus intéressant d'expression laissant supposer une direction de la croissance est toutefois au niveau de l'ovule et du ou des tégument(s). Autant *ScRALF3* que son homologue sont exprimés dans le tissu sporophytique de l'ovule lors du développement (figure 18, 19 et 30). L'expression polarisée de ceux-ci lors du développement en plus des effets de la perturbation de l'expression du peptide au niveau du gamétophyte femelle permet d'émettre l'hypothèse de l'implication de *ScRALF3* dans la coordination du développement entre le sac embryonnaire et le(s) tégument(s). Cependant, ce patron d'expression se dissocie des gènes de réponse à l'auxine. L'hormone, tout d'abord retrouvée au niveau du nucelle dans les stades précoces du développement (jusqu'au début des étapes de mitose, stade FG3), passe rapidement à l'intérieur du sac embryonnaire pour y former un gradient dans l'axe micropylaire-chalazale. Ce gradient est essentiel et permet entre autres l'établissement du destin cellulaire des cellules du sac embryonnaire (Pagnussat et al., 2009). Cette dissociation entre le patron de réponse à l'hormone et *ScRALF3* laisse à penser un rôle très spécifique pour le peptide.

Mais d'autres liens existent encore entre *ScRALF3* et l'auxine. L'hormone est de plus reconnue pour son implication dans la mise en place des tissus conducteurs à travers la plante. La différenciation vasculaire lors du développement du gynécée est

particulièrement importante et repose en partie sur l'action de l'hormone. Chez *A. thaliana*, le stigmate produit une grande quantité d'auxine permettant la formation du xylème dans le style, essentiel au transport de l'eau permettant l'hydratation des grains de pollen suite à la pollinisation (Aloni, 2010). Encore une fois, c'est ce qu'y est observé dans l'expression de *ScRALF3* : une forte expression dans le stigmate qui perdure jusqu'à environ une journée avant l'anthèse (figure 14). L'expression y est encore une fois très polarisée et varie avec le stade de développement (figure 14 j-l). Chez *A. thaliana*, l'auxine semble rester dans les papilles du stigmate jusqu'à la pollinisation et ensuite se retrouve dans le style (Aloni et al., 2006). Toutefois, le pistil est légèrement différent chez les Solanacées : le stigmate ne comporte pas de papilles aussi développées et le style est indubitablement plus long. Ces différences résident principalement dans le fait qu'*Arabidopsis* possède un stigmate sec alors que les espèces des *Solanaceae* ont plutôt des stigmates dits humides. Cette différence affecte la physiologie du stigmate, mais aussi les mécanismes moléculaires sous-jacents à la pollinisation, ce qui se traduit par un transcriptome spécifique différent (Quiapim et al., 2009). Donc, bien que l'expression de *ScRALF3* ne perdure pas jusqu'à la pollinisation, comme observé chez les gènes de réponses à l'auxine chez *A. thaliana*, et disparaît avant l'anthèse, il faut être prudent lors de la comparaison entre les deux espèces. Dès lors que *ScRALF3* est exprimé dans d'autres tissus, il est cohérent d'y voir un lien entre l'action connue de l'auxine et *ScRALF3* au niveau du stigmate. Il faut néanmoins noter que la perturbation de l'expression de *ScRALF3* n'a aucun effet sur le développement du pistil ou sur la germination ainsi que la croissance du tube pollinique suite à la pollinisation avec du pollen de type sauvage (données non présentées). On observe tout de même l'expression qui est transférée au haut du style. Puisqu'à ce moment le style subit un stress mécanique (il continue sa croissance malgré l'espace restreint à l'intérieur du bourgeon floral toujours fermé à ce stade), l'expression est possiblement due à ce stress puisque l'expression de *ScRALF3* est sensible aux blessures (figure 15 g).

Un autre endroit où la formation et la différenciation des tissus vasculaires sont d'une importance capitale est le réceptacle. C'est à cet endroit que les vaisseaux liant les divers organes de la fleur au reste de la plante se forment. *ScRALF3* est exprimé spécifiquement

au niveau des vaisseaux reliant l'ovaire et les anthères au pédicelle (figure 16). L'expression de *ScRALF3* se poursuit au niveau des tissus vasculaires dans l'ovaire et l'anthère eux-mêmes : le transcrite est fortement présent au niveau des vaisseaux du filet de l'anthère et ceux présents dans le placenta. La présence du peptide, du moins à en juger par le patron d'expression du gène, va jusqu'au funicule de l'ovule (figure 19-20). La spécificité de *ScRALF3* aux vaisseaux vasculaires relatifs aux organes reproducteurs laisse à penser à un rôle non pas dans la formation des vaisseaux, mais à un rôle plus précis au niveau de la reproduction.

Toujours en lien avec l'auxine, les grains de pollen vont accumuler un haut niveau d'auxine libre lors de leur maturation. Le tapetum de l'anthère va aussi produire de l'auxine dans les jeunes stades de développement (Aloni et al., 2006). Les grains de pollen mature à l'anthèse vont aussi contenir une quantité d'auxine (Ljung et al., 2002). Fait intéressant, le développement des grains de pollen va aussi être affecté par la perturbation de l'expression de *ScRALF3* (figure 17).

4.1.1 L'expression de *ScRALF3* est régulée de manière indirecte à la présence d'auxine

Bien que plusieurs signes nous montrent le lien entre l'auxine et *ScRALF3*, quelques différences majeures portent à réflexion. Comme mentionné, *ScRALF3* est exprimé dans le tégument lors du développement de celui-ci et cette expression subsiste à un plus faible niveau. L'analyse du patron de réponse à l'auxine à l'aide du gène rapporteur DR5-GUS chez *A. thaliana* suppose plutôt que l'hormone est retrouvée dans le sac embryonnaire dès le stade FG2 (Pagnussat et al., 2009). Néanmoins, on observe un patron similaire pour l'orthologue *AtRALF34* qui est lui aussi exprimé majoritairement dans les téguments (avec une faible présence dans le nucelle).

Pourtant, les deux gènes homologues réagissent bel et bien à l'hormone. En plus du patron d'expression similaire au patron de distribution de l'auxine dans la fleur, l'expression de *ScRALF3* est liée aux événements postfécondation, et ce en présence d'auxine particulièrement. La présence du transcrite dans l'ovaire suite à la fécondation était déjà connue (Germain et al., 2005), mais la régulation du transcrite n'est pas

contrôlée par le développement du fruit en général, mais à l'évidence par les événements de signalisation dirigés par l'auxine. L'effet de l'inhibiteur du transport polaire de l'auxine NPA sur l'expression d'*AtRALF34* démontre aussi très visuellement l'action de l'hormone sur l'expression du peptide.

D'autre part, peu de motifs reliés à la réponse à l'auxine se trouvent dans le promoteur. Quatre motifs minimaux ou partiels (2x -TGTC-, 1x -TGTCT- et 1x -TGTC-CC-) et un seul motif AuxRR complet (-ATGGACC-) sont retrouvés dans la séquence promotrice de *ScRALF3* (figure 13 et tableau II). Les promoteurs des gènes homologues chez la pomme de terre et chez la tomate possèdent un nombre similaire de motifs (trois motifs partiels ainsi qu'un complet et cinq partiels et un complet respectivement), tout comme le promoteur de l'orthologue en séquence *AtRALF34* chez l'espèce plus éloignée *A.thaliana* (trois motifs partiels et un complet). Le motif minimal -TGTC- semble essentiel à la liaison des facteurs de transcription ARF et donc à la réponse à l'auxine alors que le motif AuxRR permet un contrôle de l'amplitude de la réponse (Ulmasov et al., 1997; Ulmasov et al., 1995; Walcher et Nemhauser, 2012). Bien que ces motifs soient une bonne indication du rôle de l'auxine dans la régulation de l'expression, certains gènes connus pour répondre à l'hormone n'en possèdent aucun et suppose plutôt un contrôle indirect (Nemhauser et al., 2004). De plus, la présence de seulement quatre motifs minimaux dans le promoteur de *SAUR15* permet d'avoir une réaction à l'auxine bien que la séquence promotrice de ce gène en contienne normalement onze (dont neuf sont des sites minimaux)(Walcher et Nemhauser, 2012).

D'autres motifs présents dans la séquence promotrice de *ScRALF3* peuvent être reliés à l'induction de l'expression en présence d'auxine. Le site reconnu de liaison de NtBBF1, un facteur de transcription de type DOF identifié chez *N. tabacum*, est retrouvé à deux reprises dans le promoteur (-ACTTTA-). Ce facteur de transcription est impliqué dans la réponse à l'auxine chez le tabac et chez *A. thaliana* (Baumann et al., 1999; Nemhauser et al., 2004). De plus, des motifs reliés à des facteurs de transcription MYC enrichis dans les gènes de réponse à l'hormone sont aussi retrouvés en amont du gène *ScRALF3* (Berendzen et al., 2012). Les motifs MRE1 et MRE2 (tableau III) et les éléments RY

(tableau II), qui sont aussi impliqués dans la réponse à l'acide abscissique et dans le développement de la graine, sont plus particulièrement retrouvés dans la première portion du promoteur. Leur mode d'action est encore nébuleux, mais leur plus grande présence, particulièrement de l'élément rare RY, dans les promoteurs de gènes de réponse à l'auxine ainsi que dans celui de *ScRALF3* est intéressante.

Que l'expression de *ScRALF3* soit directement liée à l'auxine ou plutôt indirectement, elle est sans équivoque reliée à l'hormone. Mais puisque le patron n'est pas tout à fait similaire à ce qu'on pourrait attendre d'un gène de réponse à l'auxine, l'hypothèse que l'expression de *ScRALF3* soit plutôt indirectement induite par l'hormone devient un peu plus séduisante. Ce scénario permet en outre un deuxième niveau de contrôle qui permet de préciser la présence du peptide et ainsi affiner son rôle potentiel.

4.3 La présence de *ScRALF3* est essentielle lors du développement du gamétophyte femelle

En accord avec le patron d'expression fortement régulée selon le développement du gamétophyte femelle et du fruit, *ScRALF3* semble effectivement impliqué lors des premières étapes autant du développement de l'ovule que du jeune fruit puisque la perturbation de l'expression de celui-ci affecte de manière importante leur développement à tous les deux (figure 9 et figures 21 à 25). Ces étapes sont cruciales au bon fonctionnement de la reproduction et sont hautement régulées par plusieurs voies de signalisation cellule-cellule (résumé par Chevalier et al., 2011). Ces communications cellule-cellule nécessitent la présence de molécules signaux pouvant faire le lien entre les différents tissus et *ScRALF3* est un excellent candidat pour induire ce type de communication.

Au niveau du fruit, la sous-régulation de *ScRALF3* amène un phénotype de petits fruits. Dans le temps, le peptide possède un pic d'expression de huit à douze jours après la pollinisation. Cette période de temps correspond de manière générale à une période majoritairement de division cellulaire contrôlée plus particulièrement par l'auxine (Bünger-Kibler et Bangerth, 1982; Mapelli et al., 1978). Le phénotype observé chez le fruit

va pourtant plutôt se produire entre dix à quinze jours après la pollinisation, ce qui est après la présence de *ScRALF3* et vers la fin de la période de division. De plus, le sac embryonnaire étant grandement affecté lors de son développement, très peu de graine contenant un embryon est observée.

Il y a cependant un bémol : le phénotype de petits fruits est fréquent chez les mutants ayant des fruits sans graines. L'embryon en formation produit des hormones nécessaires au développement du fruit complet (Bünger-Kibler et Bangerth, 1982; Varga et Bruinsma, 1976). Il est alors difficile de distinguer l'effet produit par l'absence de *ScRALF3* dans le fruit et celui produit par l'absence de graine lors du développement de celui-ci. Ceci n'implique pas nécessairement que *ScRALF3* n'est pas impliqué dans le développement du fruit. L'analyse colorimétrique de l'expression de *ScRALF3* montre bel et bien sa présence dans les tissus vasculaires du fruit en développement ainsi que dans le tégument et dans l'embryon à un stade plus avancé (figure 20). De plus, il est à noter que l'observation du phénotype se fait après le pic d'expression, tout comme dans l'ovule. Le phénotype observé est probablement un mélange des deux effets, bien que de plus amples analyses soient nécessaires pour s'en assurer.

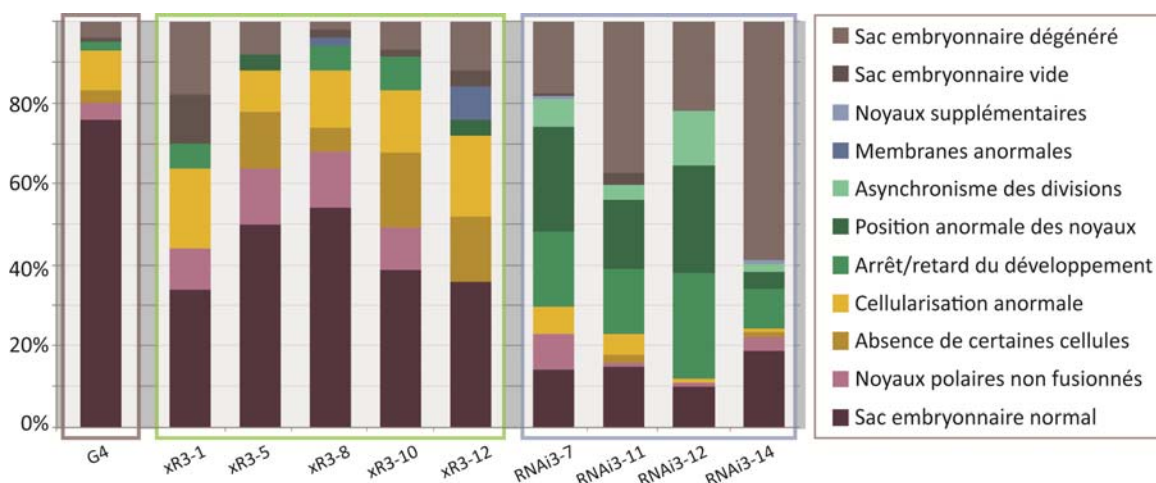


Figure 34 : La perturbation de l'expression de *ScRALF3* et sa surexpression affecte le développement du sac embryonnaire

La surexpression de *ScRALF3* affecte l'intégrité de la cellularisation alors que les mutants d'interférence démontrent des problèmes de division cellulaire. Les données utilisées sont les mêmes que celles présentées dans la section résultats.

L'importance de *ScRALF3* est sans conteste plus probante dans le développement de l'ovule. La mise en commun des observations faites sur les ovules des mutants d'interférence ainsi que ceux des mutants de surexpression permet d'avoir une vue plus globale du rôle de *ScRALF3* dans le développement de l'ovule. La surexpression du peptide affecte visiblement les mécanismes impliqués dans la cellularisation des cellules du sac embryonnaire alors que la perturbation de son expression joue sur les divisions mitotiques et la polarisation du gamétophyte (figure 34). Chez les mutants d'interférence, une série de problèmes reliée au positionnement des noyaux du sac embryonnaire et à la synchronisation de leurs divisions mitotiques, menant à l'arrêt éventuel du développement, est observée (figures 21 à 25). Plusieurs exemples de mutations causant un arrêt ou une perturbation du développement du sac embryonnaire sont répertoriés à ce jour et plusieurs d'entre eux affectent particulièrement le cycle cellulaire (résumé par Liu et Qu, 2008). Certains vont perturber les divisions méiotiques dès la mégasporogénèse alors que d'autres vont plutôt avoir un effet sur les divisions mitotiques de la mégagamétogénèse. Malgré quelques sacs embryonnaires arrêtés lors des stades de la mégasporogénèse, la très grande majorité des gamétophytes sont affectés lors des étapes de mitoses (tableaux VI et VII). Ces phénomènes rappellent ce que l'on observe chez les mutants du cytosquelette. De manière générale, la perturbation du cytosquelette dans le sac embryonnaire entraîne une migration anormale des noyaux lors du développement du gamétophyte. Le mutant *indeterminate gametophyte 1* chez le maïs par exemple présente plusieurs problèmes dont une organisation anormale des microtubules. Ceci résulte, en plus d'une migration anormale des noyaux, à une perturbation de la synchronicité des divisions mitotiques (Huang et Sheridan, 1996). Bien qu'ici en résulte une prolifération anormale de noyaux, l'idée reste sensiblement la même : en perturbant l'organisation du cytosquelette, on affecte ainsi les divisions des noyaux du sac embryonnaire. Dans le même ordre d'idée, un problème affectant les kinesines chez *A. thaliana* va quant à lui désorganiser le positionnement des noyaux lors de la mégagamétogénèse pour former un amas au centre du sac embryonnaire suite à la dernière mitose (stade FG5). Ce phénotype va perturber la cellularisation empêchant la formation de la cellule

œuf, des synergides et de la cellule centrale (Tanaka et al., 2004a). La position des noyaux semble donc aussi très importante dans la cellularisation et non seulement dans l'établissement du destin cellulaire.

Outre la bonne organisation du cytosquelette, plusieurs autres facteurs affectant des processus cellulaires de base peuvent affecter la mégasporogénèse. Cependant, la majorité d'entre eux vont jouer un rôle lors d'une étape précise et les effets observés chez les mutants vont être un arrêt à un stade particulier. Les mutants *fem2*, *fem3*, *gfa4* et *gfa5* vont par exemple être arrêté au stade d'un seul noyau (mégaspore fonctionnelle) (Christensen et al., 1998) alors que les mutants *nomega* et *prolifera* vont plutôt arrêter spécifiquement aux stades FG2 et FG4 respectivement (Kwee et Sundaresan, 2003; Springer et al., 2000). Tous vont avoir un rôle sur le cycle de divisions cellulaires bien que les gènes affectés dans chacun de ces mutants ne soient pas nécessairement connus. *NOMEGA* code pour une sous-unité du complexe bien conservé du cyclosome promouvant l'anaphase (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome, APC/C) (Kwee et Sundaresan, 2003) alors que *PROLIFERA* (*PRL*) code quant à lui pour l'homologue du facteur Mcm7 impliqué dans la réplication de l'ADN (Springer et al., 2000). Les mutants *SlowWalker 1* et *2* (*swa*) chez *A.thaliana* quant à eux affectent plutôt des gènes essentiels à la synthèse des ribosomes et causent un problème de synchronisation du développement dans le pistil. Le développement des ovules est ralenti et différents stades (deux, quatre ou huit noyaux) sont retrouvés dans un même ovaire (Li et al., 2009; Shi et al., 2005).

Mais tous ces mutants montrent des problèmes arrêtant le développement du sac embryonnaire à un stade particulier. Le dérèglement du développement affecte la progression elle-même de la mégagamétogénèse, mais non l'intégrité du sac embryonnaire comme tel. *ScRALF3* affecte quant à lui un mécanisme plus global. La mégagamétogénèse peut se poursuivre puisque des sacs embryonnaires matures et cellularisés sont observés, mais l'intégrité du sac embryonnaire est perturbée et c'est ce qui cause l'éventail de phénotypes présents chez les mutants d'interférence (tableau VI).

Si la perturbation de l'expression de *ScRALF3* a des effets visuellement frappants, la surexpression de ce dernier semble sans effet important puisque la reproduction a lieu sans problème (figure 21). Cette apparente absence de phénotype peut résulter du fait que la présence du peptide dans les premières étapes du développement du gamétophyte femelle est plus importante que sa régulation à la baisse lors de la mégagamétogenèse. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que *ScRALF3* puisse être important pour déclencher une voie de signalisation ou un mécanisme général au début du développement et permettre la progression à travers la série de divisions mitotiques. Une autre possibilité pouvant expliquer ce phénotype quasi normal est l'implication des mécanismes de régulation entourant la maturation du peptide. Malgré l'augmentation de transcrite comme observé par RT-PCR, si la quantité de peptide mature dépend de l'activité d'une subtilase et que cette dernière ne change pas, la quantité de peptide mature demeurera alors normale et aucun phénotype ne sera observé. Malheureusement, aucun anticorps n'a pu être produit pour *ScRALF3*, donc il est pour l'instant impossible de vérifier cette hypothèse. On observe toutefois une faible perturbation de la cellularisation (figure 22). La majorité des problèmes sont observés aussi chez le type sauvage, cependant leur fréquence est beaucoup plus élevée chez les mutants. Bien que les noyaux soient bien positionnés et que la cellularisation de ceux-ci se produit bel et bien, des membranes anormalement placées sont à plusieurs reprises observées. Ces perturbations ne sont pas assez importantes pour mettre en péril la fonctionnalité du sac embryonnaire et de la reproduction. Il est intéressant de noter toutefois que le cytosquelette et les microtubules sont aussi impliqués dans la cellularisation, tout comme dans le positionnement des noyaux à travers le sac embryonnaire (Russell, 1993; Webb et Gunning, 1994).

4.4 *ScRALF3* est un candidat dans la communication cellule-cellule permettant la communication entre le sporophyte et le gamétophyte

Plusieurs exemples démontrant cette communication ont déjà été relevés. Pourtant, peu de signaux directs ont été caractérisés jusqu'à maintenant. Le bon développement des téguments est essentiel à la formation du gamétophyte femelle puisqu'un défaut

dans le développement de ceux-ci cause un arrêt du développement du sac embryonnaire à un stade précoce (résumé par Bencivenga et al., 2011; Chevalier et al., 2011). Les voies de signalisation impliquées dans cette communication entre le tissu maternel et le gamétophyte en développement demeurent obscures. L'implication d'hormones dans la régulation du développement est connue, mais peu d'exemples concrets liant le sporophyte et le gamétophyte peuvent être cités. Il y a l'auxine bien entendu, mais son rôle semble se limiter à l'établissement du destin cellulaire (Pagnussat et al., 2009). La voie de signalisation de la cytokinine est aussi impliquée dans l'intégrité des vacuoles des cellules au stade mature, mais l'implication de l'hormone elle-même est encore imprécise (Deng et al., 2010; Pischke et al., 2002). Mais les signaux impliqués dans la coordination du développement au début de celui-ci restent encore indéterminés.

L'impact de la perturbation de l'expression de *ScRALF3* sur le développement du sac embryonnaire malgré son patron d'expression spécifique aux téguments en fait un excellent candidat pour le dialogue entre ces deux tissus. Le fait que le développement des téguments n'est pas affecté renforce cette hypothèse. *ScRALF3* étant effectivement maturé via la voie de sécrétion du réticulum endoplasmique (Chevalier, 2012; Chevalier et al., 2012), un modèle est proposé où *ScRALF3* est exprimé de manière polarisée au niveau du tissu sporophytique de l'ovule comme molécule signal d'une voie de signalisation dépendante d'un récepteur membranaire nécessaire à l'organisation cellulaire du sac embryonnaire. D'ailleurs, d'autres molécules signaux sont connues pour contrôler ainsi l'architecture de la cellule via des voies de signalisation. La famille de la Rho des plantes (ROPs) qui affectent l'organisation du cytosquelette (Mucha et al., 2011) ou encore les brassinostéroïdes qui contrôlent la croissance via la modulation des microtubules (Catterou et al., 2001; Vert et al., 2005) en sont de bons exemples.

5. Conclusion et perspectives

Beaucoup de chemin reste à parcourir pour comprendre les communications cellule-cellule permettant la coordination du développement du gamétophyte femelle. L'étude de *ScRALF3* amène certainement un brin plus d'information à ce sujet complexe malheureusement encore peu approfondie.

Le phénotype spécifique de *ScRALF3* dans le sac embryonnaire laisse supposer un contrôle indépendant ou du moins spécifique des mécanismes cellulaires de base du sac embryonnaire par le tissu maternel. Comme mentionnés, les mutants d'interférences vont montrer un phénotype qui ressemble beaucoup plus à une perturbation du cytosquelette qu'à un facteur régulant le cycle cellulaire. Toutefois, les exemples connus à ce jour sont tous des facteurs présents à l'intérieur du sac embryonnaire. *ScRALF3* permet de croire qu'un contrôle maternel est aussi impliqué. Mais que ce soit via le cytosquelette ou non, la voie de signalisation en aval de *ScRALF3* est importante dans le positionnement et la division nucléaire. Des analyses du cytosquelette à l'intérieur du sac embryonnaire sont à effectuer. Ce type d'analyses reste toutefois complexe compte tenu de la taille du sac embryonnaire et son inclusion dans le sporophyte. Des exemples de l'implication de peptide de type RALF dans la division est déjà connu, mais un rôle aussi précis que permet de supposer cette étude est une avancée très importante sur le sujet.

Outre la vérification de l'importance du cytosquelette dans le phénotype observé chez les mutants de *ScRALF3*, la voie de signalisation est certainement la prochaine étape à franchir. L'isolation d'un récepteur est essentielle à la poursuite de cette étude. Des protéines membranaires sont déjà connues pour lier des peptides de type RALF chez la tomate, le tabac et la luzerne (Scheer et al., 2005), mais l'identification d'une protéine précise dans le cas de *ScRALF3* et du développement de l'ovule serait certainement une grande avancée dans la compréhension du développement du gamétophyte femelle.

5. Bibliographie

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. (1997). *Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression*. *Plant Cell* 9, 1859-1868.
- Aloni, R. (2010). *The induction of vascular tissues by auxin plant hormones*. In, P.J. Davies, ed. (Springer Netherlands), pp. 485-518.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich, C.I. (2006). *Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development*. *Planta* 223, 315-328.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Bajon, C., Horlow, C., Motamayor, J.C., Sauvanet, A., and Robert, D. (1999). *Megasporogenesis in Arabidopsis thaliana L.: an ultrastructural study*. *Sexual Plant Reproduction* 12, 99-109.
- Baker, S.C., Robinson-Beers, K., Villanueva, J.M., Gaiser, J.C., and Gasser, C.S. (1997). *Interactions among genes regulating ovule development in Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 145, 1109-1124.
- Bate, N., and Twell, D. (1998). *Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements*. *Plant Molecular Biology* 37, 859-869.
- Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P., and Gualberti, G. (1999). *The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants*. *Plant Cell* 11, 323-334.
- Bemer, M., and Angenent, G.C. (2010). *Floral organ initiation and development plant developmental biology - Biotechnological perspectives*. In, E.C. Pua, and M.R. Davey, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 173-194.
- Bemer, M., Wolters-Arts, M., Grossniklaus, U., and Angenent, G.C. (2008). *The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in Arabidopsis ovules*. *Plant Cell* 20, 2088-2101.
- Bencivenga, S., Colombo, L., and Masiero, S. (2011). *Cross talk between the sporophyte and the megagametophyte during ovule development*. *Sexual plant reproduction* 24, 113-121.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., and Friml, J. (2003). *Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation*. *Cell* 115, 591-602.
- Berendzen, K., Weiste, C., Wanke, D., Kilian, J., Harter, K., and Droge-Laser, W. (2012). *Bioinformatic cis-element analyses performed in Arabidopsis and rice disclose bZIP- and MYB-related binding sites as potential AuxRE-coupling elements in auxin-mediated transcription*. *BMC Plant Biology* 12, 125.

- Brown, R.H., Nickrent, D.L., and Gasser, C.S. (2010). *Expression of ovule and integument-associated genes in reduced ovules of Santalales*. *Evolution & Development* 12, 231-240.
- Bünger-Kibler, S., and Bangerth, F. (1982). *Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators*. *Plant Growth Regulation* 1, 143-154.
- Cao, J., and Shi, F. (2012). *Evolution of the RALF Gene Family in Plants: Gene Duplication and Selection Patterns*. *Evolutionary Bioinformatics* 8, 271.
- Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B.S., and Sangwan, R.S. (2001). *Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in Arabidopsis thaliana II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull mutant*. *Planta* 212, 673-683.
- Chevalier, D., Batoux, M., Fulton, L., Pfister, K., Yadav, R.K., Schellenberg, M., and Schneitz, K. (2005). *STRUBBELIG defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 9074-9079.
- Chevalier, E. (2012). *Implication des peptides RALFs dans les communications cellulaires lors du développement du gamétophyte femelle chez Solanum chacoense et Arabidopsis thaliana*. . In *Sciences Biologiques, Institut de Recherche en Biologie Végétale (IRBV)* (Montréal, Université de Montréal), pp. 171 pages.
- Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., and Matton, D.P. (2012). *ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell-cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. (accepté pour publication, Plant Journal)*.
- Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E.L., and Matton, D.P. (2011). *Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization*. *New Phytologist* 192, 13-28.
- Christensen, C.A., King, E.J., Jordan, J.R., and Drews, G.N. (1997). *Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant*. *Sexual Plant Reproduction* 10, 49-64.
- Christensen, C.A., Subramanian, S., and Drews, G.N. (1998). *Identification of Gametophytic Mutations Affecting Female Gametophyte Development in Arabidopsis*. *Developmental Biology* 202, 136-151.
- Combiér, J.P., Kuster, H., Journet, E.P., Hohnjec, N., Gamas, P., and Niebel, A. (2008). *Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1118-1127.
- Covey, P.A., Subbaiah, C.C., Parsons, R.L., Pearce, G., Lay, F.T., Anderson, M.A., Ryan, C.A., and Bedinger, P.A. (2010). *A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation*. *Plant Physiology* 153, 703-715.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). *A Gateway Cloning Vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta*. *Plant Physiology* 133, 462-469.
- de Jong, M., Mariani, C., and Vriezen, W.H. (2009). *The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set*. *J Exp Bot* 60, 1523-1532.

- De Martinis, D., and Mariani, C. (1999). *Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants*. *Plant Cell* 11, 1061-1071.
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.-C., Liang, Y., and Zuo, J. (2010). *Arabidopsis histidine kinase CK11 acts upstream of HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS to regulate female gametophyte development and vegetative growth*. *Plant Cell* 22, 1232-1248.
- Drews, G.N., Lee, D., and Christensen, C.A. (1998). *Genetic analysis of female gametophyte development and function*. *Plant Cell* 10, 5-17.
- Drews, G.N., and Yadegari, R. (2002). *Development and function of the angiosperm female gametophyte*. *Annual Review of Genetics* 36, 99-124.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). *MYB transcription factors in Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15, 573-581.
- Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P., and Smyth, D.R. (1996). *AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth*. *Plant Cell* 8, 155-168.
- Escobar, N.M., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., and Oparka, K. (2003). *High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata*. *Plant Cell* 15, 1507-1523.
- Estrada-Luna, A.A., García-Aguilar, M., and Vielle-Calzada, J.P. (2004). *Female reproductive development and pollen tube growth in diploid genotypes of Solanum cardiophyllum Lindl.* *Sexual Plant Reproduction* 17, 117-124.
- Feijo, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K. (1999). *Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip*. *Journal of Cell Biology* 144, 483-496.
- Friedman, W.E., and Ryerson, K.C. (2009). *Reconstructing the ancestral female gametophyte of angiosperms: Insights from Amborella and other ancient lineages of flowering plants*. *Am J Bot* 96, 129-143.
- Germain, H., Chevalier, E., Caron, S., and Matton, D.P. (2005). *Characterization of five RALF-like genes from Solanum chacoense provides support for a developmental role in plants*. *Planta* 220, 447-454.
- Germain, H., Chevalier, E., and Matton, D.P. (2006). *Plant bioactive peptides: an expanding class of signaling molecules*. *Canadian Journal of Botany* 84, 1-19.
- Gray-Mitsumune, M., O'Brien, M., Bertrand, C., Tebbji, F., Nantel, A., and Matton, D.P. (2006). *Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from Solanum chacoense*. *J Exp Bot* 57, 4171-4187.
- Gross-Hardt, R., Kagi, C., Baumann, N., Moore, J.M., Baskar, R., Gagliano, W.B., Jurgens, G., and Grossniklaus, U. (2007). *LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5, e47.

- Guerriero, G., Martin, N., Golovko, A., Sundström, J.F., Rask, L., and Ezcurra, I. (2009). *The RY/Sph element mediates transcriptional repression of maturation genes from late maturation to early seedling growth*. *New Phytologist* 184, 552-565.
- Guo, F., Huang, B.Q., Han, Y., and Zee, S.Y. (2004). *Fertilization in maize indeterminate gametophyte1 mutant*. *Protoplasma* 223, 111-120.
- Hamilton, D.A., Schwarz, Y.H., and Mascarenhas, J.P. (1998). *A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements*. *Plant Molecular Biology* 38, 663-669.
- Haruta, M., and Constabel, C.P. (2003). *Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells*. *Plant Physiology* 131, 814-823.
- Haruta, M., Monshausen, G., Gilroy, S., and Sussman, M.R. (2008). *A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in Arabidopsis seedlings: identification of AtRALF1 peptide*. *Biochemistry* 47, 6311-6321.
- Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K., and Brzobohatý, B. (2003). *The putative sensor histidine kinase CK1 is involved in female gametophyte development in Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* 269, 443-453.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). *Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999*. *Nucleic Acids Research* 27, 297-300.
- Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., and Simon, R. (2003). *Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis*. *Dev Genes Evol* 213, 371-381.
- Holtorf, S., Apel, K., and Bohlmann, H. (1995). *Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 29, 637-646.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985). *A simple and general method for transferring genes into plants*. *Science* 227, 1229-1231.
- Huang, B.Q., and Sheridan, W.F. (1996). *Embryo sac development in the maize indeterminate gametophyte1 mutant: abnormal nuclear behavior and defective microtubule organization*. *Plant Cell* 8, 1391-1407.
- Hwang, I., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). *Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129, 500-515.
- Irving, H., Gehring, C., and (Editors) (2012). *Plant Signaling Peptides - Signaling and Communication in Plants*, Vol 16 (Springer Berlin Heidelberg).
- Johnston, A.J., Meier, P., Gheyselinck, J., Wuest, S.E., Federer, M., Schlagenhaut, E., Becker, J.D., and Grossniklaus, U. (2007). *Genetic subtraction profiling identifies genes essential for Arabidopsis reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte*. *Genome Biol* 8, R204.
- Jones-Rhoades, M.W., Borevitz, J.O., and Preuss, D. (2007). *Genome-Wide Expression Profiling of the Arabidopsis Female Gametophyte Identifies Families of Small, Secreted Proteins*. *PLoS Genet* 3, e171.

- Kagi, C., Baumann, N., Nielsen, N., Stierhof, Y.D., and Gross-Hardt, R. (2010). *The gametic central cell of Arabidopsis determines the lifespan of adjacent accessory cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 22350-22355.
- Kakimoto, T. (1996). *CK11, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction*. Science 274, 982-985.
- Kaplan-Levy, R.N., Brewer, P.B., Quon, T., and Smyth, D.R. (2012). *The trihelix family of transcription factors – light, stress and development*. Trends in Plant Science 17, 163-171.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). *GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends in Plant Science 7, 193-195.
- Katsir, L., Davies, Kelli A., Bergmann, Dominique C., and Laux, T. (2011). *Peptide signaling in plant development*. Current Biology 21, R356-R364.
- Kejnovsky, E., Hawkins, J.S., and Feschotte, C. (2012). *Plant transposable elements: Biology and evolution*. In Plant Genome Diversity J.F. Wendel, J. Greilhuber, J. Dolezel, and I.J. Leitch, eds. (Springer Vienna), pp. 17-34.
- Kinoshita-Tsujimura, K., and Kakimoto, T. (2011). *Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling & Behavior 6, 66-71.
- Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L., and Fischer, R.L. (1996). *The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2*. Plant Cell 8, 137-153.
- Krizek, B.A., and Fletcher, J.C. (2005). *Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide*. Nature Reviews Genetics 6, 688-698.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R., and Sussman, M.R. (2002). *An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis*. Plant Cell 14, 1109-1120.
- Kwee, H.-S., and Sundaresan, V. (2003). *The NOMEGA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in Arabidopsis*. Plant Journal 36, 853-866.
- Lafleur, E. (2009). *Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes polliniques* (Montréal, Université de Montréal).
- Lagacé, M., and Matton, D. (2004). *Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of Solanum chacoense*. Planta 219, 185-189.
- Lantin, S., O'Brien, M., and 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 Molecular Biology 41, 371-386.
- Li, N., Yuan, L., Liu, N., Shi, D., Li, X., Tang, Z., Liu, J., Sundaresan, V., and Yang, W.-C. (2009). *SLOW WALKER2, a NOC1/MAK21 homologue, is essential for coordinated cell cycle progression during female gametophyte development in Arabidopsis*. Plant Physiology 151, 1486-1497.

- Liu, J., and Qu, L.-J. (2008). *Meiotic and Mitotic Cell Cycle Mutants Involved in Gametophyte Development in Arabidopsis*. *Molecular Plant* 1, 564-574.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D., and Sandberg, G. (2002). *Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 49, 249-272.
- Mapelli, S., Frova, C., Torti, G., and Soressi, G.P. (1978). *Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits*. *Plant and Cell Physiology* 19, 1281-1288.
- Martínez-Hernández, A.d., López-Ochoa, L., Argüello-Astorga, G., and Herrera-Estrella, L. (2002). *Functional Properties and Regulatory Complexity of a MinimalRBCS Light-Responsive Unit Activated by Phytochrome, Cryptochrome, and Plastid Signals*. *Plant Physiology* 128, 1223-1233.
- Matos, J.L., Fiori, C.S., Silva-Filho, M.C., and Moura, D.S. (2008). *A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 582, 3343-3347.
- Matsubayashi, Y., and Sakagami, Y. (2006). *Peptide hormones in plants*. *Annu Rev Plant Biol* 57, 649-674.
- Mattsson, J., Ckurshumova, W., and Berleth, T. (2003). *Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development*. *Plant Physiology* 131, 1327-1339.
- McAbee, J.M., Kuzoff, R.K., and Gasser, C.S. (2005). *Mechanisms of derived unitegmy among impatiens species*. *Plant Cell* 17, 1674-1684.
- McCormick, S. (1993). *Male gametophyte development*. *Plant Cell* 5, 1265-1275.
- Meindl, T., Boller, T., and Felix, G. (1998). *The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it*. *Plant Cell* 10, 1561-1570.
- Mingossi, F.B., Matos, J.L., Rizzato, A.P., Medeiros, A.H., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C., and Moura, D.S. (2010). *SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (Saccharum spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion*. *Plant Molecular Biology* 73, 271-281.
- Moll, C., von Lyncker, L., Zimmermann, S., Kagi, C., Baumann, N., Twell, D., Grossniklaus, U., and Gross-Hardt, R. (2008). *CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants*. *Plant J* 56, 913-921.
- Moller, B., and Weijers, D. (2009). *Auxin control of embryo patterning*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001545.
- Motamayor, J.C., Vezon, D., Bajon, C., Sauvanet, A., Grandjean, O., Marchand, M., Bechtold, N., Pelletier, G., and Horlow, C. (2000). *Switch (swi1), an Arabidopsis thaliana mutant affected in the female meiotic switch*. *Sexual Plant Reproduction* 12, 209-218.
- Moura, D.S., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). *Chapter 7 - RALF peptides*. In *Handbook of Biologically Active Peptides*, J.K. Abba, ed. (Burlington, Academic Press), pp. 33-V.

- Mucha, E., Fricke, I., Schaefer, A., Wittinghofer, A., and Berken, A. (2011). *Rho proteins of plants – Functional cycle and regulation of cytoskeletal dynamics*. *European Journal of Cell Biology* 90, 934-943.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). *Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 34-41.
- Nakamura, M., Tsunoda, T., and Obokata, J. (2002). *Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator*. *Plant Journal* 29, 1-10.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C., and Chory, J. (2004). *Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis*. *PLoS Biol* 2, e258.
- Ng, W.-L., and Bassler, B.L. (2009). *Bacterial quorum-sensing network architectures*. *Annual Review of Genetics* 43, 197-222.
- Olsen, A.N., Mundy, J., and Skriver, K. (2002). *Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motifs*. *In Silico Biol* 2, 441-451.
- Pagnussat, G.C., Alandete-Saez, M., Bowman, J.L., and Sundaresan, V. (2009). *Auxin-dependent patterning and gamete specification in the Arabidopsis female gametophyte*. *Science* 324, 1684-1689.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., and Sundaresan, V. (2007). *Cell-fate switch of synergid to egg cell in Arabidopsis eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene BLH1*. *Plant Cell* 19, 3578-3592.
- Palser, B.F. (1975). *The Bases of Angiosperm Phylogeny: Embryology*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62, 621-646.
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., and Ryan, C.A., Jr. (2001). *RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 12843-12847.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C.A. (1991). *A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins*. *Science* 253, 895-897.
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G., and Ryan, C.A. (2010). *Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential--YISY--motif*. *Peptides* 31, 1973-1977.
- PGSC, P.G.S.C. (2011). *Genome sequence and analysis of the tuber crop potato*. *Nature* 475, 189-195.
- Pischke, M.S., Jones, L.G., Otsuga, D., Fernandez, D.E., Drews, G.N., and Sussman, M.R. (2002). *An Arabidopsis histidine kinase is essential for megagametogenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15800-15805.
- Quiapim, A.C., Brito, M.S., Bernardes, L.A.S., daSilva, I., Malavazi, I., DePaoli, H.C., Molfetta-Machado, J.B., Juliatti, S., Goldman, G.H., and Goldman, M.H.S. (2009). *Analysis of the Nicotiana tabacum stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species*. *Plant Physiology* 149, 1211-1230.

- Quinn, J.M., Barraco, P., Eriksson, M., and Merchant, S. (2000). *Coordinate copper- and oxygen-responsive Cyc6 andCpx1 expression in Chlamydomonas is mediated by the same element*. Journal of Biological Chemistry 275, 6080-6089.
- Quinn, J.M., and Merchant, S. (1995). *Two copper-responsive elements associated with the Chlamydomonas Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators*. Plant Cell 7, 623-638.
- Rautengarten, C., Steinhauser, D., Büssis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J., and Altmann, T. (2005). *Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the Arabidopsis thaliana subtilase gene family*. PLOS Computational Biology 1, e40.
- Ravi, M., Marimuthu, M.P.A., and Siddiqi, I. (2008). *Gamete formation without meiosis in Arabidopsis*. Nature 451, 1121-1124.
- Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G.W., and Fischer, R.L. (1995). *The BELL1 gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the Arabidopsis ovule primordium*. Cell 83, 735-742.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E., and Gasser, C.S. (1992). *Ovule development in wild-type Arabidopsis and two female-sterile mutants*. Plant Cell 4, 1237-1249.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., and Shen, Q.J. (2010). *WRKY transcription factors*. Trends in Plant Science 15, 247-258.
- Russell, S.D. (1993). *The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis*. Plant Cell 5, 1349-1359.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J., and Peñarrubia, L. (2004). *The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development*. Journal of Biological Chemistry 279, 15348-15355.
- Sanchez-Leon, N., Arteaga-Vazquez, M., Alvarez-Mejia, C., Mendiola-Soto, J., Duran-Figueroa, N., Rodriguez-Leal, D., Rodriguez-Arevalo, I., Garcia-Campayo, V., Garcia-Aguilar, M., Olmedo-Monfil, V., et al. (2012). *Transcriptional analysis of the Arabidopsis ovule by massively parallel signature sequencing*. J Exp Bot 63 3829-3842.
- Schaller, A., Stintzi, A., and Graff, L. (2012). *Subtilases - versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment*. Physiologia Plantarum 145, 52-66.
- Scheer, J.M., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2005). *LeRALF, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of Lycopersicon peruvianum*. Planta 221, 667-674.
- Schneitz, K., Hülskamp, M., and Pruitt, R.E. (1995). *Wild-type ovule development in Arabidopsis thaliana: a light microscope study of cleared whole-mount tissue*. Plant Journal 7, 731-749.
- Shi, D.Q., Liu, J., Xiang, Y.H., Ye, D., Sundaresan, V., and Yang, W.C. (2005). *SLOW WALKER1, essential for gametogenesis in Arabidopsis, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis*. Plant Cell 17, 2340-2354.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J., and Schachtman, D.P. (2007). *The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction*. Plant Cell 19, 2440 - 2453.

- Shuichi, Y. (2002). *The Dof family of plant transcription factors*. Trends in Plant Science 7, 555-560.
- Skinner, D.J., and Gasser, C.S. (2009). *Expression-based discovery of candidate ovule development regulators through transcriptional profiling of ovule mutants*. BMC Plant Biology 9, 29.
- Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., and Machida, Y. (2003). *NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis*. Genes & Development 17, 1055-1067.
- Springer, P.S., Holding, D.R., Groover, A., Yordan, C., and Martienssen, R.A. (2000). *The essential Mcm7 protein PROLIFERA is localized to the nucleus of dividing cells during the G(1) phase and is required maternally for early Arabidopsis development*. Development 127, 1815-1822.
- Srivastava, R., Liu, J.X., Guo, H., Yin, Y., and Howell, S.H. (2009). *Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis*. Plant Journal 59, 930-939.
- Stratmann, J., Scheer, J., and Ryan, C.A. (2000). *Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured Lycopersicon peruvianum cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 8862-8867.
- Sutoh, K., and Yamauchi, D. (2003). *Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds*. Plant Journal 34, 635-645.
- Suzuki, M., Kao, C.Y., and McCarty, D.R. (1997). *The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity*. Plant Cell 9, 799 - 807.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., and Machida, Y. (2010). *HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 51, 1766-1776.
- Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C., and Machida, Y. (2004a). *The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis*. Genes to Cells 9, 1199-1211.
- Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C., and Machida, Y. (2004b). *The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis*. Genes Cells 9, 1199-1211.
- Tang, W., and Perry, S.E. (2003). *Binding Site Selection for the Plant MADS Domain Protein AGL15*. Journal of Biological Chemistry 278, 28154-28159.
- Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K. (2006). *Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7, 847-859.
- Terzaghi, W.B., and Cashmore, A.R. (1995). *Light-Regulated Transcription*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46, 445-474.
- Ulker, B., and Somssich, I.E. (2004). *WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function*. Current Opinion in Plant Biology 7, 491-498.

- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997). *ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements*. *Science* 276, 1865 - 1868.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1995). *Composite structure of auxin response elements*. *Plant Cell* 7, 1611 - 1623.
- Varga, A., and Bruinsma, J. (1976). *Roles of Seeds and Auxins in Tomato Fruit Growth*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 80, 95-104.
- Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., and Chory, J. (2005). *Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 177-201.
- Vriezen, W.H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., and Mariani, C. (2008). *Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set*. *New Phytologist* 177, 60-76.
- Walcher, C.L., and Nemhauser, J.L. (2012). *Bipartite promoter element required for auxin response*. *Plant Physiology* 158, 273-282.
- Wang, G., and Fiers, M. (2010). *CLE peptide signaling during plant development*. *Protoplasma* 240, 33-43.
- Webb, M., and Gunning, B.S. (1994). *Embryo sac development in Arabidopsis thaliana II. The cytoskeleton during megagametogenesis*. *Sexual Plant Reproduction* 7, 153-163.
- Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (New York, Cold Springs Harbors Laboratory Press).
- Wu, J., Kurten, E.L., Monshausen, G., Hummel, G.M., Gilroy, S., and Baldwin, I.T. (2007). *NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in Nicotiana attenuata, is required for root hair development and plant growth in native soils*. *Plant Journal* 52, 877-890.
- Wuest, S.E., Vijverberg, K., Schmidt, A., Weiss, M., Gheyselinck, J., Lohr, M., Wellmer, F., Rahnenführer, J., von Mering, C., and Grossniklaus, U. (2010). *Arabidopsis Female Gametophyte Gene Expression Map Reveals Similarities between Plant and Animal Gametes*. *Current Biology* 20, 506-512.
- Xing, H., Pudake, R., Guo, G., Xing, G., Hu, Z., Zhang, Y., Sun, Q., and Ni, Z. (2011). *Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize*. *BMC Genomics* 12, 178.
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001). *The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane*. *Plant and Cell Physiology* 42, 1017-1023.
- Yu, H.J., Hogan, P., and Sundaresan, V. (2005). *Analysis of the female gametophyte transcriptome of Arabidopsis by comparative expression profiling*. *Plant Physiology* 139, 1853-1869.
- Zhang, G.Y., Wu, J., and Wang, X.W. (2010). *Cloning and expression analysis of a pollen preferential rapid alkalization factor gene, BoRALF1, from broccoli flowers*. *Molecular Biology Reports* 37, 3273-3281.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). *Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method*. *Nature Protocols* 1, 641-646.

Zheng, B., Deng, Y., Mu, J., Ji, Z., Xiang, T., Niu, Q.-W., Chua, N.-H., and Zuo, J. (2006). *Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and Arabidopsis response regulator 4-dependent manner*. *Physiologia Plantarum* 127, 277-292.

6. Annexes

6.1 Figure et tableau supplémentaires

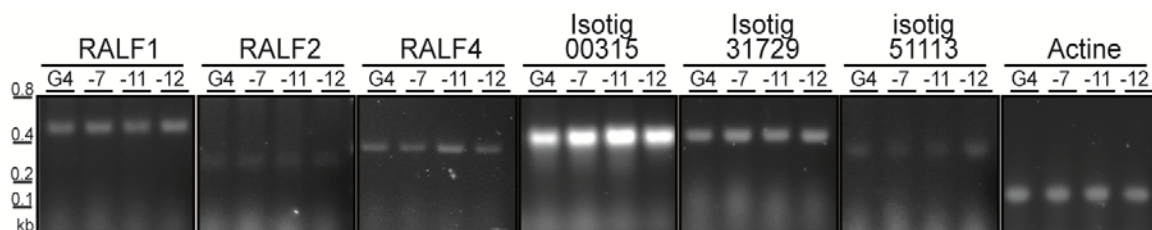


Figure supplémentaire 1 : La perturbation de l'expression de *ScRALF3* chez les mutants d'interférence est spécifique.

Analyse RT-PCR avec l'ARN total extrait d'ovule à l'anthèse de plante de type sauvage (G4) et des mutants d'interférence RNAi3-7, RNAi3-11 et RNAi3-12. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour vérifier l'expression de chacun de gène de type RALF connu (*ScRALF1-5* (Germain et al., 2005) ainsi que les huit nouveaux membres isolés à partir du transcriptome d'ovules à l'anthèse, d'ovules deux jours avant l'anthèse et de tube pollinique). Seuls *ScRALF1*, *ScRALF2*, *ScRALF4*, et les *isotig00315*, *31729* et *51113* ont été identifiés comme exprimés dans les ovules et l'expression d'aucun d'entre eux est perturbée par l'interférence de *ScRALF3*. L'expression de l'actine est utilisée comme contrôle

Figure supplémentaire 2 : Liste des amorces spécifiques relatives à l'analyse RT-PCR chez les mutants d'interférence à *ScRALF3*

Gènes	Amorces
ScRALF1	TGACAACACCAGGAGAAAAGGCACA ACCCACCCCAAGTCCCA
ScRALF2	ATGCAAGGGGAGTATTGCAG TCAAATCCTTCCCCTCATTAGACT
ScRALF3	TTTGATACAACCTATGGAGTC CCATTCCATCTAACTGCATC
ScRALF4	ACAAGACGACGAGGATGAGGATGA CTTCAACAAGAGTAGACGATGA
ScRALF5	GTACAAGATGATGCTCCTT ACAAGAGTAGATGTTATTG
Contig05842	TCCATCATCATCATCATCGTTA TCTCACCTCCTACGAATCGTCCA
Isotig00315	CGCCATGGTTGCAGAGTCCTCG TGCGATCTTTTTTGCGATGA
Isotig26341	TCCGCTGCGGCAGTAGCATT ACAATACCCCTCCCTCCCT
Isotig31729	CTTCGGGAACACACGGGGCG ACAATACCCCTCCCTCCCT
Isotig37054	CTTCGGGAACACACGGGGCG TCACCCCATATGAGGTCATAA
Isotig45761	CGATGCTACCGGCGGCGATT ACAGCAAATTAATCAAAGCAATCACAC
Isotig51113	AGCCAATCACAATGCAATGATACA TGGTCCCACCAAAAAGCAA
isotig51278	AGCTCTGCGAAGGATGTTTCCGA ACATGAATTGATACATAACTCTTCG
Actine	CTGARGCMCCYCTTAAYCCCAAG GTGGCTGACACCATCACCAGAGT

6.2 Séquences en acides aminés des *Rapid alkalisation factors* retrouvés chez *Solanum chacoense*

ScRALF1

MQKSQLYFNPLKALFFLLFSHAQMRFCSGVSVLDLKSVKDSNFMGMKRGCEKLQECSEMVGEEED
LMDSESNRRVLLMQKKYISYGTALKRDLVPCNTPGASYNCKAPGAANNYNRGCEIITRCARDVSDIKS
*

ScRALF2

MGVPSYLIVCVLVGAFFISMAAAGDNGSYDWMVPARSGECKGSIAECMAEEDEFALDSESNRRILAT
KKYISYGALQKNSVPCSRRGASYNCKPGAQANPYTRGCSAITRCRS

ScRALF3

MESPILFFLIIFLTITNNAIVIEAQVDKFGLEQLVSEDFELPMAMSSLYEETEDDEMQLDGNGRSLLWH
KFKYISYGALSANRIPCPRSGRSYTHHCYHATGPAHPYTRGCSAITRCRR

ScRALF4

MGRELYKTTRMRMMMLFLLLVTVIKVEAVSECNGTSSSIGACLVDVDEFLMESETSTRVLAAGGNAR
SQKLSYGSAGKKAEICNEKIYGDCINNENVKATRCIPGTRCKRVVIS

ScRALF5

MGRELYKMMLLVLLVTVIKVEAVSECNGTSSSIGACLVDVDEFLMESETSTRILAGGNARSQKLNKYA
AGNKAACKEKIVGNCIGNKKNVKATHCNFGNRCKRVISH

contig05842

MEFRLCIILIFSIFIMMIDPSSSSSLSSIMHGEDHRAISTRKCNGGLVGNCIDEEEEEMMESDISRRVL
GGRNGYVSYGAMSRNNVPCNVRGASYNCHANQRVNPYRRGCTQITRCARTNS*

isotig00315

MATRPIVFVMLLATLAFAMVAESSFSSSSSYFNDAVNTLGHSSGGGLDELMTAGRIGDTLFDDEEM
MMPTEARRALNSQDHISYRAMSKNAIPCDRRGASYQCTRMQKIRPYRRGCSKITRCKRR*

isotig26341

MAKVKSLSTMFISSIFIIIVALSSPAVAGSAAAVAFSGSHQLGYFPMTLSSSSPICDGSIGDCLAEDED
EFGMESESSRMLAYRRRYISYGALSSNRVPCSRRGASYNCRPGAQANPYQRGCSAITRCRH*

isotig31729

MRSFTFFCLSMVMIKILLSASSGTHGAISVDRQWNGTGEMDGINWQVSLAGGGNYLSFKAIKDTSP
ICNEKVGNCIGDKKPGQRPCYYNNCKRSPG*

isotig37054

MSKTIVLLILISFISFTFFAEVSEGVREISYGAVGENHIPCDRKSNNVKCHLGEPETSYQRGCSPLTRCR
GPQP*

isotig44819

MATRPIFVFMLLATLAFAMVAESSLSSSYFNDPVVNTLGHSSGGGLDELMTAGRIGDTLFDDEEMM
MPTESARRALNSRDHISYRAMSKNAIPCDRRGASYQQCTRMQKIRPYRRGCSKITRCQRR*

isotig45761

MAVNSFSSIFIHSSLLIAALIISGDATGGDFDVSGWVPMKSADSCEGSIAECMAAGEFEMDSESNRRILA
TTDYISYGALQSNVPCSRRGASYYNCKTGAEANPYTRDCSAITRCRS*

isotig51113

MEAPNFIKLFYFLTFFLTILFIITSVNSQSQCNNTIAKCNEDMEFLMESEISKRFLA?RKKYISPGALKRDQ
PVCNGGGSGQPYSRSLPPPSNPYSRGCSKYRCRDDPE*

isotig51278

MASTSGNKNINVVIVLCFILLIAFSSSAKDVSDSKKYIKFSPNHSTSGPHKHVHRGCSALTRCRKDIDSQP
*

6.3 Séquences en nucléotides des cadre de lecture des *Rapid alkalisation factors* retrouvés chez *Solanum chacoense*

ScRALF1

atgacaacaccaggagaaaaaggcacaagaaattcaacctcaaaactcaaaaaatcaaaaaatcccaactttacttcaaccatt
gaaggccctcttcttcttgcttctttcagccatgccagatgagatgttctggggttcagttcttgacctaaatcagttaaag
atagtaactttaacctaattggggaaaaggggtgttcagaaaagcttcaagaatgctcagaaatgggggtgaagaagattga
tggattctgaaagtaataagaagggtttgccttatgaaaagaagtacattagttatggtacattgaagagggttgggccttgc
aatactcctggtgcttcatattataattgtaaagctcctggtgcagctaataattacaacagaggatgtgagattattacaaggtg
tgctagggatgtcagtgacatcaaatcttga

ScRALF2

atgggagttccttcgtatttgattgtttgttctgttgagctttttcatttcaatggctgccgccggcgacaatggtagctacga
ttggatgggtgccggcgagatccggtgaatgcaaggggagattgagagtgcatggctgaagaagatgagtttgccttgacag
tgagtcaaacaggcgtattttagcaacaaaaagtacatcagctatggctcactccagaagaacagcgtgccgtgttctgccg
tggagcttctactacaactgcaaacctggagctcaagcgaatccctacactcgtggatgagtgctattactcgttgaggagc
tag

ScRalf3

atggagtctcaataacttttcttcttatcatcttcttattcaccatcaccaacaatgcaattgtgatcgaagcacaagttgataaat
ttggttagaacaactggtagtgaagatgttgagttgccaatggcaatgctcgtcttatacgaagaacagaggatgatgagat
gcagttagatggaaatggaagatctctattgtggcacaattcaagtactacatttcatatggagcattgtcagtaacagaata
ccctgccaccacgatctggcagatcgtattacagcaccattgttatcatgctacaggtccagctcacccttactagaggtg
ctctgctatcactcgttgccgtagatga

ScRALF4

atgggaagagaattgtacaagacgacgaggatgaggatgatgatgctcttttctgcttctaaccgtaataaaggtggaagcg
gtatcagaatgtaatgggacaagcagcagcataggtgcttctgttagatgttgatgagttcttgatggaatcagaacaagta
ctagggttcttgctgcaggtggtaatgctagatcaaaaaattatcttacgggtccgcggggaagaaagcagagatatgtaatg
aaaaaattacggtgattgcatcaataatgagaacgttaaagcaacacgctgattcctggtaccgctgcaaacgtgttgaat
atcctag

ScRALF5

Atgggaagagaattgtacaagatgatgctccttgctgcttctaactgtaataaaggtggaagcggtatcagaatgtaatggg
acaagcagcagcataggtgcttctgttagatgttgatgagttcttgatggaatcagaacaagtaggattcttctgctggtg
taatgctagatcaaaaactaaattacaaagcggcaggaacaaagcagcagatgtaaaagaaaaatagtcggtaattgc
atcggtaataagaacgtgaaggcaacacactgtaactttgtaaccgctgcaaacgtgtaatatcccattag

contig05842

atggaattccgcctatgcataatTTTaatTTTctcaatTTTatcatgatgatcgatccatcatcatcatcatcgTTatcatcaat
 catgcacggtgaggatcaccgtgcaatctcaacgaggaagtgaatggaggccttgtgggaaattgcatagatgaggaggaag
 agatgatgatggagtcaatatttagtcgacgtgattaggaggaagaaatggTTatgTTagctatggggcaatgtcgaggaaca
 atgttccttgaatgtacgaggtgcttcttattataattgtcatgcaaaccaacgagTTaatccttatcgtcgtggttgactcaaat
 tacacgttgtgctaggaccaattcttga

isotig00315

atggcactcgaccaatctttgTTTTcatgctccttgccaccctggcattcgccatggttgagagtcctcgttctcctcctcctc
 ctacttcaacgaccctgagtcataactcggccacagttctggtggtggccttgatgaattgatgactgcaggtcgtatcggg
 gacacattgTTTgatgatgaagaaatgatgatgccgacagagtcagcccgtaggccctcaatagtcaggaccacatcagttac
 agggcgatgtcgaagaacgccatcccctgtgaccgacgtggcgcatcttactaccagtcaccccgatgcagaagattcggcct
 tatagacgggctgcagcaaaatcaccagatgcaaacgtcgttaa

isotig26341

atggcgaagtgaatctctctactatgTTcatctcatcattttcttcatcattattgtagcgttcatcggccggttgcctgg
 ttccgctcggcagtagcatttagtgggtcccaccagctgggttactttccgatgacattgtcttcttaccgatctgtgacggt
 tcgattggggactgTTTggctgaagaagacgaggatgagttcgggatggaatcggagagcagccggcgcattgtagcataccg
 ccggagatacattgTTacggtgccttagtagtaacagagtgccgttcaaggagaggagcttatactacaattgccgtcct
 ggagctcaggcgaacccttaccacgtggatgagtcacatcacgcgtcggcgtcattga

isotig31729

atgaggagcttactttctttgctatccatggtgatgatagcgaagattttgctctctgcttctcgggaacacacggggcgata
 agcgttgataggcagtggaacggcaccggagaaatggatggtattaattggcaggttagtcttgcaggtggtggaaattacttg
 tcttcaaagctattaaggatacgtcggcatctgcaacgagaaagtgtacgggaattgcataggggacaagaagcctgggca
 acggccatgtactactacaataactgcaagcgttctccagggttaa

isotig37054

Atgtcaaaaacaatagttctgcttattctaatttcatttttatttatttgcagaggttctgaaggtgcagggaaatta
 gttatggcggcctaggagagaatcacataccatgtgatcgaaaagtggaaacaatgtcaaattgcattaggagaaccagaa
 acatcataccagcgtggtttagtccactcactcgatgtcaggaccaccaaccataa

isotig44819

atggcactcgaccaatctttgTTTTcatgctccttgccaccctggcattcgccatggttgagagtcctcgttctcctcctcctcgtc
 ctacttcaacgaccctgagtcataactcggccacagttctggtggtggccttgatgaattgatgactacaggtcgtatcggg
 gacacattgTTTgatgatgangaaatgatgatgccgacagagtcagcccgtaggccctcaatagtcaggaccacatcagttac
 agggcgatgtcgaagaacgccatcccctgtgaccgacgtggcgcatcttactaccagtcaccccgatgcagaagattcggcct
 tataggcgggctgcagcaaaatcaccagatgccaacgtcgttaaag

isotig45761

atggcggatgaattcctttcctccattttcatcatctcttcattgttgatcgagctttgattatctccggcagtgctaccggcggcga
tttcgacgtgagcggttgggtccgatgaaatccgccgacagctgtgaaggttcgatagcggagtgtatggctgccggagaattc
gaaatggattcggagagcaataggcgtatattagcaaccactgattatataagctatggcgcgtgcagagtaacagtggtccgt
gttctagaagaggtgcgtcgtattataactgcaagacgggtgctgaagctaataccgtatacacgtgactgactgactgactgactg
ttgccggagtaa

isotig51113

atggaagctccaaattcataaaattgttctatttcttaacttttttcttaccattttattataattacatctgtaaatagccaatca
caatgcaatgatacaatagctaaatgtaatgaagatatggagttttaatggaatctgaaattagcaaaaagatttcttgcaaaa
gaaaaaatatatttctcctggagctttgaaaagagatcaaccggttgtaacggcgggtggaagcggtaaccgtattcgcgga
gctgccttccgcccgctgcaatccgtatagtagaggttgttctaagtattatcgttgtagagatgatcctgaaatga

isotig51278

atggcttcaacaagtggaacaaaaatattaatgttgattgttctttgcttcattttacttattgcattttcaagctctgcaagg
atgttccgatagcaaaaaatataaaaattttaccaaatcatagtactagcggtgaaaaatcaaaaatccacataaacatt
atcacagaggatgcagtgctctaactcgttgccgcaagatatagatagccaaccctaa

