

Université de Montréal

**Identification de protéines impliquées dans le guidage du tube
pollinique par les ovules de *Solanum chacoense***

par Claire Viallet

Institut de Recherche en Biologie Végétale
Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en Sciences Biologiques

août, 2016

© Claire Viallet, 2016

Résumé

Chez les angiospermes, le tube pollinique, excroissance tubulaire du grain de pollen, permet le transport passif des noyaux spermatiques jusqu'au sac embryonnaire d'un ovule où ils achèvent la double-fécondation. Un des principaux défis à relever par le tube pollinique est de traverser l'ensemble des structures femelles pour atteindre précisément l'ouverture de l'ovule sur son sac embryonnaire, le micropyle. Le long de son voyage, le tube pollinique est soumis à des gradients de protéines attractantes, guidant son chemin jusqu'à l'ovaire puis jusqu'au micropyle de l'ovule. Le succès de la reproduction sexuée chez les Angiospermes dépend de ces phénomènes de guidage. Les derniers attractants auquel il est soumis, émis par les cellules synergides du sac embryonnaire, sont des protéines riches en cystéine, les LURE. *Solanum chacoense* est une pomme de terre sauvage d'Amérique du Sud cohabitant sur un même territoire avec de nombreuses autres solanacées tubéreuses avec lesquelles elle est théoriquement capable de s'hybrider. Cependant, peu d'hybrides existent à l'état naturel, leur formation étant limitée par des barrières à l'hybridation. La communication entre les acteurs mâles et femelles serait affectée lors de pollinisations interspécifiques. Les LURE, attractants micropylaires, sont des agents majeurs de cette communication. L'identification des attractants micropylaire de *S. chacoense* permettrait d'élucider l'un des mécanismes limitant l'hybridation des solanacées tubéreuses. Des études transcriptomiques et sécrétomiques ont permis la caractérisation de 95 ScCRP potentiellement impliquées dans ce guidage micropylaire. Dans ce projet, 20 de ces ScCRP ont été sélectionnées comme candidat potentiel. Ces candidats ont été clonés et exprimés avec succès dans un système bactérien puis purifiés. Enfin, le potentiel d'attraction de trois d'entre eux a été testé dans un système semi-*in vivo*, utilisant des protéines (CRP) encapsulées afin d'analyser le comportement des tubes polliniques.

Mots-clés : Protéine riche en cystéine (cysteine-rich protein; CRP), chimio-attractants, guidage des tubes polliniques, attraction micropylaire, communication pollen-pistil, *Solanaceae*, *Solanum chacoense*.

Abstract

In angiosperms, the pollen tube, a tubular outgrowth of the pollen grain, enables passive transport of sperm nuclei through various tissues along the pistil in order to reach the embryo sac of the egg cell, where double fertilization occurs. One of the main challenges for the pollen tube is to cross several structures to reach the micropyle. Along its journey, the pollen tube is influenced by gradients of attractant proteins, guiding its way down to the ovary and then to the micropyle of the ovule. The success of sexual reproduction in angiosperms relies on these guiding phenomena. The last attractants that will precisely guide the pollen tube are secreted by the two synergids cells of the embryo sac are cystein-rich proteins, LURE. *Solanum chacoense* is a wild potato from South America cohabiting on the same territory with many other tuberous *Solanum* species that could theoretically be capable of hybridizing. However, few hybrids are found in nature, their formation being limited by hybridization barriers. Pollen tube guidance can be such a barrier in interspecific crosses due to a lesser communication fit between the male and female players during pollinations. The LURE micropylar attractants are major agents of this communication. Identifying *S. chacoense*'s micropylar attractants could elucidate some of the mechanisms limiting hybridization between tuberous Solanaceae. Transcriptomic and secretomic studies allowed the characterization of 95 ScCRP potentially involved in this micropylar guiding. In this project, 20 of these ScCRP were selected as potential candidates. These candidates were successfully cloned and expressed in a bacterial system and then purified. Finally, the attraction potential for three of them was tested in a semi-*in vivo* system using gelatin embedded proteins beads to analyze the pollen tube's behavior.

Keywords : Cystein-rich protein (CRP), chemoattractants, pollen tube guidance, micropylar attraction, pollen-pistil communication, *Solanaceae*, *Solanum chacoense*.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
1 Introduction.....	1
1.1 Le tube pollinique : origine et développement	1
1.1.1 Le tube pollinique, une innovation pour répondre à la perte de mobilité des noyaux spermatiques.....	1
1.1.2 Le développement du pollen.....	2
1.1.3 La microsporogénèse, de la formation de la tétrade à sa dissociation et la formation du manteau pollinique	3
1.2 Le développement du sac embryonnaire.....	5
1.2.1 La mégasporogénèse.....	6
1.2.2 La mégagamétogénèse	7
1.3 La communication pollen-pistil : de l'adhérence des grains de pollen à la prévention de la polyspermie	7
1.3.1 De l'adhérence au stigmate à la croissance dans le style	8
1.3.2 La réception du tube pollinique	13
1.4 Le guidage du tube pollinique.....	16
1.4.1 Le guidage pré-ovulaire gouverné par des tissus sporophytiques	17
1.4.2 Le guidage ovulaire.....	19
1.5 La réception et l'intégration des signaux chimiotropiques gamétophytiques	28
1.5.1 La capacitation du tube pollinique par les tissus sporophytiques femelles	29

1.5.2	Identification des récepteurs mâles aux attractants gamétophytiques	31
1.5.3	Le calcium cytosolique, acteur majeur de l'intégration des signaux de réorientation	33
1.6	Hypothèses et méthode pour l'identification des attractants gamétophytiques chez <i>Solanum chacoense</i>	35
1.6.1	<i>S. chacoense</i> , description et intérêt du modèle	35
1.6.2	Une régulation de l'attraction par le stade développemental du gamétophyte femelle	38
1.6.3	Identification des CRP spécifiques aux ovules de <i>S. chacoense</i>	40
1.6.4	Méthodologie de travail	42
2	Matériels et Méthodes	44
2.1	Matériel végétal	44
2.2	Clonage	44
2.2.1	Extraction d'ARN total et rétro-transcription	44
2.2.2	Amplification par PCR des séquences d'intérêts	44
2.2.3	Clonage Gateway dans pQlinkHD	46
2.2.4	Clonage classique dans pGEX-4T-2 et pET28b	47
2.2.5	Séquençage des vecteurs	47
2.3	Expression des candidats recombinants par induction à l'IPTG	48
2.4	Purification des protéines recombinantes exprimées	48
2.4.1	Vérification de la solubilité	49
2.4.2	Purification en condition dénaturante	49
2.4.3	Purification en condition native	50
2.4.4	Vérification de la purification	50
2.4.5	Préparation des protéines purifiées en vue du test de guidage	51
2.4.6	Détermination de la concentration en protéine - méthode de Bradford	51
2.5	Test de guidage des candidats protéiques	52
2.5.1	Préparation du système	52
2.5.2	Test de guidage - <i>bead assay</i>	53
2.5.3	Estimation de l'angle de réorientation passive σ	54

3	Résultats.....	57
3.1	Stratégie de sélection des 20 candidats à l'attraction	57
3.1.1	Critères de sélection.....	57
3.1.2	Stratégie de sélection	59
3.2	Clonage, expression et purification des candidats à l'attraction	63
3.2.1	Clonage des candidats dans des vecteurs d'expression.....	63
3.2.2	Induction de l'expression protéique des candidats.....	65
3.3	Purification des candidats	68
3.4	Tests de guidage des candidats par la méthode du <i>bead assay</i>	72
3.4.1	Optimisation du système.....	73
3.4.2	Limitation des faux positifs	74
3.4.3	Test de guidage de <i>bead assay</i>	74
4	Discussion.....	80
4.1	Les limites des tests de guidage - les risques de faux négatifs	80
4.1.1	La production de protéines dans leur conformation native.....	80
4.1.2	Les modifications post-traductionnelles	82
4.1.3	Deux systèmes d'expression sous conformation native permettant les modifications post-traductionnelles	83
4.2	D'autres systèmes pour tester le guidage courte ou longue distance	84
4.2.1	Optimisation du système de <i>bead assay</i>	84
4.2.2	Le développement de nouveaux tests de guidage.....	85
4.3	A la recherche de nouveaux candidats à l'attraction	87
4.3.1	Les nouveaux candidats issus de l'étude du transcriptome	88
4.3.2	Une nouvelle méthode pour l'identification d'attractants gamétophytiques chez <i>S. chacoense</i>	88
4.4	Une régulation par le stade développemental d'une attraction longue ou courte distance?.....	91
4.5	Hypothèse sur une seconde barrière à l'hybridation chez les Solanacées tubéreuses.....	92
5	Conclusion	94
6	Bibliographie.....	i

7 Annexe i

Liste des tableaux

Tableau 1. Structure des amorces dépendamment de la stratégie de clonage.	45
Tableau 2. Liste des 20 candidats à l'attraction retenus, caractéristiques et réponses aux critères.....	61
Tableau 3. Patron de cystéines des sous-familles de CRP des candidats sélectionnés.....	62
Tableau 4. Résumé des résultats de clonage, d'expression et de purification des candidats à l'attraction.	67
Tableau 5. Résultats des tests de guidage des protéines candidates.....	76
Tableau 6. Liste des amorces des candidats clonés avec succès. Erreur ! Signet non défini.	

Liste des figures

Figure 1. Développement du sac embryonnaire d' <i>A. thaliana</i> , selon le modèle Polygonum.....	6
Figure 2. Structure du pistil et déroulement de son interaction avec le tube pollinique chez les <i>Solanum</i>	8
Figure 3. Différences structurales entre les sacs embryonnaires d' <i>A. thaliana</i> et de <i>T. fournieri</i>	22
Figure 4. Alignement des LURE identifiées chez <i>A. thaliana</i> et <i>T. fournieri</i> en fonction de leurs patrons de cystéine.	26
Figure 5. Attraction de tubes polliniques en fonction du stade de développement de l'ovule.	40
Figure 6. Représentation schématique du système du test de guidage du <i>bead assay</i>	55
Figure 7. Détermination de l'angle de réorientation passive σ	56
Figure 8. Résultat de la purification des candidats ScCRP13.1 et ScCRP5.1.	70
Figure 9. Purification de ScCRP5.2 dans des conditions natives.	71
Figure 10. Résultat de spectrométrie de masse des candidats ScCRP4.4, ScCRP13.1 et ScCRP15.2.	71
Figure 11. Pourcentage d'attraction des tubes polliniques par des LURE en fonction de la concentration.	75
Figure 12. Test de guidage des candidats ScCRP2.5 et ScCRP23.1 par la méthode du <i>bead assay</i>	77
Figure 13. Test de guidage du candidats ScCRP5.1 par la méthode du <i>bead assay</i>	78
Figure 14. Schéma de dispositif microfluidistique à micro-canaux inspiré de (Horade et al., 2013).....	87
Figure 15. Arbre phylogénétique des DEFL paralogues d' <i>A. thaliana</i> et d' <i>A. lyrata</i>	90

Liste des sigles et abréviations

1' : premier critère de sélection de candidat de premier niveau

1" : premier critère de sélection de candidat de second niveau

2' : second critère de sélection de candidat de premier niveau

2" : second critère de sélection de candidat de second niveau

2DBA : 2 jours avant anthèse (*two days before anthesis*)

A : anthèse

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : appareil filiforme (*filiforme apparatus*)

AGP : *arabinogalactan protein*

AMOR : *ovular methyl-glucuronosyl arabinogalactan*

ARNt : acides ribonucléiques de transfert, ou ARN de transfert

BK : milieu de Brewbaker et Kwack

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA : *Bovine serum albumin* - Sérum d'albumine bovin

BME : β -mercaptoethanol

$[Ca^{2+}]_{cyto}$: Ca^{2+} libre cytosolique

CBS : *Center for Biological Science*

ccg/ CCG: central cell guidance

cer : mutant eceriferum

CPM : *Count Per Minute*

CRP : *Cysteine-Rich Protein*

DEFL : *Defensin-Like*

DGE : Différentiel d'expression (*Differential Gene Expression*)

DTT : *Dithiothréitol*

ECA1 : *early culture abundant 1*

ECM : matrice extracellulaire (*extracellular matrix*)

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EST : *Expressed Sequence Tag*

FC : *fold change*

FIS : *fertilization independent seed*

FIS-PRC2 : *Fertilization Independent Seed -polycomb-repressive complex 2*

FG: Gamétophyte femelle (*female gametophyte*)

FGn : stade n du développement du gamétophyte femelle

FN : faux négatif

FP : faux positif

FPLC : *Fast Protein Liquid Chromatography*

FRK1 : *Fertilization-Related Kinase 1*

GABA : acide γ -aminobutyrique

GSP : *Generally Secreted Protein*

GST : *Glutathione S-transferase*

HAP : Heure après la pollinisation (*hour after pollination*)

HF : *High Fidelity*

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa : kilodalton

lap: *less adherent pollen*

LB : *Lysogeny broth*

LePRK: *L. esculentum pollen receptor kinase*

LIP : *Lost In Pollen tube guidance*

LTP : *Lipid Transfert Protein*

LURE : CRP impliquée dans l'attraction du pollen

LRR : *Leucine Rich Repeat*

maa : *magatama*

MAP kinase: *Mitogen-Activated Protein kinase*

MAP : *Microtubule-Associated Proteins*

MAPKKK : *Mitogen-Activated Kinase Kinase Kinase*

MBP : Maltose-binding protein

MCS : *Multiclonage site*

MDIS : *Male Discovery*

MIK : *MDIS1-Interacting Receptor Like Kinase*

MGU : *Male Germ Unit*

MLO : *Mildew Resistance Locus O*

MP : micropyle

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaTTS : glycoprotéines du style de *N.alata*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

NEB : *New England Biolabs Inc.*

NTA : NORTIA

oOSP : *ovule-specific OSP*

OSP : *Ovule Secreted Protein*

O/N : *Over-night*

PBS : tampon phosphate salin (*phosphate buffered saline*)

PCP : *pollen coat protein*

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)

PMI : première division mitotique (*pollen mitosis I*)

PMII : seconde division mitotique (*pollen mitosis II*)

POP2 : *Pollen-Pistil Interaction2*

PRC : *Polycomb-Repressive Complex*

PRK : *Pollen Receptor Kinase*

PT : tube pollinique (*pollen tube*)

RALF : *Rapid Alkalinization Factor*

RLK : *Receptor like kinase*

rpm : tour par minute (*round per minute*)

ROP1 : *RHO OF PLANTS 1*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RT : Température ambiante (*room temperature*)

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

SB5x : SDS-PAGE buffer 5x

SCA : Stigma/stylar Cystein-rich Adhesin

ScCRP : CRP identifiée dans le transcriptome de *Solanum chacoense*

SCR : *S-locus cysteine-rich ligand*

SIV : *semi-in vivo*

SLG : *Secreted S-locus Glycoprotein*

SLR1 : *S-locus related 1*

SP11 : S-locus protein 11

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SRK : S-receptor kinase

STIG1 : stigma-specific protein 1

T_m : température d'hybridation

TTS : Transmitting-Tissue-Specific protein

UTR : Untranslated Region

UV : rayonnement ultra violet

V : Volt

WT : sauvage (Wild-type)

ZmEA1 : Zea mays Egg Apparatus 1

Remerciements

Alors évidemment pour commencer, je voudrais sincèrement remercier Daniel Matton, mon directeur de recherche. Je le remercie de m'avoir offert la possibilité d'intégrer son laboratoire pour mener ce projet, de m'avoir remonté les bretelles quand il le fallait, soutenu, de m'avoir permis de me diversifier, et qui finalement m'a mené à cet aboutissement. Ces deux années m'ont permis de me développer aussi bien sur le plan personnel qu'académique, et sans lui rien de cela n'aurait été possible.

Dans un second temps, je souhaiterais remercier ces personnes de l'IRBV qui ont rendu agréable ce long séjour. Je voudrais remercier Valentin, aussi bien pour son soutien, pour le duo que nous avons formé ces deux années de suite en tant qu'auxiliaire d'enseignement et dans notre projet de recherche commun, mais avant tout pour son amitié. Benjamin, pour son dynamisme si motivant, à qui je souhaite de mener un beau projet de doctorat. Caroline, pour son aide au laboratoire. Mathieu, avec qui j'ai effectué mon premier stage à l'IRBV, toujours présent pour répondre à mes questions. Yang, dont j'ai repris le projet et qui m'a encadré au début de ma maîtrise. Et tous les autres, évidemment.

Je voudrais remercier mes amis qui me sont si précieux.

Mais avant tout, je voudrais remercier mes parents, qui chacun à leur façon m'ont donné le goût de la science, pour m'avoir toujours soutenu même dans mon choix de m'établir de l'autre côté de l'océan, et pour l'exemple qu'ils m'inspirent. Et pour finir mon frère et nos moments partagés.

1 Introduction

1.1 Le tube pollinique : origine et développement

1.1.1 Le tube pollinique, une innovation pour répondre à la perte de mobilité des noyaux spermatiques

La reproduction sexuée favorise la pérennité d'une espèce en permettant une augmentation de la diversité des individus par le brassage génétique. Cependant, et contrairement à la reproduction végétative où un individu ne dépend que de lui-même pour se multiplier, la reproduction sexuée nécessite l'intervention de deux acteurs, les gamètes mâles et femelles. Le succès de ce mode de multiplication dépend donc de la capacité des deux gamètes à se rencontrer.

Chez les plantes terrestres, la rencontre des gamètes peut se faire de façon active ou passive. Chez les espèces dites zoïdogamiques, notamment les ptéridophytes et certaines gymnospermes aujourd'hui éteints, le gamète mâle mobile, puisque flagellé, l'anthérozoïde, se déplace activement jusqu'au gamète femelle grâce au liquide sécrété par des éléments de l'appareil reproducteur femelle (Poort, Visscher, & Dilcher, 1996). Une fécondation zoïdogamique est différente de la fécondation aquatique, des Bryophytes par exemple, puisqu'elle est interne aux organes reproducteurs.

En revanche, chez les espèces dites siphonogamiques, auxquelles appartiennent les plantes à fleurs, le gamète mâle a perdu son flagelle et est transporté passivement jusqu'à l'ovule dans le cytoplasme d'une structure unique, le tube pollinique. Décrite pour la première fois au XIX^e siècle par le botaniste Giovanni Battista Amici (Amici, 1830), cette excroissance tubulaire du microgamétophyte, le grain de pollen, croît jusqu'aux ovules où elle délivre les noyaux spermatiques (gamètes mâles) afin de procéder à la double fécondation menant à la formation d'une graine contenant un embryon et un albumen. La perte de mobilité des gamètes s'est faite parallèlement au recrutement de tube pollinique pour leur transport passif (Hafidh, Fíla, & Honys, 2016).

La coexistence de gamètes mobiles et de tubes polliniques chez différentes espèces, notamment *Ginkgo bilboa*, *Cycas revoluta* ou le gymnosperme éteint *Glossopteris*, indique que la structure du tube pollinique avait une autre fonction avant son recrutement pour un rôle siphonogame. L'hypothèse reconnue aujourd'hui serait un rôle haustorial, nutritif, permettant de fournir des nutriments aux anthérozoïdes (Friedman & Gifford, 1997; Nishida, Pigg, Kudo, & Rigby, 2004). Cette hypothèse est étayée par la découverte de tubes polliniques et de gamètes mobiles dans le gamétophyte femelle de *Glossopteris* (Nishida et al., 2004). Ces tubes polliniques haustoriaux s'élongent, se branchent au tissu diploïde interne des ovules, le nucelle, qu'ils digèrent, permettant d'apporter des nutriments aux anthérozoïdes en développement à l'autre extrémité du tube. Une fois mature, le mur cellulaire se brise, relâchant les gamètes mobiles pouvant alors nager jusqu'au gamétophyte femelle et en assurer la fécondation.

1.1.2 Le développement du pollen

Le passage du mode de vie haplodiplophasique avec des organismes ayant des formes diploïdes puis haploïdes se succédant, des algues, mousses et fougères, à un mode de vie diplophasique, majoritairement diploïde, des plantes à fleurs, s'est accompagné d'une diminution en taille de la structure à l'origine de la formation des gamètes, les microsporangies. Chez les angiospermes, les anthères, structures situées à l'extrémité des étamines, sont le lieu de formation des gamétophytes mâles. L'ensemble des étamines forme l'androcée. Les anthères immatures contiennent des microsporangies, les microsporocytes, « les cellules mères » diploïdes. Le microsporocyte passe par deux divisions méiotiques dont le résultat est la formation de quatre microspores haploïdes, regroupées en tétrade : c'est la microsporogénèse. Ces microspores se développent ensuite en un gamétophyte mâle, le grain de pollen. Deux divisions mitotiques successives assurent la présence de deux noyaux spermatiques, nécessaires à la double fécondation : c'est la microgamétogénèse (Hafidh et al., 2016).

1.1.3 La microsporogénèse, de la formation de la tétrade à sa dissociation et la formation du manteau pollinique

1.1.3.1 La microsporogénèse

Les microspores, cellules mères diploïdes, ou microsporocytes, sont encapsulées dans les locules des jeunes anthères. Elles sont entourées par quatre couches cellulaires : le tapetum, la couche intermédiaire, l'endothecium et l'épiderme. Ces microsporocytes sont soumis à deux divisions méiotiques, permettant la formation de quatre microspores haploïdes. La seconde méiose est suivie par la synthèse d'une paroi de callose qui entoure les quatre microspores de la tétrade. Ces quatre microspores se développent rapidement. Dans un premier temps, une paroi cellulaire est synthétisée, constituée de l'intine, la couche interne pectocellulosique d'origine gamétophytique et de la primexine, la couche externe d'origine sporophytique (Scott, Spielman, & Dickinson, 2004).

1.1.3.2 Formation du manteau pollinique

Cette primexine sert de matrice au dépôt du précurseur de la sporopollénine, un biopolymère extrêmement résistant constitué d'acides gras et de phénylpropanoïdes et sert aussi à sa polymérisation. La sporopollénine, dont la formation implique le tapetum métaboliquement actif (Pacini, 1990) n'est pas déposée de façon égale. Au niveau des « ouvertures » du manteau pollinique où les futurs tubes polliniques émergent, le dépôt de sporopollénine est moindre. Ces ouvertures sont un outil de classification du pollen puisque leur nombre, taille et distribution varient selon l'espèce (Furness & Rudall, 2004).

La formation du manteau pollinique est complétée dans les dernières étapes de la microgamétogénèse, quand des résidus du tapetum dégénéralent se déposent à la surface du grain de pollen formant alors ces ornements complexes observables en microscopie (Quilichini, Grienberger, & Douglas, 2015). La structure particulière du manteau pollinique ne protège pas seulement son contenu mais permet une communication spécifique avec le stigmate, région distale du pistil sur laquelle est déposé le pollen. Elle est également impliquée dans la reconnaissance entre le pollen et le stigmate, l'impliquant dans des mécanismes d'auto-incompatibilité sporophytique et de préférence à l'espèce chez les espèces à stigmate sec (ex :

Brassicacées). Le manteau pollinique est également important pour son transport, notamment pour les grains de pollen dont les structures complexes du manteau lui permettent de s'accrocher à des pollinisateurs (Fellenberg & Vogt, 2015).

1.1.3.3 Relâchement de la tétrade et individualisation des microspores

Après le début de la formation de l'exine, les microspores sont relâchées simultanément des tétrades. La libération des microspores de la tétrade est accomplie sous le contrôle du sporophyte. Le tapetum sécrète une enzyme, la callase, responsable de la dégradation des parois de callose, entraînant la séparation de la tétrade en microspores individuelles (Preuss, Rhee, & Davis, 1994). Chacun de ces microspores correspond à un futur grain de pollen.

De nombreuses petites vacuoles apparaissent dans ces microspores libres avant de se regrouper en une seule grosse vacuole qui déplace le noyau initialement en position centrale de la microspore, en périphérie contre la paroi cellulaire. Cette polarisation n'est pas uniquement passive, mais nécessite la participation active des microtubules (Hafidh et al., 2016). Cette polarisation est un signal pour la première division hautement asymétrique de la microgamétogenèse. Une fois matures, les grains de pollen sont généralement hautement déshydratés et sont expulsés par les anthères.

1.1.3.4 La microgamétogenèse à l'origine de la formation des noyaux spermatiques

La microgamétogenèse mène à la formation de grains de pollen matures porteurs de deux noyaux spermatiques et d'un noyau végétatif, par le biais de deux divisions mitotiques.

1.1.3.4.1 La première division mitotique

La première division mitotique (PMI, *Pollen Mitosis I*) engendre deux cellules filles avec des structures et des destinées cellulaires différentes (Twell, Park, & Lalanne, 1998).

L'une des cellules filles est une large cellule végétative dont la chromatine est dispersée, l'autre une petite cellule germinative avec peu d'organites et une chromatine condensée. Pendant la maturation, la cellule végétative accumule des glucides et/ou des réserves lipidiques nécessaires à la formation du futur tube pollinique (Pacini, 1996). La cellule germinative migre à l'intérieur de sa « cellule-sœur » ce qui forme une structure d'une

cellule à l'intérieur d'une autre (Russell et al., 1996; Russell & Jones, 2015). L'asymétrie de la PMI semblerait être un facteur clé dans la destinée des deux cellules filles, et donc dans l'initiation de la lignée germinative mâle. Un rétablissement de la symétrie par centrifugation ou déstabilisation du cytosquelette mène à la formation de deux cellules végétatives similaires (Eady, Lindsey, & Twell, 1995; Terasaka & Niitsu, 1987). La mutation de MOR1/GEM1 chez *Arabidopsis thaliana*, une MAP (Microtubule-Associated Proteins), entraîne une perte de l'asymétrie de la PMI, montrant l'implication active des microtubules dans cette asymétrie, et donc dans la destinée cellulaire des cellules filles [18].

1.1.3.4.2 La seconde division mitotique

La seconde division mitotique (PMII, *Pollen Mitosis II*), ne concerne que la cellule germinative. Elle a lieu dans l'anthere pour le pollen tricellulaire ou au cours de l'élongation du tube pollinique pour le pollen bicellulaire, forme majoritaire de pollen chez les angiospermes (Brewbaker, 1967). Cette division mitotique permet la formation de deux noyaux spermatiques identiques. Ce sont ces noyaux qui assurent la double fécondation avec la cellule centrale et l'oosphère de l'ovule (**Figure 3**). Après la PMII, le noyau végétatif et les noyaux spermatiques s'associent en un complexe, le MGU (*Male Germ Unit*) (Lalanne & Twell, 2002). Ce complexe coordonne l'expulsion des noyaux spermatiques assurant la double fécondation.

1.2 Le développement du sac embryonnaire

Les carpelles sont les structures reproductrices femelles des plantes à fleurs. L'ensemble des carpelles constitue le gynécée, autrement nommé pistil. Le carpelle comprend un stigmate, couvert ou non d'un exsudat, nécessaire à la réception des grains de pollen. Le stigmate surmonte le style, un conduit pouvant aller de quelques millimètres chez *A. thaliana* à une trentaine de centimètres chez *Zea mays*. Les styles, majoritairement creux chez les monocotylédones et pleins d'un tissu de transmission chez les dicotylédones surplombent l'ovaire. Les ovaires contiennent un nombre variable d'ovules rattachés au placenta par un funicule. Ces ovules sont constitués de tissus sporophytiques diploïdes et de tissus gamétophytiques haploïdes. Une ou deux couches cellulaires, le ou les téguments, diploïdes,

entourent et protègent le nucelle, également diploïde. Le nucelle contient le mégasporocyte à l'origine de la formation du sac embryonnaire.

De façon similaire au pollen, le développement du sac embryonnaire se déroule en deux phases, la mégasporogénèse suivie de la mégagamétogénèse (**Figure 1**).

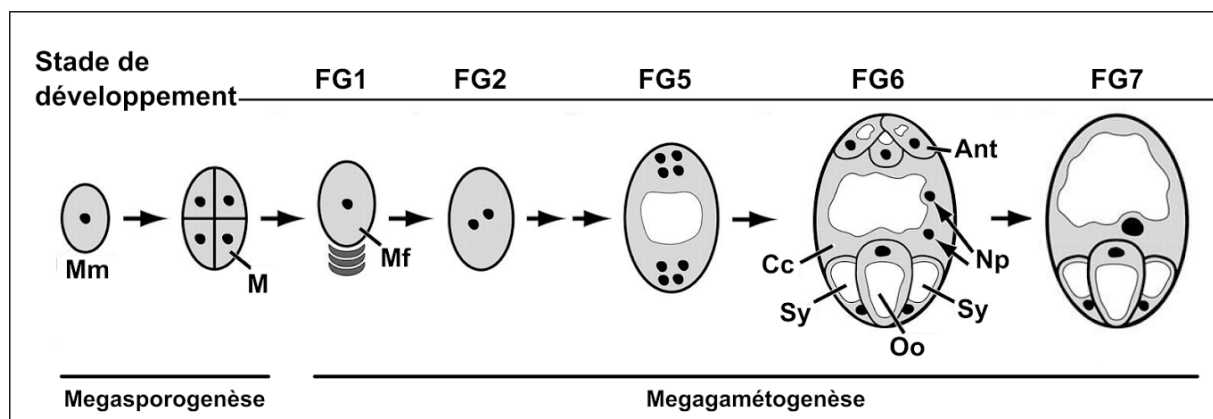


Figure 1. Développement du sac embryonnaire d'*A. thaliana*, selon le modèle Polygonum.

Mm = mégaspore mère diploïde; M = mégaspore haploïde; Mf = mégaspore fonctionnelle; Cc = cellule centrale; Sy = cellule synergide; Os = oosphère; Np = noyaux polaires; Ant = cellules antipodales. Traduit et adaptée à partir de (Yadegari & Drews, 2004).

1.2.1 La mégasporogénèse

Au niveau du placenta de l'ovaire, un primordium se forme. Sur un axe proximo-distal, trois domaines peuvent se distinguer : le funicule, proximal, qui relie le reste de l'ovule au placenta, la chalaze intermédiaire et le nucelle, distal, contenant le mégasporocyte, ou mégaspore, « la cellule mère » diploïde. Ce mégasporocyte subit deux méioses successives qui donnent quatre cellules haploïdes alignées linéairement formant une tétrade, les mégaspores. Dans le modèle le plus courant de mégasporogénèse et présent chez près de 70 % des angiospermes, soit le type *Polygonum*, les trois mégaspores inférieures dégénèrent sous l'influence d'un signal apoptotique (stade FG1) (Yadegari & Drews, 2004). La mégaspore restante, en position apicale, est à l'origine du gamétophyte femelle, ou mégagamétophyte, ou sac embryonnaire. Dans les autres modèles de mégasporogénèse, plusieurs mégaspores survivent pour former le mégagamétophyte.

1.2.2 La mégagaméto-genèse

La mégaspore fonctionnelle subit trois mitoses successives synchrones, sans cytotdiérèse (stades FG2 à FG4). Les 8 noyaux formés se répartissent symétriquement dans le syncytium, 4 noyaux au niveau du micropyle, 4 noyaux au niveau de la chalaze (stade FG5). Deux noyaux de chaque pôle migrent au centre, ce sont les noyaux polaires. Parallèlement, le sac embryonnaire se cellularise, formant une structure à 7 cellules : au pôle de la chalaze, trois cellules antipodales se forment, les noyaux polaires qui fusionnent entre les stades FG6 et FG7 forment la cellule centrale binuclée, et au pôle micropylaire, deux cellules synergides et la cellule-œuf, ou oosphère (stade FG6). Pendant la maturation du sac embryonnaire, les cellules antipodales finissent par dégénérer (stade FG7) (Christensen, King, Jordan, & Drews, 1997).

Parallèlement à la gaméto-genèse, la fleur se développe, et lorsque le sac embryonnaire atteint sa maturité la fleur est à l'an-thèse (A), prête à être pollinisée puis fécondée.

1.3 La communication pollen-pistil : de l'adhérence des grains de pollen à la prévention de la polyspermie

Les grains de pollen, porteurs de l'information génétique mâle et les ovules, porteurs de l'information génétique femelle, sont les deux acteurs gamétiques de la reproduction sexuée chez les angiospermes. Les grains de pollen ayant atteint leur maturité sont libérés des sacs polliniques et dispersés dans leur environnement au moyen de pollinisateurs, ou du vent. Si un grain de pollen atteint un stigmate approprié, plusieurs défis se présentent avant qu'il ne délivre ses noyaux spermatiques à un ovule. Dans un premier temps, il doit adhérer au stigmate, se réhydrater pour enfin germer. Le tube pollinique qui en résulte doit alors croître à travers le style, atteindre l'ovaire puis un ovule, auquel il délivre ses noyaux spermatiques. Finalement, et afin de prévenir la polyspermie, cet ovule fécondé doit pouvoir cesser l'attraction des tubes polliniques retardataires. Ces étapes sont représentées sur la **Figure 2**.

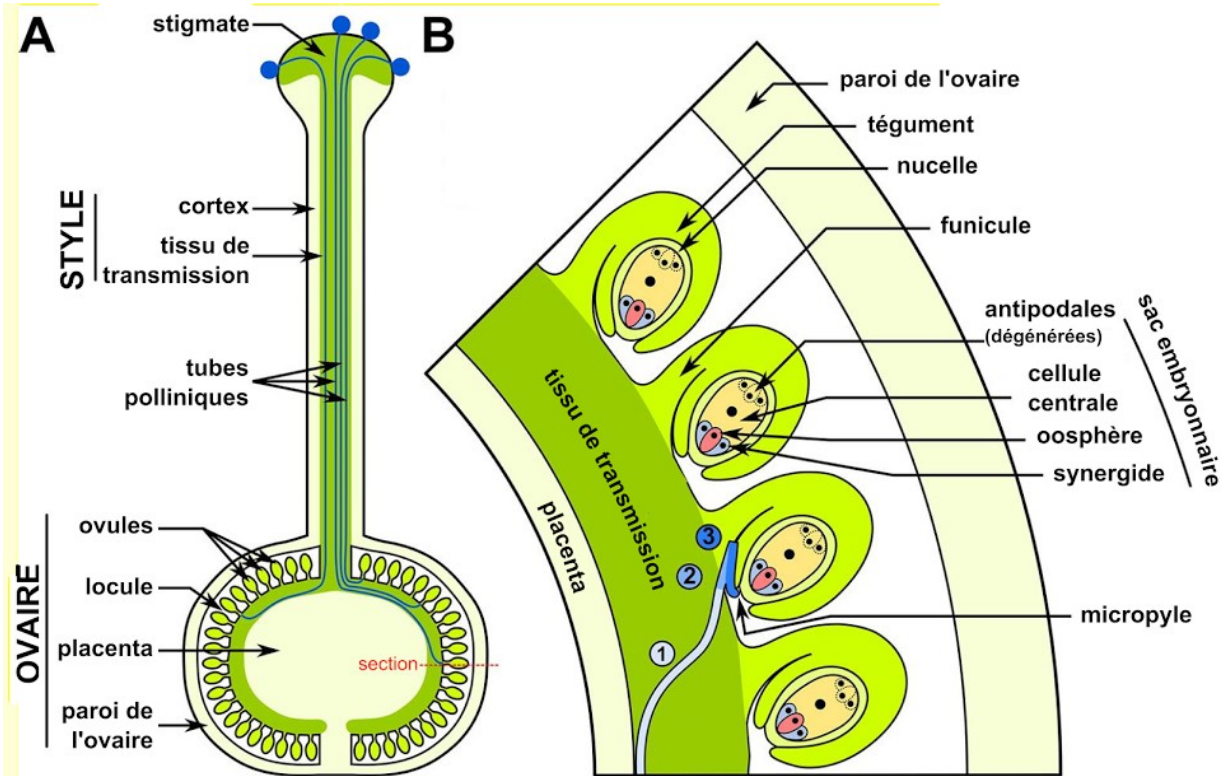


Figure 2. Structure du pistil et déroulement de son interaction avec le tube pollinique chez les *Solanum*. A. Des grains de pollen adhèrent, s'hydratent et germent au niveau du stigmaté. Les tubes polliniques croissent le long du style dans le tissu de transmission jusqu'à l'ovaire. B. Vue détaillée d'une coupe d'ovaire présentant les dernières étapes avant la double fécondation. Une fois dans l'ovaire, le tube pollinique sort de l'espace intercellulaire du tissu de transmission et s'oriente vers un ovule (1), croit le long du funicule (2) puis se dirige vers le micropyle (3). Après avoir atteint le micropyle, le tube pollinique pénètre une cellule synergide et expulse ses noyaux spermatiques. Adaptée et traduit à partir de (Liu, Joly, Dorion, Rivoal, & Matton, 2015).

1.3.1 De l'adhérence au stigmaté à la croissance dans le style

1.3.1.1 Adhérence au stigmaté

Le succès de la pollinisation dépend de la capacité des grains de pollen à adhérer rapidement à un stigmaté compatible. Dès cette première phase de communication entre le pollen et les tissus reproducteurs femelles, on observe la mise en place de procédés de

reconnaissance capables de distinguer les grains de pollen compatibles de ceux qui sont incompatibles, dans des cas de pollinisation interspécifique ou auto-incompatible.

L'adhérence du grain de pollen au stigmate dépend de la nature de celui-ci. On distingue deux formes de stigmates, les secs et les humides. Les stigmates des familles incluant les *Solanaceae*, les *Liliaceae* et les *Rosaceae* sont décrits comme humides puisque recouverts d'abondantes sécrétions des cellules papillaires, composées de sucres et de glycoprotéines. Cette matrice permet une adhérence efficace, mais non discriminante des grains de pollen. Les stigmates secs, observés chez des familles considérées comme plus avancées en matière d'évolution comme les *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Poaceae* ou *Papaveraceae*, permettent une adhérence plus spécifique des grains de pollen par complémentarité physicochimique avec la surface des cellules papillaires (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977).

La première étape de l'adhérence chez *A. thaliana* implique des molécules lipophiliques de l'exine des grains de pollen (Zinkl, Zwiebel, Grier, & Preuss, 1999). L'altération du manteau pollinique chez les mutants *cer* n'affecte pas la qualité de l'adhérence, contrairement à des aberrations structurales de l'exine chez les mutants *lap1* (*less adherent pollen 1*) (Zinkl & Preuss, 2000). Après cette phase initiale d'adhérence, le manteau pollinique riche en lipides se glisse entre le grain de pollen et le stigmate pour former une zone de contact riche en lipides, similaire à l'exsudat des stigmates humides (Elleman & Dickinson, 1990).

Dès que le grain de pollen entre en contact avec la surface du stigmate, un phénomène de préférence à l'espèce est observé chez les espèces au stigmate sec (Zinkl et al., 1999). La seconde étape de l'adhérence nécessite quant à elle des interactions entre des protéines du manteau pollinique, ou PCP-A (Pollen Coat Protein), les SLR1-BP1 et SLR1-BP2 (Takayama et al., 2000) avec des protéines du stigmate SLR1 (S-locus related 1), exprimées dans les cellules papillaires du stigma et sécrétées dans le mur cellulaire (Luu, Marty-Mazars, Trick, Dumas, & Heizmann, 1999). Ces interactions mènent à l'initiation de l'hydratation des grains de pollen, et sont impliquées dans la reconnaissance des grains de pollen non compatibles dans les cas d'auto-incompatibilité. Les acteurs de l'auto-incompatibilité, identifiés chez les *Papaveracea* (Franklin, Lawrence, & Franklin-Tong, 1995) et les *Brassicaceae* (Stein, Dixit, Nasrallah, & Nasrallah, 1996); (Stephenson et al., 1997) sont du côté stigmatique, des

glycoprotéines (SLG, Secreted S-locus Glycoprotein) (Nasrallah, Kao, Goldberg, & Nasrallah, 1985), des récepteurs sérine/thréonine kinase (SRK, S-receptor kinase) (Stein, Howlett, Boyes, Nasrallah, & Nasrallah, 1991), et du côté du pollen, des PCP-A1 (Doughty et al., 1998) et des protéines riches en cystéines (*S*-locus protein 11 ou *S*-locus Cys-rich, SP11/SCR) (Shiba et al., 2001).

1.3.1.2 Hydratation des grains de pollen

Les grains de pollen sont métaboliquement en quiescence et hautement déshydratés, contenant de 15 % à 35 % d'eau. Cette forte déshydratation a un rôle important dans leur viabilité (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). Afin de pouvoir germer, les grains de pollen ayant adhéré à la surface du stigmate doivent se réhydrater, le flux d'eau provenant du stigmate. Cette phase d'hydratation nécessite la présence de lipides que ce soit chez les plantes à stigmates humides ou secs. Chez les plantes à stigmates secs, un défaut de biosynthèse des lipides du manteau pollinique chez les mutants *pop1* ou *cer* mène à la stérilité du grain de pollen, incapable de s'hydrater et de germer normalement (Hülkamp, Kopczak, Horejsi, Kihl, & Pruitt, 1995). L'application de trilinoléine exogène sur le stigmate du mutant *cer* d'*A. thaliana* permet le rétablissement de l'hydratation (Wolters-Arts, Lush, & Mariani, 1998). Chez les plantes à stigmates humides, comme *Nicotiana*, un défaut dans la production de l'exsudat chez les mutants *stig1* empêche une hydratation normale, qui peut être surmontée par l'ajout de l'exsudat riche en lipides de *Petunia* (Wolters-Arts et al., 1998). L'étude de ces différents mutants démontre la nécessité d'une présence lipidique provenant de l'acteur mâle ou femelle. Il a été proposé que ces lipides régulent la prise d'eau par les grains de pollen. Ce flux d'eau serait contrôlé par la présence d'aquaporine dans l'épiderme du stigmate (Dixit, Rizzo, Nasrallah, & Nasrallah, 2001).

L'hydratation est un mécanisme régulé de façon temporelle et spatiale. Si elle est inappropriée, cela peut mener à une germination prématurée (Johnson & McCormick, 2001) ou sur une surface inappropriée (Lolle & Cheung, 1993). Comme pour l'adhérence, l'hydratation des stigmates secs est une barrière supplémentaire pour la discrimination des grains de pollen compatibles de ceux incompatibles. Ce phénomène de sélection est particulièrement efficace puisqu'une même papille peut hydrater un grain de pollen compatible

et ne pas hydrater un grain de pollen incompatible (Dickinson, 1995). Cette reconnaissance est permise par des protéines riches en cystéines sécrétées par le manteau pollinique (Hülkamp et al., 1995; Lewis & Crowe, 1958; Wang & Doughty, 2016). Des peptides du manteau pollinique des *Brassica* ont été identifiés comme impliqués dans l'auto-incompatibilité pendant la phase d'hydratation. Ainsi, une protéine localisée sur la membrane des cellules papillaires des *Brassica*, Exo70A1, permettant l'attachement à la membrane plasmique des vésicules post-Golgi nécessaires à l'hydratation, serait impliquée dans la voie de signalisation discriminant les grains de pollen auto-incompatibles. Les stigmates surexprimant Exo70A1 ne peuvent ainsi discriminer le pollen de même S-haplotype, alors que les mutants ayant un défaut dans leur expression ne sont plus capables d'hydrater les grains compatibles (Samuel et al., 2009).

1.3.1.3 Polarisation interne avant germination

Après l'hydratation du grain de pollen, on observe une réorganisation de ses organites et de son cytosquelette afin de supporter l'émergence et l'extension d'un tube pollinique. Le cytosquelette forme une structure filamenteuse autour du noyau végétatif, les filaments d'actines se polarisent en direction du site d'émergence du tube (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1992) et les noyaux se réorganisent afin que le noyau végétatif précède les noyaux germinatifs dans le tube pollinique (Lalanne & Twell, 2002); les mitochondries se réorganisent au site d'élongation pour fournir de l'énergie à l'élongation du futur tube pollinique. On observe également un dépôt de callose sur le futur site d'émergence du tube (Cresti, Ciampolini, Mulcahy, & Mulcahy, 1985). Cette polarisation semble être orientée par l'environnement physique du grain de pollen hydraté. En effet, les tubes polliniques ont tendance à émerger vers l'ouverture la plus proche de l'interface hydrophobique/aqueuse entre la surface du stigmate et du grain de pollen (Lush, Grieser, & Wolters-Arts, 1998). La présence de lipides est nécessaire à cette polarisation. Les tubes polliniques des mutants dépourvus de manteau pollinique riches en lipides, dont l'hydratation peut être forcée quand placés en milieu très humide (Carter & McNeilly, 1975), ont tendance à émerger indépendamment de la position du stigmate (Preuss, Lemieux, Yen, & Davis, 1993).

1.3.1.4 Germination

Cette polarisation permet l'activation, par des voies encore méconnues, de l'émergence d'un tube pollinique. Elle provoque notamment le recrutement d'acteurs impliqués dans les dynamiques d'actines fibrillaire et dans l'établissement d'un gradient calcique au point d'émergence du tube pollinique, dont ROP1 (Rho Of Plants 1), une *GTP binding protein* (Gu, Vernoud, Fu, & Yang, 2003), ou dans le phénomène d'exocytose à son extrémité nécessaire à son élongation, comme Rop Interacting CRIB-Containing1 (Li, Lin, Heath, Zhu, & Yang, 1999). Les dynamiques d'actines, l'établissement d'un gradient calcique et l'exocytose de vésicules de sécrétion sont nécessaires à la croissance d'un tube pollinique (Fu, 2015). Le tube pollinique en formation doit alors briser la barrière de l'exine afin d'émerger du grain de pollen. Selon les espèces, le tube pollinique peut franchir directement l'exine (ex : *A. thaliana*) ou traverser une ouverture (par ex : l'eucalyptus) (Edlund, Swanson, & Preuss, 2004). Pour permettre la germination, deux mécanismes peuvent affaiblir l'exine, soit une digestion enzymatique (Gherardini & Healey, 1969) soit une force mécanique, comme la pression de turgescence.

1.3.1.5 La pénétration dans le stigmate et dans le style

Une fois que le tube pollinique émerge, il doit pénétrer dans le stigmate. Chez les plantes à stigmate creux, le tube pollinique peut pénétrer directement dans le style. En revanche, chez les espèces à stigmate plein, une digestion enzymatique de la cuticule externe du stigmate est nécessaire. Cette digestion est précisément contrôlée par la reconnaissance du tube pollinique par le stigmate, permettant alors au pistil d'être protégé contre l'invasion de pathogènes. Deux récepteurs kinases localisés à l'extrémité du tube pollinique, LePRK1 et LePRK2 (*Lycopersium esculentum* Pollen Receptor Kinase) ont été identifiés chez la tomate cultivée comme pouvant être des acteurs de cette communication (Muschiatti, Eyal, & McCormick, 1998). L'association entre le LePRK et son ligand, LAT52, une protéine riche en cystéine (*cysteine-rich protein*; CRP) spécifique du pollen, serait impliquée dans une cascade de signalisations régulant la croissance du tube pollinique (Tang, Ezcurra, Muschiatti, & McCormick, 2002).

La communication précise entre le pollen et le stigmate permet une protection contre les pathogènes, le rejet du pollen auto-incompatible et le rejet du pollen provenant d'autres espèces. Mais, comme nous l'avons vu, certaines de ces espèces ne peuvent accomplir ces fonctions du fait de leur type de stigmate : il n'y a pas de véritable discrimination dans l'adhérence et l'hydratation chez les espèces à stigmate unique, ni de reconnaissance, ni d'identification des tubes polliniques chez les espèces à stigmate creux. D'autres mécanismes doivent être mis en place dans la suite du voyage.

Une fois que le tube pollinique a atteint le style, la matrice extracellulaire du tissu de transmission lui apporte les nutriments nécessaires à sa croissance. Il croît alors entre les espaces intercellulaires du style pour atteindre l'ovaire, puis se dirige vers l'entrée de l'ovule, le micropyle.

1.3.2 La réception du tube pollinique

A la fin de son voyage aux abords du micropyle, le tube pollinique ralentit. Il pénètre alors dans le micropyle, croît à travers l'appareil filiforme (AF; *filiform apparatus*, FA), pénètre la cellule synergide réceptive dont il entraîne la dégénération puis il décharge ses deux noyaux spermatiques. L'un de ces noyaux migre jusqu'à l'oosphère, le second jusqu'à la cellule centrale, c'est la double fécondation. Un grand nombre d'acteurs de la communication entre le tube pollinique et le sac embryonnaire permettent le bon déroulement de cette étape, la réception du tube pollinique.

1.3.2.1 Arrêt de la croissance et décharge des noyaux spermatiques.

La première phase de la réception du tube pollinique par l'ovule menant à l'arrêt de son élongation et à la décharge des noyaux spermatiques est contrôlée par une communication entre des protéines de l'AF et des synergides, ainsi que du tube pollinique. Dans un premier temps, la vitesse de croissance du tube pollinique diminue lorsque ce dernier se rapproche du micropyle de l'ovule. Cela pourrait être lié avec la forte concentration en acide γ -aminobutyrique (GABA) au niveau du micropyle, dont l'effet a été démontré *in vitro* (Palanivelu, Brass, Edlund, & Preuss, 2003). FERONIA, un récepteur-like kinase (RLK) est localisé au niveau de l'AF. Les tubes polliniques mutants *fer* parviennent à atteindre le

micropyle, pénètrent une cellule synergide mais ne peuvent ni cesser leur croissance ni expulser leur contenu. Une interaction entre le tube pollinique et les récepteurs FERONIA de l'AF est donc nécessaire pour l'arrêt de la croissance des tubes polliniques (Escobar-Restrepo et al., 2007). Plusieurs acteurs de la voie de signalisation de FER ont été identifiés.

Les mutants de deux gènes, *evan* et *turan*, possèdent un même phénotype que les mutants *fer*. EVAN et TURAN, exprimés dans les tubes polliniques et les ovules, sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique, où ils sont impliqués dans la glycosylation de protéines. En glycosylant d'autres acteurs protéiques, ils participent à la voie de signalisation de FERONIA dans la réception des tubes polliniques (Lindner et al., 2015). Les protéines NORTIA (Shimizu & Okada), un membre de la famille des MLO (*Mildew Resistance Locus O*) sont redistribués au pôle micropylaire de la membrane des synergides à l'arrivée d'un tube pollinique, et agissent également dans voie de signalisation de FER (Kessler et al., 2010). NORTIA serait également impliquée dans la résistance des plantes aux infections fongiques (Kessler et al., 2010). Les voies de signalisation entre la résistance des plantes aux pathogène et la communication avec le tube pollinique présentent certaines similarités (voir le rôle des CRP dans **1.4.2.3.2 L'identification des attractants du guidage micropylaire**). FER contrôle la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) lorsque le tube pollinique entre en contact avec l'AF, dont une forte concentration provoque la rupture de l'apex des tubes polliniques en agissant sur l'activité de ses canaux calciques. Deux homologues de FER, spécifiques au pollen, les RLK ANXUR1 et 2, assurent l'intégrité et la croissance du tube pollinique avant son arrivée aux FA. Chez les mutant *anx1* et *anx2*, l'apex des tubes polliniques explose peu de temps après leur germination. Par une voie de signalisation similaire à celle liant *fer* et la production de ROS, ANXUR régule la production de ROS, par l'intermédiaire de la NADPH oxydase, essentielle au maintien de la croissance des tubes polliniques (Boisson-Dernier et al., 2013).

La rupture de l'apex au moment de la pénétration des tubes polliniques dans une synergide permet l'expulsion des deux noyaux spermatiques. Cette décharge, du moins chez le maïs, est contrôlée par une protéine de type *Defensin-like* (DEFL) dérivée des synergides, ZmES4, via l'ouverture des canaux potassiques KZM1 des tubes polliniques (Amien et al., 2010). Ces noyaux vont alors migrer vers la cellule centrale et l'oosphère avec lesquels ils vont

fusionner. Ces fusions sont contrôlées notamment par EC1 (Egg Cell 1), une protéine de la famille des CRP (Sprunck et al., 2012). Cette double fécondation va mener à la formation d'un zygote diploïde et d'un albumen triploïde, tous deux formant la graine.

1.3.2.2 Prévention de la polyspermie

Un blocage de la polyspermie est essentiel pour un bon développement du zygote. Chez les animaux par exemple, la polyspermie peut conduire à une mort précoce du zygote (Spielman & Scott, 2008). Un contrôle précis dans l'attraction et la répulsion des tubes polliniques par le gamétophyte femelle permet la mise en place d'une barrière à la polyspermie.

Après l'arrivée du tube pollinique, la synergide réceptive dégénère et reçoit le contenu du tube pollinique, permettant aux noyaux spermatiques d'accéder à la cellule centrale et à la cellule œuf. Chez *A. thaliana*, compléter la double fécondation permet un blocage de la polyspermie en bloquant l'attraction d'un second tube pollinique en trois étapes. Premièrement, la fécondation de la cellule centrale provoque la fusion entre la synergide persistante et la cellule centrale, diluant les attractants traduits dans cette synergide ce qui limite son potentiel d'attraction (voir **1.4.2.3.1. Les cellules synergides du sac embryonnaire, sources des attractants**) (Maruyama et al., 2015). Ensuite, la fécondation de l'oosphère active une cascade de signalisation menant à la synthèse d'éthylène. Cet éthylène rend sensible la synergide à une désorganisation nucléaire (Völz, Heydlauff, Ripper, von Lyncker, & Groß-Hardt, 2013). JAGGER, une protéine de type arabinogalactan, est un intermédiaire de cette voie de signalisation (Pereira et al., 2016). Pour finir, la fusion du second noyau spermatique avec la cellule centrale modifie l'expression d'un complexe de remodelage de la chromatine, FIS-PRC2 (*Fertilization Independent Seed (FIS) class polycomb-repressive complex 2* (PRC2), menant à la désorganisation nucléaire de la synergide rendu possible par la synthèse d'éthylène (Maruyama et al., 2013). Ainsi, la double fécondation permet d'abord la dilution des attractants déjà produits, puis rend impossible leur synthèse en désorganisant le noyau de la synergide.

1.4 Le guidage du tube pollinique

Après avoir adhéré au stigmate et germé, l'un des défis majeurs du tube pollinique et dont le succès de la fécondation dépend, est sa capacité à atteindre précisément un ovule afin d'y délivrer ses noyaux spermatiques et d'assurer la double fécondation. Cette croissance directionnelle implique une communication fine entre les tissus sporophytiques puis gamétophytiques femelles avec le tube pollinique.

Les variations directionnelles des tubes polliniques peuvent être aléatoires ou déterminées par des signaux extérieurs. Les signaux externes peuvent être de nature mécanique, lorsque le tube pollinique se heurte à la cuticule du stigma ou aux parois cellulaires du tissu de transmission, ou de nature chimique, quand des éléments peptidiques, protéiques ou autres sont sécrétés par les tissus femelles. Le guidage du tube pollinique est le mécanisme permettant la navigation des tubes polliniques depuis le stigmate où il germe jusqu'au micropyle d'un ovule. Ce guidage est permis par la formation de gradient de signaux chimiques originaires des tissus femelles et par leur intégration par le tube pollinique. Les tissus sporophytiques et gamétophytiques agissent de façon complémentaire afin de mener les tubes polliniques au micropyle. Ainsi, les tubes polliniques peuvent atteindre la partie basale du style en absence de gamétophytes femelles dans un système semi-*in vivo* (SIV), ou en présence d'ovules immatures. Cependant, la sécrétion à faible et longue distance d'attractants d'origine gamétophytique est nécessaire pour la dernière phase du guidage jusqu'au micropyle (Hulskamp, Schneitz, & Pruitt, 1995; Sogo & Tobe, 2005).

Le premier attractant proposé dans les années 1960 fut l'ion calcium (Mascarenhas & Machlis, 1962). Un gradient croissant de Ca^{2+} le long du pistil semblait en effet suggérer un rôle d'attractant. Cependant, le calcium externe étant également impliqué dans l'élongation de l'extrémité apicale des tubes polliniques, distinguer son rôle d'attraction de celui de stimulateur de croissance est difficile (Steinhorst & Kudla, 2013). Au cours de la dernière décennie, d'autres attractants comme des protéines riches en cystéines (CRP), des arabinogalactans (AGP) ou des acides aminés ont été identifiés.

1.4.1 Le guidage pré-ovulaire gouverné par des tissus sporophytiques

1.4.1.1 Le guidage dans le stigmate

Comme vu précédemment, l'influx d'eau en provenance de l'exsudat du stigmate est un déterminant de la polarisation du grain de pollen ayant été hydraté. De cette polarité dépend l'emplacement de l'émergence d'un tube pollinique, l'influx d'eau peut donc être considéré comme un premier signal de guidage physico-chimique. D'autres éléments du guidage stigmatique ont été identifiés à ce jour.

Dans le lys, l'exsudat du stigmate est capable d'attirer les tubes polliniques *in vitro*. La chémocyanine, une petite protéine de 10 kDa appartenant à la famille de la plantacyanine, les cuprédoxines, a été extraite et identifiée comme l'un des acteurs, si ce n'est l'acteur de cette attraction (Kim et al., 2003). Sa capacité d'attraction est accrue par la présence d'une LTP (*Lipid Transfert Protein*), la SCA (*Stigma/stylar Cystein-rich Adhesin*). Cette protéine d'origine stylaire et pollinique est impliquée dans l'adhésion des tubes polliniques au tissu de transmission en interagissant avec les pectines de ce dernier, rendant la matrice extracellulaire adhérente (Park et al., 2000).

Chez *A. thaliana*, la plantacyanine, similaire à 86,8 % à la chémocyanine du lys en termes d'acides aminés, est également impliquée dans la chimio-attraction des tubes polliniques. Sa surexpression dans les tissus femelles entraîne des défauts de pénétration de tubes polliniques WT (*Wild Type*) dans les cellules papillaires (Dong, Kim, & Lord, 2005).

1.4.1.2 Le guidage par le tissu de transmission

Après la pénétration du stigmate et l'entrée dans le style, les tubes polliniques entrent en contact avec la matrice extracellulaire du tissu de transmission (ECM). L'ECM est riche en protéines, telles que la SCA (Park et al., 2000), qui permettent l'adhérence du tube pollinique au tissu de transmission. Cette adhérence permet une connexion physique, facilitant ainsi la communication entre ces deux types cellulaires. Le tissu de transmission constitue un support physique à la croissance des tubes polliniques, et chez certaines espèces, l'architecture du style seule permet de guider les tubes polliniques jusqu'à son extrémité basale. Quand les grains de pollen sont placés sur le stigmate, ils germent et sortent à l'extrémité inférieure du style.

Cependant, chez *Torenia fournieri*, quand des grains de pollen sont placés à l'extrémité inférieure d'un style disséqué, les tubes polliniques croissent en direction du stigmate. Quand des grains de pollen sont placés artificiellement au milieu du canal styloïde, les tubes polliniques poussent dans les deux directions de façon également répartie (Higashiyama & Hamamura, 2008). Des résultats similaires ont été observés chez le lys (Iwanami, 1959). Ces résultats suggèrent que l'architecture creuse des styles de *T. fournieri* et du lys suffit à guider les tubes polliniques, et que des signaux chimiotropiques sont absents.

Chez certaines espèces, le tissu de transmission peut, en plus d'être un support physique, être également une source de chimio-attractants guidant les tubes polliniques jusqu'à l'ovaire. L'étude de la matrice extracellulaire du tabac a permis l'isolement d'une large glycoprotéine de 100 kDa appartenant à la famille des AGP, la TTS (*Transmitting-Tissue Specific protein*) pouvant stimuler la croissance du tube pollinique *in vitro*. Une diminution de son expression par des ARN antisens dans le style provoque un ralentissement de la croissance des tubes polliniques, rendant stériles les individus. Dans un système SIV, la TTS peut également attirer les tubes polliniques. Son état de glycosylation est primordiale, puisqu'une TTS chimiquement déglycosylée est inapte à stimuler la croissance du tube pollinique, et perd ses capacités attractantes (Cheung, Wang, & Wu, 1995). La TTS est incorporée dans la paroi cellulaire des tubes polliniques où le groupement glycosyle est hydrolysé, suggérant que ces glycoprotéines pourraient être une source de nutriment nécessaire à l'élongation des tubes polliniques. A l'intérieur du style, un gradient de TTS cause un niveau de glycosylation croissant du stigmate à l'ovaire, coïncidant avec le chemin des tubes polliniques. Cela appuie l'importance de la glycolysation pour le guidage des tubes polliniques (Wu, Wang, & Cheung, 1995). En utilisant des procédures similaires à celles mises en œuvre pour l'isolation de TTS chez *Nicotiana tabacum* (Wu, Wong, Ogdahl, & Cheung, 2000), un ensemble de glycoprotéines du style de *Nicotiana glauca* a été identifié sous le nom de NaTTS. Ces NaTTS ont été testées comme pouvant stimuler la croissance des tubes polliniques et les attirer dans le même système SIV utilisé chez *Nicotiana tabacum* (Wu et al., 2000).

Le GABA, un neurotransmetteur du système nerveux central des mammifères (Kumar & Kuppast, 2012), est présent en gradient croissant du stigmate aux ovules dans le pistil d'*A. thaliana*, la concentration maximale étant dans le tégument interne des ovules (Palanivelu

et al., 2003). L'existence de ce gradient conduit à considérer le GABA comme un acteur potentiel d'une attraction d'origine sporophytique. *POP2* (Pollen-Pistil Interaction 2) code pour une transaminase dégradant le GABA et est exprimé ubiquitairement dans le pistil et les tubes polliniques. Chez les mutants *pop2*, la concentration en GABA augmente plusieurs dizaines de fois. Seulement lorsque l'expression de *POP2* est altérée chez ces deux acteurs, alors un défaut dans le guidage est observé, confortant l'idée de son implication dans ces mécanismes (Palanivelu et al., 2003). Cependant, à ce jour, aucune attraction des tubes polliniques par le GABA seul n'a été démontrée dans un système *in vitro* ou SIV. GABA pourrait interagir avec d'autres acteurs afin de permettre un guidage des tubes polliniques dans le style.

1.4.2 Le guidage ovulaire

Lors du voyage du tube pollinique du stigmate aux ovules, plusieurs mécanismes de guidage se succèdent en fonction de l'entrée des tubes polliniques dans leurs aires d'influence. Le guidage ovulaire correspond aux étapes de l'émergence du tube pollinique du tissu de transmission à la surface du placenta, sa croissance en direction du funicule, puis du micropyle où il va larguer ses noyaux spermatiques. Il a été proposé que ce guidage ovulaire soit médié par des signaux d'origine sporophytique et gamétophytique de courte et de longue portée.

1.4.2.1 Le guidage longue distance par l'ovule

Un guidage longue-distance par les ovules permettant aux tubes polliniques d'émerger des espaces intercellulaires du tissu de transmission a été proposé par Hulskamp et al., 1995. Chez *A. thaliana*, de l'ordre de 40 % des tubes polliniques ont tendance à émerger du tissu de transmission au niveau du premier ovule. En revanche, chez les mutants *sin1*, dont les ovules sont dépourvus de sacs embryonnaires, les tubes polliniques ont une probabilité similaire d'émerger n'importe où du tissu de transmission (Ray, Lang, Golden, & Ray, 1996). Les ovules sécrèteraient à longue distance des éléments capables d'attirer les tubes polliniques hors du tissu de transmission, les guidant de la surface du placenta jusqu'au funicule puis au micropyle. Les mutants étudiés affectant les tissus sporophytiques et gamétophytiques des ovules, il est difficile de distinguer l'origine exacte des acteurs de ce guidage à longue distance. La nature des acteurs impliqués est par ailleurs inconnue.

1.4.2.2 Le guidage funiculaire

Après l'entrée dans l'ovaire, le gamétophyte femelle est donc nécessaire au guidage des tubes polliniques jusqu'aux ovules. Ces signaux à longue distance mènent les tubes polliniques aux abords du funicule, reliant les ovules au placenta de l'ovaire. Cette structure sporophytique semble participer au guidage des tubes polliniques jusqu'aux micropyles. Dans des systèmes SIV chez *A. thaliana* les ovules dépourvus de funicule attirent près de 35 % des tubes polliniques alors qu'en présence d'ovules avec funicule, 54 % des tubes polliniques parviennent au micropyle. Le funicule n'est donc pas essentiel pour mener les tubes polliniques au micropyle, mais y facilite l'accès. Le rôle exact du funicule dans le guidage est encore méconnu, cependant plusieurs hypothèses ont été proposées. Il pourrait fournir un support physique aux tubes polliniques pour atteindre le micropyle, participer à la génération et au maintien de gradient de signaux ou favoriser l'accès aux signaux provenant de l'ovule (Palanivelu & Preuss, 2006).

Les premiers mutants identifiés ayant un effet uniquement sur le guidage funiculaire et non sur le guidage micropylaire sont les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinase MPK3 et MPK6. Les tubes polliniques doubles mutant *mpk3/mpk6* sortent normalement du tissu de transmission d'un pistil sauvage, mais se perdent sur le placenta ne parvenant pas à atteindre les funicules. Cependant, les tubes polliniques doubles mutants conservent leur aptitude à atteindre le micropyle (Guan, Lu, Xu, McClure, & Zhang, 2014). Les kinases MPK3 et MPK6 pourraient jouer un rôle dans une cascade de signalisation dans le tube pollinique, cascade initiée par des signaux d'origine funiculaire. Cette cascade pourrait agir sur un guidage direct par le funicule, ou indirectement en maximisant la sensibilité des tubes polliniques aux signaux d'attraction d'origine micropylaire. L'implication des tissus sporophytiques des ovules dans le guidage des tubes polliniques est encore méconnue, en raison de la difficulté d'obtenir des mutants n'affectant que ces tissus sans altérer les tissus gamétophytiques.

1.4.2.3 Un guidage à courte distance gamétophytique - le guidage micropylaire

Le micropyle, porte d'entrée du sac embryonnaire, est le dernier objectif à atteindre avant qu'un tube pollinique puisse y larguer ses noyaux spermatiques. L'accès au micropyle, dont le diamètre correspond approximativement à celui d'un tube pollinique, doit être contrôlé

très précisément. Chez *A. thaliana*, le développement des gamétophytes femelle est retardé chez les mutants *magatama 1* et *3* (*maal* et *3*). Les tubes polliniques peuvent se diriger vers les ovules *maa*, mais ne sont pas capables de pénétrer dans le micropyle et se dirigent dans des directions aléatoires (Shimizu & Okada, 2000). Cela suggère la nécessité d'un sac embryonnaire mature pour générer un signal d'attraction.

Sécrétés par des cellules du sac embryonnaire dans un champ de 100 à 200 µm autour du micropyle, des acteurs protéiques du guidage micropylaire ont été identifiés chez *Z. mays*, *A. thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *T. fournieri* et *Torenia concolor* (Okuda et al., 2009; Takeuchi & Higashiyama, 2012; Kanaoka et al., 2011).

1.4.2.3.1 Les cellules synergides du sac embryonnaire, sources des attractants

Les sacs embryonnaires matures sont composés chez la plupart des dicotylédones de quatre cellules différentes au pôle micropylaire : une oosphère, une cellule centrale binuclée, et deux cellules synergides (**Figure 1**). Ces cellules synergides partagent une structure, l'appareil filiforme, responsable de l'émission de protéines de signalisation vers l'extérieur du sac embryonnaire à travers le micropyle (Li, Lin, Wang, & Tian, 2009).

T. fournieri possède un sac embryonnaire protubérant contrairement à celui de la majorité des plantes à fleurs, notamment celui des Solanacées qui est caché dans le tégument de l'ovule (**Figure 3**).

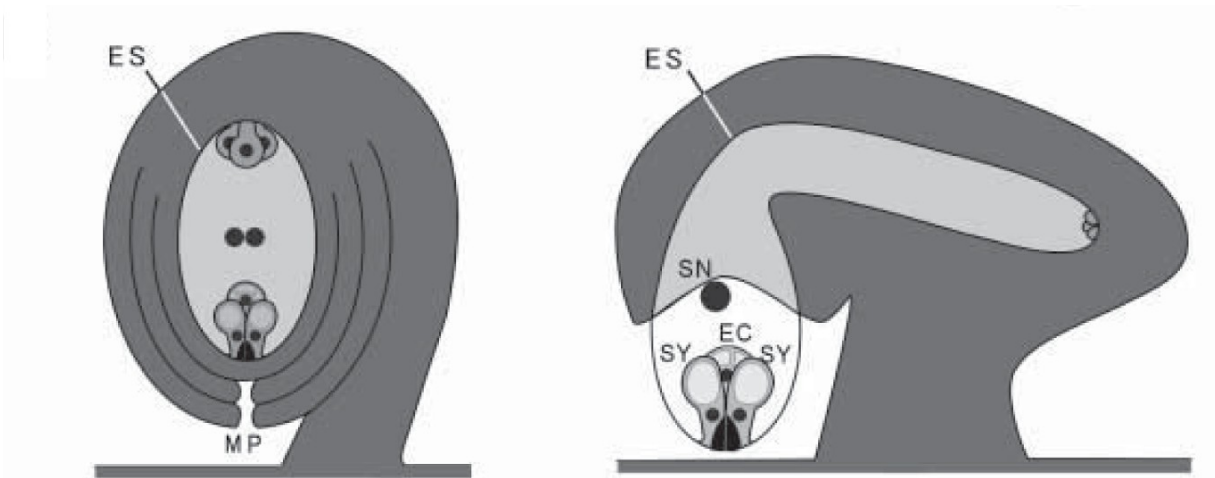


Figure 3. Différences structurales entre les sacs embryonnaires d'*A. thaliana* et de *T. fournieri*. Le sac embryonnaire d'*A. thaliana*, similaire à celui des Solanacées, est protégé par le tégument de l'ovule (à gauche). Le sac embryonnaire de *T. fournieri* est quant à lui protubérant ce qui le rend facilement accessible pour des micromanipulations (à droite). MP : micropyle; ES : sac embryonnaire; CC : cellule centrale; EC : oosphère. Adaptée à partir de (Higashiyama, 2002).

Cette structure particulière a fait de *T. fournieri* une espèce de choix pour l'étude des fonctions des cellules du sac embryonnaire, sa facilité d'accès permettant aux expérimentateurs d'effectuer des micromanipulations aisément. Afin de déterminer l'implication des différentes cellules du sac embryonnaire de *T. fournieri* dans la synthèse et l'émission d'éléments attracteurs, chacune des cellules est successivement détruite au laser. Les sacs embryonnaires ainsi excisés d'un de leurs éléments sont placés à proximité d'un tube pollinique afin de vérifier si ce dernier est encore attiré. Dans les sacs embryonnaires intacts, dépourvus d'oosphère ou de cellule centrale, l'attraction n'est pas affectée, c'est-à-dire que près de 100 % des tubes polliniques sont attirés. En revanche, si une cellule synergide est altérée, le pourcentage d'attraction des tubes polliniques diminue à 71 %. Si les deux cellules synergides sont altérées, plus aucune attraction n'est observée. Ces résultats suggèrent que les cellules synergides sont directement impliquées dans la sécrétion d'attractants chez *T. fournieri* (Higashiyama et al., 2001).

Le facteur de transcription MYB98 est exprimé dans les cellules synergides du sac embryonnaire. Une mutation de ce gène chez *A. thaliana* affecte non seulement la différenciation des cellules synergides, la formation de l'AF mais également le guidage micropylaire. Ces résultats confirment l'implication des cellules synergides dans cette étape de guidage (Kasahara, Portereiko, Sandaklie-Nikolova, Rabiger, & Drews, 2005).

Les autres cellules du sac embryonnaire sembleraient également jouer un rôle dans l'orchestration du guidage micropylaire. Les ovules mutant *ccg* (*central cell guidance*), dont le développement du sac embryonnaire n'est pas affecté, ne sont pas aptes à attirer les tubes polliniques. *CCG* code pour un facteur de transcription nucléaire spécifique à la cellule centrale. *CCG* pourrait donc contrôler l'expression de gènes nécessaires au guidage micropylaire en activant une voie de signalisation, qui persisterait malgré l'ablation de la cellule centrale (Chen et al., 2007).

1.4.2.3.2 L'identification des attractants du guidage micropylaire

En 2005, la première protéine impliquée dans le guidage micropylaire a été identifiée chez le monocotylédone *Z. mays*, *ZmEA1*. *ZmEA1* (*Zea mays Egg Apparatus 1*) est une protéine de 94 acides aminés possédant un domaine transmembranaire, dont le clivage menant à la protéine mature permettrait sa sécrétion. Secrétée par l'oosphère et les synergides dans un rayon de 100 à 150 μm autour du micropyle de l'ovule, *ZmEA1* est internalisée au contact d'un tube pollinique. La dégradation de *ZmEA1* internalisée permet au tube pollinique de rester sensible au gradient d'attractants afin de poursuivre sa route jusqu'au micropyle. L'expression de *ZmEA1* diminue rapidement après la double fécondation pour cesser dès les premières divisions du zygote. Cette baisse d'expression agit dans la prévention de la polyspermie, les ovules n'ayant plus besoin d'attirer de tubes polliniques (Márton, Cordts, Broadhvest, & Dresselhaus, 2005).

Un autre type d'attractants a été identifié chez les dicotylédones *T. fournieri* et *A. thaliana*, les LURE. Les LURE sont des DEFL appartenant à la famille des CRP, des protéines riches en cystéines. Les CRP constituent une classe de protéines hautement divergentes impliquées dans diverses voies de signalisation. Les CRP se répartissent en sous-familles, définies par leur patron en cystéine, comme les LTP, les DEFL ou les Thionin

(Silverstein et al., 2007). Ces protéines ont un rôle majeur dans les interactions plantes-pathogènes, soit dans la défense par le biais des défensines, des CRP agissant comme peptides antimicrobiens, soit dans des processus symbiotiques entre des bactéries et les nodules de légumineuses, via l'activité des NCR (nodule-specific CRP). Les CRP ont également un rôle majeur dans plusieurs étapes du développement des plantes, notamment le développement des ovules et les interactions entre sporophyte et gamétophyte (Chevalier, Loubert-Hudon, & Matton, 2013) et des racines avec les RALF (*Rapid Alkalinization Factor*) (Murphy & De Smet, 2014) ou encore de la graine (Marshall, Costa, & Gutierrez-Marcos, 2011). Pour finir, de nombreuses CRP ont été identifiées comme impliquées dans la communication pollen-pistil, dans les processus d'auto-incompatibilité avec SCR/SP11 (Shiba et al., 2001), l'adhérence des tubes polliniques à l'ECM du style avec la SCA (Park et al., 2000) ou avec STIG1 dans la communication entre le grain de pollen et le stigmate (Verhoeven et al., 2005).

L'élaboration d'une banque d'ADN complémentaire issue de cellules synergides isolées a permis d'identifier ces attractants micropylaires chez *T. fournieri* (Okuda et al., 2009). Parmi les 16 CRP les plus exprimées dans les cellules synergides, 3 d'entre elles ont la capacité d'attirer des tubes polliniques SIV, les CRP1, 2, et 11, renommées pour l'occasion TfLURE1, 2 (Okuda et al., 2009) et 11 (données non publiées). La méthode ayant permis la vérification de leur capacité attractante est celle du *bead assay* (**Figure 6**). Bien que leurs séquences peptidiques ne partagent que 62,1 % de similarité, leur patron de cystéine est hautement conservé (**Figure 4**). L'introduction d'ARN interférents (morpholinos antisens) élaborés à partir des séquences de ces LURE dans des sacs embryonnaires a pour conséquence une baisse notable de l'attraction du tube pollinique, confirmant l'implication des LURE dans le guidage micropylaire. La sécrétion d'une seule de ces LURE suffit à attirer le tube pollinique. La redondance fonctionnelle de ces protéines pourrait permettre d'augmenter la force du signal d'attraction en élargissant le périmètre du gradient de sécrétion. Ces TfLURE sont en effet sécrétés par les cellules synergides, formant un gradient protéique diffusé à partir du micropyle dans le milieu cellulaire adjacent. Par ailleurs, cette redondance assure la conservation de la fonction même en cas d'événement mutationnel. La TcLURE1, un attractant micropylaire de *T. concolor*, une espèce proche de *T. fournieri*, a également été identifiée par

une étude d'orthologie. La TcLURE1 est hautement similaire à TfLURE1, s'en différenciant par seulement 8 acides aminés (Kanaoka et al., 2011).

Une étude similaire menée chez *A. thaliana* a permis l'identification de 4 autres protéines attractantes, les AtLURE1 (Takeuchi & Higashiyama, 2012). En comparant l'ensemble des 317 DEFL d'*A. thaliana* avec leurs orthologues chez une espèce proche, *A. lyrata*, un sous-groupe de 6 gènes, les CRP810_1, a été identifié par une étude phylogénétique comme ayant divergé après la séparation de ces deux espèces. Les CRP810_1.1 à .5 ont été testés, la CRP810_1.6 étant un pseudo-gène. Quatre protéines attractives ont été identifiées, les AtLURE1.1 à 1.4. Comme pour *T. fournieri*, la sécrétion d'une seule de ces protéines suffit à attirer le tube pollinique. De façon intéressante, la CRP810_1.5, à qui manque une cystéine conservée, n'attire pas les tubes polliniques. En réintégrant artificiellement cette cystéine à la CRP810_1.5, la fonction attractive de la protéine est restituée. La modification de la conformation tridimensionnelle conférée par les ponts disulfures formés entre les cystéines des LURE pourrait affecter l'association de ces protéines avec leurs récepteurs sur le tube pollinique, dont il découlerait une perte de fonction. L'expression des AtLURE1 est par ailleurs régulée par MYB98, ce qui est cohérent avec la perte de la capacité d'attraction des ovules *myb98* (Punwani, Rabiger, Lloyd, & Drews, 2008). Par orthologie, les attractants d'*A. lyrata*, les ALLURE1, ont pu être caractérisés.

Ces attractants fonctionnellement redondants et sécrétés par les cellules synergides, sont donc des DEFL appartenant à la famille des CRP, dont la conformation apportée par le patron de répartition des cystéines détermine l'activité (**Figure 4**).

Patron de cystéines des LURE : **C** - **CxxxC** - **C** - **CxC**



Figure 4. Alignement des LURE identifiées chez *A. thaliana* et *T. furnieri* en fonction de leurs patrons de cystéine. Pourcentage de similarité : en noir : 100 %; en gris : de 60 à 80 %; en blanc : < 60 %. En rouge : encadré : cystéine supplémentaire par rapport au patron de cystéines des DEFL; souligné : perte d'une cystéine par rapport à ce patron. Numéros d'accès : TflLURE1 : BAH29749; TflLURE2 : BAH29751; TflLURE11 : BAH29759, AtLURE1.1 : NP_001031999; AtLURE1.2 : NP_001078701; AtLURE1.3 : NP_001032003; AtLURE1.4 : NP_001032004, AtCRP810_1.5: NP_001032005.

1.4.2.3.3 La spécificité à l'espèce des attractants gamétophytiques, une barrière à l'hybridation

Lors des phases d'adhérence et d'hydratation des grains de pollen en contact avec un stigmate sec, il existe des mécanismes qui permettent de discriminer les grains de pollen de la même espèce de ceux d'une autre espèce. Ces mécanismes mettent en place des barrières

limitant l'hybridation entre deux espèces. Ces barrières à l'hybridation s'étendent depuis la période de pré-pollinisation jusqu'à la survie du zygote.

Avant la pollinisation, des périodes de floraison différentes ou la préférence d'un pollinisateur pour une espèce de fleurs permettent de limiter les croisements entre espèces, les grains de pollen d'une espèce ayant peu de chance d'atteindre le stigmate d'une autre espèce, il s'agit de barrières à l'hybridation pré-pollinisation. Après la fécondation, la non-viabilité d'un zygote hybride incapable de se développer limite l'existence d'hybrides adultes dans la nature, il s'agit d'une barrière à l'hybridation post-zygotique. D'autres barrières pré-zygotique peuvent se mettre en place pendant les étapes d'interaction entre le grain de pollen/tube pollinique et les tissus reproducteurs femelles. La phase du guidage micropylaire est l'une de ces étapes limitant la formation d'hybride : les attractants d'origine gamétophytique agissent de manière espèce-spécifique.

Malgré la proximité relative entre *Z. mays* et *Tripsacum dactyloides*, ZmEA1 n'attire pas les tubes polliniques de ce dernier dans un système SIV (Uebler, Dresselhaus, & Márton, 2013).

Quant à elles, les AtLURE1.2 attirent les tubes polliniques d'*A. lyrata*, mais à une moins grande fréquence. AtLURE1.2 attirent 75 % des tubes polliniques d'*A. thaliana* mais 44 % des tubes polliniques d'*A. lyrata*. En revanche, l'attraction par AILURE1.3 des tubes polliniques de *A. lyrata* et *A. thaliana* n'est pas significativement différente, soit respectivement 77 % et 76 % (Takeuchi & Higashiyama, 2012). L'attraction des AtLURE1 est espèce-spécifique, contrairement à celle des AILURE1. Par ailleurs, les AtLURE1.2 n'attirent qu'à 14 % les tubes polliniques de *T. fournieri* (Takeuchi & Higashiyama, 2012). *T. fournieri* étant plus distante d'*A. thaliana* que *A. lyrata*, il semblerait que la spécificité de l'attraction dépend de la distance phylogénétique entre les espèces.

De façon similaire, l'attraction de TcLURE1 est respectivement de 55 % et 30 % pour des tubes polliniques de *T. concolor* et *T. fournieri*. Des résultats similaires sont observés dans des tests de guidage avec TfLURE1 sur les tubes polliniques de ces deux espèces. Seulement 8 acides aminés non cystéiques sur 62 diffèrent entre TcLURE1 et TfLURE1 (Kanaoka et al., 2011). Les cystéines sont nécessaires à la conservation de la fonction attractante, mais les

autres résidus ont une importance pour la spécificité d'association des LURE à leur récepteur sur le tube pollinique.

La divergence de ces attractants gaméophytiques est une forte barrière aux fécondations interspécifiques. Les sacs embryonnaires WT d'*A. thaliana* ne sont pas aptes à attirer les tubes polliniques de *Z. mays*. Cependant, quand ZmEA1 est transformée dans *A. thaliana* sous l'action d'un promoteur MYB98 afin que son expression soit localisée dans les cellules synergides, les sacs embryonnaires d'*Arabidopsis* MYB98:ZmEA1 sont capables d'attirer les tubes polliniques de *Z. mays* (Márton, Fastner, Uebler, & Dresselhaus, 2012). La barrière à l'hybridation peut être surmontée en insérant un attractant gaméophytique d'une espèce dans une autre.

Cette barrière est elle-même liée à une perte de compatibilité entre les récepteurs et les attractants gaméophytiques, elle-même liée à la divergence de ces protéines au cours de l'évolution. Les espèces phylogénétiquement proches sont cependant capables de conserver une certaine capacité d'attraction, la communication n'est pas rompue. Cela pourrait s'expliquer d'au moins deux façons. Lors d'une pollinisation hétérosécifique et malgré la divergence, une certaine affinité entre le récepteur du tube pollinique et l'attractant gaméophytique est conservée, mais elle est cependant moins stable/efficace que l'association entre le récepteur et son ligand provenant d'une même espèce. Un modèle à plusieurs couples de récepteurs/ligands présentant des degrés de divergence différents pourrait être une autre explication plausible. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par l'identification de deux systèmes de récepteurs des AtLURE chez *A. thaliana* (voir **1.5.2. Identification des récepteurs mâles aux attractants gaméophytiques**).

1.5 La réception et l'intégration des signaux chimiotropiques gaméophytiques

La réception et l'intégration des signaux chimiotropiques menant à une réponse cellulaire est un processus complexe dépendant de la nature du signal. L'intégration de signaux en provenance des tissus femelles est un processus rapide, de l'ordre de quelques minutes et permet de réorienter ces tubes polliniques en agissant sur son trafic vésiculaire, la dynamique

de son cytosquelette et ses canaux calciques, tous trois éléments déterminants dans l'élongation des tubes polliniques. La capacité des tubes polliniques à percevoir ces signaux de guidage s'acquière lors de leur croissance dans le style.

1.5.1 La capacitation du tube pollinique par les tissus sporophytiques femelles

Les tubes polliniques ayant germé *in vitro* sur un simple milieu de croissance ne sont pas attirés par le micropyle chez *T. fournieri*. De façon similaire, seuls 3 % des tubes polliniques *in vitro* sont attirés par des ovules chez *A. thaliana*, comparativement à 54 % d'attraction quand ils ont crû à travers un stigmate et un style (Higashiyama, Kuroiwa, Kawano, & Kuroiwa, 1998; Higashiyama et al., 2001). Les tubes polliniques de *Lilium longiflorum* sont également plus fréquemment attirés après être passés par le style (Janson, 1993). Une réponse similaire est observée dans des essais d'attraction *in vitro* avec des LURE purifiés chez *A. thaliana* et *T. fournieri* (Okuda et al., 2009 ; Takeuchi & Higashiyama, 2012). La croissance des tubes polliniques à travers les tissus femelles permet aux tubes polliniques d'acquérir la capacité de répondre aux attractants gamétophytiques femelles. On appelle ce phénomène la capacitation, qui existe également entre les spermatozoïdes et les organes reproducteurs femelles des mammifères (Bedford, 1983). Par ailleurs, 19 % des tubes polliniques ayant interagi avec un stigmate excisé sont attirés par le gamétophyte femelle. Le stigmate seul peut rendre aptes les tubes polliniques à percevoir les signaux.

Chez *A. thaliana*, l'état de maturité du pistil n'affecte pas la capacitation des tubes polliniques; il n'y a pas de différence significative dans le pourcentage d'attraction de tubes polliniques par des ovules matures au stade FG7 pour des pistils à des stades de développement plus ou moins avancés (Palanivelu & Preuss, 2006).

1.5.1.1 Évolution du profil transcriptomique lors de la croissance de tube pollinique dans le style

Une analyse transcriptomique chez *A. thaliana* par micropuce a permis de comparer les transcriptomes de grains de pollen, de tubes polliniques *in vitro* après 4 heures de croissance et de tubes polliniques issus d'un système SIV, donc ayant interagi avec un stigmate et un style.

Cette analyse a permis de montrer que non seulement les tubes polliniques-SIV expriment une plus large part du génome d'*A. thaliana* (d'environ 10 %, soit ~ 700 gènes) par rapport aux tubes polliniques-*in vitro*, mais également que l'expression de près de 1500 et 1100 gènes est significativement altérée par rapport à leur expression chez les grains de pollen et tubes polliniques-*in vitro* respectivement. Par ailleurs, les tubes polliniques-SIV sont enrichis en des transcrits impliqués dans la transduction de signal dont des récepteurs transmembranaires, dans la transcription et dans la croissance des tubes polliniques (Qin et al., 2009).

Cela suggère que le passage dans le pistil mène à l'expression de gènes impliqués dans des réseaux de régulation. Ces changements transcriptomiques sont probablement liés à une communication entre les tubes polliniques et les tissus reproducteurs femelles, menant ainsi à l'acquisition de la capacité de percevoir les signaux attracteurs des gamétophytes femelles par l'expression de récepteurs membranaires aux attractants gamétophytiques.

1.5.1.2 Une capacitation en deux temps impliquant un facteur gamétophytique

Chez *T. fournieri*, la capacité de réagir à l'attractant TfLURE2 se fait en deux étapes. L'habilité des tubes polliniques à réagir à cet attractant est affectée par sa croissance dans les tissus femelles. Une étude par *immunostaining* a montré que la capacité de TfLURE2 à s'associer à la membrane d'un tube pollinique n'est pas synchronisée avec une réponse cellulaire immédiate des tubes polliniques menant à une réorientation. Le style de *T. fournieri* fait en moyenne 17 mm. L'acquisition de la capacité de percevoir TfLURE2 s'acquiert 12 heures après la pollinisation (12 HAP) après que le tube pollinique a traversé au moins 5 mm du style. Cependant, ces tubes polliniques ne sont pas encore aptes à se réorienter. Seuls les tubes polliniques ayant traversé un style d'en moyenne 15 mm à 12 HAP peuvent non seulement percevoir mais réagir aux signaux d'attraction des TfLURE2 (Okuda et al., 2013).

Ces résultats indiquent que les récepteurs aux TfLURE2 apparaissent relativement précocement à la membrane plasmique de l'apex des tubes polliniques, mais que d'autres éléments en provenance des tissus femelles manquent pour compléter une voie de signalisation menant à une réponse cellulaire, cette pièce manquante n'entrant en jeu qu'au moment de la sortie du tissu de transmission.

Un candidat menant à l'activation de la cascade de signalisation provoquée par TflLURE2 a été récemment proposé. Il s'agit d'un arabidogalactane nommé AMOR (Mizukami et al., 2016). Chez *T. fournieri*, les tubes polliniques issus d'un système SIV sont aptes à percevoir des signaux d'attraction de TflLURE2 uniquement lorsqu'ils croissent sur un milieu dans lequel des ovules ont été incubés. Identifié par chromatographie par échange d'ion, le facteur AMOR seul permet de conférer aux tubes polliniques *in vitro* cette capacité d'être attiré par des TflLURE. Ce facteur ovulaire proviendrait des tissus sporophytiques, puisque son aptitude à capaciter les tubes polliniques n'est pas affectée lorsque le sac embryonnaire est altéré. L'activité d'AMOR dépend de son résidu 4-O-méthyl-glucuronosyl. Ce facteur ovulaire pourrait être impliqué dans la voie de signalisation de TflLURE2. La façon dont il agit reste à être identifiée.

1.5.2 Identification des récepteurs mâles aux attractants gamétophytiques

L'identification des acteurs mâles dans la communication pollen/pistil, notamment dans le guidage est moins avancé que l'identification des acteurs femelles. Ce manque de connaissance a longtemps été vu comme un lien manquant dans la communication pollen-pistil (Hafidh et al., 2014). Différents récepteurs présents sur le tube pollinique ont déjà été identifiés, tel que LePRK1 et LePRK2, deux récepteurs kinase-LRR (*Leucine Rich Repeat*) (Muschietti et al., 1998). La famille des RLK, des récepteurs kinases membranaires, avec plus de 600 représentants dans le génome d' *A. thaliana*, sont impliqués dans de nombreuses fonctions, dont le développement, la perception hormonale, et notamment la communication pollen-pistil (Li & Yang, 2016). Les RLK se caractérisent par un domaine transmembranaire, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine kinase C-terminal intracellulaire.

Récemment, deux études chez *A. thaliana*, menées indépendamment, ont conduit à l'identification de deux systèmes de récepteurs à AtLURE1.2 présents sur la membrane plasmique des tubes polliniques (Takeuchi & Higashiyama, 2016; Wang et al., 2016).

Un récepteur hétéromère, de type RLK, à AtLURE1 a été identifié chez *A. thaliana*, MDIS1 (MALE DISCOVERY1) - MIK (MDIS1-INTERACTING RECEPTOR LIKE KINASE) (Wang et al., 2016). Ce récepteur a été identifié en exprimant une forme KD (*Kinase Dead*) dominante (DN, *Dominant Negative*) dans des WT de 24 RLK spécifiques du

pollen et des tubes polliniques, sous le promoteur spécifique du pollen LAT52. Le guidage micropylaire de ces 24 mutants RLK^{DN} a été analysé. En combinant cette analyse avec celle de *yeast-two hybrid* pour identifier d'éventuels co-récepteurs, quatre LRR-RLK ont été identifiés : MDIS1, MDIS2, MIK1 et MIK2. Les tubes polliniques mutants de ces récepteurs KD-DN présentent des défauts dans le guidage micropylaire mais pas de problème de croissance *in vivo*. Des analyses biochimiques ont démontré qu'AtLURE1 peut s'associer au domaine extracellulaire de MDIS1, MIK1 et MIK2. Cela suggère que ces derniers sont des récepteurs pour AtLURE1.2. Par ailleurs AtLURE1.2 médie l'hétéro-dimérisation de MDIS1 avec MIK1 ou MIK2 et induit l'auto- et la trans-phosphorylation de ces derniers par MIK1. Ces phosphorylations pourraient jouer un rôle dans la transduction du signal.

Des homologues de MDIS1 existent chez des espèces proches d'*A. thaliana*, *Capsella rubella* et *Eutrema salsugineum*, CrMDIS1 et EsMDIS1. Cependant, aucuns homologues de MIK1 et MIK2 n'ont été identifiés chez ces espèces. Cela suggère que MIK1 et MIK2 ont évolué après la divergence de ces espèces. Le complexe MDIS1-MIK1 serait récent, avec un récepteur MDIS1 présent chez un ancêtre commun. De façon intéressante, la transformation d'AtMDIS1 dans *C. rubella* permet de surmonter la barrière à l'hybridation existant entre cette espèce et *A. thaliana*. La présence d'un seul récepteur permet de conférer aux tubes polliniques une sensibilité aux AtLURE.

Les tubes polliniques mutants KD-DN de ces récepteurs sont moins sensibles à l'attraction par AtLURE1 que des WT, cependant une attraction subsiste. Cela suggère l'existence d'autres systèmes de réception aux AtLURE1. En effet, une autre LRR-RLK a été identifiée comme pouvant s'associer à AtLURE1, PRK6 (POLLEN RECEPTOR-LIKE KINASE 6) (Takeuchi & Higashiyama, 2016). Les tubes polliniques mutant *prk6* croissent normalement mais ne réagissent aucunement aux AtLURE1.2 dans un système de *bead assay*. PRK6 est localisé sur la membrane de l'apex des tubes polliniques (Takeuchi & Higashiyama, 2016), et son expression augmente quand le tube polliniPT croit dans le style (Qin et al., 2009). Les tubes polliniques de *C. rubella* exprimant AtPRK6 acquièrent la capacité à répondre aux AtLURE1.2, confirmant le rôle clé de ce récepteur dans la sensibilité des tubes polliniques à cet attractant micropylaire.

PRK6 interagit avec LIP1 et LIP2 (LOST IN POLLEN TUBE GUIDANCE 1 et 2), des récepteurs kinases cytoplasmiques impliqués dans la transduction du signal engendré par AtLURE1.2 (Liu et al., 2013). En effet, les tubes polliniques des doubles mutants *lip1/lip2* ayant crû dans des pistils WT sont moins sensibles à l'attraction par des ovules WT (94 % d'attraction pour des tubes polliniques WT, 44 % d'attraction pour des tubes polliniques *lip1/lip2*). De façon similaire, 70 % des tubes polliniques *lip1/lip2* sont attirés par AtLURE1.2, comparativement à 95 % pour des PT WT (Liu et al., 2013). Les simples mutants ne présentent pas de phénotypes, LIP1 et LIP2 sont fonctionnellement redondants.

La coexistence de deux systèmes d'intégration du signal d'AtLURE1.2 est intéressante. La multiplicité des récepteurs pourraient permettre un guidage du tube pollinique robuste et peu sensible à des évènements mutationnels, et favoriser son caractère espèce-spécifique. La façon dont PRK6 et MDISI-MIK interagissent et leur(s) voie(s) de signalisation respectives restent encore à élucider.

1.5.3 Le calcium cytosolique, acteur majeur de l'intégration des signaux de réorientation

Après la perception des signaux chimiques décrits plus haut, le signal doit être transmis afin d'entraîner une réponse cellulaire, soit la croissance ou la réorientation des tubes polliniques. Un des acteurs majeurs dans la transduction de ces signaux est le calcium.

Les tubes polliniques en croissance sont caractérisés par un gradient localisé à leur extrémité de Ca^{2+} libre cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) passant d'une concentration de 2-10 μM à 20-200 nM. Ces aires de haute concentration en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ correspondent aux régions d'expansion de la paroi cellulaire où les vésicules de sécrétion fusionnent. Une modification artificielle de ce gradient, en libérant de façon localisée du calcium encapsulé dans des compartiments cellulaires par exemple, peut réorienter la croissance des tubes polliniques (Malho, Read, Trewavas, & Pais, 1995; Rathore, Cork, & Robinson, 1991).

La concentration en calcium cytosolique est affectée par l'influx calcique à travers la membrane plasmique ainsi que par la libération de calcium emprisonné dans des compartiments intracellulaires (Malho et al., 1995; Pierson et al., 1994). Cet influx calcique à

travers la membrane est associé à l'activité de grappes (*clusters*) de canaux calciques (Malho et al., 1995). L'activation de ces canaux, sensibles à des stimuli mécaniques, électriques ou chimiques, modifie les concentrations en $[Ca^{2+}]_{cyto}$. L'activité des canaux calcique contrôlerait donc la réorientation des tubes polliniques. En absence de signaux externes, les oscillations observées *in vitro* et *in vivo* des tubes polliniques peuvent s'expliquer par une distribution aléatoire de l'activité de ces canaux.

Il est peu probable que les canaux calciques soient les seuls régulateurs de la réorientation des tubes polliniques. Des canaux potassiques ont également été suggérés comme possibles régulateurs (Lu et al., 2011). Le lien dans la voie de signalisation entre l'association des AtLURE1 avec les récepteurs RLK MDISI-MIK1 et 2 et PRK6, et l'activation de canaux calciques, n'a pas encore été identifié.

Ces hautes concentrations en calcium intracellulaire jouent un rôle dans le transport vésiculaire en stimulant l'exocytose (Roy et al., 1999) et affectent les dynamiques des filaments d'actine du cytosquelette dans les tubes polliniques du lys (Kohno & Shimmen, 1987). Ces réponses cellulaires semblent être médiées par un certain nombre de facteurs sensibles à la concentration calcique, comme la calmoduline, l'inositol(1,4,5)triphosphate, des phosphoinositides, des protéines kinase et phosphatase (Geitmann & Palanivelu, 2007). Il a récemment été montré que le récepteur à AtLURE1.2 AtPRK6 pourrait s'associer un ROPGEF, permettant l'activation de ROP1, une Rho-GTPase majeure dans les voies de signalisation intracellulaires chez les plantes (Takeuchi & Higashiyama, 2016).

Ainsi, des attractants tels que les LURE pourraient modifier l'activité de canaux calciques en s'associant de façon très localisée avec leurs récepteurs, menant à l'enclenchement d'une voie de signalisation permettant une élongation elle aussi localisée du tube pollinique dont la conséquence est une modification de l'orientation de son apex. Les canaux calciques étant également sensibles à des stimuli mécaniques, la rencontre d'une barrière physique bloquant la croissance des tubes polliniques pourrait affecter l'activité de ces canaux, menant à la réorientation des tubes polliniques (Geitmann & Palanivelu, 2007).

1.6 Hypothèses et méthode pour l'identification des attractants gamétophytiques chez *Solanum chacoense*

L'objectif de ce projet de maîtrise est l'identification des attractants gamétophytiques impliqués dans le guidage micropylaire chez *Solanum chacoense*, une espèce de pomme de terre sauvage d'Amérique du Sud. Dans cette partie, nous développerons l'intérêt d'une recherche sur les attractants gamétophytiques chez un modèle tel que *S. chacoense*, et sur les réponses que cela pourrait apporter pour comprendre les mécanismes limitant l'hybridation entre des espèces pourtant proches. Enfin, nous développerons les hypothèses et les études préliminaires ayant mené aux choix des candidats potentiels à l'attraction. Pour finir, la méthode employée pour déterminer la capacité d'attraction de ces candidats sera explicitée.

1.6.1 *S. chacoense*, description et intérêt du modèle

1.6.1.1 Phylogénie et répartition géographique

La famille des Solanacées est un large taxon comprenant 92 genres pour 2300 espèces (Hunziker, 2001), dont de nombreuses espèces présentent un intérêt agronomique ou économique, comme le tabac (*Nicotiana tabacum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum*), ou encore l'aubergine (*Solanum melongena*). Le genre *Solanum*, qui comporte plusieurs sections et regroupe près de 1200 espèces, est l'un des plus étudiés des Solanacées.

Les *Solanum* section *Petota* sont au nombre de 196 espèces selon la classification la plus récente, dont la pomme de terre cultivée *S. tuberosum*, et notre espèce d'intérêt *S. chacoense*. *S. chacoense* est fortement répandue du centre de la Bolivie jusqu'au centre de l'Argentine, au Brésil et au Paraguay. Elle se retrouve dans des environnements variés, des plaines jusqu'à des altitudes de 2300 mètres (Hijmans & Spooner, 2001).

1.6.1.2 Structure de la fleur et pollinisation

S. chacoense possède des fleurs blanches hermaphrodites dont les inflorescences sont organisées en cymes. Ses fleurs sont composées d'une corolle à 5 pétales soudés, d'un calice à 5 sépales également soudés, de 5 étamines avec de longues anthères bilobées caractéristiques

des Solanacées et d'un pistil. L'ovaire en position supère est bicarpellé à placentation axile, surmonté d'un style de 8 à 15 mm et d'un stigmate de type humide.

La pollinisation est assurée par certaines espèces de bourdons et d'abeilles. Après s'être posé sur le stigmate, le grain de pollen binucléé, puisque la PMII se déroule pendant l'élongation du tube pollinique (McCormick, 1993), met environ 36 heures à atteindre et féconder la majorité des ovules lors d'une pollinisation compatible. A 12 HAP, le tube pollinique pénètre dans le style, à 30 HAP dans l'ovaire et à 36 HAP il atteint les ovules qu'il double-féconde. *S. chacoense* possède des allèles d'auto-incompatibilité (Lantin, O' Brien, & Matton, 1999).

1.6.1.3 Intérêt du modèle

1.6.1.3.1 Les barrières à l'hybridation chez les Solanacées tubéreuses

S. chacoense est particulièrement intéressante pour l'étude des gènes impliqués dans les mécanismes de spéciations et de barrières à l'hybridation. En Amérique latine, et particulièrement dans une large zone s'étendant du sud-est du Pérou au nord-ouest de l'Argentine, un grand nombre de solanacées tubéreuses coexistent dans des zones de distributions chevauchantes (Hijmans, Spooner, Salas, Guarino, & de La Cruz, 2002), notamment *S. chacoense*, *S. gandarillasi*, *S. tarijense*, *S. microdontum*, *S. megistacrolobum* et *S. acaule*.

Ces solanacées partagent les mêmes périodes de floraison et les mêmes pollinisateurs. Lors de pollinisations hétérospécifiques en excès en laboratoire, sans compétitions avec du pollen conspécifique, elles sont capables de s'hybrider (Hawkes & Hjerting, 1969, 1989). Par ailleurs, les zygotes hybrides formés sont viables et fertiles. Malgré cela, peu d'hybrides sont observés dans la nature, la majorité des solanacées en présence étant des « lignées pures ».

Cette différence entre les proportions théoriques d'hybrides et celles observées dans la nature s'explique par la mise en place de barrières limitant l'hybridation de ces espèces phylogénétiquement proches. Ces barrières se mettent en place dans le pistil, entre l'adhésion du grain de pollen au stigmate et la double-fécondation, elles sont post-pollinisation et pré-zygotique. Le stigmate humide des solanacées ne discrimine pas les grains de pollen, ces

barrières mettent donc en jeu des acteurs de la communication entre le tube pollinique et le style et/ou l'ovule.

1.6.1.3.2 *Intérêt de S. chacoense pour l'étude de l'implication des attractants gaméophytiques dans les barrières à l'hybridation chez les solanacées*

Il a été observé que lors d'une pollinisation hétérospécifique, plus les espèces impliquées sont éloignées, moins le tube pollinique est sensible à l'attraction par le gaméophyte femelle (Takeuchi & Higashiyama, 2012); (Uebler et al., 2013). Dans un système SIV, près de 60 % des tubes polliniques de *S. chacoense* sont attirés par un ovule de cette même espèce. Cependant, seuls 21 % et 11 % des tubes polliniques de *S. tarijense* et *S. microdontum* sont attirés par un ovule de *S. chacoense* (Lafleur, 2009). Une préférence à l'espèce existe au niveau de l'attraction du tube pollinique par l'ovule chez ces Solanacées. Cette préférence à l'espèce lors de l'attraction pourrait être liée à une divergence des attractants gaméophytiques des différentes Solanacées, comme cela a été observé pour les attractants gaméophytiques d'*A. thaliana* et *T. fournieri* (Kanaoka et al., 2011; Takeuchi & Higashiyama, 2012; Wang et al., 2016 ; Takeuchi & Higashiyama, 2016). Chez les solanacées, les attractants gaméophytiques ne pourraient pas attirer les tubes polliniques d'une autre espèce si cette dernière est trop éloignée, ou tout au moins une perte d'efficacité dans l'attraction serait observée.

Les études destinées à comparer les capacités d'attractions lors de pollinisations hétérospécifiques n'impliquent cependant que des modèles à deux espèces. L'étude de *S. chacoense* permet de travailler sur un modèle à plusieurs espèces, du fait de son appartenance à un large panel d'espèces proches. Déterminer ses attractants gaméophytiques permettrait d'identifier les attractants chez d'autres solanacées tubéreuses par une étude d'orthologie, puis à terme de leurs récepteurs. L'identification des couples récepteur/ligand permettrait de déterminer leur implication dans la mise en place de barrières à l'hybridation, et donc dans les mécanismes de spéciation de ce groupe de solanacées.

Par ailleurs, l'étude en laboratoire de *S. chacoense* est rendue possible par sa facilité de régénération et de transformation (Jan, Laublin, Birkman, & Cappadocia, 1996), par

l'accessibilité à la dissection des organes reproducteurs, par l'existence de mutants déjà caractérisés, et par un contrôle aisé de la pollinisation, *S. chacoense* étant auto-incompatible.

Comme vu précédemment, l'identification d'attractants gamétophytiques peut mener à la formation d'hybrides issus de parents non aptes à s'hybrider dans la nature (Márton et al., 2012). Nous pouvons imaginer que ce principe serait applicable au genre *Solanum*, notamment aux espèces présentant un intérêt agronomique. Forcer le croisement d'espèces avec des aptitudes agronomiques particulières permettrait d'engendrer des individus hybrides ayant hérité de ces aptitudes.

1.6.2 Une régulation de l'attraction par le stade développemental du gamétophyte femelle

S. chacoense étant une dicotylédone, nous pouvons supposer qu'il est plus probable que son système d'attraction micropylaire soit similaire à celui d'*A. thaliana* et *T. fournieri* plutôt qu'à celui de *Z. mays*, une monocotylédone.

Le premier postulat émis est l'appartenance de ces attractants micropylaire à la famille des CRP, comme les AtLURE et TfLURE. Les CRP se distinguent par plusieurs caractéristiques. Il s'agit de petites protéines de moins de 160 acides aminés; elles sont sécrétées du fait de la présence d'un peptide signal en leur N-terminal et dans leur forme mature elles contiennent de 4 à 16 cystéines, d'où l'appellation de protéine riche en cystéines (Marshall et al., 2011). Dans la recherche des attractants gamétophytiques chez *T. fournieri*, la stratégie employée était d'isoler les CRP les plus exprimés dans les cellules synergides. Du fait de l'anatomie du sac embryonnaire de *S. chacoense* (**Figure 3**), il est difficile d'isoler les cellules synergides, cette méthode ne peut donc être employée pour identifier les CRP pouvant être des candidats à l'attraction. Une autre approche basée sur le stade développemental de l'ovule et sa capacité d'attraction est employée.

La capacité d'attraction des tubes polliniques par les gamétophytes femelles semble être régulée par le stade développemental de ces derniers. Le stade développemental de l'ovule est critique dans la sécrétion d'attractants. Chez *A. thaliana*, les tubes polliniques ne sont pas attirés par les ovules au stade FG1 (0 %), le sont faiblement aux stades FG2 à FG6 (18 %),

puis à partir du stade FG7 leur capacité d'attraction ne varie plus significativement (32-49 %) (Christensen et al., 1997; Palanivelu & Preuss, 2006).

Des observations similaires ont été faites chez notre espèce modèle. ScFRK1 (*Solanum chacoense* Fertilization-related kinase 1), une MAPKKK (Mitogen-Activated Kinase Kinase Kinase) nucléaire, a été caractérisé chez *S. chacoense* (Lafleur et al., 2015). Cette MAPKKK est impliquée dans le développement des gamétophytes mâles et femelles. *ScFRK1* s'exprime dans le tégument et les mégaspores des gamétophytes femelles en développement, puis dans les cellules synergides et l'oosphère des sacs embryonnaires matures. Les ovules des mutants *frk1* ne se développent pas normalement et sont bloqués au stade FG1, sachant que les ovules mature à l'anthèse sont au stade FG7. Le guidage micropylaire est également affecté chez les mutants *frk1*. Dans des systèmes SIV, près de 83 % des tubes polliniques WT sont attirés par des ovules WT alors que seulement 13 % le sont par des ovules *frk1* (**Figure 5**) (Lafleur et al., 2015). Les tubes polliniques ne parviennent pas à atteindre le micropyle des ovules *frk1* et croissent aléatoirement à la surface de l'ovule (Lafleur, 2009; Liu, 2016). Ces résultats suggèrent que lorsque le développement de l'ovule est bloqué au stade FG1, les attractants gamétophytiques ne sont pas sécrétés. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse selon laquelle les attractants sont sécrétés par les synergides, ces dernières n'étant pas formées au stade FG1.

Deux jours avant l'anthèse (2DBA ou *2 Days Before Anthesis*), au stade FG6, les cellules synergides et l'oosphère sont cellularisés, cependant les cellules antipodales n'ont pas dégénéré et les deux noyaux polaires de la cellule centrale ne sont pas fusionnés. Chez *S. chacoense*, des tests de guidage en système SIV ont démontré que les ovules 2DBA n'attirent pas les tubes polliniques (**Figure 5**) (Liu et al., 2015). Lors du passage du stage FG6 à FG7, les cellules antipodales dégèrent, les noyaux polaires fusionnent et l'AF devient mature. Un, ou plusieurs de ces événements est un déterminant critique dans la sécrétion d'attractants (Sundaresan & Alandete-Saez, 2010).

Les ovules au stade FG1 chez les mutants *frk1* ou au stade FG6 pour les ovules 2DBA ne sécrètent pas d'attractants. Cette évolution peut s'expliquer par une régulation de l'expression des attractants par le stade développemental de l'ovule, les transcrits des attractants seraient ainsi enrichis dans les ovules matures par rapport aux ovules 2DBA ou

frk1. Divers processus peuvent retarder la traduction de transcrits, la sécrétion de protéines ou leur activation, par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou la glycosylation. Une étude directe du sécrétome des ovules permettrait d'avoir une photographie plus exacte de l'activité attractrice du sac embryonnaire.

Sachant cela, deux études distinctes ont été menées chez *S. chacoense*, la première ayant pour objectif de comparer l'abondance des transcrits des CRP exprimés dans les ovules matures à l'anthèse, 2DBA et *frk1*, la seconde d'identifier et de comparer les CRP sécrétés par les ovules à l'anthèse et 2DBA.

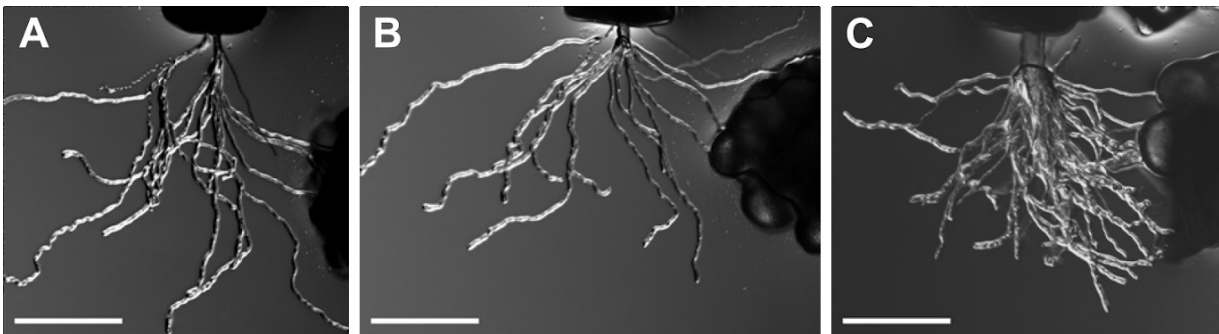


Figure 5. Attraction de tubes polliniques en fonction du stade de développement de l'ovule. Tests de guidage dans un système SIV de tubes polliniques V22 par des amas d'ovules G4 dans trois conditions : (A) *frk1*, (B) 2DBA, (C) anthèse, de *S. chacoense*. Barre d'échelle = 200 μ m. Images issues de (Lafleur, 2009).

1.6.3 Identification des CRP spécifiques aux ovules de *S. chacoense*

1.6.3.1 Une étude transcriptomique comparative des ovules dans trois conditions (A, 2DBA, *frk1*)

Les transcriptomes d'ovules dépéricarpés de *S. chacoense*, dans les trois conditions A, 2DBA et *frk1*, ont été séquencés, ainsi que celui de la feuille qui est utilisée comme contrôle (Joly V., Liu Y., Sabar M., et Matton D.P., non publié).

En 2009, un séquençage à haut débit de type 454 (pyroséquençage) d'un réplicat d'ovules dans trois conditions, soit A, 2DBA et *frk1*, suivi en 2010 d'un séquençage de type Illumina HiSeq d'un réplicat d'ovules A, 2DBA et *frk1*, de feuilles (et d'ovules de *S. gandarillasii* et *S. tarijense* à l'anthèse) ont mené à l'assemblage du transcriptome de l'ovule

de *S. chacoense*. Les *reads* du 454 ont été assemblés en 53 524 contigs, ceux de l'Illumina en 47 138 contigs. Ces deux assemblages ont été concaténés et, après correction des chimères et des décalages de cadre de lecture, 45 211 contigs ont été identifiés. Par des BLASTx contre la base de données du NCBI refseq_protein et des prédictions de cadres de lectures, 33 852 protéines ont été identifiées à partir de ces contigs. Parmi ces 33 852 protéines, les ScCRP (CRP de *S. chacoense*) ont été identifiés au moyen du programme KAPPA. KAPPA est un programme permettant la détection et le regroupement de protéines en clusters prenant en compte le patron d'un acide aminé choisi, dans notre cas la cystéine (Joly & Matton, 2015). KAPPA a ainsi permis l'identification de 95 ScCRP. Ces 95 ScCRP sont réparties en fonction de leur patron de cystéines en sous-familles de CRP, dont des DEFL, des LTP, des EAC1 (*Early Culture Abundant 1*), des Thionin-Like, entre autres, en plus de "singletons" (CRP n'appartenant à aucune famille identifiée).

Afin de mener une étude comparative de l'expression de ces 95 ScCRP entre les trois conditions d'ovules, en 2013, un séquençage en Illumina HiSeq de trois réplicats d'ovules A, 2DBA et *frk1* et de feuille a été fait. Les séquençages de ces transcriptomes ont permis d'identifier les CRP enrichies dans les ovules, toutes conditions confondues, par rapport aux feuilles, mais également les ScCRP enrichis dans les ovules matures à l'anthèse par rapport aux ovules immatures 2DBA ou *frk1*. Les ScCRP ayant une expression fortement supérieure dans les ovules à l'anthèse versus les ovules immatures ou mutants de même qu'avec les feuilles ont été choisies comme étant les meilleurs candidats possibles à l'attraction parmi l'ensemble des ScCRP.

1.6.3.2 Une étude sécrétomique comparative des ovules dans deux conditions (A, 2DBA)

L'étude des variations du nombre de transcrits entre plusieurs conditions ne prend pas en compte les étapes post-transcriptionnelles menant à l'obtention de protéines fonctionnelles, comme le contrôle de la traduction ou les modifications post-traductionnelles. L'étude de protéomes permet une vision plus réaliste de l'état fonctionnel d'une cellule dans une condition donnée. Dans notre cas, l'étude du sécrétome est encore plus pertinente, les attractants étant sécrétés par les sacs embryonnaires matures.

Les sécrétomes des ovules, soit l'ensemble des protéines sécrétées, ont été caractérisés dans les deux conditions A et 2DBA (Liu et al., 2015). Afin d'isoler les protéines du sécrétome de ces

ovules, une méthode peu dommageable pour ces cellules a été employée. Des ovules déparicarpés sont placés sur un gel d'agarose et mis à incuber pendant une nuit, puis enlevés précautionneusement afin de limiter une contamination du contenu protéique cytoplasmique. La matrice d'agarose est placée sur de la laine de verre dans un tube qui est centrifugé. L'exsudat ainsi récupéré est envoyé à une plateforme de spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines présentes à partir du transcriptome assemblé à partir des séquençages des ovules A et 2DBA. Puisque l'absence de sac embryonnaire chez le mutant *frk1* pourrait fortement influencer le transcriptome des tissus sporophytiques environnant, soit le tégument de l'ovule, le sécrétome de l'ovule *frk1* ne fut pas utilisé afin d'éviter la présence de protéines pouvant être anormalement sécrétées par le tégument de l'ovule.

A partir de cette étude, 305 protéines ont été identifiées, les OSP (*Ovule Secreted Protein*). Afin de déterminer les protéines spécifiquement sécrétées par l'ovule, ces 305 protéines ont été comparées avec des bases de données de sécrétomes de stigmatite de lys, d'olivier et de tabac, ainsi qu'avec une base de données répertoriant les GSP (*Generally Secreted Proteins*). Ainsi, 178 protéines sont identifiées comme des oOSP (*ovule-specific OSP*). Parmi ces 178 protéines, et en considérant les critères suivants : protéine d'une taille inférieure à 250 acides aminés, comportant entre 4 et 18 cystéines et ayant une prédiction de sécrétion, le programme KAPPA a permis de répertorier 4 protéines comme étant des CRP, les ScCRP23.1 (OSP21), ScCRP4.1 (OSP227), ScCRP15.2 (OSP305) et ScCRP15.1 (OSP123). Ces ScCRP étant sécrétés par les ovules matures, ont été ajoutés au groupe des candidats potentiels à l'attraction des tubes polliniques.

1.6.4 Méthodologie de travail

Les deux études précédemment décrites ont permis l'identification de 95 ScCRP de l'ovule de *S. chacoense*, de déterminer leur différentiel d'expression entre les trois conditions, à l'anthèse, 2DBA et *frk1* et de caractériser des CRP sécrétés à l'anthèse. En considérant 4 hypothèses, nous avons pu déterminer 20 candidats potentiellement impliqués dans l'attraction micropylaire : **(1)** enrichissement des transcrits à l'anthèse par rapport à 2DBA et *frk1*; **(2)** enrichissement dans l'ovule à l'anthèse par rapport à la feuille; **(3)** similarité du patron de cystéine avec celui d'attractants déjà identifié; **(4)** identification dans le sécrétome. Ces candidats ont été dans un premier temps clonés dans les vecteurs d'expression pQLinkHD,

pET28b ou PGEX-4T-2, ayant un promoteur inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Leur expression est ensuite induite sous différentes conditions. Ces protéines sont alors purifiées par chromatographie d'affinité par *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), les protéines exprimées étant associées à une étiquette de polyhistidine (6xHis). Après vérification de leur séquence protéique par spectrométrie de masse, ces protéines purifiées sont alors testées pour leur capacité d'attraction dans un système similaire à celui utilisé chez *A. thaliana* et *T. fournieri* ayant permis l'identification des LURE, celui du *bead assay*. Le *bead assay* est un test dans lequel l'expérimentateur place une bille de gélatine contenant le candidat à tester à proximité d'un tube pollinique croissant sur un milieu gélosé. Si le tube pollinique s'oriente vers la bille, qui diffuse en gradient le candidat testé, et après une répétition de l'expérience assurant une validité statistique, le candidat peut être considéré comme agissant en attractant à courte distance. Par cette méthode, plusieurs des candidats préalablement sélectionnés, exprimés et purifiés sont testés.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Matériel végétal

Lors de ce projet, l'espèce étudiée est la pomme de terre sauvage *S. chacoense*. Des individus de deux géotypes sont utilisés afin de procéder à des pollinisations compatibles, G4 (allèle d'autoincompatibilité $S_{12}S_{14}$) et V22 ($S_{11}S_{13}$). Les pollinisations se font selon l'ordre suivant : G4 (♀) × V22 (♂).

Les plantes sont cultivées dans deux conditions selon les manipulations. Les plantes servant à l'extraction d'ARN totaux sont cultivées dans les serres du Jardin Botanique de Montréal à une température ambiante variant de 22 °C à 24 °C, dans des conditions de luminosité de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité (16L8D). Les plantes utilisées pour les tests de guidage sont cultivées en chambre de croissance afin de favoriser la reproductibilité des expériences en stabilisant les conditions de culture, qui sont de 22 °C et 16L8D.

2.2 Clonage

2.2.1 Extraction d'ARN total et rétro-transcription

Les ARN totaux de 30 ovaires G4 à l'anthèse, broyés à l'azote liquide, sont extraits selon la méthode d'Invitrogen™ utilisant le TRIzol® Reagent (Invitrogen™). La qualité de l'extraction des ARN totaux extraits est vérifiée sur gel d'agarose 1 %. Ces ARN sont conservés à une température de -80 °C. Les ARN totaux sont rétrotranscrits avec la trousse M-MLV (Invitrogen™).

2.2.2 Amplification par PCR des séquences d'intérêts

Pour les candidats sécrétés par voie conventionnelle, les séquences nucléotidiques des candidats à amplifier par réaction en chaîne par polymérase (PCR) correspondent à leur séquence codante dépourvue de peptide signal. La séquence du peptide signal est prédite à l'aide de SignalP 4.1 de CBS (*Center for Biological Science*). Les amorces utilisées pour l'amplification des ADN complémentaires (ADNc), obtenus par rétro-transcription, sont

conçues selon la méthode de clonage et le vecteur utilisé. Les séquences nucléotidiques des amorces sont résumées dans le

Vecteur d'expression	Objectif	Sens	Structure de l'amorce
pQLinkHD	Clonage Gateway	F	5'-GGG- attB1-Met -séquence spécifique-3'
		R	3'-GGG- attB2-(STOP) séquence spécifique-5'
PGEX-4T-2	Clonage classique	F	5'-GGGG- EcoRI-GG -séquence spécifique-3'
		R	3'-GGG- XhoI-STOP-His(6)-(STOP) séquence spécifique-5'
pET28b	Clonage classique	F	5'-CCC- BamHI -séquence spécifique-3'
		R	3'-CCC- HindIII-(STOP) séquence spécifique
	Séquençage 3' + clonage classique	F	5'-GGG- BamHI -séquence spécifique-3'
		R	5'-CCCCC- HindIII-CCC-T(30) -5'

Tableau 1.

Les PCR HF (*High Fidelity*) sont réalisées avec l'ADN polymérase Phusion[®] (NEB[™], New England Biolabs Inc.), permettant de limiter le nombre d'erreurs. La température d'hybridation (T_m) utilisée correspond à la plus petite T_m d'un couple d'amorces à laquelle on soustrait 2 °C. Les réactions PCR de 50 µL se font selon la programmation suivante : 30 sec à 98 °C; 35 cycles comprenant une étape de 30 sec à 98 °C, une étape de 30 sec à T_m -2 °C et une étape de 30 sec à 72 °C; 10 min à 72 °C suivie d'un refroidissement à 10 °C.

Tous les produits PCR sont migrés dans un gel d'agarose 1 % pour ensuite être purifiés selon le protocole de la trousse « Gel extraction kit » (QIAGEN[™]).

Vecteur d'expression	Objectif	Sens	Structure de l'amorce
pQlinkHD	Clonage Gateway	F	5'-GGG-attB1-Met-séquence spécifique-3'
		R	3'-GGG-attB2-(STOP)séquence spécifique-5'
PGEX-4T-2	Clonage classique	F	5'-GGGG-EcoRI-GG-séquence spécifique-3'
		R	3'-GGG-XhoI-STOP-His(6)-(STOP)séquence spécifique-5'
pET28b	Clonage classique	F	5'-CCC-BamHI-séquence spécifique-3'
		R	3'-CCC-HindIII-(STOP)séquence spécifique
	Séquençage 3' + clonage classique	F	5'-GGG-BamHI-séquence spécifique-3'
		R	5'-CCCCCC-HindIII-CCC-T(30)-5'

Tableau 1. Structure des amorces dépendamment de la stratégie de clonage. F (*forward*) : amorce sens; R (*reverse*) : amorce anti-sens; His(6) : séquence codante pour 6 histidine (6x CAT); attB1 et attB2, séquence de recombinaison pour le réaction BP du clonage Gateway; (STOP) : suppression du codon stop en 3' de la séquence codante; (STOP) : conservation du codon stop; STOP : ajout d'un codon STOP TAA; ajout d'un codon méthionine ATG; EcoRI - XhoI - BamHI - HindIII : ajout du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction correspondante.

Les amorces des candidats clonés avec succès sont présentées dans le tableau supplémentaire en annexe (

Tableau 6). La température d'hybridation (T_m) de ces amorces est calculée sur Geneious 7.1.7.

2.2.3 Clonage Gateway dans pQlinkHD

Les produits PCR préalablement purifiés des candidats ScCRP20.1, ScCRP13.1, ScCRP4.1 et ScCRP15.2, flanqués des séquences de recombinaison attB1 et attB2, sont clonés dans le vecteur Gateway donneur pZeo à l'aide la de BP Clonase (Invitrogen™) selon le protocole du manufacturier. Un mélange réactionnel de 20 µl contenant entre 100 et 300 ng de produit PCR, 15 ng de vecteur pZeo et 2 µL de BP Clonase sont incubés à 23 °C pendant une

nuit, selon le protocole d'Invitrogen™. L'enzyme est ensuite inactivée 15 min à 37 °C après l'ajout de 2 µl de protéine K. L'intégralité du mélange réactionnel est transformée dans des *Escherichia coli* compétentes de souche TOP10. Les colonies ayant poussé sont repiquées puis purifiées par kit de mini-préparation d'ADN (Bio Basic Inc.™).

Le site de restriction BamHI se situe entre les sites de recombinaison attP1 et attP2 du vecteur pZeo. Un vecteur pZeo ayant intégré une séquence entre ces sites par recombinaison est donc dépourvu de ce site de restriction. Le succès de l'insertion des produits PCR dans pZeo est déterminé en digérant les vecteurs purifiés par minipréparation avec l'enzyme BamHI.

Les vecteurs pZeo:candidat sont recombinés avec le vecteur de destination Gateway pQLinkHD à l'aide de la LR Clonase (Invitrogen™), selon le protocole du manufacturier. Dans un mélange réactionnel de 20 µl, 150 ng de pZeo:candidat, 150 ng de pQLinkHD vide et 2 µl d'enzyme LR Clonase sont mis à incuber à 23 °C pendant une nuit. L'enzyme est inactivée 15 min à 37 °C après l'ajout de 2 µl de protéine K. L'intégralité du mélange réactionnel est transformée dans des *Escherichia coli* de souche TOP10. Les colonies ayant intégré avec succès les vecteurs pQLinkHD:candidat sont criblées par digestion enzymatique avec EcoRI et HindIII.

2.2.4 Clonage classique dans pGEX-4T-2 et pET28b

Les candidats ScCRP23.1, ScCRP23.2 et ScCRP1.7 sont clonés dans le vecteur d'expression pGEX-4T-2, qui contient une séquence codante pour une étiquette GST (Glutathione S-transferase) en N-terminal.

Les produits PCR sont flanqués en 5' d'une séquence contenant le site EcoRI, et en 3' d'une séquence pour le site XhoI. Les produits PCR et le vecteur vide pGEX-4T-2 sont digérés une nuit à 37 °C avec XhoI et EcoRI. Les produits de digestion sont purifiés à l'aide d'un protocole de purification au phénol-chloroforme. Deux (2) µl des produits de digestion purifiés sont migrés sur un gel d'agarose 1 % avec une échelle Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.™), afin d'estimer précisément la quantité d'ADN ayant migré, et donc la concentration des produits PCR et du vecteur vide digéré et purifié. La concentration moyenne est de 60 ng/µl pour le vecteur digéré, et elle est de 5 ng/µL pour les

produits PCR digérés. Afin de respecter le ratio insert/vecteur de 3:1 M, 18 ng d'insert et 100 ng de vecteur sont incubés dans une réaction de 20 µl pendant une nuit à température ambiante à l'aide de ligase HC (NEB™). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries compétentes TOP10. Le criblage des colonies se fait par digestion enzymatique sur les vecteurs purifiés par minipréparation avec les enzymes XhoI et EcoRI.

Un protocole similaire est utilisé pour le clonage des séquences amplifiées des candidats ScCRP24.1, ScCRP47.1, ScCRP5.3 et ScCRP6.1 dans le vecteur pET28b à l'aide des enzymes BamHI et HindIII.

2.2.5 Séquençage des vecteurs

La séquence des constructions est vérifiée par séquençage afin de s'assurer que les étiquettes polyhistidine et GST sont bien en phase avec les séquences codantes des candidats. Les vecteurs issus des minipréparations dont l'insertion de la séquence d'intérêt a été vérifiée par digestion enzymatique sont envoyés à la plateforme de séquençage au Centre d'innovation Génome Québec à l'Université McGill. Les constructions dans pQLinkHD sont séquencées à partir des amorces M13F et M13R, celles dans pGEX-4T-2 avec pGEXF et pGEXR, et celles dans pET28b avec T7 et T7 terminateur.

Le chromatogramme issu du séquençage est analysé et corrigé avec FinchTV. Les séquences sont analysées à l'aide du logiciel Geneious 7.1.7.

2.3 Expression des candidats recombinants par induction à l'IPTG

Les vecteurs, dont la séquence a été vérifiée, sont transformés dans une souche d'expression d'*E. coli*, soit la souche Rosetta, soit Rosetta-gami, soit BL21. Cinq colonies sont repiquées dans 25 ml de bouillon LB (*Lysogeny broth*) avec antibiotiques (**Tableau 2**) et mis sous agitation à 37 °C pour la nuit. Le lendemain, 20 ml de cette pré-culture sont transférés dans un 1 L de LB liquide avec antibiotiques, qui est placé à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique entre 0,55 et 0,65 à une longueur d'onde de 600 nm (D.O.₆₀₀). Puis, 1 mM d'IPTG y est ajouté dans des conditions stériles. La culture est remise à agiter dans

des conditions préalablement définies, soit à 37 °C pendant 4 h, soit à 28 °C durant 5 h, soit à température ambiante pendant la nuit. Ces conditions sont déterminées par des essais d'induction dans des cultures de 50 mL. Après induction, les bactéries sont centrifugées durant 20 minutes à 4000 rpm et à 4 °C, et les culots sont conservés à -80 °C jusqu'à l'étape de purification.

Des aliquotes de 1 ml de cette culture avant ou après l'induction sont centrifugées. Le culot est resuspendu dans 50 µl (pour la culture non-induite) ou 100 µl (pour la culture induite) de tampon SB1x. Ces échantillons sont dénaturés dans un bain à 90 °C pendant 10 minutes en présence de 100 mM de DTT. Ces échantillons sont migrés sur un gel de polyacrylamide 15 % à 120 V, colorés 1 heure au bleu de Coomassie puis décoloré pendant une nuit. Ces gels permettent de déterminer si l'expression de la protéine candidates est induite sous les conditions d'induction choisies.

2.4 Purification des protéines recombinantes exprimées

Les protéines induites sont purifiées par chromatographie d'affinité, en se basant sur l'affinité spécifique entre l'étiquette de polyhistidine et la résine de nickel contenue dans les colonnes HisTrap FF (GE Healthcare™).

Selon la solubilité des protéines induites, deux protocoles de purifications différents sont utilisés, l'un en condition dénaturante et l'autre en condition native. Les protéines induites sont purifiées sur une colonne HisTrap FF avec une FPLC (ÄKTA Avant 25, GE Healthcare™).

2.4.1 Vérification de la solubilité

La solubilité des protéines induites est vérifiée. Des culots de 1 mL de bactéries induites sont re-suspendus dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8,0), puis lysés par 3 impulsions de sonication de 1 minute chaque au sonicateur Branson™. Une fraction des bactéries lysées, contenant les protéines totales, est conservée. Les échantillons lysés sont centrifugés 10 min à 12 000 rpm à 4 °C. Une fraction du surnageant contenant les protéines solubles, du culot contenant les protéines insolubles et des protéines totales sont migrés sur un gel de polyacrylamide 15 %.

2.4.2 Purification en condition dénaturante

Les protéines recombinantes induites insolubles sont purifiées en condition dénaturante. Les culots bactériens induits sont resuspendus dans 30 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), et sont lysés à deux reprises dans une presse de French. Le lysat bactérien est centrifugé 30 min à 12 000 rpm et 4 °C. Les corps d'inclusion contenant les protéines induites insolubles sont présents dans le culot. Ce culot est lavé à deux reprises dans une solution de lavage (0,5 % Triton X-100 V/V, 1 mM EDTA), et dans une solution de 1 mM NaCl pour enlever l'ADN génomique. Les corps d'inclusion sont solubilisés dans 30 mL d'une solution d'urée 8 M (8 M Urée, 500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 20 mM Imidazole, 1 mM BME, pH 8,0) entre 3 et 5 h, jusqu'à disparition complète du culot. Les protéines solubilisées sont centrifugées 30 min à 12 000 rpm à température ambiante, puis sont filtrées sur membrane avec des pores de 0,45 µm de diamètre (Millipore) pour enlever les impuretés.

Les protéines dénaturées sont chargées sur une colonne 1 ml HisTrap FF. Après le chargement, la colonne est lavée avec 30 ml de solution de 8 M Urée. Les 20 mM d'imidazole du tampon 8 M Urée limitent les associations non spécifiques entre des protéines bactériennes et les billes de nickel contenues dans la colonne. Une renaturation sur colonne se fait avec un gradient linéaire de solution 8 M à 0 M d'urée, à une vitesse de 0,5 mL/minute. Un cocktail d'inhibiteur de protéase (RocheTM) est ajouté à la solution à 0 M d'urée. Les protéines sont éluées dans une solution contenant 50 mM Tris·HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 1 mM BME, et un cocktail inhibiteur de protéase, ajusté à pH 8,0.

2.4.3 Purification en condition native

Les protéines recombinantes induites solubles sont purifiées en condition native. Les culots bactériens induits sont resuspendus dans 30 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8,0), et sont lysés à deux reprises dans une presse de French. Le lysat bactérien est centrifugé 30 min à 12 000 rpm et 4 °C. Le surnageant contient les protéines solubles. Ce surnageant est filtré sur membrane avec des pores de 0,45 µm de diamètre (MilliporeTM).

Le surnageant filtré est chargé dans une colonne 1 ml HisTrap FF. La colonne est lavée avec 30 ml de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8,0). Les protéines associées aux billes de nickel de la colonne sont éluées avec un tampon d'élution (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche™), pH 8,0).

2.4.4 Vérification de la purification

Une détection au rayonnement UV de longueur d'onde 280 nm permet d'estimer la quantité de protéines éluées par fraction, présentée dans le chromatogramme fourni par le programme UNICORN associé au chromatographe en phase liquide rapide (ÄKTA Avant 25). Les fractions correspondant au pic d'élution sont sélectionnées à partir de ce chromatogramme.

Une quantité de 5 µl de chacune de ces fractions est migrée sur gel de polyacrylamide, avec 100 mM de DTT et du SB5x afin de vérifier la pureté et la taille des protéines éluées.

Les bandes dont la taille correspond à la taille théorique attendue sont découpées et envoyées à la plateforme de spectrométrie de masse de l'IRIC (Institut de recherche en immunologie et en cancérologie, Université de Montréal).

2.4.5 Préparation des protéines purifiées en vue du test de guidage

Les fractions sélectionnées des protéines purifiées en condition dénaturante sont regroupées (*poolées*), concentrées et transférées dans un tampon de dialyse (100 mM de L-arginine, 1 mM de glutathion oxydé, 10 mM de glutathion réduit et 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) en utilisant des filtres Amicon ultra 3K (Millipore™). Malgré le changement de tampon, du β-mercaptoethanol (BME), provenant du tampon d'élution est encore présent et empêche le repliement des protéines purifiées. Les protéines sont transférées dans des sacs de dialyses, et immergées sous agitation à 4 °C dans le tampon de dialyse pendant 3 jours. Le protocole suivi pour la dialyse s'inspire de celui utilisé pour l'obtention des TfLURE (Okuda et al., 2009). Cette dialyse dilue le BME résiduel et favorise la formation des ponts disulfures. Les protéines dialysées sont transférées dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 en utilisant les filtres Amicon ultra 3K (Millipore™).

Les fractions sélectionnées des protéines purifiées en condition native sont regroupées, concentrées, et transférées dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 en utilisant les filtres Amicon ultra centrifugal filters 3K (Millipore™).

2.4.6 Détermination de la concentration en protéine - méthode de Bradford

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Une courbe standard est établie à partir de triplicats de 8 concentrations différentes de BSA (sérum d'albumine bovin): 0 - 0,01 – 0,02 – 0,03 – 0,04 – 0,06 – 0,08 et 0,1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ dans des volumes totaux de 50 μl . Des triplicats d'aliqots de 10 μl des candidats protéiques dans le tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 sont complétés avec 40 μl d' H_2O Milli-Q. Puis sont ajoutés 200 μl de réactif de Bradford. Enfin, 15 minutes plus tard, l'absorbance des échantillons de BSA et des candidats protéiques est estimée avec le lecteur de plaque SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices™). Les concentrations de triplicats d'échantillons protéiques sont estimées à partir de cette courbe standard.

2.5 Test de guidage des candidats protéiques

Les tests de guidage par des candidats protéiques se font avec la méthode dite du *bead assay*, adaptée du protocole développé par (Okuda et al., 2009). Le système et le test de *bead assay* sont respectivement présentés dans la **Figure 6**.

2.5.1 Préparation du système

Le 1er jour à $t=0$ h des pistils de fleur à l'anthèse de *S. chacoense* G4 sont pollinisés de façon limitante par du pollen de V22. Une pollinisation limitante, donc non saturante, permet de limiter le nombre de tubes polliniques émergeant de l'extrémité du style, facilitant ainsi un travail individuel sur chacun d'entre eux. Un milieu de support (BK1x, 12 % saccharose, 0,25 % gomme gellane) est autoclavé puis versé dans une boîte de Petri, où le milieu se solidifie. Un carré supérieur à 14 mm x14 mm est préalablement découpé dans le fond de la boîte de Pétri. Une lamelle de microscope est collée avec de la colle forte en dessous de ce trou. Le milieu BK1x est composé de 0,01 % d'acide borique (H_2BO_4), 1 mM de chlorure de calcium (CaCl_2), 1 mM de nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) et 1 mM de sulfate de magnésium

(MgSO₄). Ce milieu est ajusté à un pH 7,0, filtré à 45 µm et autoclavé. Ces systèmes sont scellés avec une pellicule de ParafilmTM et placés à l'obscurité à 4 °C jusqu'au lendemain. En parallèle, 10 ovaires à l'anthèse sont prélevés de fleurs G4 et incubés dans un milieu de croissance liquide (BK1x, 12 % saccharose, PBS1x pH 8,5) pendant 20 h, à l'obscurité et à température ambiante. Le second jour, après avoir enlevé les ovaires et éliminé les résidus tissulaires (20 minutes de centrifugation, 4 °C, 12 000 rpm), le milieu de croissance est chauffé 10 min à 95 °C afin de le stériliser et de dénaturer les protéines sécrétées et/ou issues du bris des ovaires, pour qu'elles n'affectent pas les tests de guidage. Puis, 1,5 % d'agarose *ultra-low melt* est ajouté au milieu, qui est placé à 65 °C pendant 10 minutes. Ce milieu (200 µl) est coulé en couche fine dans une cavité de 14 mm x 14 mm, découpé de manière stérile au centre du milieu de support, au niveau de la lamelle. Après solidification, 4 styles de G4 pollinisés sont disséqués et leur extrémité basale est placée sur le milieu de croissance (à t=24 h, 24 HAP). Ce système est scellé avec une bande de ParafilmTM, et placé à l'envers, à l'obscurité et à température ambiante. Le troisième jour (t=36 h, 36 HAP), les tubes polliniques sont sortis du style et croissent à la surface du milieu de croissance. L'expérimentateur peut alors procéder au test de guidage.

Ce milieu de croissance est optimisé en testant différents pH pour le tampon phosphate salin (PBS), différents pourcentages de saccharose, et d'agarose *ultra-low-melt*. Les variations de pH du milieu de croissance sont mesurées avant et après l'incubation de 20 heures d'ovaires, avant l'ajout d'agarose *ultra-low melt* avec des bandes de papier pH (pH 4 à 10, incrément entre 0,3 et 0,5, MilliporeTM). La qualité de la croissance des tubes polliniques selon les différents milieux (n=12 pistils pollinisés par type de milieu) est estimée visuellement par dénombrement des tubes polliniques démontrant une croissance non-zigzagante, dont l'apex explose précocement et par leur longueur maximale d'élongation. Ces observations se font au microscope Axio Observer.Z1, à un grossissement 100X.

2.5.2 Test de guidage - *bead assay*

La protéine candidate testée est encapsulée dans des billes de gélatine. Il est préparé dans un mix de 4 µl constitué de 7,5 % de gélatine, 0,25 mM de dextran Alexa Fluor® 488 de 10 000 MW (Molecular ProbesTM #D22910) , et une solution de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

contenant le candidat protéique à une concentration préalablement déterminée. Ce mix est vortexé dans 150 µl d'huile de silicone saturée en eau, afin de former des microbilles de gélatine contenant la ou les protéine(s) et le marqueur fluorescent (Alexa Fluor). Le milieu de croissance dans la boîte de Pétri est ensuite submergé par 300 µL d'huile de silicone. L'ensemble du système est alors placé sous un microscope inversé Axio Observer.Z1 équipé d'une caméra AxioCam HRm (ZEISS™) et associé au logiciel *Axio Vision Rel. 4.8*. Un capillaire de verre est étiré afin d'avoir une extrémité fine à l'aide d'une étireuse de pipette selon les paramètres suivants : 2 Stages Pulling, Heater n°1=82,9 °C, Heater n°2=66,6 °C (PC-10, Narishige™). Ce capillaire est placé sur le micromanipulateur associé au microscope. On prélève 5 µl du mix de billes de gélatine qui est pipeté dans l'huile de silicone surplombant les tubes polliniques. Une bille de gélatine d'environ 40 µm de diamètre est piquée à l'extrémité du capillaire de verre et est placée sur le milieu de croissance aux abords d'un tube pollinique en croissance, à une distance comprise entre 30 et 40 µm. La bille se fond dans le milieu, et son contenu protéique diffuse dans le milieu adjacent en formant un gradient. La réponse du tube pollinique à la présence de la bille est observée sur fond clair (*brightfield*) en vidéo accéléré (*time-lapse*) de 60 minutes avec des photographies prises toutes les 5 minutes au grossissement 200X.

2.5.3 Estimation de l'angle de réorientation passive σ

Une photographie au grossissement 50X est prise des tubes polliniques à 40 HAP. A l'aide du logiciel ImageJ, la trajectoire d'un tube pollinique est déterminée en prenant les coordonnées cartésiennes d'un tube pollinique par intervalles de 50 µm. L'angle σ correspondant à l'angle de réorientation d'un tube pollinique entre deux segments OA et OB (**Figure 7**). Les points A et B ont respectivement pour coordonnées (x_a, y_a) et (x_b, y_b) . Cet angle σ , exprimé en degré, est calculé selon la formule suivante :

$$\sigma = 180 \cdot \frac{1}{\pi} \cdot \arccos \frac{(x_a \cdot x_b) + (y_a \cdot y_b)}{\sqrt{x_a^2 + y_a^2} \cdot \sqrt{x_b^2 + y_b^2}}$$

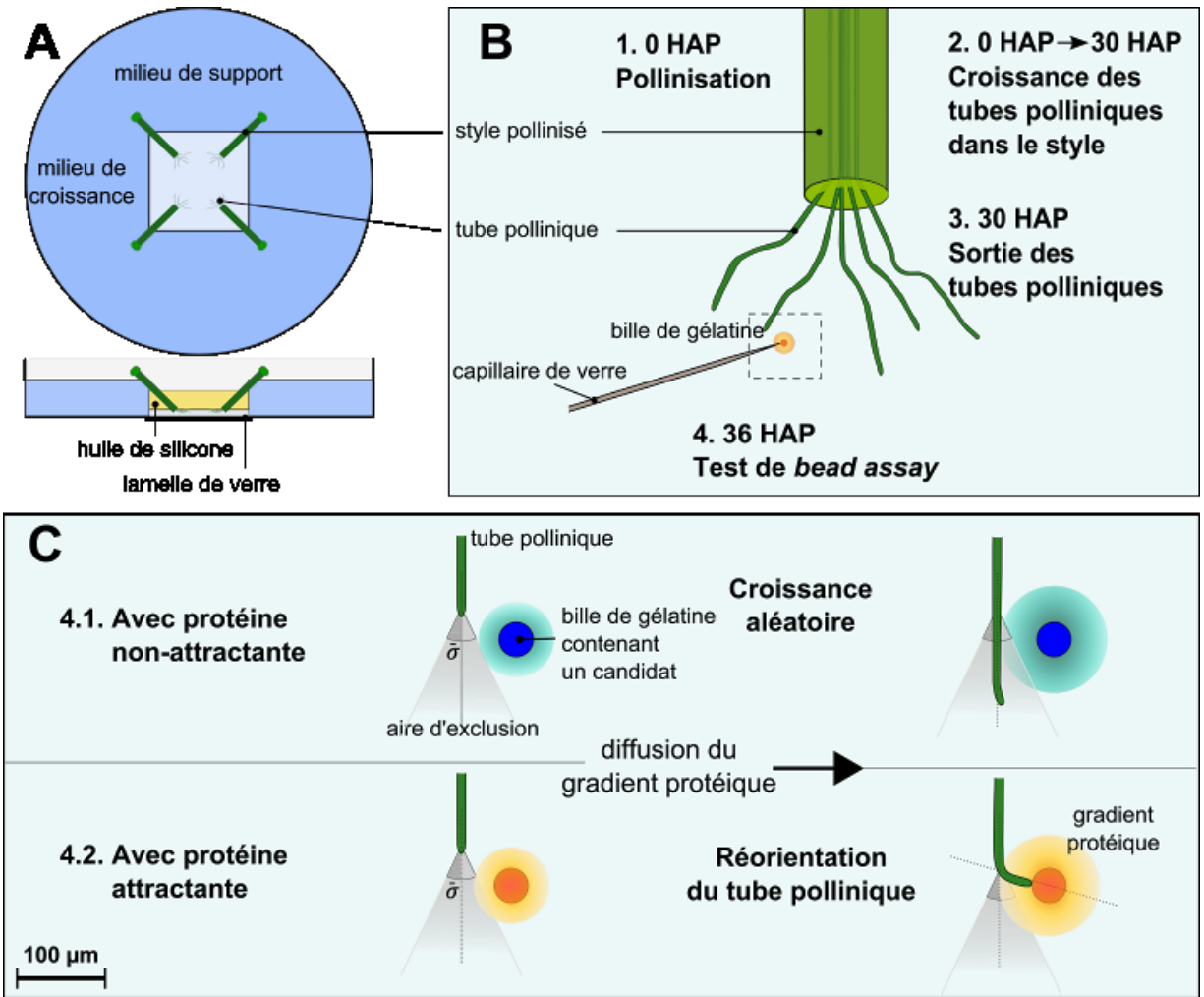


Figure 6. Représentation schématique du système du test de guidage du *bead assay*.

A. Vue de dessus et de côté du dispositif de test du *bead assay*. Dans une cavité découpée dans le milieu du support, une fine couche de milieu de croissance est déposée. Quatre styles pollinisés à $t=0$ et disséqués sont déposés en biais afin que leur extrémité basale repose sur le milieu. 300 µl d'huile de silicone sont coulés dans cette cavité. **B.** À 30 HAP, les tubes polliniques sortent du style et croissent sur le milieu de croissance. À 36 HAP, une bille de gélatine contenant la protéine candidate à tester est placée à proximité d'un tube pollinique à l'aide d'un capillaire de verre. **C.** Les billes de gélatine sont placées à 30-40 µm de l'apex d'un tube, en évitant une aire d'exclusion définie par l'angle de réorientation passive σ . Selon la capacité d'attraction des protéines dans la bille de gélatine, deux réponses cellulaires sont attendues, soit en 4.1. absence d'attraction, les tubes polliniques croissent de manière aléatoire;

soit en 4.2 présence d'attraction, le tube pollinique se réoriente en direction de la bille de gélatine.

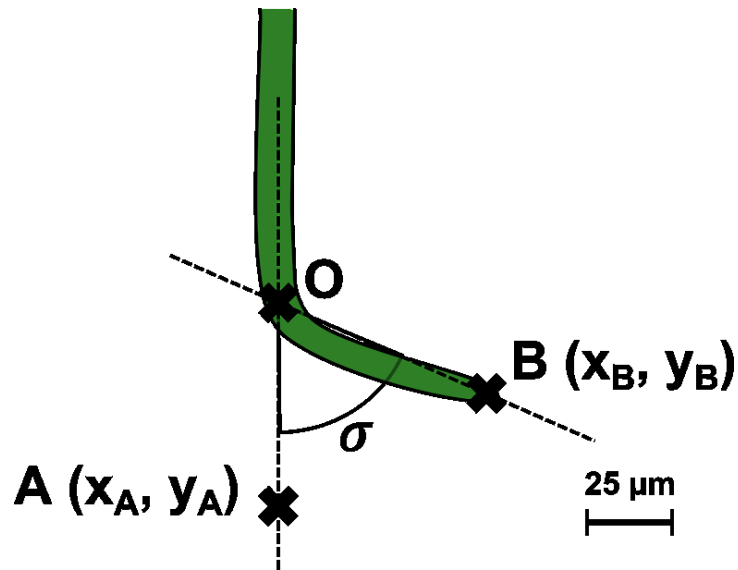


Figure 7. Détermination de l'angle de réorientation passive σ .

Le point O correspond aux coordonnées de l'apex d'un tube pollinique à un temps t; le point B aux coordonnées de l'apex à un temps t+1; O et B étant distant de 50 μm . Le segment OB correspond à la trajectoire effective du tube pollinique. Le segment OA est obtenu en prolongeant, à partir du dernier point de mesure O, la précédente trajectoire du tube pollinique si elle n'avait pas changé. L'angle σ correspond à l'angle AOB.

3 Résultats

3.1 Stratégie de sélection des 20 candidats à l'attraction

3.1.1 Critères de sélection

Comme décrit précédemment dans l'introduction, le séquençage du transcriptome des ovules de *S. chacoense* a mené à l'identification de 95 ScCRP + 4 OSP dont 2 incluses dans ces 95 ScCRP. Chacune de ces 95 ScCRP respectent des critères de sélection peu restrictifs. Les critères suivants ont été utilisés avec le programme KAPPA (Joly & Matton, 2015) pour considérer qu'une protéine est une CRP :

- la protéine doit avoir une taille maximale de 160 acides aminés,
- la protéine doit avoir 4 cystéines au minimum et 16 au maximum,
- il est prédit que la protéine soit sécrétée en raison de la présence d'un peptide signal (détecté par SignalP) ou d'une prédiction de sécrétion, par SecretomeP, supérieure à 0,5. Des protéines peuvent en effet être sécrétées en absence de peptide signal par des voies de sécrétion non conventionnelles (Ding et al., 2012).

L'ensemble de ces 95 ScCRP ne pouvant être testé pour des considérations pratiques, un nombre limité a été sélectionné pour vérifier leur capacité d'attraction. La séquence Illumina HiSeq de 2013 permet d'avoir des données de DGE (Differentiel Gene Expression) pour l'ensemble de ces ScCRP entre les 3 conditions d'ovules, soit à l'anthèse, 2DBA et *frk1*, et la feuille de *S. chacoense*. Les séquences de ces ScCRP étant connues, chaque candidat a pu être associé à une sous-famille de CRP en alignant leur séquence contre la base de données *nr* (*non-redundant protein sequences*) du NCBI. Une nouvelle classification optimale de ces ScCRP pourra être faite en utilisant KAPPA en mode *ab initio* pour comparer ces CRP aux patrons décrits par (Silverstein et al., 2007). Les familles temporairement identifiées sont des DEFL, LTP, Thionin-like, Egg-Cell, entre autres.

La sélection des candidats se base sur différents critères établis à partir des hypothèses déjà exposées, relative à un enrichissement des transcrits à l'anthèse par rapport à 2DBA et

frk1, un enrichissement dans l'ovule par rapport à la feuille, leur patron de cystéine et, dans une moindre mesure, leur présence dans le sécrétome de l'ovule.

Premier critère **(1)**: le candidat est d'une part exprimé plus fortement à l'anthèse par rapport à frk1 et par rapport à 2DBA, et d'autre part enrichi dans l'ovule par rapport à la feuille. L'hypothèse selon laquelle l'expression de l'attractant reflète sa sécrétion et donc son activité nous conduit à fixer 2 niveaux d'enrichissement. Au premier niveau (1'), le candidat est d'une part au moins 2 fois plus exprimé à l'anthèse qu'à 2DBA ou *frk1* et d'autre part au moins 5 fois plus exprimé dans l'ovule que dans la feuille. On constate que 44 des 95 ScCRP (44/95) répondent à ce niveau (1'). Le second niveau (1'') reflète un fort enrichissement à l'anthèse, soit 5 fois plus de transcrits à l'anthèse par rapport à 2DBA et *frk1*, et associé à une expression 5 fois plus forte dans l'ovule que dans la feuille. On observe que 18/95 ScCRP répondent à ce niveau 1''.

Second critère **(2)**: le candidat est fortement enrichi dans l'ovule à l'anthèse par rapport à la feuille. Les attractants étant exprimés spécifiquement dans les cellules synergides chez *T. fournieri* et *A. thaliana*, nous nous attendons à des résultats similaires. Comme pour le premier critère, deux niveaux d'enrichissement sont considérés. Au premier niveau (2'), le candidat est 250 fois plus exprimé dans l'ovule à l'anthèse que dans la feuille et la moitié des candidats (48/95) répondent à ce critère. Au second niveau (2''), le candidat est 5000 fois plus exprimé dans l'ovule à l'anthèse que dans la feuille et seulement 8/95 ScCRP répondent au critère 2''.

Certaines ScCRP ne répondent pas ou peu au critère 1 ou au critère 2, mais présentent néanmoins des caractéristiques intéressantes. Le programme KAPPA, en plus de permettre l'identification des ScCRP, permet de regrouper ces dernières en fonction de leur patron de cystéines. Le patron de cystéine, qui définit l'appartenance d'une CRP à sa sous-famille, semble avoir une importance notable pour l'activité de la protéine. En effet, l'activité d'attraction du pseudo-gène CRP810_1.5 d'*A. thaliana* est rétablie lorsque son patron de cystéine est rétabli. Ces similarités de patron conduisent à introduire un 3^{ème} critère dit de similarité **(3)**. Aussi bien chez *T. fournieri* que chez *A. thaliana*, les LURE déjà identifiées sont de la famille des DEFL. Ainsi, les ScCRP qui présentent un patron de cystéine qui correspond à celui des DEFL, seraient donc des candidats intéressants. Par ailleurs, en

regroupant l'ensemble des 95 ScCRP de *S. chacoense* avec les AtLURE et TfLURE, deux ScCRP (ScCRP24.1 et ScCRP13.1) ont été associées aux TfLURE en raison d'une similarité entre leur patron de cystéines respectifs, et sont renommés pour l'occasion TfLURE-like. Ce patron est par ailleurs proche de celui des DEFL. Enfin, la présence de ScCRP dans le sécrétome de l'ovule constitue un 4^{ème} critère (4) et conduit à sélectionner quatre candidats supplémentaires, dont deux parmi les 95 ScCRP, ScCRP23.1 (OSP21), ScCRP4.1 (OSP227), ScCRP15.2 (OSP305) et ScCRP15.1 (OSP123).

3.1.2 Stratégie de sélection

Parmi les 95 ScCRP identifiées, 29 ne répondent à aucun critère, elles ont donc été écartées. Parmi les 66 restants, seules 20 ScCRP sont sélectionnées comme candidat à l'attraction afin de limiter le nombre de candidats à tester. Le choix de ces 20 candidats est tributaire de leurs réponses aux critères de sélection préalablement établis. Afin de faciliter ce choix, ces critères sont hiérarchisés selon leur importance.

Aucune des 95 ScCRP ne répond à l'ensemble des quatre critères préalablement définis, et une seule répond aux critères les plus sélectifs 1" et 2", la ScCRP2.2. Afin de faciliter le choix des candidats, certains critères sont priorisés. L'ensemble des candidats sélectionnés répondent à un ou plusieurs de ces critères. La liste des candidats sélectionnés est présentée dans le **Tableau 2**. Bien que certaines des 95 ScCRP répondent aux critères précédemment établis, elles n'ont été identifiées comme appartenant aux ScCRP que récemment, après de nouvelles analyses du transcriptome de l'ovule.. Ces ScCRP pourraient être des candidats intéressants dans des études ultérieures.

Quatre des huit (4/8) des ScCRP répondant au critère 2" ont été sélectionnées en priorité (ScCRP13.1, ScCRP23.1, ScCRP2.2 et ScCRP23.2). Les 4 autres ScCRP répondant à ce critère n'ont pu être pris en considération lors du choix des candidats, n'ayant été identifiées que lors d'une étude récente.

Dix sur dix-huit (10/18) ScCRP répondant au critère 1" sont ensuite sélectionnées (ScCRP2.1, ScCRP2.2, ScCRP4.4, ScCRP4.5, ScCRP4.6, ScCRP6.1, ScCRP6.2, ScCRP5.2, ScCRP5.3 et ScCRP20.1). La ScCRP2.2 est déjà sélectionnée précédemment à partir du

critère 2". Parmi les 8 candidats non sélectionnés, 7 n'ont été identifiés que récemment par une nouvelle analyse du transcriptome.

Les ScCRP5.1 et ScCRP47.1 ont été identifiées comme étant des DEFL, comme les ScCRP5.2 et ScCRP5.3 déjà sélectionnées (critère 3). Elles répondent par ailleurs respectivement aux critères 1'/2' et 1'. Ces deux ScCRP sont donc sélectionnées comme candidats.

La ScCRP24.1 et la ScCRP13.1, qui est déjà sélectionnée, sont des TFLURE-like (critère 3). Elles répondent respectivement aux critères 1'/2' et 2" et sont sélectionnées.

Les ScCRP23.1 (OSP21), ScCRP4.1 (OSP227), ScCRP15.2 (OSP305) et ScCRP15.1 (OSP123) qui ont été identifiées dans l'étude du sécrétome de l'ovule sont également des candidats à l'attraction dans cette étude et sont sélectionnées (critère 4). Bien que la ScCRP15.1 possède 18 cystéines dans sa forme mature, nous l'avons conservé parmi les candidats. Son identification en tant que CRP repose sur des critères moins rigoureux que ceux considérés pour les 95 candidats du transcriptome (≤ 250 aa; $4 \leq$ nombre de cystéine ≤ 18 ; peptide signal ou score SecretomeP $\geq 0,5$).

Un dernier candidat, la ScCRP1.7, une Snakin-like, qui répond aux critères 1'/2', est également sélectionné.

Les caractéristiques de ces 20 candidats à l'attraction de ce projet de maîtrise sont répertoriées dans le **Tableau 2** ci-dessous. Les patrons de cystéines de chaque candidat sélectionné sont présentés dans le

Sous-famille	Patron de cystéine des protéines matures, identifié par KAPPA
Egg cell secreted (EC1)-like	(37-99)C(9)C(17-26)CC(9)C(18-21)C(8-55)
Nouveau groupe X	(10-14)C(11-12)C(10)CxxxC(19-23)C(8-10)C(3-18)
LTP-like	(25-30)C(9)C(12-14)CC(19-21)Cx(20-22)C(9-13)C(3-21)
Defensin-like (1)	(27-31)C(5)C(7-8)CxxxCx(5)Cx(20-24)
Defensin-like (2)	(27-34)C(10-13)C(4-5)CxxxC(9-11)C(5-6)Cx(0-4)
Thionin-like (1)	(8-31)CxxxCxxx(5)C(3-4)Cxxx(11-14)Cxxx(4)C(15) Cxxx(4)C(11)

Thionin-like (2)	(29)CxxxCxxxC(5)CxxxCxxxC(19)CxxxCxxxC(5)CxxxCxxxC(14)CxxxC(4)C(15) xC(4)C(11)
Snakin-like	(19-54)CxxxCxxxC(8)CxxxCxxCCxxCx(11-28)
TfLURE-like	(34-47)C(10-16)CxxxC(11-13)C(9-12)Cx(3-14)
TA20-like	(27)CxxxC(4)CxxC(8)CCxxxCC(16)
ECA1 gametogenesis related-like	(36-80)C(7-8)C(18-19)CC(9-16)C(26-33)C(2-24)

Tableau 3.

Identifiant	Ancien identifiant	Sous-famille	Taille (aa)		Nombre de cystéine (mature)	Sécrétion	DGE			Réponse aux critères				Remarque
			Protéine immature	Protéine mature			FC frk1/A	FC 2DBA/A	FC Feuille/A	Critère 1'	Critère 1''	Critère 2'	Critère 2''	
ScCRP1.7	ScCRP8.1	Snakin-like	113	89	12	PS	-3,2	-78,1	-1123,4	✓	-	✓	-	
ScCRP2.1	ScCRP1.2	Egg cell secreted (EC1)-like	138	115	6	PS	-5,1	-68,4	-461,8	✓	✓	✓	-	
ScCRP2.2	ScCRP1.3	Egg cell secreted (EC1)-like	138	118	6	PS	-5,1	-29,0	-5824,2	✓	✓	✓	✓	
ScCRP4.4	ScCRP2.1	Nouveau groupe X	88	60	4	PS	-7,8	-1162,8	-1227,0	✓	✓	✓	-	
ScCRP4.5	ScCRP2.2	Nouveau groupe X	87	59	4	PS	-8,0	-280,6	-295,9	✓	✓	✓	-	
ScCRP4.6	ScCRP2.3	Nouveau groupe X	86	56	4	PS	-6,4	-97,8	-1080,7	✓	✓	✓	-	
ScCRP5.1	ScCRP5.1	Defensin-like	83	60	6	PS	-4,6	-150,9	-1667,1	✓	-	✓	-	
ScCRP5.2	ScCRP5.2	Defensin-like	78	55	6	PS	-5,6	-96,9	-747,8	✓	✓	✓	-	
ScCRP5.3	ScCRP5.3	Defensin-like	79	51	6	PS	-5,2	-96,0	-740,3	✓	✓	✓	-	SI
ScCRP6.1	ScCRP2.4	Nouveau groupe X	90	66	5	PS	-7,0	-424,8	-448,5	✓	✓	✓	-	SI
ScCRP6.2	ScCRP2.5	Nouveau groupe X	71	49	5	PS	-6,9	-68,7	-529,6	✓	✓	✓	-	
ScCRP13.1	ScCRP9.2	TfLURE-like	101	78	10	PS	-1,9	NA	-21755,5	-	-	✓	✓	
ScCRP15.2	ScCRP6.1	Thionin-like	89	89	12	NC	NA	2,1	-1188,3	-	-	✓	-	DS
ScCRP20.1	ScCRP12.1	TA20-like	71	49	8	PS	-5,5	-13,5	-1225,5	✓	✓	✓	-	
ScCRP23.1	ScCRP3.1	LTP-like	155	129	8	PS	-1,9	-18,8	-8357,3	-	-	✓	✓	DS
ScCRP23.2	ScCRP3.7	LTP-like	134	108	9	PS	-1,9	-17,9	-5638,0	-	-	✓	✓	
ScCRP24.1	ScCRP9.1	TfLURE-like	96	77	10	PS	-3,4	-22,2	-390,9	✓	-	✓	-	SI
ScCRP47.1	ScCRP11.1	Defensin-like	71	50	7	PS	-4,1	-26,6	-41,7	✓	-	-	-	SI
	ScCRP4.1	ECA1 gametogenesis related-like	114	86	6	PS	NA	-5,3	-17,8	-	-	-	-	DS
	ScCRP15.1	Thionin-like	154	133	18	PS	NA	-1,5	-748,5	-	-	✓	-	DS

Tableau 2. Liste des 20 candidats à l'attraction retenus, caractéristiques et réponses aux critères. FC : *fold change*; *frk1* : ovule de mutant *frk1*; 2DBA : ovule immature 2 jours avant l'anthèse; A : ovule à l'anthèse; aa : acide aminé; ✓ : réponse positive au critère; - : réponse négative au critère; NA : FC non significatif; SI : séquence incomplète; DS : détecté dans le sécrétome. PS : peptide signal ; NC : non-conventionnel. Les FC sont considérés comme significatifs avec une p- value $\leq 0,05$. Les FC sont calculés à partir des CPM (Count Per Minute) issus du séquençage Illumina HiSeq de 2013 : $FC(A/B) = CPM(A)/CPM(B)$. Les anciens identifiants correspondent à ceux employés dans la thèse de Liu (Liu, 2016).

Sous-famille	Patron de cystéine des protéines matures, identifié par KAPPA	Candidat
Egg cell secreted (EC1)-like	(37-99)C(9)C(17-26)CC(9)C(18-21)C(8-55)	ScCRP2.1; ScCRP2.2
Nouveau groupe X	(10-14)C(11-12)C(10)Cxxx(19-23)C(8-10)C(3-18)	ScCRP4.4; ScCRP4.5; ScCRP2.3; ScCRP4.6; ScCRP6.2
LTP-like	(25-30)C(9)C(12-14)CC(19-21)Cx(20-22)C(9-13)C(3-21)	ScCRP23.1; ScCRP23.2
Defensin-like (1)	(27-31)C(5)C(7-8)Cxxx(9-11)Cx(20-24)	ScCRP5.1; ScCRP5.2; ScCRP5.3
Defensin-like (2)	(27-34)C(10-13)C(4-5)Cxxx(9-11)C(5-6)Cx(0-4)	ScCRP47.1
Thionin-like (1)	(8-31)Cxxx(5)C(3-4)Cxxx(11-14)Cxxx(4)C(15) Cxxx(4)C(11)	ScCRP15.2
Thionin-like (2)	(29)Cxxx(5)Cxxx(19)Cxxx(5)Cxxx(14)Cxxx(4)C(15)Cxxx(4)C(11)	ScCRP15.1
Snakin-like	(19-54)Cxxx(8)Cxxx(11-28)	ScCRP1.7
TfLURE-like	(34-47)C(10-16)Cxxx(11-13)C(9-12)Cx(3-14)	ScCRP24.1; ScCRP13.1
TA20-like	(27)Cxxx(4)Cx(8)CCxxx(16)	ScCRP20.1
ECA1 gametogenesis related-like	(36-80)C(7-8)C(18-19)CC(9-16)C(26-33)C(2-24)	ScCRP4.1

Tableau 3. Patron de cystéines des sous-familles de CRP des candidats sélectionnés. x : acide aminé autre que cystéine; C : cystéine; (,) : nombre d'acides aminés non cystéiques séparant les cystéines. Les patrons de cystéines sont établis à partir du programme KAPPA (Joly & Matton, 2015) à partir des séquences protéiques des CRP matures détectés dans le transcriptome de l'ovule de *S. chacoense*. L'appartenance d'une CRP à une sous-famille en fonction de son patron de cystéines se base sur (Silverstein et al., 2007).

Parmi les 20 candidats sélectionnés, 4 ont des séquences incomplètes en leur C-terminal, les ScCRP13.1, ScCRP6.1, ScCRP5.3 et ScCRP47.1. La séquence de ces candidats doit être complétée

Par ailleurs, certains candidats sélectionnés avaient précédemment été testés par Yang Liu (Liu, 2016). Néanmoins, la stratégie employée pour tester leur capacité d'attraction étant légèrement différente, ces candidats restent intéressants à tester.

3.2 Clonage, expression et purification des candidats à l'attraction

3.2.1 Clonage des candidats dans des vecteurs d'expression

Les candidats sélectionnés sont clonés et exprimés dans un système bactérien, de la même façon que l'ont été les LURE identifiées chez *T. furnieri* et *A. thaliana*.

Les candidats sécrétés par voie traditionnelle, soit avec un peptide signal, en ont été excisés afin que les protéines soient exprimées directement dans leur forme mature. Une étiquette 6-Histidine est ajoutée en C-terminal ou en N-terminal des candidats, afin de faciliter leur purification sur colonne His-Trap FF (GE Healthcare Life Sciences). Les candidats étant des CRP, soit de petites protéines de moins de 20 kDa, l'utilisation d'un His-tag se justifie, une étiquette d'une taille plus importante pouvant entraver leur activité et ralentir leur diffusion.

Les 9 candidats ScCRP2.1, ScCRP2.2, ScCRP4.4, ScCRP4.5, CCRP4.6, ScCRP6.2, ScCRP5.1 et ScCRP5.2 et ScCRP20.1 ont préalablement été clonés dans le vecteur d'expression pET28b par digestion enzymatique et ligation. Ces constructions sont transformées dans les souches bactériennes *E. coli* Rosetta-gami ou BL21.

Les systèmes de clonage, conditions d'expression et méthode de purification sont récapitulés dans le **Tableau 4**.

3.2.1.1 Clonage Gateway dans pQLink HD

Dans un premier temps, 7 candidats, les ScCRP23.1 (OSP21), ScCRP15.2 (OSP305), ScCRP23.2, ScCRP1.7, ScCRP13.1 et ScCRP5.1 et ScCRP20.1 sont clonés dans le vecteur Gateway pQLinkHD. Les 2 candidats ScCRP4.1 (OSP227) et ScCRP15.1 (OSP123) sont

clonés dans le vecteur Gateway accepteur pZeo, mais n'ont cependant pas pu être clonés dans le vecteur pQLinkHD. Les sites de recombinaisons nécessaires à l'enzyme LR Clonase auraient pu être endommagés lors de la PCR, empêchant la recombinaison de la séquence à insérer dans pQLinkHD. Ils devront être clonés de nouveau avec une stratégie de clonage différente, par exemple dans le vecteur pET28b. L'utilisation de vecteurs Gateway permet, si de nouvelles expériences l'exigent, de changer facilement l'étiquette associée au candidat. Les constructions sont séquencées afin de vérifier si l'étiquette 6-Histidine en N-terminal du site de recombinaison attR1 est en phase avec la séquence codante du candidat cloné. Une fois les séquences vérifiées, les constructions sont transformées dans la souche *E. coli* Rosetta.

3.2.1.2 Clonage des candidats incomplets (ScCRP24.1, ScCRP47.1, ScCRP5.3 et ScCRP6.1)

Les 4 candidats dont la séquence en C-terminal manquait (ScCRP24.1, ScCRP47.1, ScCRP5.3 et ScCRP6.1) ont été complétés par RT-PCR en utilisant une amorce oligo-dT et une amorce spécifique pour chacun des candidats (**Tableau 6** en Annexe). Pendant l'amplification PCR, l'amorce oligo-Dt s'hybride avec la séquence polyadénylée en 3' de l'ADN complémentaire correspondant au candidat. Cette amplification permet l'obtention d'un amplicon contenant l'intégralité de la séquence codante, avec en 3' de cette dernière le 3'-UTR (*untranslated region*) du transcrit. Deux sites de restrictions sont associés aux amorces sens-spécifique et oligo-Dt, respectivement BamHI et HindIII. Le produit PCR est digéré avec ses enzymes, permettant son insertion dans le vecteur pET28b préalablement digéré. Par séquençage, nous avons vérifié que l'étiquette 6-Histidine en N-terminal du MCS (*multi cloning site*) est en phase avec la séquence codante des candidat SCRP24.1, SCRP5.3 et ScCRP6.1. Le séquençage de la ScCRP47.1 a révélé des problèmes dans le clonage de cette dernière, qui devra être réessayé. Le 3'-UTR étant en 3' du codon stop de la séquence codante, il n'interfère pas avec l'expression du candidat. Les constructions de SCRP24.1, SCRP5.3 et ScCRP6.1 sont ensuite transformées dans une souche d'expression *E. coli* Rosetta.

3.2.1.3 Clonage dans pGEX-4T-2

L'expression des 3 candidats ScCRP23.2, ScCRP1.7 et ScCRP23.1 clonés dans le vecteur pQLinkHD n'a jamais réussi à être induit, quelles que soient les conditions utilisées.

Les conditions d'expression testées étaient : 37 °C (4 h), 28 °C (5 h), 23 °C (ON), 18 °C (O/N), des concentrations en IPTG de 0,1 à 1 mM, des densités optiques (DO₆₀₀) au moment de l'induction de 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7. Ces candidats ont été de nouveau clonés dans un autre vecteur d'expression, PGEX-4T-2.

Le vecteur PGEX-4T-2 contient une séquence GST en N-terminal du MCS, avec en C-terminal du GST un site de reconnaissance à l'enzyme thrombine permettant de cliver l'étiquette GST lors de la purification. Cliver la GST permet de limiter les risques que cette étiquette interfère avec l'activité du candidat, le GST faisant 27 kDa et les candidats entre 10 et 15 kDa. Une purification en chromatographie d'affinité avec une colonne GST-Trap FF de protéines recombinantes ayant une étiquette GST exige que les protéines induites soient solubles. Afin de pouvoir purifier les candidats protéiques induits même s'ils sont insolubles, une étiquette 6-Histidine est ajoutée. Ainsi, avec l'aide de l'amorce anti-sens pendant l'amplification PCR, une séquence codant pour une étiquette 6-Histidine a été rajoutée en 3' de la séquence codante de ces candidats.

Les ADN complémentaires obtenus par rétro-transcription sont amplifiés à partir de nouvelles amorces spécifiques des ScCRP23.2, ScCRP1.7 et ScCRP23.1. Ces produits PCR sont digérés avec EcoRI et XhoI, puis insérés par ligation dans PGEX-4T2, préalablement digérés avec ces mêmes enzymes de restriction. Les constructions sont vérifiées par séquençage, puis transformées dans la souche d'expression *E. coli* Rosetta.

3.2.2 Induction de l'expression protéique des candidats

3.2.2.1 Induction de l'expression

Les 17 candidats clonés avec succès sont transformés dans une souche d'*E. coli* destinée à l'expression protéique, soit BL21, Rosetta ou Rosetta gami. Qu'ils soient clonés dans pQLinkHD, pET28b ou PGEX-4T-2, l'expression des candidats est sous le contrôle du promoteur T7, inductible à l'IPTG. Afin d'induire l'expression des protéines recombinantes, des tests d'induction à l'IPTG sont faits, à 37 °C (4 h), 28 °C (5 h), 23 °C (O/N), à des concentrations d'IPTG comprises entre 0,2 et 1 mM. La difficulté du travail avec les protéines est que chacune d'entre elle requiert une optimisation des différents paramètres d'expression,

puis de purification. On ne peut prédire d'après la séquence protéique ou de n'importe quelle autre donnée les conditions d'expression adaptées.

L'expression des 14 candidats ScCRP23.1, ScCRP1.7, ScCRP23.2, ScCRP2.2, ScCRP4.4, CCRP4.6, ScCRP15.2, ScCRP13.1, ScCRP2.1, ScCRP5.1 et ScCRP5.2 a été induite avec succès, dans les conditions résumées dans le **Tableau 4**.

La ScCRP5.1 ayant été clonée dans deux vecteurs différents, pQlinkHD et pET28b, nous avons essayé d'induire l'expression protéique dans ces deux constructions. Seul le clone dans pET28b a pu être exprimé avec succès.

L'expression des 3 ScCRP20.1, ScCRP4.5 et ScCRP6.2 n'a pu être induite, quelles que soient les conditions d'induction employées. Ces candidats vont être clonés dans le vecteur PGEX-4T-2.

3.2.2.2 Vérification de la solubilité

Pour les 14 candidats dont l'expression a été induite avec succès, la solubilité de la protéine a été vérifiée. Les protéines induites des 3 candidats clonés dans PGEX-4T2 (ScCRP23.1, ScCRP23.2 et ScCRP1.7) ainsi que ScCRP5.1 et ScCRP5.2 clonés dans pET28b sont solubles. Les protéines induites des 6 candidats ScCRP2.2, ScCRP4.4, CCRP4.6, ScCRP15.2, ScCRP13.1 et ScCRP2.1 sont insolubles, contenues dans des corps d'inclusion. Faire varier la durée, la température d'induction ou la concentration en IPTG n'affecte pas la solubilité de la protéine.

Identifiant	Ancien identifiant	Vecteur	Résistance	Souche d'expression	Induction			Solubilité	Purification (protocole)
					Température	Durée	[IPTG] mM		
ScCRP2.2	ScCRP1.3	pET28b	Kan	BL21	28 °C	5 h	1	IB	Urée 8 M
ScCRP4.4	ScCRP2.1	pET28b	Kan	Rosetta gami	28 °C	5 h	1	IB	Urée 8 M
ScCRP4.6	ScCRP2.3	pET28b	Kan	Rosetta gami	28 °C	5 h	1	IB	Urée 8 M
ScCRP5.1	ScCRP5.1	pET28b	Kan	Rosetta gami	28 °C	5 h	1	SUP+IB	Condition native
ScCRP5.2	ScCRP5.2	pET28b	Kan	BL21	28 °C	5 h	1	SUP+IB	Condition native
ScCRP15.2	ScCRP6.1	pQlinkHD	Amp	Rosetta	37 °C	4 h	1	IB	Urée 8 M
ScCRP13.1	ScCRP9.2	pQlinkHD	Amp	Rosetta	28 °C	5 h	1	IB	Urée 8 M
ScCRP23.1	ScCRP3.1	PGEX-4T-2	Amp	Rosetta	37 °C	4 h	1	SUP+IB	A faire
ScCRP23.2	ScCRP3.7	PGEX-4T-2	Amp	Rosetta	37 °C	4 h	1	SUP+IB	A faire
ScCRP1.7	ScCRP8.1	PGEX-4T-2	Amp	Rosetta	37 °C	4 h	1	SUP+IB	A faire
ScCRP2.1	ScCRP1.2	pET28b	Kan	BL21	28 °C	5 h	1	IB	A faire
ScCRP6.1	ScCRP2.4	pET28b	Kan	Rosetta	37 °C	4 h	1	-	A faire
ScCRP5.3	ScCRP5.3	pET28b	Kan	Rosetta	37 °C	4 h	1	-	A faire
ScCRP24.1	ScCRP9.1	pET28b	Kan	Rosetta	37 °C	4 h	1	-	A faire
ScCRP4.5	ScCRP2.2	pET28b	Kan	Rosetta gami	Pas d'induction				
ScCRP6.2	ScCRP2.5	pET28b	Kan	Rosetta gami	Pas d'induction				
ScCRP20.1	ScCRP12.1	pQlinkHD	Amp	Rosetta	Pas d'induction				
ScCRP47.1	ScCRP11.1	pET28b	Kan						
	ScCRP4.1	pZeo	Zeo	-					
	ScCRP15.1	pZeo	Zeo	-					

Tableau 4. Résumé des résultats de clonage, d'expression et de purification des candidats à l'attraction. Les protéines induites sont IB : dans la fraction insoluble; SUP : dans la fraction soluble. Les anciens identifiants correspondent à ceux employés dans la thèse de Liu (Liu, 2016).

3.3 Purification des candidats

Afin d'augmenter le rendement, des cultures de 1 L des souches d'expression transformée d'*E. coli* ont été induites à l'IPTG selon les conditions d'induction précédemment définies. Deux méthodes de purification ont été employées selon la solubilité des protéines induites à l'IPTG.

Les protéines solubles sont purifiées dans des conditions natives. Les protéines insolubles sont purifiées dans des conditions dénaturantes, les corps d'inclusion sont dénaturés dans une solution d'urée à 8 M, plus efficace qu'une solution à 6 M également testée. Les protéines sont renaturées sur colonne en diminuant progressivement la concentration en urée jusqu'à 0 M, puis sont éluées.

De façon similaire à l'étape de l'expression protéique, la purification nécessite une optimisation des paramètres pour chaque nouvelle protéine. Un système de purification peut convenir à une protéine mais pas à une autre, même si ces deux protéines sont exprimées dans les mêmes conditions, dans la même souche bactérienne et clonées dans un même vecteur. Parmi les candidats ayant été exprimés, 7 ont été purifiés avec succès sur des colonnes His-Trap FF avec le FPLC ÄKTA Avant 25: les ScCRP5.1, ScCRP5.2 en condition native, les ScCRP2.2, ScCRP4.4, CCRP4.6, ScCRP15.2 et ScCRP13.1 en condition dénaturante.

Les fractions obtenues sont migrées sur un gel de polyacrylamide 15 % afin de vérifier la pureté des protéines éluées et si leur taille observée est celle attendue. Les gels d'inductions, de purification et les chromatogrammes des ScCRP5.1 et ScCRP13.1 sont présentés sur la **Figure 8**. Les fractions issues de la purification de la ScCRP5.2 présentent une forte contamination (**Figure 9**). Une seconde étape de purification a été nécessaire pour enlever ces impuretés. Après avoir remplacé le tampon d'éluion par un tampon de lyse par dialyse, les fractions éluées de la ScCRP5.2 sont de nouveau purifiées dans des conditions natives. Ce second tour de purification a permis de diminuer la proportion d'impuretés dans les protéines éluées.. Les purifications des autres candidats présentent également des bandes à des tailles non-attendues (**Figure 8**). Étant donné leur taille, nous supposons que certaines de ces bandes correspondent à des candidats sous forme de multimères. Les autres bandes étant faibles, peu

de protéines contaminantes se retrouvent dans les fractions, limitant le risque qu'elles affectent les tests de guidage ultérieurs. Les fractions retenues sont celles présentant le moins d'impuretés. Afin de vérifier que les bandes des gels issus des fractions de la purification contiennent bien les protéines attendues, les bandes des fractions présentant le plus de protéines éluées ont été découpées et envoyées à la spectrométrie de masse (**Figure 10**).

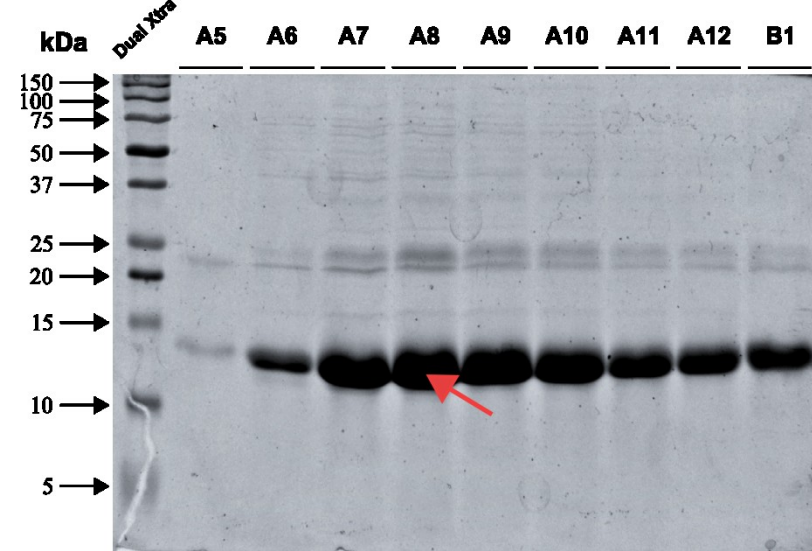
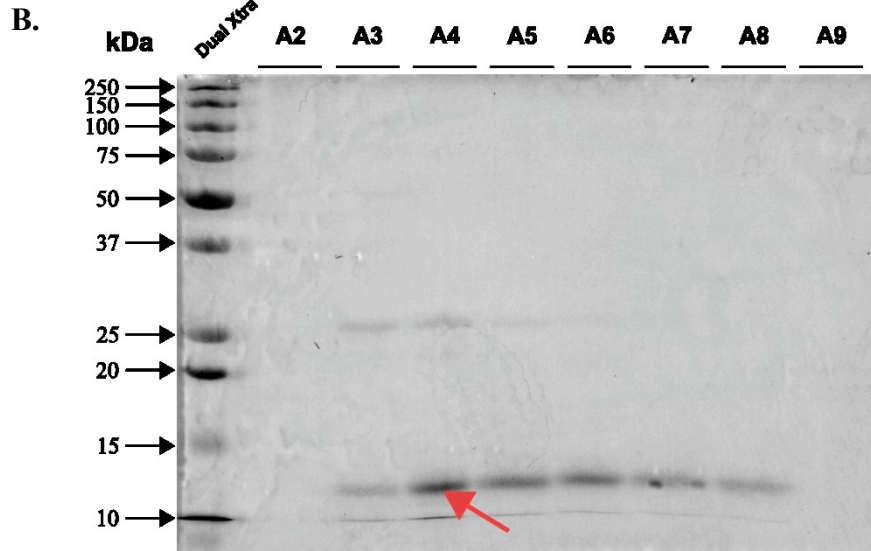
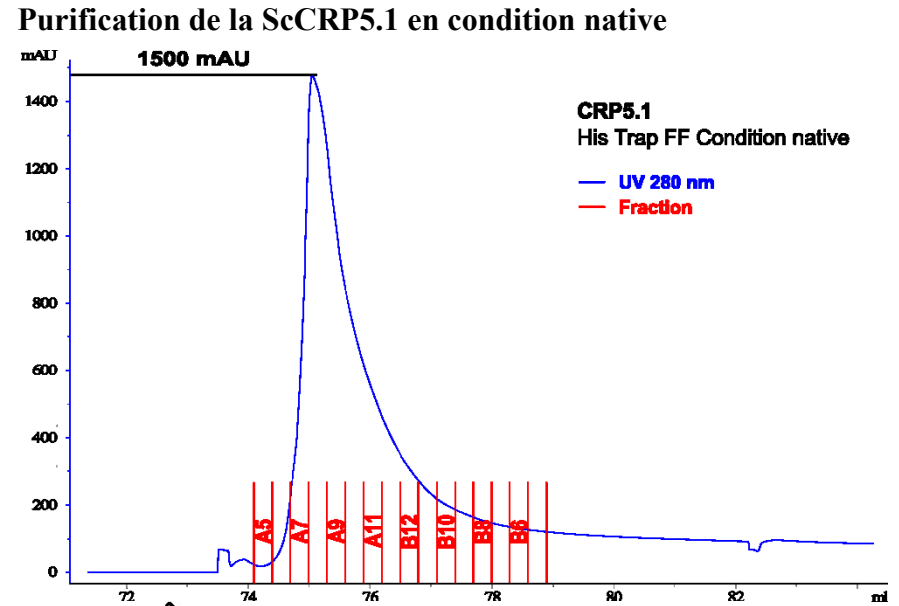
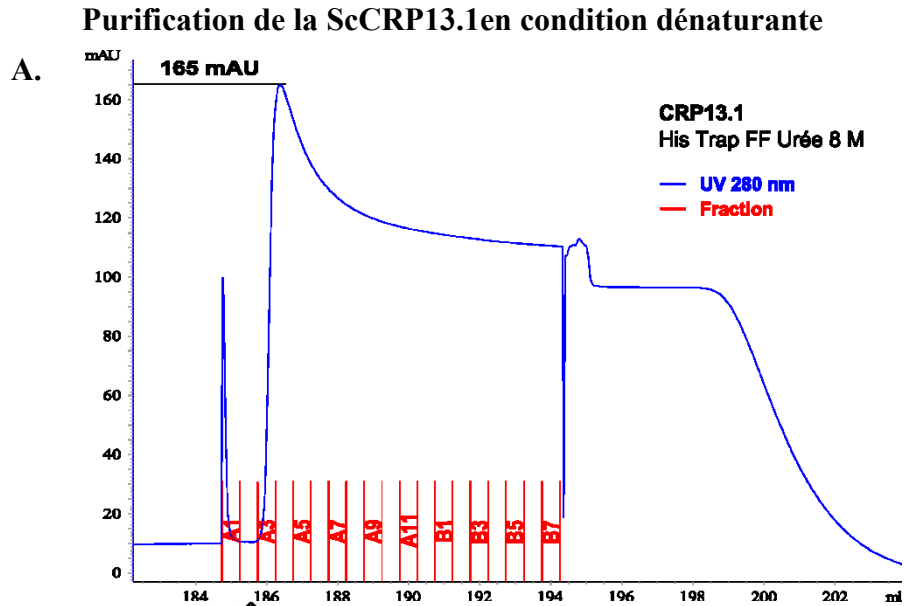


Figure 8. Résultat de la purification des candidats ScCRP13.1 et ScCRP5.1. **A.** Chromatogramme issu de la purification à partir du programme UNICORN associé à la FPLC ÄKTA 25. Les fractions retenues sont celles au niveau du pic d'éluion, détecté à l'UV 280 nm. **B.** Gel de polyacrylamide 15 %. L'échelle utilisée est la Precision Plus Protein™ Dual Xtra (Bio-Rad™). Cinq microlitres (5 µl) de chaque fraction est migré avec 100 mM de DTT et du SB5x à 120 V. Coloration de 1 h au bleu de Coomassie, décoloration O/N. La flèche rouge indique la bande correspondant à la taille attendue de la protéine purifiée.

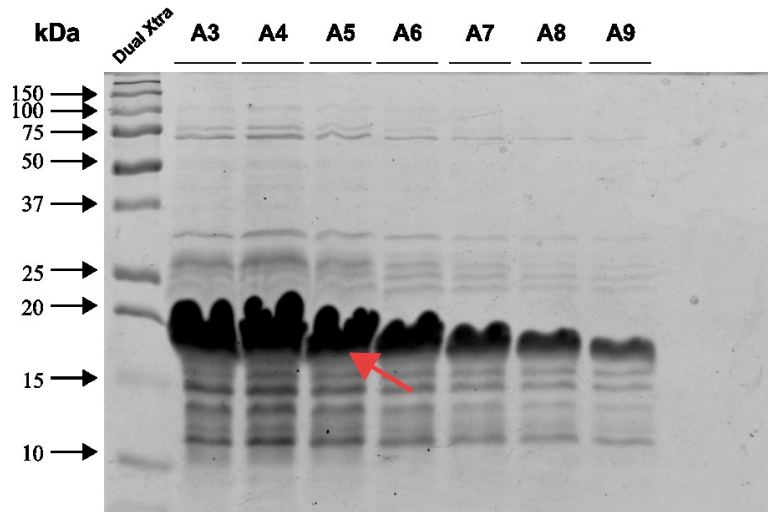


Figure 9. Purification de ScCRP5.2 dans des conditions natives. Gel de polyacrylamide 15 %. L'échelle utilisée est la Precision Plus Protein™ Dual Xtra (Bio-Rad™). Cinq microlitres (5 μ l) de chaque fraction sont migrés avec 100 mM de DTT et du SB5x à 120 V. Coloration de 1 h au Bleu de Coomassie, décoloration O/N. La flèche rouge indique la bande correspondant à la taille attendue de la protéine purifiée. De A3 à A4 : fractions d'élutions issues de la purification

ScCRP4.4. 10,6 kDa

94/94 acide aminés (100% de couverture)

M G S S H H H H H H	S S G L V P R G S H	M A S M T G G Q Q M	G R D P Y P P R I E
D L P R P E L E N L	C K N G S V P R F E	S I C L S D C V Y F	I K Y N D Y K E L G
C E L K W E Y D G G	Y I S G		

ScCRP13.1. 11,7 kDa

86/100 acide aminés (86% de couverture)

M K H H H H H H H G	A A G T S L Y K K A	G L D S N L T H L E	M A R G N L T E L D
V D Y H Y R C S G N	L G P C N Y E Y C D	E D C C I R T C N N	Y Y S E L N P E P K
C T D F P G Y Y P Y	K F C I C W H D C Y		

ScCRP15.2. 12,6 kDa

85/113 acide aminés (75% de couverture)

M K H H H H H H H G	A A G T S L Y K K A	G L E M I K G E D G	E C L S L C I A G C
F L N P I C S T I I	C P D Y C S Q R D V	R T R N N R I C N V	G C S I G H C Y K Y
L I N N Y D H E K F	G S C M T S C N E N	Y C V D G N N I A L	P K A

Figure 10. Résultat de spectrométrie de masse des candidats ScCRP4.4, ScCRP13.1 et ScCRP15.2. Probabilité de présence d'un résidu par rapport à la séquence recombinante théorique de la protéine purifiée : en vert : > 95 %, en jaune : entre 80 et 94 %, en blanc : entre 0 et 19 %. La spectrométrie de masse est effectuée à la plateforme de protéomique de l'IRIC. La représentation des résultats se fait sur *Scaffold viewer*.

Chacun des candidats purifiés dans des conditions dénaturantes est ensuite dialysé pendant 3 jours afin de favoriser un repliement correct dans sa structure tertiaire. Les candidats purifiés, à l'exception du candidat ScCRP5.2, sont transférés dans une solution 50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Leurs concentrations sont alors établies par la méthode de Bradford. Une fois purifiées, dosées, et contenues dans une solution de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, la capacité de ces protéines à attirer les tubes polliniques de *S. chacoense* est prête à être testée par la méthode du *bead assay*.

3.4 Tests de guidage des candidats par la méthode du *bead assay*

La méthode utilisée pour tester la capacité d'attraction d'un tube pollinique par des protéines purifiées a été mise en place lors de l'étude des LURE de *T. fournieri*, et utilisée pour l'étude chez *A. thaliana*. Cette technique, concluante dans ces études, est adoptée dans le cadre de ce projet de maîtrise.

Les tests de guidage sont effectués sur des tubes polliniques SIV. Dans un premier temps ($t=0$), des styles de *S. chacoense* G4 sont pollinisés par du pollen d'individus V22. Le lendemain ($t=24h$), le pistil dans lequel croissent les tubes polliniques est isolé, et son extrémité basale est déposée sur un milieu gélosé. A $t=30h$, les tubes polliniques sont sortis de l'extrémité basale du pistil et croissent dans le milieu gélosé, et quelques heures plus tard, le test de guidage peut commencer. La méthode, dite du *bead assay* (**Figure 6**), consiste à placer une bille de gélatine d'environ 40 μm de diamètre contenant la protéine purifiée à tester à proximité (entre 30 et 40 μm) d'un tube pollinique viable et en croissance.

Si le tube s'oriente en direction de la bille de gélatine qui diffuse le candidat dans le milieu adjacent, et si cette expérience est répétée avec succès suffisamment de fois, on peut estimer alors que la protéine testée attire le tube pollinique.

Afin d'optimiser la reproductibilité des expériences, les plantes utilisées sont cultivées en chambre de croissance dont la température et la luminosité sont contrôlées (22 °C, 16L8D).

3.4.1 Optimisation du système

La réalisation d'un test de guidage dépend de la qualité de la croissance des tubes polliniques, qui se détermine par plusieurs facteurs, soit la longueur maximale moyenne des tubes polliniques sur le milieu, la proportion d'apex ayant explosé et leur trajectoire de croissance. Des tubes polliniques courts, dont l'apex explose précocement et présentant des trajectoires irrégulières en zigzag ne sont pas exploitables, peut soit refléter la mauvaise qualité du milieu de croissance employé soit de mauvaises conditions de croissance de l'individu utilisé. Afin de limiter ce dernier aspect, les plants utilisés sont cultivés dans un environnement contrôlé, en chambre de croissance. La qualité de croissance d'un tube pollinique dépend de l'humidité du milieu de croissance, de son pH, de sa composition, de sa densité, et de sa concentration en sucre.

Le milieu gélosé initialement utilisé est un milieu BK1x avec 5 % de saccharose, dans lequel une dizaine d'ovaires ont été incubés 20 h, rendu solide par l'ajout de 1 % d'agarose *ultra-low melt*. Cependant, sur ce milieu, la croissance de ces tubes polliniques s'arrête rapidement et la majorité des tubes polliniques présentent des déformations (croissance zigzagante, éclatement précoce de l'apex). Seule une faible proportion des tubes polliniques est utilisable pour les essais d'attraction. Afin de maximiser cette proportion, le milieu de croissance a été optimisé.

Dans un premier temps, plusieurs concentrations de saccharose, nécessaire à la croissance des tubes polliniques, ont été testées, soit 5 %, 8 %, 10 % et 12 %. Plusieurs concentrations en agarose *ultra-low melt*, le gélifiant du milieu lui conférant sa densité, ont également été testées : 0,5 %, 1 %, 1,5 % et 2 %. Nous avons pu démontrer que la croissance des tubes polliniques de *S. chacoense* est optimale dans les milieux 12 % saccharose et 1,5 % d'agarose *ultra-low melt*. Le milieu BK utilisé pour la croissance est initialement à un pH de 7. Dans le style, la croissance du tube pollinique implique des flux ioniques entre son cytosol et le milieu extracellulaire, notamment de Ca^{2+} . Ces flux ioniques pourraient provoquer des micro-variations de pH du milieu localisés à l'apex du tube pollinique en croissance, ce qui pourrait en affecter la qualité. Afin de stabiliser et limiter les variations de pH du milieu, du tampon phosphate salin (*phosphate buffered saline*, PBS) a été ajouté à la composition du milieu.

Différents milieux de croissance BK1x 12 % Saccharose PBS1x ont été élaborés, avec des PBS à des pH différents (pH 5 à 9 avec des incréments de 0,5 unité). La qualité de croissance dans chacun de ces milieux a été évaluée. Le milieu présentant la meilleure qualité de croissance est celui avec un PBS initial à un pH 8,5. L'incubation d'ovaires pendant 20 h a tendance à acidifier le milieu, quelle que soit l'acidité du PBS initial. Le milieu de croissance avec un PBS à pH 8,5, après incubation, est en moyenne à un pH 7,0.

3.4.2 Limitation des faux positifs

Les tests de guidage se basent sur un principe d'une réorientation active et non aléatoire, d'un tube pollinique sur le milieu de croissance au cours de sa croissance. Afin que les tests de guidage soient validés, il faut déterminer si la réorientation est active, du fait de la présence d'un attractant, ou due au hasard. A cette fin, nous avons déterminé un angle moyen σ de réorientation des tubes polliniques en l'absence d'attractants (billes vides et absence de bille). L'angle moyen σ de réorientation des tubes polliniques en l'absence d'attractants est de 13° , avec un écart-type de 12° ($n=172$ angles mesurés, sur 23 tubes polliniques différents).

Cet angle permet de déterminer une aire d'exclusion pour le dépôt de la bille de gélatine, ce qui permet de limiter le nombre de faux positifs (FP), lorsque qu'un tube se réoriente en direction de la bille de gélatine sans que cette réorientation soit due à un phénomène d'attraction. Pour limiter les FP lors des *bead assay*, la bille de gélatine n'est donc pas déposée à un angle de $\pm 25^\circ$ (ce qui correspond à $\bar{\sigma} + \sigma_\sigma$) par rapport à l'orientation initiale (au moment du dépôt de la bille) du tube pollinique (**Figure 6** et **Figure 7**).

3.4.3 Test de guidage de *bead assay*

La concentration massique de chaque protéine purifiée est convertie en concentration molaire en considérant sa taille théorique en kDa. Le pourcentage de tubes polliniques attirés dépend de la concentration molaire de l'attractant dans la bille de gélatine. Dans les systèmes de *bead assay* utilisés dans de précédentes études, les concentrations attirant le plus de tubes polliniques sont de 40 nM pour TfLURE1, de 4 nM pour TfLURE2 (*T. fournieri*) et supérieures ou égales à 5 μ M pour AtLURE1.2 (*A. thaliana*) (**Figure 11**). Le pourcentage des tubes polliniques attirés par AtLURE1.2 est corrélé positivement avec la concentration

d'attractant. En revanche, au-delà d'une concentration de 40 nM de TfLURE1 ou de 4 nM de TfLURE2, le pourcentage d'attraction de tubes polliniques diminue. Le choix de la concentration molaire testée d'un candidat peut donc avoir un impact sur le pourcentage des tubes polliniques qui pourraient être attirés, notamment si les tubes polliniques de *S. chacoense* répondent de manière analogue à ceux de *T. fournieri* en présence d'une concentration trop élevée d'attractants.

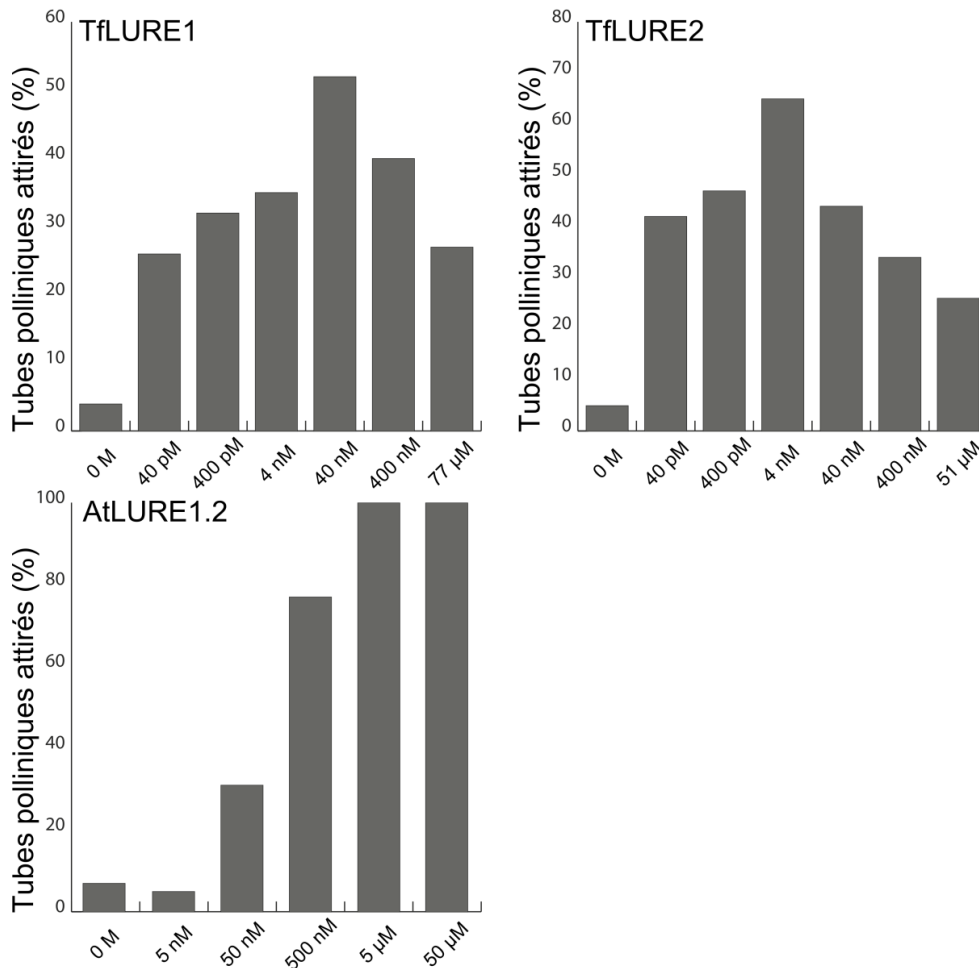


Figure 11. Pourcentage d'attraction des tubes polliniques par des LURE en fonction de la concentration. Ces résultats sont issus de tests de guidage par *bead assay* des TfLURE1, TfLURE2 et AtLURE1.2. La concentration correspond à la concentration molaire des protéines dans les billes de gélatine. Données issus de (Takeuchi & Higashiyama, 2012) et (Okuda et al., 2009).

Les concentrations molaires des candidats à tester, dans une solution 50 mM Tris, pH 8,0, sont de 4 nM, 40 nM, 400 nM et 4 μ M afin de couvrir une échelle de concentration.

Afin de s'assurer d'un contrôle négatif, des billes de gélatine vides sont placées à 40 μ m de l'apex de tubes polliniques. On vérifie qu'aucun des tubes polliniques n'est attiré (0/25). Un contrôle positif a précédemment été effectué avec des billes de gélatine contenant de l'exsudat de 4 ovaires à l'anthèse dépericarpés, On observe que 43 % des tubes polliniques (n=28) sont attirés, le système du *bead assay* est adapté pour *S. chacoense*. La capacité d'attraction des 5 candidats ScCRP2.2, ScCRP4.4, CCRP4.6, ScCRP5.1 et ScCRP5.2 a été évaluée lors de tests précédents, aux concentrations molaires indiquées dans le **Tableau 5**, sans résultat concluant (Liu, 2016). Ces candidats sont à nouveau testés (test actuel), aux différentes concentrations répertoriées dans le **Tableau 5**

Les tubes polliniques considérés pour ces tests présentent une croissance non-zigzagante et un trafic véhiculaire actif, observable au microscope à un grossissement de 200 X. Les tubes polliniques dont la croissance s'arrête au moment du placement de la bille ne sont pas comptabilisés. Les résultats des tests de guidage sont présentés dans le **Tableau 5**.

Identifiant	Ancien identifiant	Test précédent		Test actuel (40 nM)
		Concentration déjà testée	Résultat	
ScCRP2.2	ScCRP1.3	67 μ M	0/30	
ScCRP4.4	ScCRP2.1	23 μ M	0/30	
ScCRP4.6	ScCRP2.3	160 μ M	0/30	
ScCRP5.1	ScCRP5.1	15 μ M	0/30	3/24
ScCRP5.2	ScCRP5.2	16 μ M	0/30	
ScCRP15.2	ScCRP6.1	-	-	0/19
ScCRP13.1	ScCRP9.2	-	-	0/18

Tableau 5. Résultats des tests de guidage des protéines candidates. La quantité x/y indique le nombre x de tubes polliniques se réorientant vers la bille de gélatine contenant le candidat, par rapport au nombre y de tubes testés. Un contrôle négatif est effectué en testant le guidage avec des billes vides (n=25) et on constate une systématique absence d'attraction. Un contrôle positif (Liu, 2016) a été effectué à partir d'exsudat d'ovule à l'anthèse : 43 % des tubes polliniques (n=28) se réorientent vers la bille. Les anciens identifiants correspondent à ceux employés dans la thèse de Liu (Liu, 2016).

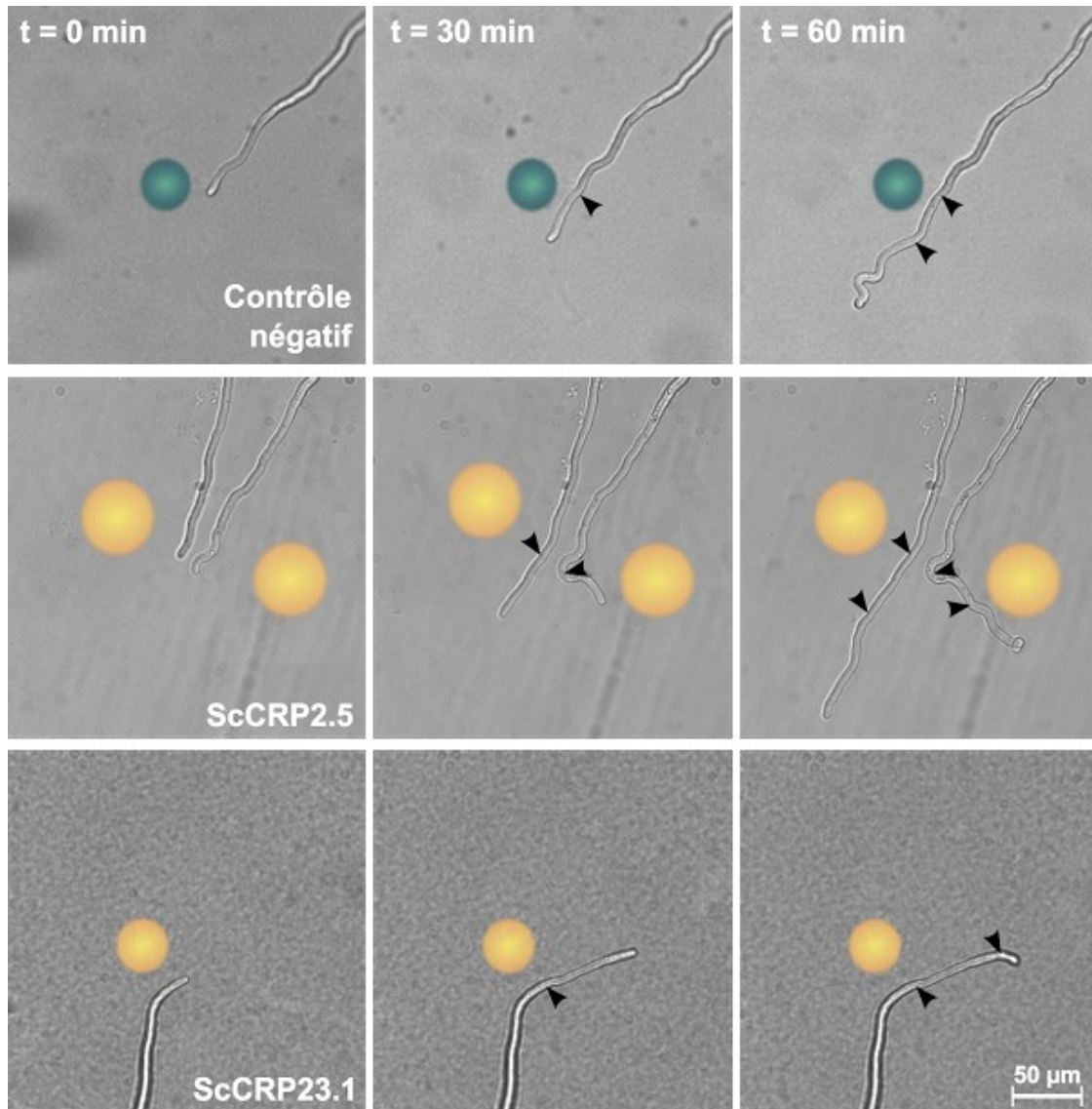


Figure 12. Test de guidage des candidats ScCRP2.5 et ScCRP23.1 par la méthode du *bead assay*. A $t=0$, une bille de gélatine est placée à proximité d'un tube pollinique. Une vidéo en accéléré (*time-lapse*) est lancée pendant 60 minutes avec une photographie toute les 5 minutes. L'emplacement des tubes polliniques à $t=0$, $t=30$ et $t=60$ minutes est évalué. Les cercles pleins correspondant à l'emplacement de, en bleu, une bille de gélatine vide, en jaune, une bille de gélatine contenant 40 nM de candidat protéique. Grossissement 200 X, fond clair (*brightfield*), Axio Observer.Z1. Les flèches noires correspondant à l'emplacement de l'extrémité du tube pollinique 30 minutes avant la prise d'image.

A ce jour, 3 candidats ont été testés individuellement, les ScCRP15.2, 9.2 et 5.1. Ces expériences sont présentées dans le **Tableau 5**. Les autres candidats n'ont pu être obtenus sous une forme protéique purifiée que tardivement, du fait de la complexité du travail avec des protéines, ils n'ont donc pas pu encore être testés. Les ScCRP15.2 et 9.2 n'ont présenté aucune attraction, dont des exemples de *bead assay* sont représentés dans la **Figure 12**. En revanche, avec la ScCRP5.1, 3/24 tubes polliniques ont été attirés à une concentration de 40 nM. Un exemple de *bead assay* ayant démontré une attraction avec ce candidat est présenté dans la **Figure 13**.

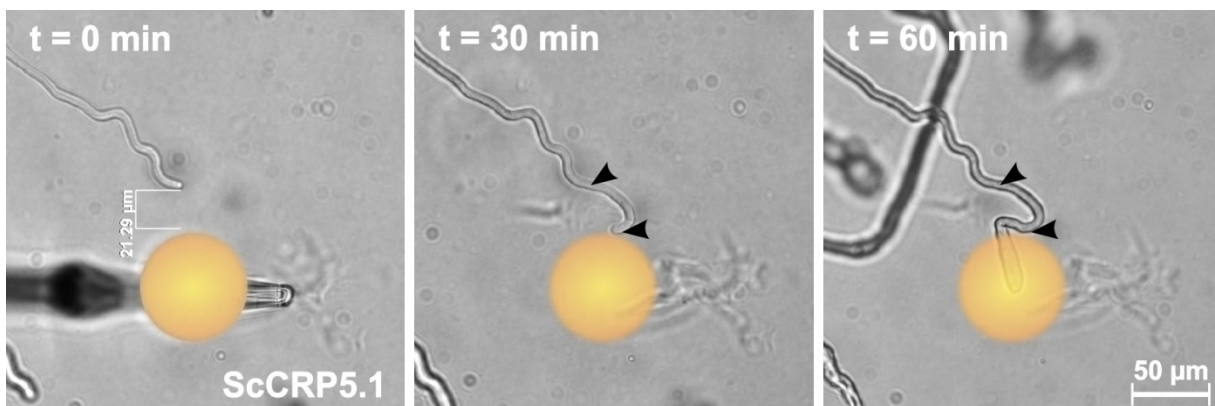


Figure 13. Test de guidage du candidats ScCRP5.1 par la méthode du *bead assay*. A $t=0$, une bille de gélatine est placée à proximité d'un tube pollinique. Une vidéo en accéléré (*time-lapse*) est lancée pendant 60 minutes avec une photographie toute les 5 minutes. L'emplacement des tubes polliniques à $t=0$, $t=30$ et $t=60$ minutes est évalué. Les cercles pleins jaunes correspondent à l'emplacement d'une bille de gélatine contenant 40 nM de candidat protéique. Grossissement 200 X, fond clair (*brightfield*), Axio Observer.Z1. Les flèches noires correspondant à l'emplacement de l'extrémité du tube pollinique 30 minutes avant la prise d'image.

Une attraction de 3/24 (soit 12,5 %) est faible relativement à l'attraction par des LURE purifiées, atteignant un maximum de près de 100 % pour l'AtLURE1.2 à 50 μM (**Figure 5**), mais est cependant un résultat encourageant. Le pourcentage d'attraction des tubes polliniques peut être, comme vu précédemment, influencé par les concentrations protéiques utilisées

(**Figure 11**). Il peut également être affecté par la capacité du tube pollinique à répondre à ce signal (voir **1.5.1. La capacitation du tube pollinique par les tissus sporophytiques femelles** et **4.2.1. Optimisation du système de *bead assay***), donc par la composition du milieu de croissance et le temps d'élongation des tubes polliniques sur ce dernier.

Si le ScCRP5.1 est un attractant micropylaire, une optimisation de ces deux paramètres pourrait donc permettre d'obtenir une plus forte réponse des tubes polliniques à cette protéine. Il serait important d'effectuer de nouveaux tests de guidage avec la ScCRP5.1 en faisant varier les temps des croissances des tubes polliniques sur le milieu de croissance entre leur sortie du style et le *bead assay*, les concentrations protéiques, et éventuellement la composition du milieu de croissance. Ce candidat est particulièrement intéressant, puisqu'il s'agit d'une DEFL, comme les AtLURE et les TfURE. Il répond par ailleurs aux critères 1' et 2', soit une surexpression à l'anthèse par rapport aux ovules 2DBA et *frk1*, et une surexpression dans l'ovule par rapport à la feuille.

Les tests de guidage des autres candidats sont à effectuer.

4 Discussion

4.1 Les limites des tests de guidage - les risques de faux négatifs

A ce jour, aucun attractant gamétophytiques n'a été identifié chez *S. chacoense*. Bien que des tests de guidage aient été faits sur plusieurs candidats, de nombreux restent néanmoins à faire. Il existe des limitations au système développé permettant ces tests de guidage. Ce système se base sur un clonage et une expression des candidats dans un système bactérien, sur une purification souvent en condition dénaturante, puis sur le test de guidage du *bead assay*. Les étapes d'expression et de purification pourraient mener à la production de candidats protéiques non fonctionnels. Des tests de guidage avec de telles protéines pourraient engendrer des faux négatifs (FN). Dans nos expériences, des FN seraient des candidats ne démontrant pas de capacité d'attraction alors qu'*in vivo* ils agissent en tant qu'attractant, ce qui empêche de conclure sur la non-attractivité des candidats testés. D'autres systèmes de production protéiques, et des contrôles pendant le *bead assay*, sont proposés ici afin de limiter les risques de FN.

4.1.1 La production de protéines dans leur conformation native

Comme nous l'avons vu, la formation des ponts disulfures entre les cystéines est déterminante pour la fonctionnalité des AtLURE. En effet, la perte d'une cystéine chez AtCRP810_1.5 la rend non fonctionnelle. Dans ce projet, lors des inductions protéiques à l'IPTG dans un système bactérien des candidats, une grande proportion des protéines induites se trouve dans des corps d'inclusion et sont insolubles. La purification des protéines insolubles se fait sous des conditions dénaturantes, ici en utilisant de l'urée. L'urée dénature les protéines en provoquant la réduction des ponts disulfures. Pendant la renaturation sur colonne, alors que la concentration en urée diminue progressivement, ces ponts disulfures peuvent progressivement se reformer. Enfin, la dialyse de 3 jours, diluant le β -mercaptoethanol, permet de finaliser une lente reformation des ponts disulfure. Malgré ces précautions, il existe un risque que les ponts disulfures ne se reforment pas correctement, et que la conformation tridimensionnelle de la protéine purifiée soit différente de celle de la protéine native *in vivo*.

Le protocole de renaturation des protéines utilisées est adapté de celui utilisé dans la production des LURE déjà identifiés (Okuda et al., 2009). Ce protocole pourrait cependant ne pas être adapté au repliement des CRP de *S. chacoense*.

Un mauvais repliement pourrait affecter l'activité de la protéine pendant les tests de guidage, produisant des FN. Une solution serait de travailler avec des protéines solubles. En effet, la purification de protéines solubles se faisant en conditions natives, les ponts disulfures ne sont à aucune étape réduits. Les tests de guidage pourraient alors se faire avec des protéines dans leurs conformations natives.

Des protéines solubles peuvent être obtenues de différentes façons. L'expression protéique à plus faible température ralentit la synthèse protéique et la cinétique de repliement, ce qui limite les interactions hydrophobes impliquées dans l'agrégation des protéines. Une plus faible induction, en diminuant la concentration en IPTG ou le temps d'induction, limite la quantité de protéines induites, et donc le risque qu'elles s'agrègent. Dans ce projet, malgré les différentes conditions d'induction testées, la solubilité des protéines ne changeait pas.

Néanmoins, d'autres méthodes peuvent favoriser l'expression de protéines solubles. Certaines souches d'*E. coli* ont été spécifiquement conçues pour favoriser la production de protéines solubles. Par exemple, la formation des ponts disulfure et le repliement des protéines sont favorisées dans les souches Origami (NovagenTM) et SHuffle (NEBTM) (Lobstein et al., 2012). L'ajout de certaines étiquettes aux protéines à induire peut également favoriser leur solubilité. Les étiquettes GST ou MBP (*Maltose-binding protein*) sont connues pour améliorer la solubilité des protéines, notamment quand elles sont placées en N-terminal de la protéine (Costa, Almeida, Castro, & Domingues, 2014). L'intérêt d'exprimer une protéine recombinante avec une étiquette GST, notamment clonée à partir d'un vecteur PGEX, est la possibilité de la purifier par chromatographie d'affinité sur colonne GST-Trap FF (GE HealthcareTM) et de la cliver sur colonne. La co-expression de protéine avec des protéines chaperonnes permet également de favoriser leur solubilité. Ainsi, le repliement initial des protéines pourrait être assisté par des chaperonnes qui en s'associant aux zones hydrophobes des protéines en cours de repliement préviendrait leurs agrégations. L'induction à l'IPTG d'une pyruvate kinase cytosolique recombinante de *S. tuberosum* (6xHis-StPKc1) dans les souches BL21(DE3) DH5 α , RosettaTM (DE3) et HB101 entraîne une forte expression de protéines insolubles,

quelques soient les conditions. Cependant, l'induction de la 6xHis-StPKc1 dans une souche HB101 co-exprimant le complexe de protéines chaperonnes, GroES-GroEL, codé par le vecteur pGro7, permet d'augmenter nettement la proportion de protéines solubles (Auslender, Dorion, Dumont, & Rivoal, 2015).

Dans le cadre de l'expression des CRP candidats à l'attraction, nous pourrions tenter d'utiliser des souches d'expression favorable à la formation des ponts disulfures comme Origami ou SHuffle (NEBTM), ou tenter de les co-exprimer avec des protéines chaperonnes. Nous avons également vu que les candidats qui ne s'exprimaient pas dans pQLinkHD pouvaient s'exprimer dans le vecteur PGEX-4T-2 sous forme soluble (ScCRP23.1, ScCRP23.2 et ScCRP1.7). La solubilité de ces candidats a pu être favorisée par la présence d'une étiquette GST en N-terminal. Les candidats dont l'expression n'a pas réussi à être induite (ScCRP4.5, ScCRP6.2, ScCRP20.1 et ScCRP6.1) sont destinés à être clonés dans PGEX-4T-2.

4.1.2 Les modifications post-traductionnelles

Des modifications post-traductionnelles peuvent conférer à des protéines leur activité. La TTS, une glycoprotéine impliquée dans le guidage des tubes polliniques dans le style, doit être glycosylée pour être active (Cheung et al., 1995). L'activité de la SLG, impliquée dans la reconnaissance des grains de pollen de même haplotype dans les cas d'auto-incompatibilité, nécessite également d'être glycosylée (Luu et al., 1999). Chez *S. chacoense*, les glycoprotéines semblent également jouer un rôle dans le guidage à courte ou longue distance par les ovules. Les glycoprotéines des exsudats d'ovule à l'anthèse de *S. chacoense* ont été purifiées avec une colonne ConA. Des tests de guidage SIV ont été faits en comparant la réponse des tubes polliniques à des fractions enrichies ou non en glycoprotéines. La fraction non enrichie correspond aux protéines totales de l'exsudat d'ovules à l'anthèse. La fraction enrichie attire 68 % des tubes polliniques alors que celle non-enrichie n'en attire que 50 % (Liu, 2016). Au vu de ces résultats, il semblerait que des glycoprotéines sécrétées par l'ovule sont impliquées dans un guidage à courte ou longue distance. Bien qu'aucun des attractants micropylaires identifiés, soit ZmEA1 (Márton et al., 2005), les TflLURE (Okuda et al., 2009) et les AtLURE (Takeuchi & Higashiyama, 2012) ne soit glycosylé, l'activité des attractants micropylaires dans d'autres systèmes pourrait dépendre de cette modification post-traductionnelle. Les

attractants micropylaires de *S. chacoense* pourrait avoir besoin de N- ou de O-glycosylation pour être actifs. Cependant, le système d'expression bactérien utilisé dans ce projet ne permet pas d'apporter des modifications post-traductionnelles aux protéines induites.

4.1.3 Deux systèmes d'expression sous conformation native permettant les modifications post-traductionnelles

Deux systèmes d'expression protéiques pourraient à la fois permettre une production directe de protéines recombinantes sous une conformation tridimensionnelle native, et y apporter des modifications post-traductionnelles : les levures et les cellules végétales.

4.1.3.1 L'expression dans des levures

Les levures possèdent une machinerie cellulaire complexe permettant des modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation, la formation de ponts disulfures, et la sécrétion de protéines. Plusieurs systèmes d'expression protéique dans des levures sont utilisés, notamment dans les levures *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Yarrowia*, et plus couramment encore dans *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Ces systèmes d'expression se basent sur l'intégration dans un chromosome de l'hôte d'un vecteur porteur de la séquence codante d'un candidat d'intérêt. La construction de ce vecteur, constitué d'un promoteur constitutif ou inductible, d'un terminateur et d'un marqueur de sélection peut se faire dans un système bactérien, avec *E. coli* par exemple. Ces systèmes, notamment dans *P. pastoris*, permettent l'expression et la sécrétion de protéines d'intérêt, en les associant avec des protéines possédant des signaux de sécrétion (Ahmad, Hirz, Pichler, & Schwab, 2014). Une sécrétion directe de ces protéines recombinantes, donc sous une conformation native dans le milieu, permettrait d'éviter les étapes de purification ce qui favoriserait la production de protéines fonctionnelles.

L'utilisation du kit d'expression PichiaPink™ (Life Technologie), basée sur ce principe, pourrait permettre l'expression et la sécrétion des CRP candidats à l'attraction dont l'activité pourrait dépendre d'une glycosylation, sans avoir besoin de les purifier.

4.1.3.2 L'expression dans des cellules végétales

L'expression et la sécrétion de protéines sous une conformation native peut également se faire dans un second système : les cellules végétales transformées. Une cellule transformée ayant intégrée la séquence d'un candidat possédant un signal de sécrétion, sous le contrôle d'un promoteur constitutif, 35S par exemple, pourrait permettre la sécrétion sous une conformation native de protéines d'intérêt. La sécrétion directe de protéine d'intérêt permettrait également d'éviter les étapes de purification. Dans le cadre de notre étude, les cellules végétales utilisées pourraient être celle de *S. tuberosum*, dont la transformation par agro-infection a été optimisée (Visser, Jacobsen, Witholt, & Feenstra, 1989). Dans les cellules de *S. tuberosum*, les protéines candidates pourraient être soumises à des modifications post-traductionnelles, les rendant potentiellement actives. Cette méthode a été essayée dans le cadre de ce projet, cependant sans succès, l'étape limitante étant la transformation de *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*), l'agent infectieux considéré. Les constructions de candidat dans les vecteurs binaires PGWB8 ont été obtenues sans difficulté. Cependant, la transformation de ces vecteurs PGWB8:candidat dans des *A. rhizogenes* par choc thermique n'a pas fonctionné. Cette méthode d'expression de candidat pourrait cependant être de nouveau essayée, en changeant le protocole de transformation des *A. rhizogenes*. En effet, il semblerait que la transformation d'*A. rhizogenes* par électroporation présente un meilleur rendement que celle par choc thermique.

4.2 D'autres systèmes pour tester le guidage courte ou longue distance

4.2.1 Optimisation du système de *bead assay*

La pertinence des tests de guidage dépend de la capacité des tubes polliniques à percevoir les signaux d'attraction. Chez *T. foeneri*, cette capacité à percevoir les signaux dépend non seulement de la longueur du style traversée, mais également de la durée de la période entre la pollinisation et les tests de guidage. En effet, à 6 HAP, les tubes polliniques ne sont jamais capables de répondre aux signaux d'attraction des TflLURE1, ni leurs récepteurs à s'y associer. Cependant, à 12 HAP, les TflLURE peuvent s'associer à leurs récepteurs et le tube

pollinique se réoriente (Okuda et al., 2013). En faisant des tests de guidage avec des ovules à l'anthèse et/ou des exsudats d'ovule à différentes HAP, nous pourrions estimer dans quelles conditions les tubes polliniques sont les plus aptes à percevoir les signaux. Ces contrôles positifs ne sont cependant pas optimaux. La récupération d'exsudat se fait hors du pistil à partir d'ovaires déparicarpés, ces derniers sont donc blessés et soumis à des conditions de stress. La sécrétion d'attractants micropylaires pourrait donc en être affectée. Par ailleurs, les attractants micropylaires ne sont qu'une fraction des protéines contenues dans cet exsudat. Cela pourrait expliquer le pourcentage d'attraction du tube pollinique plus faible lors de contrôles positifs, soit 43 %, relativement à une LURE purifiée (**Figure 11**).

Cette optimisation permettrait de déterminer à quel moment les tubes polliniques seraient les plus sensibles à des tests de guidage en *bead assay*.

Par ailleurs, le pH du milieu de croissance a été stabilisé par l'ajout d'un PBS. Le pH du milieu semblant favoriser la croissance des tubes polliniques est de 7,0. À des pH plus acide, l'apex des tubes polliniques explose précocement. Le pH intracellulaire observé de la zone d'élongation des tubes polliniques est en moyenne de 7,11 d'après l'étude conduite par (Fricker, White, & Obermeyer, 1997). D'après (Fricker, White, & Obermeyer, 1997), un pH extérieur plus acide (pH 4,5) se traduit par une faible acidification du pH cytoplasmique de l'ordre de 0,18 pH, alors qu'une alcalinisation du milieu externe (pH > 7,0) a pour conséquence une sérieuse augmentation du pH cytoplasmique qui se traduit par un arrêt immédiat de la croissance. Une acidification du pH cytosplasmique, bien que faible, pourrait également mener à une explosion précoce de l'apex. Un pH intra et extracellulaire peu différent pourrait favoriser la croissance des tubes polliniques *in vitro*.

4.2.2 Le développement de nouveaux tests de guidage

La méthode pour estimer les capacités d'attractions de candidats protéiques par *bead assay* présente divers problèmes. L'expérimentateur doit placer, à l'aide d'un micromanipulateur, des billes de gélatine, l'une après l'autre, chaque bille correspondant à un tube pollinique. Généralement, un test de *bead assay* permet d'évaluer la réponse de l'ordre de 5 à 9 tubes polliniques, puisque sur le nombre testé, généralement une quinzaine, un certain nombre de tubes polliniques ne sont plus en croissance. Par ailleurs, le micromanipulateur

étant nécessaire, seuls les tubes polliniques d'un système (**Figure 6A**) peuvent être testés à la fois. Afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs, au moins 30 tubes polliniques doivent être testés par candidat. L'obtention de résultats peut donc être longue et fastidieuse

D'autres méthodes permettant de vérifier la réponse cellulaire des tubes polliniques à la présence d'attractants pourraient être mise en place. Lors de tests de guidage, la comptabilisation des tubes polliniques répondant à l'attraction est difficile : à partir de quel angle de réorientation peut-on considérer qu'un tube pollinique répond à un phénomène d'attraction? La réorientation des tubes polliniques est contrôlée par un gradient d'attractant diffusant dans le milieu *in vitro* de façon radiale, rendant difficile l'évaluation de la concentration en candidat protéique au niveau du tube pollinique. Un nouveau dispositif a été développé, offrant un système à deux choix aux tubes polliniques et permettant un contrôle plus précis de la diffusion de protéine, qui peut s'utiliser sans micromanipulateur et limite les risques de FP : la puce de microfluidique à micro-canaux (Horade, Kanaoka, Kuzuya, Higashiyama, & Kaji, 2013). Cette puce, en PMDS (polydimethylsiloxane) bio-compatible, est un dispositif creux de la forme désirée, dépendamment du type de test de guidage, dans lequel on coule un milieu de croissance adapté (**Figure 14**). L'extrémité d'un style pollinisé est posée sur ce milieu dans une cavité de la puce. Dans la conception d'origine de la puce, cette cavité débouche sur un canal perpendiculaire au style au bout duquel deux autres cavités sont creusés : les réservoirs. Pour des tests de guidage à longue distance, on peut par exemple pipeter un candidat à l'attraction dans un réservoir, et un tampon contrôle dans l'autre (**Figure 14.A.**). Le faisceau de tube pollinique croit de façon guidé par la barrière physique de la puce jusqu'au canal, et alors deux choix s'offrent aux tubes. En absence d'attraction, les tubes polliniques se dirigent aléatoirement vers un réservoir ou l'autre. Cependant, si la protéine testée a un effet d'attraction, la proportion de tubes polliniques se dirigeant vers le réservoir la diffusant augmente. Les barrières physique guidant ces tubes permet également de modéliser la diffusion de protéine dans le milieu en fonction de leur poids moléculaire, donner une idée plus précise de leur concentration aux abords des tubes.

Dans le cadre de l'identification d'attractant micropylaire chez *S. chacoense*, un dispositif s'inspirant de ces puces peut être utilisé. Pour des tests de guidage à courte distance, nous pourrions utiliser des puces avec une cavité débouchant sur des canaux de la taille d'un

tube pollinique, ce qui limiterait ses oscillations et par là même les risques de FP, qui débouche à son tour sur un système à deux choix constitués de deux réservoirs (**Figure 14.B.**). Ce dispositif pourrait à l'avenir remplacer les *bead assay*, puisqu'en se départissant de l'utilisation d'un micromanipulateur, plus de tubes polliniques pourraient être testé à la fois, d'une façon plus contrôlé et en limitant les risques de FP. Par ailleurs, nous aurions un meilleur contrôle de la concentration de candidats protéiques testés.

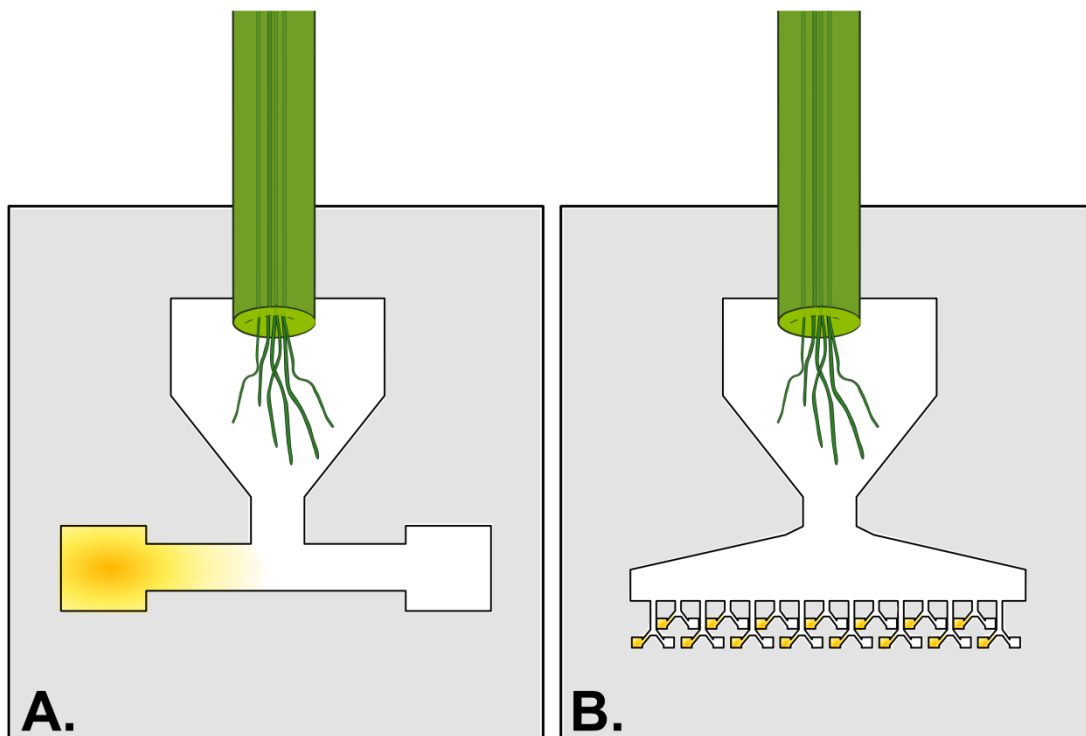


Figure 14. Schéma de dispositif microfluidistique à micro-canaux inspiré de (Horade et al., 2013). A. Dispositif à deux choix permettant des tests de guidage longue distance. B. Dispositif permettant des tests de guidage courte distance sur des tubes polliniques pris individuellement. En jaune, le gradient de diffusion d'une protéine candidate à l'attraction.

4.3 A la recherche de nouveaux candidats à l'attraction

Plusieurs candidats à l'attraction micropylaire n'ont pas encore pu être testés. Si aucun résultat concluant n'est observé une fois que l'ensemble des candidats sélectionnés aura été

testé, de nouveaux candidats vont devoir être déterminés. Ces nouveaux candidats peuvent être sélectionnés à partir des bases de données déjà existantes, de DGE des CRP par exemple, ou en formulant de nouvelles hypothèses sur les attractants micropylaires de solanacées tubéreuses.

4.3.1 Les nouveaux candidats issus de l'étude du transcriptome

Dans un premier temps, des ScCRP identifiées récemment dans le transcriptome de l'ovule à l'anthèse de *S. chacoense* pourraient être des candidats intéressants. Ainsi, 11 CRP non encore sélectionnées répondent aux critères 1" et 2".

Les ScCRP14.1, ScCRP30.1, ScCRP48.1 et ScCRP49.1 répondent au critère 2" : elles sont toutes fortement enrichies dans l'ovule par rapport aux feuille (respectivement, FC(Feuille/Anthèse)=-8712; -7207; -6220; -7662).

Les ScCRP18.1, ScCRP20.1, ScCRP22.1, ScCRP33.1, ScCRP43.1, ScCRP44.1 et ScCRP51.1 répondent quant à eux au critère 1" : elles sont enrichies dans les ovules à l'anthèse par rapport aux ovules *frk1* et 2DBA. Ces ScCRP n'ayant été identifiées que récemment, des études complémentaires pour déterminer leur sous-famille de CRP, en rapport avec leur patron de cystéine, seraient à faire.

4.3.2 Une nouvelle méthode pour l'identification d'attractants gamétophytiques chez *S. chacoense*

Une nouvelle hypothèse pourrait mener à l'identification de candidats intéressants. Deux stratégies différentes ont mené à l'identification des LURE chez *Arabidopsis* et *Torenia*. La stratégie d'identification chez *Arabidopsis* se base sur l'hypothèse suivante. Lors d'une pollinisation interspécifique entre *A. thaliana* et *A. lyrata*, l'attraction gamétophytique des tubes polliniques se fait d'une façon espèce-spécifique. Soit les mécanismes permettant une attraction micropylaire sont différents, ce qui est peu probable en raison de la proximité phylogénétique entre les deux espèces considérées, soit les attractants d'une espèce ne sont pas reconnus par les récepteurs du tube pollinique de l'autre espèce.

Les gènes codant pour les couples de récepteurs et de ligands pourraient avoir divergé de façon conjointe, après la séparation d'*A. thaliana* et *A. lyrata*, ce qui se traduirait par un défaut de communication. En effet, la co-évolution rapide d'acteurs mâles et femelles impliqués dans la reproduction a en effet été suggérée comme pouvant être à l'origine de la mise en place de barrière à l'hybridation (Swanson & Vacquier, 2002). Même dans le cas d'évènement de spéciation relativement récent, les gènes codants pour ces acteurs pourraient avoir suffisamment divergé pour que les protéines codées ne soient plus compatibles.

La divergence d'un attractant présent chez son ancêtre commun, après un événement de spéciation, suivie d'événements de duplication formant une famille d'attractant, ici fonctionnellement redondante, aurait conféré à cette étape de la communication pollen-pistil une spécificité à l'espèce. Les événements de duplication se déroulant après l'évènement de spéciation, les membres de cette famille chez *A. thaliana* seraient donc phylogénétiquement plus proches de leurs paralogues que de leurs orthologues chez *A. lyrata*. Un seul groupe de paralogues parmi les 317 DEFL d'*A. thaliana*, les CRP810, répond à ces caractéristiques (voir **Figure 15**) (Takeuchi & Higashiyama, 2012). Cette hypothèse de départ se vérifie, puisque les AtLURE font partie des CRP810.

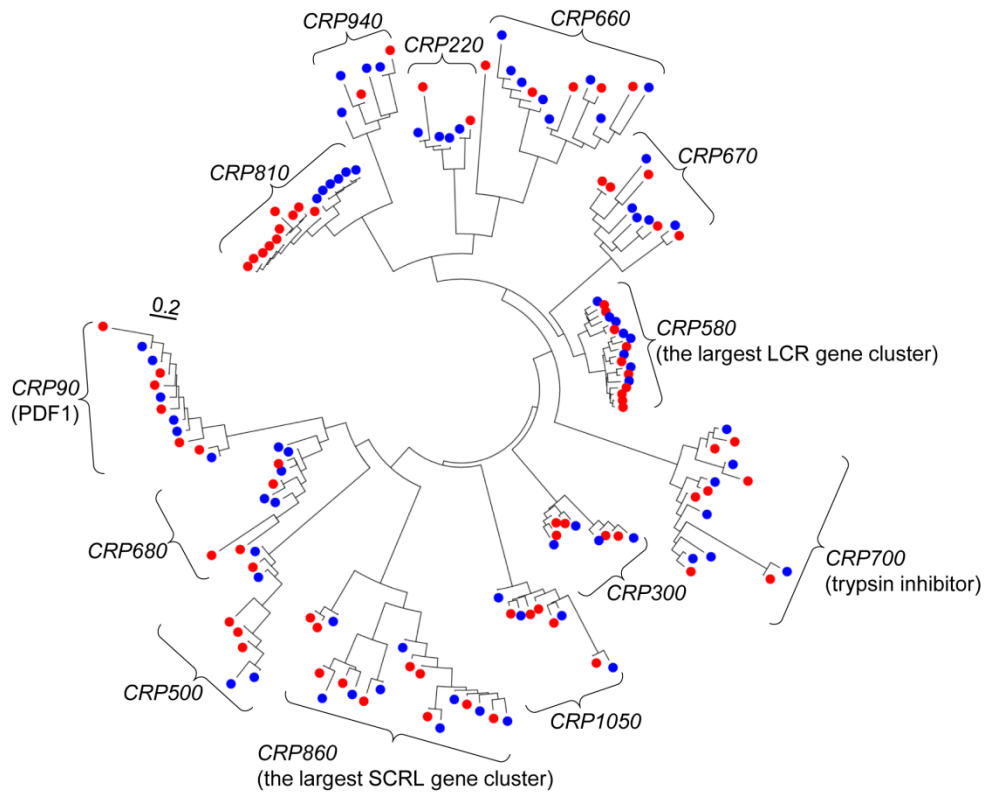


Figure 15. Arbre phylogénétique des DEFL paralogues d'*A. thaliana* et d'*A. lyrata*. Les DEFL d'*A. thaliana* sont représentés en rouge et celles d'*A. lyrata* en bleu). Traduit à partir de (Takeuchi & Higashiyama, 2012).

Un phénomène de préférence à l'espèce a été également observé chez les Solanacées tubéreuses. Nous pourrions supposer que les attractants micropylaires des Solanacées tubéreuses s'organise également en familles issues d'évènement de duplication d'un attractant unique ayant divergé après la mise en place de barrière à l'hybridation entre ces espèces.

A partir du séquençage HiSeq effectué en 2010, les transcriptomes des ovules à l'anthèse de deux autres solanacées tubéreuses ont été assemblés, ceux de *S. gandarillasii* et *S. tarijense*. Nous pourrions mener une étude similaire que celle effectuée chez *Arabidopsis*, en établissant un arbre phylogénétique des CRP, ou des DEFL de *S. gandarillasii*, *S. tarijense* et *S. chacoense*. Si une famille de CRP présente des caractéristiques similaires au CRP810, alors ses membres pourraient être des candidats intéressants à l'attraction gamétophytique.

4.4 Une régulation par le stade développemental d'une attraction longue ou courte distance?

L'identification des candidats à l'attraction repose sur l'hypothèse selon laquelle l'émission d'attractants micropylaires est régulée par le stade de développement de l'ovule, et ne serait effective qu'au stage FG7, soit à l'anthèse. Cette régulation de la production d'attractant gamétophytique en fonction du stade développemental s'expliquerait pour des raisons d'économies énergétiques de l'ovule. Avant le stade FG7, les fleurs de *S. chacoense* étant fermées, elles sont inaccessibles à la pollinisation. La sécrétion d'attractants se ferait en parallèle avec l'ouverture de la fleur.

Les expériences menant à cette hypothèse, démontrent que les ovules *frk1*, bloqués au stade FG1, et 2DBA, au stage FG6, attirent moins les tubes polliniques que des ovules à l'anthèse. Ces expériences ont été conduites lors de tests de guidage à longue à distance (Lafleur, 2009; Lafleur et al., 2015). Dans des tests de guidage longue distance, un amas d'ovules est placé à environ $\sim 500 \mu\text{M}$ de l'extrémité du style (**Figure 5**). On observe ensuite la répartition des tubes polliniques pour déterminer s'ils sont attirés ou non par l'amas d'ovules. Ces expériences ont démontré l'existence d'une régulation de l'attraction des tubes polliniques en fonction du stade de développement des ovules, et donc de la sécrétion d'attractant.

Cependant, ces attractants jouent-ils un rôle dans un guidage à longue ou à courte distance, similaire à un guidage micropylaire *in vivo*? Une influence sur le guidage à longue distance par ovules *frk1* et 2DBA a été démontrée, mais qu'en est-il du guidage micropylaire. Ces tests de guidage peuvent-ils démontrer un défaut dans une attraction à courte distance? L'identification du type de guidage impliqué, selon qu'il soit de courte ou de longue distance, est nécessaire afin de s'assurer que des tests par *bead assay* sont adaptés pour démontrer les capacités d'attraction des candidats.

Le guidage micropylaire est effectivement affecté chez les ovules *frk1*, puisque les tubes polliniques ne peuvent atteindre et pénétrer le micropyle bien qu'ils aient atteint le funicule (Lafleur, 2009). Il faudrait cependant vérifier si le guidage micropylaire est affecté pour des ovules au stade FG6, soit à 2DBA. Pour vérifier cela, deux méthodes pourraient être adoptées. Dans un premier temps, nous pourrions comptabiliser le nombre de tubes polliniques

parvenant à atteindre le micropyle d'ovule 2DBA dans un système SIV, et comparer cette proportion au nombre de tubes atteignant des ovules à l'anthèse. Dans un second temps, nous pourrions collecter de l'exsudat d'ovule 2DBA, selon un protocole similaire à celui utilisé pour l'identification du sécrétome des ovules de *S. chacoense* (Liu et al., 2015). La capacité d'attraction de cet exsudat, placé dans une microbille de gélatine, serait testée dans un système de *bead assay*. Le pourcentage de tubes polliniques attirés serait alors comptabilisé. Si une différence significative entre les pourcentages d'attraction à 2DBA et ceux à l'anthèse était observée, nous pourrions conclure que les derniers stades de développement de l'ovule affectent bien le guidage micropylaire, et non un guidage longue distance.

Bien que cette vérification n'a pas encore été effectuée, l'étude de différents mutants mène à considérer que les derniers stades de développement de l'ovule affecte bien le guidage micropylaire. Trois événements majeurs se déroulent entre les stades FG6 et FG7, les noyaux polaires fusionnent, les cellules antipodales dégénèrent et l'appareil filiforme devient mature (Christensen et al., 1997). Chez les mutants *maa*, les noyaux polaires ne fusionnent pas. Chez ces mutants, des tubes polliniques WT parviennent à sortir de l'espace intercellulaire du tissu de transmission, à atteindre le funicule, mais ils ne parviennent pas à atteindre le micropyle (Shimizu & Okada, 2000). La fusion des noyaux polaires serait donc nécessaire à l'expression/sécrétion d'attractants micropylaire.

Cependant, si le guidage micropylaire n'est pas affecté avec des ovules 2DBA, un autre système pour tester la capacité des candidats à attirer les tubes polliniques à longue distance devrait être développé. En effet, un phénomène d'attraction à longue distance pourrait ne pas être évalué dans un système de *bead assay*, conçu spécifiquement pour des tests de guidage à courte distance.

4.5 Hypothèse sur une seconde barrière à l'hybridation chez les Solanacées tubéreuses

Comme expliqué dans l'introduction, une préférence à l'espèce existe au niveau de l'attraction du tube pollinique par l'ovule chez les solanacées tubéreuses. Nous avons supposé que cette préférence à l'espèce est liée à une divergence des attractants gamétophytique que

nous avons essayé ici de caractériser. Comme proposé plus tôt, la divergence des CRP identifiées dans le transcriptome de *S. chacoense*, *S. gandarillasii* et *S. tarijense* (séquençage Illumina HiSeq effectué en 2010) pourrait ainsi être un critère additionnel lors de la sélection de nouveaux candidats. Cependant, une autre hypothèse pourrait expliquer une préférence à l'espèce dans les pollinisations interspécifiques chez les Solanacées tubéreuses.

La capacitation du tube pollinique, c'est à dire son acquisition de la capacité à percevoir les signaux d'attraction gamétophytique, pourrait être affectée lors de la croissance du tube pollinique dans un style d'une autre espèce. Un défaut de communication entre le style et le tube pollinique limiterait l'acquisition par ce dernier de récepteurs aux attractants gamétophytiques. Des études en cours chez les Solanacées tubéreuses précédemment évoquées semblent démontrer que la croissance des tubes polliniques dans un style hétérosécifique affecte leur vitesse d'élongation (données non publiées).

Des résultats similaires ont été observés chez deux Orchaceae, *Orchis italica* et *Orchis anthropophora*. Après une pollinisation, la vitesse de croissance des tubes polliniques, selon qu'ils soient consécifiques ou hétérosécifiques diffère. A 16 HAP, ils sont respectivement de 4 à 6 mm et 1 à 2 mm de long. A 24 HAP, les tubes polliniques consécifiques ont atteint l'ovaire alors que ceux hétérosécifiques font 4 à 6 mm de long, et n'atteignent l'ovaire qu'entre 36 et 48 HAP (Luca, Palermo, Bellusci, & Pellegrino, 2015). Une croissance plus rapide du pollen consécifique permettrait de le rendre plus compétitif et de maximiser ses chances de féconder les ovules avant du pollen hétérosécifique, limitant le nombre de graines hybrides. Cette vitesse de croissance moindre lors d'une pollinisation hétérosécifique pourrait être couplée et/ou s'expliquer par un défaut de capacitation, qui affecterait la sensibilité des tubes polliniques aux attractants gamétophytiques. L'étude de la sensibilité à l'attraction de tubes polliniques ayant crû dans un style hétérosécifique permettrait de confirmer ou d'infirmier cette hypothèse.

Un défaut de capacitation dans le style suivi d'une perte d'affinité entre attractants gamétophytiques et récepteurs du tube pollinique lors de pollinisations interspécifiques pourrait expliquer le faible nombre d'hybrides observés dans la nature.

5 Conclusion

Au cours de ce projet de maîtrise, 20 candidats à l'attraction gamétophytique chez *S. chacoense* ont été sélectionnés à partir d'études précédentes sur les ScCRP (Liu et al., 2015) (Joly V., Liu Y., Sabar M., et Matton D.P., non publié). Ces candidats, clonés dans des systèmes bactériens, exprimés puis purifiés avec succès, ont été testés dans un système de *bead assay* afin d'évaluer leur capacité à attirer les tubes polliniques. Parmi ces 20 candidats, la capacité d'attraction de 3 d'entre eux a pu être évaluée, sans résultats concluants, et les tests de guidage des autres candidats sont en cours.

De nombreux candidats à l'attraction micropylaire chez *Solanum chacoense* sont à ce jour encore à tester. De nouvelles hypothèses pour l'identification de nouveaux candidats à l'attraction, des systèmes d'expressions favorisant un bon repliement des protéines et d'éventuelles modifications post-traductionnelle, et d'autres systèmes pour vérifier leur potentiel d'attraction sont autant de voies à explorer dans les années à venir qui mèneront à terme à l'identification des attractants micropylaires. Après des étapes de validation, en utilisant des ARN interférant par exemple, comme dans l'étude (Takeuchi & Higashiyama, 2012), les protéines attractantes pourraient alors prendre le qualificatif de **ScLURE**.

L'identification des ScLURE serait intéressante aussi bien sur le plan de la recherche fondamentale que de la recherche appliquée.

Dans un premiers temps, cela pourrait mener à la caractérisation des attractants micropylaires d'autres Solanacées tubéreuses par étude d'orthologie. Déterminer les attractants micropylaires, acteurs impliqués dans la mise en place de barrière à l'hybridation, d'un groupe d'espèces phylogénétiquement proches et pour certaines coexistant en sympatrie (Hijmans & Spooner, 2001), permettrait d'éclairer les mécanismes ayant mené à un semi-isolement reproductif entre ces espèces. L'identification des récepteurs polliniques aux LURE des Solanacées tubéreuses serait un atout pour ces études, et constituerait un projet intéressant à mener. Cela aiderait également à caractériser d'autres barrières à l'hybridation post-pollinisation pré-zygotique, comme lors de la capacitation des tubes polliniques par le style.

La transformation d'attractants (ZmEA1 dans *A. thaliana* (Márton et al., 2012)) ou de récepteurs (AtMDIS1 et AtPRK6 dans *C. rubella* (Takeuchi & Higashiyama, 2016; Wang et al., 2016)) d'une espèce dans une autre permet à des tubes polliniques d'être guidés jusqu'au micropyle dans des croisement interspécifiques alors que dans la nature, aucune attraction de la sorte n'est observée. Les barrières à l'hybridation peuvent être surmontées. En surmontant ces barrières, l'obtention d'individus hybrides réunissant des capacités agronomiques de leurs parents, normalement incapables d'être croisés, pourrait devenir possible. Cette perspective serait intéressante chez les Solanacées, puisque de nombreuses espèces ont des intérêts agronomiques notables, particulièrement *S. tuberosum*, la pomme de terre cultivée. La caractérisation des ScLURE faciliterait celle des StLURE (les attractants micropylaire de *S. tuberosum*), ce qui à terme pourrait permettre d'obtenir des nouvelles formes de pommes de terre comestibles.

6 Bibliographie

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
- Amici, G. B. (1830). Note sur la mode d'action du pollen sur le stigmate. *Ann. sci. nat*, 21(329.332).
- Amien, S., Kliwer, I., Márton, M. L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D., & Dresselhaus, T. (2010). Defensin-like ZmES4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1. *PLoS Biol*, 8(6), e1000388. doi: 10.1371/journal.pbio.1000388
- Auslender, E. L., Dorion, S., Dumont, S., & Rivoal, J. (2015). Expression, purification and characterization of *Solanum tuberosum* recombinant cytosolic pyruvate kinase. *Protein expression and purification*, 110, 7-13. doi: 10.1016/j.pep.2014.12.015
- Bedford, J. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*, 28(1), 108-120. doi: 10.1095/biolreprod28.1.108
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D. S., Nestorova, A., Franck, C. M., Thirugnanarajah, S., & Grossniklaus, U. (2013). ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol*, 11(11), e1001719. doi: 10.1371/journal.pbio.1001719
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brewbaker, J. L. (1967). The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *American journal of botany*, 1069-1083.
- Carter, A., & McNeilly, T. (1975). Effects of increased humidity on pollen tuber growth and seed set following self pollination in Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Euphytica*.

- Chen, Y.-H., Li, H.-J., Shi, D.-Q., Yuan, L., Liu, J., Sreenivasan, R., . . . Yang, W.-C. (2007). The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(11), 3563-3577. doi: 10.1105/tpc.107.053967
- Cheung, A. Y., Wang, H., & Wu, H.-m. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, 82(3), 383-393. doi: 10.1016/0092-8674(95)90427-1
- Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., & Matton, D. P. (2013). ScRALF3, a secreted RALF-like peptide involved in cell-cell communication between the sporophyte and the female gametophyte in a solanaceous species. *Plant J*, 73(6), 1019-1033. doi: 10.1111/tpj.12096
- Christensen, C. A., King, E. J., Jordan, J. R., & Drews, G. N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sexual Plant Reproduction*, 10(1), 49-64. doi: 10.1007/s004970050067
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. *Recombinant protein expression in microbial systems*, 24. doi: 10.3389/fmicb.2014.00063
- Cresti, M., Ciampolini, F., Mulcahy, D., & Mulcahy, G. (1985). Ultrastructure of Nicotiana glauca pollen, its germination and early tube formation. *American journal of botany*, 719-727.
- Dickinson, H. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sexual Plant Reproduction*, 8(1), 1-10. doi: 10.1007/BF00228756
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y. D., Robinson, D. G., & Jiang, L. (2012). Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci*, 17(10), 606-615. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.004
- Dixit, R., Rizzo, C., Nasrallah, M., & Nasrallah, J. (2001). The Brassica MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant molecular biology*, 45(1), 51-62. doi: 10.1023/A:1006428007826
- Dong, J., Kim, S. T., & Lord, E. M. (2005). Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(2), 778-789. doi: 10.1104/pp.105.063388

- Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S. J., Willis, A. C., Parkin, I. A., & Dickinson, H. G. (1998). PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *The Plant Cell*, *10*(8), 1333-1347. doi: 10.1105/tpc.10.8.1333
- Eady, C., Lindsey, K., & Twell, D. (1995). The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *The Plant Cell*, *7*(1), 65-74. doi: 10.1105/tpc.7.1.65
- Edlund, A. F., Swanson, R., & Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, *16*(suppl 1), S84-S97. doi: 10.1105/tpc.015800
- Elleman, C. J., & Dickinson, H. (1990). The role of the exine coating in pollen–stigma interactions in Brassica oleracea L. *New Phytologist*, *114*(3), 511-518. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00419.x
- Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., & Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science*, *317*(5838), 656-660. doi: 10.1126/science.1143562
- Fellenberg, C., & Vogt, T. (2015). Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends in plant science*, *20*(4), 212-218. doi: 10.1016/j.tplants.2015.01.011
- Franklin, F., Lawrence, M., & Franklin-Tong, V. (1995). Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *International Review of Cytology*, *158*, 1-64. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62485-7
- Fricke, M., White, N., & Obermeyer, G. (1997). pH gradients are not associated with tip growth in pollen tubes of Lilium longiflorum. *Journal of Cell Science*, *110*(15), 1729-1740.
- Friedman, W. E., & Gifford, E. M. (1997). Development of the male gametophyte of Ginkgo biloba: a window into the reproductive biology of early seed plants (*Ginkgo Biloba A Global Treasure* (p. 29-49): Springer.
- Fu, Y. (2015). The cytoskeleton in the pollen tube. *Current opinion in plant biology*, *28*, 111-119. doi: 10.1016/j.pbi.2015.10.004

- Furness, C. A., & Rudall, P. J. (2004). Pollen aperture evolution—a crucial factor for eudicot success? *Trends in plant science*, 9(3), 154-158. doi: 10.1016/j.tplants.2004.01.001
- Geitmann, A., & Palanivelu, R. (2007). Fertilization requires communication: signal generation and perception during pollen tube guidance. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(2), 77-89.
- Gherardini, G., & Healey, P. (1969). Dissolution of outer wall of pollen grain during pollination. doi: 10.1038/224718a0
- Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y., & Yang, Z. (2003). ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. *Journal of Experimental Botany*, 54(380), 93-101. doi: 10.1093/jxb/erg035
- Guan, Y., Lu, J., Xu, J., McClure, B., & Zhang, S. (2014). Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 165(2), 528-533. doi: 10.1104/pp.113.231274
- Hafidh, S., Fíla, J., & Honys, D. (2016). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant reproduction*, 1-21. doi: 10.1007/s00497-015-0272-4
- Hafidh, S., Potěšil, D., Fíla, J., Feciková, J., Čapková, V., Zdráhal, Z., & Honys, D. (2014). In search of ligands and receptors of the pollen tube: the missing link in pollen tube perception. *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 388-394. doi: 10.1042/BST20130204
- Hawkes, J. G., & Hjerting, J. P. (1969). *The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study*. Oxford Clarendon Press.
- Hawkes, J. G., & Hjerting, J. P. (1989). *The potatoes of Bolivia: their breeding value and evolutionary relationships*. Oxford Science Publications.
- Heslop-Harrison, Y., & Heslop-Harrison, J. (1992). Germination of monocolpate angiosperm pollen: evolution of the actin cytoskeleton and wall during hydration, activation and tube emergence. *Annals of Botany*, 69(5), 385-394. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088359
- Heslop-Harrison, Y., & Shivanna, K. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany*, 41(6), 1233-1258.

- Higashiyama, T. (2002). The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of plant research*, 115(2), 0149-0160. doi: 10.1007/s102650200020
- Higashiyama, T., & Hamamura, Y. (2008). Gametophytic pollen tube guidance. *Sexual Plant Reproduction*, 21(1), 17-26. doi: 10.1007/s00497-007-0064-6
- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., & Kuroiwa, T. (1998). Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. *The Plant Cell*, 10(12), 2019-2031. doi: 10.1105/tpc.10.12.2019
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S.-y., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science*, 293(5534), 1480-1483. doi: 10.1126/science.1062429
- Hijmans, R., Spooner, D., Salas, A., Guarino, A., & de La Cruz, J. (2002). *Atlas of wild potatoes. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 10 (I-IX)*.
- Hijmans, R. J., & Spooner, D. M. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, 88(11), 2101-2112.
- Horade, M., Kanaoka, M. M., Kuzuya, M., Higashiyama, T., & Kaji, N. (2013). A microfluidic device for quantitative analysis of chemoattraction in plants. *Rsc Advances*, 3(44), 22301-22307. doi: 10.1039/c3ra42804d
- Hülkamp, M., Kopczak, S. D., Horejsi, T. F., Kihl, B. K., & Pruitt, R. E. (1995). Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 8(5), 703-714. doi: 10.1046/j.1365-313X.1995.08050703.x
- Hülkamp, M., Schneitz, K., & Pruitt, R. E. (1995). Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 7(1), 57-64. doi: 10.1105/tpc.7.1.57
- Hunziker, A. T. (2001). *Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G.
- Iwanami, Y. (1959). *Physiological studies of pollen*. Yokohama Municipal University.
- Jan, V. V. S., Laublin, G., Birhman, R., & Cappadocia, M. (1996). Genetic analysis of leaf explant regenerability in *Solanum chacoense*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 47(1), 9-13. doi: 10.1007/BF02318960

- Janson, J. (1993). Placental pollination in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Science*, 90(1), 105-115. doi: 10.1016/0168-9452(93)90161-R
- Johnson, S. A., & McCormick, S. (2001). Pollen germinates precociously in the anthers of raring-to-go, an *Arabidopsis* gametophytic mutant. *Plant Physiology*, 126(2), 685-695. doi: 10.1104/pp.126.2.685
- Joly, V., & Matton, D. P. (2015). KAPPA, a simple algorithm for discovery and clustering of proteins defined by a key amino acid pattern: a case study of the cysteine-rich proteins. *Bioinformatics*, btv047. doi: 10.1093/bioinformatics/btv047
- Kanaoka, M. M., Kawano, N., Matsubara, Y., Susaki, D., Okuda, S., Sasaki, N., & Higashiyama, T. (2011). Identification and characterization of TcCRP1, a pollen tube attractant from *Torenia concolor*. *Annals of botany*, 108(4), 739-747. doi: 10.1093/aob/mcr111
- Kasahara, R. D., Portereiko, M. F., Sandaklie-Nikolova, L., Rabiger, D. S., & Drews, G. N. (2005). MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(11), 2981-2992. doi: 10.1105/tpc.105.034603
- Kessler, S. A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N. F., Wuest, S. E., Ingram, G., Panstruga, R., & Grossniklaus, U. (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science*, 330(6006), 968-971. doi: 10.1126/science.1195211
- Kim, S., Mollet, J.-C., Dong, J., Zhang, K., Park, S.-Y., & Lord, E. M. (2003). Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16125-16130. doi: 10.1073/pnas.2533800100
- Kohno, T., & Shimmen, T. (1987). Ca²⁺-induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma*, 141(2-3), 177-179. doi: 10.1007/BF01272900
- Kumar, M., & Kuppast, I. (2012). A Review on Gamma-aminobutyric Acid (GABA) and its receptors. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 3(3), 60-69.
- Lafleur, E. (2009). *Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes polliniques*. Repéré à https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/3617/Lafleur_Edith_2009_memoire.pdf

- Lafleur, E., Kapfer, C., Joly, V., Liu, Y., Tebbji, F., Daigle, C., . . . Matton, D. P. (2015). The FRK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) from *Solanum chacoense* is involved in embryo sac and pollen development. *Journal of experimental botany*, *66*(7), 1833-1843. doi: 10.1093/jxb/eru524
- Lalanne, E., & Twell, D. (2002). Genetic control of male germ unit organization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *129*(2), 865-875. doi: 10.1104/pp.003301
- Lantin, S., O' Brien, M., & 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*(3), 371-386. doi: 10.1023/A:1006375522626
- Lewis, D., & Crowe, L. K. (1958). Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity*, *12*, 233-256. doi: 10.1038/hdy.1958.26
- Li, D., Lin, M., Wang, Y., & Tian, H. (2009). Synergid: a key link in fertilization of angiosperms. *Biologia plantarum*, *53*(3), 401-407. doi: 10.1007/s10535-009-0078-z
- Li, H., Lin, Y., Heath, R. M., Zhu, M. X., & Yang, Z. (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *The Plant Cell*, *11*(9), 1731-1742. doi: 10.1105/tpc.11.9.1731
- Li, H., & Yang, W. (2016). RLKs orchestrate the signaling in plant male-female interaction. *Science China Life Sciences*, 1-11. doi: 0.1007/s11427-016-0118-x
- Lindner, H., Kessler, S. A., Müller, L. M., Shimosato-Asano, H., Boisson-Dernier, A., & Grossniklaus, U. (2015). TURAN and EVAN mediate pollen tube reception in *Arabidopsis* synergids through protein glycosylation. *PLoS Biol*, *13*(4), e1002139. doi: 10.1371/journal.pbio.1002139
- Liu, J., Zhong, S., Guo, X., Hao, L., Wei, X., Huang, Q., . . . Gu, H. (2013). Membrane-bound RLCKs LIP1 and LIP2 are essential male factors controlling male-female attraction in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *23*(11), 993-998. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.043
- Liu, Y. (2016). *The plant ovule omics: an integrative approach for pollen-pistil interactions and pollen tube guidance studies in solanaceous species*. (Université de Montréal). Repéré à <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/13589>

- Liu, Y., Joly, V., Dorion, S., Rivoal, J., & Matton, D. P. (2015). The plant ovule secretome: a different view toward pollen–pistil interactions. *Journal of proteome research*, *14*(11), 4763–4775. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00618
- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*, *11*(1), 1. doi: 10.1186/1475-2859-11-56
- Lolle, S. J., & Cheung, A. Y. (1993). Promiscuous germination and growth of wildtype pollen from Arabidopsis and related species on the shoot of the Arabidopsis mutant, fiddlehead. *Developmental biology*, *155*(1), 250–258. doi: 10.1006/dbio.1993.1022
- Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, M. A., Uozumi, N., Cheung, A., & Sze, H. (2011). Pollen tubes lacking a pair of K⁺ transporters fail to target ovules in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *23*(1), 81–93. doi: 10.1105/tpc.110.080499
- Luca, A., Palermo, A., Bellusci, F., & Pellegrino, G. (2015). Pollen competition between two sympatric Orchis species (Orchidaceae): the overtaking of conspecific of heterospecific pollen as a reproductive barrier. *Plant Biology*, *17*(1), 219–225. doi: 10.1111/plb.12199
- Lush, W. M., Grieser, F., & Wolters-Arts, M. (1998). Directional Guidance of Nicotiana glauca Pollen Tubes in Vitro and on the Stigma. *Plant Physiology*, *118*(3), 733–741. doi: 10.1104/pp.118.3.733
- Luu, D.-T., Marty-Mazars, D., Trick, M., Dumas, C., & Heizmann, P. (1999). Pollen–stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *The Plant Cell*, *11*(2), 251–262. doi: 10.1105/tpc.11.2.251
- Malho, R., Read, N. D., Trewavas, A. J., & Pais, M. S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *The Plant Cell*, *7*(8), 1173–1184. doi: 10.1105/tpc.7.8.1173
- Marshall, E., Costa, L. M., & Gutierrez-Marcos, J. (2011). Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell–cell communication in plant reproduction and development. *Journal of experimental botany*, *62*(5), 1677–1686. doi: 10.1093/jxb/err002

- Márton, M. L., Cordts, S., Broadhvest, J., & Dresselhaus, T. (2005). Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize. *Science*, *307*(5709), 573-576. doi: 10.1126/science.1104954
- Márton, M. L., Fastner, A., Uebler, S., & Dresselhaus, T. (2012). Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant ZmEA1 from Arabidopsis ovules. *Current Biology*, *22*(13), 1194-1198. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.061
- Maruyama, D., Hamamura, Y., Takeuchi, H., Susaki, D., Nishimaki, M., Kurihara, D., . . . Higashiyama, T. (2013). Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes. *Developmental cell*, *25*(3), 317-323. doi: 10.1016/j.devcel.2013.03.013.
- Maruyama, D., Völz, R., Takeuchi, H., Mori, T., Igawa, T., Kurihara, D., . . . Umeda, M. (2015). Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism. *Cell*, *161*(4), 907-918. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.018
- Mascarenhas, J. P., & Machlis, L. (1962). Chemotropic response of *Antirrhinum majus* pollen to calcium. *Plant Physiology*, *39*(1), 70-77. doi: 10.1104/pp.39.1.70
- McCormick, S. (1993). Male gametophyte development. *The Plant Cell*, *5*(10), 1265. doi: 10.1105/tpc.5.10.1265
- Mizukami, A. G., Inatsugi, R., Jiao, J., Kotake, T., Kuwata, K., Ootani, K., . . . Maruyama, D. (2016). The AMOR arabinogalactan sugar chain induces pollen-tube competency to respond to ovular guidance. *Current Biology*, *26*(8), 1091-1097. doi: 10.1016/j.cub.2016.02.040
- Murphy, E., & De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci*, *19*(10), 664-671. doi: 10.1016/j.tplants.2014.06.005
- Muschietti, J., Eyal, Y., & McCormick, S. (1998). Pollen tube localization implies a role in pollen–pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *The Plant Cell*, *10*(3), 319-330. doi: 10.1105/tpc.10.3.319
- Nasrallah, J., Kao, T.-H., Goldberg, M., & Nasrallah, M. (1985). A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature*, *318*, 263-267. doi: 10.1038/326523a0

- Nishida, H., Pigg, K. B., Kudo, K., & Rigby, J. F. (2004). Zooidogamy in the late Permian genus *Glossopteris*. *Journal of plant research*, *117*(4), 323-328. doi: 10.1007/s10265-004-0164-4
- Okuda, S., Suzuki, T., Kanaoka, M. M., Mori, H., Sasaki, N., & Higashiyama, T. (2013). Acquisition of LURE-binding activity at the pollen tube tip of *Torenia fournieri*. *Molecular plant*, *6*(4), 1074-1090. doi: 0.1093/mp/sst050
- Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., Yui, R., . . . Susaki, D. (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*, *458*(7236), 357-361. doi: 10.1038/nature07882
- Pacini, E. (1990). Tapetum and microspore function. Dans S. Blackmore & R. B. Knox (dir.), *Microspores Evolution and Ontogeny: Evolution and Ontogeny* (p. 213-237): Academic Press.
- Pacini, E. (1996). Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, *9*(6), 362-366. doi: 10.1007/BF02441957
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F., & Preuss, D. (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell*, *114*(1), 47-59. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00479-3
- Palanivelu, R., & Preuss, D. (2006). Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biology*, *6*(1), 1. doi: 10.1186/1471-2229-6-7
- Park, S.-Y., Jauh, G.-Y., Mollet, J.-C., Eckard, K. J., Nothnagel, E. A., Walling, L. L., & Lord, E. M. (2000). A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *The Plant Cell*, *12*(1), 151-163. doi: 10.1105/tpc.12.1.151
- Pereira, A. M., Nobre, M. S., Pinto, S. C., Lopes, A. L., Costa, M. L., Masiero, S., & Coimbra, S. (2016). “Love Is Strong, and You're so Sweet”: JAGGER Is Essential for Persistent Synergid Degeneration and Polytubey Block in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, *9*(4), 601-614. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.002
- Pierson, E. S., Miller, D. D., Callaham, D. A., Shipley, A. M., Rivers, B. A., Cresti, M., & Hepler, P. K. (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *The Plant Cell*, *6*(12), 1815-1828. doi: 10.1105/tpc.6.12.1815

- Poort, R. J., Visscher, H., & Dilcher, D. L. (1996). Zoidogamy in fossil gymnosperms The centenary of a concept, with special reference to prepollen of late Paleozoic conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11713-11717. doi: 10.1073/pnas.93.21.11713
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., & Davis, R. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes & development*, 7(6), 974-985. doi: 10.1101/gad.7.6.974
- Preuss, D., Rhee, S. Y., & Davis, R. W. (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information*, 264(5164), 1458-1459. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00183.x
- Punwani, J. A., Rabiger, D. S., Lloyd, A., & Drews, G. N. (2008). The MYB98 subcircuit of the synergid gene regulatory network includes genes directly and indirectly regulated by MYB98. *The Plant Journal*, 55(3), 406-414. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03514.x
- Qin, Y., Leydon, A. R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., . . . Palanivelu, R. (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet*, 5(8), e1000621. doi: 10.1371/journal.pgen.1000621
- Quilichini, T. D., Grienenberger, E., & Douglas, C. J. (2015). The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry*, 113, 170-182. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.05.002
- Rathore, K. S., Cork, R. J., & Robinson, K. R. (1991). A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Developmental biology*, 148(2), 612-619. doi: 10.1016/0012-1606(91)90278-B
- Ray, A., Lang, J. D., Golden, T., & Ray, S. (1996). SHORT INTEGUMENT (SIN1), a gene required for ovule development in Arabidopsis, also controls flowering time. *Development*, 122(9), 2631-2638.
- Roy, S. J., Holdaway-Clarke, T. L., Hackett, G. R., Kunkel, J. G., Lord, E. M., & Hepler, P. K. (1999). Uncoupling secretion and tip growth in lily pollen tubes: evidence for the role

- of calcium in exocytosis. *The Plant Journal*, 19(4), 379-386. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00515.x
- Russell, S., Strout, G., Stramski, A., Mislán, T., Thompson, R., & Schoemann, L. (1996). Microgametogenesis in *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae). 1. Descriptive Cytology and Three-Dimensional Organization. *American Journal of Botany*, 83, 1435-1453. doi: 10.2307/2446099
- Russell, S. D., & Jones, D. S. (2015). The male germline of angiosperms: repertoire of an inconspicuous but important cell lineage. *Frontiers in plant science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00173
- Samuel, M. A., Chong, Y. T., Haasen, K. E., Aldea-Brydges, M. G., Stone, S. L., & Goring, D. R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and Arabidopsis stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell*, 21(9), 2655-2671. doi: 10.1105/tpc.109.069740
- Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S46-S60. doi: 10.1105/tpc.017012
- Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimosato, H., Funato, M., Nakagawa, T., . . . Hinata, K. (2001). A Pollen Coat Protein, SP11/SCR, Determines the PollenS-Specificity in the Self-Incompatibility of Brassica Species. *Plant Physiology*, 125(4), 2095-2103. doi: 10.1104/pp.125.4.2095
- Shimizu, K. K., & Okada, K. (2000). Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance. *Development*, 127(20), 4511-4518. doi: 10.5167/uzh-71801
- Silverstein, K. A., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., & VandenBosch, K. A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*, 51(2), 262-280. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x
- Sogo, A., & Tobe, H. (2005). Intermittent pollen-tube growth in pistils of alders (*Alnus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8770-8775. doi: 10.1073/pnas.0503081102

- Spielman, M., & Scott, R. J. (2008). Polyspermy barriers in plants: from preventing to promoting fertilization. *Sexual Plant Reproduction*, 21(1), 53-65. doi: 10.1007/s00497-007-0063-7
- Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., & Dresselhaus, T. (2012). Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science*, 338(6110), 1093-1097. doi: 10.1126/science.1223944
- Stein, J. C., Dixit, R., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1996). SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of Brassica, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 8(3), 429-445. doi: 10.1105/tpc.8.3.429
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19), 8816-8820. doi: 10.1073/pnas.88.19.8816
- Steinhorst, L., & Kudla, J. (2013). Calcium-a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(7), 1573-1581. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.10.009
- Stephenson, A. G., Doughty, J., Dixon, S., Elleman, C., Hiscock, S., & Dickinson, H. G. (1997). The male determinant of self-incompatibility in Brassica oleracea is located in the pollen coating. *The Plant Journal*, 12(6), 1351-1359. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.12061351.xv
- Sundaresan, V., & Alandete-Saez, M. (2010). Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development*, 137(2), 179-189. doi: 10.1242/dev.030346
- Swanson, W. J., & Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 137-144. doi: 10.1038/nrg733
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Asano, K., Hara, M., Che, F.-S., . . . Isogai, A. (2000). Isolation and characterization of pollen coat proteins of Brassica campestris that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3765-3770. doi: 10.1073/pnas.040580797

- Takeuchi, H., & Higashiyama, T. (2012). A species-specific cluster of defensin-like genes encodes diffusible pollen tube attractants in Arabidopsis. *PLoS Biol*, *10*(12), e1001449. doi: 10.1371/journal.pbio.1001449
- Takeuchi, H., & Higashiyama, T. (2016). Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis. *Nature*, *531*(7593), 245-248. doi: 10.1038/nature17413
- Tang, W., Ezcurra, I., Muschiatti, J., & McCormick, S. (2002). A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *The Plant Cell*, *14*(9), 2277-2287. doi: 10.1105/tpc.003103
- Terasaka, O., & Niitsu, T. (1987). Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, *100*(2), 205-216. doi: 10.1007/BF02488324
- Twell, D., Park, S. K., & Lalanne, E. (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in plant science*, *3*(8), 305-310. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01277-1
- Uebler, S., Dresselhaus, T., & Márton, M. (2013). Species-specific interaction of EA1 with the maize pollen tube apex. *Plant signaling & behavior*, *8*(10), e25682. doi: 10.4161/psb.25682.
- Verhoeven, T., Feron, R., Wolters-Arts, M., Edqvist, J., Gerats, T., Derksen, J., & Mariani, C. (2005). STIG1 controls exudate secretion in the pistil of petunia and tobacco. *Plant Physiology*, *138*(1), 153-160. doi: 10.1104/pp.104.054809
- Visser, R., Jacobsen, E., Witholt, B., & Feenstra, W. (1989). Efficient transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics*, *78*(4), 594-600. doi: 10.1007/BF00290847
- Völz, R., Heydlauff, J., Ripper, D., von Lyncker, L., & Groß-Hardt, R. (2013). Ethylene signaling is required for synergid degeneration and the establishment of a pollen tube block. *Developmental cell*, *25*(3), 310-316. doi: 10.1016/j.devcel.2013.04.001.
- Wang, L., & Doughty, J. (2016, March 18-23, 2016). *A class of small cysteine-rich pollen coat proteins are important regulators of pollen hydration in Arabidopsis thaliana*" Communication présenté The 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction, Tucson, Arizona, USA. Repéré à

https://cals.arizona.edu/pr2016/sites/cals.arizona.edu.pr2016/files/styles/Pollen_Pistil_Interaction_Session_4_Abstracts_Final.pdf

- Wang, T., Liang, L., Xue, Y., Jia, P.-F., Chen, W., Zhang, M.-X., . . . Yang, W.-C. (2016). A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature*. doi: 10.1038/nature16975
- Wolters-Arts, M., Lush, W. M., & Mariani, C. (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature*, 392(6678), 818-821. doi: 10.1038/33929
- Wu, H.-m., Wang, H., & Cheung, A. Y. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell*, 82(3), 395-403. doi: 10.1016/0092-8674(95)90428-X
- Wu, H. m., Wong, E., Ogdahl, J., & Cheung, A. Y. (2000). A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *The Plant Journal*, 22(2), 165-176. doi: 10.1046/j.1365-3113x.2000.00731.x
- Yadegari, R., & Drews, G. N. (2004). Female gametophyte development. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S133-S141. doi: 10.1105/tpc.018192
- Zinkl, G. M., & Preuss, D. (2000). Dissecting *Arabidopsis* pollen-stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity. *Annals of Botany*, 85(suppl 1), 15-21. doi: 10.1006/anbo.1999.1066
- Zinkl, G. M., Zwiebel, B. I., Grier, D. G., & Preuss, D. (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*, 126(23), 5431-5440.

7 Annexe

Vecteur de destination	Type de clonage	Candidat	Nom de l'amorce	Tm °C	Séquence
pET28b	Clonage classique	ScCRP2.1	C16_F	65,7	CCCGGATCCGCAATTACTCGAAGGAGGAAGA
			C16_R	61,3	CCCAAGCTTTTAATTTTTCGTACTATCTTCATTCTTCAC
		ScCRP2.2	C17_F	68,5	CCCGGATCCGAGCGTCTCACAGTTACTCGG
			C17_R	59,9	CCCAAGCTTTTAGTTCTTAATTTTGCGTACAATCTT
		ScCRP5.1	C19_F	64,4	CCCGGATCCGAATAAATTTGTAGGTGGATTAGCATG
			C19_R	64,4	CCCAAGCTTTCAGGATTTAGACTCTGTCTGGTG
		ScCRP5.2	C24_F	63,3	CCCGGATCCGTATCCAAATGAATGCTTAAAAGATGA
			C24_R	59,9	CCCAAGCTTTTAAGCATGAGATAAATTTGGATCATT
	ScCRP4.4	C26-1_F	64,5	CCCGGATCCGTATCCTCCAAGAATAGAAAGTATTTGT	
		C26-1_R	63	CCCAAGCTTTCACCCACTAATATAACCCCCA	
	ScCRP4.5	C26-2_F	65,6	CCCGGATCCGTATCCTCCACGAATAGAAAGTGTTT	
		C26-2_R	63	CCCAAGCTTTCACCCACTAATATAACCCCCA	
	CCRP4.6	C27_F	65,6	CCCGGATCCGTATCCTCCATCAATAGAAGAACTTGT	
		C27_R	62,1	CCCAAGCTTTTATGAGCCATGAGTCTCATCATATT	
	ScCRP6.2	C29_F	67	CCCGGATCCGTGTACCCGATCTCCTTCATCA	
C29_R		59,2	CCCAAGCTTTTATTCAAGATAACAATTAATTAAGAAG		
Séquençage 3' + clonage classique	ScCRP6.1	pET28b_2.4_F	64,4	CCCGGATCCGAATTGTAAAAAGTACCCTCCATCAA	
	ScCRP5.3	pET28b_5.3_F	64,4	CCCGGATCCGTTTGAGATTGTTATCATGATGG	
	ScCRP24.1	pET28b_9.1_F	64,5	CCCGGATCCGATGAGAATTGTACCAATGATATATGGA	
	ScCRP47.1	pET28b_11.1_F	64,4	CCCGGATCCGAGGAATTTGGAGAGGAAATG	
	-	OligoDT(30)_HindIII	60	CCCCCAAGCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

Tableau 6. Liste des amorces des candidats clonés avec succès. Les Tm sont calculés sur le logiciel Geneious 7.1.7.

Vecteur de destination	Type de clonage	Candidat	Nom de l'amorce	Tm °C	Séquence
pQLinkHD	Gateway	ScCRP13.1	B CRP9.2 F	69,2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGATAGCAACTTGACTCATTGG
			B CRP9.2 R	70,3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAATAACAATCATGCCAGC
		ScCRP15.1	B- OSP125F	68,2	GGGGGATCCATGGAGATCGTTGGAGGGGTGAA
			B-OSP125 R	63,3	GGGGCTCGAGAGCTTTTGATAGAAAAATAATTTTGCC
		ScCRP4.1	B- OSP229F	63,2	GGGGGATCCATGTATCCAACATTAAGAAGTCCT
B-OSP229 R	67	GGGGCTCGAGTTGGGAGGTACAGTCTTTCCA			
ScCRP20.1	B CRP12.1 F	71,1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGTGGATGGCGACTCTTGCA		
		B CRP12.1 R	71,2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGATACGAAGGAAATTATTAGGGC	
		ScCRP15.2	B-attB1 OSP307F	69,2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAGATGATCAAAGGAGAGGATGG
B-OSP307 attB2R	70,7		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAAGCTTTTGGTAGAGCAATAT		
PGEX-4T2	Classique	ScCRP23.2	3.7_PGEX4T2_F	68,2	GGGGGAATTCGGGACGTTCCATGCGCAGATGT
			3.7_PGEX4T2_R	69,7	GCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGCCCTCAGAGCAATCAACAT
		ScCRP1.7	8.1_PGEX4T2_F	67	GGGGGAATTCGGGATGATGATGATGGTGACGG
8.1_PGEX4T2_R	69,9		GCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGCCCGGGACACTTATGCTT		
ScCRP23.1	B22_PGEX4T2_F	68,2	GGGGGAATTCGGGACGTTCCATGCGCAGATGT		
		B22_PGEX4T2_R	69,7	GCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGCCCAACCTCAGAGCAATCAA	

Tableau 6. Liste des amorces des candidats clonés avec succès. (Suite)