



HAL
open science

Dissection des premières étapes de la reproduction chez Arabidopsis par imagerie cellulaire en temps réel

Frédérique Rozier

► **To cite this version:**

Frédérique Rozier. Dissection des premières étapes de la reproduction chez Arabidopsis par imagerie cellulaire en temps réel. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02353792

HAL Id: hal-02353792

<https://ephe.hal.science/hal-02353792>

Submitted on 5 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Science de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

MORIN-ROZIER Frédérique

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

***Dissection des premières étapes de la
reproduction chez *Arabidopsis* par
imagerie cellulaire en temps réel***

Soutenu le 31 octobre 2019

devant le jury suivant :

Jean-Marie Exbrayat, Directeur d'études cumulant : Président
Isabelle Fobis-Loisy, Chargé de Recherche, CNRS : Tuteur Scientifique
Maxime Ratinier, Maître de Conférences : Tuteur Pédagogique
Vanessa Vernoud, Chargé de Recherche, INRA : Rapporteur
Nathalie Poussereau, Maître de Conférences, UCBL : Examineur
Thierry Gaude, Directeur de Recherche, CNRS : Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Isabelle Fobis-Loisy

UMR 5667, laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Lyon

Directeur : Teva Vernoux

et de

Maxime Ratinier

UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), Lyon

EPHE (science et vie de la terre)

Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)

REMERCIEMENTS

Il vaut mieux des souvenirs plein la tête que des rêves constants jamais réalisés.
Ce rapport est un rêve concrétisé, une aventure contre le temps qui passe.

Elle avait aussi des rêves plein la tête, qui s'enfouissent dans un souvenir passé.
C'est pour Laurence que vont mes pensées, contre ce temps toujours plus fugace.

Je dédie ce mémoire à Lucie, Audrey, Thomas, Océane, Dylan, Axel,
Léo, Raïssa, Mélanie, Elise, à leur volonté d'avancer dans la vie.

« Pas bientôt fini ce rapport » ! Qui résonne encore comme une ritournelle.
Il m'a bien supporté, parfois un peu agacé, ici je parle de mon mari.

Ce master est devenu concret, merci en premier à mes tuteurs pour leur soutien.
Je remercie comme il se doit mon directeur d'unité et le CNRS.

Sans le soutien de mon équipe SiCE, cette aventure ne serait rien.
Finalement merci à Olivier et à son confocal aux lasers express.



TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION.....	11
II.	ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
II.1	LA COMMUNICATION CELLULAIRE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE.....	17
II.1.1	<i>La membrane plasmique.....</i>	17
II.1.2	<i>Diffusion de signaux par des récepteurs kinases.....</i>	18
II.1.2.1	Les domaines extracellulaires.....	18
II.1.2.2	Les domaines intracellulaires et transduction du signal.....	20
II.1.3	<i>Echanges membranaires de molécules.....</i>	21
II.1.3.1	Canaux présents à la membrane plasmique.....	22
II.1.3.2	Pompes présentes à la membrane plasmique.....	22
II.1.3.3	Connexions cytoplasmiques entre les cellules : les plasmodesmes.....	23
II.1.3.3.1	Structure.....	24
II.1.3.3.2	Fonctionnement des plasmodesmes.....	24
II.1.4	<i>Conclusion.....</i>	27
II.2	LA REPRODUCTION SEXUEE CHEZ LES PLANTES A FLEURS.....	28
II.2.1	<i>Organisation de la fleur hermaphrodite.....</i>	28
II.2.1.1	L'organe femelle.....	29
II.2.1.2	Formation de l'organe mâle.....	30
II.2.2	<i>Rencontre entre les deux partenaires : dialogue moléculaire.....</i>	32
II.2.2.1	L'adhésion.....	32
II.2.2.2	Hydratation du pollen.....	33
II.2.2.3	Germination du pollen et émission d'un tube pollinique.....	35
II.2.2.4	Pénétration du tube pollinique dans la papille stigmatique et croissance du tube dans les tissus femelles.....	35
II.2.2.5	Décharge du tube et fécondation.....	36
II.3	LA COMMUNICATION CELLULAIRE AU NIVEAU DE LA PAPILLE STIGMATIQUE.....	37
II.3.1	<i>La réponse d'auto-incompatibilité chez les Brassicacées.....</i>	37
II.3.2	<i>Les réactions cellulaires de la papille confrontée à la pollinisation.....</i>	39
II.3.2.1	Trafic cellulaire.....	39
II.3.2.2	Mouvement du cytosquelette.....	42
II.3.2.3	Le calcium.....	43
II.3.3	<i>Conclusion.....</i>	43
III.	PARTIE EXPERIMENTALE.....	45
III.1	CONTEXTE.....	47
III.2	MATERIEL ET METHODE.....	47
III.2.1	<i>Culture des plantes en chambre de culture.....</i>	47
III.2.2	<i>Plantes disponibles au laboratoire.....</i>	48
III.2.3	<i>Plasmides disponibles au laboratoire.....</i>	48
III.2.4	<i>Plasmides générés pour l'étude.....</i>	48
III.2.5	<i>Transformation des plantes A.thaliana.....</i>	49
III.2.6	<i>Sélection des plantes transgéniques.....</i>	49
III.2.7	<i>Phénotype de compatibilité ou incompatibilité des lignées transgéniques.....</i>	49
III.2.8	<i>Analyse de la production de graines.....</i>	50
III.2.9	<i>Acquisition des images par microscopie confocale.....</i>	50
III.2.10	<i>Analyses d'images.....</i>	50
III.2.11	<i>Mesure de l'hydratation du pollen.....</i>	51
III.2.12	<i>Coloration des papilles stigmatiques au FM4-64.....</i>	51
III.2.13	<i>Analyses statistiques.....</i>	51

III.3	RESULTATS	52
III.3.1	<i>Analyse des lignées transgéniques</i>	52
III.3.1.1	Restauration de la réponse d'auto-incompatibilité chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
III.3.1.2	Les marqueurs fluorescents s'expriment dans les organes reproducteurs	52
III.3.1.3	Le marqueur fluorescent s'exprimant au niveau des organes reproducteurs n'altère pas la réponse à la pollinisation.	54
III.3.1.4	La réponse d'auto-incompatibilité se maintient au cours du temps	56
III.3.2	<i>Mise en place du système d'imagerie du vivant</i>	58
III.3.2.1	Contraintes expérimentales	58
III.3.2.2	Le système semi in vivo	59
III.3.2.3	Le système semi in vivo permet de visualiser la pollinisation par microscopie confocale 60	
III.3.2.4	Le système semi in vivo conserve les réponses à la pollinisation.....	61
III.3.3	<i>Analyse du comportement du pollen</i>	62
III.3.3.1	En situation de réponse compatible les grains de pollen s'hydratent tandis que les grains de pollen incompatibles s'hydratent peu	62
III.3.3.1.1	Comportement des grains de pollen compatibles	63
III.3.3.1.2	Comportement des grains de pollen incompatibles	64
III.3.3.2	En situation compatible les germinations précoces des grains de pollen s'observent avec des hydratations rapides	64
III.3.3.3	Une forte hygrométrie permet la germination des grains de pollen incompatibles	67
III.3.3.4	En réponse d'auto-incompatibilité les tubes polliniques ne pénètrent pas la papille stigmatique.....	70
III.3.4	<i>Réaction de la papille stigmatique à la pollinisation</i>	72
III.3.4.1	La papille stigmatique réagit à la pollinisation par un réarrangement de son cytosquelette d'actine.....	72
III.3.4.2	La papille stigmatique contrôle plusieurs grains de pollen	75
III.3.5	<i>Une structure jointive est visible tardivement entre les deux partenaires</i>	77
III.4	DISCUSSION	79
III.4.1	<i>L'haplotype S14 chez <i>A.lyrata</i> restaure la réponse auto-incompatible chez <i>A.thaliana</i></i>	79
III.4.2	<i>Notre système semi in vivo ne modifie pas le comportement du pollen durant la pollinisation</i>	79
III.4.3	<i>Notre système semi in vivo permet d'étudier la réponse d'auto-incompatibilité chez <i>A.thaliana</i></i>	81
III.4.4	<i>Le système semi in vivo permet d'étudier des comportements cellulaires de la papille stigmatique au cours de la pollinisation</i>	83
III.4.5	<i>Le système semi in vivo peut être utilisé pour rechercher le point de contact entre le grain de pollen et la papille stigmatique</i>	84
III.4.6	<i>Conclusion</i>	85
IV.	BIBLIOGRAPHIE	87
V.	ANNEXES	99
V.1	VISUALISATION DE LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES DANS LE PISTIL D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . .	101
V.2	ANALYSE DE LA REPONSE D'AUTO-INCOMPATIBILITE SUR LES LIGNEES TRANSGENIQUES EXPRIMANT LES GENES <i>SRK14</i> ET <i>SCR14</i>	102
V.3	RAPPORT LONGUEUR/LARGEUR DES GRAINS DE POLLEN A LA SORTIE DES ANTHERES	103
V.4	POLLINISATION DANS LE SYSTEME SEMI <i>IN VIVO</i>	104
V.5	FOCALISATIONS DES FILAMENTS D'ACTINE EN SITUATION INCOMPATIBLE DANS LE SYSTEME D'HYDRATATION FORCEE 105	
V.6	GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN COMPATIBLES LORS D'UNE POLLINISATION MULTIPLE DANS LE SYSTEME SEMI <i>IN VIVO</i>	106
V.7	DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING : ARTICLE EN PRÉPARATION	107

LISTE DES ABREVIATIONS

ARC1: Accumulation and Replication of Chloroplasts

ARN: Acide Ribo Nucléique

CLV1 : Clavata 1

CLV2 : Clavata 2

CLV3 : Clavata 3

CNR : CORYNE

EGF: Epidermal Growth Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

GRP: Glycin Rich Protein

KAPP : Kinase Associated Protein Phosphatase

LecRLKs: Lectin Receptor Kinase

LRR: Rich Region Repeat

PCP: Pollen Coat Protein

PIN : PIN FORMED

PIP : Plasma Membrane Intrinsic Protein

RedFP: Red Fluorescent Protein

RLCK: Receptor Like Cytoplasmique Kinase

RLK: Rich Region Leucine

RLP: Receptor Like Protein

SAM : Zone Méristématique Apicale

SLG : S-Locus Glycoprotein

SLR1 : S-locus Related 1

SRK: S-Locus Receptor Kinase

SCR : S-locus Cystein Rich

THL: Thioredoxine-h-Like

Turq: protéine fluorescente mturquoise

WUS: WUSCHEL

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Communication cellulaire chez les plantes.

Figure 2 : Représentation simplifiée de la classification des récepteurs RLKs et RLCKs selon la nomenclature des Shiu en 2001.

Figure 3 : Schématisation des modèles de transmission de signaux du complexe CLV1-CLV2-CNR par la voie cytoplasmique.

Figure 4 : Localisation des PINs à la membrane plasmique et leur importance dans le développement chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure 5 : Les plasmodesmes permettent les connexions entre les cellules voisines.

Figure 6 : Régulation de l'expression du gène *CLAVATA3 (CLV3)* par le gène *WUSCHEL (WUS)*.

Figure 7 : Communication cellulaire entre les différentes cellules qui constituent un organisme végétal.

Figure 8 : Organisation de la fleur chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure 9 : Organisation de l'organe femelle chez *Arabidopsis Thaliana*.

Figure 10 : Formation du gamétophyte mâle.

Figure 11 : La pollinisation chez les plantes à fleurs.

Figure 12 : Comportement du pollen selon le type de pollinisation à laquelle il est confronté.

Figure 13 : Réponse cellulaire durant la pollinisation compatible.

Figure 14 : Schématisation du modèle de transmission de signaux du récepteur SRK par la voie cytoplasmique.

Figure 15 : Observation de la fluorescence des lignées transformées.

Figure 16 : Analyse de la réponse d'auto-incompatibilité sur les lignées transgéniques *SRK14* et *SCR14* exprimant un marquage fluorescent.

Figure 17 : Analyse de la réceptivité des papilles stigmatiques selon leur âge.

Figure 18 : Système semi *in vivo*.

Figure 19 : Comparaison des comportements des grains de pollen entre les deux situations.

Figure 20 : Schématisation du rapport Longueur/largeur.

Figure 21 : Rapport Longueur/largeur des grains de pollen mesurés toutes les deux minutes.

Figure 22 : Comparaison du niveau d'hydratation des grains de pollen durant les dix premières minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques.

Figure 23 : Hydratation et germination des grains de pollen en situation d'hygrométrie forcée.

Figure 24 : Croissance des tubes polliniques selon la situation compatible ou en réponse d'auto-incompatibilité.

Figure 25 : Visualisation des tubes polliniques dans le système à hydratation forcée.

Figure 26 : Visualisation de la focalisation d'actine au cours de la pollinisation dans le système semi *in vivo*.

Figure 27 : Absence de focalisation des filaments d'actine en réponse d'auto-incompatibilité dans le système à hydratation forcée.

Figure 28 : La papille stigmatique réagit à la présence de plusieurs grains de pollen.

Figure 29 : Visualisation du manteau pollinique des grains de pollen.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Lignées mâles et femelles générées pour l'analyse de la pollinisation dans le système semi *in vivo*.

Tableau 2 : Comportement des grains de pollen selon la situation compatible ou incompatible.

Tableau 3 : Pointage de la focalisation d'actine au cours de la pollinisation dans le système semi *in vivo*.

I. INTRODUCTION

Les Organismes pluricellulaires sont constitués d'un ensemble d'organes et de tissus qui définissent leur spécificité. Des informations diffusent dans ces ensembles cellulaires conduisant au développement d'organes, à la croissance et à la mise en place de réactions de défenses contre des agressions extérieures. Les exemples les plus décrits dans la littérature des échanges conduisant à une spécialisation cellulaire sont les différentes étapes de l'organogénèse en embryologie. Chez l'animal un organisme pluricellulaire se développe à partir de la fusion de deux cellules reproductrices (Sánchez-Villagra and Werneburg, 2016). Des groupes cellulaires se spécialisent en tissus qui subissent une croissance jusqu'à l'âge adulte. Au cours du développement chez les animaux, la spécificité cellulaire est maintenue par un ensemble de signaux. Chez les plantes, un axe racinaire et caulinaire (tige) s'établit au cours de l'embryogénèse. Grâce à des cellules souches maintenues dans des méristèmes, des nouveaux organes apparaissent tout au long de la vie de la plante. Des « compétences » cellulaires propres au développement des racines ou à la production de nouveaux organes aériens ont été établies précocement au niveau de l'embryon.

Que ce soit dans le règne animal ou le règne végétale, le développement harmonieux des organismes pluricellulaires nécessite une communication entre les cellules (Chaiwanon et al., 2016). Ces communications peuvent être d'ordre spatial, d'échanges moléculaires ou de perceptions de signaux (Bloemendal and Kück, 2013). Des molécules de signalisation telles que des hormones, produites par des cellules émettrices diffusent dans l'organisme par le sang chez les animaux ou la sève chez les plantes. Ainsi les cellules peuvent percevoir des signaux produits à distance. Le maintien de la spécialisation tissulaire dépend également de communications cellulaires au travers de la perception de signaux et de diffusions de molécules entre les cellules appartenant au même tissu ou à des tissus différents. Dans ce cas la communication se réalise avec des cellules avoisinantes. Les cellules peuvent percevoir des signaux émis par des cellules environnantes au travers de récepteurs localisés à leur périphérie. Le signal ainsi perçu est transcrit à l'intérieur de la cellule de manière spécifique selon le type cellulaire et modifie le comportement de la cellule cible. La position d'une cellule dans son environnement ainsi que le contexte cellulaire dans lequel elle évolue définit donc sa spécificité.

Les organismes communiquent avec le milieu extérieur au travers de l'épiderme capable d'interpréter les variations externes en matière d'environnement. Les cellules épidermiques ont un rôle protecteur contre les maladies, la température et des dommages physiques. Chez les plantes à fleurs, l'épiderme situé à l'extrémité de l'organe reproducteur femelle joue un rôle de tri et sélectionne les partenaires mâles à l'issue d'un « dialogue » moléculaire conduisant à une

reconnaissance de chacun des partenaires. Ce travail s'attache à disséquer les étapes précoces de la relation qui s'établie entre le gamétophyte mâle et les tissus femelles. Pour cela nous avons mis au point un système permettant d'observer, sur du matériel vivant, les deux partenaires de la reproduction au cours des premières étapes d'interaction.

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

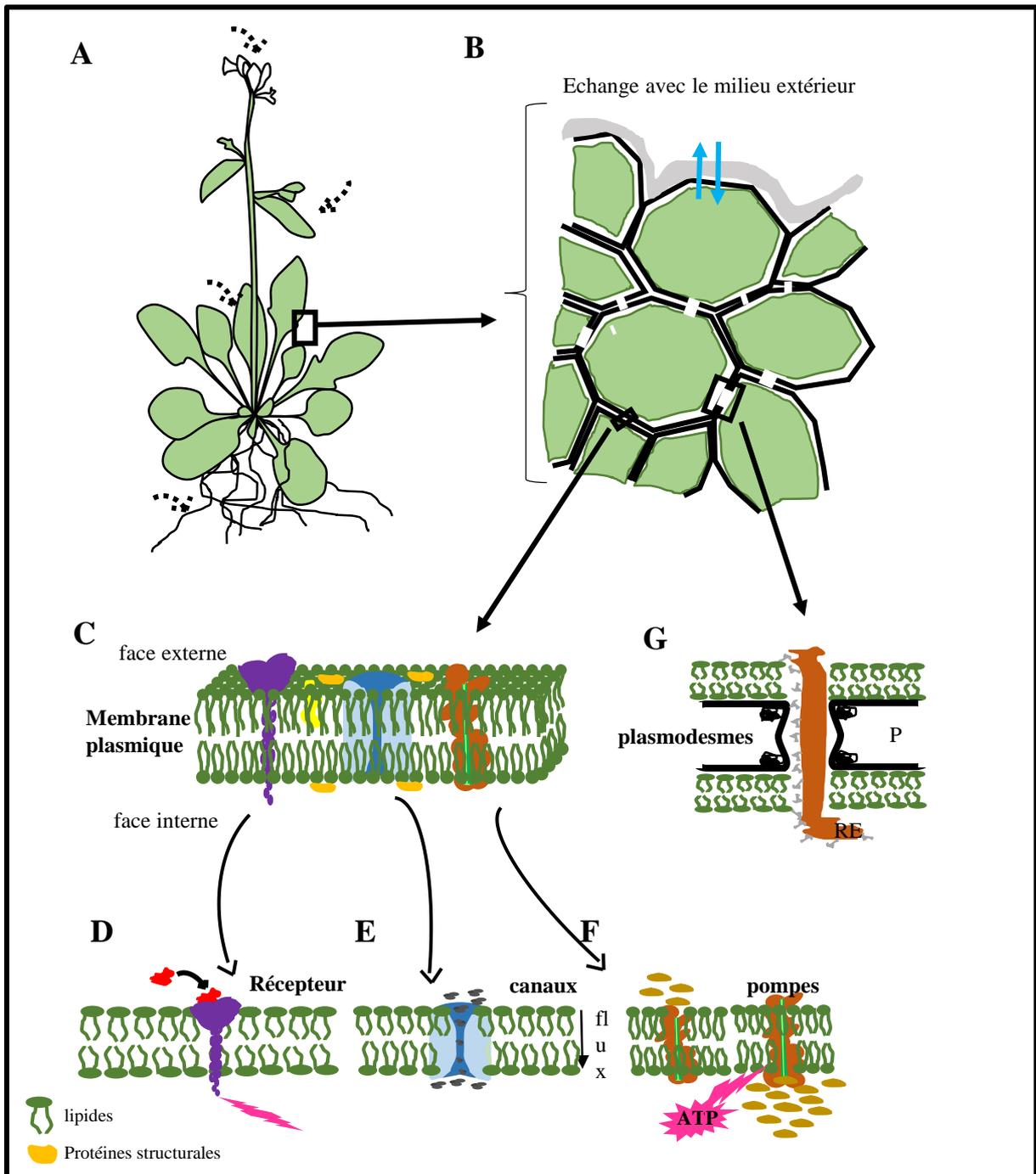


Figure 1. **Communication cellulaire chez les plantes.** A, plante herbacée constituée à sa base de racines et de parties aériennes (tige, feuilles, fleurs) percevant des signaux extérieurs (flèches en pointillées). B, schématisation d'une partie de feuille. Les bords externes de la feuille perçoivent des signaux du milieu extérieur. Les cellules communiquent entre elles par divers mécanismes. La paroi cellulaire est représentée par un trait noir et la membrane plasmique par un trait vert. C, détails de la membrane plasmique montrant les lipides et les protéines la constituant. Les pôles hydrophobes des lipides sont orientés vers le centre de la membrane plasmique. Les protéines sont présentes en surface, sur une demi-membrane ou la traversent complètement. D, récepteurs membranaires. La reconnaissance d'un ligand active le récepteur qui induit un signal en cascade dans la cellule. E, canaux permettant le flux d'ions et de petites molécules au travers de la membrane. F, pompes changeant de conformation sous l'apport d'énergie. Cette modification de conformation permet le transport de molécules à l'encontre du gradient de concentration. G, plasmodesmes. Passage de molécules par le réticulum endoplasmique reliant les cellules entre elles. RE, réticulum endoplasmique. P, paroi.

II.1 LA COMMUNICATION CELLULAIRE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

La plante, au cours de son développement, réagit à des stimuli extérieurs qui gouvernent son développement. La lumière, l'obscurité, la température et les éléments minéraux présents dans le sol influent sur sa croissance, sa floraison et la production de fruits. Les cellules sont en constante communication les unes par rapport aux autres, percevant ou émettant des signaux, qui coordonnent les activités cellulaires (figure 1A). La membrane plasmique qui sépare les cellules, joue un rôle prépondérant dans cette communication cellulaire. Des complexes moléculaires localisés à la membrane plasmique permettent la diffusion de signaux (figure 1C). Les récepteurs sont des complexes protéiques qui relaient, au niveau de la membrane plasmique, des signaux extérieurs vers l'intérieur de la cellule (figure 1D) (He et al., 2018). Les cellules communiquent également entre elles au travers des canaux (figure 1E), de pompes (figure 1F) ou par contact direct grâce à des plasmodesmes (figure 1G).

II.1.1 La membrane plasmique

La membrane plasmique est visible par microscopie électronique où trois couches distinctes sont identifiées : deux feuillettes denses séparés par un feuillet clair. Elle est constituée de lipides et de protéines (Mamode Cassim et al., 2019).

Chez les plantes une analyse à haut débit par chromatographie liquide (LC-MS) a permis de caractériser les principales classes lipidiques présentes à la membrane plasmique telles que les phospholipides, phosphoinositides, sphingolipides et les stérols (Mamode Cassim et al., 2019). Les lipides forment une double couche qui est relativement imperméable au passage de la plupart de molécules hydrosolubles mais permet le passage de molécules hydrophobes. La structure en double couche est due au caractère amphiphile des molécules lipidiques (figure 1C). Elles possèdent une extrémité hydrophile polaire orientée vers l'extérieur et une extrémité hydrophobe apolaire orientée vers le centre de la membrane. Les phospholipides peuvent se retourner sur eux même, se déplacer latéralement ou changer de couche.

Les protéines présentes à la membrane plasmique sont soit périphériques soit intégrées à cette bicouche. Les protéines périphériques (extrinsèques) interagissent peu avec la couche lipidique (figure 1C) et sont souvent associées à des lipides et/ou des protéines. Les protéines intégrées sont difficilement détachables de la membrane plasmique. Elles interagissent avec les extrémités hydrophobes des lipides présents à la membrane. Les protéines transmembranaires sont visibles de chaque côté de la membrane et constituées de domaines spécifiques permettant

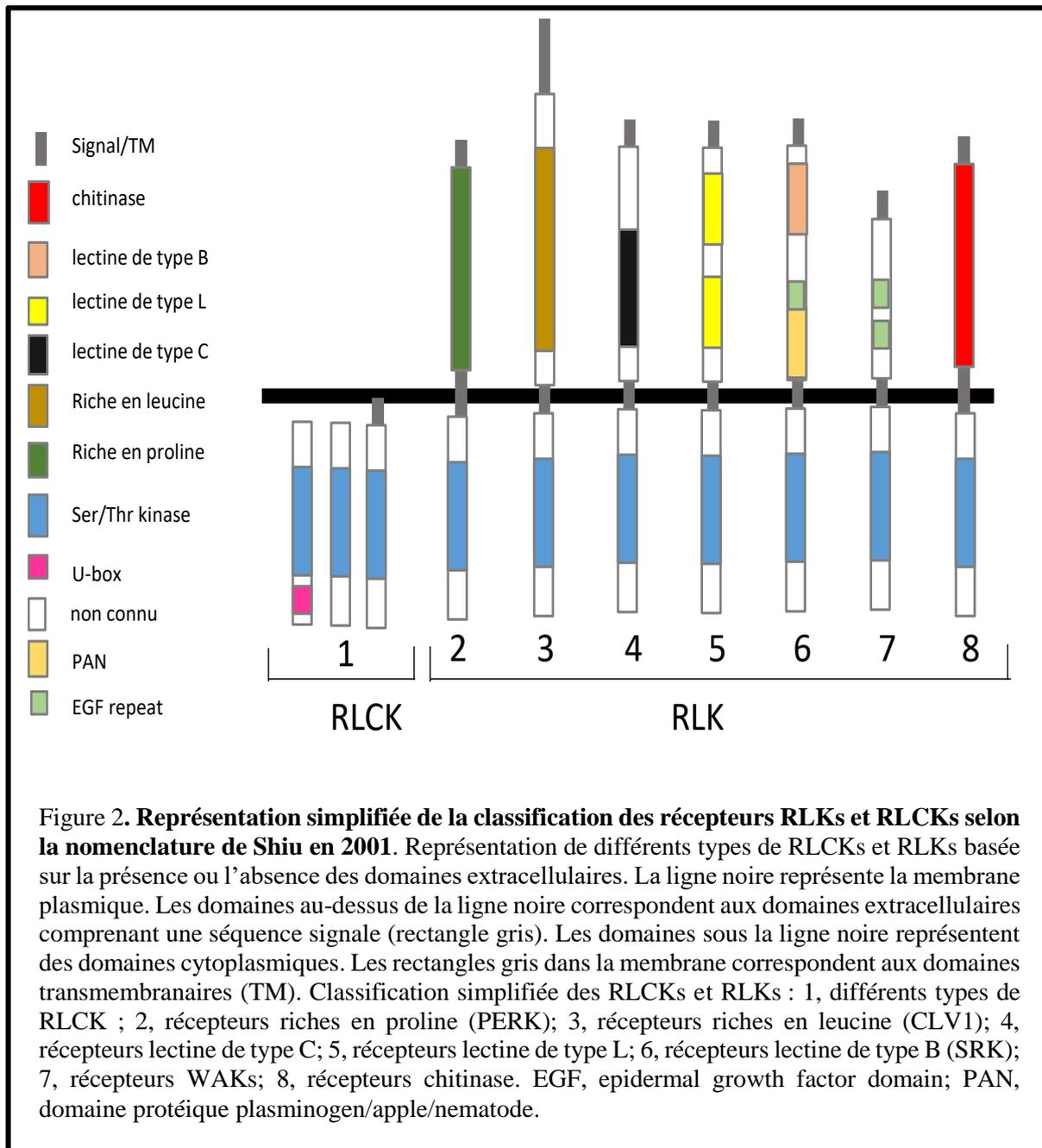
soit de transporter des éléments soit de diffuser des signaux de part et d'autre de la membrane plasmique (figure 1C).

II.1.2 Diffusion de signaux par des récepteurs kinases

Parmi les récepteurs présents à la membrane plasmique, les récepteurs like-kinase (RLK) et les récepteurs like protein (RLP) sont largement représentés. Ces deux types de récepteurs sont constitués d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Les RLP ont un domaine intracellulaire réduit, tandis que les RLK possèdent un domaine kinase cytoplasmique (Shiu and Bleecker, 2001). Des récepteurs dépourvus d'un domaine extracellulaire mais ayant un domaine intracellulaire comparable aux RLKs (RLCKs, récepteurs like cytoplasmic kinase) interviennent également dans la perception et la transmission de signaux (He et al., 2018).

II.1.2.1 Les domaines extracellulaires

Les récepteurs sont classés selon leur domaine extracellulaire (figure 2). La classe majoritaire, nommée LRR pour « Leucine Rich Repeat », présente une région riche en Leucine (LRR-RLK et LRR-RLP) dont la structure en arc adopte la forme d'un fer à cheval (Matsushima and Miyashita, 2012). La reconnaissance d'un ligand ainsi que la transmission du signal intracellulaire dépendent d'une homodimérisation des LRR-RLK ou d'une dimérisation soit avec un autre LRR-RLK soit avec des LRR-RLP. Par exemple, les récepteurs Clavata1 (*CLV1*) et Clavata 2 (*CLV2*) qui sont respectivement un LRR-RLK et LRR-RLP, impliqués dans la régulation des cellules souches dans la zone du méristème d'inflorescence (méristème à l'origine des fleurs) chez *Arabidopsis thaliana*, forment des hétérodimères avec le récepteur kinase CORYNE (*CNR* sans domaine extracellulaire) associé à la membrane (Müller et al., 2008). La perception du ligand Clavata 3 (*CLV3*) par ce complexe induit une cascade de signalisation intracellulaire qui permettra la régulation de l'expression du gène WUSCHEL (*WUS*) impliqué dans le maintien des cellules souches. L'affinité entre les protéines *CLV1* et *CLV2* serait liée aux charges des résidus présents dans le domaine transmembranaire. Une mutation de l'un des trois gènes (*CLV1*, *CLV3* ou *CNR*) conduisant à une perte de fonction provoque soit une prolifération anormale du méristème soit à une dégénérescence prématurée des cellules souches démontrant l'importance de la formation d'un hétérodimère dans la perception du ligand *CLV3* (Clark et al., 1993; Geldner et al., 2009; Müller et al., 2008).



Les « Lectin Receptors Kinase » (lecRLKs) contiennent divers types de motifs de liaison au sucre ou à des lectines dans leur partie extracellulaire. Trois types de LecRLKs ont été identifiés. Le type L correspondant aux « Legume Lectine Motifs » participe à la détection de pathogènes. Le type C pourrait également intervenir dans la réponse immunitaire. Le récepteur SRK (*S* Locus Receptor Kinase), caractéristique de la catégorie des B lectines contient un domaine agglutinine qui reconnaît le α -D-mannose. Ce récepteur intervient dans des reconnaissances cellulaires au moment des étapes précoces de la reproduction (Schopfer et al., 1999a; Takayama et al., 2000a). Il reconnaît un ligand peptidique provenant du partenaire mâle. Cependant le rôle du domaine agglutinine dans la reconnaissance du ligand n'a jamais été démontré. Ces

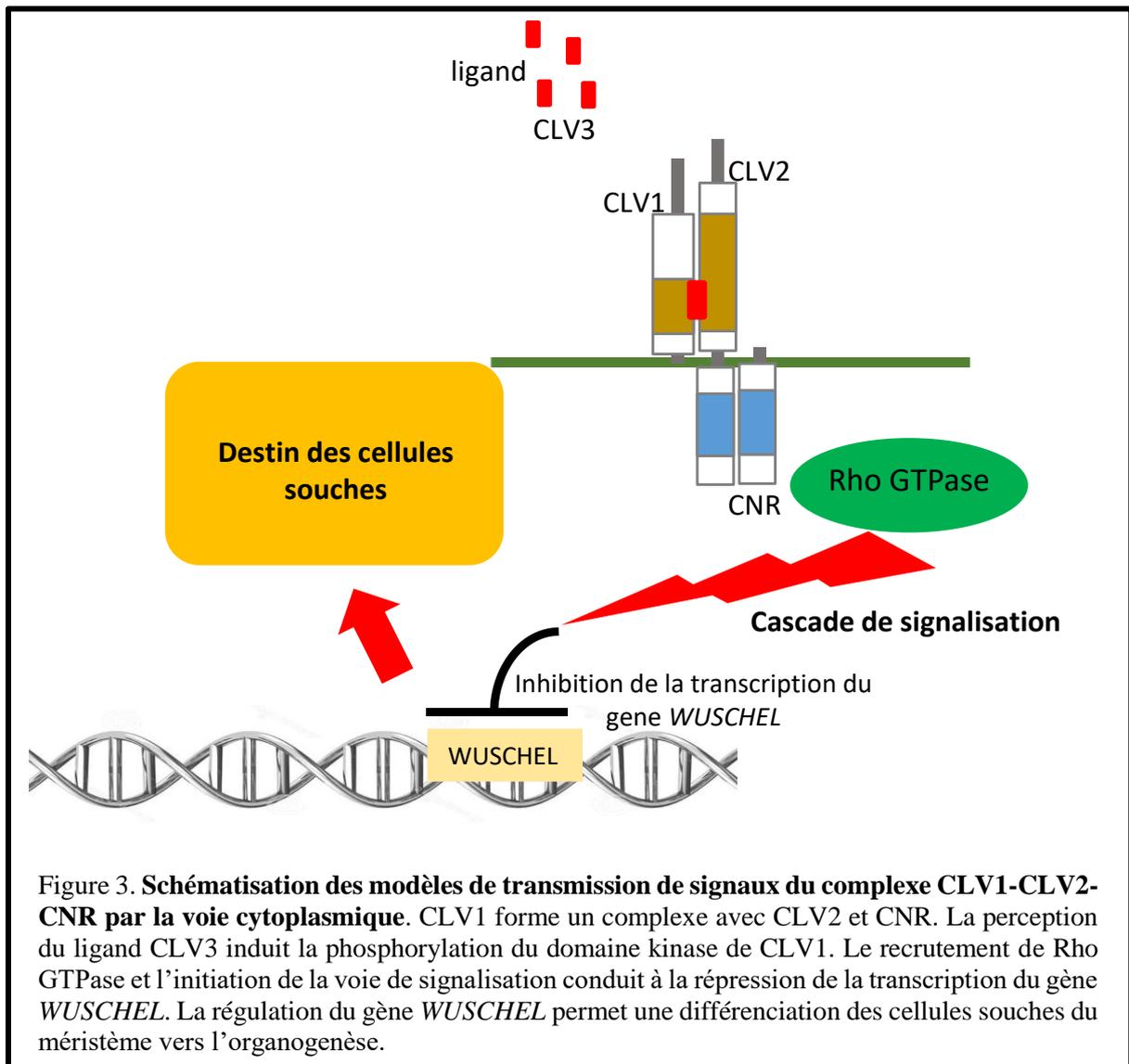
récepteurs possèdent également des motifs EGF (Epidermal Growth Facteur) qui pourraient intervenir dans des interactions protéines-protéines.

Le domaine extracellulaire des récepteurs kinases associés à la paroi (nommés WAK-type) sont des récepteurs de la pectine et/ou des oligogalacturonides, deux composants de la paroi cellulaire des plantes (Wolf, 2017). Souvent impliqués en réponse à des attaques de pathogènes, ces récepteurs interviennent également dans le développement et l'expansion cellulaire (Kohorn et al., 2009). Comme pour SRK, le récepteur WAK possède des domaines répétés de type EGF.

II.1.2.2 Les domaines intracellulaires et transduction du signal

Le domaine intracellulaire des récepteurs RLK possède un domaine kinase qui lorsqu'il est activé s'autophosphoryle induisant une cascade de signalisation par des successions de phosphorylation-déphosphorylation. Cette cascade est spécifique de chaque récepteur. Différentes interactions ont été démontrées entre le domaine kinase des récepteurs et des protéines cytosoliques. Dans le genre Brassica, les protéines thioredoxine-h-like (THL1 et THL2) interagissent avec SRK empêchant son autophosphorylation spontanée en absence du ligand (Cabrillac et al., 2001). De même que THLs, la protéine Kinase Associated Protéine Phosphatase (KAPP) agit négativement sur CLV1 (Hazak and Hardtke, 2016). CLV1 peut être détecté dans les cellules sous deux états, un état désactivé correspondant à un complexe de 185 kD et un état activé sous forme d'un complexe de 450kD (Trotochaud et al., 1999). Le ligand CLV3, la kinase CNR et des protéines Rho-GTPase (switch moléculaires impliqués dans la transduction de signaux chez les plantes) ont été identifiés dans ce complexe de 450 kD suggérant une cascade de signalisation induite par CLV1 et activé par CLV3 (figure 3).

En conclusion, les récepteurs kinases localisées à la membrane plasmique et transformant un message extérieur en signaux percevables par les cellules végétales établissent une communication cellulaire indispensable aux fonctionnements des cellules.



II.1.3 Echanges membranaires de molécules

Les échanges cellulaires de facteurs de transcription, de petites protéines, d'acide ribonucléiques (ARN) et de gaz interviennent dans la communication cellulaire. Toutes ces molécules migrent de cellules en cellules selon des spécificités liées à leur affinité pour la membrane plasmique. Elles peuvent se déplacer de façon passive au travers de la bicouche lipidique par gradient de diffusion ou par des canaux. Elles peuvent également faire appel à des transporteurs qui seront spécifiques et souvent activés par des réactions moléculaires en amont. De plus, les cellules végétales disposent d'un système de communication établi par des ponts que l'on appelle plasmodesmes et qui relient les cellules entre elles.

II.1.3.1 Canaux présents à la membrane plasmique

Les canaux sont sélectifs et interviennent dans la diffusion facilitée de molécules (figure 1 E). Ils s'ouvrent et se ferment sous l'action de régulateurs qui peuvent être des ions ou des molécules ou par des actions mécaniques. Leur temps d'ouverture variable peut être de quelques millisecondes ou rester ouvert tant que le stimulus persiste. Les aquaporines sont des canaux fortement représentés à la membrane plasmique. Ils permettent le transport d'eau, de nutriments et de gaz. Ces canaux sont activés soit par des processus de phosphorylation, des régulations protoniques (H^+) ou calcique (Ca^{++}). Ils sont hautement sélectifs dans leur transport (Maurel et al., 2015). Ceux présents à la membrane plasmique sont nommés « Plasma Membrane Intrinsic Proteins » (PIPs) et jouent un rôle important dans la croissance de la plante. Ils sont principalement impliqués dans le transport de molécules d'eau (Chen et al., 2013; Cochard et al., 2007; Ma et al., 2008).

II.1.3.2 Pompes présentes à la membrane plasmique

Les pompes sont des protéines membranaires qui transportent des molécules ou des ions de part et d'autre de la membrane. Contrairement aux canaux, le transport de ces molécules nécessite un apport d'énergie (transport actif) généré par l'hydrolyse de l'ATP (figure 1 F). Ce transport permet de créer un gradient de concentration de molécules dans la cellule ce qui induit une réponse cellulaire que l'on peut retrouver par exemple avec les transporteurs PINs (PIN-FORMED) qui interviennent dans le transport d'auxine, une hormone végétale impliquée dans différents processus biologiques (Haga and Sakai, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, il y a 8 protéines PINs dont 5 localisés interviennent dans l'organogenèse (PIN1 et PIN4), dans l'embryogenèse (PIN1 et PIN4 et PIN7), dans la réponse à la gravité ou gravitropisme (PIN2 et PIN3) et dans la réponse à la lumière ou phototropisme (PIN1 et PIN3). Ces transporteurs sont localisés à la membrane plasmique et génère une diffusion directionnelle de l'auxine vers le milieu extérieur (figure 4A) (Paponov et al., 2005; Rahman et al., 2007). La localisation des PINs au niveau de la membrane plasmique a une grande importance dans l'initiation de nouveaux organes dans la périphérie des zones méristématique (figure 4B). Au niveau du méristème d'inflorescence chez *A.thaliana* par exemple, PIN1 intervient dans la mise en place de l'architecture des nouvelles fleurs. Il en résulte une organisation de l'inflorescence dont chaque nouveau départ de fleur est séparé d'un angle de 137° par rapport au précédent. Le mutant *pin1* défectueux dans la synthèse du transporteur PIN1 ne produit aucune fleur montrant une tige nue (figure 4C) (Vernoux et al., 2000).

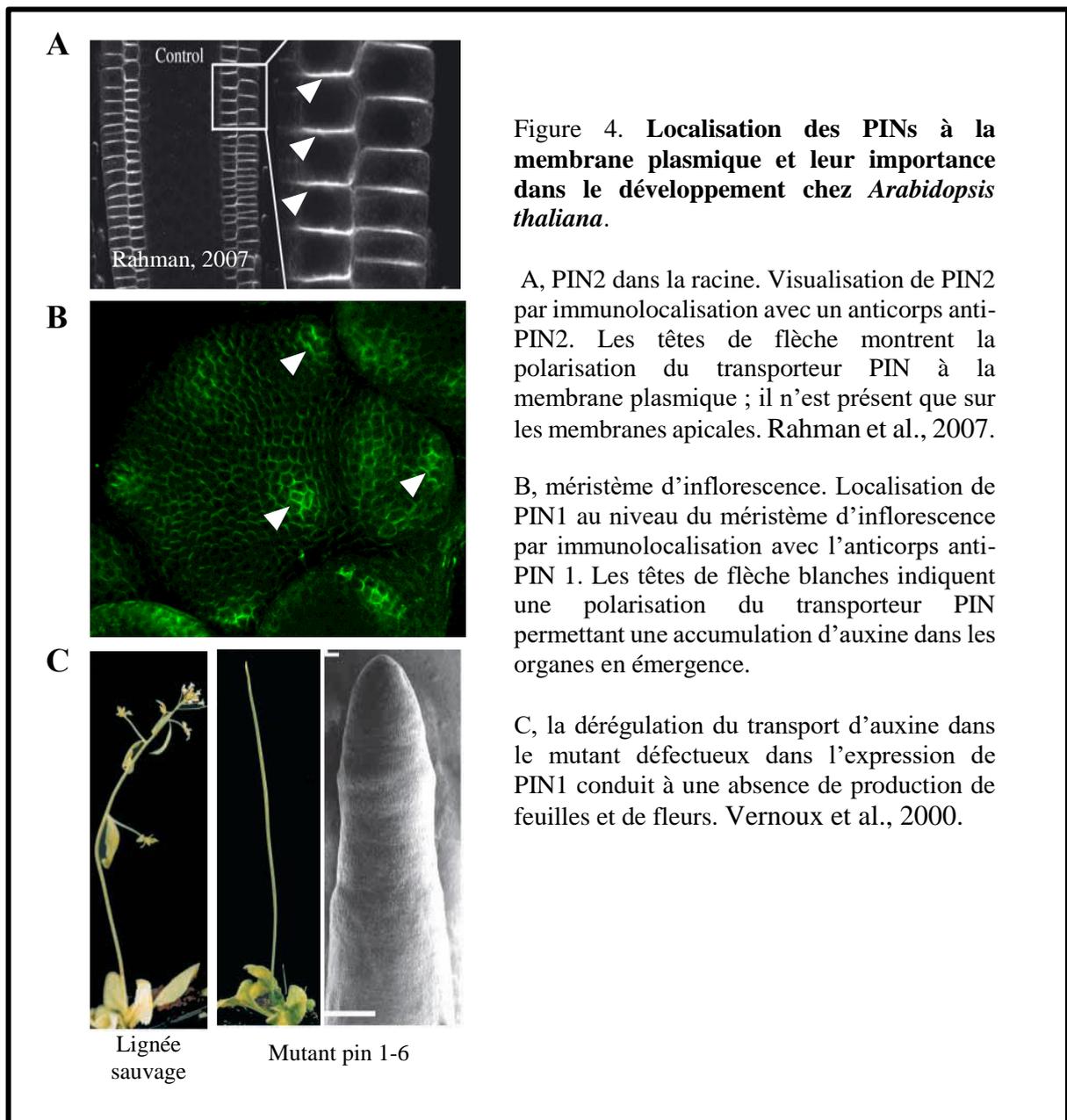


Figure 4. Localisation des PINs à la membrane plasmique et leur importance dans le développement chez *Arabidopsis thaliana*.

A, PIN2 dans la racine. Visualisation de PIN2 par immunolocalisation avec un anticorps anti-PIN2. Les têtes de flèche montrent la polarisation du transporteur PIN à la membrane plasmique ; il n'est présent que sur les membranes apicales. Rahman et al., 2007.

B, méristème d'inflorescence. Localisation de PIN1 au niveau du méristème d'inflorescence par immunolocalisation avec l'anticorps anti-PIN 1. Les têtes de flèche blanches indiquent une polarisation du transporteur PIN permettant une accumulation d'auxine dans les organes en émergence.

C, la dérégulation du transport d'auxine dans le mutant déficient dans l'expression de PIN1 conduit à une absence de production de feuilles et de fleurs. Vernoux et al., 2000.

II.1.3.3 Connexions cytoplasmiques entre les cellules : les plasmodesmes

Les cellules végétales sont constituées d'une paroi rigide limitant le passage de molécules et donnant la forme aux cellules. Des connexions cytoplasmiques, décrites pour la première fois chez les végétaux par Eduard Tangl en 1879 et nommés plasmodesmes en 1901 par Eduard Strasburger (Bloemendal and Kück, 2013; Itaya et al., 1998), permettent une communication entre les cytoplasmes de cellules voisines ; c'est la voie symplastique de transport de molécules opposée à la voie apoplastique chez laquelle les molécules se déplacent dans la paroi et les espaces extracellulaires (Bel and Kesteren, 2012). Depuis ces premières

découvertes, des études ont démontrées que les plasmodesmes régulent des transports de molécules entre les cellules.

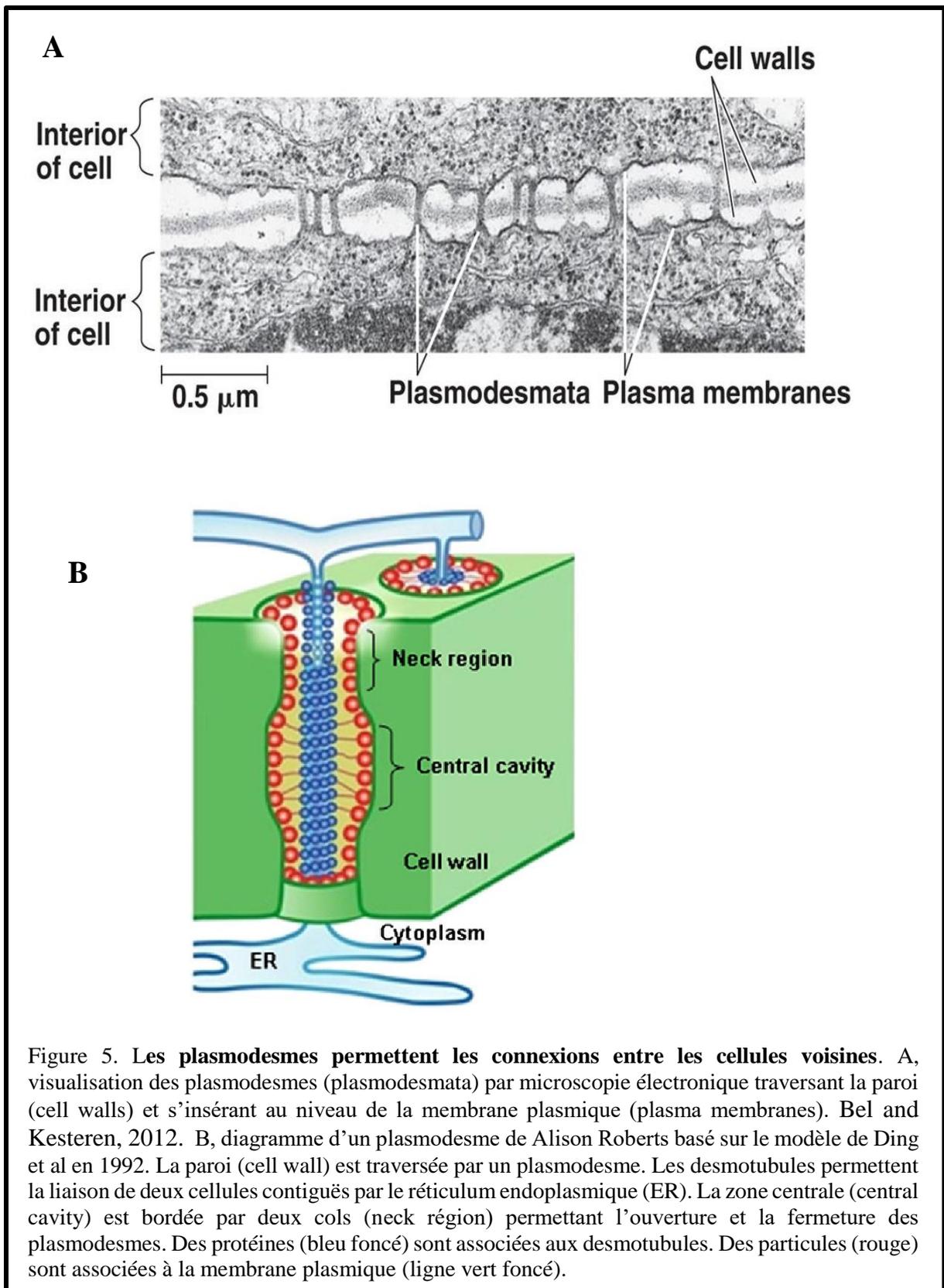
II.1.3.3.1 Structure

Les plasmodesmes de diamètre de 20 à 50 nm sont composés d'un ensemble de constituants plus ou moins dense au électrons par microscopie électronique à transmission (figure 5A) (Bel and Kesteren, 2012). Les desmotubules, situés au centre des plasmodesmes, permettent une liaison des réticulums endoplasmiques des cellules voisines (figure 5B) (Lee et al., 2011). Les extrémités des desmotubules sont resserrées par un col (neck en anglais) qui permet l'ouverture et la fermeture des plasmodesmes. Les filaments d'actine ainsi que des protéines maintiennent la structure des desmotubules (Overall and Blackman, 1996; Yu et al., 2011). Les plasmodesmes formés au moment de la division cellulaire sont nommées plasmodesmes primaires. Soit ils dégènèrent soit ils évoluent en plasmodesmes secondaires selon la spécificité du tissu cellulaire. Par exemple, ils dégènèrent dans le pollen mature alors que dans le méristème, on observe une modification de leur fréquence au cours du développement des fleurs (Sager and Lee, 2014). On note ainsi une réponse spatio-temporelle de l'évolution des plasmodesmes selon les conditions physiologiques et environnementales.

II.1.3.3.2 Fonctionnement des plasmodesmes

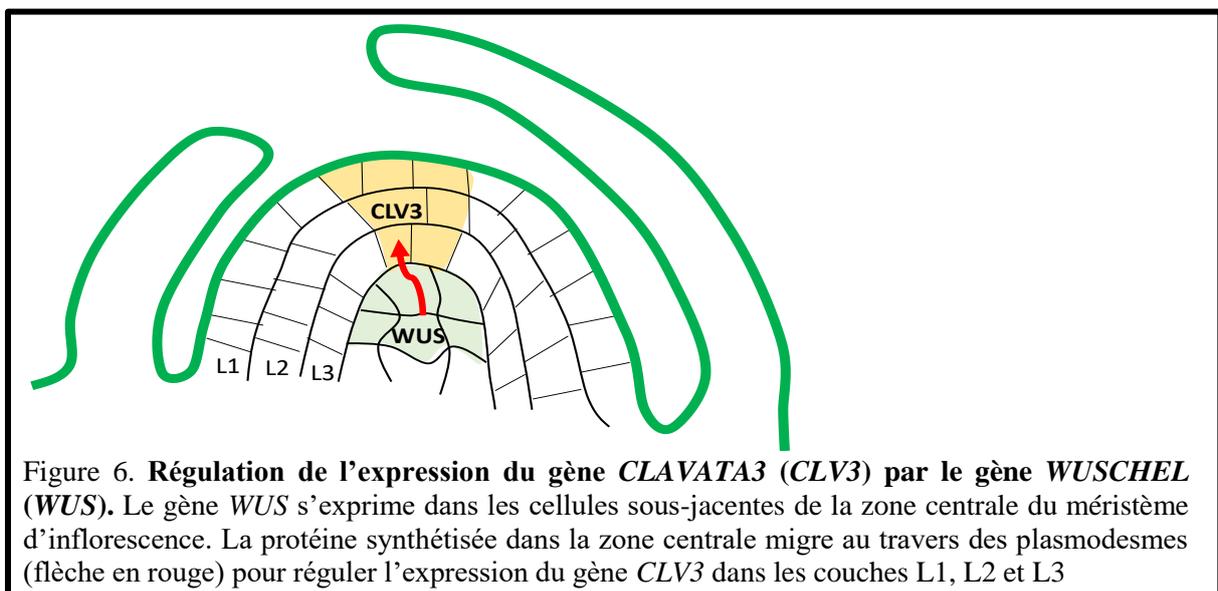
La taille limite d'exclusion d'un plasmodesme est définie par la limite en dessous de laquelle les molécules ne peuvent pas circuler passivement. Elle varie selon les tissus. On distingue alors deux types de transports, un transport passif démontré par le mouvement de sondes fluorescentes qui ont une taille inférieure à la taille d'exclusion et peuvent diffuser librement, et un transport actif correspondant à un transport ciblé de macromolécules dont la taille est supérieure à la taille limite d'exclusion. La taille limite d'exclusion, qui varie selon le tissus (Overall and Blackman, 1996), ainsi que la fermeture totale des plasmodesmes dans certains tissus sont importantes dans le développement des plantes. Chez *A.thaliana*, le gène homeobox *WUS*, transcrit puis traduit dans des cellules sous-jacentes de la zone centrale du méristème d'inflorescence, migre au travers des plasmodesmes vers la zone centrale où il active l'expression du gène *CLV3* (figure 6). Dans le mutant « perte de fonction » *wus*, le phénotype sauvage peut être restauré lorsque la protéine *WUS* est fusionnée à une seule GFP. Lorsqu'elle est fusionnée à deux molécules de GFP le phénotype n'est pas restauré. Ceci démontre

l'importance de la taille des molécules et la régulation de leur migration au travers des plasmodesmes (Yadav et al., 2011).



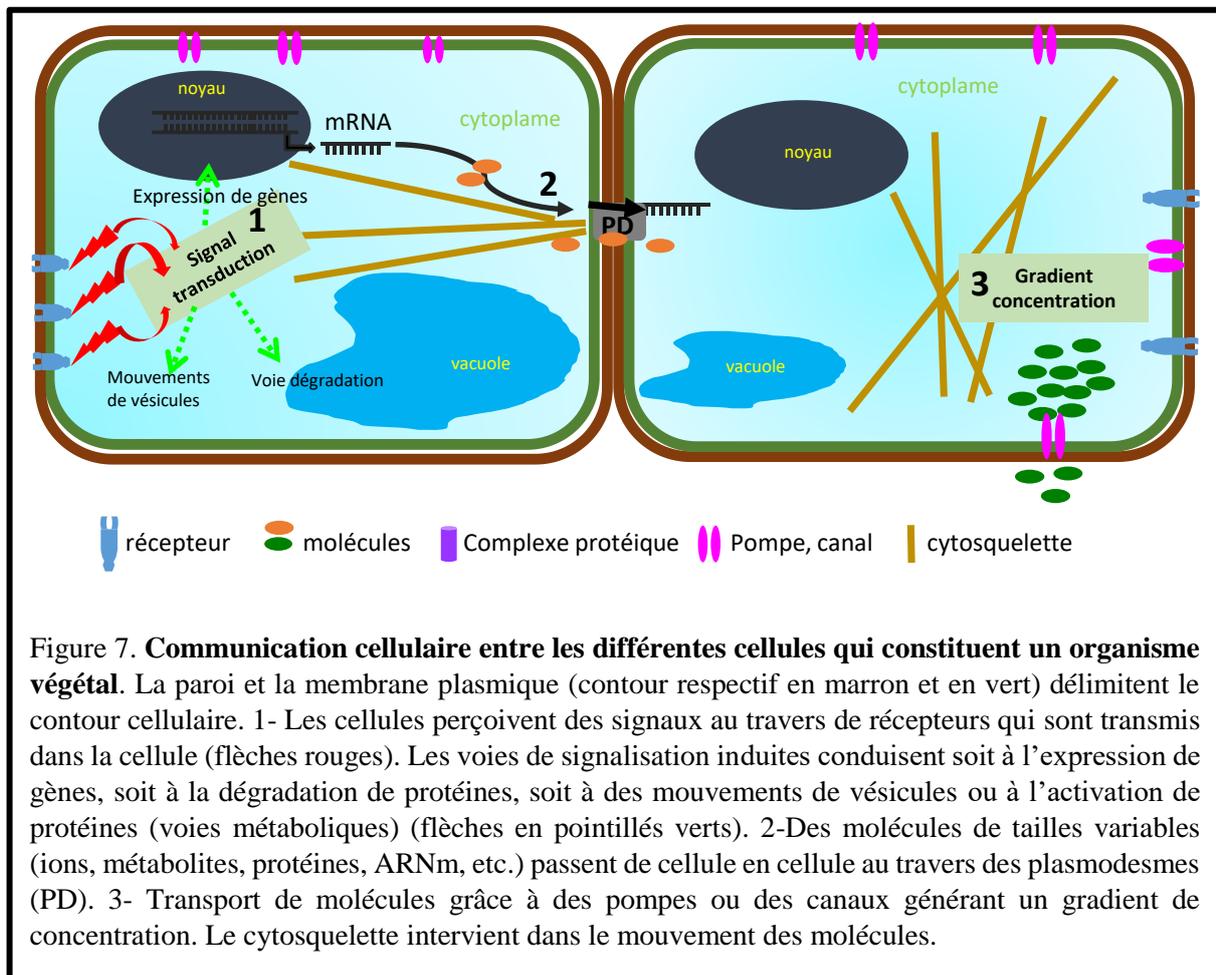
La présence de filaments d'actine a été mise en évidence par immunomarquage au niveau des pointes racinaires de plantes d'orge (White et al., 1994). Bien que son rôle dans le transport de molécules reste à définir, la dépolymérisation des filaments d'actine par la cytochalasine (molécule fongique qui bloque la polymérisation et l'élongation des filaments d'actine) induit un élargissement du col des plasmodesmes (Roberts and Oparka, 2003). Un traitement des cellules avec de la phalloïdine (molécule fongique empêchant la dépolymérisation de l'actine) inhibe le transport de molécules entre les cellules (Roberts and Oparka, 2003). Plusieurs auteurs ont décrit une proximité entre les filaments d'actine et le réticulum endoplasmique par une co-localisation de chacun de ces deux constituants cellulaires (Boevink et al., 1998; Roberts and Oparka, 2003). La myosine VIII, présente uniquement chez les plantes, a été localisée au niveau des plasmodesmes (Reichelt et al., 1999). Son activité ATPase permet de fournir l'énergie nécessaire au transport de molécules et générerait un mouvement directionnel (Titus, 1993).

La taille des pores des plasmodesmes est régulée rapidement et transitoirement en réponse à la voie de signalisation calcique (Sager and Lee, 2014). Diverses protéines contractiles dont l'action dépend à la fois de la présence de calcium et d'une activité phosphatase ou kinase ont été mise en évidence au niveau des plasmodesmes (Ding et al., 1999). Des dépôts de callose au niveau des plasmodesmes diminuent la taille limite d'exclusion empêchant ainsi toute migration de molécules entre les cellules. Ce dépôt de callose intervient essentiellement en réponse à une attaque par un pathogène. Il peut être également visible au niveau des méristèmes des organes aériens au moment du repos hivernal des bourgeons (dormance). Dans ce cas, le dépôt de callose est réversible au moment de levée de la dormance. (Cilia and Jackson, 2004).



II.1.4 Conclusion

La communication cellulaire au travers de différents mécanismes mis en place par les plantes permet de réguler le développement et de répondre aux différents stimuli environnementaux. Ils sont complémentaires et souvent dépendant les uns des autres (figure 7).

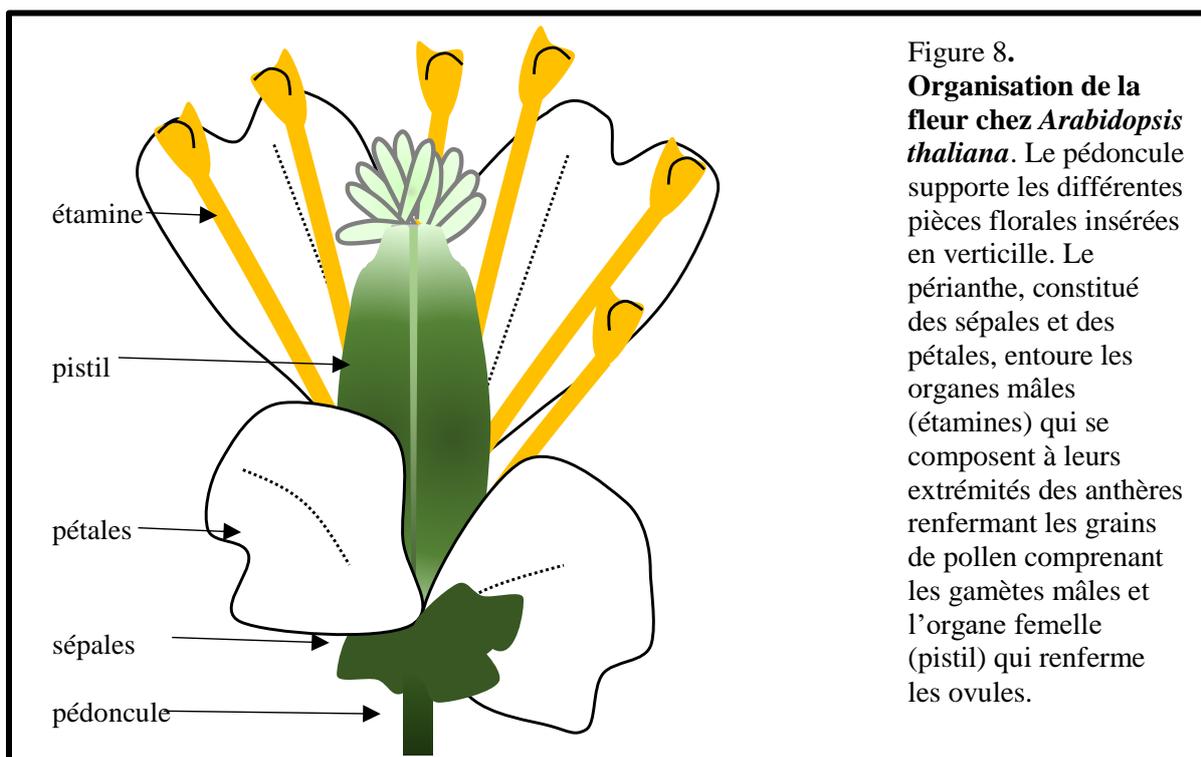


II.2 LA REPRODUCTION SEXUEE CHEZ LES PLANTES A FLEURS

Lors de la reproduction sexuée chez les plantes à fleurs, ou angiospermes, une communication cellulaire s'établit entre les deux partenaires depuis le premier contact à la surface de l'organe femelle jusqu'à la fusion des gamètes. Chez environ 90% des plantes à fleurs, les organes reproducteurs qui produisent les gamètes sont présents dans une même structure : la fleur hermaphrodite. La rencontre entre les deux partenaires conduit à un ensemble d'évènements d'acceptation ou de rejet dépendant de chaque espèce.

II.2.1 Organisation de la fleur hermaphrodite

La fleur comprend plusieurs pièces florales dont l'identité se met en place au niveau du méristème floral (Bowman et al., 1991). Elle est organisée en verticille dont chaque pièce est portée par un réceptacle. Le périanthe formé d'un calice (ensemble des sépales) et d'une corolle (ensemble des pétales) entoure les organes reproducteurs. L'androcée (ensemble d'étamines, mâle) entoure le pistil ou gynécée (ensemble des carpelles, femelle) situé au centre de la fleur. Le nombre et la forme de chacune des différentes pièces florales varient selon les espèces et est à la base de la classification des angiospermes. La famille des Brassicacées (anciennement crucifères) renfermant des espèces agronomiques comme le chou, le colza, la moutarde ainsi que l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, montre par exemple quatre sépales, quatre pétales, six étamines et un pistil central (figure 8).



II.2.1.1 L'organe femelle

L'organe femelle est constitué de plusieurs tissus. L'ovaire renferme un ou plusieurs ovules. Le sac embryonnaire contenu dans chaque ovule contient plusieurs types cellulaires : la cellule œuf ou oosphère donnera le futur embryon, la cellule centrale se développera en albumen (tissu nourricier de la graine), les synergides sont impliquées dans la réception des gamètes mâles et trois cellules antipodales dont le rôle reste inconnu à ce jour (figure 9) (Cresti et al., 1992).

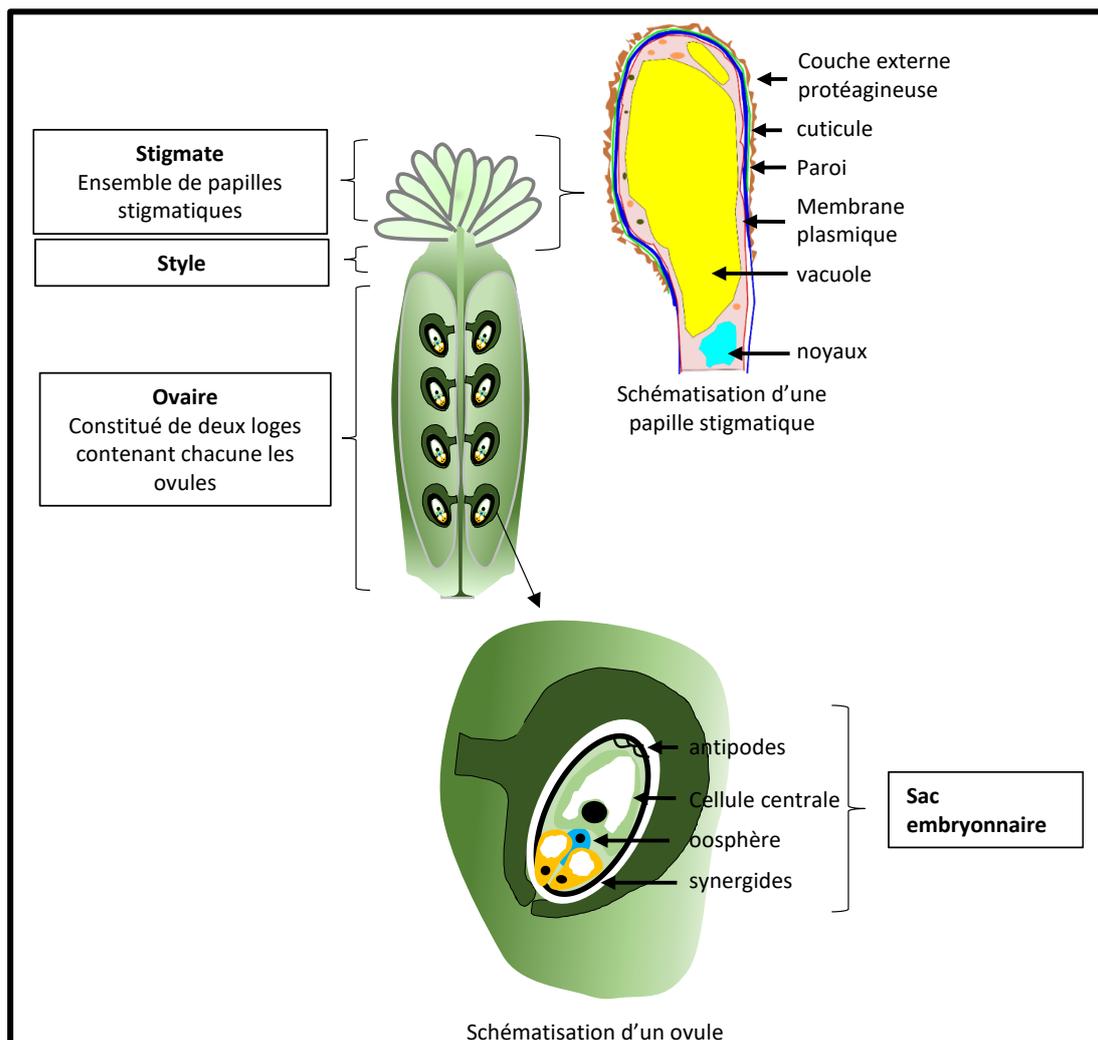


Figure 9. **Organisation de l'organe femelle chez *Arabidopsis thaliana*.** L'organe femelle est constitué d'un ensemble de tissu. A maturité les papilles stigmatiques possèdent une grande vacuole et sont recouvertes d'une couche protéagineuse. L'ovaire est constitué de deux loges séparées par le septum sur lequel sont attachés les ovules. Chaque ovule dispose d'un sac embryonnaire dans lequel les cellules reproductrices sont enfermées : l'oosphère haploïde et la cellule centrale diploïde. Les deux synergides (haploïdes) à la base émettent les signaux qui guideront le tube pollinique au moment de la pollinisation. Le rôle des trois cellules antipodiales (haploïdes) reste inconnu.

Au cours de son développement, l'organe femelle développe à l'extrémité de l'ovaire deux nouveaux tissus: le style et le stigmate (Cresti et al., 1992). Le style relie l'extrémité du stigmate à l'ovaire. Il est constitué du tissu de transmission par lequel les gamétophytes mâles migreront pour rejoindre la partie sous-jacente de l'organe femelle. Le stigmate est constitué d'un ensemble de cellules épidermiques individualisées nommées papilles stigmatiques. Elles ont un rôle de tri des gamétophytes mâles. Deux types de stigmates sont décrits dans la littérature : les stigmates recouverts de sécrétions nommées exsudats et les stigmates secs. Les sécrétions des stigmates à exsudats interviennent à maturité et contiennent une mixture de lipides et de protéines (Sanchez et al., 2004). Des enzymes présentes dans ces sécrétions visqueuses, particulièrement des peroxydases et des estérases, pourraient intervenir dans des voies de signalisation, de reconnaissances ou de défenses (Hiscock and Allen, 2008). Les stigmates secs ont des papilles protubérantes recouvertes d'une cuticule cireuse (Edlund et al., 2004a). La cuticule qui recouvre les stigmates secs est perméable à l'eau et à des petites protéines (Roberts et al., 1984). Une fine membrane pouvant être caractérisée comme une fine couche de protéines recouvre la cuticule. Des études de cytochimie ont démontrées que des estérases et des glycoprotéines étaient les composants majeurs de cette pellicule (Heslop-Harrison and Shivanna, 1977).

L'espèce montrant un stigmate sans sécrétion la plus étudiée est *A. thaliana*. (Figure 9). Le développement du pistil d'*A. thaliana* a été bien caractérisé notamment à partir de structures visibles par microscopie électronique (Smyth et al en 1990). Douze stades ont été définis depuis l'émergence des organes floraux jusqu'à l'ouverture de la fleur considérée comme le stade mature (anthèse, stade 13). Du stade 1 au stade 5, les sépales qui entourent la fleur s'initient puis recouvrent l'ensemble du bouton floral. Un tube correspondant au pistil apparaît au stade 6. Il se développe jusqu'au stade 10 puis les papilles stigmatiques apparaissent au stade 11. Au stade 13, l'ovaire renferme une soixantaine d'ovules répartis dans deux loges.

II.2.1.2 Formation de l'organe mâle

Les gamètes mâles sont produits dans les anthères au niveau du tissu sporogène contenu dans les loges polliniques (figure 10). Une succession de mitoses puis de méioses permet d'aboutir à la formation de microspores qui renferment les gamètes et évolueront à maturité en grains de pollen. Le tapetum, cellules nourricières directement au contact des microspores, intervient dans la formation du grain de pollen (Feng and Dickinson, 2010). Durant la maturation des grains de pollen et la déshydratation de l'anthère, le tapetum dégénère et des

composés issus de cette dégradation sont déposés sur les grains de pollen constituant le manteau pollinique et jouant un rôle

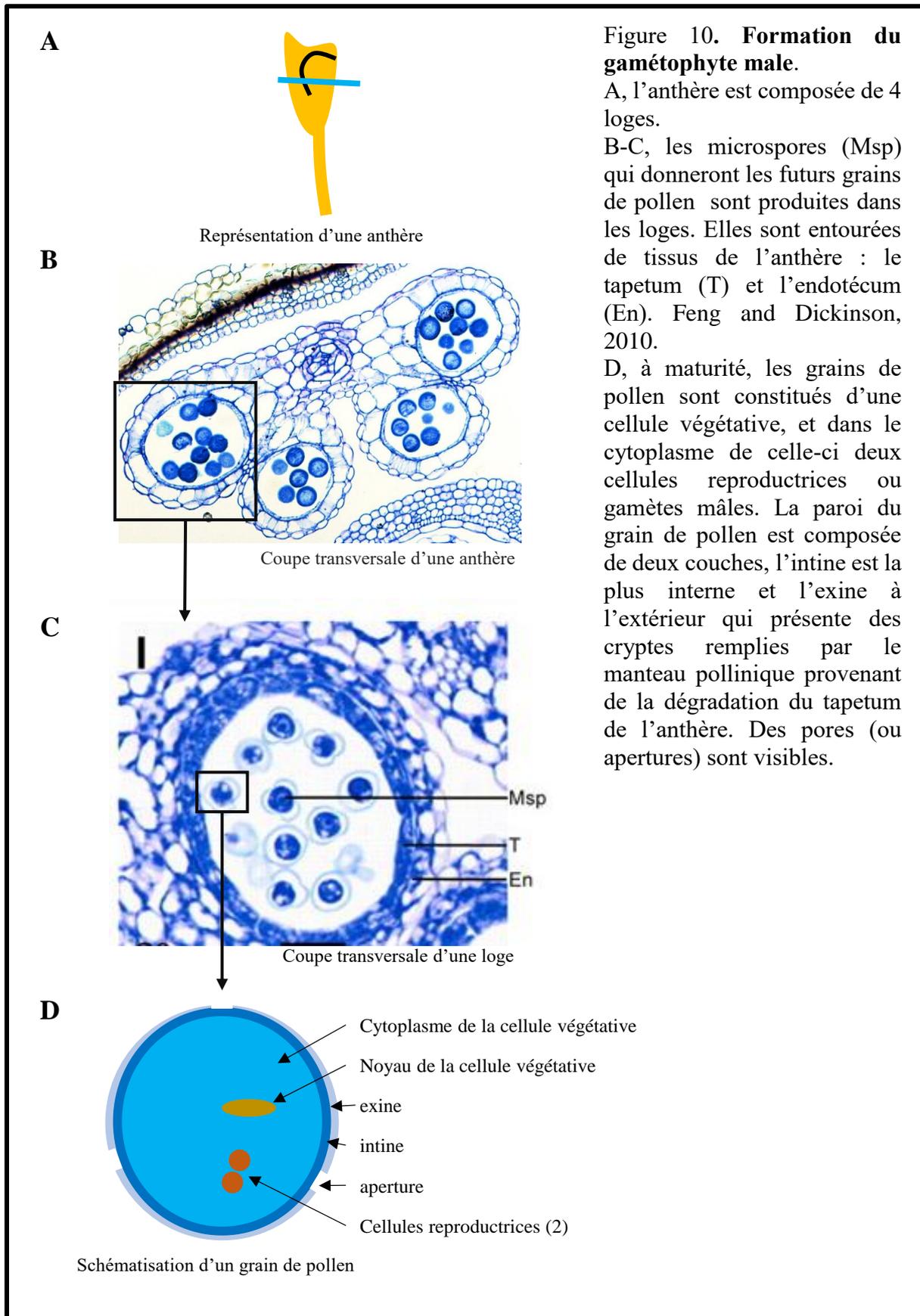


Figure 10. **Formation du gamétophyte male.**

A, l'anthère est composée de 4 loges.

B-C, les microspores (Msp) qui donneront les futurs grains de pollen sont produites dans les loges. Elles sont entourées de tissus de l'anthère : le tapetum (T) et l'endotécum (En). Feng and Dickinson, 2010.

D, à maturité, les grains de pollen sont constitués d'une cellule végétative, et dans le cytoplasme de celle-ci deux cellules reproductrices ou gamètes mâles. La paroi du grain de pollen est composée de deux couches, l'intine est la plus interne et l'exine à l'extérieur qui présente des cryptes remplies par le manteau pollinique provenant de la dégradation du tapetum de l'anthère. Des pores (ou apertures) sont visibles.

important lors de l'interaction du pollen avec la surface du stigmate (Doughty et al., 2000). A maturité, les grains de pollen sont déshydratés et de forme ovale. Ils sont alors libérés de l'anthere au niveau d'une zone de déhiscence. Chez *A.thaliana*, les anthères apparaissent au stade 5 selon le descriptif de Smyth et coll. (Smyth et col en 1990). Au stade 8, les loges deviennent visibles. Les anthères continuent leur développement jusqu'au stade 13 ou elles deviennent déhiscentes et libèrent les grains de pollen (Smyth et al., 1990).

A maturité, le grain de pollen d'*A.thaliana* est formé de trois cellules haploïdes. La cellule végétative occupe la totalité du volume du grain de pollen et sa fonction principale est d'assurer la survie du grain de pollen. Les deux cellules reproductrices ou gamètes mâles, appelées encore cellules spermatiques, sont plus petites et englobées dans le cytoplasme de la cellule végétative (figure 10). La paroi du grain de pollen est composée de deux couches : l'une externe, l'exine, très résistante, constituée essentiellement de sporopollenine, et l'autre contiguë à la membrane plasmique, l'intine, plus mince et composée de pectines et cellulose. L'exine comporte des ouvertures (point de moindre résistance) dont le nombre varie selon les espèces. Elles sont au nombre de trois et oblongues chez *Arabidopsis*. Le manteau pollinique représente 10 à 15 % du poids total du grain de pollen, est composé d'une couche de lipides (tels que des stérols, des alcanes et des acides gras libres), de protéines (dérivant d'oléo-protéines telles que des protéines riches en glycine, les GRP), et de moindre importance d'enzymes telles que des estérases et des lipases (Murphy, 2006).

II.2.2 Rencontre entre les deux partenaires : dialogue moléculaire

A maturité, les anthères libèrent les grains de pollen. Dans les fleurs hermaphrodites, la proximité des organes reproducteurs permet aux grains de pollen de se déposer sur le stigmate situé à proximité (figure 11A). Ils peuvent également être véhiculés par le vent ou les insectes pour se déposer sur le stigmate d'une autre fleur (figure 11B). Au contact de la papille stigmatique le grain de pollen va subir plusieurs étapes. Il va adhérer, s'hydrater puis émettre un tube pollinique (germination) qui va croître dans les tissus femelles jusqu'aux ovules où le tube va libérer son contenu cytoplasmique.

II.2.2.1 L'adhésion

L'adhésion du grain de pollen sur la papille stigmatique est initiée par une reconnaissance spécifique de composés à la surface de chacun des deux partenaires. Cependant,

le mode d'adhésion diffère selon qu'il s'agisse de la rencontre du pollen avec un stigmate humide recouvert d'exsudats et d'un stigmate sec. Les pollens déposés sur les stigmates humides adhèrent facilement alors qu'un tri cellulaire plus strict est mis en place au niveau des stigmates secs. Sur ce dernier, une force d'adhésion permet au grain de pollen de rester collé à la papille stigmatique (figure 11C). Les glycoprotéines sécrétées par le stigmate et les composants du manteau pollinique interviennent dans cette force d'adhésion (Zinkl et al., 1999). Chez les Brassicacées, la suppression de protéines à la surface de la papille par traitement avec une protéase diminue la force d'adhésion du pollen (Roberts et al., 1980). Deux protéines stigmatiques de séquences proches : *S-Locus Glycoprotéine (SLG)* et *S-Locus Related 1 (SLR1)* ont été décrites comme intervenant dans l'adhésion entre le pollen et le stigmate. Ces deux protéines s'associent avec de petites protéines présentes dans le manteau pollinique qui sont respectivement *PCP-A1* et *SLR1-BP* (Doughty et al., 1993; Takayama et al., 2000a). Des études de croisements interspécifiques ont démontrées que la force d'adhésion était moindre dans les croisements entre espèces éloignées (Luu et al., 1997; Zinkl et al., 1999). Coté pollen, chez *A.thaliana*, plusieurs mutants défectueux dans la composition lipidique ou ayant une structure irrégulière de la couche externe du gamétophyte mâle ont été décrits pour leur perte d'adhésion (Zinkl and Preuss, 2000). De même, la suppression du manteau pollinique par traitement chimique produit également une perte d'adhésion du pollen avec la papille stigmatique (Zinkl et al., 1999).

Au cours de l'adhésion chez les espèces présentant un stigmate sec, le manteau pollinique et la couche externe de la papille fusionne pour former une structure appelée « foot » (figure 11C). Ce « foot » permet le passage de molécules de la papille vers le grain de pollen (Chapman and Goring, 2010).

II.2.2.2 Hydratation du pollen

Le pollen arrivant déshydraté à la surface du stigmate, un efflux d'eau de la papille vers le pollen est nécessaire pour réactiver son métabolisme cellulaire et ainsi permettre la germination. L'hydratation du pollen semble passive et sans régulation sur les stigmates sécrétant des exsudats (Swanson et al., 2004). Les stigmates secs en opposition, régulent l'hydratation des grains de pollen. Cette hydratation est visible par la modification de forme du grain de pollen (figure 11C). D'une forme ovale, il gonfle et devient sphérique. Le stade de développement du stigmate influe sur l'hydratation du pollen. Chez *A.thaliana*, entre le stade 8 et le stade 11 (stigmate immature), l'hydratation du pollen est plus longue qu'au stade 13 où les

papilles sont matures (Ma et al., 2012). Les composés contenus dans le manteau pollinique du grain de pollen des espèces à stigmate sec jouent un rôle important dans le système de capillarité facilitant le flux d'eau de la papille stigmatique vers le grain de pollen (Murphy et al., 2012).

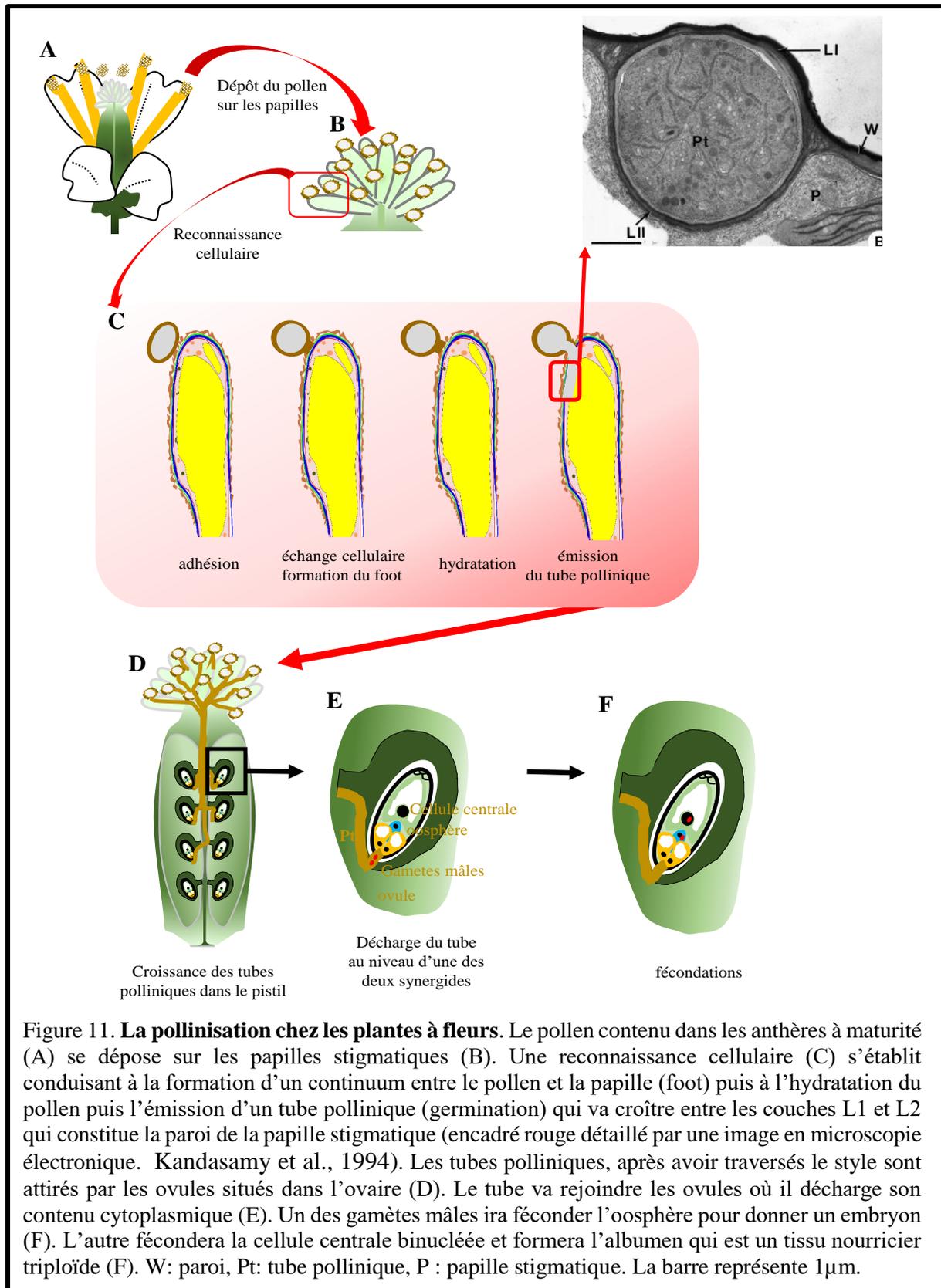


Figure 11. **La pollinisation chez les plantes à fleurs.** Le pollen contenu dans les anthères à maturité (A) se dépose sur les papilles stigmatiques (B). Une reconnaissance cellulaire (C) s'établit conduisant à la formation d'un continuum entre le pollen et la papille (foot) puis à l'hydratation du pollen puis l'émission d'un tube pollinique (germination) qui va croître entre les couches L1 et L2 qui constitue la paroi de la papille stigmatique (encadré rouge détaillé par une image en microscopie électronique. Kandasamy et al., 1994). Les tubes polliniques, après avoir traversés le style sont attirés par les ovules situés dans l'ovaire (D). Le tube va rejoindre les ovules où il décharge son contenu cytoplasmique (E). Un des gamètes mâles ira féconder l'oosphère pour donner un embryon (F). L'autre fécondera la cellule centrale binucléée et formera l'albumen qui est un tissu nourricier triploïde (F). W: paroi, Pt: tube pollinique, P : papille stigmatique. La barre représente 1µm.

Le pollen des mutants mâles stériles *cer*, ne possédant pas de lipides à longue chaîne normalement présents dans le manteau pollinique ne s'hydrate pas sur la papille stigmatique en condition normale d'hygrométrie (Preuss et al., 1993). Les protéines les plus représentées dans le manteau pollinique sont des Glycine Rich Protein (GRP) (Abell et al., 2004). Elles proviennent de la dégradation du tapetum lors de la maturation du grain de pollen (Lévesque-Lemay et al., 2016). Plusieurs GRPs sont présentes au niveau du manteau pollinique. La plus abondante est GRP17. Un mutant « perte de fonction » pour cette protéine (*grp17-1*) montre un retard d'hydratation (Mayfield and Preuss, 2000). Deux protéines Extra Cellular Lipase (EXL4 et EXL6) également fortement représentées dans le manteau pollinique ont une activité estérase. Un retard d'hydratation est observé dans le mutant *exl 4-1* associant ainsi le rôle de cette protéine à l'hydratation du grain de pollen et à la mise en place de connexion entre le pollen et la papille stigmatique par une activité hydrolytique (Updegraff et al., 2009).

II.2.2.3 Germination du pollen et émission d'un tube pollinique

L'hydratation du pollen s'accompagne d'une activation des processus métaboliques et d'une synthèse de protéines. Une réorganisation du cytosquelette d'actine permet de polariser la cellule végétative en vue de l'extension d'un tube qu'on appelle le tube pollinique. Les gamètes mâles étant immobiles, c'est par le tube pollinique qu'ils pourront traverser les tissus du pistil et atteindre les ovules. La polymérisation des filaments d'actine est visible à la pointe du futur tube pollinique (Cameron and Geitmann, 2018a). Dans la plupart des espèces, l'émergence du tube pollinique ne se fait pas au hasard mais se produit là où l'exine est plus fine, au niveau des ouvertures. Chez *A.thaliana*, le tube pollinique émerge au point de contact entre le grain de pollen et la papille stigmatique qui parfois ne correspond pas à une ouverture (Edlund et al., 2004b).

II.2.2.4 Pénétration du tube pollinique dans la papille stigmatique et croissance du tube dans les tissus femelles

La croissance du tube pollinique dans le stigmate diverge selon les espèces. Chez les Brassicacées, la pénétration du tube pollinique nécessite la digestion de la paroi de la papille stigmatique. Les enzymes secrétées par le grain de pollen et le tube pollinique jouent un rôle important pour cette pénétration. Des activités nucléasiques, estérasiques et protéasiques ont été localisées au niveau de l'intine du pollen et du tube pollinique (Edlund et al., 2004). Le contact établi par l'intermédiaire du « foot » entre la papille stigmatique et le pollen permet de

guider la croissance du tube pollinique vers les tissus de la papille. Les images en microscopie électronique à transmission ont démontré que la paroi de la papille stigmatique est composée de deux sous-couches. Le tube durant sa croissance grandit entre ces deux couches (figure 11 C) (Elleman et al., 1992; Kandasamy et al., 1994). Les enzymes sécrétées par le tube permettent sa croissance au travers des tissus femelles. Le tube pollinique s'étend uniquement pas son extrémité, on parle de croissance de pointe (« tip growth ») (Cameron and Geitmann, 2018b). Son extension polarisée est visible par une concentration de vésicules à l'apex du tube permettant d'acheminer les éléments indispensables à la synthèse de la paroi (Hepler et al., 2013).

Chez les papavéracées, le tube pénètre la cuticule et se développerait entre la cuticule et la paroi. Chez les composées, telle que *Helianthus annuus*, le tube ne pénètre pas la cuticule mais croît dans la matrice extracellulaire de sécrétions émises par les papilles stigmatiques (Elleman et al., 1992).

Des signaux émis par les tissus femelles et notamment les ovules, permettent de diriger le tube pollinique dans le pistil. Des expériences *in vitro* ont montré que pour percevoir les signaux ovulaires, le tube pollinique doit tout d'abord passer dans le stigmate et le style. En effet, des grains de pollen déposés sur un milieu de culture « *in vitro* » aqueux s'hydratent et émettent un tube pollinique qui croît aléatoirement, incapable de rejoindre un ovule placé sur le milieu de culture. A l'inverse, si les grains sont préalablement déposés sur une portion du pistil coupée, contenant le stigmate et le style, les tubes émergent de la partie coupée et rejoignent les ovules. Ceci indique un pré-conditionnement du tube pollinique à percevoir les signaux émis par les ovules, lors du passage par le stigmate/style (Zheng et al., 2018).

Arrivé à la base des papilles, le tube pollinique continue sa croissance dans le style puis l'ovaire, au niveau du tissu de transmission, quelle que soit l'espèce considérée (figure 11 D). Le tissu de transmission est composé de cellules sécrétant une matrice dont la fonction proposée serait de guider la croissance des tubes ainsi que de fournir les éléments nutritifs nécessaires à son élongation (Lennon et al. 1998). Lorsque le tube arrive au niveau d'un ovule, il va émerger du tissu de transmission attiré par les signaux ovulaires puis rejoindre l'ovule.

II.2.2.5 Décharge du tube et fécondation

Le tube pénètre l'ovule au niveau du micropyle constituant un passage vers le sac embryonnaire (figure 11E). Il va entrer dans une des synergides puis éclater afin de libérer son

contenu cytoplasmique. FERRONIA, un récepteur kinase localisé dans la membrane épaisse des synergides (appareil filiforme) perçoit la pénétration du tube pollinique dans la synergide activant un flux calcique associé à l'éclatement du tube pollinique et à la libération des gamètes mâles (Liu et al., 2016). Un des gamètes ira féconder l'oosphère pour former l'embryon diploïde alors que le second fusionnera avec la cellule centrale binucléée pour donner une cellule triploïde qui évoluera en tissu nourricier (figure 11F).

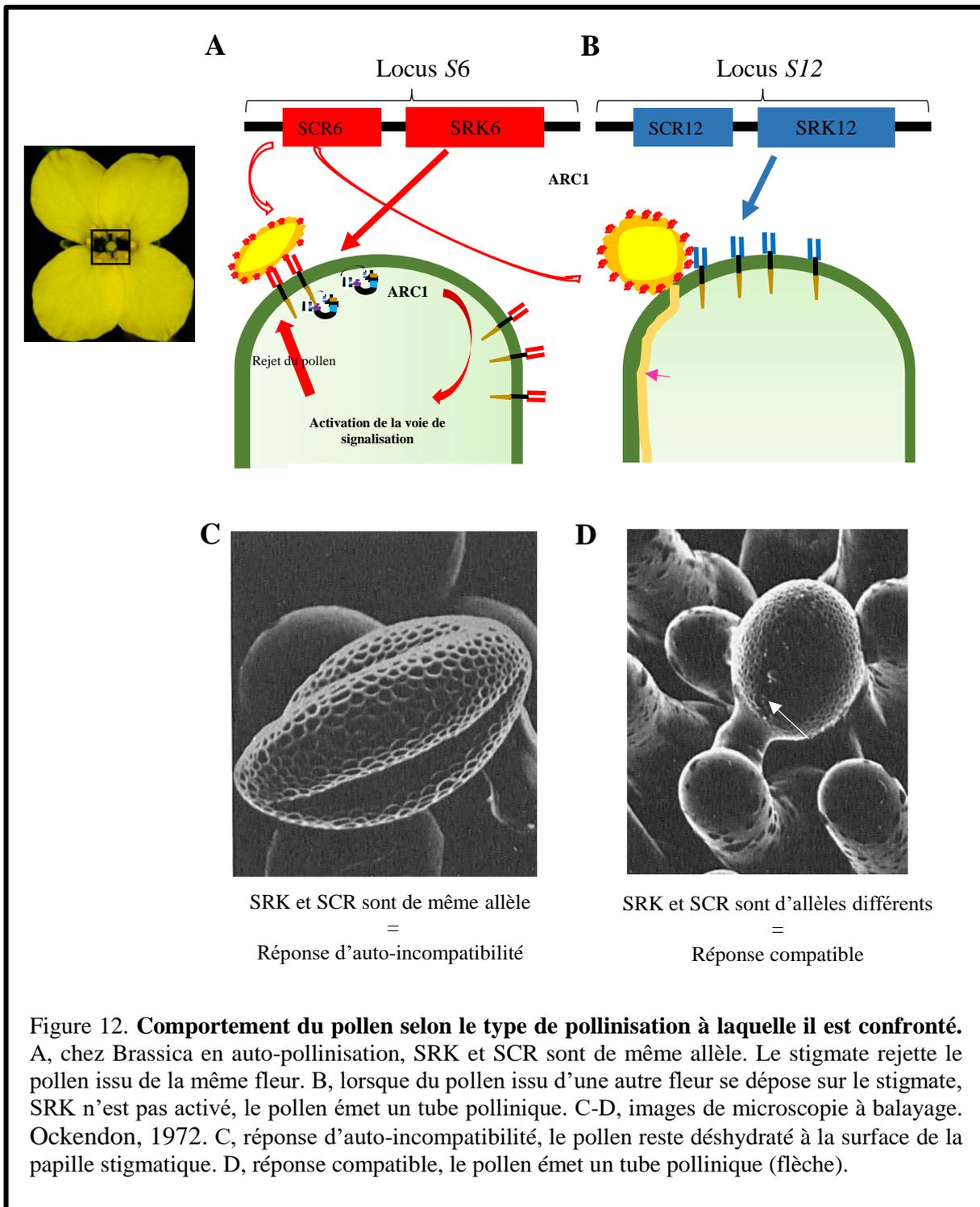
II.3 LA COMMUNICATION CELLULAIRE AU NIVEAU DE LA PAPILLE STIGMATIQUE

La papille stigmatique est la première cellule femelle à laquelle le pollen est confronté au moment de la pollinisation. On parle de compatibilité quand la papille accepte le grain de pollen, permet son hydratation et la croissance du tube pollinique. Le terme incompatibilité apparaît lorsque la papille ne reconnaît pas le grain de pollen dû à des différences morphologiques ou biochimiques entre des espèces éloignées. De plus, environ 50% des espèces ont la particularité de rejeter leur propre pollen afin d'éviter l'autopollinisation et favoriser ainsi les croisements entre individus génétiquement différents. Chez les Solanées, les Rosacées et les Papavéracées, la réponse d'auto-incompatibilité vise à détruire le tube pollinique lors de son développement dans le pistil impliquant des événements de mort cellulaire. Chez les Brassicacées, la réponse d'auto-incompatibilité intervient dès le premier contact entre le pollen et la papille stigmatique. Elle engendre une voie de signalisation en cascade qui se traduit par un blocage de l'hydratation du grain de pollen (Ockendon, 1972).

II.3.1 La réponse d'auto-incompatibilité chez les Brassicacées

La réponse d'auto-incompatibilité chez les Brassicacées dépend de deux gènes situés sur le même locus : le locus *S* (Kachroo et al., 2002). Ce locus est multi-allélique et on utilise le terme d'haplotype *S* pour désigner les différents variants du locus *S* ; il existe par exemple plus de 100 haplotypes *S* différents chez l'espèce *Brassica oleracea* (chou fourrager). Le récepteur kinase SRK (*S*-locus Receptor kinase) (Stein et al., 1991), localisé à la membrane plasmique des papilles stigmatiques, et son ligand SCR (*S*-locus Cysteine Rich) (Schopfer et al., 1999b; Takayama et al., 2000b) présent dans la paroi du grain de pollen, sont les acteurs clé de la réponse d'auto-incompatibilité. Si les deux partenaires de la pollinisation, stigmate et pollen, expriment des protéines SRK et SCR portant le même allèle (par exemple, SRK6 et

SCR6 de l'haplotype *S6*), alors la réponse d'auto-incompatibilité sera déclenchée et le pollen sera rejeté (figure 12) (Kachroo et al., 2002; Ockendon, 1972).



Le récepteur SRK est constitué de trois domaines codés par un ou un groupe d'exons (Nou et al., 1993; Stein et al., 1991). L'exon 1 correspondant à la partie extracellulaire de la protéine qui est riche en résidus cystéine et comprend un peptide signal à son extrémité. L'exon

2, correspondant au domaine transmembranaire de la protéine, code une suite d'acides aminés hydrophobes. Les exons 3 à 7 correspondent à un domaine catalytique kinase (Stein et al., 1991). Le niveau d'expression de la protéine SRK augmente avec la maturité du stigmate pour être maximal lorsque les papilles sont réceptives au grain de pollen, au stade 13 de développement du stigmate (Nasrallah et al., 2002).

Le gène *SCR* code un polypeptide de 74 à 77 acides aminés riche en résidus cystéine. La protéine *SCR* est hydrophile sauf à son extrémité N-terminale où 19 acides aminés hydrophobes sont présents (peptide signal). L'analyse en expression d'ARN démontre que *SCR* est spécifique des anthères et n'est présent dans aucun autre tissu de la plante. *SCR* est produit dans le tapetum et migre vers le manteau pollinique durant la formation du grain de pollen (Schopfer et al., 1999b).

Dans le genre *Brassica* il existe un troisième gène lié au locus *S* : le gène *SLG* (Nasrallah and Wallace, 1967). La séquence peptidique de *SLG* comporte de fortes homologies avec le domaine extracellulaire de *SRK*. Son rôle n'est pas clairement défini car certains haplotypes *S* de *Brassica* et d'espèces d'*Arabidopsis* auto-incompatibles sont dépourvus de gène *SLG*. Il a été suggéré que *SLG* pourrait augmenter la force de la réponse d'auto-incompatibilité chez certains haplotypes *S* (Kitashiba and Nasrallah, 2014).

Beaucoup d'espèces au cours de l'évolution ont perdu leur réponse d'auto-incompatibilité (Igic et al., 2008). Dans le genre *Arabidopsis*, *A. kamchatica* et *A. thaliana* sont auto-compatibles (Tsuchimatsu et al., 2012). Concernant l'espèce *A. thaliana*, plante modèle la plus utilisée en recherche fondamentale, la perte de la réponse d'auto-incompatibilité relève de mutations inactivant *SRK* et/ou *SCR* (Boggs et al., 2009; Kusaba et al., 2001). Cependant, la réintroduction par transgénèse de gènes *SRK* et *SCR* fonctionnels, provenant de l'espèce auto-incompatible *A. lyrata*, réactive la réponse d'auto-incompatibilité (Nasrallah et al., 2004).

II.3.2 Les réactions cellulaires de la papille confrontée à la pollinisation

La papille stigmatique réagit différemment selon le type de pollinisation (compatible ou incompatible) auquel elle est confrontée.

II.3.2.1 Trafic cellulaire

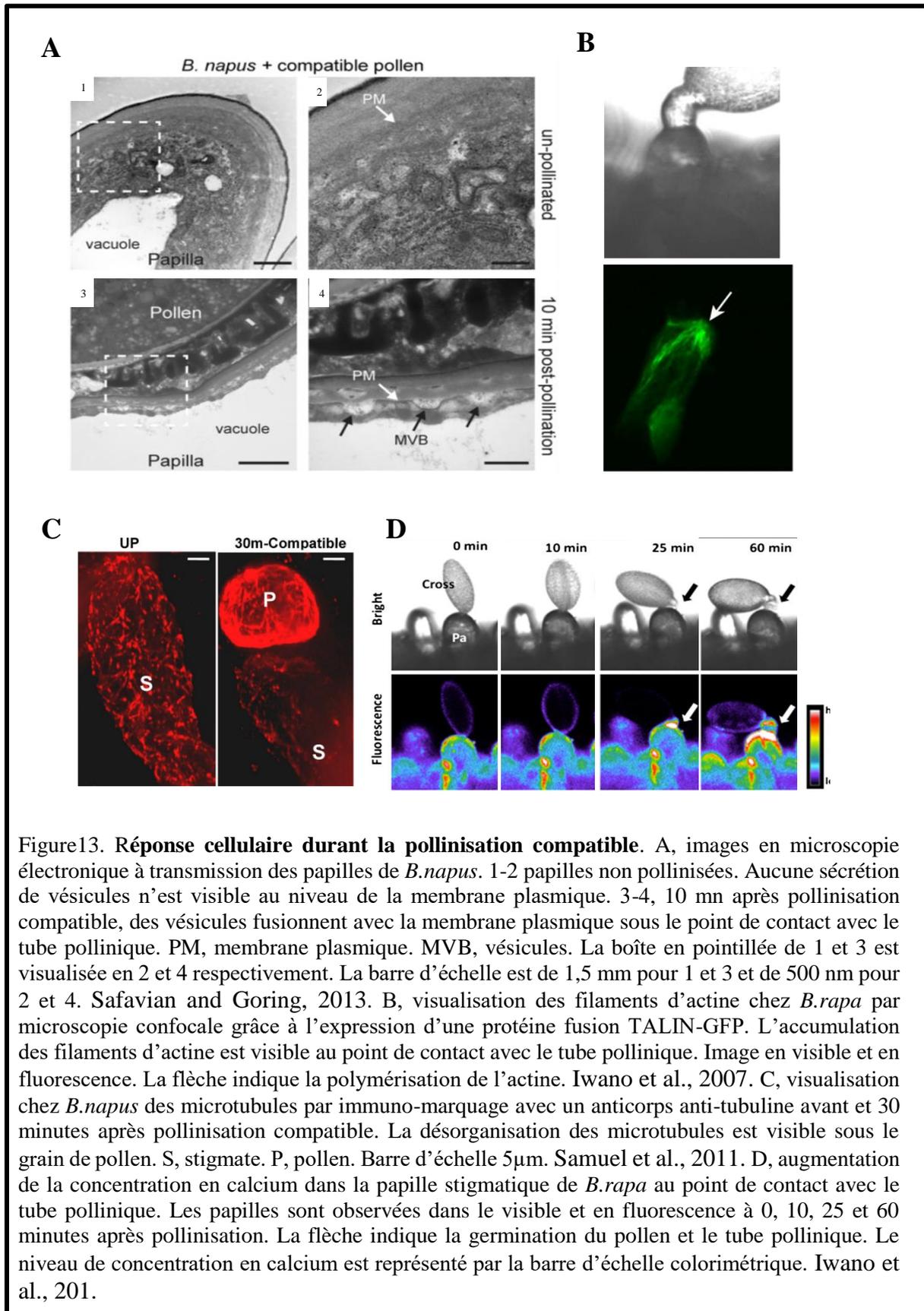
En situation compatible, l'hydratation du pollen nécessite un apport d'eau depuis la papille stigmatique (Swanson et al., 2004; Updegraff et al., 2009; Zinkl et al., 1999). Par microscopie électronique à transmission, Dickinson en 1995 a montré la présence de vésicules dans la papille

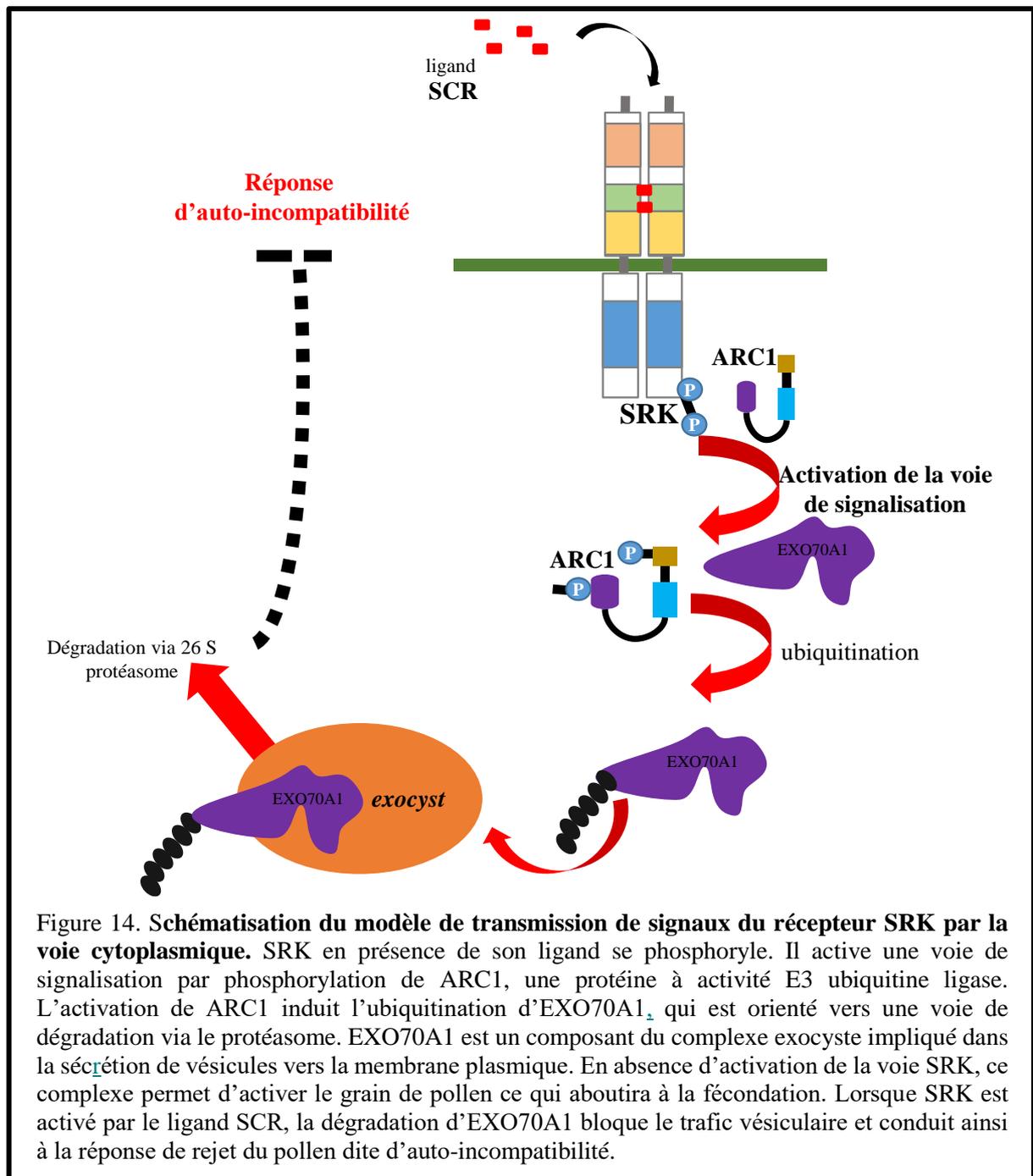
stigmatique au point de contact avec le grain de pollen durant sa phase d'hydratation et plus tard pendant la croissance du tube pollinique dans la papille de *B.oleracea* (Dickinson, 1995).

Plus récemment, il a été montré que le complexe exocyste était impliqué dans le ciblage de vésicules à la membrane plasmique sous le grain de pollen en situation compatible (figure 13A) (Safavian and Goring, 2013). Le complexe exocyste est composé de huit protéines présentes sous différentes formes alléliques. Il agit en complexe avec de multiples fonctions (basées selon les multiples isoformes de la protéine EXO70) allant de la régulation de l'exocytose au recyclage de molécules à la membrane plasmique ainsi qu'à des voies de dégradation via le protéasome. En réponse compatible, l'émission de tubes polliniques sur des mutants présentant un défaut d'expression de la protéine EXO70A1 est fortement réduite (Safavian et al., 2015; Samuel et al., 2009) démontrant l'importance du complexe exocyste dans la croissance du tube pollinique.

En situation incompatible, dans le genre Brassica, aucune vésicule n'est présente à la membrane plasmique au point de contact entre les deux partenaires (Goring, 2018; Safavian and Goring, 2013) conduisant à une absence d'hydratation des grains de pollen. La reconnaissance du ligand SCR par son récepteur SRK présent à la membrane plasmique induit une cascade de phosphorylation (Stein and Nasrallah, 1993) cytoplasmique visible par le rejet du pollen à la surface du stigmate (Watanabe et al., 2003). L'auto-phosphorylation de SRK par reconnaissance de son ligand permettrait la phosphorylation de ARC1, un effecteur qui se lie au domaine kinase de SRK (Stone et al., 1999). ARC1, une protéine à activité E3 ubiquitine ligase, induit une ubiquitination de EXO70A1 conduisant le complexe exocyste vers la voie de dégradation via le protéasome (figure 14) (Samuel et al., 2009; Stone et al., 2003). L'inhibition de l'expression de ARC1 permet l'hydratation des grains de pollen et l'émission de tubes qui pénètrent la papille stigmatique chez Brassica naturellement auto-incompatible (Stone et al., 1999). Ces données confirment que l'effecteur entre SRK et l'exocyste serait ARC1 dans la réponse d'auto-incompatibilité.

Un trafic cellulaire au niveau de la papille stigmatique est donc important pour permettre une germination normale du grain de pollen (figure 13A). Et selon le modèle proposé par l'équipe de Goring, l'absence de ce trafic pourrait être à l'origine de la réponse d'auto-incompatibilité et au blocage du pollen incompatible.





II.3.2.2 Mouvement du cytosquelette

Dans les cellules végétales comme dans toutes les cellules, le cytosquelette est représenté sous deux types de structures : les filaments d'actine et les microtubules. Dans les cellules végétales, le cytosquelette d'actine est impliqué dans le transport de vésicules et d'organites (Cheung et al., 2008). Au niveau de la papille stigmatique, un réarrangement des filaments d'actine est visible au point de contact entre la papille et le grain de pollen puis plus tard au moment de l'émergence du tube pollinique (figure 13B) (Iwano et al., 2007). La

dépolymérisation de l'actine, au niveau des papilles, avec la drogue Cytochalasin D inhibe la germination des grains de pollen compatibles démontrant l'importance de l'actine dans la réponse compatible (Iwano et al., 2007). Il a été proposé que la focalisation de filaments d'actine au point de contact avec le pollen pourrait être impliquée dans le transport des vésicules nécessaires à l'hydratation et la germination du pollen (Iwano et al., 2007). Lorsque la papille stigmatique est confrontée à un pollen incompatible, une dépolymérisation de l'actine au point de contact a été observée et les auteurs ont suggéré que cette dépolymérisation aurait un rôle dans la réponse de rejet du pollen (Iwano et al., 2007).

Le rôle des microtubules dans la pollinisation est moins clair. La déstabilisation du réseau de microtubules, soit par une drogue soit chez un mutant, accélère la germination du pollen compatible alors que ces traitements n'ont aucun effet sur la pollinisation incompatible (figure 13C) (Samuel et al., 2011).

II.3.2.3 Le calcium

Une augmentation significative du niveau de calcium dans la papille est visible au point de contact avec le grain de pollen compatible et durant la pénétration du tube pollinique (Iwano et al., 2014) (figure 13D). Ce signal calcique est dû à un efflux de calcium depuis la papille stigmatique vers le pollen. Une analyse en transcriptomique a permis d'identifier une pompe calcique (ACA13). Cette pompe est présente dans des vésicules avant pollinisation et s'accumule à la membrane plasmique au point de contact avec le tube pollinique émergent (Iwano et al., 2014). Le calcium ainsi libéré par la papille stigmatique pourrait être mobilisé par le grain de pollen pour la germination et la croissance du tube pollinique. Le pollen incompatible provoque également une augmentation du calcium cytoplasmique dans la papille mais cette augmentation est dû à un influx probablement depuis des stocks extracellulaires (Iwano et al., 2015). Une analyse pharmacologique a montré que cet influx de calcium est nécessaire et suffisant pour induire la réponse d'auto-incompatibilité et qu'il dépend de l'activité d'un récepteur au glutamate (GLR) (Iwano et al., 2015).

II.3.3 Conclusion

Les papilles stigmatiques, cellules épidermiques situées à l'extrémité de l'organe reproducteur femelle, sont capables de percevoir des signaux extracellulaires provenant du pollen et de produire une réponse cellulaire adaptée. Ainsi, elles représentent un modèle de choix pour l'étude de la communication cellulaire chez les plantes.

III. PARTIE EXPERIMENTALE

III.1 CONTEXTE

La fécondation chez les plantes à fleurs résulte d'une communication étroite entre les partenaires mâles et femelles depuis le dépôt du grain de pollen à l'extrémité du pistil jusqu'à la fusion des gamètes. Dans cette partie expérimentale, nous ne nous intéresserons qu'aux étapes précoces de l'interaction entre le pollen et les papilles stigmatiques qui jouent un rôle fondamental dans la discrimination du pollen chez les Brassicacées.

Les différentes études reportées dans la littérature sur la réponse précoce des papilles stigmatiques à la pollinisation concernent majoritairement le genre *Brassica* (Chapman and Goring, 2010; Iwano et al., 2007, 2015; Schopfer et al., 1999). Peu de données en imagerie du vivant ont été reportées dans ce genre *Brassica* peut être dû à la complexité de la transgénèse visant à introduire des molécules fluorescentes de façon stable. Le groupe de June et Mike Nasrallah aux Etats-Unis a démontré en 2002 qu'il était possible de restaurer la réponse d'auto-incompatibilité chez *A.thaliana* ouvrant ainsi la voie à un autre modèle d'étude sur la pollinisation chez les plantes à fleurs (Nasrallah et al., 2002). Depuis les études sur la pollinisation se sont développées sur l'espèce *A.thaliana* qui présente une large gamme de mutants (stock center) et une facilité à la transgénèse (Clough and Bent, 1998; Zhang et al., 2006).

Notre projet vise à développer l'imagerie du vivant chez *A.thaliana* au cours des premières étapes de la pollinisation afin de visualiser le comportement du pollen ainsi que les mouvements de compartiments cellulaires dans la papille stigmatique en réponse à la pollinisation compatible et incompatible. Pour cela, dans un premier temps, nous avons introduit des protéines fluorescentes dans des lignées transgéniques *A.thaliana* disponibles au laboratoire. Dans une seconde étape, nous avons développé un protocole nommé « système semi *in vivo* » qui permet de suivre par microscopie confocale ces protéines fluorescentes qui s'expriment au niveau des organes reproducteurs mâles et femelles.

III.2 MATERIEL ET METHODE

III.2.1 Culture des plantes en chambre de culture

Les plantes sont cultivées sur du terreau (terre blonde 70%, terre brune 30%, argile 60kg/m³, chélate de fer 2,5g/m³). Elles sont déposées dans des chambres de culture en alternance de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'éclairage est constitué de luminaires LED de chez Valoya ; le spectre est le NS12 avec une couverture supérieure à 90% du spectre solaire et d'intensité de 150 micromoles/m²/s. Les plantes sont fertilisées avec de l'engrais Peters excel

avec acidifiant 20-10-20-2MgO+MO à raison de 1 cuillère (3,5g) pour 6 litres à chaque arrosage. L'hygrométrie est réglée à 60% la journée et 63 % la nuit.

III.2.2 Plantes disponibles au laboratoire

Nous disposons de lignées transgéniques *A.thaliana* dans lesquelles les gènes de réponse à l'auto-incompatibilité SRK allèle *S14* (*SRK14*) et SCR allèle *S14* (*SCR14*) d'*A.lyrata* ont été introduits. *SRK14* a été introduit dans l'écotype Col-0 sous le contrôle du promoteur pSLR1, issu de *B. oleracea*, et s'exprimant spécifiquement au niveau du stigmate (pSLR1-*SRK14* - PK7//Col0). L'écotype C24 a été transformé avec le gène *SCR14* sous le contrôle de son propre promoteur (pg*SCR14* -PB7//C24). La sélection des lignées en vue d'obtenir des plantes avec une insertion unique du transgène et à l'état homozygote a été réalisée grâce à un marqueur de sélection basta (PB7) ou kanamycine (PK7).

Des plantes présentant un marquage fluorescent au niveau des filaments d'actine dans les papilles stigmatiques ont également été générées en transformant la lignée pSLR1-*SRK14*-PK7//Col0 avec la molécule fusion *venus*-lifeact introduite sous le contrôle du promoteur pSLR1 (tableau 1).

III.2.3 Plasmides disponibles au laboratoire

Des séquences d'ADN correspondant à des promoteurs, des gènes d'intérêt ou des séquences de molécules fluorescentes disponibles au niveau de l'équipe ont été introduites dans des vecteurs compatibles avec la technologie de clonage du système Gateway (INVITROGEN).

Les promoteurs pSLR1, pLat52, pAct11, pGRP17 ont été introduits dans le vecteur pENTR5'. Les molécules fluorescentes mTurquoise, mCherry et RedFP ont été introduites dans le vecteur pENTR3'. Le gène GRP17 a été introduit dans le vecteur pDON221.

III.2.4 Plasmides générés pour l'étude

Différentes recombinaisons LR avec le système Gateway entre des plasmides présents au laboratoire et des vecteurs de destination (PK7m34GW, PH7m34GW ou PB7m34GW) ont permis de générer des plasmides pour la transformation des plantes. Ces vecteurs sont introduits dans la bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α par choc thermique. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu de culture sélectif LB (Bertani, 1951) à 37°C durant 24h00. Les clones d'intérêt sont amplifiés en culture liquide. Les plasmides sont ensuite extraits par

lyse des bactéries puis isolés par purification sur colonne (kit Macherey Nagel ref : 740588.250). Les clones sont séquencés afin de confirmer la conformité des séquences introduites.

III.2.5 Transformation des plantes *A.thaliana*

Les vecteurs d'intérêt sont introduits, par électroporation, dans *Agrobacterium tumefaciens* qui a la capacité de transférer des morceaux d'ADN plasmidiques dans le génome des plantes. Les agrobactéries possédant le plasmide recombiné sont amplifiées durant 48h00 sur le milieu de culture YEB (Vervliet et al., 1975) avec des agents de sélection, puis dilués dans une solution de chlorure de magnésium à 10 mM, 5% de saccharose et 0.03% de silwet. Les inflorescences d'*A.thaliana* ont été trempées dans la suspension d'agrobactéries, puis les plantes ont été déposées en chambre de culture jusqu'à l'obtention des graines de première génération ou T1 (10 semaines). Les lignées ainsi générées sont listées dans le tableau 1.

III.2.6 Sélection des plantes transgéniques

Les graines issues de la transformation (T1) sont stérilisées avec de la javel (3 gr de chlore actif, 50 µl tween 20 (sigma réf p2287) dans 100 ml H₂O). Les graines issues de la T2 (2^{ème} génération) sont stérilisées dans un mixte éthanol/javel. Les graines sont semées sur un milieu de culture MS (Murashige et Skoog, Duchefa réf : M0221) supplémenté de 1% de saccharose (Duchefa ref : S0809) et 0.8% de Plant Agar (Duchefa réf : P1001). Le pH est ajusté à 5,6 avec du KOH. Le milieu de culture est stérilisé 20 min à 120°C. Les facteurs de sélection (kanamycine, glufosinate et hygromycine) sont ajoutés au milieu de culture quand la température du milieu est d'environ 55°C. Les plantules sont cultivées durant 10 jours en armoire de culture à 21 °C avec une alternance jour/nuit de 16h00/8h00 sous une lumière Orsam Biolux L36W (éclairage blanc) et Sylvania Gro-lux F 36W (spectre lumineux dans le rouge et le bleu). Les plantules résistantes sont repiquées sur du terreau et cultivées dans les conditions décrites ci-dessus.

III.2.7 Phénotype de compatibilité ou incompatibilité des lignées transgéniques

Le comportement du pollen, en situation compatible et incompatible, est analysé par la coloration au bleu d'aniline qui permet de visualiser les tubes polliniques (annexe 1) (Webb and Williams, 1988). Les boutons au stade 12 précoce (avant maturité du stigmate) sont

émasculés par suppression des anthères immatures. Les plantes sont laissées une nuit en chambre de culture. La pollinisation est réalisée, au stade 13-14, le lendemain par recouvrement des stigmates avec du pollen provenant d'anthères déhiscentes. Six heures après pollinisation, les stigmates sont prélevés, fixés dans une solution d'acide acétique à 10% et d'éthanol à 50%, hydrolysés dans une solution de NaOH 4N deux heures à température ambiante puis colorés dans une solution au bleu d'aniline dilué à 0.01% dans un tampon phosphate de pH 7.5. Les stigmates sont observés au microscope Zeiss imager M2, sous une lampe HXP120C et avec un filtre DAPI. Les grains de pollen et les tubes polliniques sont visibles par épi-fluorescence. Le nombre de grains de pollen présents sur les papilles et le nombre de tubes polliniques émis présents dans le stigmate sont dénombrés puis répertoriés dans un tableau Excel. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R. Trois expériences indépendantes sont réalisées pour chaque condition.

III.2.8 Analyse de la production de graines

Les fleurs sont émasculées au stade 12. Les stigmates sont recouverts manuellement au stade 13-14 de grains de pollen. Les graines présentes dans les siliques sont dénombrées à quinze jours. Les expérimentations ont été répétées au moins trois fois.

III.2.9 Acquisition des images par microscopie confocale

Les images sont réalisées avec le microscope Leica SP8 à scanner résonnant et un objectif x25 à immersion à eau. Des prises de vue tous les 1 μm sont réalisées du haut de l'échantillon jusqu'à la limite d'obtention d'images de l'objectif (profondeur de champ).

La molécule mTurquoise (mtruq) est excitée par un laser diode 448. Les molécules « Venus » et Red Fluorescent Protein (RFP) sont excitées respectivement par un laser OPSL 488 et 552. Les longueurs d'onde émises par ces molécules sont réceptionnées respectivement entre 450-481, 510-551 et 598-648.

III.2.10 Analyses d'images

Les acquisitions d'images sont analysées avec le logiciel image J.

III.2.11 Mesure de l'hydratation du pollen

La pile d'images correspondant à chaque prise de vue est cumulée sur image J pour chacune des prises de vues afin de n'établir qu'une seule image par temps. Ce cumul de succession d'images (ou stack en anglais) permet de visualiser les longueurs et largeurs maximales de chacun des grains de pollen déposés sur les papilles stigmatiques. Les distances sont alors mesurées après calibration des images. La longueur et la largeur des pollens sont mesurées avec la fonction mesure d'image J. Les mesures sont répertoriées dans un tableau Excel. La longueur est divisée par la largeur (L/l) pour donner un chiffre exprimant la forme du pollen et correspondant au niveau d'hydratation.

III.2.12 Coloration des papilles stigmatiques au FM4-64.

Les papilles stigmatiques sont déposées trente-cinq minutes après pollinisation dans une solution FM4-64 à 8,63 μ molaires diluées dans un milieu MS/2 avec 100g/l de saccharose et un pH ajusté à 5,6. Les stigmates sont ensuite rincés rapidement dans le milieu MS/2 avant d'être déposés entre lame et lamelle pour être imagés au microscope confocal SP8.

Le FM4-64 est une molécule lipophile utilisée en biologie pour suivre les mouvements de vésicules membranaires (Bolte et al., 2004). Il ne pénètre pas la papille stigmatique, révélant ainsi le contour cellulaire. Le FM4-64 est observé par microscopie en fluorescence avec une excitation 515 nm et émission 640 nm.

III.2.13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques sont réalisées avec le logiciel R. La comparaison d'un ensemble d'expérimentation est réalisée par un test ANOVA. Les comparaisons deux à deux sont réalisées avec le test de Student quand la répartition des échantillons suit une loi normale ou avec le test de Wilcoxon lorsque les effectifs sont inférieurs à vingt ou ne suivent pas une répartition selon la loi normale.

III.3 RESULTATS

III.3.1 Analyse des lignées transgéniques

III.3.1.1 Restauration de la réponse d'auto-incompatibilité chez *Arabidopsis thaliana*

Nous avons réintroduit le gène *SRK* pour l'allèle *S14* d'*A. lyrata* dans l'écotype Col0 et le gène *SCR* pour ce même allèle *S14* dans l'écotype C24. Ces lignées ont été analysées pour leur réponse d'auto-incompatibilité (annexe 2). Les stigmates de la lignée femelle pSLR1-*SRK14*-PK7//Col0 ont été pollinisés au stade 13-14 avec du pollen de l'écotype C24 (sauvage) ou du pollen pg*SCR14*-PB7//C24 (incompatible). Le pollen pg*SCR14*-PB7//C24 déposé sur un stigmate sauvage produit de nombreux tubes polliniques ce qui montre que ce pollen est parfaitement viable. Lorsque les lignées femelles et les lignées mâles expriment le même allèle *S14*, la réponse d'auto-incompatibilité se met en place. Dans la littérature la réponse à la pollinisation est considérée auto-incompatible lorsque moins de cinq tubes polliniques sont présents sur l'ensemble du stigmate (Kitashiba et al., 2011). Nos lignées, avec en moyenne moins de cinq tubes polliniques par stigmate, présentent les caractéristiques décrites et correspondent à la mise en place d'une réponse d'auto-incompatibilité chez *A.thaliana*.

III.3.1.2 Les marqueurs fluorescents s'expriment dans les organes reproducteurs

Nous avons introduit des protéines fluorescentes dans la lignée femelle pSLR1-*SRK14*-PK7//Col0 et mâle pg*SCR14*-PB7//C24 afin de visualiser les partenaires mâles (pollen) et femelles (stigmate) par microscopie confocale (tableau1). La lignée pSLR1-*SRK14*-PK7//Col0 a été transformée pour exprimer la protéine lifeact fusionnée à la protéine fluorescente « *venus* » (Courtemanche et al., 2016) sous le contrôle du promoteur pSLR1 spécifique du stigmate (Hackett et al., 1996) (tableau 1). Les lignées mâles fluorescentes ont été générées à partir de deux promoteurs spécifiques du pollen. Les promoteurs pAct11 (Huang et al., 1997) et pLat52 (Twell et al., 1990) dirigent respectivement l'expression des protéines fluorescentes RedFP et mtrurquoise (tableau1).

Ces lignées nouvellement générées ont été analysées pour leur niveau de fluorescence dans les organes reproducteurs par imagerie confocale (figure 15). La lignée femelle *SRK14/venus*-lifeact montre une fluorescence des filaments d'actine régulièrement répartis dans l'ensemble de la papille stigmatique (figure 15A). Les grains de pollen et les tubes polliniques fluorescent au niveau de leur cytoplasme (figure 15B-C-D-E). La fluorescence suit la croissance des tubes polliniques (figure 15D-E).

Tableau 1. Lignées mâles et femelles générées pour l'analyse de la pollinisation dans le système *semi in vivo*. A, lignée femelle. B, lignées mâles avec une fluorescence cytoplasmique et/ou au niveau du manteau pollinique.

A	Compartiments observés	promoteur	Molécule fluorescente	Protéine cible	résistance	Lignée destinatrice	notation
	Cytosquelette d'actine	SLR1	Venus	lifeact	kanamycine	Col0/SRK14	SRK14/venus-lifeact

B	Compartiments observés	promoteur	Molécule fluorescente	Protéine cible	résistance	Lignée destinatrice	notation
	Grains de pollen et tubes polliniques	Lat52	mturquoise		kanamycine	C24	C24/mturq
	Grains de pollen et tubes polliniques	Act11	redFP		kanamycine	C24/SCR14	SCR14RedFP
	Manteau pollinique/grain de pollen/tube pollinique	lat52 GRP17	mturquoise Mcherry	GRP17	basta Kanamycine	C24	GRPlat

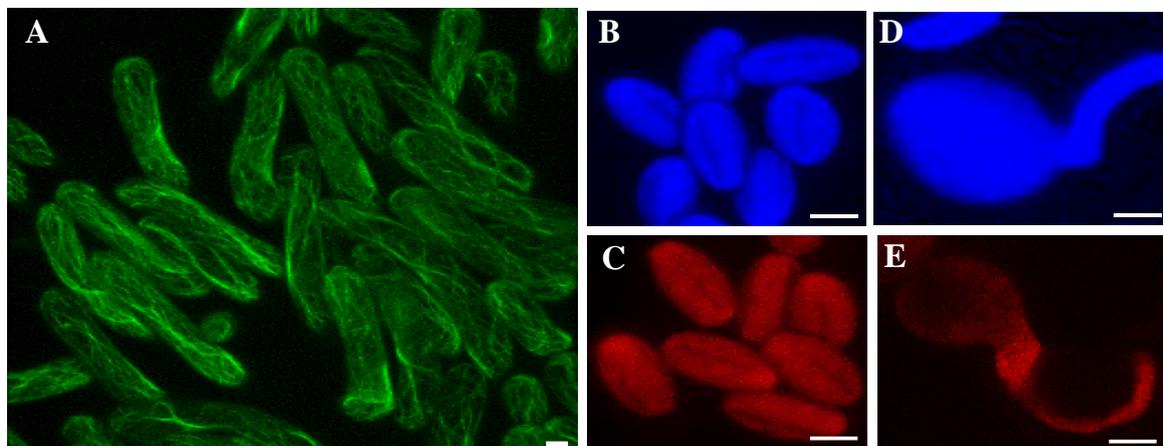


Figure 15. Observation de la fluorescence des lignées transformées. A, lignée femelle. Visualisation du cytosquelette d'actine au niveau des papilles stigmatiques avec la protéine fluorescente « venus » (construction *pSLR1/venus-lifeact*). B-C-D-E, lignées mâles. Grains de pollen et tubes polliniques. B, cytoplasme en bleu de la lignée compatible C24/turq. C, cytoplasme en rouge de la lignée incompatible C24 *SCR14RedpFP*. D-E, tube pollinique exprimant respectivement les molécules fluorescentes *mturquoise* et *RedFP*. Barre 10 µm.

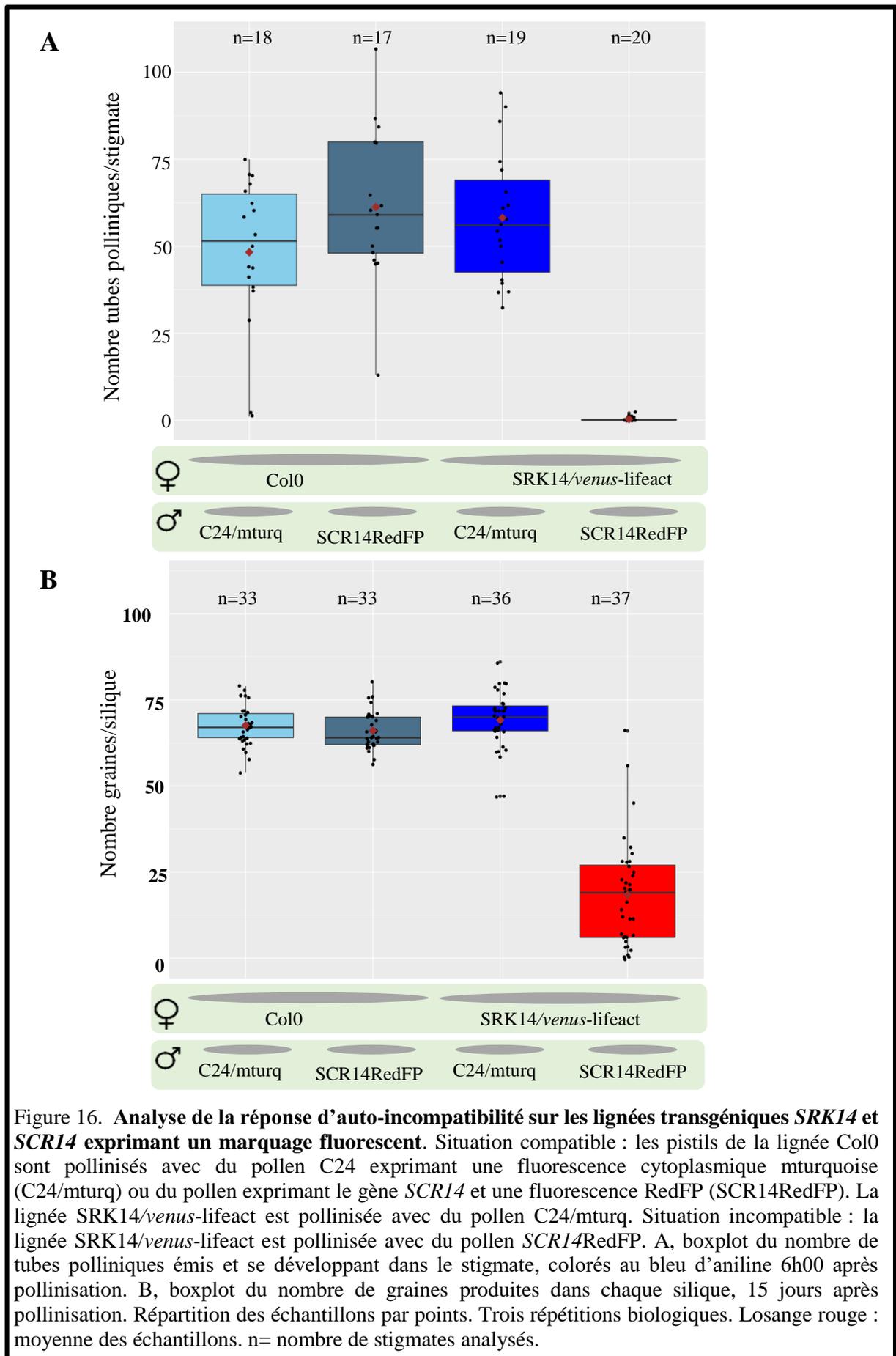
III.3.1.3 Le marqueur fluorescent s'exprimant au niveau des organes reproducteurs n'altère pas la réponse à la pollinisation.

Nous nous sommes assurés que ces plantes auxquelles un transgène avait été ajouté ne présentaient pas d'anomalie dans la réponse à la pollinisation. Après émasculation, les pistils de Col0 et *SRK14/venus-lifeact* sont pollinisés avec du pollen C24/turq et *SCR14RedFP*. Les tubes polliniques développés dans les pistils sont visualisés par la coloration au bleu d'aniline. En situation compatible (croisements Col0 x C24/mturq, Col x *SCR14RedFP*, *SRK14/venus-lifeact* x C24/mturq, figure 16A), les grains de pollen émettent des tubes polliniques visibles dans le style par un faisceau de tubes. En situation incompatible (*SRK14/venus-lifeact* x *SCR14RedFP*), les grains de pollen restent bloqués à la surface du pistil. Le nombre de tubes polliniques émis dans chaque situation a été compté et reporté dans un graphique. La répartition des échantillonnages par boîte à moustache met en évidence la différence du nombre de tubes polliniques émis entre les situations compatibles et incompatibles (figure 16).

En réponse compatible, en moyenne, plus de cinquante tubes polliniques sont dénombrés par stigmate (figure 16A). Des valeurs extrêmes (deux à dix tubes polliniques), sont cependant observées. Deux des raisons probables à ce faible nombre de tubes polliniques en situation compatible : soit les stigmates ont été émasculés trop tôt et leur maturité n'était pas optimale, soit ils ont été lésés durant l'émasculation. La répartition de l'échantillonnage par points dans la boîte à moustache permet d'identifier un regroupement des valeurs autour de la médiane (figure 16A). L'analyse statistique par le test de student (la répartition des échantillons suit une loi normale) n'indique aucune différence entre tous les types de réponses compatibles. Ainsi, le pollen *SCR14RedFP* et les pistils *SRK14/venus-lifeact* montrent toutes les aptitudes à la pollinisation compatible.

En réponse incompatible lorsque les pistils *SRK14/venus-lifeact* sont pollinisés avec du pollen *SCR14RedFP*, le nombre de tubes polliniques produits ne dépasse pas cinq en moyenne. Ainsi nos résultats démontrent que la réponse d'auto-incompatibilité est conservée au cours des six heures (temps entre la pollinisation et le prélèvement des stigmates pour analyse) qui suivent la pollinisation dans ces nouvelles lignées générées exprimant un déterminant d'auto-incompatibilité (SRK ou SCR) et un marqueur fluorescent.

Le rendement grainier permet d'estimer la capacité des tubes polliniques à se développer dans le pistil et à féconder les gamètes femelles. Nous avons compté le nombre de graines produites pour chaque type de pollinisation (figure 16B). En situation compatible le nombre de graines produites est en moyenne de soixante-dix graines par silique ce qui est comparable au rendement grainier obtenu pour *A. thaliana* sauvage ainsi que pour les lignées transgéniques



sans transgène fluorescent (annexe 2). En situation de réponse d'auto-incompatibilité, le nombre de graines produites est en moyenne de 23 graines par silique, et on observe une grande variabilité. Ce nombre de graines ainsi que cette disparité a également été observée avec des lignées ne présentant pas de marquage fluorescent (annexe 2).

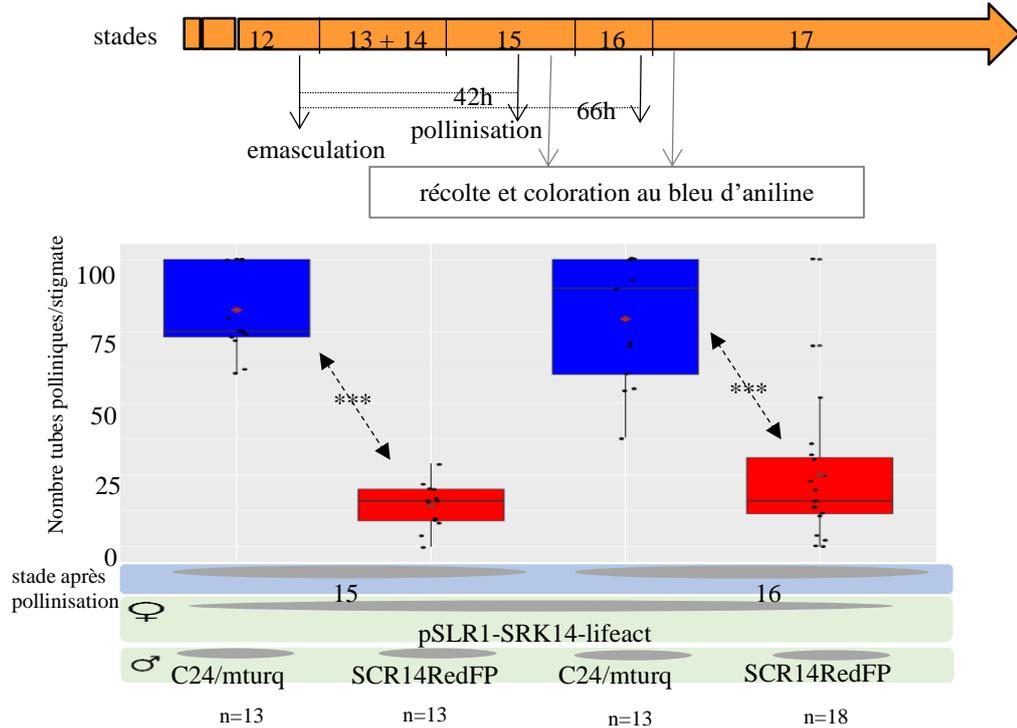
Alors que quasiment aucun tube pollinique n'est détecté dans le stigmate 6 heures après une pollinisation incompatible (figure 16A), un nombre de graines non négligeable est dénombré (figure 16B). Ce résultat suggère que la barrière d'auto-incompatibilité devient moins stricte au cours du développement du pistil et que certains grains de pollen déposés au stade 13-14 finissent par germer et produire quelques graines. Cependant, il faut remarquer que le nombre de graines produites en situation incompatible est très inférieur à celui produit en situation compatible (23 en moyenne en situation incompatible contre 70 en moyenne en situation compatible) ce qui montre qu'une réponse d'auto-incompatibilité partielle est tout de même maintenue au cours du temps.

III.3.1.4 La réponse d'auto-incompatibilité se maintient au cours du temps

Pour comprendre l'origine des graines produites lors de la réponse incompatible, nous avons réalisé deux types d'expériences de pollinisation dans le temps : i) nous avons pollinisé des stigmates *SRK14/venus-lifeact* avec du pollen incompatible *SCR14RedFP* à des stades tardifs de développement du pistil (stade 15 et 16) et ii) nous avons pollinisé des stigmates *SRK14/venus-lifeact* avec du pollen incompatible *SCR14RedpFP*, au stade 13-14 comme dans l'expérience présentée sur la figure 16, mais nous avons récolté les pistils pollinisés plus tardivement, 24h, 48h ou 72h après pollinisation (au lieu de 6h).

En situation compatible, aux stades 15 et 16, plus de 75 tubes polliniques en moyenne sont dénombrés dans le stigmate ce qui montre qu'à ces stades, le stigmate est toujours réceptif (figure 17A). En situation incompatible, au stade 15 et 16, en moyenne, respectivement 15 et 20 tubes polliniques sont comptés par pistil (figure 17A). Ce chiffre est nettement supérieur au nombre de tubes présents dans des stigmates pollinisés au stade 13-14 (0 tube/stigmate, figure 16). Ce résultat montre que la réponse d'auto-incompatibilité s'amointrit avec l'âge des papilles stigmatiques dès le stade 15. Cependant, même si des tubes sont détectés dans le stigmate en situation incompatible, un test statistique de Wilcoxon (moins de 20 échantillons par traitement) permet de mettre en évidence une différence significative avec la situation compatible.

A



B

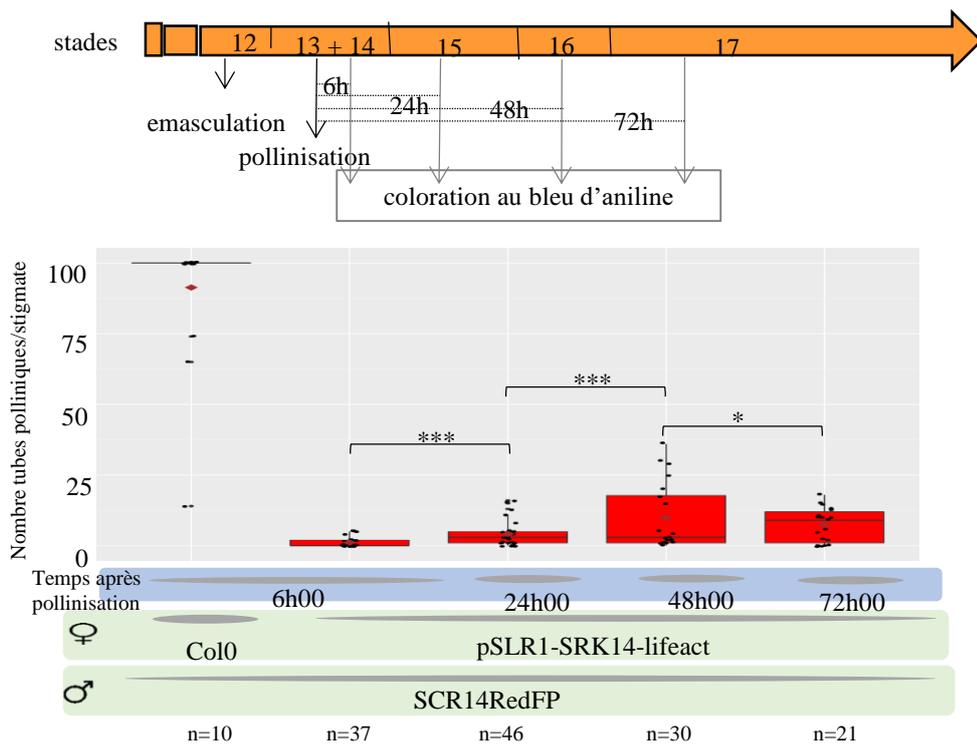


Figure 17. **Analyse de la réceptivité des papilles stigmatiques selon leur âge.** Les chronologies (bandeau orange) indiquent le stade d'émasculation, les stades de pollinisation et de récolte des stigmates. A, boxplot des pollinisations aux stades 15 et 16 des stigmates en situation compatible (en bleu) et incompatible (en rouge). Deux répétitions par expérimentation dans chaque situation. B, boxplot des récoltes aux cours du temps. Les stigmates sont pollinisés au stade 13-14 et récoltés en situation compatible 6h00 après pollinisation (en bleu) et pour les situations incompatibles (en rouge) après 6h00, 24h00, 48h00 et 72h00. Trois répétitions par expérimentation. n= nombre de stigmates analysés. Répartition des échantillons par points. Test de Wilcoxon significatif à 0,01***, à 0,05**, à 0,1*.

Lorsque des stigmates au stade 13-14 sont pollinisés avec du pollen incompatible et que les pistils sont récoltés 6h00, 24h00, 48h00 et 72h00 après pollinisation, le nombre de tubes polliniques dénombrés augmente avec les temps éloignés de la pollinisation (figure 17B). Un test de Wilcoxon permet de montrer que le nombre de tubes émis est significativement différent entre les prélèvements six heures et vingt-quatre heures puis entre les prélèvements à vingt-quatre heures et quarante-huit heures. Entre quarante-huit heures et soixante-douze heures, le nombre de tubes polliniques présents dans les pistils diffèrent peu. Cela peut être dû soit au vieillissement des papilles stigmatiques entre ces deux stades qui n'auraient plus la capacité de supporter la croissance des tubes polliniques soit au pollen qui a perdu sa capacité à germer.

Ces deux expérimentations nous indiquent que la réponse d'auto-incompatibilité diminue au cours du temps, mais que le nombre de tubes polliniques émis reste significativement différent de celui obtenu en situation compatible. De plus, ces expériences montrent que pendant la période de maturité optimale du stigmate (stade 13-14), la réponse d'auto-incompatibilité est très forte et peu de tubes (<5/stigmate) franchissent cette barrière. Ce stade est donc optimal pour suivre et comparer, en imagerie du vivant, les réponses compatibles et incompatibles

III.3.2 Mise en place du système d'imagerie du vivant

III.3.2.1 Contraintes expérimentales

Travailler avec l'espèce *A.thaliana* offre de nombreux avantages décrits précédemment. Cela implique également des contraintes expérimentales auxquelles il faut s'adapter.

► Cette espèce est de petite taille. Les manipulations doivent se réaliser délicatement sous une loupe binoculaire.

► La réceptivité optimale des papilles stigmatiques est le stade 13-14 dans la nomenclature de Smyth en 1990 (Smyth et al., 1990). Ce stade correspond également à la déhiscence des anthères. A ce stade, en condition native, les anthères qui entourent le stigmate libèrent les grains de pollen qui s'accrochent aux papilles stigmatiques. Afin d'établir une chronologie des événements de la pollinisation, le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques doit être maîtrisé. Les fleurs sont donc émasculées au stade 12 avant la déhiscence des anthères pour éviter toutes pollinisations intempestives qui nuiraient à l'analyse des événements de la pollinisation par imagerie. Cette étape est délicate car il ne faut pas émasculer la fleur trop tôt pour ne pas perturber le développement du stigmate. La présence des sépales et des pétales

favorise une bonne croissance du pistil, c'est pourquoi lors de l'émasculation il est important de garder ces organes.

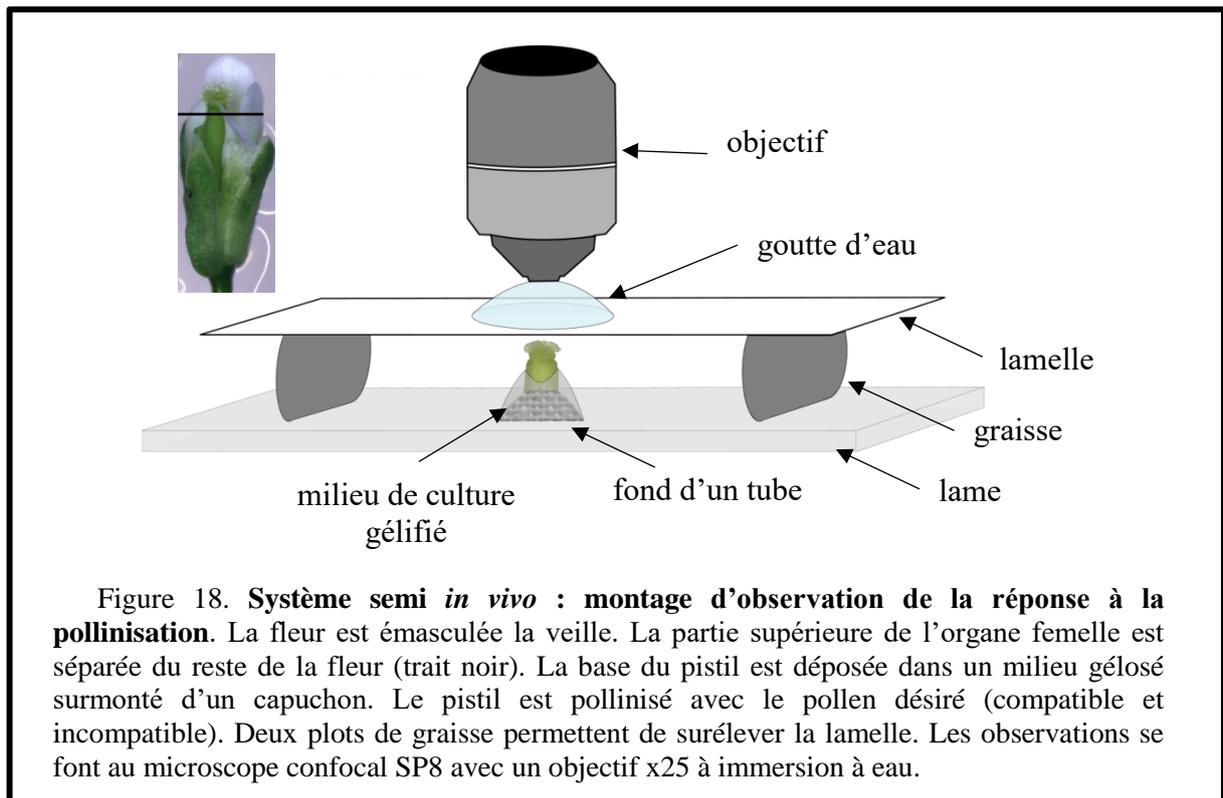
► L'hygrométrie de l'air ambiant durant la culture des plantes influe sur la qualité du pollen. Le pollen a tendance à germer anormalement lors de fortes hygrométries (supérieures à 80%). Des contrôles de la régularité de la température et de l'hygrométrie, dans les chambres de culture, sont donc importants pour ce type d'expérimentation. De même le contrôle de l'hygrométrie pendant les étapes d'adhésion et d'hydratation du pollen est indispensable. A forte hygrométrie le pollen incompatible présente un taux de germination anormalement élevé sur un stigmate au stade 13-14.

► Les fleurs d'*A.thaliana* sont positionnées à l'extrémité d'une hampe florale. Pour visualiser la pollinisation par microscopie, le pistil doit être détaché du reste de la fleur. Il doit rester dans des conditions où l'air peut circuler entre les tissus. Le maintien en survie du pistil durant toute la durée de l'expérimentation a nécessité des ajustements techniques.

► L'hydratation du grain de pollen et l'émission du tube pollinique sont rapides. Le mode d'acquisition d'image pour réaliser des prises de vue sur l'ensemble du stigmate nécessite d'être rapide.

III.3.2.2 *Le système semi in vivo*

Les pistils sont coupés au milieu de l'ovaire et déposés sur une lame de verre, dans une goutte de milieu gélosé qui permettra de les maintenir en vie durant tout le temps des observations. Un fond de tube permet d'enfermer la goutte d'agarose et de limiter ainsi l'évaporation de l'eau contenue dans le milieu aqueux. Le taux d'hygrométrie est alors limité dans cette mini-chambre ainsi constituée. Les stigmates sont ensuite pollinisés avec les différents pollens et l'ensemble est recouvert d'une lamelle (figure 18). La lamelle qui recouvre la chambre est maintenue par des plots de graisses qui permettent d'ajuster la hauteur en fonction de la taille du pistil. Afin de permettre à l'air de circuler dans la mini-chambre les plots de graisses sont placés uniquement aux extrémités de la lamelle. Une fermeture trop hermétique de la mini-chambre nuirait au développement du pollen. Toutes ces étapes se réalisent sous une loupe binoculaire à un grossissement maximal notamment au moment de la pollinisation pour ajuster le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques.

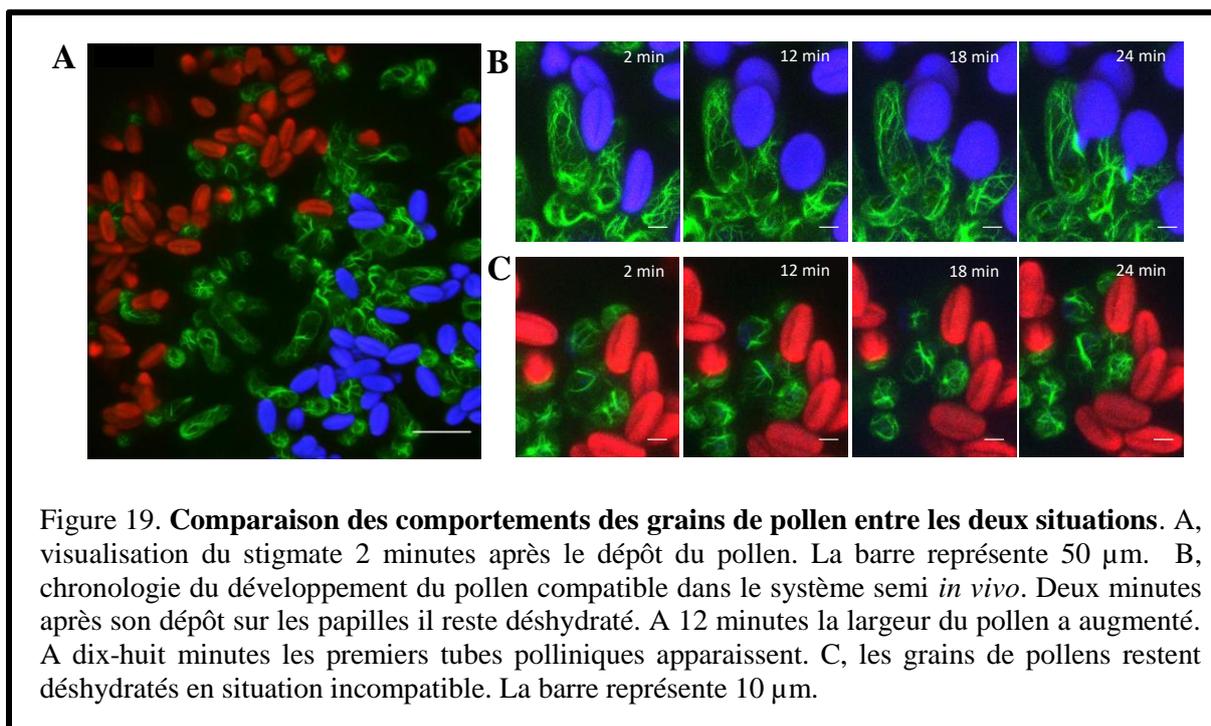


III.3.2.3 Le système semi *in vivo* permet de visualiser la pollinisation par microscopie confocale

Le suivi du développement du pollen sur les papilles stigmatiques en direct sur du matériel vivant est réalisé par microscopie confocale avec les lignées fluorescentes générées.

Nous avons choisi de déposer sur le même stigmate *SRK14/venus-lifeact* du pollen *SCR14RedpFP* (incompatible) sur la moitié gauche de stigmate et du pollen *C24/turq* (compatible) sur la moitié droite. Ainsi, il sera possible de suivre en même temps, en une seule acquisition d'image, les deux types de pollen (figure 19A). Avec ce système de double pollinisation, nous nous affranchissons des paramètres physiologiques et environnementaux (état du stigmate, taux d'humidité dans la mini chambre...) pouvant influencer la germination du pollen et la réponse d'auto-incompatibilité.

Les acquisitions d'images ont été réalisées de l'extrémité haute du stigmate jusqu'à sa base tous les 1 μm . Le temps nécessaire pour parcourir cette distance, pour les trois marqueurs fluorescents (stigmate vert, pollen compatible bleu et incompatible rouge), en microscopie confocale à résonance est de 1,40 minutes en moyenne. Les acquisitions d'images ont été espacées de 2 minutes, depuis le dépôt du pollen jusqu'à la fin de l'expérience (30 à 40 minutes). Des films ont été réalisés à partir de ces acquisitions en utilisant le logiciel ImageJ.



III.3.2.4 Le système semi *in vivo* conserve les réponses à la pollinisation

Cinq expérimentations indépendantes ont été réalisées. Les grains de pollen en situation compatible émettent un tube pollinique visible sur la figure 19B. Sur les 106 grains de pollen analysés 73% émettent un tube pollinique (Tableau 2). En moyenne ces tubes polliniques apparaissent 20,38 minutes après le dépôt des pollens C24/turq sur les papilles stigmatiques (tableau 2) ce qui correspond au temps de germination observé *in planta* par plusieurs groupes (Iwano et al., 2004; Kandasamy et al., 1994). En réponse incompatible (figure 19C), seul 1,3 % des grains de pollen émettent un tube pollinique (tableau 2) soit 1 grain de pollen sur les 75 analysés, ce qui est cohérent avec le faible nombre de tube pollinique détectés en bleu d'aniline (figure 16A) ou décrit dans la littérature (Kitashiba et al., 2011). On peut en conclure que la réponse d'auto-incompatibilité est maintenue dans le système semi *in vivo*.

Tableau 2. **Comportement des grains de pollen selon la situation compatible ou incompatible.** Pourcentage de germination des grains de pollens compatibles et incompatibles et temps moyen d'émission des tubes polliniques dans le système semi *in vivo*. SEM=écart type à la moyenne.

	germination			nombre de grains de pollen (n)
	%	temps (minutes)	SEM	
grains de pollen compatibles	74	20,38	0,55	106
grains de pollen incompatibles	1,3	---	---	75

III.3.3 Analyse du comportement du pollen

III.3.3.1 En situation de réponse compatible les grains de pollen s'hydratent tandis que les grains de pollen incompatibles s'hydratent peu

Lors de l'hydratation du pollen, le diamètre s'accroît ; d'une forme ovale à la sortie de l'anthere, il s'arrondit au contact des papilles stigmatiques puis émet un tube pollinique (Dickinson and Elleman, 1985; Doughty et al., 1998; Ma et al., 2012; Updegraff et al., 2009).

Nous avons suivi et analysé dans le temps 69 grains de pollen compatibles et 53 grains de pollen incompatibles afin de déterminer leur modification de forme durant la pollinisation (figure 19B-C). Nous avons mesuré la longueur et la largeur de chaque grain de pollen toutes les deux minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques. Le rapport de ces deux mesures nous permet d'établir un changement de forme qui démarre d'un état allongé avec un rapport proche de deux pour évoluer vers un rapport proche de 1 correspondant à des formes plus arrondies (figure 20). Cela traduit un gonflement des grains de pollen qui correspond à leur hydratation.

A la sortie de l'anthere le rapport longueur/largeur (L/l) des grains de pollen s'étale de 1,7 à 2,4 quelle que soit l'origine des grains de pollen (compatible ou incompatible) avec une moyenne de 2 (annexe 3).

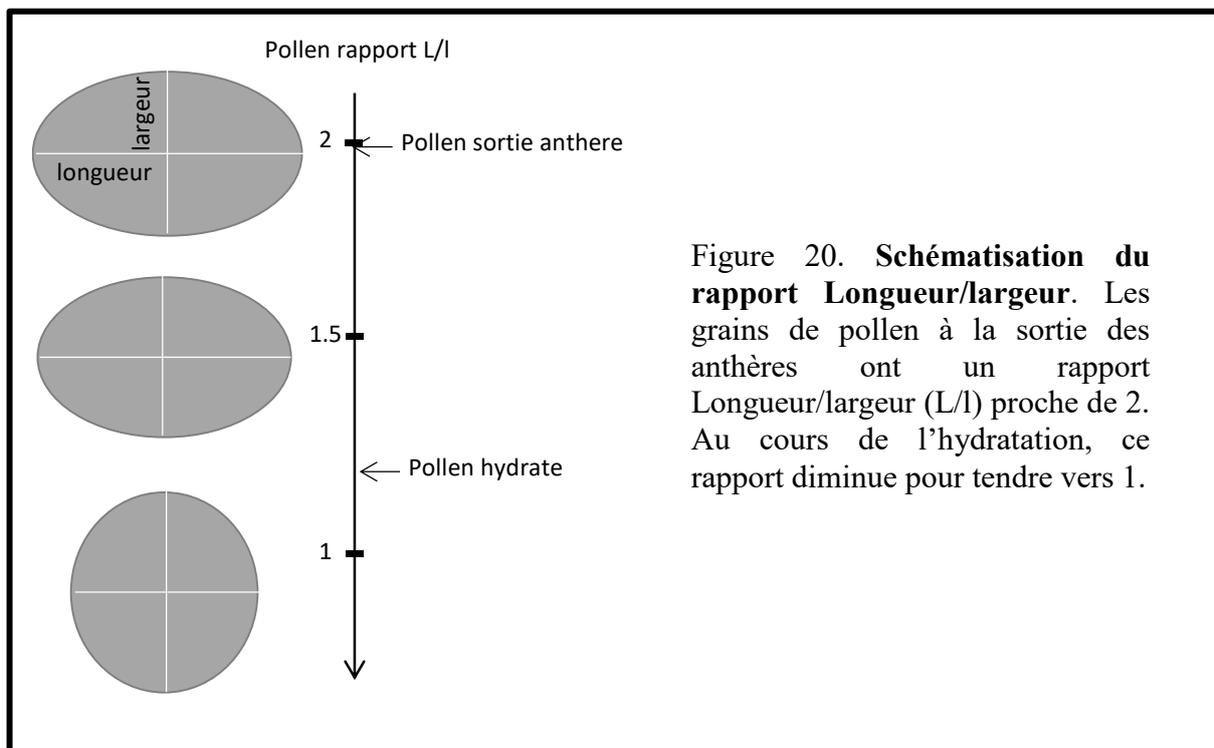


Figure 20. **Schématisation du rapport Longueur/largeur.** Les grains de pollen à la sortie des anthères ont un rapport Longueur/largeur (L/l) proche de 2. Au cours de l'hydratation, ce rapport diminue pour tendre vers 1.

III.3.3.1.1 Comportement des grains de pollen compatibles

En situation compatible, la courbe, établie à partir de la moyenne du rapport L/l, diminue rapidement durant les douze premières minutes. D'un rapport compris entre 1,8 à 2 deux minutes après le dépôt des grains de pollen sur les papilles stigmatiques, ce rapport passe en dessous de 1.4 en douze minutes. Les premières germinations apparaissent à ce temps (figure 21). Une analyse statistique avec le test de student indique une différence significative durant les six premières minutes qui suivent le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques (p-value entre 2 et 4 minutes : 0.0139, p-value entre 4 et 6 minutes : 8e-4).

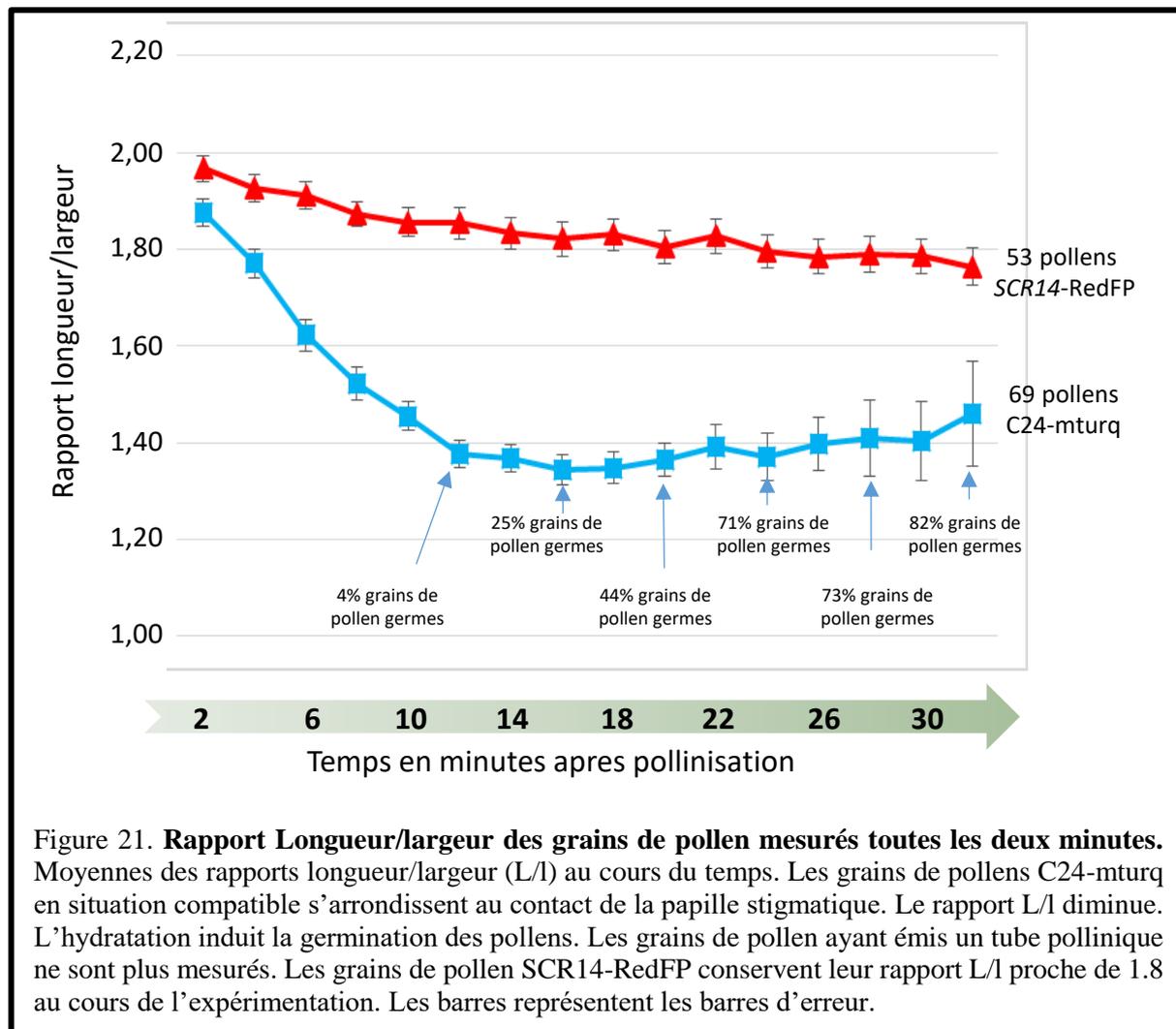


Figure 21. **Rapport Longueur/largeur des grains de pollen mesurés toutes les deux minutes.** Moyennes des rapports longueur/largeur (L/l) au cours du temps. Les grains de pollens C24-mturq en situation compatible s'arrondissent au contact de la papille stigmatique. Le rapport L/l diminue. L'hydratation induit la germination des pollens. Les grains de pollen ayant émis un tube pollinique ne sont plus mesurés. Les grains de pollen SCR14-RedFP conservent leur rapport L/l proche de 1.8 au cours de l'expérimentation. Les barres représentent les barres d'erreur.

La comparaison statistique entre 2 et 12 minutes après le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques démontre une forte hydratation des grains de pollen entre ces deux mesures (p-value < 2.2e-16) alors qu'elle n'indique aucune différence statistique entre 12 et 32 minutes (p-value : 0.47). Les douze premières minutes qui suivent le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques apparaissent donc importantes dans l'hydratation des grains de pollen. De façon

intéressante, les premières germinations apparaissent à 12 minutes lorsque le ratio d'hydratation de 1,4 est atteint (figure 21). Le pourcentage de germination augmente progressivement au cours de l'expérience, à seize minutes 25% des grains de pollen ont émis un tube pollinique pour atteindre 71% à 24 minutes. Les grains n'étant plus mesurés après germination, de moins en moins de pollen sont mesurés au fur et à mesure de l'expérience. A 32 minutes, en fin d'expérimentation 18% des grains de pollen n'ont pas germés correspondant à 11 grains de pollen.

III.3.3.1.2 Comportement des grains de pollen incompatibles

Les grains de pollen incompatibles déposés dans les mêmes conditions que les grains de pollen compatibles montrent un rapport L/l avoisinant 1,8 à 32 minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques (figure 21). Leur niveau d'hydratation reste donc en moyenne peu important. Cependant sur les 53 grains de pollen incompatibles analysés et suivis dans le temps, 10 montrent un rapport L/l inférieur à 1,4 à 32 minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques. Ceci démontre que certains grains de pollen incompatibles peuvent s'hydrater dans le système semi *in vivo*. Il représente 23 % des grains de pollen analysés. Cependant sur ces 10 grains de pollen suivis dans le temps, aucun n'a émis de tubes polliniques.

En conclusion, dans notre système semi *in vivo*, il semblerait qu'un niveau suffisant d'hydratation (rapport L/l de 1,4) soit nécessaire pour déclencher la germination. Cependant ce rapport n'est pas suffisant car certains grains de pollen incompatibles atteignent ce niveau d'hydratation et ne germent pas.

III.3.3.2 *En situation compatible les germinations précoces des grains de pollen s'observent avec des hydratations rapides*

Comme décrit précédemment, dans nos conditions expérimentales, la germination du pollen n'est pas synchrone. Nous suspectons qu'une variabilité du niveau d'hydratation des grains de pollen compatibles pourrait être une des causes pour laquelle la germination des grains de pollen s'étale dans le temps. Nous avons défini des classes de germinations en fonction du temps de germination des grains de pollen. La première classe correspond aux germinations précoces entre 12 et 18 minutes après le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques. La seconde classe intermédiaire regroupe les grains de pollen qui ont germé entre 20 et 24 minutes. La troisième catégorie concerne les germinations tardives entre 26 et 30 minutes, la quatrième étant représentée par les grains de pollen qui n'ont pas germés. Le niveau d'hydratation de ces

4 classes de grains de pollen compatibles est également comparé à celui des grains de pollen incompatibles. Nous avons limité cette comparaison aux dix premières minutes car au-delà les premières germinations apparaissent.

Tous les grains de pollen à 2 minutes ont un même niveau d'hydratation (figure 22). Aucune différence statistique n'est démontrée par le test ANOVA (test sur les moyennes de l'ensemble des classes, p-value : 0.13 à 5%). Des différences significatives de rapport L/l apparaissent entre les grains de pollen compatibles de la classe [12-18] et les grains de pollen incompatibles dès quatre minutes après le dépôt des grains de pollen sur les papilles stigmatiques. Les classes [12-18] et [20-24] ne montrent aucune différence de niveau d'hydratation durant les dix minutes d'analyse. A huit minutes, une différence de forme apparaît entre les classes [20-24] et [26-30]. Ce n'est qu'à dix minutes que la classe des grains de pollen qui ont germés tardivement [26-30] se détache de ceux qui n'ont pas émis de tube pollinique (compatible non germés). Les grains de pollen C24/turq compatibles qui n'ont pas germés et les grains de pollen incompatibles *SCR14RedFP* se comportent de façon identique. Il faut noter qu'entre le moment où le grain de pollen atteint un rapport L/l inférieur à 1,4, il s'écoule environ 10 minutes avant que le tube pollinique soit émis.

En conclusion, nous avons montré que les grains de pollen à germination précoce et intermédiaire se sont hydratés plus rapidement que les grains de pollen à germination tardive. Ce niveau d'hydratation, représenté par le rapport L/l, est significativement différent de celui des grains qui n'ont pas émis de tube pollinique que ce soit en réponse compatible ou en réponse incompatible. La rapidité d'hydratation semblerait ainsi déterminer la rapidité avec laquelle le grain de pollen va émettre un tube pollinique.

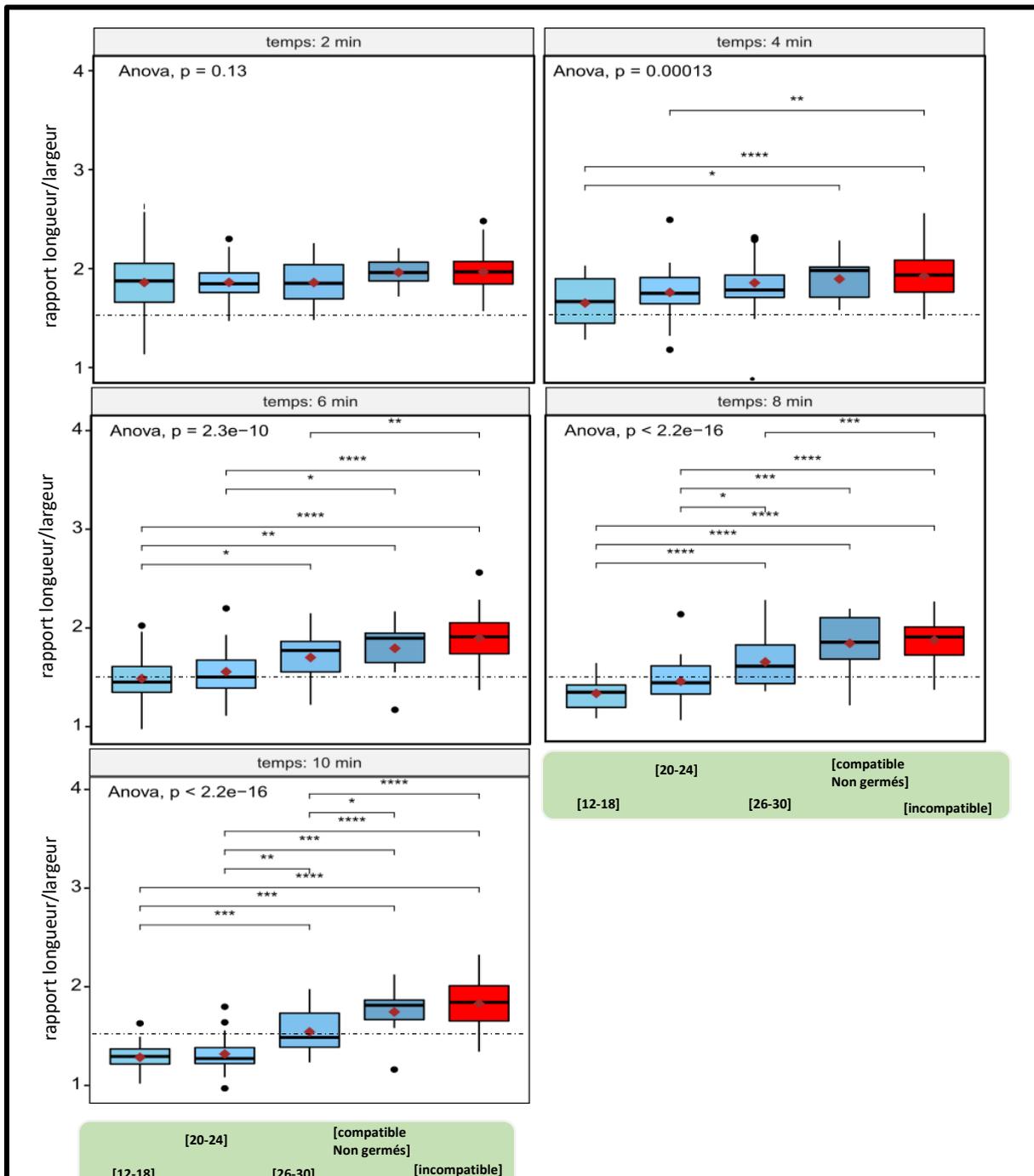
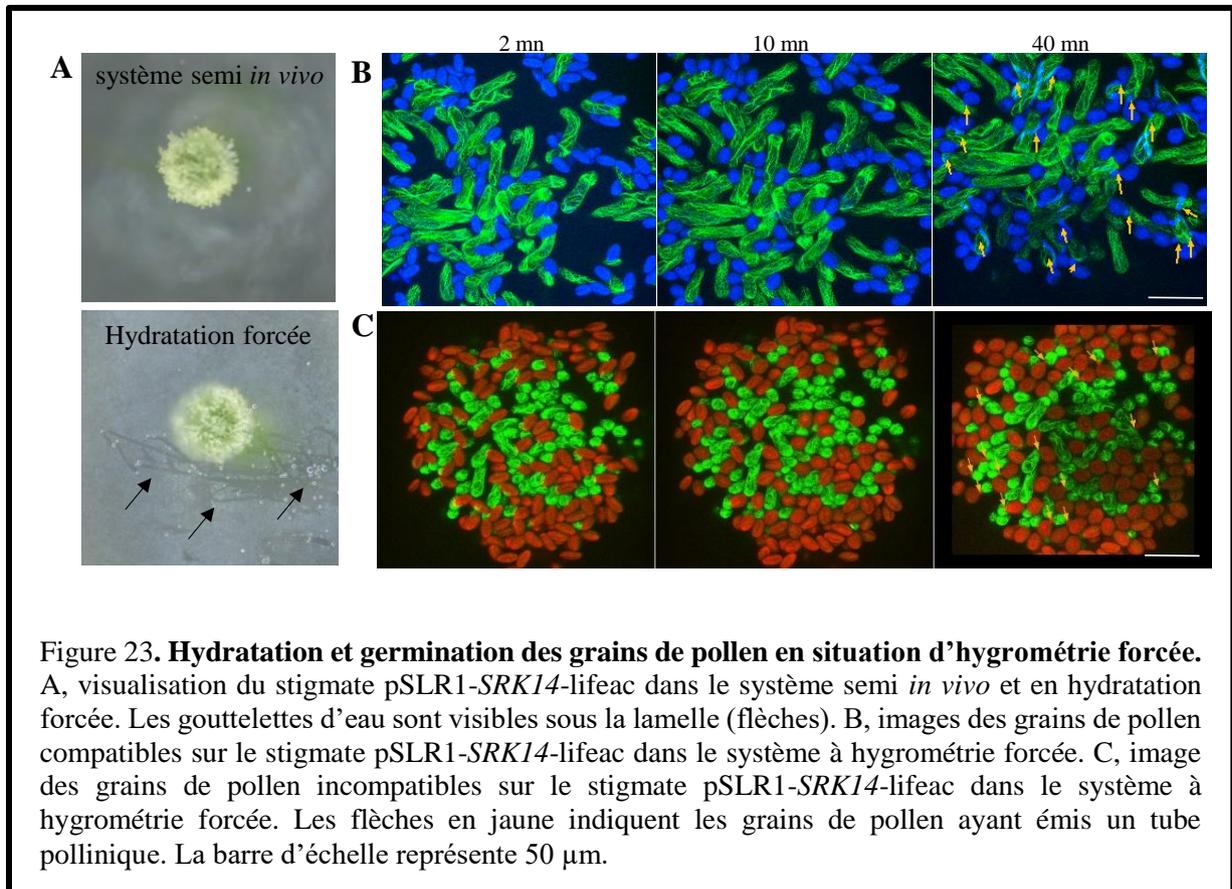


Figure 22. Comparaison du niveau d'hydratation des grains de pollen durant les dix premières minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques. Boxplot. Les grains de pollen C24/turq sont répartis en 3 classes selon leur rapidité à émettre un tube pollinique en situation compatible respectivement 12-18 (12 à 18 min, n=19), 20-24 (20 à 24 min, n=22), 26-30 (26 à 30 min, n=17). Les grains de pollen compatibles non germés sont indiqués « compatible Non germés » (n=11). Les grains de pollen pgSCR14RedFP en réponse incompatible sont notés incompatible (n=53). Les tirets en noires indiquent le rapport L/l de 1,4. Analyse statistique entre toutes les classes par un test ANOVA. Statistiquement significatif si $p < 0,05$. Analyse statistique du niveau d'hydratation des grains de pollen en fonction de leur classe par un test de Wilcoxon. Test de Wilcoxon significatif à 0,01***, à 0.05**, à 0.1*. Seules les différences significatives sont représentées. La moyenne est représentée par des losanges rouges.

III.3.3.3 Une forte hygrométrie permet la germination des grains de pollen incompatibles

Dans la littérature, il a été montré que l'augmentation du taux d'hygrométrie de l'air ambiant favorise l'hydratation des grains de pollen incompatibles et stimulent leur germination (Carter and McNeilly, 1976; Dickinson and Elleman, 1985). Notre système semi *in vivo* présente l'avantage de pouvoir augmenter artificiellement le niveau d'hygrométrie par ajout de boules d'agarose de part et d'autre du stigmate. Ceci induit une évaporation d'eau dans la petite chambre visible sous la lamelle (figure 23A). Ainsi nous pouvons augmenter le niveau d'hygrométrie dans notre système, ce qui nous permet de visualiser le comportement des grains de pollen incompatibles dans un environnement artificiellement plus humide que des conditions standard. Nous noterons ce montage « hydratation forcée ». Nous avons réalisé une étude du comportement des grains de pollen en réponse compatible et incompatible dans cet environnement à forte humidité. Pour ces expériences, les pollens compatibles et incompatibles ont été déposés séparément sur des stigmates distincts. Une image deux minutes après la pollinisation puis dix minutes après permettent de visualiser l'hydratation des grains de pollen dans chaque situation (figure 23B-C). A partir de douze minutes, les images acquises toutes les minutes ont permis de suivre le comportement de chaque grain de pollen pour son émission du tube pollinique.



Dans un premier temps, il est important de vérifier que le comportement des grains de pollen compatibles déposés dans une atmosphère humide n'est pas modifié par rapport à des conditions standards. Le pourcentage de germination est comparable (88% dans le système forcé contre 74% dans le système semi *in vivo*). La germination est légèrement stimulée, en effet les grains germent en moyenne en 18,44 minutes contre 19,79 minutes dans le système semi *in vivo* (figure 24). Le comportement des grains de pollen en réponse compatible dans le système à hydratation forcée est proche de celui observé dans le système semi *in vivo*.

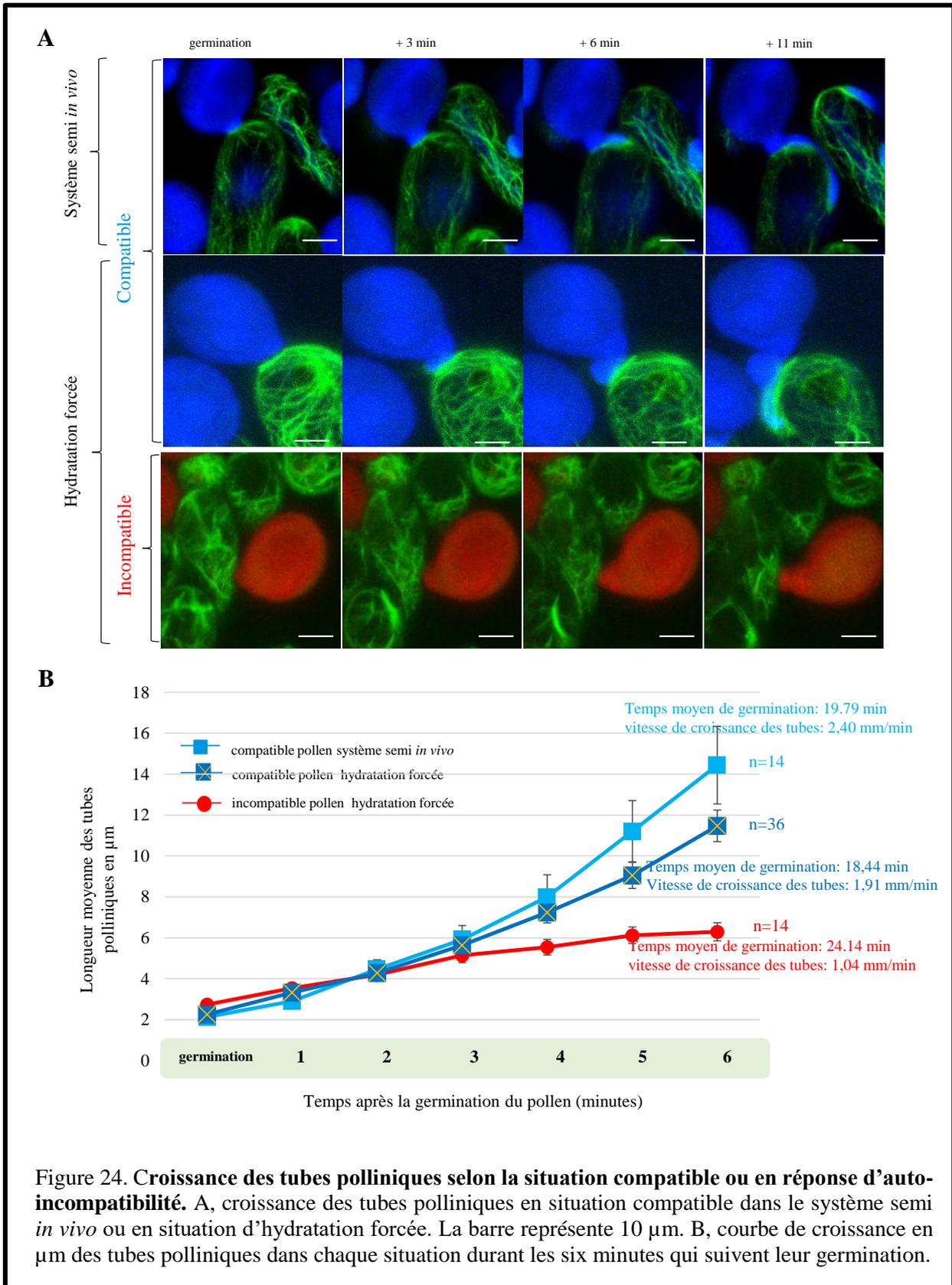
En réponse d'auto-incompatibilité, cinq expérimentations indépendantes ont été réalisées. L'augmentation de l'hygrométrie induit une augmentation du pourcentage de germination des grains de pollen incompatibles qui passe de 1.3 % à 37%. Ce pourcentage moyen de 37% varie de 18% à 58 % selon les expérimentations.

L'analyse du niveau d'hydratation des grains de pollen incompatible, vingt minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatiques, montre que 75,92% d'entre eux, déposés dans le système à hydratation forcée, ont un rapport L/l inférieur à 1,4. Toutefois, 59% de ces grains de pollen sont incapables d'émettre un tube pollinique. En comparaison, en situation compatible dans le système semi *in vivo*, seuls 7,24 % des grains de pollen qui avaient atteint ce rapport de 1,4 vingt minutes après leur dépôt sur les papilles stigmatique n'avaient pas germé. On peut en conclure que la germination des grains de pollen incompatibles est fortement réduite même si les conditions sont favorables à l'initiation d'un tube pollinique. Le niveau d'hydratation optimal de 1.4 définie dans la réponse compatible n'est donc pas suffisant pour permettre la germination des grains de pollen incompatibles.

Nos acquisitions d'images au cours du temps permettent de visualiser la croissance des tubes polliniques. Nous avons suivi la croissance de tube pollinique dans chacune des situations compatibles (système semi *in vivo*, hydratation forcée) et en situation incompatible dans le système à hydratation forcée (figure 24). Les premières mesures ont débuté à la germination des grains de pollen (figure 24A) et ont été poursuivies jusqu'à ce que le tube pollinique atteigne la base de la papille stigmatique. Notre analyse de croissance s'est concentrée sur les six premières minutes car en situation compatible, les tubes polliniques tournent autour de la papille stigmatique et se retrouvent hors du plan focal. Leur mesure devient alors difficile.

En situation compatible, bien que l'émission d'un tube pollinique soit plus précoce dans le système à hydratation forcée (18,44 minutes contre 19,79 dans le système semi *in vivo*), la vitesse de croissance des tubes pollinique (respectivement 1,91 $\mu\text{m}/\text{min}$ et 2,40 $\mu\text{m}/\text{min}$) et la distance parcourue à six minutes (respectivement 11,47 μm et 14,43 μm) n'est pas statistiquement significativement différentes (distance parcourue p-value : 0.18). Le

comportement des grains de pollen compatibles ne semble donc pas être influencé par une augmentation du niveau d'hygrométrie.



En réponse d'auto-incompatibilité, dans le système à hydratation forcée, la croissance des tubes polliniques est fortement limitée (figure 24A-B). En moyenne sur les six minutes de suivi de croissance des tubes polliniques la distance parcourue par les tubes n'est que de 1.04 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour atteindre une longueur totale de 6,29 μm à six minutes.

La vitesse de croissance des tubes polliniques durant les trois premières minutes, que ce soit en situation compatible ou incompatible, semble similaire. Les premières différences de vitesse de croissance apparaissent 4 minutes après l'émission des tubes polliniques. En situation compatible on observe une augmentation de la vitesse de croissance des tubes polliniques alors que les tubes polliniques en situation incompatible maintiennent une vitesse à peu près constante. A 4 minutes, des différences significatives de vitesse de croissance apparaissent entre les tubes polliniques compatibles et incompatibles (comparaison compatible dans le système semi *in vivo* et incompatible, p-value 0.00812 ; comparaison compatible et incompatible en hydratation forcée, p-value : 0.043). Cette différence s'accroît avec le temps.

Une augmentation du niveau d'hygrométrie permet de lever partiellement la réponse d'auto-incompatibilité en permettant aux grains de pollen de s'hydrater et de germer. Cependant on remarque que moins de la moitié d'entre eux émettent un tube pollinique qui se développe lentement au niveau de la papille stigmatique. Une troisième barrière de réponse auto-incompatible pourrait intervenir au niveau de la papille stigmatique.

III.3.3.4 En réponse d'auto-incompatibilité les tubes polliniques ne pénètrent pas la papille stigmatique.

En situation compatible, le tube pollinique chez les brassicacées pénètre la papille stigmatique, s'y développe pour atteindre les tissus sous-jacents. Des observations en microscopie électronique ont montré que le tube digère la paroi de la papille pour pousser à l'intérieur de celle-ci (Kandasamy et al., 1994). Dans notre système d'imagerie du vivant il est difficile de visualiser la pénétration du tube pollinique. Le marquage des filaments d'actine permet de visualiser la papille stigmatique mais manque de précision concernant la localisation exacte du tube pollinique. Nous avons coloré les papilles stigmatiques afin de visualiser leur contour et de positionner les tubes polliniques dans le système à hydratation forcée en situation compatible et incompatible. Le FM4-64 utilisé en imagerie du vivant pour visualiser des compartiments cellulaires fluorescents lorsqu'il est inséré dans une couche lipidique (membrane plasmique, membrane vésiculaire...). Au niveau de la papille stigmatique, cette molécule reste localisée à la surface ; identifiant ainsi le contour cellulaire de cette cellule épidermique. Ce marquage particulier nous laisse penser que le FM4-64 reste bloqué à

l'extérieur de la papille mais serait capable d'interagir avec la cuticule (couche externe de la paroi cellulaire) riche en lipides. Le contour cellulaire est alors visible en rouge par microscopie à fluorescence. L'intérieur de la papille stigmatique est visible en vert grâce à la fluorescence des filaments d'actine (lignée femelle *SRK14/venus-lifeact*).

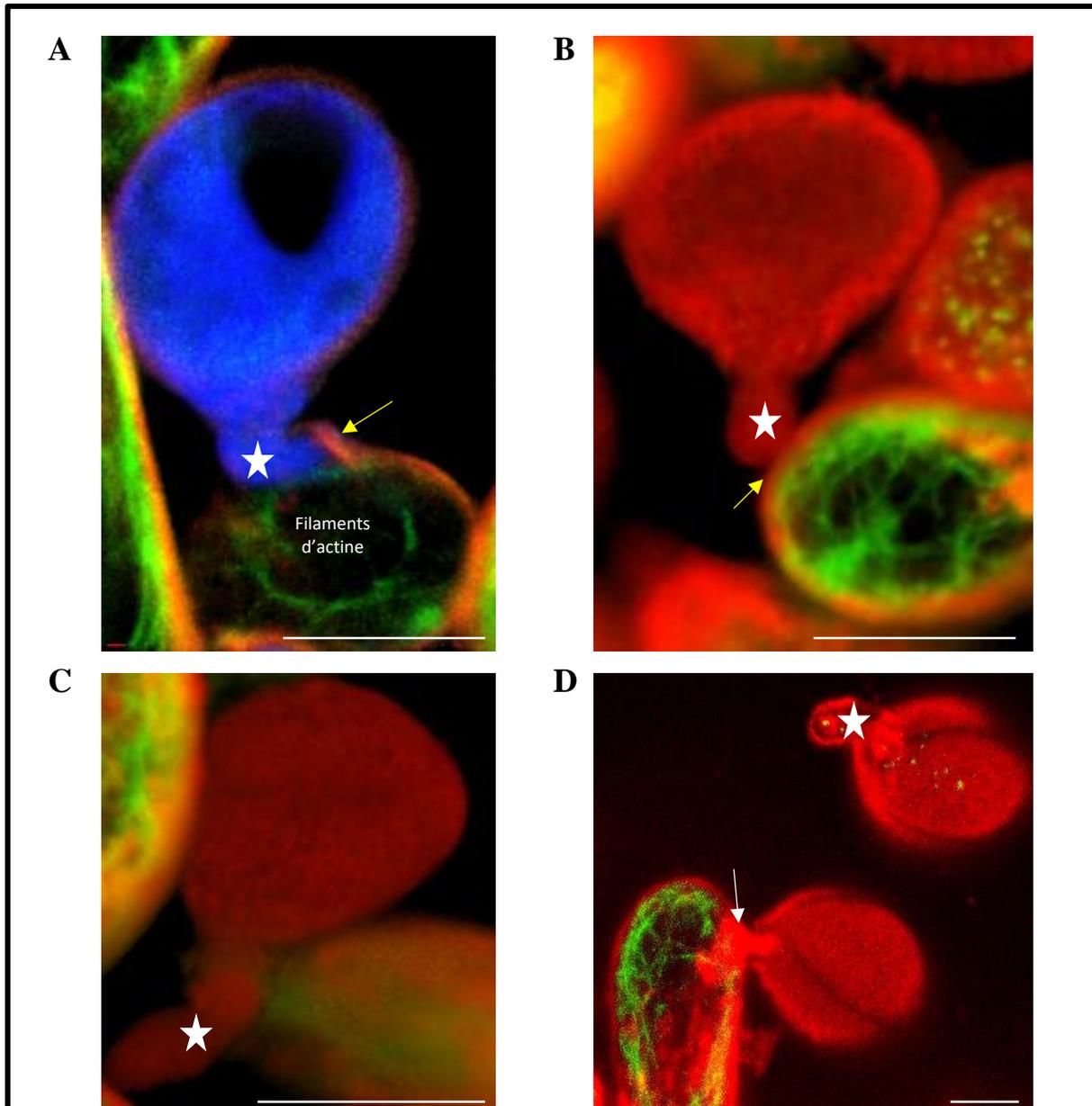


Figure 25. **Visualisation des tubes polliniques dans le système à hydratation forcée.** A, situation compatible, pénétration du tube pollinique dans la papille. B-C-D, situation incompatible. B-C, tubes polliniques à l'extérieur de la papille stigmatique. B, le tube pollinique ne pénètre pas la papille stigmatique. C, tube pollinique semble croître entre deux papilles stigmatiques. D, éclatement du grain de pollen en bas de l'image (flèche blanche) et grain de pollen ayant émis un tube pollinique puis s'est détaché de la papille stigmatique. L'étoile blanche et les flèches jaunes indiquent respectivement le tube pollinique et la paroi. La barre représente 10 μ m. Couche externe de la papille stigmatique visible en rouge après coloration au FM4-64. Les filaments d'actine indiquant l'intérieur de la papille stigmatique sont visibles en verts. Représentation en 3 dimensions avec le logiciel image J.

En situation compatible, le tube pollinique visible en bleu (figure 25A) se situe entre le contour rouge (marquage FM4-64) et les filaments d'actine révélés en verts. Ceci montre que le tube pollinique a pénétré puis s'est développé entre ces deux marquages donc à l'intérieur de la papille stigmatique.

En situation incompatible, les tubes polliniques sont localisés soit à l'extérieur de la couche marquée en rouge (figure 25 B-C) soit ne sont pas en contact avec la papille, (figure 25D). Certains tubes qui n'ont pas germés éclatent au moment de la coloration des papilles stigmatiques (figure 25D). Que le tube soit court (figure 25B) ou long (figure 25C), la localisation reste identique. Cette localisation nous indique que les tubes polliniques incompatibles peinent à pénétrer la papille stigmatique et restent localisés à l'extérieur.

La différence de vitesse de croissance des tubes polliniques entre les situations compatibles et incompatibles (figure 24) pourrait être due à cette absence de pénétration des tubes polliniques incompatibles dans la papille stigmatique.

III.3.4 Réaction de la papille stigmatique à la pollinisation

III.3.4.1 La papille stigmatique réagit à la pollinisation par un réarrangement de son cytosquelette d'actine

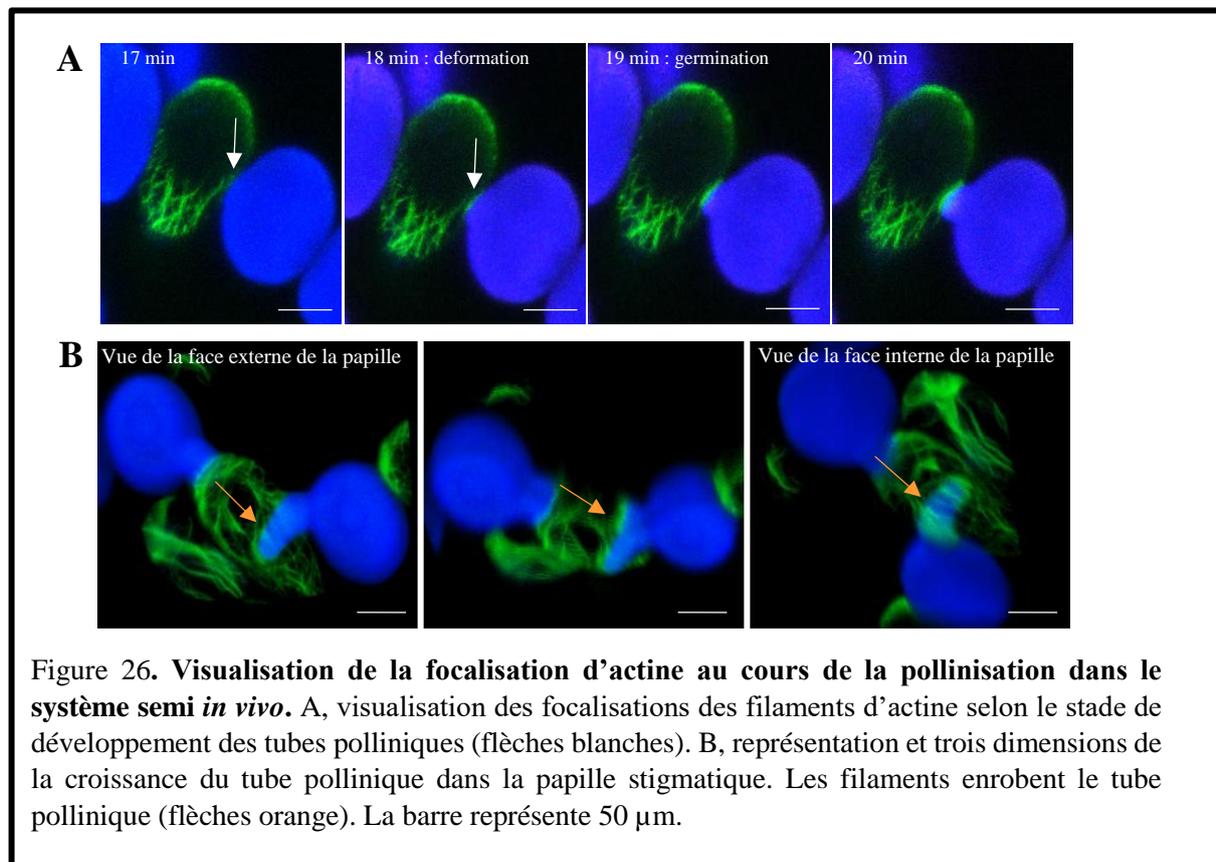
Lors de la pollinisation, des mouvements de vésicules et une réorganisation du cytosquelette d'actine et de microtubules dans la papille stigmatique ont été rapportés dans la littérature (Iwano et al., 2007; Safavian and Goring, 2013; Samuel et al., 2009, 2011). Notre lignée *SRK14/venus-lifeact* exprimant une fluorescence stable au niveau du cytosquelette d'actine au cours des acquisitions d'images (annexe 4) nous permettent de suivre en détail le comportement du cytosquelette d'actine dans la papille stigmatique au cours de la pollinisation compatible dans le système semi *in vivo* et incompatible dans le système à hydratation forcée durant quarante minutes.

En réponse compatible, durant les phases précoces d'hydratation des grains de pollen, aucune réorganisation d'actine n'est visible au point de contact avec le pollen. Pour 25% des papilles analysées, une focalisation d'actine apparaît en fin d'hydratation, une minute avant la déformation du grain de pollen initiant l'émergence du tube pollinique (Tableau 3 et figure 26). Pour 25% des papilles, la polymérisation des filaments d'actine est visible pendant la déformation ou la germination du grain de pollen. Pour près de la moitié des cas (47%), la focalisation d'actine est tardive, après la germination et 8% des papilles ne montrent aucune focalisation (tableau 3). Cette focalisation s'intensifie avec la pénétration du tube et persiste

durant toute la croissance du tube pour 83% des papilles stigmatiques analysés. Une représentation en trois dimensions avec le logiciel image J permet de faire pivoter les acquisitions d'images. Cela permet de mieux visualiser la concentration des filaments d'actine le long du tube pollinique (figure 26B).

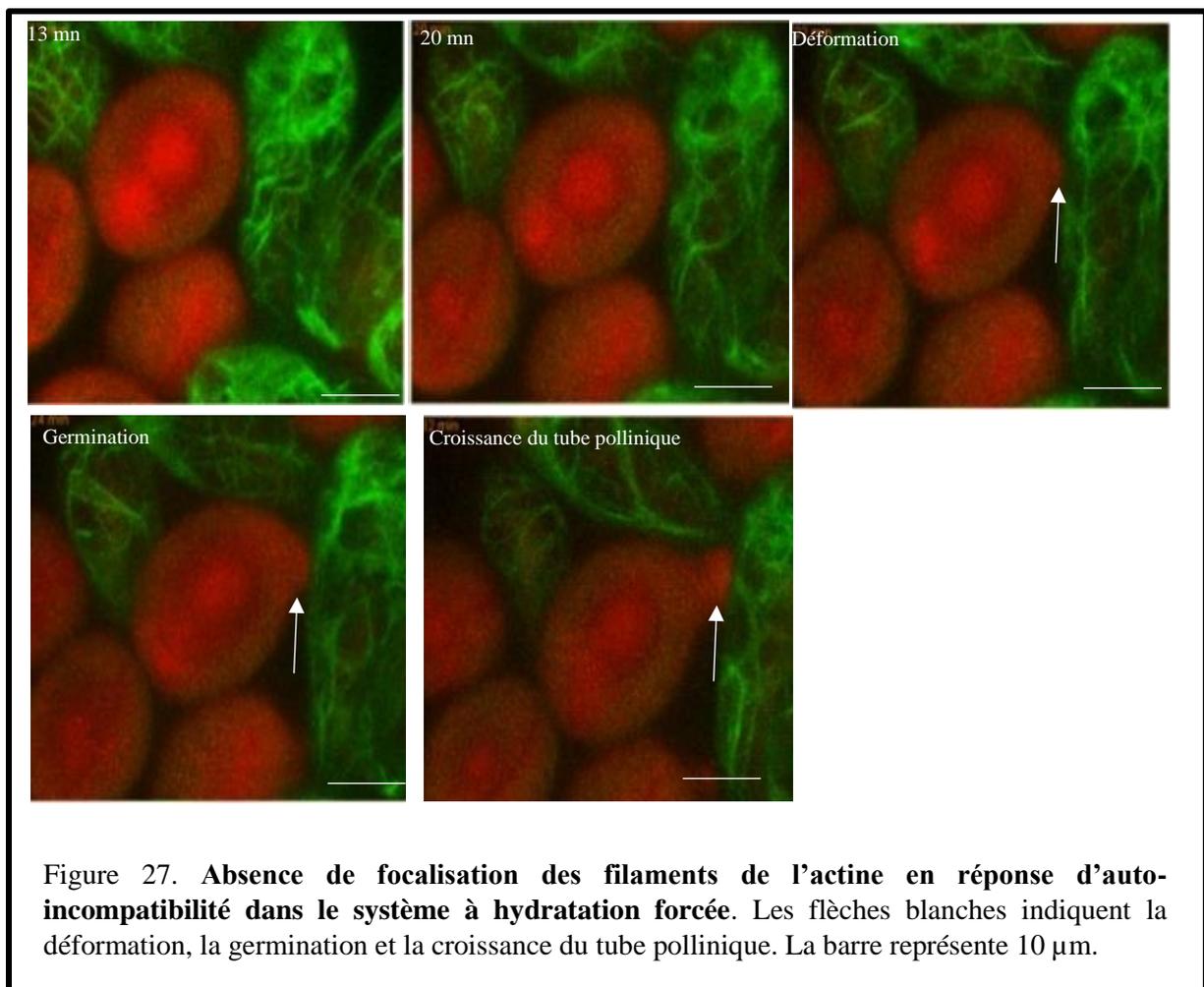
Tableau 3. **Pointage de la focalisation d'actine au cours de la pollinisation dans le système semi *in vivo*.** Repérage de la focalisation des filaments d'actine dans la papille en fonction du stade de développement des grains de pollen.

Focalisation de l'actine	Nombre de papilles stigmatiques
Fin de l'hydratation	6/24 (25%)
Pendant la déformation du pollen	4/24 (17%)
Durant la germination du pollen	2/24 (8%)
Après germination	10/24 (47%)
Pas de focalisation de l'actine	2/24 (8%)



En réponses d'auto-incompatibilité dans le système semi *in vivo*, sur les 53 grains de pollen suivi dans le temps, nous n'avons jamais observé de polymérisation d'actine au point de contact durant la durée des acquisitions d'image. Nous avons également observé, dans les conditions d'hydratation forcée, la dynamique de l'actine (figure 27). Sur les seize grains de pollen suivi dans le temps, aucune polymérisation d'actine n'a été observée pour 14 d'entre eux (annexe 5). Pour les deux grains de pollen restant une focalisation d'actine transitoire qui disparaît au court des acquisitions d'images a été observée.

Une réorganisation du cytosquelette d'actine au cours de la pollinisation apparaît tardivement en situation compatible et est très peu visible en situation incompatible. Comme nous avons vu, grâce au marquage FM4-64, que seul le tube compatible pénètre la papille, nous pouvons suggérer que la polymérisation d'actine serait déclenchée par cette intrusion du tube pollinique.



III.3.4.2 La papille stigmatique contrôle plusieurs grains de pollen

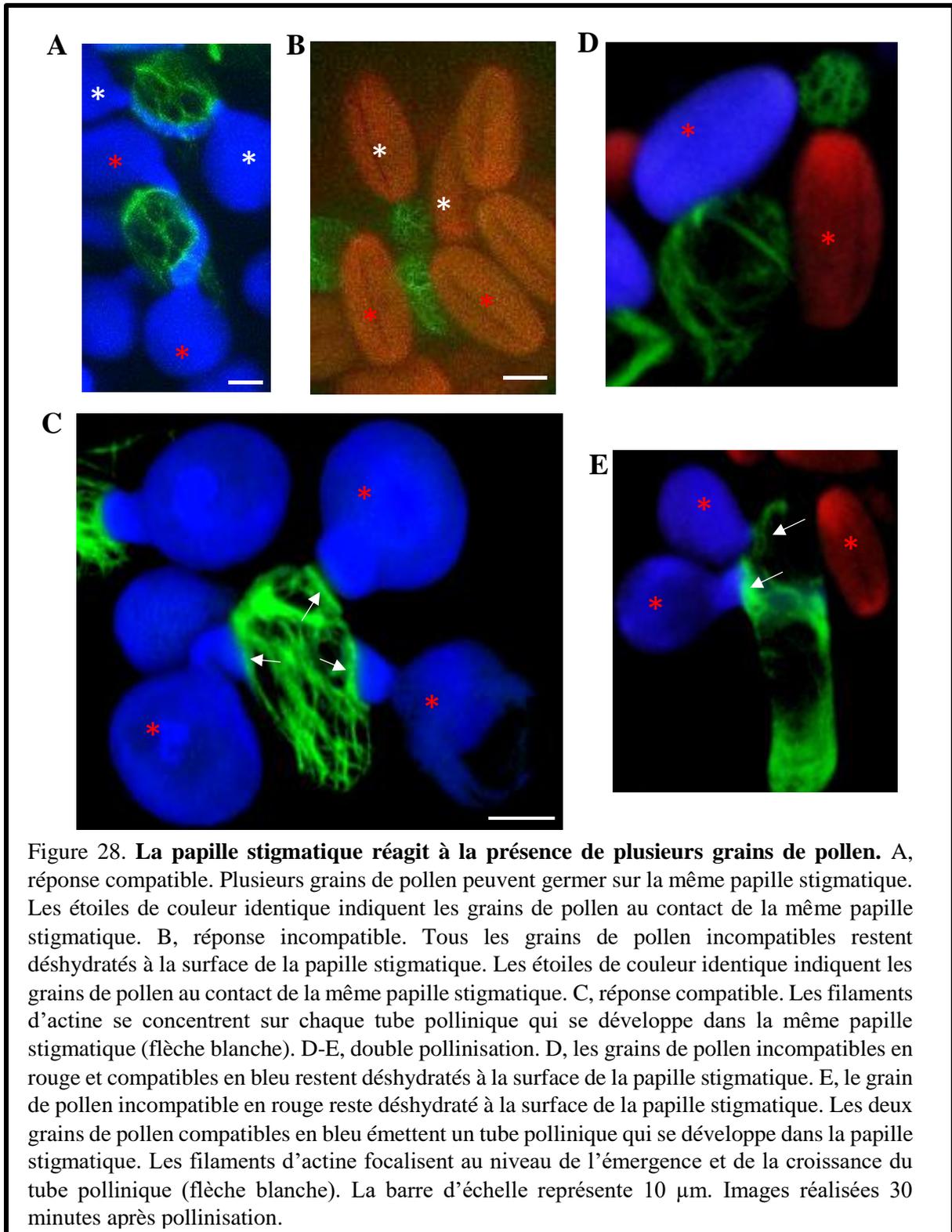
En conditions naturelles de pollinisation, plusieurs grains de pollen peuvent se déposer sur une même papille stigmatique. De plus, la papille stigmatique peut être confrontée à une double pollinisation. Du pollen compatible et du pollen incompatible peuvent être en contact simultanément avec une même papille stigmatique. Nous avons regardé comment une papille stigmatique pouvait réagir à la présence de plusieurs grains de pollen (compatibles et/incompatibles) dans notre système semi *in vivo*.

En réponse compatible, plusieurs grains de pollen peuvent émettre un tube pollinique sur une même papille stigmatique (figure 28A, annexe 6). Chaque tube se développe normalement dans la papille stigmatique. On peut remarquer un décalage de la taille des tubes polliniques sur la figure 28C suggérant une germination séquentielle des grains de pollen. Bien que ces résultats soient préliminaires, nous avons réalisé un premier comptage qui montre que les grains de pollen présents sur une même papille stigmatique en situation compatible germent les uns après les autres (annexe 6). Le temps entre la germination de chaque grain de pollen est cependant très variable (annexe 6). Un seul cas a été observé pour lequel deux grains de pollen ont germé simultanément (annexe 6). De façon intéressante, nous avons observé que chaque tube pollinique présent sur une même papille stigmatique provoque une focalisation d'actine (figure 28C).

En réponse incompatible tous les grains de pollen au contact de la papille restent déshydratés et ne germent pas (figure 28B).

Lorsque la papille stigmatique chez *A.thaliana* est confrontée à une double pollinisation (pollen compatible + pollen incompatible), il a été reporté que la réponse d'auto-incompatibilité limitait fortement la germination de tout grain de pollen compatible déposé sur cette même papille (Iwano et al., 2015). En opposition, Sarker en 1988 (Sarker et al., 1988) avait publié dans le genre Brassica la capacité des grains de pollen compatibles à émettre un tube pollinique même en présence d'un grain de pollen incompatible sur la même papille stigmatique. Nous avons déposé des grains de pollen incompatibles puis immédiatement après des grains de pollen compatibles sur une même zone du stigmate afin d'augmenter la probabilité qu'un grain incompatible et un grain compatible se retrouvent sur la même papille stigmatique. Nos observations montrent que des grains de pollen compatibles en contact avec une papille ayant reçu un pollen incompatible peuvent soit rester déshydratés (figure 28D) soit émettre un tube pollinique (figure 28E). Lorsqu'un tube pollinique est émis, une focalisation des filaments d'actine est alors observée (figure 28E). Sans avoir de donnée statistique, ni de mesures précises, nous avons l'impression que le grain compatible germe s'il est éloigné du grain

incompatible. Cette observation suggère que la réponse incompatible déclenchée sous le grain incompatible diffuserait dans la papille et bloquerait un autre grain proche mais cette diffusion serait limitée au voisinage du grain incompatible. Ces résultats préliminaires demandent à être étoffés, ce qui pourrait faire l'objet de la suite du projet.



III.3.5 Une structure jointive est visible tardivement entre les deux partenaires

Dès les premiers contacts entre le grain de pollen et la papille stigmatique une structure jointive permettant des échanges est visible par microscopie électronique (Elleman and Dickinson, 1990, 1996; Zinkl et al., 1999). Cette structure jointive appelée « foot » a également été observée grâce à une protéine du manteau pollinique, GRP17 fusionnée à une GFP (Green Fluorescent Proteine), et qui, lors du contact pollen-stigmate, migre depuis le pollen vers la surface de la papille dès le début de l'hydratation du pollen (Lévesque-Lemay et al., 2016b).

Afin de visualiser le « foot » dans notre système semi *in vivo*, nous avons introduit dans notre lignée C24/turq la protéine GRP17 fusionnée à la protéine mcherry. La protéine GRP17 marque le contour du grain de pollen ainsi que le point d'émission du tube pollinique (figure 29). Le cumul de la fluorescence en rouge et celle en bleu permet de visualiser le pourtour du pollen en rose (figure 29A). Les ouvertures correspondant à un amincissement de la couche de l'exine du pollen sont visibles en cours d'hydratation du pollen (figure 29B).

Nous avons suivi l'hydratation et la germination de ces grains de pollen afin de détecter la mise en place de cette structure jointive entre le grain de pollen et la papille stigmatique. Cette structure n'est visible, dans nos conditions expérimentales, uniquement en fin d'hydratation des grains de pollen juste avant l'émission du tube pollinique (figure 29C). Elle entoure le tube pollinique durant son émission (figure 29D) et permet de visualiser la sortie du tube pollinique (figure 29E).

La mise en évidence d'une structure jointive entre le grain de pollen avec la papille stigmatique, telle qu'elle a pu être décrite par différents auteurs dès l'adhésion par microscopie électronique, semble difficilement réalisable dans nos conditions expérimentales. Nous ne pouvons détecter que tardivement le point de contact entre la papille stigmatique et le grain de pollen au moment de l'émission du tube pollinique.

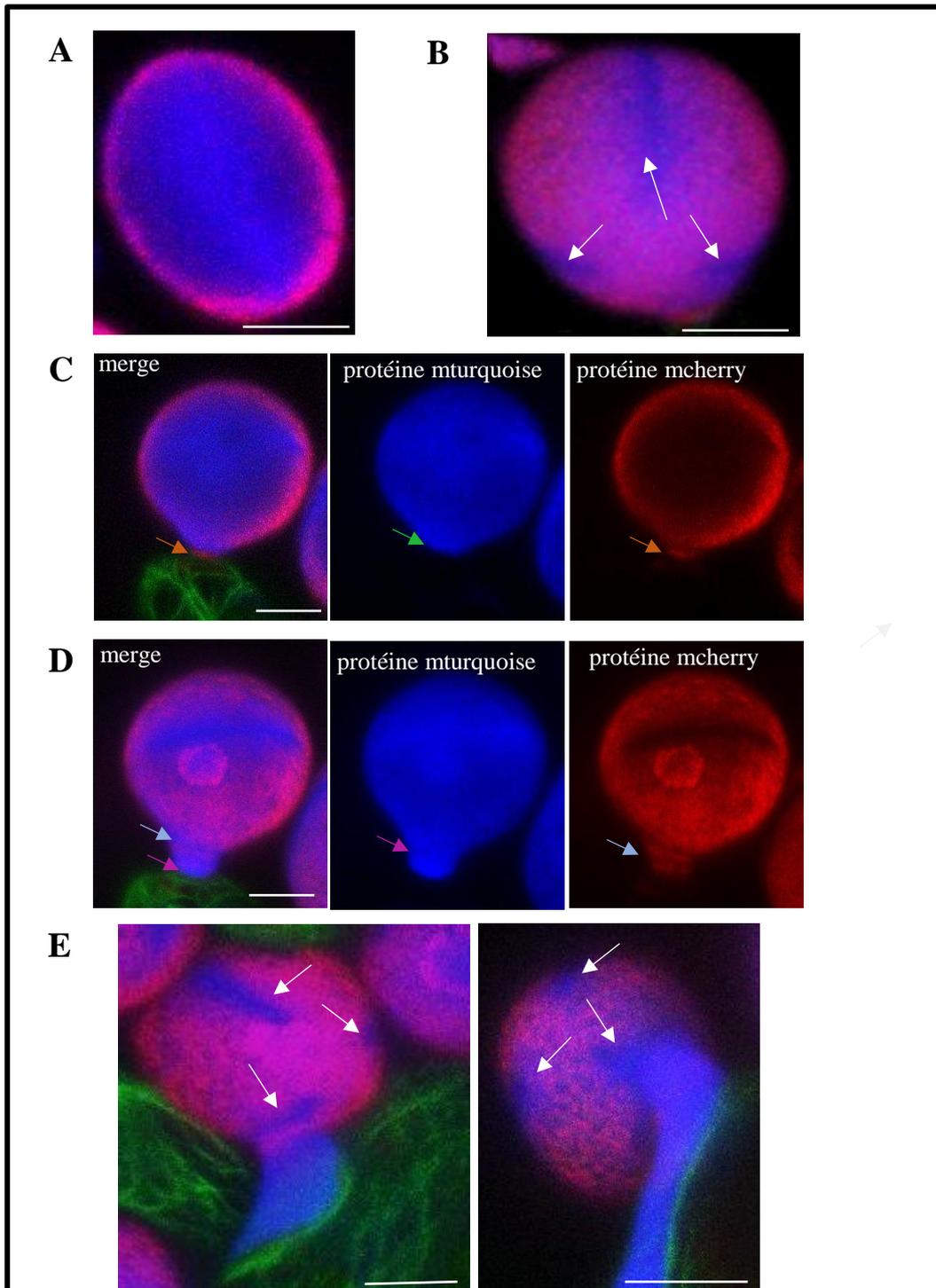


Figure 29. **visualisation du manteau pollinique des grains de pollen.** A, visualisation de la protéine fluorescente mcherry dans la couche externe du grain de pollen hydraté. Le cytoplasme est visualisé en bleu par la protéine fluorescente mturquoise. B, les apertures sont visibles sur le pollen hydraté (flèches blanches). C, mise en place d'une structure (flèche orange) entre le grain de pollen et la papille stigmatique au moment de l'initiation du grain de pollen (flèche verte). D, la couche externe du grain de pollen (flèche bleue) enrobe le tube pollinique (flèche violette) avant sa pénétration dans la papille stigmatique. E, le tube pollinique sort en dehors ou par une des apertures (flèches blanches) lorsque le grain de pollen est au contact d'une papille stigmatique. La barre = 10 μ m

III.4 DISCUSSION

Nous avons réalisé une étude de microscopie du vivant afin de caractériser les premières interactions établies entre les papilles stigmatiques et les grains de pollen au cours de la pollinisation chez les plantes à fleurs. Cette reconnaissance cellulaire fait intervenir divers mécanismes d'acceptation et de rejet du soi et du non soi. Chez les Brassicacées la réponse d'auto-incompatibilité, basées sur la reconnaissance d'un ligand par son récepteur, interviennent dès le premier contact du pollen avec la papille stigmatique. Dans ce cas, la papille rejette le pollen provenant de la même fleur (Dickinson, 1995; Safavian and Goring, 2013). Depuis les travaux de l'équipe de Nasrallah, sur la réintroduction de la réponse d'auto-incompatibilité chez *A.thaliana*, par transfert du récepteur kinase SRK et de son ligand SCR provenant de l'espèce auto-incompatible *A.lyrata*, de nouvelles opportunités d'études sur la pollinisation se sont ouvertes (Nasrallah et al., 2002).

III.4.1 L'haplotype *SI4* chez *A.lyrata* restaure la réponse auto-incompatible chez *A.thaliana*

Nous avons généré nos propres lignées mâles et femelles exprimant le ligand *SCR14* et le récepteur *SRK14* provenant d'*A.lyrata*. Les lignées que nous avons générées expriment une réponse d'auto-incompatibilité stable aux stades de développement du pistil 13, 14 et 15. Au-delà, cette réponse diminue, ce qui conduit à la production de graines. Toutefois, il est important de noter que le nombre de graines est réduit par rapport à un croisement compatible ce qui montre que la réponse d'auto-incompatibilité se maintient partiellement au cours du temps dans nos lignées en comparaison des lignées décrites dans la littérature (Nasrallah, 2019). De plus, nous avons montré qu'aux stades 13-14, stades auxquels nous avons réalisé nos expériences de pollinisation dans le système semi *in vivo* et correspondant à la déhiscence des anthères et à la maturité optimale des papilles stigmatiques, la réponse de rejet du pollen est stable et forte.

III.4.2 Notre système semi *in vivo* ne modifie pas le comportement du pollen durant la pollinisation

Des marqueurs fluorescents ont été introduits dans ces lignées d'*A.thaliana* exprimant les déterminants de l'auto-incompatibilité (SRK et SCR) et dans des lignées sauvages pour visualiser spécifiquement les grains de pollen et les papilles stigmatiques par microscopie confocale et ainsi identifier les interactions qui s'établissent entre les partenaires. La lignée femelle exprimant *SRK14* a été transformée avec la molécule chimère *venus-lifeact* afin de

suivre la dynamique des filaments d'actine en réponse compatible et incompatible. Cette molécule chimère qui se lie aux filaments d'actine (Courtemanche et al., 2016) présente une fluorescence plus stable que la protéine fusion GFP-mTalin décrite par différents auteurs (Fu et al., 2001; Iwano et al., 2007). Deux lignées mâles ont été générées pour exprimer une fluorescence au niveau des grains de pollen et du tube pollinique. Nous avons transformé des plantes pour exprimer une fluorescence cytoplasmique sous le contrôle de promoteurs spécifiques du gamétophyte mâle. Ainsi sur un même stigmate nous pouvons distinguer les deux types de pollen.

Nous avons mis au point un protocole permettant de visualiser des lignées sous microscopie confocale afin de suivre les évènements précoces de la pollinisation. Plusieurs contraintes nous ont conduit à déposer du pollen compatible et incompatible sur le même stigmate lors de notre étude. L'émasculature des fleurs, le stade de développement des stigmates (Ma et al., 2012), le taux d'hygrométrie (Dickinson, 1995) sont des facteurs influant sur la pollinisation et pouvant modifier le comportement du pollen au cours de différentes expérimentations. Pour limiter le niveau d'hygrométrie de notre système semi *in vivo*, la boule d'agarose, qui permet le maintien en survie du stigmate durant toute la durée de l'expérimentation, est recouverte d'un fond de capuchon percé. Le trou réalisé dans le capuchon permet de mettre le pistil au contact de l'agarose et de le maintenir droit. L'évaporation de l'eau présente dans le support solide d'agarose est ainsi contenue.

Les grains de pollen ont été déposés de part et d'autre du stigmate en limitant leur contact afin d'éviter toute influence d'un type de pollen par rapport à l'autre. En effet, un groupe japonais a démontré que le pollen incompatible pouvait limiter la germination du pollen compatibles lorsqu'il est déposé sur une même papille stigmatique (Iwano et al., 2015). Cette répartition permet ainsi d'étudier indépendamment le comportement de chaque type de pollen.

La reconnaissance du pollen par le stigmate induit des évènements biologiques extrêmement rapides. Pour répondre à cette contrainte nous avons utilisé un microscope confocale SP8 à scanner résonnant qui nous a permis d'établir un chronométrage précis du comportement du pollen sur les papilles stigmatiques. Un objectif à grande ouverture numérique nous permet également de travailler sur une profondeur de champ de 50 μm couvrant ainsi une partie de la hauteur du stigmate.

Pour valider notre système semi *in vivo*, nous avons caractérisé l'hydratation des grains de pollen incompatibles et compatibles. Chez les Brassicacées, l'hydratation du pollen dépend du flux d'eau provenant de la papille stigmatique. D'un niveau hydratation de 15 à 35% au moment de la déhiscence des anthères (Heslop-Harrison, 1979), les grains de pollen s'hydratent plus ou

moins rapidement chez *A.thaliana* (Dickinson, 1995; Preuss et al., 1993). Durant chacune de nos expérimentations, le niveau de déshydratation des grains de pollen incompatibles et le faible pourcentage de germination nous indiquent que le niveau d'hygrométrie est bien contrôlé dans ce système semi *in vivo*; les pollens incompatibles ne s'hydratent pas spontanément et leur germination reste exceptionnelle, comme observé *in planta*. En opposition, les grains de pollen compatibles déposés sur le même stigmate, débutent une hydratation dans les minutes qui suivent leur dépôt sur les papilles stigmatiques. Cette hydratation est caractérisée par une modification de forme des grains de pollen. Ce changement de forme est essentiellement lié à un élargissement du grain de pollen (Dickinson, 1995; Hiroi et al., 2013; Zuberi and Dickinson, 1985). Afin de pallier les erreurs de mesure dues à la prise de vue, en ne mesurant que la largeur des pollens, nous avons établi le rapport de la longueur sur la largeur (L/l) qui nous donne une indication de la forme des grains de pollen. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un seuil critique L/l (1,4) que le grain de pollen doit atteindre pour initier la germination du tube pollinique. Ce rapport est atteint plus ou moins rapidement selon les grains de pollen et nous avons montré que plus ce rapport est atteint rapidement plus le grain de pollen germe vite.

III.4.3 Notre système semi *in vivo* permet d'étudier la réponse d'auto-incompatibilité chez *A.thaliana*

La réponse d'auto-incompatibilité peut être levée par une hygrométrie élevée (Carter and McNeilly, 1976; Roberts et al., 1980; Zuberi and Dickinson, 1985). Une forte hygrométrie de l'air ambiant induit une hydratation des grains de pollen provoquant ainsi l'émission de tubes polliniques anormaux qui semblent incapables de pénétrer la papille stigmatique (Zuberi and Dickinson, 1985, Edlund et al., 2016). Nous avons modifié notre système semi *in vivo* pour augmenter le niveau d'hygrométrie de la petite chambre et ainsi visualiser le comportement des grains de pollen incompatibles. Nous avons vérifié que notre système à hygrométrie forcée ne perturbe pas l'hydratation et la germination des grains de pollen compatibles. La vitesse de croissance des tubes polliniques dans les papilles stigmatiques est comparable dans les deux types d'expérimentations (systèmes semi *in vivo* et en hydratation forcée). L'augmentation du niveau d'hygrométrie dans notre système à hydratation forcée est progressive et débute quand la lamelle recouvre le stigmate. L'évaporation de l'eau contenue dans les boules d'agarose apporte un environnement de plus en plus humide au niveau des papilles stigmatiques. Il est toutefois difficile de définir un niveau d'hygrométrie précis dans cette petite chambre.

Le niveau d'hydratation des grains de pollen incompatibles est comparable aux résultats obtenus en situation compatible. Bien qu'une 75.92% des grains de pollen incompatibles

montrent un rapport L/l en dessous de 1,4 au cours des vingt minutes qui suivent leur dépôt sur les stigmates, on note une disparité des pourcentages de germination. Le seuil de 1.4 du rapport L/l n'est donc pas la seule condition pour que les grains de pollen incompatibles germent. Des interactions moléculaires entre les grains de pollen et les papilles stigmatiques autres que des flux d'eau pourraient être nécessaires. Chez *B.oleracea* la relation pollen-stigmate initie une polarisation des composants cytoplasmiques du pollen (Elleman and Dickinson, 1996) qui n'est plus visible lorsque les grains de pollen sont hydratés avec une forte hygrométrie sur un milieu de culture *in vitro* (Elleman and Dickinson, 1990). Il serait intéressant de visualiser l'augmentation de la présence du réticulum endoplasmique et la présence de vésicules au niveau des grains de pollen incompatibles déposés dans notre système d'hydratation forcée. L'élongation des tubes polliniques incompatibles émis est limitée en comparaison à la situation compatible (respectivement 6.29 μm et 11.47 μm). En culture *in vitro*, sur des milieux adaptés à la germination des grains de pollen, les tubes polliniques peuvent atteindre 200 μm en 1h00 soit 3.33 $\mu\text{m}/\text{minutes}$ (Boavida and McCormick, 2007). Les mesures effectuées dans notre système à hydratation forcée montrent une vitesse de croissance similaire des tubes polliniques entre une situation incompatible et compatible durant les trois premières minutes qui suivent la germination, puis la vitesse devient constante et atteint une phase plateau en situation incompatible. Ce comportement pourrait être dû à un second contrôle de la réponse d'auto-incompatibilité initiée chez *A.tahliana* où les tubes polliniques auraient des difficultés à pénétrer la papille stigmatique. Un dépôt de callose au point de contact entre le grain de pollen et la papille stigmatique a été décrit comme responsable de l'échec de la pénétration du tube pollinique chez Brassica (Zuberi and Dickinson, 1985). Les tubes polliniques incompatibles développés dans notre système à hydratation forcée ne semblent pas montrer de pénétration de la papille stigmatique. Pour définir le positionnement des tubes polliniques par rapport à la couche externe de la papille et vérifier notre hypothèse, nous avons réalisé une coloration avec le FM4-64. En situation compatible, les tubes polliniques se situent sous la couche marquée par le FM4-64 (probablement la cuticule) alors qu'en situation incompatible les tubes polliniques sont situés à l'extérieur de la papille. Ceci confirme que les tubes polliniques en situation incompatible ne pénètrent pas la papille stigmatique. Nos expérimentations semblent indiquer qu'il existe trois niveaux de contrôle de la réponse d'auto-incompatibilité. Le premier se situe dès le dépôt du pollen incompatible inhibant son hydratation. Si l'hydratation est stimulée (dans notre système d'hydratation forcée) et que son niveau passe en dessous d'un rapport L/l de 1,4, les grains de pollen n'initient que rarement l'émergence d'un tube pollinique. Et lorsqu'un tube est produit, ce dernier ne peut pénétrer la papille stigmatique. Toutefois on observe que le tube

pollinique reste proche de la papille stigmatique et n'évolue pas aléatoirement dans la petite chambre de culture.

III.4.4 Le système semi *in vivo* permet d'étudier des comportements cellulaires de la papille stigmatique au cours de la pollinisation

Les multiples rôles attribués au cytosquelette d'actine démontrent son importance dans les processus cellulaires. Nous avons suivi les mouvements d'actine grâce à la protéine fluorescente *venus* au cours de la pollinisation. En réponse compatible, une focalisation d'actine apparaît plus ou moins rapidement selon les papilles stigmatiques. Elle intervient, dans les cas les plus précoces, lors de la déformation des grains de pollen juste avant l'émission du tube pollinique. Elle se poursuit durant la croissance du tube pollinique dans la papille stigmatique. A l'opposé, aucune focalisation de l'actine n'est visible en situation d'incompatibilité. De la même manière, lorsque la germination des tubes incompatibles est favorisée par une forte hygrométrie, les tubes n'induisent généralement pas de remobilisation des filaments d'actine et dans les rares cas où une focalisation se produit, elle est très faible et ne persiste pas durant la croissance du tube pollinique. Nos résultats montrent donc que la réorganisation d'actine est spécifique de la réponse compatible. Grâce à des reconstructions en trois dimensions on peut visualiser les filaments d'actine concentrés autour du tube pollinique compatible en émergence puis en croissance. La focalisation d'actine le long du tube pollinique semble indiquer que la papille stigmatique réagit à la pénétration et l'élongation du tube pollinique. Deux hypothèses peuvent découler de cette observation. Soit la polymérisation des filaments d'actine permet d'apporter les éléments nécessaires à la croissance du tube pollinique tel que cela a été suggéré par différents auteurs, soit la papille stigmatique réagit à la pénétration d'un corps étranger de façon similaire à la réaction de la plante lors d'une attaque par un pathogène. En effet, un réarrangement des filaments d'actine a été observé au point d'infection avec le pathogène (Porter and Day, 2016). Nous pouvons ainsi suggérer que la papille stigmatique réagit à la pollinisation par un mouvement de son cytosquelette d'actine en réponse à l'invasion par un tube pollinique comme le ferait une autre cellule épidermique en réponse à une intrusion d'un pathogène.

Lorsque plusieurs grains de pollen sont déposés sur une même papille stigmatique en situation compatible, on observe une réorganisation des filaments d'actine pour chacun des tubes polliniques émis. Cependant, l'émission des tubes polliniques n'est pas synchrone. Il serait intéressant d'établir une courbe d'hydratation pour chacun des grains de pollen présent

sur une même papille stigmatique et d'établir un lien possible entre la rapidité de germination des grains de pollen et leur rapidité à s'hydrater (rapport L/l). Ceci pourrait indiquer que soit l'hydratation est séquentielle sur un ensemble de grains de pollen présents sur une même papille soit au contraire que c'est l'émission du tube pollinique qui est décalée dans le temps.

Par ailleurs, une même papille stigmatique est capable d'une part d'inhiber l'hydratation des grains de pollen incompatibles et d'autre part de réagir à la pénétration des tubes polliniques en situation compatible. Dans chacun des deux contextes l'actine jouerait un rôle important. Lorsqu'une papille stigmatique est confrontée à une double pollinisation (compatible et réponse d'auto-incompatibilité), les filaments d'actine suivent la croissance des tubes polliniques compatibles. En situation incompatible, les données d'un groupe japonais démontrent une diminution de la concentration des filaments d'actine dans la papille stigmatique au point de contact avec le pollen 1h00 après pollinisation chez Brassica (Iwano et al., 2007). La papille stigmatique serait donc capable de discerner et d'adapter le comportement des filaments d'actine selon chacune des situations. Notre système semi *in vivo* pourrait permettre d'étudier la dynamique des filaments d'actine lorsqu'une papille stigmatique est confrontée à une double pollinisation.

III.4.5 Le système semi *in vivo* peut être utilisé pour rechercher le point de contact entre le grain de pollen et la papille stigmatique

Définir le point de contact entre la papille stigmatique et le grain de pollen peut s'avérer compliqué selon la position de chacun des partenaires lors des acquisitions d'images. Nous avons cherché à identifier ce point de contact en introduisant une molécule fluorescente au niveau de la couche externe du grain de pollen (GRP17-mcherry). Cependant, Cette structure jointive visible par microscopie électronique dès le début de l'hydratation du pollen (Elleman and Dickinson, 1990; Roberts et al., 1980; Zinkl et al., 1999) n'est visible que tardivement dans nos conditions expérimentales (juste avant la germination). Une faible fluorescence pourrait expliquer que nous n'avons pas pu identifier le point de contact entre les deux partenaires au moment de l'hydratation des grains de pollen. Cependant, la double fluorescence (cytoplasmique et couche externe) de nos grains de pollen permet de situer le point d'émergence du tube pollinique. Le manteau pollinique visible en rouge entoure le tube pollinique détecté en bleu. Chez *A.thaliana* le tube pollinique ne privilégie pas sa sortie par les apertures, dont l'épaisseur de l'exine est moindre, mais directement par le point de contact avec la papille stigmatique (Edlund et al., 2016). Il est donc capable de détruire l'exine du grain de pollen. Il

pourrait être intéressant avec nos lignées, pour lesquelles les apertures sont clairement identifiées, de confirmer ces données.

III.4.6 Conclusion

En conclusion, la mise au point d'un système d'observation en imagerie du vivant du stigmate nous a permis de visualiser de manière dynamique différents événements spécifiques aux premières étapes de la pollinisation. Notre système semi *in vivo* nous a ainsi permis de caractériser chez *A.thaliana* i) l'hydratation des grains de pollen et leur germination en situation compatible, ii) la dynamique du cytosquelette d'actine. Notre système pourra être utilisé pour visualiser en direct d'autres mouvements cellulaires comme par exemple, des vésicules intracellulaires connues pour être impliquées dans la réponse compatible (Goring, 2018). Grâce à notre système en hydratation forcée, nous avons pu mettre en évidence trois niveaux de contrôle de la réponse auto-incompatible chez *A.thaliana* et démontrer que les tubes polliniques émis dans ces conditions ne pénétraient pas la papille stigmatique. Un article a pu être initié à partir de ce travail (annexe 7).

IV. BIBLIOGRAPHIE

- Abell, B.M., Hahn, M., Holbrook, L.A., and Moloney, M.M. (2004). Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin. *Plant J.* 37, 461–470.
- Bel, A.J.E. van, and Kesteren, W.J.P. van (2012). *Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communication* (Springer Science & Business Media).
- Bertani, G. (1951). STUDIES ON LYSOGENESIS I. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.
- Bloemendal, S., and Kück, U. (2013). Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften* 100, 3–19.
- Boavida, L.C., and McCormick, S. (2007). TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 52, 570–582.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 15, 441–447.
- Boggs, N.A., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (2009). Independent S-Locus Mutations Caused Self-Fertility in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* 5, e1000426.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* 214, 159–173.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112, 1–20.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C., and Gaude, T. (2001). The S -locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410, 220.
- Cameron, C., and Geitmann, A. (2018a). Cell mechanics of pollen tube growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 51, 11–17.
- Cameron, C., and Geitmann, A. (2018b). Cell mechanics of pollen tube growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 51, 11–17.
- Carter, A.L., and McNeilly, T. (1976). Increased atmospheric humidity post pollination: A possible aid to the production of inbred line seed from mature flowers in the Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *Gemmifera*). *Euphytica* 25, 531–538.
- Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J.-Y., Oh, E., and Wang, Z.-Y. (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell* 164, 1257–1268.
- Chapman, L.A., and Goring, D.R. (2010). Pollen–pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae. *J. Exp. Bot.* 61, 1987–1999.
- Chen, W., Yin, X., Wang, L., Tian, J., Yang, R., Liu, D., Yu, Z., Ma, N., and Gao, J. (2013). Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1. *Plant Mol. Biol.* 83, 219–233.

- Cheung, A.Y., Duan, Q., Costa, S.S., de Graaf, B.H.J., Di Stilio, V.S., Feijo, J., and Wu, H.-M. (2008). The Dynamic Pollen Tube Cytoskeleton: Live Cell Studies Using Actin-Binding and Microtubule-Binding Reporter Proteins. *Mol. Plant* *1*, 686–702.
- Cilia, M.L., and Jackson, D. (2004). Plasmodesmata form and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 500–506.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* *119*, 397–418.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735–743.
- Cochard, H., Venisse, J.-S., Barigah, T.S., Brunel, N., Herbette, S., Guilliot, A., Tyree, M.T., and Sakr, S. (2007). Putative Role of Aquaporins in Variable Hydraulic Conductance of Leaves in Response to Light. *Plant Physiol.* *143*, 122–133.
- Courtemanche, N., Pollard, T.D., and Chen, Q. (2016). Avoiding artifacts when counting polymerized actin in live cells with Lifeact-fluorescent fusion proteins. *Nat. Cell Biol.* *18*, 676–683.
- Cresti, M., Blackmore, S., and Went, J.L. van (1992). *Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Dickinson, H. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sex. Plant Reprod.* *8*, 1–10.
- Dickinson, H.G., and Elleman, C.J. (1985). Structural changes in the pollen grain of Brassica oleracea during dehydration in the anther and development on the stigma as revealed by anhydrous fixation techniques. *Micron Microsc. Acta* *16*, 255–270.
- Ding, B., Itaya, A., and Woo, Y.-M. (1999). Plasmodesmata and Cell-to-Cell Communication in Plants. In *International Review of Cytology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 251–316.
- Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A., and Dickinson, H. (1993). Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 467.
- Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S.J., Willis, A.C., Parkin, I.A.P., and 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. *Plant Cell* *10*, 1333–1347.
- DOUGHTY, J., WONG, H.Y., and DICKINSON, H.G. (2000). Cysteine-rich Pollen Coat Proteins (PCPs) and their Interactions with Stigmatic S (Incompatibility) and S-Related Proteins in Brassica: Putative Roles in SI and Pollination. *Ann. Bot.* *85*, 161–169.
- Edlund, A.F., Swanson, R., and Preuss, D. (2004a). Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *Plant Cell* *16*, S84–S97.
- Edlund, A.F., Swanson, R., and Preuss, D. (2004b). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* *16*, S84–S97.

- Edlund, A.F., Zheng, Q., Lowe, N., Kuseryk, S., Ainsworth, K.L., Lyles, R.H., Sibener, S.J., and Preuss, D. (2016). Pollen from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae are functionally omniaperturate. *Am. J. Bot.* *103*, 1006–1019.
- Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1990). The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytol.* *114*, 511–518.
- Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1996). Identification of pollen components regulating pollination-specific responses in the stigmatic papillae of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* *133*, 197–205.
- Elleman, C.J., Franklin-Tong, V., and Dickinson, H.G. (1992). Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* *121*, 413–424.
- Feng, X., and Dickinson, H.G. (2010). Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the *Arabidopsis* anther. *Development* *137*, 2409–2416.
- Fu, Y., Wu, G., and Yang, Z. (2001). ROP Gtpase-Dependent Dynamics of Tip-Localized F-Actin Controls Tip Growth in Pollen Tubes. *J. Cell Biol.* *152*, 1019–1032.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., and Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *59*, 169.
- Goring, D.R. (2018). Exocyst, exosomes, and autophagy in the regulation of Brassicaceae pollen-stigma interactions. *J. Exp. Bot.* *69*, 69–78.
- Hackett, R.M., Cadwallader, G., and Franklin, F.C. (1996). Functional analysis of a *Brassica oleracea* SLR1 gene promoter. *Plant Physiol.* *112*, 1601–1607.
- Haga, K., and Sakai, T. (2012). PIN Auxin Efflux Carriers Are Necessary for Pulse-Induced But Not Continuous Light-Induced Phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *160*, 763–776.
- Hazak, O., and Hardtke, C.S. (2016). CLAVATA 1-type receptors in plant development. *J. Exp. Bot.* *67*, 4827–4833.
- He, Y., Zhou, J., Shan, L., and Meng, X. (2018). Plant cell surface receptor-mediated signaling – a common theme amid diversity. *J Cell Sci* *131*, jcs209353.
- Hepler, P.K., Rounds, C.M., and Winship, L.J. (2013). Control of Cell Wall Extensibility during Pollen Tube Growth. *Mol. Plant* *6*, 998–1017.
- Heslop-Harrison, J. (1979). An Interpretation of the Hydrodynamics of Pollen. *Am. J. Bot.* *66*, 737–743.
- Heslop-Harrison, Y., and Shivanna, K.R. (1977). The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. *Ann. Bot.* *41*, 1233–1258.
- Hiroi, K., Sone, M., Sakazono, S., Osaka, M., Masuko-Suzuki, H., Matsuda, T., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2013). Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa*. *Ann. Bot.* *112*, 115–122.

- Hiscock, S.J., and Allen, A.M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* *179*, 286–317.
- Huang, S., An, Y.Q., McDowell, J.M., McKinney, E.C., and Meagher, R.B. (1997). The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol. Biol.* *33*, 125–139.
- Igic, B., Lande, R., and Kohn, J.R. (2008). Loss of Self-Incompatibility and Its Evolutionary Consequences. *Int. J. Plant Sci.* *169*, 93–104.
- Itaya, A., Woo, Y.-M., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, R.S., and Ding, B. (1998). Developmental Regulation of Intercellular Protein Trafficking through Plasmodesmata in Tobacco Leaf Epidermis. *Plant Physiol.* *118*, 373–385.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.-S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., and Isogai, A. (2004). Ca²⁺ Dynamics in a Pollen Grain and Papilla Cell during Pollination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* *136*, 3562–3571.
- Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., Miwa, T., Funato, M., Entani, T., Nakayama, P., Shimosato, H., Takaoka, A., Isogai, A., et al. (2007). Actin dynamics in papilla cells of Brassica rapa during self- and cross-pollination. *Plant Physiol.* *144*, 72–81.
- Iwano, M., Igarashi, M., Tarutani, Y., Kaothien-Nakayama, P., Nakayama, H., Moriyama, H., Yakabe, R., Entani, T., Shimosato-Asano, H., Ueki, M., et al. (2014). A Pollen Coat-Inducible Autoinhibited Ca²⁺-ATPase Expressed in Stigmatic Papilla Cells Is Required for Compatible Pollination in the Brassicaceae[W]. *Plant Cell* *26*, 636–649.
- Iwano, M., Ito, K., Fujii, S., Kakita, M., Asano-Shimosato, H., Igarashi, M., Kaothien-Nakayama, P., Entani, T., Kanatani, A., Takehisa, M., et al. (2015a). Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nat. Plants* *1*, 15128.
- Iwano, M., Ito, K., Fujii, S., Kakita, M., Asano-Shimosato, H., Igarashi, M., Kaothien-Nakayama, P., Entani, T., Kanatani, A., Takehisa, M., et al. (2015b). Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nat. Plants* *1*, 15128.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* *11*, 1925–1934.
- Kachroo, A., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (2002). Self-Incompatibility in the Brassicaceae. *Plant Cell* *14*, s227–s238.
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (1994). Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in Arabidopsis. *Development* *120*, 3405–3418.
- Kitashiba, H., and Nasrallah, J.B. (2014). Self-incompatibility in Brassicaceae crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breed. Sci.* *64*, 23–37.
- Kitashiba, H., Liu, P., Nishio, T., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (2011). Functional test of Brassica self-incompatibility modifiers in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18173–18178.

Kohorn, B.D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., Defeo, E., and Obregon, P. (2009). Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 60, 974–982.

Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J.B., and Nasrallah, M.E. (2001). Self-Incompatibility in the Genus *Arabidopsis*: Characterization of the S Locus in the Outcrossing *A. lyrata* and Its Autogamous Relative *A. thaliana*. *Plant Cell* 13, 627–643.

Lee, J.-Y., Cho, S.K., and Sager, R. (2011). Plasmodesmata and Noncell Autonomous Signaling in Plants. In *The Plant Plasma Membrane*, A.S. Murphy, B. Schulz, and W. Peer, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 87–107.

Lennon, K.A., Roy, S., Hepler, P.K., and Lord, E.M. (1998). The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* 11, 49–59.

Lévesque-Lemay, M., Chabot, D., Hubbard, K., Chan, J.K., Miller, S., and Robert, L.S. (2016a). Tapetal oleosins play an essential role in tapetosome formation and protein relocation to the pollen coat. *New Phytol.* 209, 691–704.

Lévesque-Lemay, M., Chabot, D., Hubbard, K., Chan, J.K., Miller, S., and Robert, L.S. (2016b). Tapetal oleosins play an essential role in tapetosome formation and protein relocation to the pollen coat. *New Phytol.* 209, 691–704.

Liu, X., Castro, C., Wang, Y., Noble, J., Ponvert, N., Bundy, M., Hoel, C., Shpak, E., and Palanivelu, R. (2016). The Role of LORELEI in Pollen Tube Reception at the Interface of the Synergid Cell and Pollen Tube Requires the Modified Eight-Cysteine Motif and the Receptor-Like Kinase FERONIA. *Plant Cell* 28, 1035–1052.

Luu, D.T., Heizmann, P., and Dumas, C. (1997). Pollen-Stigma Adhesion in Kale Is Not Dependent on the Self-(In)Compatibility Genotype. *Plant Physiol.* 115, 1221–1230.

Ma, J.-F., Liu, Z.-H., Chu, C.-P., Hu, Z.-Y., Wang, X.-L., and Zhang, X.S. (2012). Different regulatory processes control pollen hydration and germination in *Arabidopsis*. *Sex. Plant Reprod.* 25, 77–82.

Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., Luo, Y., and Gao, J. (2008). Rh-PIP2;1, a Rose Aquaporin Gene, Is Involved in Ethylene-Regulated Petal Expansion. *Plant Physiol.* 148, 894–907.

Mamode Cassim, A., Gouguet, P., Gronnier, J., Laurent, N., Germain, V., Grison, M., Boutté, Y., Gerbeau-Pissot, P., Simon-Plas, F., and Mongrand, S. (2019). Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog. Lipid Res.* 73, 1–27.

Matsushima, N., and Miyashita, H. (2012). Leucine-Rich Repeat (LRR) Domains Containing Intervening Motifs in Plants. *Biomolecules* 2, 288–311.

Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., and Verdoucq, L. (2015). Aquaporins in Plants. *Physiol. Rev.* 95, 1321–1358.

- Mayfield, J.A., and Preuss, D. (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat. Cell Biol.* 2, 128–130.
- Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. (2008). The Receptor Kinase CORYNE of *Arabidopsis* Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1. *Plant Cell* 20, 934–946.
- Murphy, D.J. (2006). The extracellular pollen coat in members of the Brassicaceae: composition, biosynthesis, and functions in pollination. *Protoplasma* 228, 31.
- Murphy, E., Smith, S., and Smet, I.D. (2012). Small Signaling Peptides in *Arabidopsis* Development: How Cells Communicate Over a Short Distance. *Plant Cell* 24, 3198–3217.
- Nasrallah, J.B. (2019). Chapter Sixteen - Self-incompatibility in the Brassicaceae: Regulation and mechanism of self-recognition. In *Current Topics in Developmental Biology*, U. Grossniklaus, ed. (Academic Press), pp. 435–452.
- Nasrallah, M.E., and Wallace, D.H. (1967). Immunogenetics of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Heredity* 22, 519.
- Nasrallah, M.E., Liu, P., and Nasrallah, J.B. (2002). Generation of Self-Incompatible *Arabidopsis thaliana* by Transfer of Two S Locus Genes from *A. lyrata*. *Science* 297, 247–249.
- Nasrallah, M.E., Liu, P., Sherman-Broyles, S., Boggs, N.A., and Nasrallah, J.B. (2004). Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: Implications for the evolution of selfing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16070–16074.
- Nou, S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (1993). Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6, 79–86.
- Ockendon, D.J. (1972). Pollen Tube Growth and the Site of the Incompatibility Reaction in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 71, 519–522.
- Overall, R.L., and Blackman, L.M. (1996). A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1, 307–311.
- Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Bilou, I., and Palme, K. (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.* 10, 170–177.
- Porter, K., and Day, B. (2016). From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 58, 299–311.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7, 974–985.

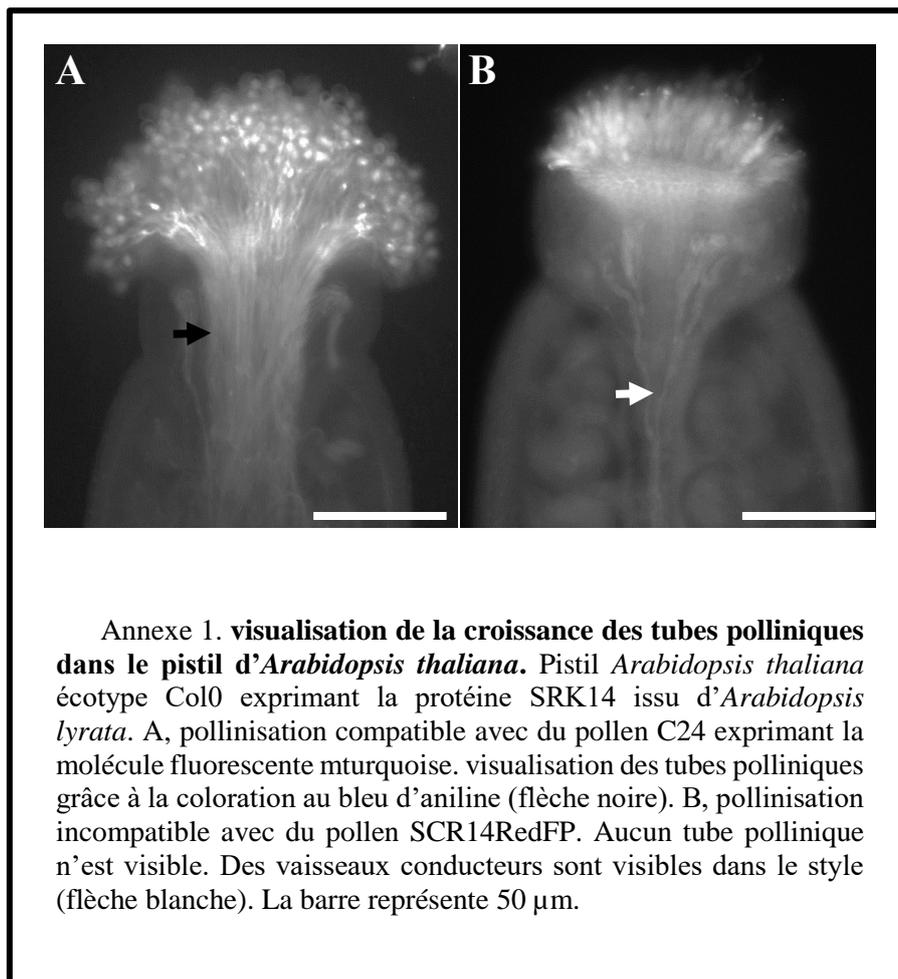
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E.B., and Baskin, T.I. (2007). Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J.* 50, 514–528.
- Reichelt, S., Knight, A.E., Hodge, T.P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., and Kendrick-Jones, J. (1999). Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J.* 19, 555–567.
- Roberts, A., and Oparka, K. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ.* 26, 103–124.
- Roberts, I.N., Stead, A.D., Ockendon, D.J., and Dickinson, H.G. (1980). Pollen stigma interactions in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 58, 241–246.
- Roberts, I.N., Harrod, G., and Dickinson, H.G. (1984). Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*. I. Ultrastructure and physiology of the stigmatic papillar cells. *J. Cell Sci.* 66, 241–253.
- Safavian, D., and Goring, D.R. (2013). Secretory Activity Is Rapidly Induced in Stigmatic Papillae by Compatible Pollen, but Inhibited for Self-Incompatible Pollen in the Brassicaceae. *PLOS ONE* 8, e84286.
- Safavian, D., Zayed, Y., Indriolo, E., Chapman, L., Ahmed, A., and Goring, D.R. (2015). RNA Silencing of Exocyst Genes in the Stigma Impairs the Acceptance of Compatible Pollen in *Arabidopsis* [OPEN]. *Plant Physiol.* 169, 2526–2538.
- Sager, R., and Lee, J.-Y. (2014). Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* 65, 6337–6358.
- Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L., and 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. *Plant Cell* 21, 2655–2671.
- Samuel, M.A., Tang, W., Jamshed, M., Northey, J., Patel, D., Smith, D., Siu, K.W.M., Muench, D.G., Wang, Z.-Y., and Goring, D.R. (2011). Proteomic Analysis of *Brassica* Stigmatic Proteins Following the Self-incompatibility Reaction Reveals a Role for Microtubule Dynamics During Pollen Responses. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.011338.
- Sanchez, A.M., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R., and Mariani, C. (2004). Pistil Factors Controlling Pollination. *Plant Cell* 16, S98–S106.
- Sánchez-Villagra, M.R., and Werneburg, I. (2016). Mammalian organogenesis in deep time: tools for teaching and outreach. *Evol. Educ. Outreach* 9, 11.
- Sarker, R.H., Elleman, C.J., and Dickinson, H.G. (1988). Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4340–4344.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1999a). The Male Determinant of Self-Incompatibility in *Brassica*. *Science* 286, 1697–1700.

- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1999b). The Male Determinant of Self-Incompatibility in Brassica. *Science* 286, 1697–1700.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A.B. (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Sci STKE* 2001, re22–re22.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2, 755–767.
- Stein, J.C., and Nasrallah, J.B. (1993). A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of Brassica oleracea L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* 101, 1103–1106.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8816–8820.
- Stone, S.L., Arnoldo, M., and Goring, D.R. (1999). A Breakdown of Brassica Self-Incompatibility in ARC1 Antisense Transgenic Plants. *Science* 286, 1729–1731.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T., and Goring, D.R. (2003). ARC1 Is an E3 Ubiquitin Ligase and Promotes the Ubiquitination of Proteins during the Rejection of Self-Incompatible Brassica Pollen. *Plant Cell* 15, 885–898.
- Swanson, R., Edlund, A.F., and Preuss, D. (2004). Species Specificity in Pollen-Pistil Interactions. *Annu. Rev. Genet.* 38, 793–818.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Asano, K., Hara, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Hinata, K., and Isogai, A. (2000a). Isolation and characterization of pollen coat proteins of Brassica campestris that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen–stigma adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3765–3770.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., and Isogai, A. (2000b). The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1920–1925.
- Titus, M.A. (1993). Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 77–81.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., and Clark, S.E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* 11, 393–406.
- Tsuchimatsu, T., Kaiser, P., Yew, C.-L., Bachelier, J.B., and Shimizu, K.K. (2012). Recent Loss of Self-Incompatibility by Degradation of the Male Component in Allotetraploid Arabidopsis kamchatica. *PLOS Genet.* 8, e1002838.
- Twell, D., Yamaguchi, J., and McCormick, S. (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* 109, 705–713.
- Updegraff, E.P., Zhao, F., and Preuss, D. (2009). The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of Arabidopsis pollen. *Sex. Plant Reprod.* 22, 197–204.

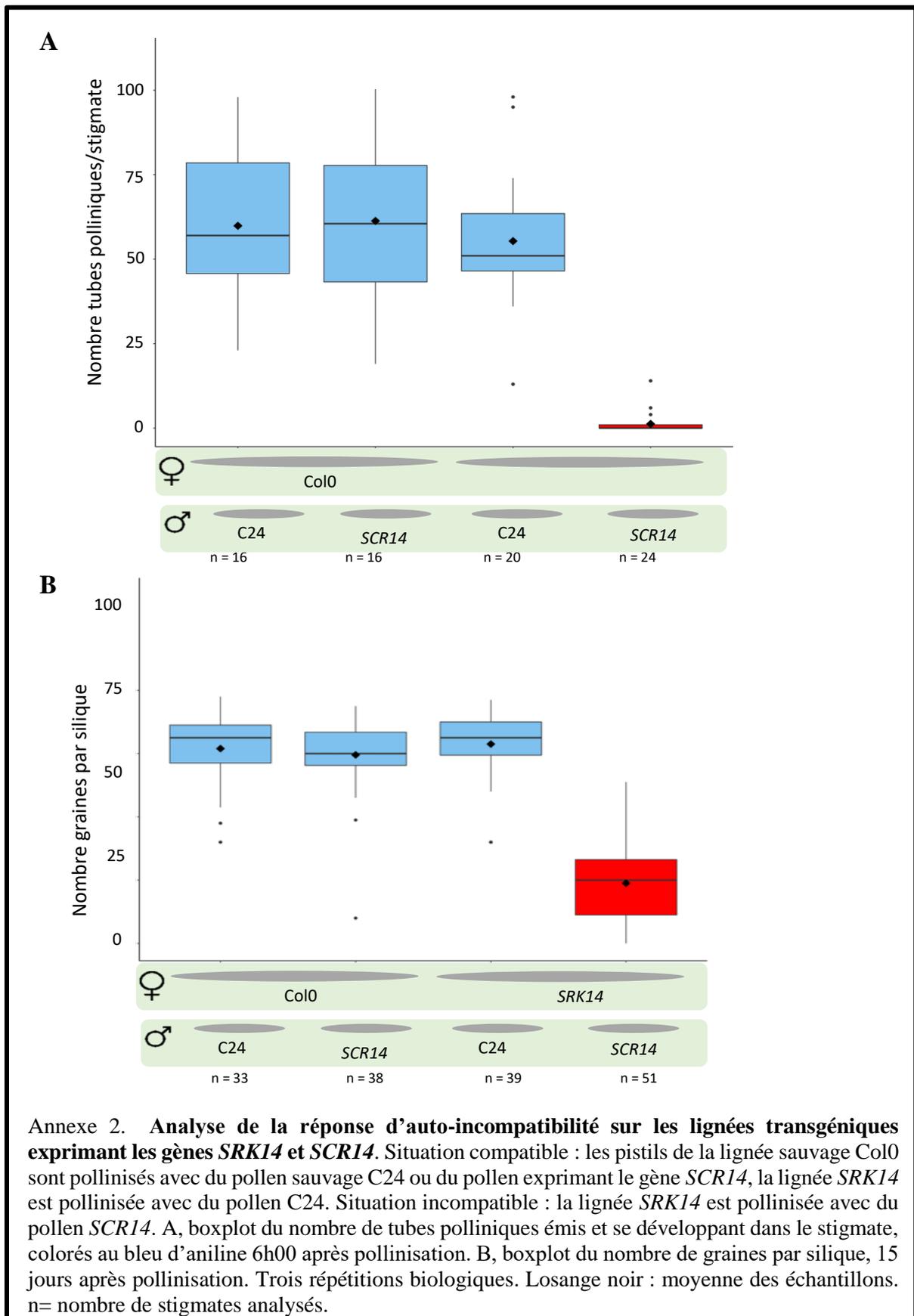
- Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P., and Traas, J. (2000). PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* 127, 5157–5165.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van Montagu, M., and Schell, J. (1975). Characterization of Different Plaque-forming and Defective Temperate Phages in *Agrobacterium* Strains. *J. Gen. Virol.* 26, 33–48.
- Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A., and Hinata, K. (2003). Recent Progresses on Self-incompatibility Research in Brassica Species. *Breed. Sci. - Breed. SCI* 53, 199–208.
- Webb, M.C., and Williams, E.G. (1988). Effects of Temperature, Light, Nutrients and Carbon Dioxide on the Strength of the Self-Incompatibility Response in Detached Flowers of *Lycopersicon peruvianum*. *Ann. Bot.* 61, 395–404.
- White, R.G., Badelt, K., Overall, R.L., and Vesk, M. (1994). Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* 180, 169–184.
- Wolf, S. (2017). Plant cell wall signalling and receptor-like kinases. *Biochem. J.* 474, 471–492.
- Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H., and Reddy, G.V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* 25, 2025–2030.
- Yu, D., Na, L.I.U., Gang, L.I.U., Wen-long, L.I., Agronomy, Y.A. and W.D. (College of University, H.A., Zhengzhou 450002, and P.R.China) (2011). Actin and Myosin Co-Localize in Plasmodesmata and Ectodesmata-Like Structure. *J. Integr. Agric.*
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc.* 1, 641.
- Zheng, Y.-Y., Lin, X.-J., Liang, H.-M., Wang, F.-F., and Chen, L.-Y. (2018). The Long Journey of Pollen Tube in the Pistil. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Zinkl, G.M., and Preuss, D. (2000). Dissecting Arabidopsis Pollen-Stigma Interactions Reveals Novel Mechanisms that Confer Mating Specificity. *Ann. Bot.* 85, 15–21.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., and Preuss, D. (1999). Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* 126, 5431–5440.
- Zuberi, M.I., and Dickinson, H.G. (1985). Pollen-stigma interaction in Brassica. III. Hydration of the pollen grains. *J. Cell Sci.* 76, 321–336.

V. ANNEXES

V.1 VISUALISATION DE LA CROISSANCE DES TUBES POLLINIQUES DANS LE PISTIL D'*ARABIDOPSIS THALIANA*.



V.2 ANALYSE DE LA REPONSE D'AUTO-INCOMPATIBILITE SUR LES LIGNEES TRANSGENIQUES EXPRIMANT LES GENES *SRK14* ET *SCR14*

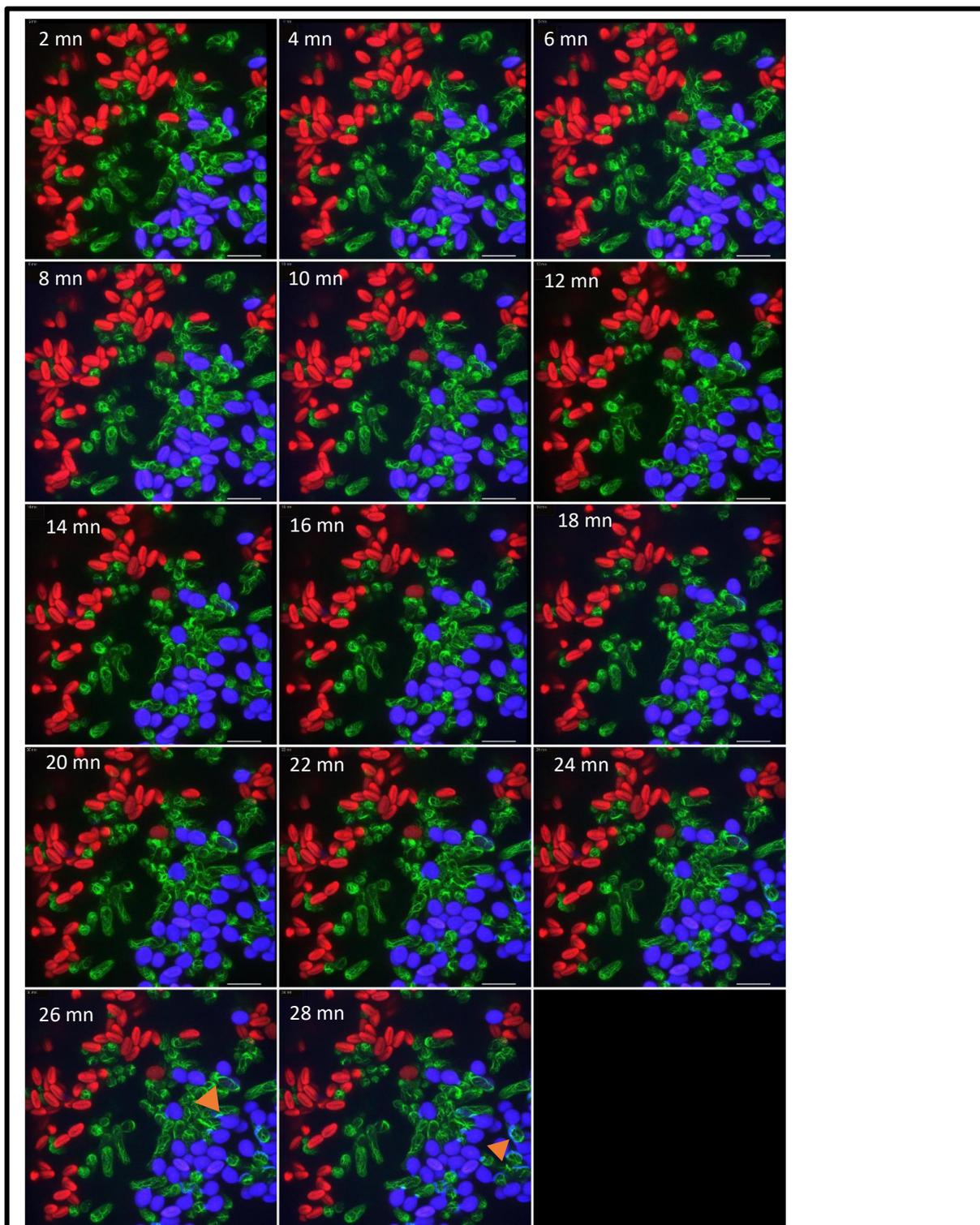


V.3 RAPPORT LONGUEUR/LARGEUR DES GRAINS DE POLLEN A LA SORTIE DES ANTHÈRES

Annexe 3. **Rapport longueur/largeur des grains de pollen à la sortie des anthères.** SEM = Erreur standard à la moyenne. n= nombre de grains mesurés

	rapport L/W des grains de pollen à la sortie des anthères	
	C24/SCR14+RFP	C24/Turq
moyenne L/W	1,927316394	2,011351771
SEM	0,025186384	0,028854195
n	56	68

V.4 POLLINISATION DANS LE SYSTEME SEMI *IN VIVO*



Annexe 4. **Pollinisation dans le système semi *in vivo*.** Cumul de piles d'images. Les pollens *SCR14-RedFP* et *C24-mturq* sont déposés respectivement à gauche et à droite du stigmate. Les images sont acquises tous les 1 µm du haut du stigmate jusqu'à sa base, toutes les deux minutes. Le pollen *SCR14-RedFP* est déposé en premier. Le décompte du temps de pollinisation démarre après le dépôt du pollen *C24-mturq*. Les pollens *C24-mturq* en réponse compatible émettent des tubes polliniques qui se développent dans les papilles stigmatiques (tête de flèche). Les filaments d'actines sont visibles durant toute la durée des acquisitions d'images. La barre représente 50 µm.

V.5 FOCALISATIONS DES FILAMENTS D'ACTINE EN SITUATION INCOMPATIBLE DANS LE SYSTEME D'HYDRATATION FORCEE

Annexe 5. **Focalisations des filaments d'actine en situation incompatible dans le système d'hydratation forcée.** Le temps est décompté à partir du dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques. Les temps de déformation du grain de pollen et d'émergence du tube pollinique permettent de situer la focalisation des filaments d'actine de la papille stigmatique en fonction de la germination des grains de pollen. Les tubes polliniques sont restés visibles durant la durée de l'expérimentation. Aucune focalisation d'actine le long des tubes polliniques n'est visible.

déformation grain	émergence tube	focalisation actine	suivi du tube	focalisation actine le long du tube
14	16	non	oui	non
23	26	non	oui	non
30	32	non	oui	non
18	20	non	oui	non
25	28	non	oui	non
27	30	non	oui	non
14	17	non	oui	non
23	26	non	oui	non
21	23	27	oui	non
23	25	non	oui	non
22	25	non	oui	non
15	16	non	oui	non
24	29	28	oui	non
26	30	non	oui	non
25	27	non	oui	non
26	28	non	oui	non

V.6 GERMINATION DES GRAINS DE POLLEN COMPATIBLES LORS D'UNE POLLINISATION MULTIPLE DANS LE SYSTEME SEMI IN VIVO

Annexe 6. **Germination des grains de pollen compatibles lors d'une pollinisation multiple dans le système semi in vivo.** Pour chaque papille stigmatique le nombre de grains de pollen a été compté et le temps nécessaire à la germination reporté dans le tableau.

nombre de grains de pollen par papille	temps de germination en minutes		
	pollen 1	pollen 2	pollen 3
2	14	18	
2	14	18	
3	26	non germé	non germé
2	12	14	
2	14	28	
2	12	20	
2	18	30	
2	18	non germé	
3	12	14	26
2	26	30	
2	20	24	
3	18	24	24
2	24	non germé	
2	24	32	
2	22	24	

V.7 DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING : ARTICLE EN PRÉPARATION

Authors: Frédérique Rozier¹, Lucie Riglet², Chie Kodera³, Vincent Bayle¹, Eléonore Durand⁴, Jonathan Schnabel¹, Thierry Gaude¹ and Isabelle Fobis-Loisy¹

Author affiliation:

¹ Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, F-69342, Lyon, France .

² Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Bateman Street, Cambridge CB2 1LR, UK

³ Institut Jean-Pierre Bourgin, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France.

⁴ CNRS, UMR 8198 Evo-Eco-Paleo, Université de Lille - Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

E-mail address:

Frederique.rozier@ens-lyon.fr, thierry.gaude@ens-lyon.fr, vincent.bayle11@ens-lyon.fr, lucie.riglet@slcu.cam.ac.uk, Chie.Kodera@inra.fr, eleonore.durand@univ-lille.fr, jonathan.schnabel31@gmail.com

Corresponding author:

Isabelle Fobis-Loisy, Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, F-69342, Lyon, France. (33) 4 72 72 89 85. Isabelle.fobis-loisy@ens-lyon.fr

Highlight: A live imaging system coupled with self-incompatible Arabidopsis lines highlights the role of stigmatic cells in controlling pollen hydration and in reacting to pollen tube intrusion by remodeling actin cytoskeleton.

Abstract: Early events occurring at the surface of the female organ are critical for plant reproduction, especially in species with a dry stigma. Following landing on the stigmatic papilla cells, the pollen rehydrates, germinates a tube, which then penetrates the cell wall and grows towards the ovules to convey the male gametes to the embryo sac. In self-incompatible (SI) species within the Brassicaceae, these processes are blocked when the stigma encounters incompatible pollen. Here, based on the generation of SI-Arabidopsis lines and by setting up a live imaging system, we show that control of pollen hydration has a central role in pollen selectivity. The faster pollen takes water from the papilla during an initial period of 10 minutes, the faster it germinates. Furthermore, we found that the SI barriers act to block the proper hydration of incompatible pollen and when hydration is promoted by high humidity, an additional control prevents pollen tube penetration into the stigmatic wall. In papilla cells, actin bundles focalize at the contact site with the compatible pollen but not with the incompatible one, raising the possibility that stigmatic cells react to the mechanical pressure applied by the invading growing tube.

Keywords : actin, Arabidopsis, compatible and incompatible pollinations, hydration threshold, pollen-stigma interaction.

Introduction

Flowers of Brassicaceae species have a dry stigma, highly discriminatory with early control of pollen capture following pollination (Dickinson, 1995). The stigma consists of a dome of flask-shaped epidermal cells (papillae) once pollen grains land on papillar cells, only those recognized as compatible are accepted, whereas undesirable pollen grains (i.e., from unrelated species or self-pollen in self-incompatible species) are rejected (reviewed in Doucet *et al.* 2016). Pollen grains need to hydrate on the stigma so as to permit the emergence of a pollen tube that penetrates the papilla cell wall and then grows within the pistil tissues (reviewed in Chapman and Goring 2010). *In vitro* assays showed that growing through the stigma is required for pollen tubes to efficiently target the ovules (Palanivelu and Preuss, 2006). Likewise, genetic ablation of the stigmatic papillae prevents normal pollen hydration or germination (Tung *et al.*, 2005). Early events of the pollen-stigma interaction are thus crucial steps for successful fertilization.

Most of the Brassicaceae species have a self-incompatibility (SI) system, which allows the stigma to reject self-pollen grains and hence to prevent self-fertilization (de Nettancourt, 2001). This self/non-self recognition mechanism is genetically controlled by a single multiallelic locus, the *S*-locus, and depends on a receptor-ligand interaction (Ivanov *et al.*, 2010). The ligand, the *S*-locus Cysteine Rich protein (SCR/SP11), is present in the material contained in the cavities of the pollen cell wall (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000), migrates to the papilla surface and interacts with the *S*-locus Receptor Kinase (SRK) (Stein *et al.*, 1991), localized to the plasma membrane of stigmatic papillae. This interaction induces SRK phosphorylation and activation of the signaling cascade leading to self-pollen rejection (Cabrillac *et al.*, 2001). Incompatible pollen grains fail to hydrate properly and do not germinate or only germinate a short pollen tube whose growth is arrested on papilla cells (Dickinson, 1995; Hiroi *et al.*, 2013). Although *Arabidopsis thaliana* is self-fertile, transgenic SI *A. thaliana* lines were generated by reintroducing SCR/SP11 and SRK gene pairs from its SI close relative *A. lyrata* (Nasrallah and Nasrallah, 2002; Nasrallah *et al.*, 2004). SI *Arabidopsis* lines have opened the way for thorough analysis of pollen-stigma recognition mechanisms through the use of the genetic tools and mutant collections available for this model plant species.

Although they have been studied for many years, the early steps leading to pollen acceptance or rejection decision are still not clearly characterized. In this work, based on the generation of new SI *Arabidopsis* lines, we revisited the cellular aspects of pollen-stigma interaction by setting up a live imaging system to monitor pollen hydration and germination following compatible as well as incompatible pollinations. We quantified the degree of pollen hydration required for pollen activation and highlighted a late SI control restricting penetration of stigmatic cell wall by the pollen tube. Furthermore, we monitored the dynamics of actin network during compatible and incompatible pollination and found that remodeling of actin cables is triggered in stigmatic cells only when pollen-stigma interaction is engaged in compatibility.

Materials and methods

Plant growth conditions

A. thaliana Col-0, C24, *A. lyrata* ssp *petraea* haplotype *S14* originating from the Czech Republic (seeds kindly provided by Dr Pierre Saumitou-Laprade, Université de Lille F59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France) and all transgenic plants were grown in growth chambers under a long-day cycle of 16-h light/8-h dark at 21°C/19°C with a relative humidity around 60 %. *A. lyrata* plants were propagated by cuttings every 3 months.

A. lyrata *SCR14* and *SRK14* gene cloning, plasmid construction, plant transformation and gene expression

The *AISRK14* genomic sequence spanning the coding region from the start to the stop codons (3,620 kb) and a fragment of 4,081 kb containing the *AISCR14* gene, 1,844 kb of the 5' upstream region and 817 bp of the 3' downstream region were amplified from genomic DNA of *A. lyrata* containing the *S14* locus. Subsequent clonage steps and transgenic lines produced in this work are described in Supplementary protocol S1. Sequences of *AISRK14* and *AISCR14* transgenes introduced in *A. thaliana* have been submitted to GENBANK (*pSLR1-gAISRK14*: accession number MH680585, *pgAISCR14*: accession number MH680584).

AISRK14 expression level in stigma of transgenic plants was determined as described in Supplementary protocol S2.

Pollination assays

Flower buds at the end of developmental stage 12 (Smyth *et al.*, 1990) were emasculated and 18 hours later stigmas that had reached developmental stage 13 or Early 14 (14E) were manually pollinated on plant with mature pollen. Six hours after pollination, stigmas were fixed in acetic acid 10 %, ethanol 50 % (v/v) and stained with aniline Blue (Kho and Baër, 1968) for pollen tube counting. In a second series of pollination assay, stage 12 flower buds were emasculated and 42h (stage 15) or 66 h (stage 16) later, stigmas were pollinated with fresh mature pollen followed by fixation and aniline blue staining. In a third experiment, stigmas were pollinated at stage 13-14E and collected after six, 24, 48 or 72 hours followed by fixation and aniline blue staining. Pollination assays were carried out on at least three stigmas and repeated at least at two different dates. Pollination was considered as incompatible when less than five pollen tubes were counted in the stigma (Kitashiba *et al.*, 2011).

Dual pollination: semi *in vivo* assay

Stage 12 flower bud was emasculated and 18 hours later (stage 13-14E), pistil was cut transversally in the middle of the ovary and placed vertically in a half-cut, perforated PCR tube whose base was introduced in a solid agar medium. Pollen was deposited by gently touching the stigma with a mature anther. Incompatible pollen was deposited first, followed (within less than 1 min) by deposition of compatible pollen, which defined the timing starting point (T₀) for monitoring pollen behavior. A cover slip was delicately applied on the surface of the pollinated stigma for confocal imaging. The system was maintained throughout the experiment at 21°C and under 45 % relative humidity. To increase the relative humidity at the vicinity of the pollinated stigma, pieces of solid agar medium were added around the mounted pistil. For cell surface labelling, after 35 minutes in high humidity conditions, pollinated stigma was incubated in FM™ 4-64 Dye (*N*-3-Triethylammoniumpropyl-4-6-4-Diethylamino Phenyl Hexatrienyl Pyridinium Dibromide, Life Technologies T3166, 8.23 μM) for five minutes and subsequently washed in 1/2 Murashige and Skoog basal medium containing 10 % (w/v) of sucrose, before mounting between slide and coverslip in this medium.

Confocal Microscopy and Fluorescence quantification at the contact point with the incompatible pollen

Images were acquired with a SP8 laser-scanning confocal microscope (Leica) using a 25x objective (numeric aperture 0.95, water immersion). Detailed acquisition settings are provided in Supplementary protocol S3. Fluorescence at the contact point with the incompatible pollen was quantified as described in Supplementary protocol S3.

Measurement of pollen hydration rate

Because the increase of water content in pollen grain is correlated with change of its shape from ellipsoid to spheroid (Zuberi and Dickinson, 1985; Hiroi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016), for each pollen grain, we recorded every two minutes the ratio between the long and the wide axis (L/W) to estimate the pollen hydration rate until germination. Slopes were determined by linear regression of the hydration curve based on pollen ratio evolution during the first 10 minutes period (5 data points), using the curve $f = ax + b$.

Seed set

Flower buds at stage 12 were emasculated and pollinated with mature pollen 18 h later. 21 days after pollination, mature siliques were opened to count the number of seeds.

Statistic analysis

For each experiment (except the initial selection of SRK and SCR transgenic plants), at least two independent biological replicates (performed at different dates) were carried out. After checking that the mean and variability of the samples were homogenous between replicates, data were pooled to apply a statistical test. Graph and statistics were obtained with R studio or Excel softwares. We tested the sample distribution with a Shapiro-Wilk test and applied a Student-test to compare the mean of two given data sets. To compare multiple samples with a single test, we performed an ANOVA. In this study, p-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Generation of transgenic lines designed for live cell imaging

We generated transgenic plants for *AISRK14* in Col-0 background as this accession is more suitable for crossing with available fluorescent marker lines. We used the *Brassica oleracea SLR1* (*S-locus-related gene 1*) promoter to express the *AISRK14* receptor in stigmatic cells. Among the 12 transgenic lines we generated, we isolated four independent lines possessing a unique insertion and homozygous for *AISRK14*. Stage 13-14E stigmas from these four lines rejected pollen from the original *A. lyrata S14* plant (less than five pollen tubes/stigma) whereas *A. lyrata* pollen produced numerous pollen tubes on Col-0 stigmas (Supplementary Fig S1A, B, C). We quantified the expression level of the *AISRK14* transgene in stage 13-14E stigmas of the two strongest transgenic plants (lines #10 and #18, Supplementary protocol S2) and found that the relative expression was two times lower than that detected in *A. lyrata S14* stigmas but still sufficient to induce SI response (Supplementary Fig S1D). We selected the transgenic line #10 for further analysis and named it Col-0/*AISRK14*. In spite of several attempts to introduce *AISCR14* in Col-0, we did not succeed in generating transgenic pollen that could be rejected by stigmas of Col-0/*AISRK14*. As an alternative, we used the C24 accession, this accession exhibiting a strong SI response when transformed with *A. lyrata SRK/SCR* genes (Nasrallah et al., 2004; Liu et al., 2007). We first transformed C24 plants with *AISRK14* to generate a female tester capable of rejecting *A. lyrata S14* pollen grains (named C24/*AISRK14* line #14; Supplementary Fig S1C). Then, among the 18 transgenic lines transformed with *AISCR14* in C24 background, we isolated five independent lines with unique insertion and homozygous for *AISCR14*. Pollen from each of these lines was rejected on C24/*AISRK14* line #14 mature stigmas (Supplementary Fig S1E). We selected transgenic line #4 for further analysis, which was named C24/*AISCR14*.

To facilitate live-cell monitoring of pollen tube growth on the stigma, we introduced Lifeact fused to Venus to label stigma papillae of Col-0/*AISRK14* (Col-0/*SRK14* + Act:Venus), TURQUOISE protein to monitor compatible pollen of C24 (C24/*TURQ*) and RFP for incompatible pollen of C24/*AISCR14* (C24/*SCR14* + RFP) (Fig. 1A). We found that the presence of fluorescent proteins did not alter the compatibility (ANOVA test p-value = 0.23), as well as the SI response (T-test p-value = 0.15) assessed by pollen tube counting (Fig. 1B). Despite the strong pollen rejection

response following incompatible cross (Col-0/SRK14 + Act:Venus x C24/SCR14 + RFP), some seeds developed in siliques (Fig. 1C). A comparable number of seeds were counted in siliques derived from an incompatible cross between non-labeled pollen and stigmas (mean values of 18.35 versus 19.04, T-test p-value = 0.82, Fig. 1C). However, the incompatible crosses exhibited a significantly reduced seed set compared with the compatible ones (T-test p-value = 2.2E-16 between the four compatible crosses cumulated and the two incompatible crosses cumulated, Fig. 1C). Together, our data show that we succeeded in restoring SI system in *A. thaliana* using a new *A. lyrata* haplotype *S14* and that a mature stigma recognizes and rejects incompatible pollen independently of the accession background. Furthermore, expressing a fluorescent protein in addition to the SI determinant does not modify completion of the SI response.

SI response is maintained for about two days and then partially breaks down

As some seeds could develop in siliques following incompatible crosses (Fig. 1C), we investigated how persistent the SI response was during stigma development. To this end, we first carried out pollination experiments using compatible (C24/TURQ) or incompatible (C24/*AISCR14*) pollen grains deposited on Col-0/SRK14 + Act:Venus stigmas at different pistil developmental stages (Fig. 2A). When incompatible pollen grains were deposited on stage-15 stigmas, almost no pollen tube bypassed the stigmatic barrier (mean of 1.85 tube/stigma, graph Fig. 2A), whereas some pollen tubes succeeded in penetrating stage-16 stigmas (mean of 13.2 tubes/stigma, graph Fig. 2A). By contrast, when compatible pollinations were performed on stigmas at stages 15 or 16, pollen tubes abundantly grew in the stigma. In a second set of experiments, we examined how long incompatible pollen grains deposited on stage 13-14E stigmas could stay inhibited after 6, 24, 48 or 72 hours of contact with papilla cells (Fig. 2B). We observed a breakdown of the SI barrier 48h and 72h after pollen deposition, when stigmas reached stage 16 and stage 17, respectively. However, the number of pollen tubes overpassing SI barrier (mean of 9.9 tubes/stigma and 7.3 tubes/stigma, respectively, graph Fig. 2B) was much less than the massive invasion observed in compatible situations (on average more than 50 tubes/stigma, graphs Fig. 2A, B). Together, these experiments show that partial breakdown of the SI response occurs late during pistil ageing and that a strong SI phenotype is maintained during a large time-window of floral development, from stage 13 (anthesis) to stage 15 (stigma

extended above long anthers), that is to say slightly less than two days (Smyth *et al.*, 1990). Thus the SI pollination partners we generated are suitable for developing a live-cell imaging to monitor pollen behavior at the surface of mature stigmas (stage 13-14E) without risking weakening of the SI barrier.

Design of a semi *in vivo* assay that allows live cell imaging of early pollination events

To study the very early cellular changes that occur following pollen-stigma interaction, we designed a device that maintains stigma alive for at least one hour and allows cell-live imaging under confocal microscopy (Fig 3A). In this system, compatible and incompatible pollen can be separately deposited on the same stigma and their behavior tracked in the same experimental conditions (Fig 3B, Supplementary video S1). To test whether this device permitted the maintenance of compatibility/incompatibility responses, we performed five independent experiments where a Col0/SRK14+Act:Venus stigma was dual-pollinated with C24/SCR14+RFP (incompatible) and C24/TURQ (compatible) pollen grains. We found that the percentage of germination for compatible pollen varied from 58 % to 81 %, with a mean value of 74 % (n=106, Fig. 3C). Emission of a pollen tube occurred on average 20 minutes after pollen deposition (Fig. 3C). On the contrary, germination of incompatible pollen was a rare event, occurring for only 1.3 % of the tracked grains (n=75, Fig. 3C). Thus, our semi *in vivo* system allows live cell imaging of pollinated stigmas while preserving the highly regulated SI process.

Actin dynamics in stigmatic cells during pollination

Because remodeling of the actin cytoskeleton in the papilla cells has been reported following pollination in Brassica (Iwano *et al.*, 2007), we decided to monitor actin dynamics over time. Before pollination, we found the actin cytoskeleton network to be composed of bundles mainly oriented along the longitudinal axis of the stigmatic cell (Fig. 4A). Upon compatible pollination, a clear accumulation of actin that focalized at the contact site with the compatible pollen was observed in 92 % of the pollinated papillae (22/24, Fig. 4B). For 25% the stigmatic cells (6/24), actin fluorescence increased beneath the pollen grain just before appearance of a protusion at the periphery of the grain corresponding to the pollen tube emergence site (deformation). For 17% of the stigmatic cells (4/24), actin accumulation appeared during pollen deformation. For

50% of the cell, actin focalized when a clear emergence of the tube (minimum 1 μm) was visible (8%, 2/24) or when the tube started to grow on the stigma surface (42%, 10/24, Fig. 4C, Supplementary video S2). At later stages of pollen tube progression, actin focalization was observed all along the tube path in 83% (20/24) of the monitored papilla cells (Fig. 4D, Supplementary video S3). Interestingly, when several pollen germinated on the same papilla, actin focalization was observed below each tube (Fig.4E). By contrast, on the seven dual-pollinated stigmas we tracked over time, we never detected any actin focalization beneath the incompatible pollen grains (Supplementary video S4). All together, our live-cell imaging analysis shows that the actin cytoskeleton polymerizes in the stigmatic cell following deposition of compatible but not incompatible pollen grains. Actin accumulation starts at the pollen contact site just before pollen deformation and goes on throughout the elongation of the pollen tube.

Kinetics of compatible pollen hydration is divided into two phases

Next, we compared the kinetics of pollen hydration and germination following dual pollination, using the L/W ratio as a proxy for pollen hydration (Zuberi and Dickinson, 1985). At maturity, the mean L/W ratio of pollen grains was close to two (Fig. 5A, Supplementary table S1). We measured the pollen ratio every two minutes, starting two minutes after pollen deposition (Fig. 5B, Supplementary Fig S2). Among the 69 compatible pollen grains we tracked, 58 germinated in the course of the experiment whereas 11 never did. We found that during the first 10 minutes (preceding germination, Supplementary table S2), the mean pollen ratio dramatically decreased indicating that grains were taking up water and got roundish (solid blue curve Fig. 5B). Water uptake continued during the following 20 minutes, but at a much slower rate as the hydration curve gets flatter. We found that germination started when the pollen ratio was below 1.4 (solid blue curve Fig. 5B). Among the 58 pollen grains that germinated during the course of the experiment, a huge majority (57/58) reached the 1.4 ratio before germination; only one germinated pollen grain never reached this ratio. For the 11 compatible pollen grains that never germinated (dashed blue curve Fig. 5B), the hydration curve shows no rapid hydration phase during the first 10 minutes and the mean ratio never reached the value of 1.4. Taken together, our results show that in Arabidopsis, water transport toward the pollen grain follows a bi-phasic kinetics: first, an initial phase characterized by a high pollen hydration rate required to reach a

certain degree of water content in the pollen (ratio 1.4), followed by a second phase where the hydration rate dramatically decreases and pollen germination occurs.

Variability in pollen germination time depends on the hydration rate during the early interaction phase

In our experimental conditions, pollen germination was not synchronous, starting 12 minutes after pollen contact with the stigma and spreading over the 32 min of the experiment (Supplementary table S2). We suspected that different hydration rates of pollen grains might be the cause of this variability. To test this hypothesis, we classified the 69 compatible pollen grains according to their germination capability and categorized them into four classes: those that germinated early (from 12 to 18 minutes, $n = 19$), with an intermediate time (from 20 to 24 minutes, $n = 22$), late (from 26 to 32 minutes, $n = 17$), and those that did not germinate ($n = 11$), and we compared their hydration rate during the rapid hydration phase from two to 10 min (Fig. 5C). At two min, no significant differences were found between the L/W ratios of pollen for each classes (1.85/1.87/1.85/1.96, respectively; ANOVA test p -value = 0.13, Fig. 5C). At 10 min, pollen that germinated late were significantly less hydrated (higher L/W ratio) than those that germinated early or with an intermediate time (T-test p -value = $2.43E-04$ and $1.64E-03$, respectively, Fig. 5C), though their hydration degree was significantly higher than non germinated pollen (T-test p -value = $3.62E-02$, Fig. 5C). We calculated the slopes of the hydration curves by linear regression, as previously described (Wang *et al.*, 2016), and found that early and intermediate germinating pollen grains had the highest hydration rates compared with late and non germinating pollen grains (Fig 5C). Non germinating pollen exhibited a very slow hydration rate (slope - 0.043) associated with a poor water uptake at 10 min, deduced from the high pollen ratio (mean of 1.77). Our data show that most of the tracked compatible pollen germinated within 32 minutes and that the germination time relates to the capacity of the pollen to uptake water during an initial short period of 10 minutes. The faster the pollen takes water from the stigma, the quicker it germinates.

Incompatible pollen does not fully hydrate and pollen tube does not penetrate the stigmatic cell wall

Next, we examined the hydration rate of incompatible pollen on the dual-pollinated stigmas. Of the 53 incompatible grains we monitored, none germinated during the time course of the experiment. Furthermore, most of them ($n = 43$) never exhibited a L/W ratio below the threshold value of 1.4 (solid red line, Fig. 6A) and only poorly hydrated compared with compatible grains (solid blue curve, Fig. 6A). The mean hydration curve showed a constant slope during the 32 minutes of the experiment. By contrast, the 10 remaining incompatible grains had a L/W ratio below 1.4 with a mean hydration curve (dashed red line, Fig. 6A) resembling that of compatible pollen. In addition, their hydration rate within the first 10 minutes was similar to late germinating compatible pollen (slope value of -0.074 versus -0.089 , respectively, Fig. 6B), and hence hydrated as efficiently as some compatible grains.

As high humidity can stimulate pollen hydration and promote incompatible pollen germination (Carter and McNeilly, 1976; Ockendon, 1978; Zuberi and Dickinson, 1985), we checked the effect of high humidity (100 %) on pollen behavior in a modified semi *in vivo* system (Supplementary Fig S3). We found that compatible pollen germination was slightly stimulated compared with standard conditions (88 % germination versus 74 % and mean germination time of 18.55 minutes versus 20.38 minutes, respectively; Supplementary Fig S4). Moreover, high humidity conditions did not dramatically affect actin reorganization as we detected a clear focalization of actin beneath the pollen grain/tube in 75 % of the pollinated papillae (33/44) (Fig. 7A, Supplementary Fig S4, Supplementary video S5). Following incompatible pollination, we observed that germination of incompatible pollen was strongly stimulated, varying from 18 % to 58 % depending on the experiment (mean of 35 %, Supplementary Fig S5) compared with the 1.3 % of germination in standard conditions. In addition, among the 46 grains monitored, 46 % reached a L/W ratio of 1.4 within 10 minutes (Supplementary table S3), whereas only 4 % reached this value in standard conditions. However, it took more time for the incompatible pollen tube to emerge (24.87 min versus 18.55 min, Supplementary Fig S5), and the tube exhibited an enlarged tip and seemed blocked at the papilla surface, the pollen being detached from the papilla (Fig. 7B, Supplementary video S6). The growth rate of incompatible tube was

1.05 $\mu\text{m}/\text{min}$, whereas a compatible tube extended much more rapidly in both standard and high humidity conditions (2.41 $\mu\text{m}/\text{min}$ and 1.91 $\mu\text{m}/\text{min}$, respectively, Fig. 7C). Growth kinetics shows that during the first three minutes, elongation rate of both compatible and incompatible tubes was comparable, but then compatible tubes extended rapidly whereas incompatible tubes slowed down (Fig. 7C). These observations suggest that the incompatible tube may not be able to penetrate the papilla cell wall. To test this hypothesis, we stained papilla cells with the amphiphilic styryl dye FM4-64. Contrary to most plant cells where the dye labels the plasma membrane (PM) and the vesicular network (Grebe *et al.*, 2003; Jaillais *et al.*, 2007; Jelínková *et al.*, 2010), we noticed that it remained at the surface of the papilla as it did not colocalize with the actin or the PM canonical marker LTI6b (Supplementary Fig S6). This labelling is probably due to the interaction of the dye with the hydrophobic cuticle layer of the stigmatic cell. While the compatible pollen tube clearly penetrated the FM4-64-labeled layer and grew in close contact with the papilla cytoplasm identified by the actin fluorescence (9 tubes/9, Fig 7D), the incompatible tube was never observed under the FM4-64 layer and stayed outside the papilla (11 tubes/11, Fig 7D). Additionally, at the contact site with the short abnormal incompatible tube, we rarely observed focalization of actin in the papilla, contrary to the compatible situation (Fig. 7B, Supplementary Fig S5 and video S6). Taken together, our results show that incompatible grains generally fail to fully hydrate, and when pollen hydration and germination are promoted by high relative humidity, the SI reaction efficiently blocks tube penetration into the papilla cell wall, the tube remaining outside the papilla surface without triggering actin focalization at the contact site with the stigmatic cell.

Discussion

Here, we set up a live imaging system with a fast-scanning confocal microscope to simultaneously monitor compatible and incompatible *Arabidopsis* pollen behavior on the same single stigma and provide a thorough analysis of the dynamics of the cellular events following pollen perception.

***AISCR14* and *AISRK14* SI *Arabidopsis* lines**

The two *Arabidopsis* lines we generated, one that expressed the female determinant (*A/SRK14*) and the second the male determinant (*A/SCR14*) were self-fertile but exhibited a strong SI response when crossed. This SI response was maintained during flower development for about two days, only weakening at late stages of stigma development where few pollen tubes developed in pistil tissues and ultimately leading to seed set. Nevertheless, the seed yield remained much below the one reported for selfed Col-0 *Arabidopsis* (19 seeds per silique versus 62 seeds per silique). Thus, these *SRK14* and *SCR14* transformants almost fully recapitulate the SI phenotype of the natural SI Brassicaceae, the strength of the response being however less persistent compared with strictly SI lines. Previous work reported a strong SI phenotype, although over a narrow window, in stigmas at stage 13 and early stage 14 in Col-0 lines expressing the cognate *A. lyrata SCRb-SRKb* gene pair (the so-called Col-0/*AISb* line), whereas older flowers fully accepted self-pollen (Nasrallah, 2002; Nasrallah *et al.*, 2004). By contrast, in another study, the same *SCRb-SRKb* gene pair was shown to be unable to confer SI in Col-0, even in stage-13 flowers, the transgenic plants being fully fertile with a seed set similar to selfed Col-0 plants (Indriolo *et al.*, 2014). In this latter study, a role for the E3-ubiquitin ligase *ARC1* in promoting SI was demonstrated as only Col-0 co-expressing the *A. lyrata* or *B. oleracea* *ARC1* with the *SCRb-SRKb* pair acquired the capacity to reject self-pollen. Interestingly, the Col-0/*AISRK14* lines generated in our study express a strong SI response in mature stigmas without the need of co-expressing *AIARC1*, the stigmas remaining partially self-incompatible at later flower developmental stages. Earlier work showed that the variability of SI phenotypes observed between *Arabidopsis* transformants was mainly due to *SRK* transcript levels (Nasrallah and Nasrallah, 2014). It has been reported that transient SI phenotype and self-fertility of Col-0/*AISb* transformants were caused by modifier loci harbored in the Col-0 genome (Liu *et al.*, 2007; Boggs *et al.*, 2009). One of these loci, *PUB8*, encoding an ARM-repeat and U-box protein, regulates *SRK* transcript levels and is responsible for the pseudo-self compatibility observed in old flowers of Col-0/*AISb* (Liu *et al.*, 2007). Contrary to the Col-0/*AISb* transformants mentioned above, in our study, *AISRK14* expression was driven by the *SLR1* promoter region that does not contain the *SRK* 5' and 3' regulatory sequences. As a consequence, it is likely that transcription of *AISRK14* gene and/or stability of the transcripts escape the regulation of Col-0 SI modifiers,

leading to the accumulation of *ISRK14* protein to a level sufficient to maintain a partial pollen rejection response during flower development. The weakening of SI response we observed in late developmental stages was expected as it is known that *SLR1* promoter activity is developmentally regulated, decreasing with flower ageing (Lalonde *et al.*, 1989), and hence leading to lower abundance of *SRK14* transcript levels.

Though we attempted to transform Col-0 with *AISCR14*, we failed to obtain transformants whose pollen grains were rejected on *ISRK14*-expressing stigmas. In SI Arabidopsis species, a dominance hierarchy between *SCR* alleles has been reported, which is regulated by small RNAs (sRNAs) (Durand *et al.*, 2014). We may propose that the inability to introduce a functional *AISCR14* in Col-0 might reside in the presence of vestigial sRNAs targeting the recessive *AISCR14* allele, while these sRNAs would be absent in the C24 background.

Pollen behavior

We observed that around 20 minutes after interaction with the stigma papillae, the compatible pollen germinates a tube, which is consistent with the germination time reported in Arabidopsis after *in vivo* pollination (Kandasamy *et al.*, 1994; Iwano, 2004). Once emerged, the pollen tube extends at a rate of 2.41 $\mu\text{m}/\text{min}$, which is significantly faster than tube elongation *in vitro* (around 1 $\mu\text{m}/\text{min}$; Iwano *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017) and consistent with growth rates reported in other *in vivo* systems (Iwano, 2004; Cheung *et al.*, 2010). Furthermore, we found that tube growth rate is not constant, exhibiting a slow growth phase within the first three minutes after tube emergence, followed by a second phase of more rapid growth. A bi-phasic growth kinetics was already reported for Arabidopsis pollen tube growing *in vitro*, except that the timing was much longer; the transition from germination to a rapid growth phase requiring 30 minutes (Vogler *et al.*, 2015). While compatible pollen grains promptly achieve germination, incompatible grains deposited on the same stigma, and in the close vicinity of compatible ones, follow a complete different destiny. Indeed, incompatible pollen grains exhibit an extremely low germination rate (1.3 %), which is in agreement with the few pollen tubes we detected after aniline blue staining. Thus, our semi *in vivo* system recapitulates what happens in nature when pollen from various origins lands on the same stigma, accepting compatible whereas rejecting incompatible pollen grains.

We found that almost immediately after landing on the stigma, compatible pollen starts to hydrate and within 10 minutes is almost fully hydrated. By contrast, during the same time period, the L/W ratio of incompatible grains only poorly evolves. Thus, inhibition of the incompatible pollen acts very early, within the first minutes following stigma contact, blocking pollen hydration. As previously described, hydration appears as the first check point controlling pollen rejection in SI species with dry stigma (Zuberi and Dickinson, 1985; Dickinson, 1995; Samuel *et al.*, 2009; Hiroi *et al.*, 2013; Safavian and Goring, 2013; Wang *et al.*, 2016). In this study, the hydration threshold required to trigger germination was found to correspond to a pollen L/W ratio below 1.4. Pollen turgor pressure has been proposed to be the main driving force for germination (Hiroi *et al.*, 2013; Vogler *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Our result indicates that the optimal pollen turgor pressure corresponds to a 1.4 L/W ratio which is reached after 10 minutes of pollen deposition.

Although 19 % (10/53) of the incompatible grains exhibit hydration features similar to the compatible ones, they, however, never germinate. Thus, a second check point acts to ensure that undesirable pollen grains that escape the hydration control are properly inhibited, blocking their germination. When hydration of incompatible pollen is artificially boosted in a saturated humidity environment, a significant proportion of the grains bypasses the second checkpoint and germinates. However, pollen tube growth is slow and does not reach the second phase of rapid elongation observed with compatible tubes. Futhermore, tubes are abnormal, displaying an enlarged extremity, and grow outside the papilla cell, unable to penetrate the cell wall. Production of a short incompatible tube, whose growth is arrested in papilla cells, has been described in some S-haplotypes of SI Brassica species (Elleman and Dickinson, 1994; Dickinson, 1995). Thus, our data highlight this late control of SI reaction that prevents penetration of the stigmatic cell wall by incompatible tubes.

Actin cytoskeleton

In Brassica, remodeling of the actin cytoskeleton architecture has been described at the site of pollen-stigma interaction (Iwano *et al.*, 2007). However, these results remain controversial, as a previous work suggested that actin filaments do not show any rearrangement (Dearnaley *et al.*, 1999). Using an actin marker line, we show that a clear reorganization of actin occurs at the

contact site with compatible pollen. However, while actin bundles appear in *Brassica* papillae as soon as pollen hydration starts and remain visible during the entire pollen hydration process (Iwano *et al.*, 2007), in *Arabidopsis*, actin reorganization starts later, from the end of pollen hydration and in most cases following pollen deformation or pollen tube emergence. One explanation for these discrepancies could be that SI mechanism in *Brassica* and *Arabidopsis* does not rely on rigorously similar cellular processes as previously proposed (Kitashiba *et al.*, 2011). Alternatively, these discrepancies could be due to technical reasons: (i) we used stable transformed *Arabidopsis* lines instead of transient expression in *Brassica* papillae, (ii) we performed massive pollination of the stigmatic cells compared with deposition of a single *Brassica* pollen by micromanipulation, and (iii) we used the Lifeact peptide instead of the mouse Talin protein to label F-actin because this short peptide does not affect actin dynamics *in vivo* (Era *et al.*, 2009). Nevertheless, whatever the species, actin focalization appears as a hallmark of the compatible reaction as it is never detected in incompatible pollination. Interestingly, Hardham *et al.* (2008) showed that touching the surface of the *A. thaliana* cotyledon epidermal cells with a microneedle induced a rapid actin focalization around the contact point, leading the authors to propose that actin reorganization is triggered by detection of mechanical pressure. Likewise, reorganization of actin microfilaments was observed in many plant-pathogen interactions, where actin cables accumulate at the contact site with the pathogen (Takemoto, 2004 and references therein). Altogether, we may hypothesize that reorganization of actin is triggered in stigmatic cells that sense the mechanical pressure produced by the pollen grain/tube at the site of cell wall penetration. In accordance with this, we generally did not detect modification of the actin architecture at the contact site with incompatible pollen tubes that were generated in high humidity conditions and that could not penetrate the stigmatic cell wall. The focalization of actin at the pollen tube penetration site is also consistent with the well characterized role of actin network in vesicular delivery to the plasma membrane (Szymanski and Staiger, 2018). Indeed, the current SI model proposes that vesicular secretion is induced upon compatible pollination to transport cargos required for stigmatic cell wall loosening and pollen activation (reviewed in Jany *et al.*, 2019). Actin cables could thus be involved in the polarized secretion towards the pollen grain and the growing pollen tube.

Taking together, using fast scanning confocal microscopy, our observations underline the suitability of our system to capture very dynamic events occurring within minutes. Notably, we monitored the dynamics of actin network during compatible and incompatible responses and found that focalization of actin cables was triggered when pollen-stigma interaction is engaged in compatibility and elicited in response to mechanical pressure exerted by pollen grain/tube.

Acknowledgments: We thank Fany Doustaly for *AISRK14* transgenic line selection, Ghislaine Laroche for *AISCR14* construction and transgenic line selection, Annie Chaboud for giving us the pAct11 and the pLat52 promoter regions and Claire Lionnet for her support with confocal microscopy. We are grateful to Takashi Ueda for the *LifeActin:Venus* construct and to Olivier Haman for kindly giving us access to the confocal microscope (ERC-2013-CoG-615739). We thank members of the SiCE team for fruitful discussions. This work was supported by CNRS and Grant ANR-14-CE11-0021.

References

- Boggs NA, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2009. In Vivo Detection of Residues Required for Ligand-Selective Activation of the S-Locus Receptor in Arabidopsis. *Current Biology* **19**, 786–791.
- Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T.** 2001. The S -locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**, 220–223.
- Carter AL, McNeilly T.** 1976. Increased atmospheric humidity post pollination: A possible aid to the production of inbred line seed from mature flowers in the Brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *Gemmifera*). *Euphytica* **25**, 531–538.
- Chapman LA, Goring DR.** 2010. Pollen-pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1987–1999.
- Cheung AY, Boavida LC, Aggarwal M, Wu H-M, Feijó JA.** 2010. The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1907–1915.
- Dearnaley JDW, Clark KM, Heath IB, Lew RR, Goring DR.** 1999. Neither compatible nor self-incompatible pollinations of *Brassica napus* involve reorganization of the papillar cytoskeleton. *New phytologist* **141**, 199–207.

Dickinson HG. 1995. Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sexual Plant Reproduction* **8**, 1–10

Doucet J, Lee HK, Goring DR. 2016. Pollen Acceptance or Rejection: A Tale of Two Pathways. *Trends in Plant Science* **21**, 1058–1067.

Durand E, Meheust R, Soucaze M, et al. 2014. Dominance hierarchy arising from the evolution of a complex small RNA regulatory network. *Science* **346**, 1200–1205.

Era A, Tominaga M, Ebine K, Awai C, Saito C, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Nakano A, Ueda T. 2009. Application of Lifeact Reveals F-Actin Dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the Liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1041–1048.

Elleman CJ, Dickinson HG. 1994. Pollen-stigma interaction during self-incompatibility in *Brassica oleracea*. In: Williams EG, Knox RB, Clarke AE. *Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. Netherlands: Kluwer, 67–87.

Grebe M, Xu J, Möbius W, Ueda T, Nakano A, Geuze HJ, Rook MB, Scheres B. 2003. *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Current Biology* **13**, 1378–1387.

Hardham AR, Takemoto D, White RG. 2008. Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biology* **8**, 63.

Hiroi K, Sone M, Sakazono S, Osaka M, Masuko-Suzuki H, Matsuda T, Suzuki G, Suwabe K, Watanabe M. 2013. Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa*. *Annals of Botany* **112**, 115–122.

Indriolo E, Safavian D, Goring DR. 2014. The ARC1 E3 Ligase Promotes Two Different Self-Pollen Avoidance Traits in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 1525–1543.

Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T. 2010. When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends in Plant Science* **15**, 387–394.

Iwano M, Shiba H, Miwa T, Che FS, Takayama S, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A. 2004. Ca²⁺ Dynamics in a Pollen Grain and Papilla Cell during Pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 3562–3571.

Iwano M, Shiba H, Matoba K, et al. 2007. Actin Dynamics in Papilla Cells of *Brassica rapa* during Self- and Cross-Pollination. *Plant Physiology* **144**, 72–81.

Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T. 2007. Evidence for a sorting endosome in *Arabidopsis* root cells: Plant sorting endosome. *The Plant Journal* **53**, 237–247.

- Jany E, Nelles H, Goring DR.** 2019. The Molecular and Cellular Regulation of Brassicaceae Self-Incompatibility and Self-Pollen Rejection. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, 1–35.
- Jelínková A, Malínská K, Simon S, et al.** 2010. Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking? *The Plant Journal* **61**, 883–892.
- Kandasamy MK, Nasrallah JB, Nasrallah ME.** 1994. Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development* **120**, 3405–3418.
- Kho YO, Baër J.** 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**, 298–302
- Kitashiba H, Liu P, Nishio T, Nasrallah JB, Nasrallah ME.** 2011. Functional test of Brassica self-incompatibility modifiers in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18173–18178.
- Lalonde BA, Nasrallah ME, Dwyer KG, Chen C-H, Barlow B, Nasrallah JB.** 1989. A highly conserved Brassica gene with homology to the S-locus-specific glycoprotein structural gene. *The Plant Cell* **1**, 249–258.
- Liu P, Sherman-Broyles S, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2007. A Cryptic Modifier Causing Transient Self-Incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **17**, 734–740.
- Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2002. Generation of Self-Incompatible *Arabidopsis thaliana* by Transfer of Two S Locus Genes from *A. lyrata*. *Science* **297**, 247–249.
- Nasrallah ME, Liu P, Sherman-Broyles S, Boggs NA, Nasrallah JB.** 2004. Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16070–16074.
- Nasrallah JB, Nasrallah ME.** 2014. S-locus receptor kinase signalling. *Biochemical Society Transactions* **42**, 313–319.
- Nettancourt D de.** 2001. *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ockendon DJ.** 1978. Effect of hexane and humidity on self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* **52**, 113–117.
- Palanivelu R, Preuss D.** 2006. Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in vitro. *BMC Plant Biology* **6**, 7.
- Safavian D, Goring DR.** 2013. Secretory Activity Is Rapidly Induced in Stigmatic Papillae by Compatible Pollen, but Inhibited for Self-Incompatible Pollen in the Brassicaceae (D Bassham, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e84286.

- Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR.** 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 ONLINE* **21**, 2655–2671.
- Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 1999. The Male Determinant of Self-Incompatibility in Brassica. *Science* **286**, 1697–1700.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM.** 1990. Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **2**, 755–767.
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 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**, 8816–8820.
- Szymanski D, Staiger CJ.** 2018. The Actin Cytoskeleton: Functional Arrays for Cytoplasmic Organization and Cell Shape Control. *Plant Physiology* **176**, 106–118.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A.** 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 1920–1925.
- Takemoto D, Hardham AR.** 2004. The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. *Plant Physiology* **136**, 3864–3876.
- Tung CW, Dwyer KG, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2005. Genome-Wide Identification of Genes Expressed in Arabidopsis Pistils Specifically along the Path of Pollen Tube Growth. *Plant Physiology* **138**, 977–989.
- Vogler F, Konrad SSA, Sprunck S.** 2015. Knockin’ on pollen’s door: live cell imaging of early polarization events in germinating Arabidopsis pollen. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Wang L, Clarke LA, Eason RJ, Parker CC, Qi B, Scott RJ, Doughty J.** 2016. PCP-B class pollen coat proteins are key regulators of the hydration checkpoint in *Arabidopsis thaliana* pollen-stigma interactions. *New Phytologist*.
- Yang X, Zhang Q, Zhao K, Luo Q, Bao S, Liu H, Men S.** 2017. The Arabidopsis GPR1 Gene Negatively Affects Pollen Germination, Pollen Tube Growth, and Gametophyte Senescence. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.
- Zuberi MI, Dickinson HG.** 1985. Pollen-stigma interaction in Brassica. III. Hydration of the pollen grains. *Journal of Cell Science* **76**, 321–336.

Figure Legends

Fig 1: Generation of SI Arabidopsis lines

Fig 2 : Dynamics of the SI response in Col-0 background

Fig 3 : Set up of the semi *in vivo* assay

Fig 4: Actin reorganization at the contact site with the compatible pollen grain and pollen tube

Fig 5 : Kinetics of compatible pollen hydration following dual pollination

Fig 6 : Kinetics of incompatible pollen hydration following dual pollination

Fig 7: Germination of incompatible pollen in high humidity conditions

Supplementary data

Protocol S1-S3: supporting material

Table S1. L/W ratio of pollen grains at anthesis

Table S2. Germination of compatible pollen tracked during experiments described in figure 5.

Table S3. L/W ratio of incompatible pollen in high humidity conditions, 10 minutes after pollen deposition. Highlighted in grey, pollen grains with L/W ratio < 1.4 (21/46 = 46%).

Figure S1: *AISRK14* and *AISCR14* Transgenic plant selection

Figure S2: Hydration kinetics of compatible and incompatible pollen in the semi *in vivo* system.

Figure S3: Standard and high humidity assays

Figure S4: Behavior of compatible pollen in high humidity conditions

Figure S5: Behavior of incompatible pollen in high humidity conditions

Figure S6: FM4-64 labelling of stigmatic cells. Stigmas were incubated in FM4-64 and imaged under confocal microscopy (red fluorescence)

Video S1: Dual pollination with compatible and incompatible pollen deposited on the same stigma

Video S2: Actin rearrangement at the pollen contact site

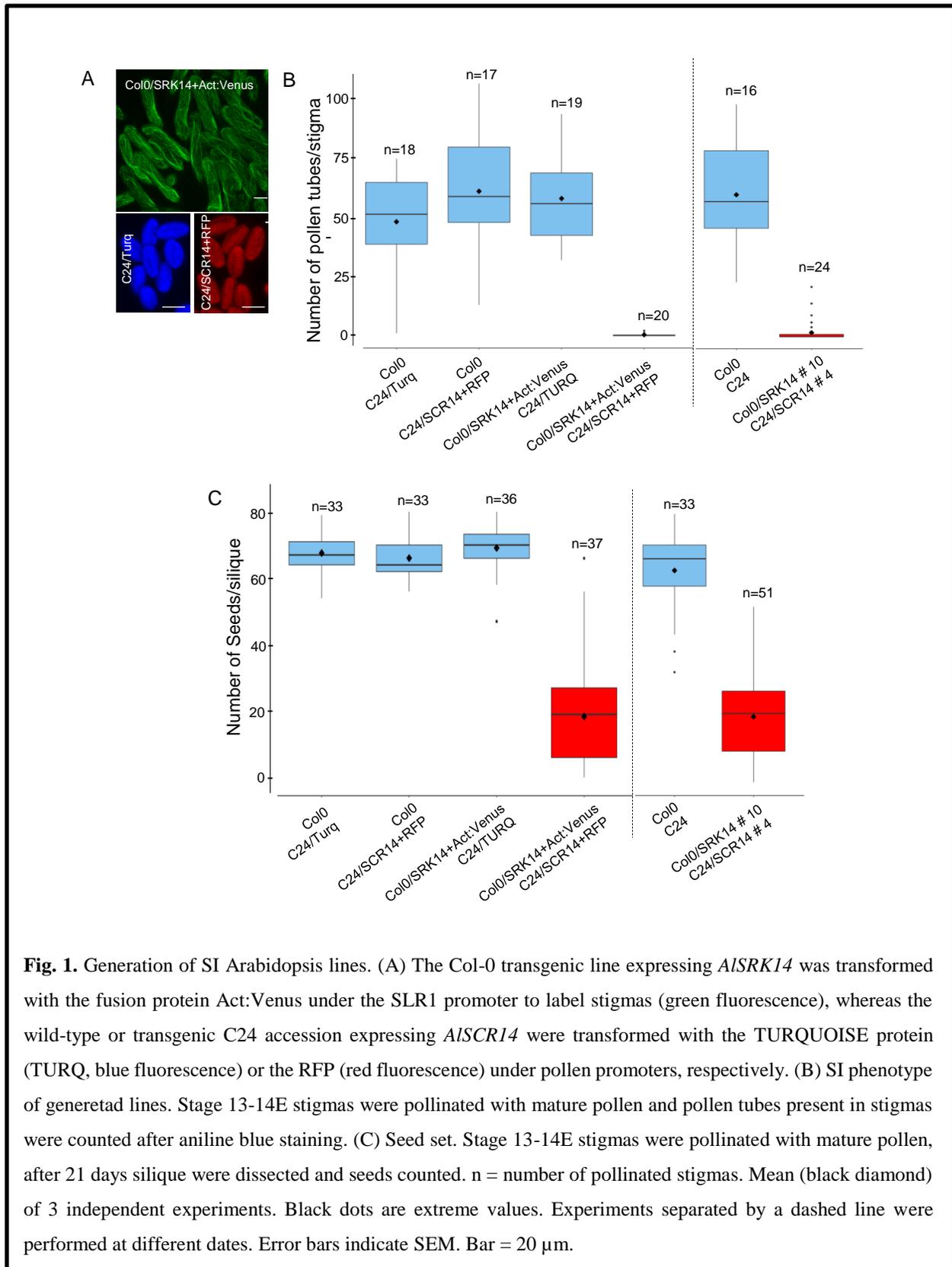
Video S3: Actin rearrangement along the pollen tube path

Video S4: Actin behavior in stigmatic cells in contact with incompatible pollen

Video S5: Compatible pollen germination and pollen tube growth in high humidity conditions

Video S6: Incompatible pollen germination and pollen tube growth in high humidity conditions

DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING



DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING

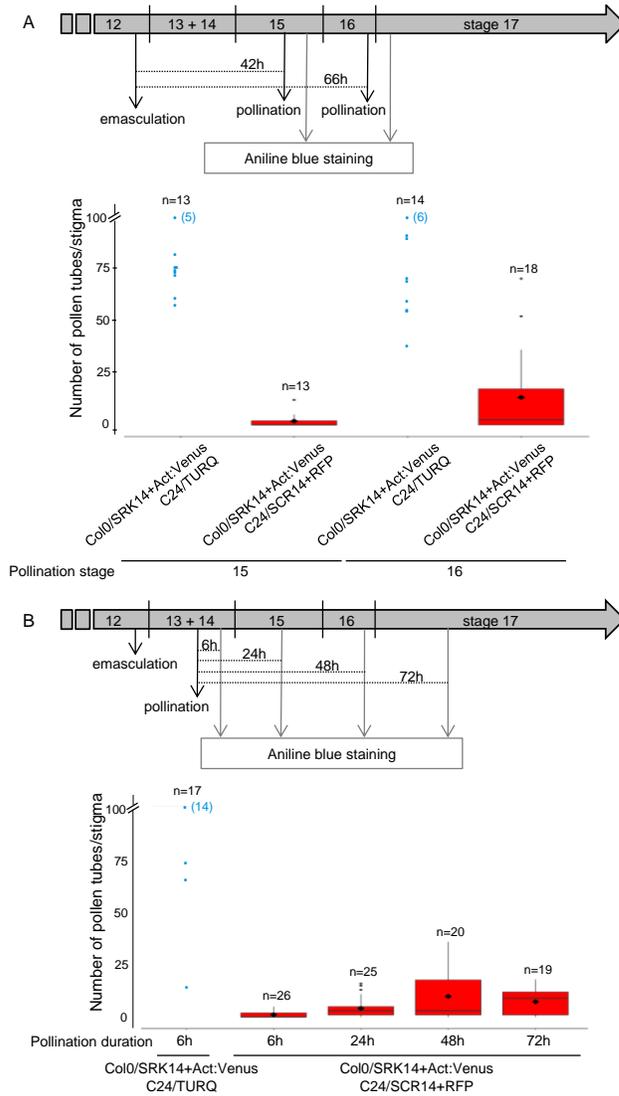
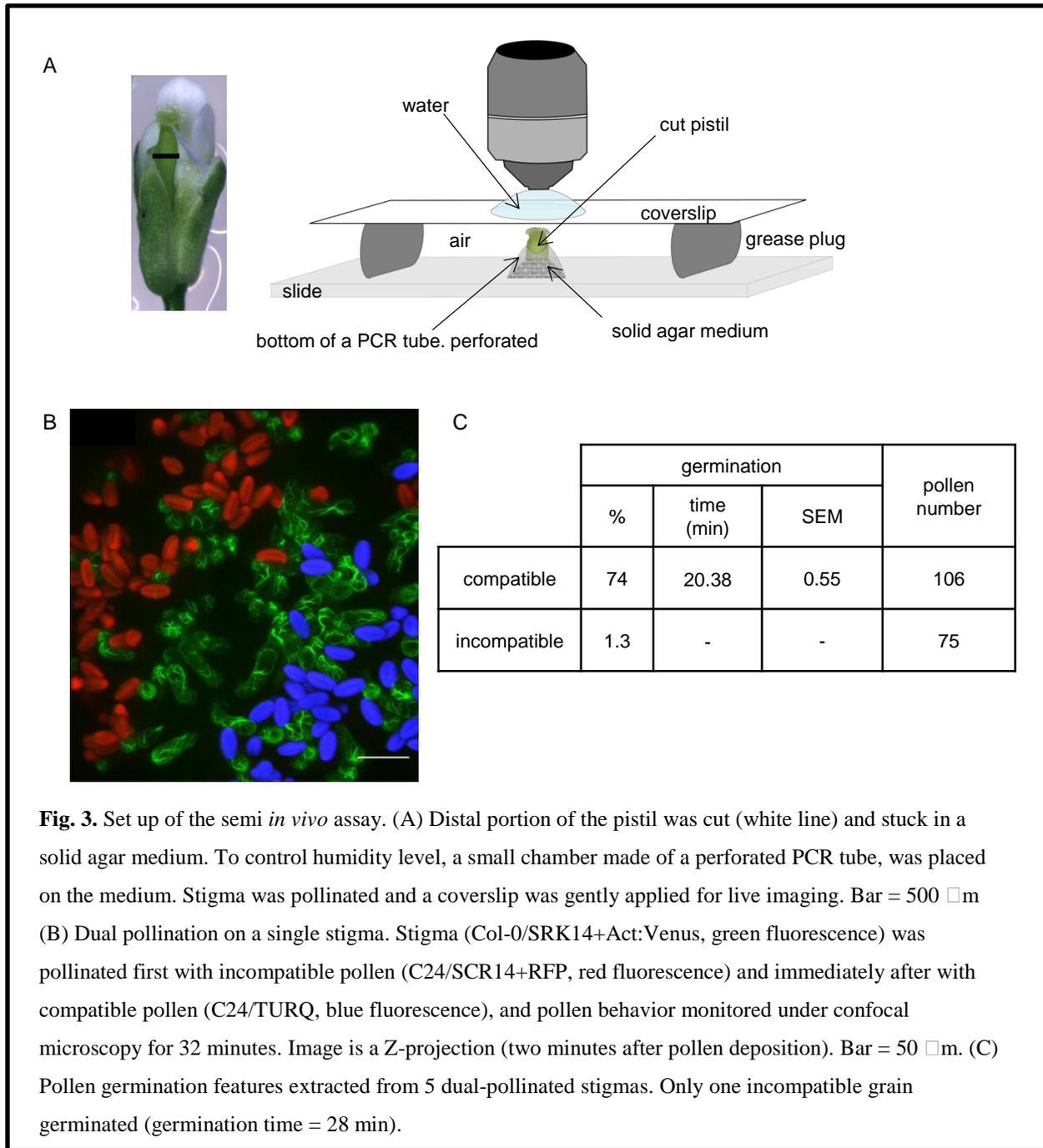
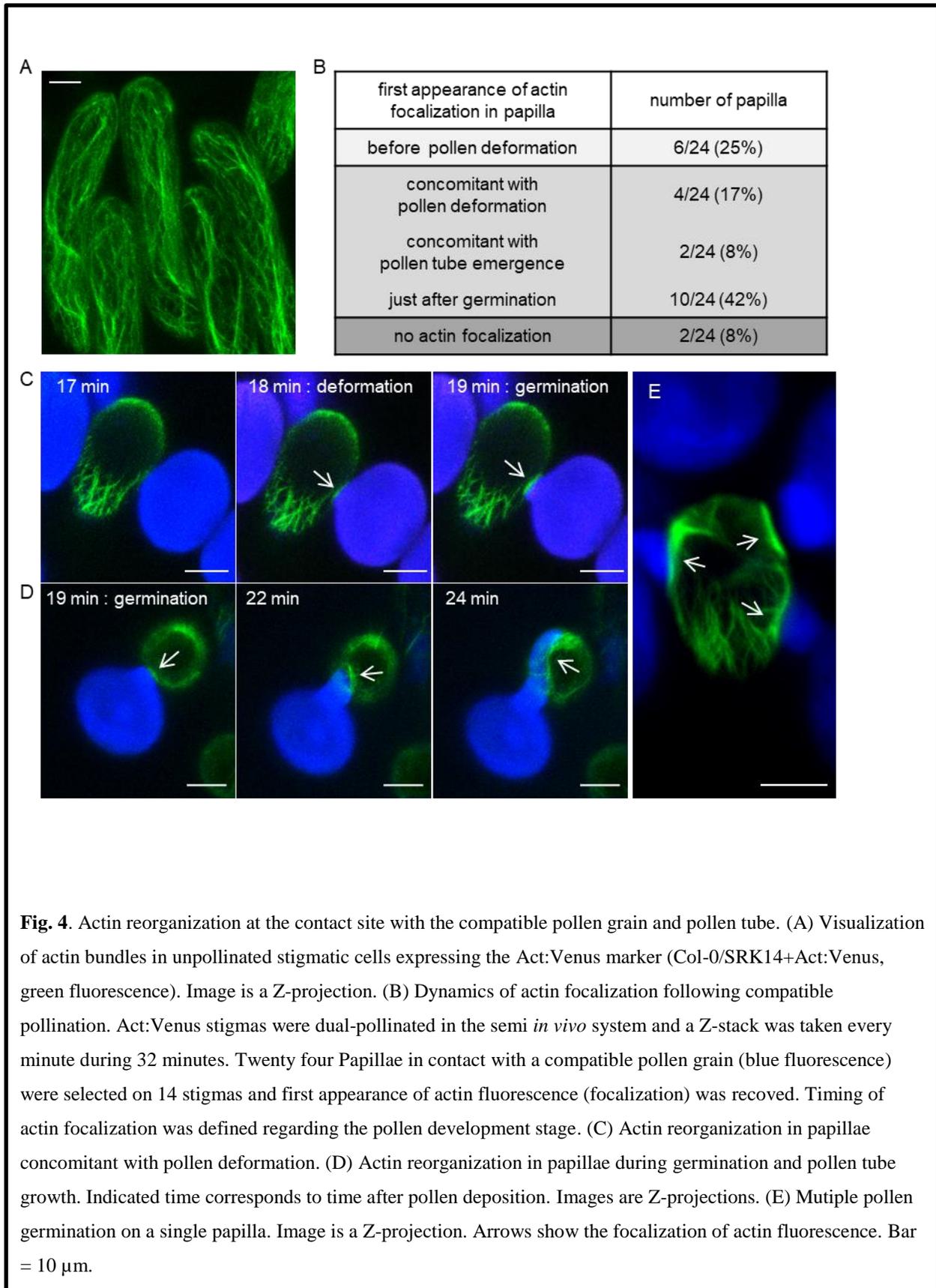


Fig. 2. Dynamics of the SI response in Col-0 background. (A) SI phenotype following pollination of stigmas at two developmental stages. Flower buds at the end of developmental stage 12 were emasculated and pollinated with mature pollen 42h (stigma stage 15) or 66h (stigma stage 16) after emasculatoin and pollen tubes in stigmas counted 6h after pollination (upper panel). Pollen tube count after aniline blue staining of stigmas (bottom graph). (B) Maintenance of SI reaction over time. Flower buds at the end of stage 12 were emasculated, pollinated with mature pollen 18h later (stage13-14) and harvested six, 24, 48 or 72 hours after pollination (upper panel). Pollen tube count after aniline blue staining of stigmas (bottom graph). Beyond 100 pollen tubes per stigma, exact number was not determined and given a value of 100 (no mean, no error bar). n = number of pollinated stigmas. Blue dots correspond to individual pollinated stigma; when several stigma have the same value, the stigma number is indicated in bracket. Mean (black diamond) of two independent experiments. Black dots are extreme values. Error bars indicate SEM.



DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING



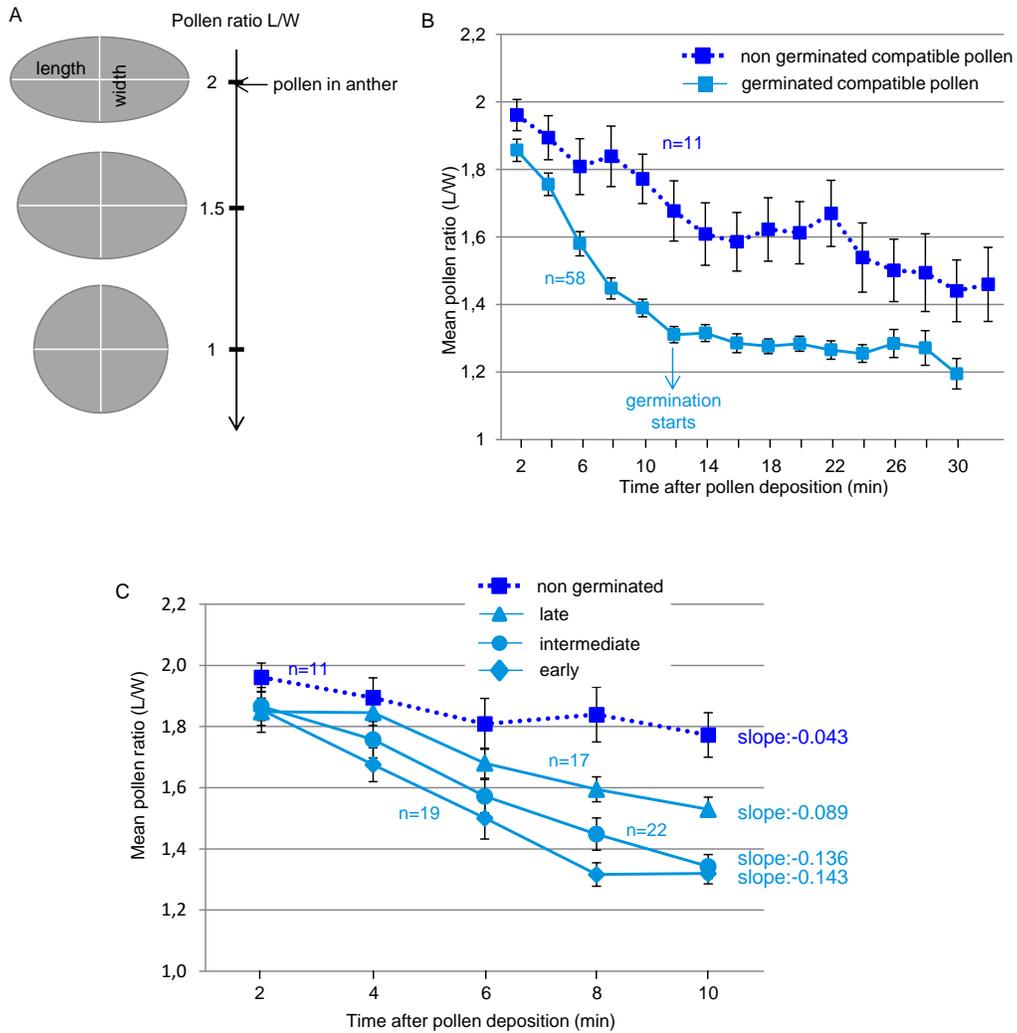


Fig. 5. Kinetics of compatible pollen hydration following dual pollination. (A) During hydration, pollen shape changes from an ovoid towards a round shape given by the ratio Length/Width (L/W). (B) Evolution of the L/W ratio during a compatible interaction. Among the 69 tracked pollen grains, 58 germinated during the experiment (solid blue line), whereas 11 failed to germinate (dashed blue line). (C) Kinetics of pollen hydration related to rate of germination. Pollen grains were classified by their germination time in four categories: early, intermediate, late and non germinated. Slopes were calculated by linear regression based on pollen hydration curve during the first 10 minutes. n = number of pollen grains. Mean of five independent experiments. Error bars indicate SEM.

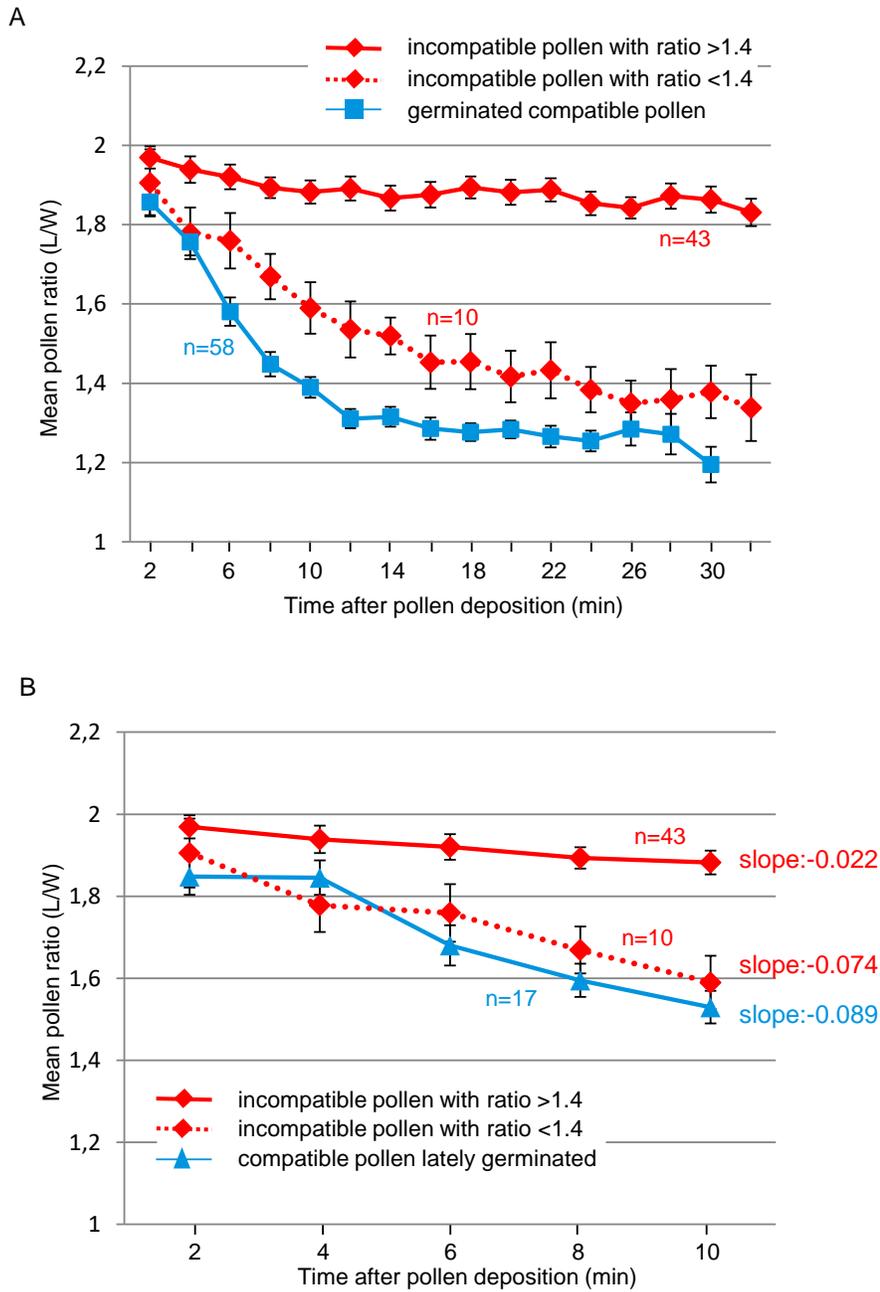


Fig. 6. Kinetics of incompatible pollen hydration following dual pollination. (A) Evolution of the L/W ratio during an incompatible interaction. Among the 53 tracked pollen grains, 43 exhibited a L/W ratio below 1.4 (solid red line) whereas 10 had a ratio lower than 1.4 (dashed red line). The solid blue line that indicates hydration dynamics of compatible pollen was reproduced from Fig. 5B to aid in comparison. (B) hydration rates during the first 10 minutes of incompatible pollen with a L/W ratio >1.4 (solid red line), incompatible pollen with a L/W ratio <1.4 (dashed red line) and compatible pollen that lately germinated (solid blue line, reproduced from Fig. 5C). Slopes were calculated by linear regression. *n* = number of pollen grains. Mean of 5 independent experiments (seven pollinated stigmas), error bars indicate SEM.

DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING

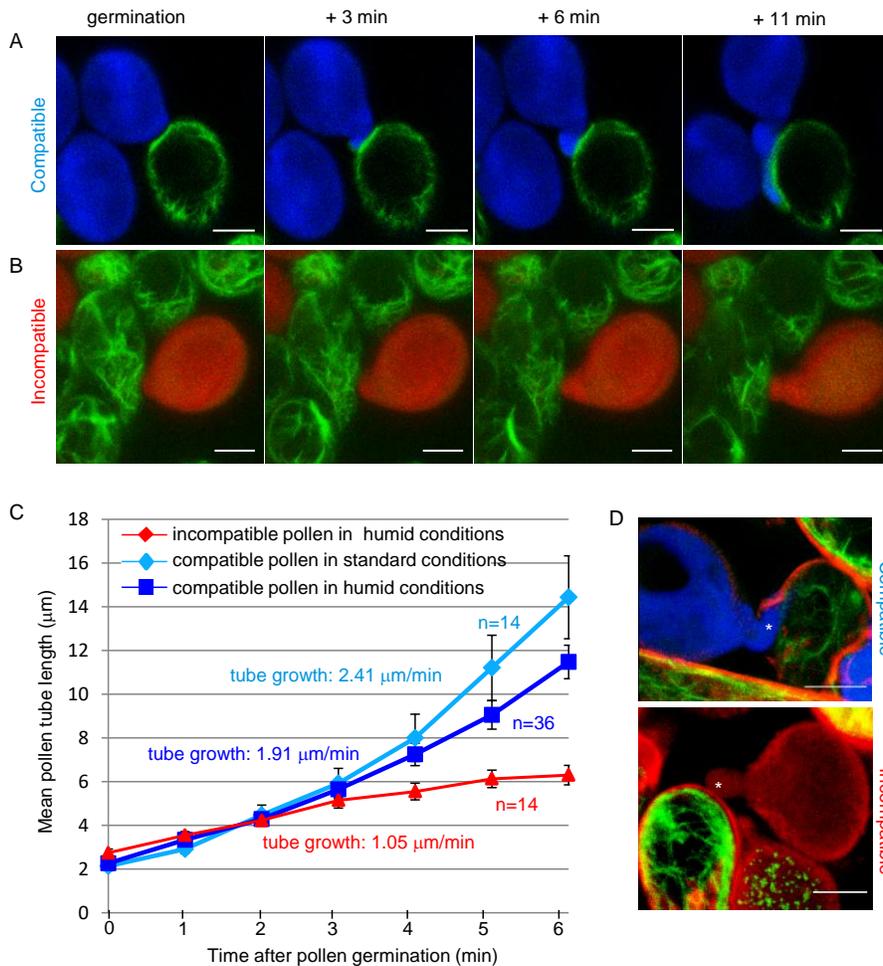


Fig. 7. Pollen germination in high humidity conditions. (A) Compatible pollen (blue fluorescence) was deposited on an Act:Venus stigma and incubated in high humidity conditions. (B) Incompatible pollen (red fluorescence) was deposited on an Act:Venus stigma and incubated in high humidity conditions. A Z-stack was taken every minutes after pollen deposition. Images are Z-projections. Bar = 10 μ m. (C) Growth rate of pollen tubes in standard and high humidity conditions. Pollen tube length was measured at each time point from germination (0 on the horizontal axis) during 6 minutes, for compatible pollen developed in standard conditions (light blue line), in high humidity conditions (dark blue line) or for incompatible pollen in high humidity conditions (red line). n = number of tracked pollen grains on minimum 6 different stigmas, error bars indicate SEM. (D) 35 minutes after incubation in high humidity conditions, stigmas were stained with FM4-64. A Z-stack was processed with image J to generate a 3D projection. Compatible pollen tube (white star) was detected beneath the FM4-64 labelled layer (red fluorescence surrounding the papilla cell), whereas incompatible tube (yellow star) was outside. Bar = 10 μ m.

Supplementary protocol S1

A. lyrata *SCR14* and *SRK14* gene cloning

The *AlSRK14* genomic sequence (3,620 kb) was amplified with specific AttB-containing primers (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACCATGAGAGGTGTAATACCAAAGTACC3' and 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACCGAGGTTCCACTTCCGTGGTGG3') and subsequently inserted by BP recombination into a pDon207 plasmid. A fragment of 4,081 kb containing the *AlSCR14* gene was amplified using the AttB-containing primer (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGGTAGCTCAACCTAGCTAAG3' and 5'ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CATGATCACCAAAGACAAGATCC3'). This fragment was subsequently inserted by BP recombination into a pDONR-Zeo plasmid.

Plasmid construction

We used Gateway® vectors (Life Technologies, USA; <http://www.thermofisher.com/>, Karini et al. 2002) for expression of transgenes in *A. thaliana*. The DNA fragment containing the *Brassica oleracea* *SLR1* stigma specific promoter (1.5 kb upstream of the *SLR1* start codon, Hackett et al. 1996; Fobis-Loisy et al. 2007) was inserted into the pDONP4-P1R plasmid (Durand *et al.*, 2014). Two pollen specific promoters were used, either *pLAT52* from *Lypopersicum esculentum* (Twell et al., 1989; Rotman et al. 2003) or *pACT11* from *A. thaliana* (Huang *et al.*, 1997; Rotman et al. 2005), which were inserted by recombination into the plasmid pDONP4-P1R. Coding sequence (CDS) of TURQUOISE (TURQ), GFP or RFP proteins were introduced in the pDONP2R-P3 (+Stop). The sequence encoding *LTI6b* (Cutler et al., 2000) was amplified and inserted in pDon207 plasmid. The entry clone containing the LifeAct peptide fused to VENUS was provided by Takashi Ueda (Era *et al.*, 2009).

Expression vectors were produced by three fragment LR recombination. The *SLR1* promoter, the genomic sequence *AlSRK14* and a 3'mock sequence were inserted in the pK7m34GW destination vectors. The genomic sequence *AlSCR14* (including promoter and 3'UTR regions), a 5'mock sequence and a 3'mock sequence were inserted in the pB7m34GW. The *SLR1* promoter, the *LifeActin:Venus* and a 3'mock sequence were inserted in the pB7m34GW (Act:Venus). The *LAT52* promoter, the TURQUOISE CDS (+stop) and a 3'mock sequence were inserted in the pK7m34GW. The *ACT11* promoter, the *RFP* CDS (+stop) and a 3'mock sequence were inserted in the pK7m34GW. The *SLR1* promoter, the *LTI6b* sequence and the *GFP* CDS (+stop) were inserted in the pB7m34GW.

Plant transformation

Arabidopsis transgenic plants were generated using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation according to Logemann et al. (Logemann *et al.*, 2006). *AISRK14* construct was introduced in Col-0 and C24. *AISCR14* and *LAT52-TURQ* constructs were introduced in C24. Act:Venus construct was introduced in the selected *AISRK14* line #10. *pACT11-RFP* construct was introduced in the selected *AISCR14* line #4. *LTI6b:GFP* was introduced in Col-0. For all transformations, unique insertion lines homozygous for the transgene were selected by segregation on antibiotic containing medium.

References

- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR.** 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3718–3723.
- Durand E, Meheust R, Soucaze M, et al.** 2014. Dominance hierarchy arising from the evolution of a complex small RNA regulatory network. *Science* **346**, 1200–1205.
- Era A, Tominaga M, Ebine K, Awai C, Saito C, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Nakano A, Ueda T.** 2009. Application of Lifeact Reveals F-Actin Dynamics in Arabidopsis thaliana and the Liverwort, Marchantia polymorpha. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1041–1048.
- Fobis-Loisy I, Chambrier P, Gaude T.** 2007. Genetic transformation of Arabidopsis lyrata: specific expression of the green fluorescent protein (GFP) in pistil tissues. *Plant Cell Reports* **26**, 745–753.
- Hackett RM, Cadwallader G, Franklin FCH.** 1996. Functional analysis of a Brassica oleracea SLR1 gene promoter. *Plant physiology* **112**, 1601–1607.
- Huang S, An Y-Q, McDowell JM, McKinney EC, Meagher RB.** 1997. The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant molecular biology* **33**, 125–139.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A.** 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193–195.
- Logemann E, Birkenbihl RP, Ülker B, Somssich IE.** 2006. An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* **2**, 16.
- Rotman N, Durbarry A, Wardle A, Yang WC, Chaboud A, Faure J-E, Berger F, Twell D.** 2005. A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Current Biology* **15**, 244–248.
- Rotman N, Rozier F, Boavida L, Dumas C, Berger F, Faure J-E.** 2003. Female control of male gamete delivery during fertilization in Arabidopsis thaliana. *Current Biology* **13**, 432–436.
- Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S.** 1989. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Molecular and General Genetics MGG* **217**, 240–245.

Supplementary protocol S2**Reverse transcription and Quantitative real-time PCR**

Thirty stigmas from stage 13-14E *A. thaliana* flower buds or twenty stigmas from *A. lyrata* buds just before anthesis were dissected and total RNA was extracted with the Arcturus® PicoPure® RNA isolation kit (Life Technologies). 265 ng of total RNA were reverse-transcribed with random hexanucleotides and RevertAid (200U/μL ; Thermo scientific) and subjected to quantitative real-time PCR with *SRK14* or *ACTIN8* specific primers. Because *ALSRK14* expression level was compared between *A. lyrata* and *A. thaliana*, we designed primers that amplify a region of the *ACTIN8* cDNA conserved between the two species (forward primer 5'-CGACGGACAAGTGATCACGATC-3' and reverse primer 5'-CATAGTTGTACCACCACTGAGCAC-3'). Amplification of *SRK14* was performed with two primers located within the first exon (forward primer 5'-GCCGCCAGACACATCCGGGGC-3' and reverse primer 5'-CAACCCTTCCCACCATCTTGG-3'). Absence of contaminating genomic DNA was controlled with primers located within a non coding region close to the *ACTIN8* gene (forward primer 5'-GGCTGTGACAATGCGAAGCCCC-3' and reverse primer 5'-CCCCATTTTGGTATCTAGGG-3'). Quantitative analysis of real-time PCR results was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Schmittgen and Livak 2008).

References

Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* **3**, 1101–1108.

Supplementary protocol S3**Confocal Microscopy**

VENUS and GFP were excited at 488 nm and fluorescence detected between 450 and 550 nm, RFP and FM4-64 were excited at 561 nm and fluorescence detected between 550 and 600 nm, TURQUOISE was excited at 458 nm and fluorescence detected between 400 and 450 nm. To avoid emission spectrum overlay, image acquisition was performed with the sequential mode. Serial confocal images encompassing the entire volume of the stigma were recorded every 1 μm and every 1 or 2 minutes. Images and movies were processed with Image J software.

Supplementary table S1. L/W ratio of pollen grains at anthesis

	pollen from anther	
	<i>C24/TURQ</i>	<i>C24/SCR14+RFP</i>
mean L/W ratio	2.01	1.92
SEM	0.03	0.03
n	55	49

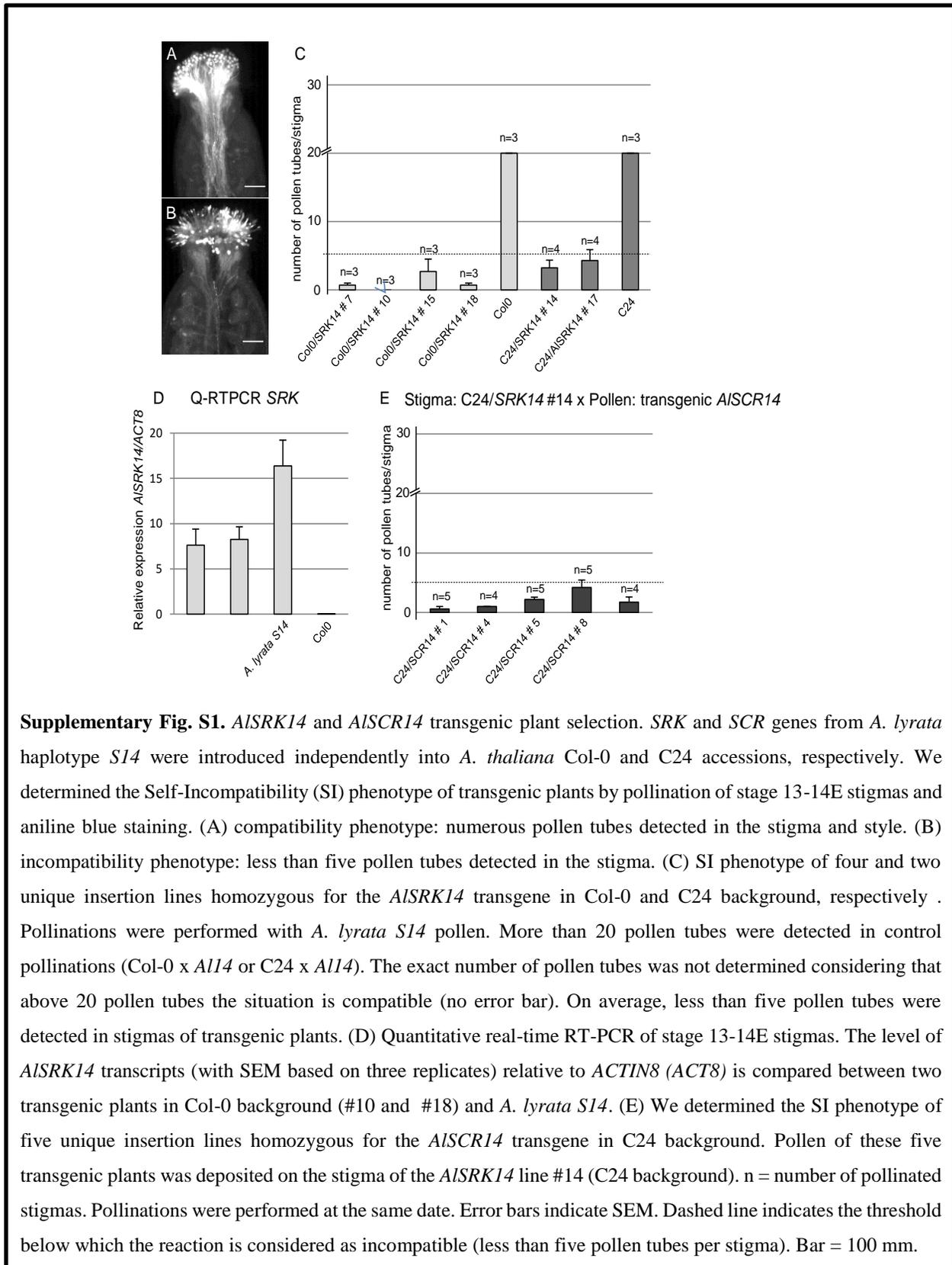
Supplementary table S3. Germination of compatible pollen tracked during experiments described in figure 5.

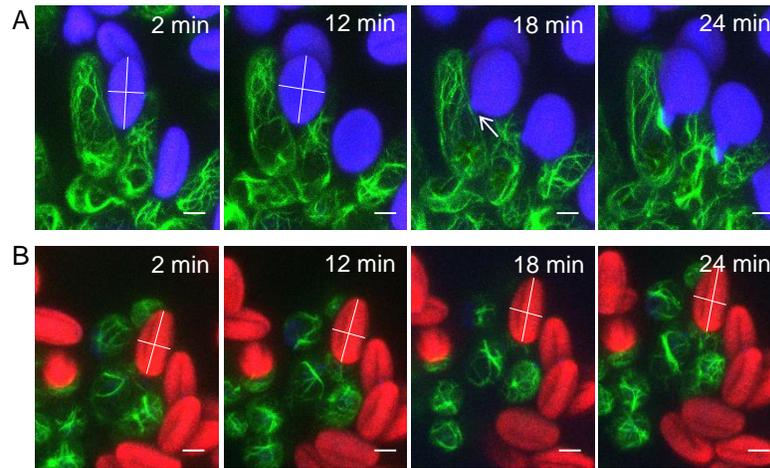
time after pollen deposition	% of grains having germinated
2 min	0%
4 min	0%
6 min	0%
8 min	0%
10 min	0%
12 min	5% (3/58)
14 min	15.5% (9/58)
16 min	24% (14/58)
18 min	33% (19/58)
20 min	43% (25/58)
22 min	60% (35/58)
24 min	71% (41/58)
26 min	84% (49/58)
28 min	91% (53/58)
30 min	96.5% (56/58)
32 min	100% (58/58)

Supplementary table S4. L/W ratio of incompatible pollen in high humidity conditions 10 minutes after pollen deposition. Highlighted in grey, pollen grains with L/W ratios < 1.4 (21/46, i.e., 46%).

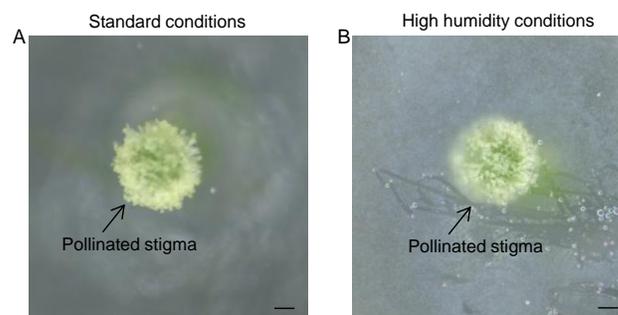
pollen number	ratio L/W at 10 min
1	1.496808511
2	1.571253071
3	1.18293281
4	1.537048014
5	1.706111834
6	1.944564435
7	1.876534789
8	1.918410042
9	1.895803184
10	1.563836682
11	1.266405485
12	1.152023692
13	1.625305623
14	1.500844119
15	1.721281741
16	1.355664488
17	1.092155009
18	1.226078334
19	1.25945658
20	1.305036786
21	1.19333996
22	1.564263323
23	1.338819523
24	1.279553526
25	1.192789969
26	1.338057743
27	1.532069158
28	1.675443968
29	1.376488866
30	1.447643979
31	1.882959369
32	1.323836657
33	1.555009219
34	1.147639956
35	1.26795284
36	1.533791523
37	1.407605785
38	1.527503526
39	1.588938714
40	1.576662144
41	1.302325581
42	1.341981132
43	1.358876117
44	1.405837004
45	1.230807577
46	1.489843297

DISSECTION OF THE EARLY POLLEN-STIGMA INTERACTIONS BY LIVE-CELL IMAGING





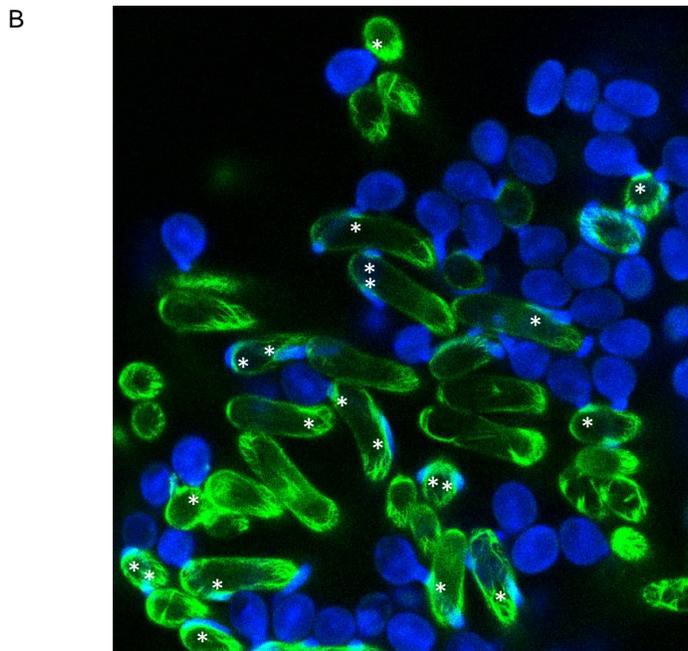
Supplementary Fig. S2. Hydration kinetics of compatible and incompatible pollen in the semi *in vivo* system. Images are Z-projections and correspond to enlargement of the pollinated stigma shown in supplementary video S1. Indicated time corresponds to the time after pollen deposition. (A) Length and width (white lines) of one compatible pollen grain. Emergence of a pollen tube (arrow) occurs after 18 minutes. (B) Length and width of one incompatible pollen grain. Bar = 10 mm.



Supplementary Fig. S3. Standard and high humidity assays. (A) Stigma in contact with the coverslip 30 minutes after pollination in standard conditions. (B) Stigma in contact with the coverslip 30 minutes after pollination in high humidity conditions. bar = 100 mm

A

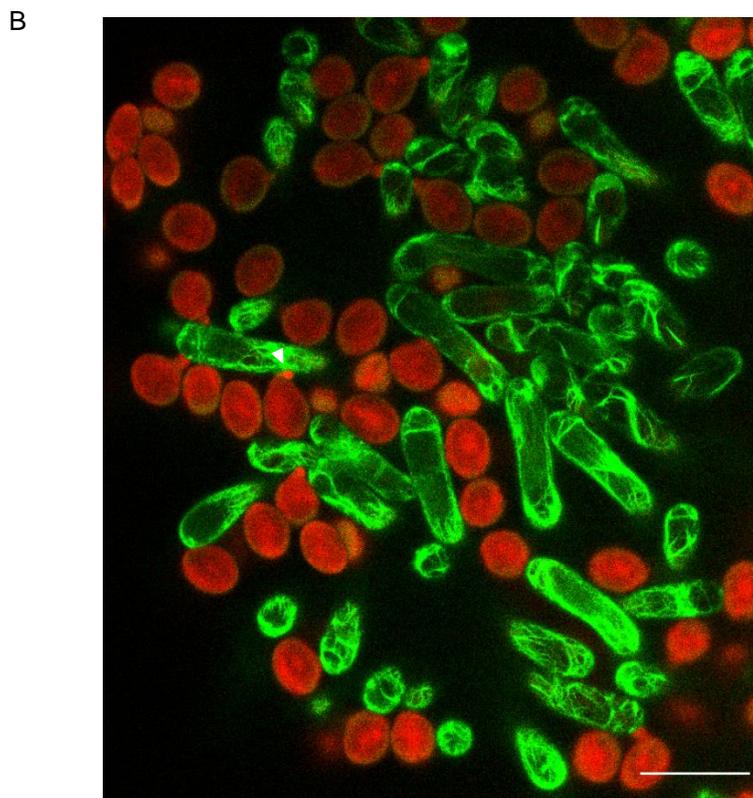
compatible pollination in high humidity conditions						
germination					actin focalization in papilla	
%	pollen number	time (min)	SEM	pollen number	%	pollen number
88	586	18.55	0.62	44	75	44



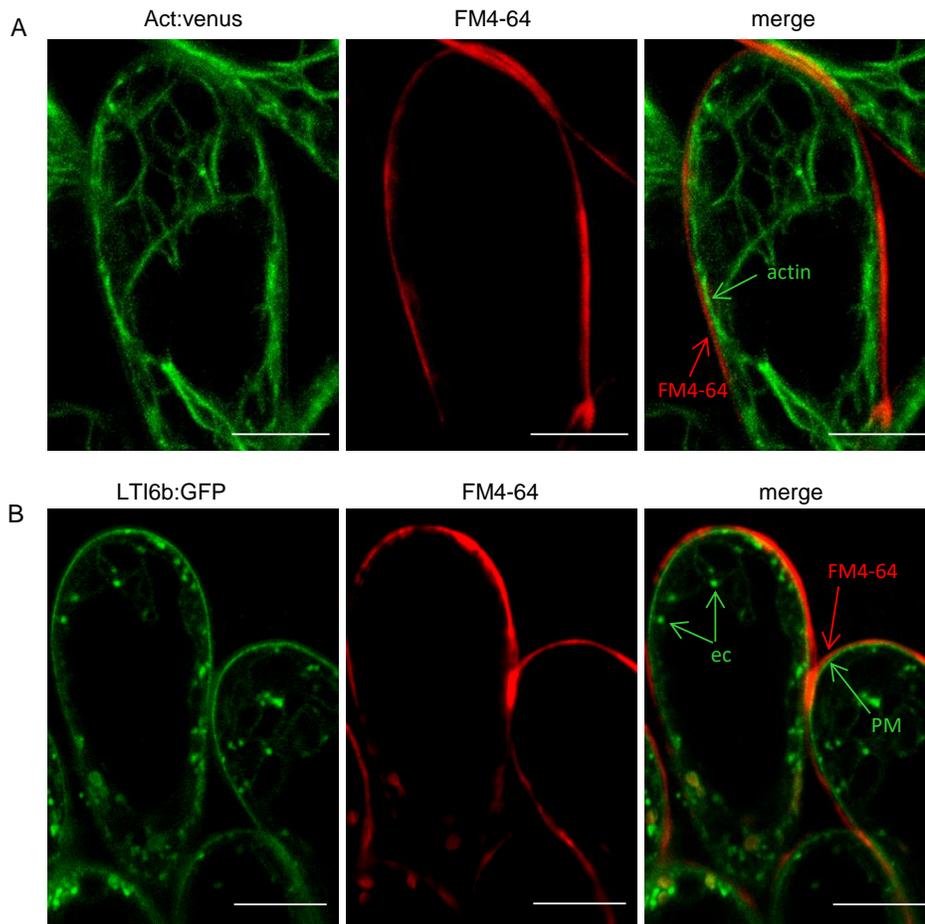
Supplementary Fig. Behavior of compatible pollen in high humidity conditions . (A) Features of compatible pollination in high humidity conditions. An Act:Venus marker stigma was pollinated with compatible pollen and incubated in high humidity conditions for 40 minutes. Four independent experiments. (B) Actin (green fluorescence) focalization (white asterisks) in stigmatic cells in contact with blue-fluorescent germinated pollen grains. Image is a single confocal section, 40 minutes after **pollen deposition**. **Bar = 50 mm.**

A

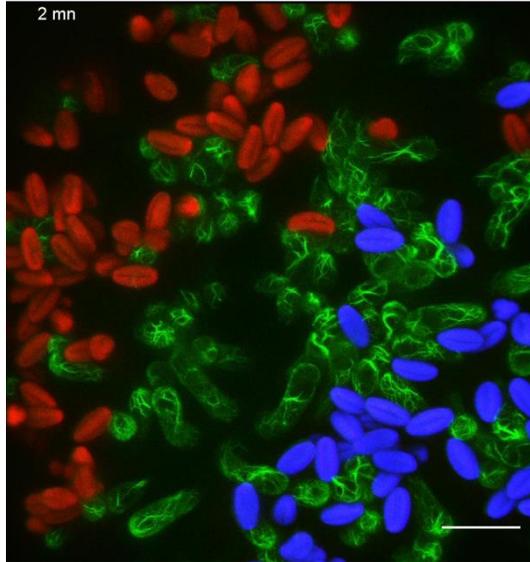
incompatible pollination in high humidity conditions						
germination				actin focalization in papilla		
%	pollen number	time (min)	SEM	pollen number	%	pollen number
35	314	26.45	1.17	22	13	16



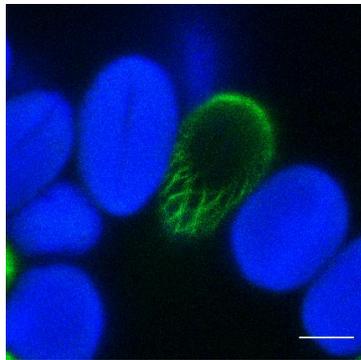
Supplementary Fig. S5. Behavior of incompatible pollen in high humidity conditions . (A) Features of incompatible pollination in high humidity conditions. An Act:Venus marker stigma was pollinated with incompatible pollen and incubated in high humidity conditions for 40 minutes. Four independent experiments. (B) Actin (green fluorescence) rarely focalized in stigmatic cells in contact with red-fluorescent germinated pollen grains (only one visible actin focalization: white arrow head). Image is a single confocal section, 40 minutes after pollen deposition. Bar = 50 mm



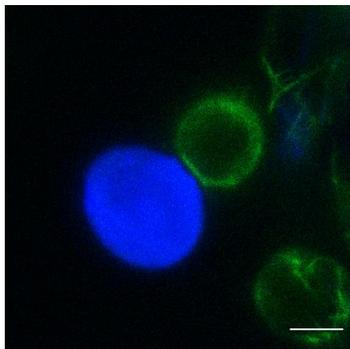
Supplementary Fig. S6. FM4-64 labelling of stigmatic cells. Stigmas were incubated in FM4-64 and imaged under confocal microscopy (red fluorescence). Single confocal sections are presented. (A-B) FM4-64 remains at the surface of the stigmatic cells as deduced from its localization above the actin marker Act:Venus (A) and the LTI6b:GFP marker (B) known to label plasma membrane (PM) and endocytic compartments (ec). bar = 10 mm



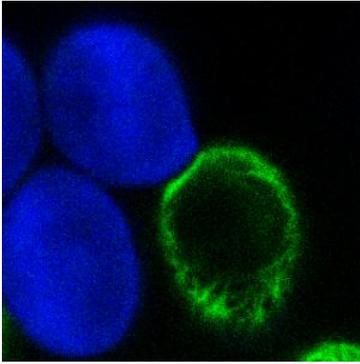
Supplementary video S1. Dual pollination with compatible and incompatible pollen deposited on the same stigma. A stigma expressing the Act:Venus marker (green fluorescence) was pollinated first with incompatible pollen (left part of the stigma, red fluorescence) and immediately after with compatible pollen (right part of the stigma, blue fluorescence). A Z-stack was taken every 2 minutes after pollen deposition. Images were processed with ImageJ to generate a Z-projection at each time point to construct the video. Bar = 50 μ m.



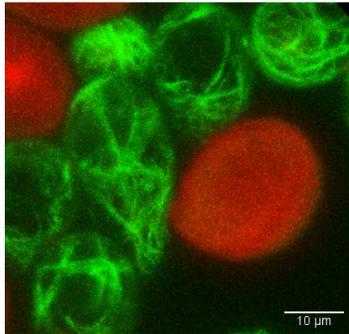
Supplementary video S2. Actin rearrangement at the pollen contact site. An Act:Venus stigma (green fluorescence) was pollinated with compatible pollen (blue fluorescence). A Z-stack was taken every minute after pollen deposition. Images were processed with Image J to generate a Z-projection at each time point to construct the video. Bar = 10 μ m.



Supplementary Figure S3. Actin rearrangement along the pollen tube path. An Act:Venus stigma (green fluorescence) was pollinated with compatible pollen (blue fluorescence). A Z-stack was taken every minute after pollen deposition. Images were processed with image J to generate a Z-projection at each time point to construct the video. Bar = 10 μ m.



Supplementary video S4. Compatible pollen germination and pollen tube growth in high humidity conditions. An Act:Venus stigma (green fluorescence) was pollinated with compatible pollen (blue fluorescence) and incubated in high humidity conditions. A Z-stack was taken every minute after pollen deposition. Images were processed with image J to generate a Z-projection at each time point to construct the video. Bar = 10 μ m.



Supplementary video S5. Incompatible pollen germination and pollen tube growth in high humidity conditions. An Act:Venus stigma (green fluorescence) was pollinated with incompatible pollen (red fluorescence) and incubated in high humidity conditions. A Z-stack was taken every minute after pollen deposition. Images were processed with image J to generate a Z-projection at each time point to construct the video. Bar = 10 μ m.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Science de la Vie et de la Terre

*Dissection des premières étapes de la reproduction chez *Arabidopsis* par imagerie
cellulaire en temps réel*

MORIN-ROZIER Frédérique

Le xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

RESUME

La spécificité cellulaire, la croissance et le développement des organismes pluricellulaires dépendent d'une communication qui s'établit soit avec le milieu extérieur soit entre les différents tissus qui les constituent. Les informations issues de signaux extracellulaires sont perçues par la cellule et traduits par des réactions intracellulaires. La reproduction sexuée chez les plantes est un exemple de communication cellulaire. Une communication s'établit entre les partenaires mâles et femelles dès le dépôt du grain de pollen (contenant les gamètes mâles) à l'extrémité de l'organe femelle appelé stigmate et composé de nombreuses cellules épidermiques, les papilles stigmatiques. Chez certaines espèces, les organes mâles et femelles sont proches, enfermés dans la fleur, ce qui favorise le dépôt du pollen sur son propre stigmate (autopollinisation). Afin d'empêcher la consanguinité et favoriser le brassage génétique, certaines espèces sont capables de rejeter leur propre pollen, on parle alors de réponse auto-incompatible et d'espèces auto-incompatibles. Chez les Brassicacées, ce rejet dépend d'une réaction récepteur-ligand qui intervient dès le dépôt du pollen sur les papilles stigmatiques. L'autopollen est bloqué à la surface du stigmate alors qu'un pollen génétiquement différent de la femelle sera accepté et produira une descendance. *Arabidopsis thaliana*, appartenant à la famille des Brassicacées, a perdu au cours de l'évolution cette capacité à rejeter son propre pollen. Il est toutefois possible de réactiver cette réponse en ré-introduisant par transgénèse, un couple récepteur-ligand fonctionnel provenant de l'espèce proche *Arabidopsis lyrata*, auto-incompatible. L'objectif de ce travail est de disséquer les premières étapes de reconnaissance entre les cellules stigmatiques et les grains de pollen compatibles et incompatibles. Nous avons mis en place un système semi in vivo permettant de suivre, par microscopie confocale, le devenir des grains de pollen à la surface stigmatique, ainsi que de visualiser les mouvements cellulaires ou les modifications structurales qui interviennent dans la cellule femelle lors de l'interaction. Nous avons montré que le blocage du pollen incompatible intervient à plusieurs niveaux, précocement lors de l'activation du grain de pollen ou plus tardivement lors de la pénétration de la surface stigmatique. Nous avons également visualisé des mouvements du cytosquelette d'actine dans la papille stigmatique au niveau du point de contact avec le pollen compatible résultant de la communication cellulaire générée par la rencontre des deux partenaires.

MOTS-CLES : Arabidopsis, pollinisation, pollen, stigmate, microscopie confocale, actine.

