

Contrôle de la fécondation par des mécanismes d'auto-incompatibilité

Isabelle Fobis-Loisy et Thierry Gaude

Reproduction et Développement des Plantes, Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR 5667 CNRS-INRA-ENSL-UCB Lyon I, IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

Auteur correspondant : Isabelle Fobis-Loisy, Isabelle.Fobis-Loisy@ens-lyon.fr

Reçu le 18 novembre 2009

Résumé – Les angiospermes ou plantes à fleurs présentent le système reproductif le plus évolué des végétaux, ce qui a probablement contribué à leur succès puisque c'est de loin le groupe de plantes terrestres le plus abondant. Leur essor est vraisemblablement lié à la mise en place de stratégies reproductives limitant l'autofécondation et favorisant ainsi le brassage génétique au sein d'une espèce. L'une des barrières principales à l'autofécondation est l'auto-incompatibilité (AI) permettant à l'organe reproducteur femelle de discriminer le pollen « soi » du pollen « non-soi » et de rejeter spécifiquement le pollen « soi ». Dans cette revue, nous montrerons que les mécanismes d'AI existant chez différentes familles d'angiospermes sont très divers tant au niveau des molécules impliquées dans la reconnaissance qu'au niveau de la cascade moléculaire aboutissant au rejet du pollen « soi ».

Mots clés : Angiospermes / auto-incompatibilité sporophytique / auto-incompatibilité gamétophytique

Abstract – Control of fertilization by self-incompatibility mechanisms.

Flowering plants (angiosperms) are the most prevalent and evolutionarily advanced group of plants. Reproductive strategies that promote cross-fertilization have played an essential role in the success of angiosperms as they contribute to genetic variability among plant species. A major genetic barrier to self-fertilization is self-incompatibility (SI), which allows female reproductive cells to discriminate between self- and non-self pollen and specifically reject self-pollen. In this review, we describe three SI mechanisms showing that different flowering plant families use distinct molecules for recognition of self as well as diverse biochemical pathways to arrest pollen tube growth.

Key words: Angiosperms / sporophytic self-incompatibility / gametophytic self-incompatibility

Introduction

De nos jours, les plantes à fleurs ou angiospermes représentent plus de 90 % des espèces végétales qui nous entourent. On compte 350 000 à 400 000 espèces qui occupent tous les biotopes, alors que seules 956 espèces de gymnospermes (essentiellement des conifères) ont été répertoriées. L'essor des angiospermes est en grande partie dû à des adaptations évolutives aboutissant à une grande sécurité de la reproduction : (i) la fleur qui renferme les organes reproducteurs, (ii) les carpelles fermés qui assurent la protection de l'em-

bryon, (iii) la double fécondation qui produit d'une part l'embryon et d'autre part l'albumen, une structure nourricière temporaire, (iv) le fruit qui, en plus de son rôle de protection, contribue à la dispersion des graines.

Environ 96 % des espèces d'angiospermes présentent les organes reproducteurs mâle et femelle sur un même individu et, dans la majorité des cas, au sein d'une même structure : la fleur hermaphrodite. À cause de cette proximité des organes reproducteurs, la probabilité d'autofécondation est élevée. En effet,

le pollen véhiculant les gamètes mâles peut aisément se déposer à la surface du pistil (refermant les gamètes femelles) d'une même fleur ou d'une fleur d'un même individu. Une stratégie d'autofécondation peut être un avantage dans certaines conditions environnementales favorables et relativement stables mais peut devenir problématique dans le cas d'un contexte environnemental variable et imprévisible. L'autofécondation, tendant à produire des individus génétiquement identiques, aboutit à un faible taux de variabilité génétique au sein d'une population et ainsi, à des difficultés d'adaptation aux conditions environnementales variables que les plantes rencontrent dans la nature et auxquelles elles ne peuvent échapper. La diversité génétique est essentielle pour la survie à long terme d'une population. Elle augmente la probabilité qu'au moins un individu survive face à des fluctuations environnementales drastiques. Il n'est donc pas étonnant qu'au cours de l'histoire évolutive des angiospermes, la pression de sélection ait permis de stabiliser des stratégies limitant l'autofécondation et favorisant les croisements entre individus génétiquement différents.

L'un de ces mécanismes, le plus sophistiqué et le plus répandu, est l'auto-incompatibilité (AI) qui permet au pistil de discriminer un grain de pollen en fonction de son origine génétique. Le pollen « soi » ou autopollen est rejeté alors que le pollen « non-soi » ou allopollen est accepté et conduira à une descendance (De Nettancourt, 2001). Sous le terme d'AI sont regroupés des mécanismes génétiquement et moléculairement très divers. Par exemple, chez certaines espèces (notamment la primevère), la fleur existe sous deux ou trois formes qui diffèrent morphologiquement et la pollinisation n'aboutit que si les deux partenaires proviennent de formes différentes. Chez la majorité des espèces, il n'existe cependant aucune différence morphologique entre les fleurs. Parmi ces espèces dites homomorphes, plusieurs mécanismes d'AI existent et diffèrent sur (i) le nombre de loci contrôlant la reconnaissance, (ii) le contrôle génétique du phénotype d'AI des partenaires mâle et femelle, (iii) le site du rejet du pollen et (iv) les mécanismes moléculaires contrôlant la réaction de rejet de l'autopollen. Ces différences indiquent clairement que l'AI est apparue plusieurs fois au cours de l'histoire évolutive des angiospermes.

Malgré ces différences importantes, tous les systèmes d'AI homomorphes décrits à ce jour présentent certains points communs. Pour la majorité d'entre eux et notamment ceux décrits ci-après, l'AI est contrôlée par un locus unique nommé le locus *S* pour « *Self-incompatibility* ». Dans ce contexte, le « soi » et le « non-soi » correspondent respectivement à une identité ou une divergence pour le locus *S*. Ce locus *S* renferme deux gènes clés génétiquement liés

qui déterminent respectivement la spécificité allélique (haplotype *S*) du pistil ou du pollen. Ces gènes sont hautement polymorphes; par exemple chez le navet (*Brassica rapa*) plus de 100 haplotypes différents pour le locus *S* ont été répertoriés (Ruffio-Chable & Gaude, 2001). Pour tous les systèmes d'AI décrits à ce jour, la reconnaissance de l'autopollen est basée sur une interaction allèle-spécifique entre les produits mâle et femelle du locus *S*. Cette interaction conduit à l'activation d'une cascade d'événements moléculaires et cellulaires dans le pistil ou dans le pollen qui aboutit à l'inhibition de la croissance du tube pollinique.

Des mécanismes variés pour inhiber l'autopollen

En fonction du contrôle génétique du phénotype d'AI du grain de pollen, les systèmes d'AI homomorphes peuvent être subdivisés en deux classes, l'AI gamétophytique (AIG) et l'AI sporophytique (AIS). Chez les familles à AIG : Solanacées (tabac, tomate...), Rosacées (rose, arbres fruitiers...), Scrofulariacées (*Antirrhinum* ...), Papaveracées (coquelicot...), le phénotype du pollen est déterminé par son propre génotype haploïde. Chez les familles à AIS, notamment Brassicacées (choux fourrager, brocoli, colza...) et Astéracées (tournesol...), le génome diploïde du parent producteur de pollen détermine le phénotype du grain de pollen. Si la plante émettrice de pollen est hétérozygote pour le locus *S*, le pollen exprimera deux spécificités alléliques *S*.

Ces deux systèmes diffèrent notamment au niveau du site de reconnaissance et de rejet de l'autopollen. Chez les Brassicacées, le rejet se manifeste très précocement au niveau de la surface réceptrice du pistil, le stigmate. En général, la germination du grain de pollen est bloquée et il est, par conséquence, assez rare que des tubes polliniques se développent dans le pistil. Dans les systèmes d'AIG, la barrière d'AI est plus tardive, le grain de pollen germe, émet un tube pollinique qui pénètre dans le pistil. La mort cellulaire est alors le seul moyen de stopper la progression du tube dans les tissus femelles.

Rejet précoce de l'autopollen : reconnaissance ligand-récepteur à la surface du stigmate des Brassicacées

Chez les Brassicacées, la réaction de rejet intervient au niveau de la zone de contact entre le grain de pollen et les cellules épidermiques du pistil : les papilles stigmatiques. Cette réponse est rapide; elle est généralement observée dans les minutes qui suivent le dépôt du pollen. Elle est également très localisée puisqu'elle ne se

manifeste que dans la zone de contact entre le pollen et la cellule stigmatique (Sarker *et al.*, 1988). Ainsi une même papille stigmatique est capable de discriminer le pollen en fonction de son origine génétique, rejetant l'autopollen et acceptant l'allopollen (Dickinson, 1995).

Dans cette famille, la reconnaissance de l'autopollen est basée sur une interaction allèle-spécifique entre un récepteur membranaire et son ligand, codé respectivement par les deux gènes du locus *S*. Le gène *SRK* (*S-locus Receptor Kinase*, Stein *et al.*, 1991) code pour un récepteur transmembranaire à activité kinase localisé dans la membrane plasmique des cellules stigmatiques. Le gène *SCR* (*S-locus Cysteine Rich*, Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000) code pour un peptide sécrété d'environ 80 résidus, localisé dans la paroi du grain de pollen. Des approches biochimiques *in vitro* ont montré que le peptide SCR interagissait de manière allèle-spécifique avec le domaine extracellulaire de SRK (Kachroo *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2001; Chookajorn *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que cette interaction provoquait l'autophosphorylation du récepteur (Cabrillac *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats suggère que lors de l'autopollinisation, le peptide SCR traverse la paroi des papilles stigmatiques pour atteindre le récepteur SRK localisé à la membrane plasmique, provoquant alors son autophosphorylation et l'activation de la voie de transduction conduisant au rejet du pollen. La démonstration définitive que les gènes *SRK* et *SCR* sont nécessaires et suffisants pour la reconnaissance de l'autopollen provient d'expériences de transgénèse dans lesquelles le transfert d'un allèle *S* donné permet l'acquisition de la spécificité de reconnaissance correspondante par la plante transgénique (Takasaki *et al.*, 2000; Takayama & Isogai, 2005). L'une des expériences de transgénèse la plus probante est la complémentation du « mutant » naturel autofertile *Arabidopsis thaliana* (Nasrallah *et al.*, 2002; 2004). *A. thaliana* est une espèce qui appartient à la famille des Brassicacées. Son autofertilité est liée à des réarrangements au niveau du locus *S* affectant les gènes de reconnaissance *SRK* et *SCR* (Kusaba *et al.*, 2001). L'AI peut être restaurée en transférant un couple de gènes *SRK/SCR* fonctionnels provenant d'une espèce AI phylogénétiquement proche *Arabidopsis lyrata* (Nasrallah *et al.*, 2002). Ces études ont également montré qu'au sein de l'espèce *A. thaliana*, les différentes accessions (*columbia*, C24, RLD. . .) diffèrent dans leur habilité à exprimer le caractère d'AI après transformation avec les gènes *SRK* et *SCR* d'*A. lyrata*. Chez *A. thaliana*, au moins deux loci indépendants du locus *S* sont nécessaires à l'expression stable du caractère d'AI (Nasrallah *et al.*, 2004). L'un de ces loci, *PUB8*, code pour une protéine renfermant un domaine « *U-Box* », ce qui suggère

un rôle de cette protéine dans l'ubiquitination. Il a également été montré que la protéine *PUB8* régule le niveau d'accumulation des ARN messagers SRK. Ainsi, chez certaines accessions d'*A. thaliana*, le niveau d'expression de *PUB8* et par conséquent celui du transgène *SRK* d'*A. lyrata* est insuffisant pour permettre une expression forte et stable du caractère d'AI (Liu *et al.*, 2007).

La cascade d'événements mise en place dans la cellule stigmatique après reconnaissance pollen-stigmate est actuellement mal connue. Certaines protéines ont été identifiées grâce à des cribles « double hybride » chez la levure utilisant comme appât le domaine cytoplasmique de SRK, ou grâce à la caractérisation de mutants perte-de-fonction. Parmi ces molécules, deux thiorédoxines, THL1 et THL2, agiraient comme régulateurs négatifs de la réponse d'AI (Cabrillac *et al.*, 2001). Dans le stigmate, à l'état basal, SRK existe sous forme de dimères (Giranton *et al.*, 2000). Cette association se fait au niveau de deux domaines localisés dans la région extracellulaire de SRK, indépendants de ceux impliqués dans l'activation par le ligand (Naithani *et al.*, 2007). Il a été montré qu'en absence de ligand, SRK n'est pas phosphorylée et cet état inactif pourrait être maintenu par les thiorédoxines qui régulent négativement l'activité kinase de SRK *in vitro* (Cabrillac *et al.*, 2001). Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de transgénèse chez le colza. En effet, la réduction du niveau d'expression des deux thiorédoxines par des stratégies antisens conduit à un rejet partiel du pollen normalement compatible (Haffani *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que les thiorédoxines pourraient être impliquées dans le maintien à l'état inactif des dimères de SRK présents à l'état basal; l'arrivée du ligand provoquant alors la levée de cette inhibition.

Après interaction avec son ligand de manière allèle-spécifique, la protéine SRK est phosphorylée. Son domaine kinase recrute alors des cibles cytosoliques et initie une cascade de phosphorylation/déphosphorylation aboutissant au rejet de l'autopollen. Parmi ces protéines cibles, la protéine ARC1 (*Armadillo Repeat-Containing protein 1*), identifiée chez le colza, est capable de se lier spécifiquement au domaine kinase de SRK et est phosphorylée par le récepteur (Gu *et al.*, 1998). La réduction par antisens du niveau d'expression de ARC1 dans des pistils de colza transgéniques produit une levée partielle de la barrière d'AI, l'autopollen étant alors capable de franchir la barrière stigmatique (Stone *et al.*, 1999). La protéine ARC1 est exprimée spécifiquement dans le stigmate. Elle appartient à une famille de protéines à domaine « *U-Box* » et présente une activité E3-ubiquitine ligase (Stone *et al.*, 2003). L'ubiquitination des protéines conduit à leur dégradation *via* le protéasome et ARC1 pourrait appartenir au

complexe responsable de cette ubiquitination. Stone *et al.* (2003) ont montré que le niveau d'ubiquitination des protéines stigmatiques augmente en réponse à une pollinisation incompatible alors qu'il reste inchangé dans des plantes transgéniques n'exprimant plus ARC1. De plus, la protéine ARC1 co-localise au niveau du réticulum endoplasmique avec des marqueurs du protéasome et ceci, uniquement en présence d'une forme fonctionnelle de SRK (Stone *et al.*, 2003). Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer un modèle dans lequel la protéine ARC1 serait phosphorylée par le récepteur SRK activé. Cette phosphorylation provoque l'assemblage de ARC1 avec le protéasome au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Actuellement le substrat de ARC1 n'a pas été identifié mais il pourrait s'agir d'un facteur pistillaire nécessaire à la germination et/ou à la croissance du tube pollinique. Sa dégradation, induite par ARC1 et le protéasome lors d'une pollinisation incompatible, serait responsable du rejet de l'autopollen (Stone *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que deux des protéines impliquées dans la cascade de réponse d'AI possèdent un domaine « *U-Box* » : la protéine ARC1 identifiée chez le colza et la protéine PUB8 isolée chez *A. thaliana*. Comme ARC1, la protéine PUB8 contient des domaines « *Arm-repeat* » mais elle contient également d'autres régions que l'on ne retrouve pas dans ARC1, ce qui suggère qu'elle ne correspondrait pas à l'homologue de ARC1. Ainsi, en plus de la phosphorylation, l'ubiquitination semble jouer un rôle clé dans le contrôle de la réponse d'AI. Cependant, l'identification des substrats de ces « E3-ubiquitine ligases » serait un grand pas en avant dans la compréhension des mécanismes responsables de l'arrêt de germination du grain de pollen.

D'autres interacteurs du domaine kinase de SRK ont été identifiés par la technique du double hybride chez la levure et, parmi eux, la protéine SNX1 (*Sorting Nexin 1*) présente un intérêt tout particulier (Vanoosthuysse *et al.*, 2003). En effet, dans les cellules animales, la protéine SNX1 est impliquée dans la dégradation du récepteur à l'EGF qui présente des similitudes de structure et de fonctionnement avec le récepteur SRK (Tichtinsky *et al.*, 2003). Chez *A. thaliana*, comme dans les cellules animales ou chez la levure, la protéine SNX1 est localisée à l'endosome, compartiment endocytique (Jaillais *et al.*, 2006). L'identification de la protéine SNX1 comme un effecteur putatif de la réponse d'AI suggère que l'endocytose pourrait avoir un rôle dans la reconnaissance et le rejet de l'autopollen. Il a d'ailleurs été montré récemment par immunolocalisation dans des papilles de *B. oleracea*, que le récepteur SRK est majoritairement présent dans des endosomes et que seule une petite fraction est détectée au niveau de la mem-

brane plasmique (Ivanov & Gaude, 2009). Cette faible proportion de SRK à la membrane serait cependant suffisante pour fixer le ligand ; le récepteur SRK est alors rapidement internalisé après perception du signal. Différents arguments ont permis aux auteurs de suggérer que l'internalisation de SRK en réponse au ligand serait impliquée dans l'atténuation du signal et le routage, *via* l'endosome, du récepteur vers la vacuole pour sa dégradation. Il n'est cependant pas à exclure que le récepteur SRK activé puisse déclencher ou amplifier la réponse d'AI depuis l'endosome. Il a d'ailleurs été montré qu'un autre récepteur kinase végétal, le récepteur aux brassinostéroïdes (BRI1) est capable de déclencher la voie de réponse conduisant à l'activation des gènes cibles depuis des compartiments intracellulaires (Geldner *et al.*, 2007).

Un dernier élément clé de la réponse d'AI a été identifié par l'analyse d'un mutant spontané de *Brassica rapa*, variété « *Yellow Sarson* » (Murase *et al.*, 2004). Cette variété porte une mutation récessive dans le gène « *modifier* » (*Mod*) qui abolit totalement la capacité du stigmate à reconnaître et rejeter l'autopollen. Le clonage positionnel de cette mutation a permis de révéler que le gène *Mod* code pour deux protéines kinases cytoplasmiques, MLPKf1 et MLPKf2 (*M-Locus Protein Kinase*). Deux transcrits sont produits à partir du gène *Mod* par utilisation d'un site alternatif d'initiation de la transcription. Les deux isoformes ne diffèrent que par leur extrémité N-terminale, région renfermant des sites d'ancrage à la membrane plasmique. MLPKf1 se fixe à la membrane grâce à un motif de myristoylation alors que MLPKf2 utilise un domaine hydrophobe (Kakita *et al.*, 2007). Les deux kinases sont présentes dans le stigmate et complètent la mutation *mod*. Des expériences de complémentation de fluorescence (BiFc) en protoplastes de cellules BY2 ont montré qu'il existait une interaction directe entre SRK et les deux isoformes MLPK et que cette interaction a lieu au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, MLPKf1 et/ou MLPKf2 interagiraient avec SRK pour initier la cascade de phosphorylations responsable du rejet de l'autopollen chez les Brassicacées (figure 1).

Mort cellulaire programmée du tube pollinique chez les Papaveracées

La réponse d'AI chez le coquelicot (*Papaver rhæas*) se manifeste rapidement après la germination du grain de pollen pendant l'émission du tube pollinique. Elle aboutit à la mort du tube pollinique dès sa pénétration dans le stigmate. Le déterminant femelle de cette AI correspond à une petite protéine de 15 kDa, PrsS (*Papaver rhæas* stigma S) sécrétée par les papilles stigmatiques (Foote *et al.*, 1994). Cette molécule ne présente aucune similitude avec d'autres protéines

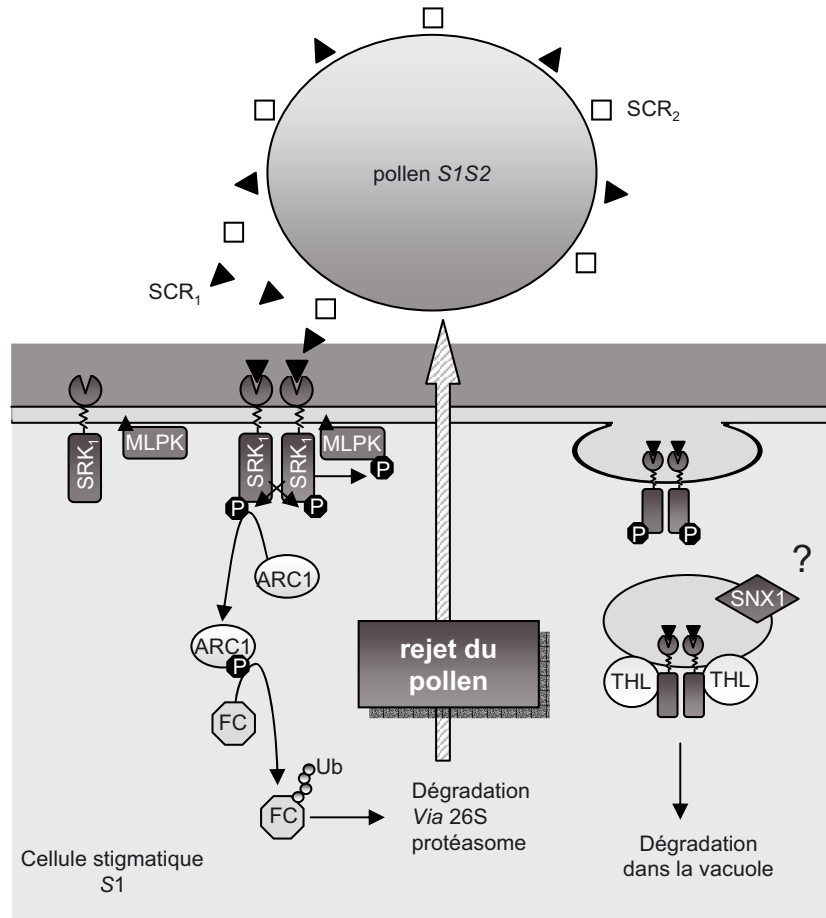


Fig. 1. Rejet précoce de l'autopollen : reconnaissance ligand-récepteur à la surface du stigmate des Brassicacées. Lorsqu'un grain de pollen se dépose à la surface du stigmate le déterminant mâle de l'AI, SCR, migre à travers la paroi stigmatique pour atteindre la membrane plasmique des papilles renfermant le déterminant femelle de l'AI, SRK. L'interaction *S*-spécifique entre SCR et SRK produit l'activation du récepteur et sa phosphorylation. Le récepteur SRK est alors capable de phosphoryler des protéines cibles : MLPK (MLPKf1 et MLPKf2), deux kinases ancrées à la membrane plasmique qui participent à l'activation de la voie de transduction et ARC1, une protéine cytoplasmique à activité E3-ubiquitine ligase. L'activation de ARC1 serait responsable de l'ubiquitination et la dégradation d'un facteur de compatibilité (FC), dont la disparition provoquerait le rejet du pollen incompatible. Après son activation, SRK serait internalisée par endocytose puis maintenue à l'état inactivé par des thiorédoxines (THL) avant sa dégradation dans la vacuole. La protéine SNX1, localisée à l'endosome, pourrait participer à ce ciblage vers la vacuole.

de fonction connue. Comme chez les Brassicacées, l'identification du déterminant mâle, PrpS (*Papaver rhæas* pollen S), a été possible grâce au séquençage systématique du locus *S* (Wheeler *et al.*, 2009). La suppression de l'expression de ce gène grâce à des oligonucléotides antisens a permis de montrer l'implication de PrpS dans l'inhibition allèle-spécifique du pollen incompatible (Wheeler *et al.*, 2009). Le gène *PrpS* code pour une protéine de 20 kDa associée à la membrane plasmique du tube pollinique. Selon les prédictions de séquence, PrpS renfermerait un unique domaine transmembranaire et il a été montré qu'une région de 15 acides aminés localisée dans son domaine extracellulaire interagit *in vitro*

avec la protéine PrsS. Ces données suggèrent fortement que l'étape de reconnaissance allèle-spécifique est réalisée par les deux protéines du locus *S* PrsS et PrpS. Une troisième protéine, SBP (*S-protein-binding protein*), semble avoir également un rôle clé dans la réponse d'AI. Comme son nom l'indique, cette protéine membranaire, spécifiquement exprimée dans le tube pollinique, est capable de fixer la protéine PrsS (Jordan *et al.*, 1999). Cette liaison n'est cependant pas dépendante de l'haplotype *S* et la protéine SBP est plutôt considérée comme une protéine accessoire facilitant la reconnaissance de PrsS. La compréhension des événements moléculaires déclenchés par la reconnaissance PrsS-PrpS et conduisant à l'arrêt de croissance

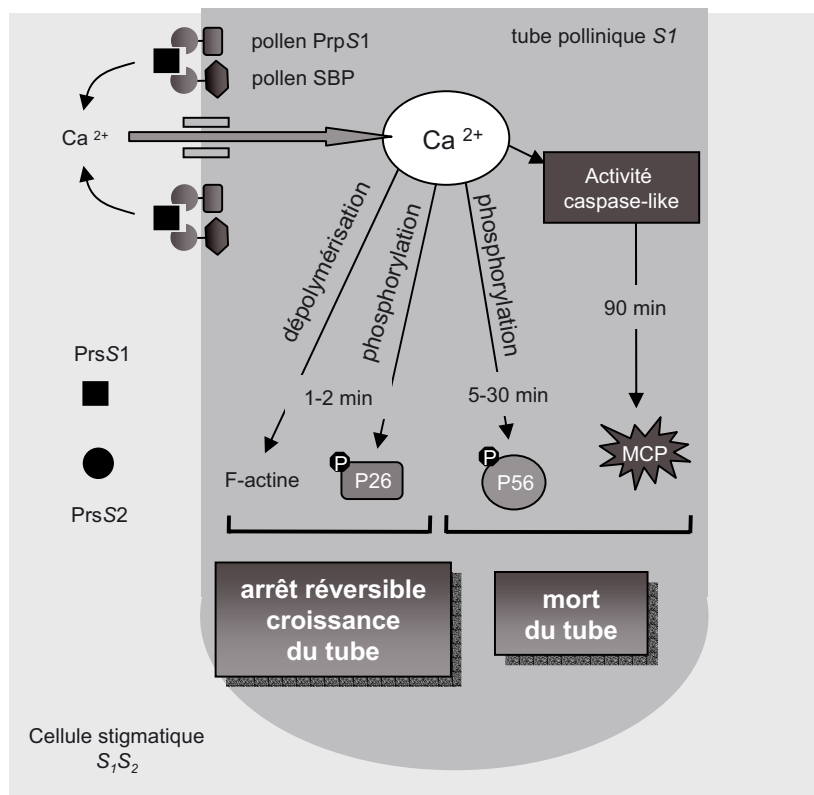


Fig. 2. Mort cellulaire programmée du tube pollinique chez les *Papaveracées*. L'interaction entre les deux partenaires de l'AI : PrsS (déterminant femelle) et PrpS (déterminant mâle) se fait à la surface du tube pollinique ; la protéine pollinique SBP faciliterait cette interaction. Le complexe PrsS-PrpS contrôlerait l'activité de canaux calciques produisant l'entrée massive de calcium. Le calcium agit comme un messager secondaire provoquant : (i) la dépolymérisation rapide de l'actine, (ii) la phosphorylation de protéines cibles : P26, une protéine cytoplasmique présentant des homologies avec une pyrophosphatase et P56, une MAP kinase putative et (iii) l'activation de marqueurs de la mort cellulaire programmée (MCP) comme des caspases.

du tube pollinique est bien plus avancée dans ce système que pour tous les autres mécanismes d'AI. Ceci est en grande partie dû au développement d'un bio-essai *in vitro* reconstituant la réponse d'AI. Dans cet essai, l'addition de protéines PrsS purifiées produit des changements moléculaires à l'intérieur du tube pollinique aboutissant à sa mort cellulaire et cet effet ne se produit que lorsque les deux partenaires expriment le même haplotype *S* (McClure & Franklin-Tong, 2006). L'un des premiers événements déclenché par l'addition de protéine PrsS est l'entrée de calcium dans une zone du tube pollinique située en amont de son extrémité (Franklin-Tong *et al.*, 2002). Cette réponse précoce suggère que la protéine PrpS pourrait fonctionner comme un régulateur de canaux calciques. Cet influx de calcium entraîne très rapidement (1 à 2 minutes) une dépolymérisation de l'actine ; cette déstabilisation du cytosquelette d'actine serait alors responsable de l'arrêt précoce de la croissance du tube pollinique. La dépolymérisation de l'actine est suivie d'une cascade de phosphorylations de protéines

cibles (P26, P56), puis de l'apparition d'événements décrits comme marqueurs de la mort cellulaire, notamment, le déclenchement d'activités de type caspase (Thomas & Franklin-Tong, 2004) et la fragmentation de l'ADN (Jordan *et al.*, 2000). Cette seconde phase de la réponse d'AI est irréversible et aboutit à la mort du tube pollinique (figure 2).

Dégradation des ARN polliniques par des S-RNases chez les Solanacées

Ce troisième type d'AI se manifeste en général plus tardivement, dans la partie supérieure du style. La croissance de tube pollinique incompatible est tout d'abord ralentie, puis sa membrane va se désagréger progressivement, l'épaisseur de la paroi cellulaire va se réduire et finalement l'extrémité du tube pollinique va gonfler et exploser (De Nettancourt, 2001). Ces événements cellulaires sont déclenchés par des glycoprotéines abondamment sécrétées par les cellules

du pistil depuis le stigmate jusqu'à l'ovaire, le long du trajet du tube pollinique (McClure *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1994). Ces glycoprotéines, hautement polymorphes, sont codées par le locus *S*; elles correspondent au déterminant femelle de l'AI. McClure *et al.* (1989) ont montré qu'elles possédaient une activité de dégradation des ARN, et elles ont alors été nommées S-RNases pour « *S-locus ribonucleases* ».

Le mécanisme responsable de la dégradation spécifique des ARN du tube pollinique incompatible n'est actuellement pas totalement élucidé. L'entrée des S-RNases dans le tube pollinique se fait indépendamment de l'haplotype *S*; la spécificité a donc lieu plus tardivement à l'intérieur du tube (Luu *et al.*, 2000). Un début de compréhension de cette spécificité d'action provient de la caractérisation de l'activité biochimique du partenaire mâle de l'AI, la protéine SLF (« *S-Locus F-box* »; Lai *et al.*, 2002) ou SFB (« *S-haplotype-specific F-box* ») selon les espèces (Ushijima *et al.*, 2003). SLF est une protéine cytoplasmique qui appartient à la famille des protéines *F-box* connues pour fonctionner dans un complexe E3-ubiquitine ligase. Ce complexe est impliqué dans l'ubiquitination et la dégradation de protéines *via* le protéasome. Des expériences de double hybride et de chromatographie d'affinité *in vitro* ont montré que la protéine SLF est capable de se lier aux S-RNases indépendamment de l'haplotype *S* (Qiao *et al.*, 2004).

Compte tenu de l'activité de SLF dans la dégradation de protéines et de son interaction avec les S-RNases, un premier modèle a été proposé. Dans ce modèle, nommé modèle de dégradation des S-RNases, la protéine SLF interagit avec toutes les S-RNases qui pénètrent dans le tube pollinique. Lorsque les partenaires SLF et S-RNases sont codés par un haplotype *S* différent, cette interaction produirait l'ubiquitination et donc la dégradation des S-RNases protégeant alors le tube pollinique de leur effet cytotoxique. À l'inverse, lorsque l'haplotype *S* est commun, les S-RNases ne seraient pas ubiquitinées; leur activité étant alors maintenue, elles provoqueraient la dégradation des ARN du tube pollinique incompatible aboutissant à sa mort cellulaire. À ce jour, il n'existe pas de données expérimentales permettant de comprendre comment une même protéine SLF pourrait provoquer ou non l'ubiquitination de S-RNases cibles en fonction de leur haplotype *S*. De plus, Sonneveld *et al.* (2005) ont montré que chez un mutant naturel du *Prunus*, une délétion du gène SLF ne produit pas le rejet du pollen compatible comme cela est prévu dans le scénario décrit ci-dessus. Ces auteurs proposent alors l'existence dans le tube pollinique d'un inhibiteur général de l'activité RNase. Lors d'une pollinisation incompatible, l'interaction des S-RNases avec la protéine SLF du même haplotype *S* provoquerait une levée de l'inhibition par l'inhibiteur général, favorisant ainsi l'ac-

tivité cytotoxique des S-RNases. Cette levée d'inhibition pourrait se faire par ubiquitination et dégradation de l'inhibiteur *via* SLF.

Malgré les améliorations apportées au modèle de dégradation des S-RNases par Sonneveld *et al.* (2005), des points faibles persistent. En effet, ce modèle ne tient pas compte du rôle de plusieurs protéines stylaires nécessaires à l'inhibition du tube pollinique incompatible. Parmi ces protéines, le facteur HT-B, riche en résidus asparagine. La suppression de l'expression du gène HT-B par des stratégies antisens, chez *Nicotiana* et *Solanum*, compromet le rejet de l'autopollen (McClure *et al.*, 1989; O'Brien *et al.*, 2002). De plus, l'accumulation de la protéine HT-B est plus faible dans un tube pollinique compatible que dans un tube incompatible, ce qui suggère que la déstabilisation de HT-B est associée avec la compatibilité (Goldraij *et al.*, 2006). Le modèle de dégradation des S-RNases ne tient pas non plus compte de la distribution cellulaire des S-RNases dans le tube pollinique rapportée par Goldraij *et al.* (2006). Ces auteurs ont montré qu'après leur entrée dans le tube pollinique, les S-RNases sont séquestrées dans des compartiments intracellulaires aussi bien dans le cas d'un croisement compatible qu'incompatible. Des expériences d'immunomarquage avec des marqueurs de compartiments ont permis de montrer que les S-RNases sont maintenues dans des compartiments vacuolaires. Cependant, 36 heures après la pollinisation, ces compartiments vacuolaires ne sont plus visibles dans le tube pollinique incompatible alors qu'ils sont toujours présents dans les tubes compatibles. Cette observation suggère que la séquestration des S-RNases lors de la pollinisation compatible protégerait les ARN du tube de leur effet cytotoxique. Il est intéressant de noter que la suppression de l'expression de HT-B (plantes antisens ou RNAi) empêche la désintégration de ces compartiments, maintenant ainsi les S-RNases séquestrées lors d'une pollinisation incompatible. Compte tenu de ces données expérimentales, Goldraij *et al.* (2006) ont proposé un modèle alternatif, le modèle de compartimentation comprenant trois étapes successives : (i) une entrée des S-RNases dans le tube pollinique indépendante de l'haplotype *S*; la protéine HT-B stylaire se trouve alors endocytée dans les mêmes compartiments que les S-RNases. (ii) une étape spécifique de l'haplotype *S* affectant la stabilité de la protéine HT-B et (iii) un relargage massif de S-RNases uniquement lors de la pollinisation incompatible. Dans ce modèle, l'étape spécifique de l'haplotype *S* repose sur une interaction des S-RNases avec le partenaire pollinique SLF. Cette interaction ayant lieu dans le cytoplasme, une partie des S-RNases doit pouvoir sortir du système endomembranaire. Les auteurs proposent que cette sortie puisse se faire *via* un transport rétrograde vers le réticulum endoplasmique. Lors

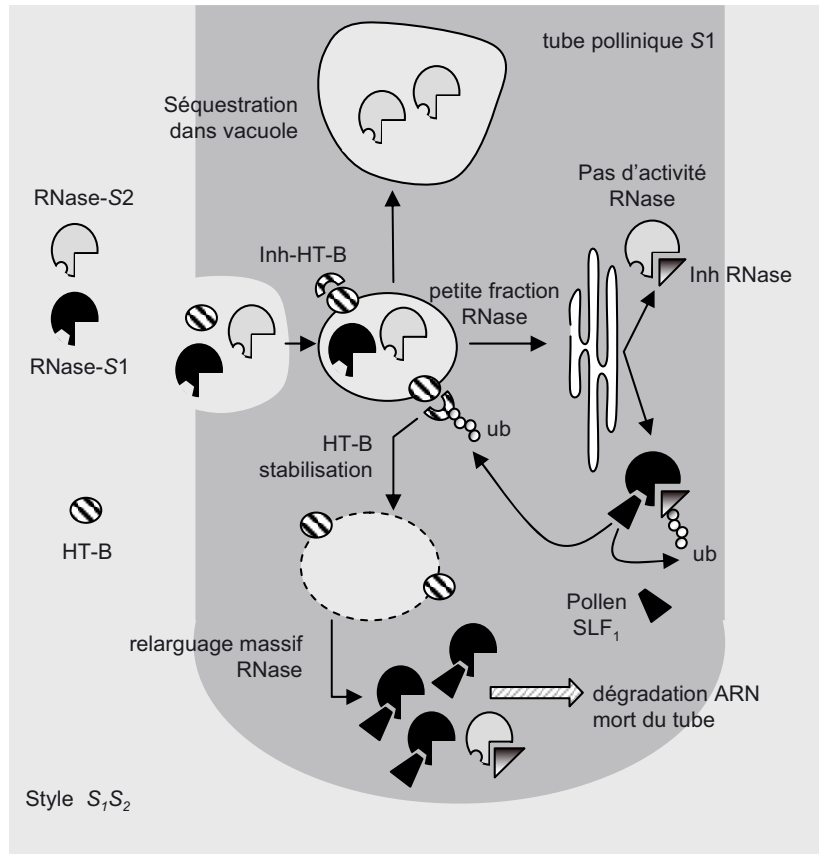


Fig. 3. Dégradation des ARN polliniques par des S-RNases chez les Solanacées. Quel que soit leur haplotype *S*, les S-RNases pénètrent dans le tube pollinique par endocytose. La protéine stylaire HT-B est endocytée de manière concomitante. Lors de la pollinisation compatible, les S-RNases sont séquestrées dans des compartiments vacuolaires. Une fraction est relarguée dans le cytoplasme, prise en charge par un inhibiteur général des S-RNases. Lors d'une pollinisation incompatible, l'interaction S-RNase-SLF a deux effets : (i) elle bloque l'activité de l'inhibiteur général et (ii) elle stabilise la protéine HT-B. Compte tenu de l'activité du facteur SLF, il est possible que ces deux actions soient réalisées par l'ubiquitination puis la dégradation de protéines : l'inhibiteur de S-RNases et un inhibiteur de HT-B. La stabilisation de HT-B produit la désintégration des compartiments vacuolaires, provoquant le relargage massif de S-RNases aboutissant à la mort du tube pollinique incompatible.

d'une pollinisation compatible, cette fraction ainsi relarguée dans le cytoplasme serait prise en charge par un inhibiteur général des S-RNases qui reste à identifier. À l'inverse, dans le tube incompatible, l'interaction des S-RNases avec la protéine SLF protégerait les S-RNases de cet inhibiteur général, maintenant ainsi leur activité. De plus, cette interaction stabiliserait la protéine HT-B provoquant la désintégration des compartiments vacuolaires, ce qui libère ainsi la majeure partie des S-RNases responsables de la dégradation des ARN polliniques et de la mort du tube incompatible (figure 3). Ce modèle paraît très attractif, mais de nombreux éléments sont encore hypothétiques et nécessitent des recherches futures. Parmi ces éléments, la description de la nature et du rôle de la protéine HT-B devrait permettre de consolider ce modèle de compartimentation.

Conclusion

De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années dans la caractérisation moléculaire des mécanismes contrôlant l'AI chez plusieurs espèces d'angiospermes. Depuis la découverte récente du déterminant mâle de l'AI chez les Papavaracées, tous les acteurs moléculaires responsables de la spécificité de reconnaissance de l'autopollen ont été caractérisés pour les trois types d'AI connus à ce jour. Il est alors intéressant d'observer qu'au cours de l'histoire évolutive des angiospermes, des stratégies de reconnaissance très diverses ont été retenues pour lutter contre l'autofécondation et favoriser le brassage génétique. De même, le décryptage de la cascade d'événements déclenchés par cette reconnaissance a permis de montrer que l'arrêt de la croissance du tube

pollinique est basé sur des stratégies biochimiques très variées. Cependant, malgré l'existence de modèles de travail pour les trois types d'AI décrits dans cette revue, il reste encore de nombreux points obscurs à élucider. Chez les Brassicacées, les premières étapes conduisant au rejet du grain de pollen sont relativement bien décrites, cependant nous ne disposons d'aucun élément permettant de comprendre comment la germination du grain de pollen proprement dite est bloquée. Chez les Papaveracées, alors que la cascade aboutissant à la mort cellulaire du tube pollinique est clairement décrite, le lien entre l'interaction des déterminants mâle et femelle et l'entrée de calcium dans le tube n'est pas connu. Enfin, chez les Solanacées, le rôle de la protéine HT-B et surtout comment l'interaction entre le déterminant mâle et les S-RNases, influence sa stabilité reste à établir. Quoi qu'il en soit, résoudre les puzzles que constituent les mécanismes d'AI aura forcément des implications importantes sur notre compréhension de la communication cellulaire chez les plantes et à plus grande échelle chez tous les eucaryotes.

Références

- Cabrillac D., Cock J.M., Dumas C., Gaude T., The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 2001, 410, 220-223.
- Chookajorn T., Kachroo A., Ripoll D.R., Clark A.G., Nasrallah J.B., Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 911-917.
- De Nettancourt D., Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants, 2nd edn, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- Dickinson H., Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*, *Sex Plant Reprod*, 1995, 8, 1-10.
- Foote H.C., Ride J.P., Franklin-Tong V.E., Walker E.A., Lawrence M.J., Franklin F.C., Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (*S*) gene from *Papaver rhæas* L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 2265-2269.
- Franklin-Tong N.E., Franklin F.C., Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci*, 2003, 8, 598-605.
- Franklin-Tong V.E., Holdaway-Clarke T.L., Straatman K.R., Kunkel J.G., Hepler P.K., Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhæas*. *Plant J*, 2002, 29, 333-345.
- Geldner N., Hyman D.L., Wang X., Schumacher K., Chory J., Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev*, 2007, 21, 1598-1602.
- Giranton J.L., Dumas C., Cock J.M., Gaude T., The integral membrane *S*-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97, 3759-3764.
- Goldraj A., Kondo K., Lee C.B., Hancock C.N., Sivaguru M., Vazquez-Santana S., Kim S., Phillips T.E., Cruz-Garcia F., McClure B., Compartmentalization of *S*-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 2006, 16, 805-810.
- Gu T., Mazzurco M., Sulaman W., Matias D.D., Goring, D.R., Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 382-387.
- Haffani Y.Z., Gaude T., Cock J.M., Goring D.R., Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol Biol*, 2004, 55, 619-630.
- Ivanov R., Gaude T., Endocytosis and endosomal regulation of the *S*-receptor kinase during the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*, 2009, 21, 2107-2117.
- Jaillais Y., Fobis-Loisy I., Miège C., Rollin C., Gaude T., AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature*, 2006, 7, 443, 106-109.
- Jordan N.D., Franklin F.C., Franklin-Tong V.E., Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhæas*. *Plant J*, 2000, 23, 471-579.
- Jordan N.D., Kakeda K., Conner A., Ride J.P., Franklin-Tong V.E., Franklin F.C., *S*-protein mutants indicate a functional role for SBP in the self-incompatibility reaction of *Papaver rhæas*. *Plant J*, 1999, 20, 119-125.
- Kachroo A., Schopfer C.R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B., Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, 2001, 293, 1824-1826.
- Kakita M., Murase K., Iwano M., Matsumoto T., Watanabe M., Shiba H., Isogai A., Takayama S., Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 2007, 19, 3961-3973.
- Kusaba M., Dwyer K., Hendershot J., Vrebalov J., Nasrallah J.B., Nasrallah M.E., Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the *S* locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell*, 2001, 13, 627-643.
- Lai Z., Ma W., Han B., Liang L., Zhang Y., Hong G., Xue, Y., An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol*, 2002, 50, 29-42.
- Liu P., Sherman-Broyles S., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B., A cryptic modifier causing transient self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2007, 8, 734-740.
- Luu D.T., Qin X., Morse D., Cappadocia M., *S*-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, 2000, 407, 649-651.
- McClure B.A., Franklin-Tong, V.E., Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta*, 2006, 224, 233-245.

- McClure B.A., Haring V., Ebert P.R., Anderson M.A., Simpson R.J., Sakiyama F., Clarke A.E., Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 1989, 342, 955-957.
- Murase K., Shiba H., Iwano M., Che F.S., Watanabe M., Isogai A., Takayama S., A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 2004, 303, 1516-1519.
- Murfett J., Atherton T.L., Mou B., Gasser C.S., McClure B.A., *S-RNase* expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes *S*-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 1994, 367, 563-566.
- Naithani S., Chookajorn T., Ripoll D.R., Nasrallah J.B., Structural modules for receptor dimerization in the *S*-locus receptor kinase extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 12211-12216.
- Nasrallah M.E., Liu P., Nasrallah J.B., Generation of self-incompatible *Arabidopsis thaliana* by transfer of two *S* locus genes from *A. lyrata*. *Science*, 2002, 297, 247-249.
- Nasrallah M.E., Liu P., Sherman-Broyles S., Boggs N.A., Nasrallah J.B. Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 16070-16074.
- O'Brien M., Kapfer C., Major G., Laurin M., Bertrand C., Kondo K., Kowiyama Y., Matton D.P., Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Plant J*, 2002, 32, 985-996.
- Qiao H., Wang H., Zhao L., Zhou J., Huang J., Zhang Y., Xue Y., The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with *S-RNases* that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 2004, 16, 582-595.
- Ruffio-Châble V., Gaude T., *S*-haplotype polymorphism in *Brassica oleracea*. *Acta Horti*, 2001, 546, 257-261.
- Sarker R.H., Elleman C.J., Dickinson H.G., Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85, 4340-4344.
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B., The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Science*, 1999, 286, 1697-1700.
- Sonneveld T., Tobutt K.R., Vaughan S.P., Robbins T.P., Loss of pollen-*S* function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an *S* haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell*, 2005, 17, 37-51.
- Stein J.C., Howlett B., Boyes D.C., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B., Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 8816-8820.
- Stone S.L., Anderson E.M., Mullen R.T., Goring D.R., ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 2003, 15, 885-898.
- Stone S.L., Arnoldo, M., Goring D.R., A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science*, 1999, 286, 1729-1731.
- Takasaki T., Hatakeyama K., Suzuki G., Watanabe M., Isogai A., Hinata, K., The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature*, 2000, 403, 913-916.
- Takayama S., Isogai A., Self-incompatibility in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 2005, 56, 467-489.
- Takayama S., Shiba H., Iwano M., Shimosato H., Che F.S., Kai N., Watanabe M., Suzuki G., Hinata K., Isogai A., The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, 97, 1920-1925.
- Takayama S., Shimosato H., Shiba H., Funato M., Che F.S., Watanabe M., Iwano M., Isogai A., Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 2001, 413, 534-538.
- Thomas S., Franklin-Tong V.E., Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*, 2004, 429, 305-309.
- Tichtinsky G., Vanoosthuysse V., Cock J.M., Gaude T., Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci*, 2003, 8, 231-237.
- Ushijima K., Sassa H., Dandekar A.M., Gradziel T.M., Tao R., Hirano H., Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell*, 2003, 15, 771-781.
- Vanoosthuysse V., Tichtinsky G., Dumas C., Gaude T., Cock J.M., Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea S* locus receptor kinase. *Plant Physiol*, 2003, 133, 919-929.
- Wheeler M.J., de Graaf B.H., Hadjosif N., Perry R.M., Poulter N.S., Osman K., Vatovec S., Harper A., Franklin F.C., Franklin-Tong V.E., Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature*, 2009, 18, 992-995.