Université d'Évry-Val d'Essonne
École Doctorale GAO :
Des Génomes Aux Organismes

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en sciences
De l'université d'Évry-Val d'Essonne
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

par
Imen MESTIRI
le 30 novembre 2010

Changements génétiques et épigénétiques en relation avec le comportement méiotique chez les allopolyploïdes de blé (genres *Aegilops* et *Triticum*)

JURY

Pr. Andrew Leitch	**Rapporteur**
Dr. Raphael Mercier	**Rapporteur**
Dr. François Roudier	**Examinateur**
Pr. Francis Quétier	**Président du jury**
Dr. Joseph Jahier	**Co-encadrant**
Dr. Boulos Chalhoub	**Directeur de thèse**

N° 2010 EVRY 033

Remerciements

La thèse, quelle aventure !!!
La mienne fut remplie de moments passionnants et éprouvants à la fois mais également de rencontres inoubliables et il faut le dire pas mal de travail. Bref, une expérience unique que je recommande à tous les amateurs de sensations fortes.

Ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans les nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Je vais donc profiter de ces quelques pages pour remercier tous ceux qui ont partagé cette aventure avec moi et qui m'ont aidé tout au long de ces années.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de lire et de juger cette thèse :
- Merci à Andrew Leitch et Raphaël Mercier d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs.
- Merci à Francis Quétier et François Roudier pour avoir accepté d'être examinateurs.
Vos nombreuses remarques et corrections ont largement contribué à améliorer ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Boulos Chalhoub, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour m'avoir tant appris au cours de ces années mais aussi pour ces multiples qualités humaines. Il a toujours été présent et m'a accompagné tout au long de ma thèse. Il m'a notamment beaucoup aidé pour la rédaction de mes articles, de ce manuscrit et de mes présentations tout préservant mon style et mes idées. Tu m'as un peu mené la vie dure, mais le résultat est là. Tu m'as formé et poussé à m'affirmer. Merci Boulos.

Je remercie également Joseph Jahier, mon co-encadrant de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à Rennes pendant plusieurs périodes au cours de ma thèse et pour la collaboration étroite qui a marqué l'ensemble de ce travail, et probablement mon avenir (la méiose en fera probablement partie). Merci pour ta disponibilité et pour toutes les discussions passionnantes que nous avons eu, qui m'ont beaucoup appris et donné envie d'apprendre.

J'ai énormément apprécié les séjours passés à Rennes, notamment grâce à la gentillesse (on est souvent accueillie par un café et des petites viennoiseries) et la disponibilité des autres membres de l'équipe, à commencer par Anne Marie Tanguy. Elle a pris le temps nécessaires pour me former en cytologie, ce qui n'a pas été facile vu que je n'y connaissais rien. Merci pour m'avoir tant appris, si je me suis découvert une passion pour cette discipline, c'est un peu grâce à toi.

Merci à Denise Deffains pour son aide et sa gentillesse et pour avoir accepté de partager son ordi, son microscope…

Un grand Merci, à Olivier Coriton et Virginie Huteau, la cyto TEAM pour m'avoir formé en hybridation *in situ*, pour avoir supporté avec patience mon envahissement : j'ai envahi la paillasse d'Olivier, monopolisé le microscope …

Merci à tous pour votre bonne humeur et vos encouragements.

Merci à Pascal et Christophe pour le soin apporté aux plantes et pour les nombreux Paris-Rennes en Kangoo.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de mon équipe et il y en a eut un certain nombre au fil des années :

Mathieu, plus qu'un collègue, un ami. Tu me charries souvent mais ton soutien moral et affectif m'est précieux. Merci pour tes encouragements permanents, et ton aide au moment de finaliser et d'imprimer ce manuscrit. Merci pour tous les moments de détente que j'ai passé avec toi et ta douce Odile dont l'amitié m'est très chère.

Belharry, tu m'as aidé et encouragé toutes ces années, tes idées et tes remarques m'ont toujours été très utiles. Tu m'as tendu l'oreille lorsque j'en avais besoin et toujours trouvé le moyen de me faire décompresser. Tu te lances également dans cette aventure qu'est la thèse et je te souhaite beaucoup de chance, de courage et de réussite.

Je remercie également Cécilou pour m'avoir prêté main forte à plusieurs moments de ma thèse et pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble… et aussi pour avoir supportée mes tentatives de vocalises pendant des journées entières !!!

JJ, merci pour tout. Comme l'a dit Mathieu, tu es l'une des personnes les plus « intéressantes » que j'ai eu la chance de rencontrer. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils précieux… on en a souvent abusé. Je n'oublierai jamais tous ces fous rires que tes aventures loufoques ont provoqués.

Merci à Gwen (et Ben) et Laurène (et Claude) pour leur amitié et les agréables moments qu'on a passé en dehors du boulot et continueront de passer ensemble. Merci à toutes les deux.

Merci à Nathalie notre maître de conférence préférée pour ses conseils très utiles et sa sympathie.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont donné un coup de main, notamment Lu et Houda lorsque la fin de thèse approchait à grand pas. Houda, ça ne fait pas très longtemps que tu es au labo mais je pense qu'on va bien s'entendre et qu'une nouvelle et solide amitié se dessine.

Merci aux anciens membres de l'équipe notamment Soazic et Aurélie que je n'oublierai jamais mais aussi Véro, Karim, Fabien, Christophe ; sans oublier les nouvelles recrues, Dom, Bella et Vin Ha qui m'ont soutenu lors des moments difficiles.

Merci à l'ensemble de l'URGV pour leur accueil et notamment ceux qui ont contribué à ma bonne humeur et mon moral au cours de ces années, notamment grâce aux crêpes party, happy hour …

Je remercie vivement Sam et Souha pour leur amitié et leur bonne humeur, je vous adore. Sousou, je te souhaite beaucoup te courage pour la fin de la thèse et j'espère pouvoir être là pour ta soutenance.

Merci également à Alois, Clément, Charlotte, Marco, Cyrille, Laure, Richard, Fred pour leur sympathie. Ronan, Alex, Samira et tous les autres fêtards du G1 pour tous les agréables moments qu'on a passé et merci à tous les fumeurs du G2, Vitor, Christophe, Coco, Lucila pour avoir égayé mes pauses café.

Je ne voudrais pas oublier ma petite Cléa. J'ai trouvé en toi une véritable amie, voir plus, tu es un peu comme ma petite sœur. Un grand merci à toi qui m'as toujours soutenu et réconfortée. Je te souhaite beaucoup de courage pour cette période en espérant que tu finiras ta propre aventure avec les félicitations du jury.

Merci à Nounou, Sana, Samia, Rim, Tatou, Loula, Mohamed et Imène pour leur amitié, pour m'avoir soutenu et comprise.

Un grand merci à Olivier et Juliette, que j'ai eu la chance de rencontrer à l'URGV et qui depuis sont devenu des amis. Merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, pour les discussions enflammées sur l'epigénétique et pour vos encouragements permanents. Merci d'avoir été là pour ma soutenance malgré toutes vos obligations, je ne l'oublierai jamais.

Merci à la famille Caillieux et la famille Sedouga pour m'avoir accueilli, soutenu et encouragé tout au long de ces années.

Un merci très spécial à mon petit Juanita. Tu as largement contribué à la réussite de cette thèse par ton questionnement, tes idées et ton aide lors la rédaction de la thèse. Merci pour avoir toujours été là, pour m'avoir remonté le moral quand j'en avais le plus le plus besoin, merci pour tout.

Pour finir, je remercie et dédie cette thèse à ma famille.

Tout d'abord mes parents, qui m'ont toujours soutenu et porté le plus haut possible. Merci de m'avoir donné un environnement idéal pendant mon enfance, de m'avoir appris à persévérer et à aller de l'avant. Je sais que ça n'a pas été facile pour vous de me voir partir. Vous avez partagé et supporté mes humeurs pendant toutes ces années sans cesser de m'encourager et de me réconforter. Merci d'avoir toujours accepté mes choix et de m'avoir toujours fait confiance, je vous en serai éternellement reconnaissante

Ichraf, ma sœurette chérie, merci pour toutes les fois où tu as supporté avec patience mon stress, ma mauvaise humeur et ma « tyrannie », je mérite bien mon surnom de « dictateur ». Merci pour ton soutien et ton amour, merci pour les fous rires et les moments partagés entre sœurs. Je serais toujours là pour toi, ne l'oublies jamais.

Taieb, mon frérot adoré, tu es et as toujours été mon rayon soleil. Tu étais encore petit quand je suis partie, et j'ai un peu loupé ton adolescence mais rare sont les jours où je n'ai pas pensé à toi. Maintenant tu as grandis et je ne peux être que fière du jeune homme que tu es devenu. Merci de m'avoir soutenu et encouragé, de m'avoir réconforté et de m'avoir fait rire tant de fois.

L'amour que je vous voue à tous les quatre est absolu… Merci infiniment pour vos encouragements, votre patience et votre amour.

Sommaire

Introduction générale 5

Section I Introduction bibliographique & contexte de la thèse 8

Synthèse bibliographique 9

I. La polyploïdie 9

I.1 Définitions 9

I.2 Voies de formations des polyploïdes 10

I.3 Prévalence et fréquence de la polyploïdie chez les eucaryotes 13

I.4 Changements génomiques chez les polyploïdes 14

I.4.1 Remaniements structuraux : dynamique et mécanismes 14

I.4.2 Changements épigénétiques 18

I.4.3 Reprogrammation de l'expression des gènes 20

II. L'aneuploïdie : effets sur la structure et l'expression des génomes 23

III. La méiose chez les espèces polyploïdes 25

III.1 La méiose et la recombinaison chez les espèces diploïdes 25

III.1.1 Généralités et mécanismes de base 25

III.1.2 Correspondance entre appariements, chiasmas et crossing-over 27

III.2 La méiose et la recombinaison chez les espèces allopolyploïdes 28

IV. Le blé, excellent modèle pour étudier la dynamique des génomes allopolyploïdes 32

IV.1 Espèce cultivée d'intérêt socio-économique majeur 32

IV.2 Evolution et Organisation des génomes du blé 33

IV.2.1 Allopolyploïdes de la tribu des *Triticeae* 33

IV.2.2 Evolution par évènements de polyploïdisations fréquents et récurrents 33

IV.2.3 Importance de la prolifération des éléments transposables dans les génomes du blé 35

IV.3 Comportement diploïde à la méiose 36

V. Contexte et objectifs de la thèse 37

Section II Résultats & Discussions 40

Chapitre I Caractérisation du comportement méiotique et des changements structuraux chez les allopolyploïdes de blé 41

I. Introduction et contexte 42

Chapitre I-A : Article 45

Chapitre I-B : Appariement homéologue, aneuploïdie et changements structuraux chez les allotétraploïdes synthétiques de blé (genres *Triticum* et *Aegilops*). 53

I. Introduction 54

II. Matériels et méthodes 56

II.1 Hybridation interspécifique, sauvetage d'embryons et doublement chromosomique .. 56

II.2 Méthodes d'analyses cytogénétiques 57

II.2.1 Dénombrement chromosomique par observation de mitoses somatiques 57

II.2.2 Comportement méiotique dans les CMP 57

II.2.3 Hybridation génomique in situ (GISH) 57

II.3 Méthodes d'analyses moléculaires 58

III. Résultats 59

III.1 Production d'allotétraploïdes synthétiques par hybridation interspécifique et doublement chromosomique 59

III.1.1 Hybridation interspécifique et sauvetage d'embryons 59

III.1.2 Doublement chromosomique 60

III.2 Etude de la méiose des hybrides interspécifiques 61

III.2.1 Appariements homéologues récurrents chez les hybrides interspécifiques haploïdes 61

III.2.2 Effets de la combinaison génomique sur la fréquence d'appariements homéologues 61

III.3 Etude de la méiose chez les allotétraploïdes synthétiques 62

III.3.1 Comportement méiotique des allotétraploïdes synthétiques en génération S0 62

III.3.2 Comportement méiotique des allotétraploïdes synthétiques des générations S3 à S5 63

III.4 L'aneuploïdie chez les allotétraploïdes synthétiques..... 64

III.5 Changements structuraux chez les allotétraploïdes synthétiques..... 64

III.5.1 Analyse moléculaire avec des marqueurs locus-spécifiques 64

III.5.1.1. Polymorphisme entre espèces parentales 65

III.5.1.2. Changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques 66

III.5.2 Analyse cytogénétique et identification de réarrangements chromosomiques..... 69

IV. Discussion 71

Chapitre II : Caractérisation des changements de l'état de méthylation de l'ADN chez les allohexaploïdes synthétiques de blé génétiquement stables 80

I. Introduction 81

II. Matériels et méthodes 86

II.1 Allohexaploïdes synthétiques..... 86

II.2 Principe de la méthode Methyl Sensitive Polymerase Chain Reaction (MSPCR): Analyse et interprétation des changements de méthylation 86

II.2.1 Sensibilité de HpaII et MspI à la méthylation des cytosines au site 5'-CCGG-3' 86

II.2.2 Extraction d'ADN, digestions enzymatiques et PCR semi quantitative 87

III. Résultats 89

III.1 Taux de méthylation des cytosines chez les espèces *T. turgidum* et *Ae. taushii* 89

III.2 Méthylation de l'ADN chez les allohexaploïdes synthétiques JOY36 et JOY54..... 90

III.2.1 Marqueurs monomorphes 91

III.2.2 Marqueurs polymorphes..... 93

III.2.3 Pertes et gains de la méthylation de l'ADN en réponse à l'allopolyploïdie 95

III.3 Variations intergénérationnelles de la méthylation..... 96

III.4 Effet de la variabilité du génome D 97

IV. Discussion 99

Section III Conclusions générales & perspectives 104

Références bibliographiques 113

Annexes 122

Annexe I : Liste des figures 123

Annexe II : Liste des tableaux 124

Annexe III : Article 125

Introduction générale

La polyploïdie (assortiment complet de plus de deux jeux de chromosomes dans un même noyau) a joué un rôle essentiel dans l'évolution des eucaryotes, notamment chez les angiospermes dont la majorité, si ce n'est tous, ont connu au moins un évènement de polyploïdisation au cours de leur évolution.

Ainsi, les programmes de séquençage de génomes complets ont permis de mettre en évidence le fait que les espèces considérées comme diploïdes tel que le riz, le maïs, la vigne ou arabidopsis sont en fait d'anciens polyploïdes ou paléopolyploïdes.

Les raisons de ce succès évolutif ne sont pas encore bien élucidées et font l'objet de nombreuses recherches depuis une dizaine d'années.

Les études menées à ce jour montrent que : (i) les espèces néo-polyploïdes doivent surmonter les biais d'appariement et de ségrégation chromosomique afin de s'établir comme nouvelles espèces ; (ii) le génome des espèces polyploïdes est très dynamique et subit, dès les premières générations de sa formation puis au cours de l'évolution, une cascade de changements génétiques, fonctionnels et épigénetiques générant de nouveaux phénotypes absents des espèces parentales. La nature et la fréquence de ces changements ainsi que leur 'timing' varient d'une espèce polyploïde à une autre.

La polyploïdie est particulièrement importante chez les espèces de blé (*Triticum* et *Aegilops*) qui constituent, en plus de leur importance économique, un excellent modèle pour étudier les effets de la polyploïdie et mieux cerner les mécanismes impliqués dans la stabilisation et le succès des espèces polyploïdes. En effet, en plus de l'existence de différents polyploïdes à l'état naturel et de la possibilité de néo-synthétiser des polyploïdes en laboratoire, ce système polyploïde est le seul pour lequel un locus à effet majeur, empêchant l'appariement entre chromosomes homéologues à la méiose, a pu être caractérisé. Ce locus, *Ph1 (Pairing homoeologous 1)* présent chez les blés tétraploïdes et hexaploïdes naturels assure un appariement homologue strict, dit comportement de diploïde à la méiose, essentiel à la stabilité de ces espèces allopolyploïdes.

En exploitant les spécificités et avantages qu'offre le modèle blé, mon travail de thèse a porté sur la caractérisation du comportement méiotique et des changements génétiques et épigénétiques (méthylation de l'ADN) pouvant accompagner la formation des blés allopolyploïdes, par hybridation interspécifique suivie de la duplication du génome.

Ainsi, ce travail permet d'évaluer les facteurs impliqués dans la stabilisation de ces blés néo-polyploïdes et plus largement, il contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes expliquant le succès évolutif de ces espèces allopolyploïdes.

Ce manuscrit de thèse se divise en trois principales sections.

La **première section** introduit mon projet de recherche en m'appuyant sur les données bibliographiques abordant la polyploïdie et ses conséquences sur le fonctionnement et la dynamique des génomes. Ceci est complémenté par la présentation de mon modèle d'étude, le blé, ainsi que de ma problématique de recherche.

La **seconde section** présente les résultats obtenus au cours de ma thèse et les discussions associées. Cette section comprend deux chapitres, chacun étant structuré en une introduction, une présentation des matériels et méthodes, des résultats et une discussion.

Le **chapitre I** explore les changements génétiques en lien avec l'appariement méiotique en comparant un large jeu d'allopolyploïdes synthétiques offrant notamment la possibilité d'analyser ; (i) l'effet de la nature de l'appariement (homologue ou homéologue) sur la stabilité chromosomique et génétique, ainsi que; (ii) l'effet de la variabilité des génomes parentaux sur la stabilité. Il intègre un **premier volet (chapitre I-A)** constitué d'un article publié dans la revue New Phytologist intitulé «*Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity*».

Un **deuxième volet (chapitre I-B)** rédigé en français s'intéresse à l'impact de l'appariement homéologue sur la dynamique des changements génétiques et chromosomiques chez les allotétraploïdes synthétiques du groupe blé (*Triticum* et *Aegilops*).

Le **chapitre II** décrit l'étendue des changements de l'état de méthylation de l'ADN chez des allohexaploïdes synthétiques de blé stables au niveau génétique.

La **troisième section** est consacrée à la conclusion générale et aux perspectives qu'offrent les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse.

Les références bibliographiques et les annexes sont présentées à la fin du manuscrit. Les annexes regroupent les listes des figures et des tableaux présentés dans ce manuscrit, ainsi que l'article intitulé «*Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids*» auquel j'ai contribué et sur lequel j'appuierai certains points abordés dans la discussion.

Section I
Introduction bibliographique & contexte de la thèse

Synthèse bibliographique

I. La polyploïdie

I.1 Définitions

Les organismes ayant un mode de reproduction sexué (diploïdes ou polyploïdes) passent, au cours de leur cycle de vie, par un état haploïde (mono- ou polyhaploïde) pendant lequel les cellules possèdent une seule copie du génome (1n ou nombre de chromosomes gamétique), ces cellules sont les gamètes. La fusion des gamètes mâles et femelles restaure le nombre de chromosomes somatiques (2n) en donnant un embryon possédant deux copies de chaque chromosome ou chromosomes homologues.

La polyploïdie se définit chez les eucaryotes comme l'assortiment complet de plus de deux jeux de chromosomes dans un même noyau (Grant, 1981). Ainsi une espèce diploïde possède deux jeux de chromosomes (2n=2x avec x : nombre de chromosomes dans un jeu) alors qu'une espèce polyploïde possède plus de deux jeux (triploïde: 2n=3x, tétraploïdes: 2n=4x, hexaploïdes: 2n=6x…).

Il existe également un type particulier de polyploidisation, l'endopolyploidie qui touche certains tissus. Le processus de duplication de l'ADN pendant l'endopolyploidie conduit à:

- la polyténie lorsque toutes les chromatides filles sont rattachées au même centromère sans modification du nombre de chromosomes.
- l'endomitose lorsque les chromosomes dupliqués sont indépendants et repartis dans l'ensemble du volume nucléaire.

Un organisme ou une cellule possédant un jeu complet de chromosomes sont dit euploïdes par opposition aux aneuploïdes qui présentent un jeu de chromosomes incomplet (perte d'un chromosome ou bras de chromosome) ou surnuméraire (gain d'un chromosome ou bras de chromosome). Les différentes formes d'aneuploidie et leurs effets seront discutés dans le paragraphe II et tout au long de cette thèse.

On distingue généralement les espèces autopolyploïdes et les espèces allopolyploïdes. Les autopolyploïdes possèdent des jeux de chromosomes provenant d'une même espèce parentale alors que les espèces allopolyploïdes dérivent d'un ou de plusieurs événements d'hybridation interspécifique, suivis ou précédés d'un doublement chromosomique (Stebbins, 1971).

Cette classification a souvent été sujette à controverse (revue dans Ramsey & Schemske, 1998, 2002) puisque les autopolyploïdes peuvent être issus de croisements entre génotypes divergents de la même espèce. En d'autres termes, plus la divergence entre les espèces progénitrices est faible, plus un allopolyploïde tend vers un autopolyploïde.

Les espèces allopolyploïdes réunissent dans leur noyau des génomes ayant divergé de leur ancêtre commun à la suite d'un évènement de spéciation. Ces génomes sont qualifiés d'homéologues.

L'allopolyploïdie est un des mécanismes de spéciation les plus répandus chez les plantes, et conduit à la formation de nouvelles lignées montrant des capacités adaptatives souvent supérieures à leurs parents diploïdes. Ces capacités, qui se traduisent dans la nature par une plus large expansion de ces espèces (dont certaines se montrent invasives), ont été largement exploitées par l'homme, qui a ainsi domestiqué un grand nombre d'espèces jouant aujourd'hui un rôle économique majeur comme le blé, le coton, ou le maïs (Ramsey & Schemske, 1998; Wendel & Doyle, 2005; Leitch & Leitch, 2008).

I.2 Voies de formation des polyploïdes

Plusieurs modes de formation des polyploïdes ont été décrits chez les plantes (Ramsey & Schemske, 1998). En effet, les espèces polyploïdes (auto- ou allopolyploïdes) peuvent être formées de manière directe ou indirecte (formation d'hybrides) et suivant deux voies de doublement du stock chromosomique, la voie somatique et la voie méiotique (formation puis fusion de gamètes non réduits) (voir Figure 1, 2 et 3).

Le doublement somatique se produit suite à une absence totale de division cellulaire lors de la mitose (alors que le jeu de chromosomes s'est répliqué) et peut aboutir à un organisme polyploïde lorqu'il a lieu soit dans le zygote ou le jeune embryon (post-zygotique), soit dans un tissu méristématique donnant naissance aux cellules germinales qui forment à leur tour les gamètes (pré-zygotique). La primevère *Primula kewensis* dérive ainsi d'un

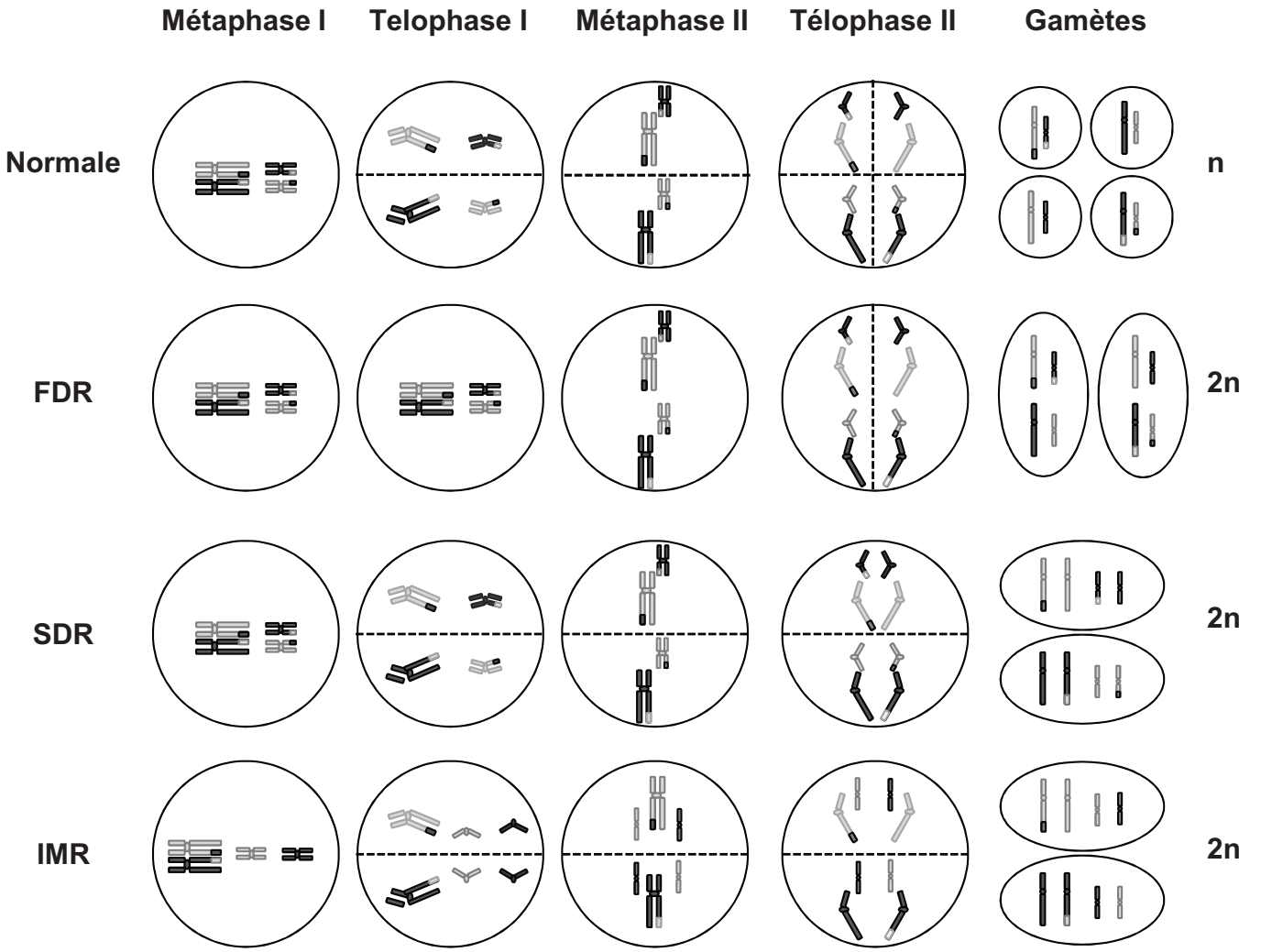

Figure 1 : Formation de gamètes non réduits (2n) de type FDR (First Division Restitution), SDR (Second Division Restitution) et IMR (Indeterminate Meiotic Restitution).

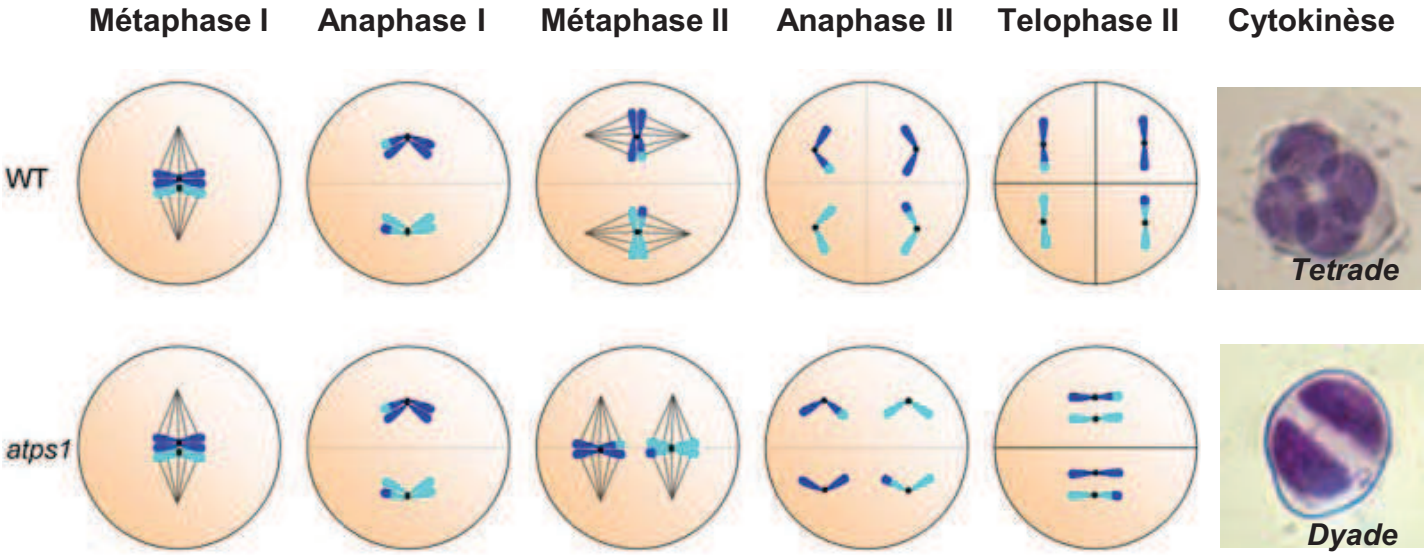

Figure 2 : Formation de gamètes non réduits (2n) suite à une orientation parallèle des fibres du fuseaux chez les mutants *atps1* (d'après Andreuzza & Siddiqi, 2008 ; d'Erfurth et *al.,* 2008).

doublement somatique affectant une tige de l'hybride diploïde stérile *Primula floribunda* x *Primula verticellata* (Newton & Pellew, 1929).

Bien que le doublement somatique soit couramment utilisé pour générer des polyploïdes synthétiques au laboratoire (doublement induit par un agent chimique tel que la colchicine ou le colcemide), il est admis que la plupart des polyploïdes ont été formés par la voie des gamètes non-réduits (Harlan & De wet, 1975; Bretagnolle &Thompson, 1995; Ramsey & Schemske, 1998).

Les gamètes non réduits (gamètes 2n ou diplogamètes) contiennent le même nombre de chromosomes que la plante dont ils sont issus et trouvent leur origines dans les anomalies méiotiques, notamment l'absence de première ou deuxième division méiotique et l'organisation anormale des fuseaux. Plusieurs types de gamètes non-réduits (mécanismes cytologiques et conséquences génétiques différentes) ont été décrits dans la littérature (Bretagnolle & Thompson, 1995; Ramsey & Schemske, 1998):

- Les gamètes issus de FDR (*First Division Restitution*), c'est-à-dire d'une absence de première division méiotique qui se traduit par la non disjonction des chromosomes homologues. Les gamètes formés suite à une FDR sont diploïdes et hétérozygotes aux évènements de recombinaison près (hétérozygotie au centromère et homozygotie au-delà du premier CO) (Figure 1). Ils contiennent 1 paire de chromatides homologues et donc l'intégralité de l'information génétique des parents (aux remaniements près). C'est ce type de gamètes non réduits qui a été observé chez les blés (Jauhar, 2007).
- Les gamètes issus de SDR (*Second Division Restitution*), c'est-à-dire d'absence de seconde division méiotique aboutissant à la non disjonction des chromatides sœurs (Figure 1). Dans ce cas, la méiose aboutit à la formation de gamètes homozygotes sauf entre le premier CO et le telomère où s'est hétérozygote et contenant une paire de chromatides sœurs appartenant à l'un des jeux d'origine.
- Les gamètes issus de IMR (*Indeterminate Meiotic Restitution*). Ce type de restitution méiotique implique la présence de chromosomes restés à l'état d'univalents (chromosomes non appariés en métaphase I) dont la ségrégation se fait simultanément mais différemment de celle des chromosomes sous forme de bivalents (Lim *et al.,* 2001; Figure1).

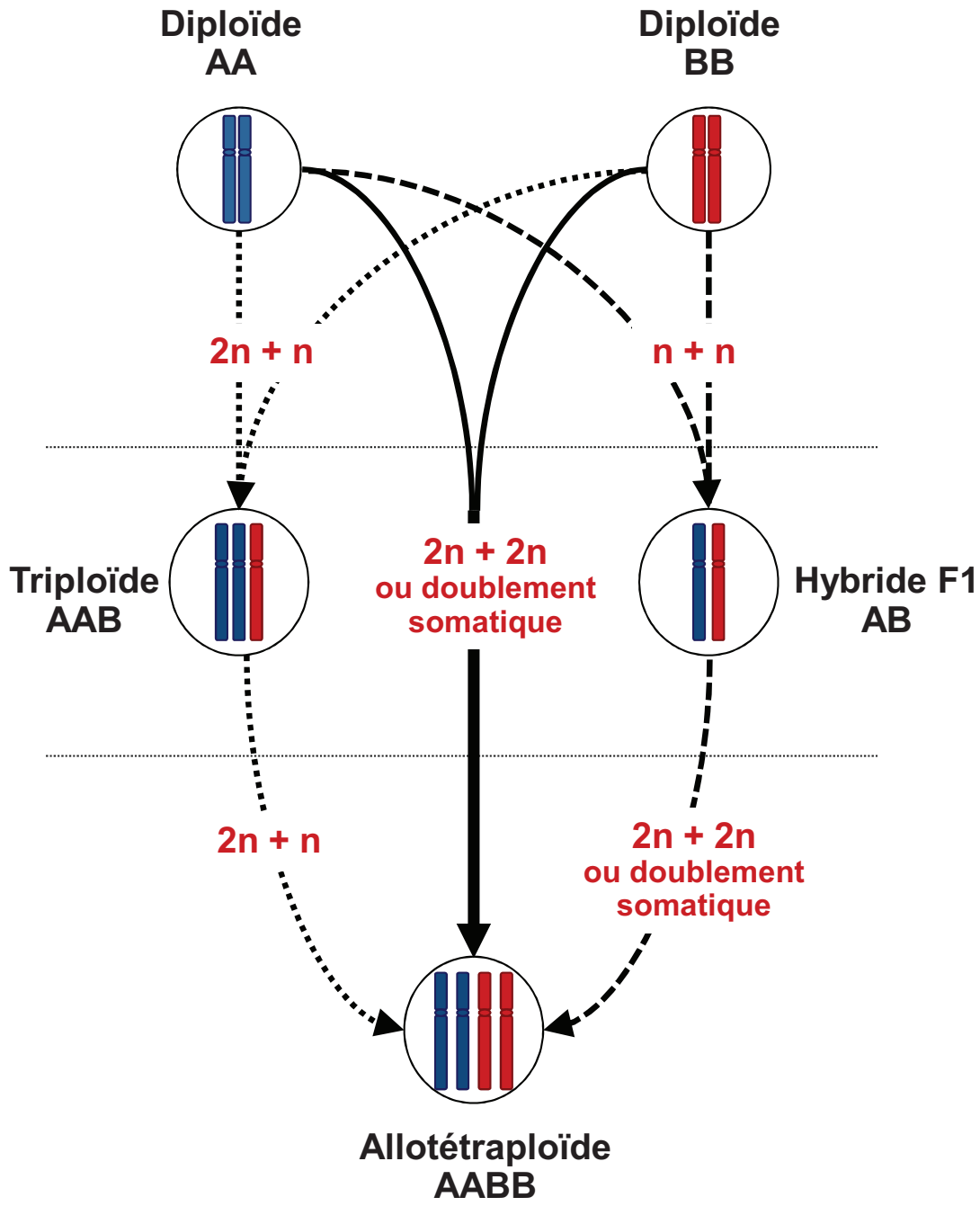

Figure 3 : Différentes voies de formation des allopolyploïdes : directe (flèches pleines) et indirecte (flèches en pointillés) (d'après Ramsy & Schemske, 2002 ; Hegarty & Hiscock, 2008).

- Les gamètes issus d'une absence totale de division (FDR suivie d'une SDR) et possédant donc les deux paires de chromosomes homologues à deux chromatides.

Les gamètes non réduits peuvent également être formés suite à une orientation anormale des fuseaux lors de la méiose. Ainsi, la formation de fuseaux parallèles lors de la métaphase II peut générer des gamètes non reduits de type FDR, comme il a été décrit pour les mutants *ps1* (*parallel spindle 1*) de pomme de terre (Fukuda, 1927 cité dans Andreuzza & Sidiqqui, 2008).

Très récemment, plusieurs gènes impliqués dans la formation des gamètes non réduits ont été isolés et caractérisés (d'Erfurth *et al.,* 2008, 2009, 2010; Erilova *et al.,* 2009; revue dans Brownfield & Kohler, 2010). Par exemple, une mutation dans le gène *AtPS1* (*Arabidopsis thaliana parallel spindle 1*), (se traduit par la formation de fuseaux en orientation parallèle en métaphase II au lieu de la configuration tétrahèdrale normale aboutissant à la formation de dyades à la place de tétrades (d'Erfurth *et al.,* 2008; Figure 2).

Ainsi, un allotétraploïde peut être formé (i) de manière directe suite à la fusion de deux gamètes non-réduits produits par les deux espèces parentales diploïdes ou suite à un doublement somatique ayant lieu dans le zygote (Figure 3); (ii) de manière indirecte après la fusion de deux gamètes non-réduits produits par l'hybride interspécifique (Figure 3) ou suite à la formation d'un hybride triploïde qui, par autofécondation ou rétrocroisement avec l'une des espèces parentales, peut former un allotétraploïde (Figure 3).

Les allohexaploïdes synthétiques étudiés au cours de ma thèse ont été obtenus suivant une voie indirecte, c'est-à-dire suite à la fusion de gamètes non réduits (Mestiri *et al.,* 2010).

Les travaux menés ces dernières années montrent que la plupart des espèces polyploïdes ont une origine multiple, l'événement de polyploïdisation s'étant produit de façon récurrente et indépendante au sein des populations (Soltis *et al.,* 2004). C'est notamment le cas des espèces polyploïdes du genre *Tragopogon* où*, T. mirus et T. miscellus* résulteraient respectivement de 9 et d'au moins 21 événements d'hybridation distincts (Soltis & Soltis, 1995). En revanche, les spartines semblent avoir une origine unique (Ainouche *et al.,* 2004). Le blé hexaploïde résulte d'un ou deux évènements d'allopolyploïdisation (Talbert, 1998).

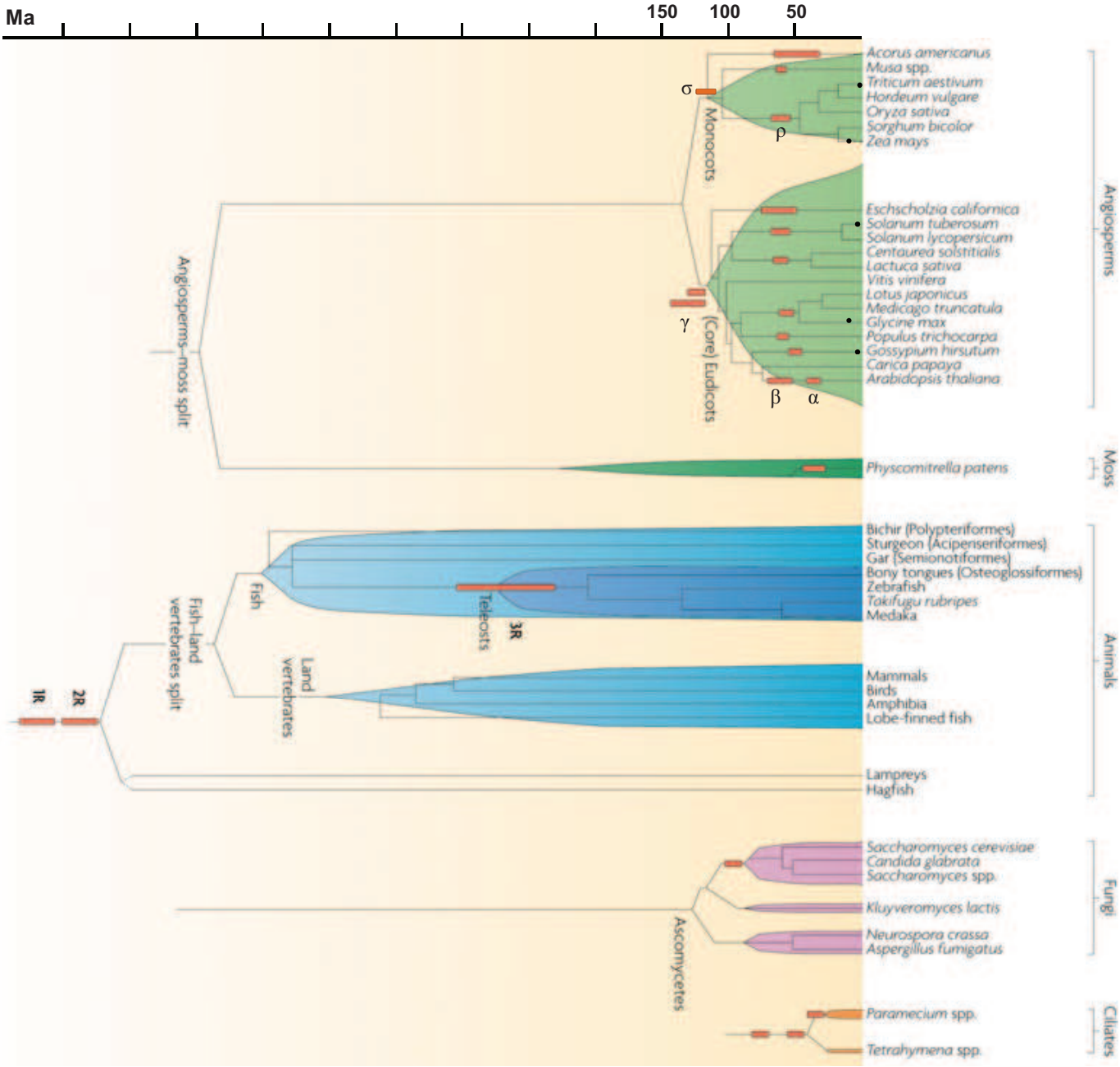

Figure 4 : Occurrence des évènements de duplication du génome au cours de l'évolution des eucaryotes (d'après Van de peer *et al.,* 2009ab ; Soltis & Soltis, 2009, Tang *et al.,* 2010).
Les barres horizontales indiquent les évènements de duplication anciens et les cercles noirs montrent des évènements de polyploïdisation récents.
α, β et γ indiquent les événements de duplication observés chez *Arabidopsis thaliana.*
ρ indique la duplication ancestrale commune à toutes les *Poaceaes*, il y a ~70 Ma.
σ indique la duplication ancestrale chez les monocotylédones peu après leur divergence des dicotylédones .

I.3 Prévalence et fréquence de la polyploïdie chez les eucaryotes

La polyploïdie a joué un rôle crucial dans l'évolution des eucaryotes, en particulier chez les angiospermes (Adams & Wendel, 2005; Soltis *et al.,* 2009; Van de peer *et al.,* 2009ab; Figure 4).

Les premières estimations de la fréquence des évènements de polyploïdisation, basées sur des analyses cytologiques classiques prenant en compte le nombre chromosomique de base, suggèrent que 30 à 70% des angiospermes sont polyploïdes (Muntzing, 1936; Darlington, 1937; Stebbins, 1950; Grant, 1981; Soltis *et al.,* 2009).

Masterson (1994) a par la suite utilisé la corrélation qui existe entre le volume des cellules de garde des stomates et la quantité d'ADN dans le noyau pour estimer que 70% des angiospermes ont subi au moins un évènement de duplication du génome.

Plus récemment, le séquençage de génomes complets et l'analyse des séquences EST (Expressed Sequence Tag) ont permis de montrer que la majorité des angiospermes ont connu un ou plusieurs cycles de duplication totale du génome (Blanc & Wolfe, 2004; Cui *et al.,* 2006; Jaillon *et al.,* 2007; Tang *et al.,* 2008). Ainsi, ces analyses ont montré que des espèces diploïdes comme le riz, le maïs ou arabidopsis sont en fait d'anciens polyploïdes ou paléopolyploïdes.

Par ailleurs, Otto & Whitton (2000) ont estimé que la polyploïdie est impliquée dans 2-4% des évènements de spéciation chez les angiospermes. De plus, les travaux de Soltis *et al.* (2009) suggèrent une forte corrélation entre la polyploïdie et le taux de diversification des espèces. Par exemple, l'évènement de polyploïdisation chez les *Poaceae* coïncide avec l'origine et la divergence du «core des *Poaceae*», un clade contenant plus 10000 espèces.

La polyploïdie semble être moins répandue chez les animaux que chez les végétaux. En effet, uniquement 2 à 3 évènements anciens ont eut lieu au cours des 500 à 600 millions d'années d'évolution des vertébrés et peu d'évènement récents ont été documentés alors que plusieurs évènements anciens ont eut lieu depuis la diversification des plantes à fleurs, il y a 150-200 millions d'années. De plus, plusieurs évènements récents ont été trouvés chez les angiospermes (Figure 4). Il existe néanmoins des centaines d'espèces polyploïdes parmi les insectes et les vertébrés, notamment chez les reptiles, les amphibiens et les poissons. Des évènements de duplication du génome ont également été documentés chez des organismes unicellulaires. En effet, la première duplication ancestrale a été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Wolfe & Shields, 1997). Plus récemment, il a été montré

que le protozoaire unicellulaire *Paramecium tetraurelia* a subi plusieurs évènements de polyploïdisation (Aury *et al.,* 2006).

La polyploïdie a joué un rôle essentiel dans l'évolution et la domestication des plantes. Ce processus a un fort impact sur la dynamique de la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes car il est accompagné d'importants changements génétiques et épigénétiques qui génèrent de nouveaux phénotypes absents des espèces parentales.

I.4 Changements génomiques chez les polyploïdes

Les études menées à ce jour montrent que le génome des espèces polyploïdes est très dynamique et subit, dès sa formation et au cours de l'évolution, une cascade de changements génétiques, épigénétiques et transcriptionnels. La nature, le moment et la fréquence de ces changements varie d'une espèce polyploïde à une autre.

Des descriptions exhaustives des changements génétiques, fonctionnels et épigénétiques qui ont eu lieu et des mécanismes s'y rapportant ont fait l'objet de revues récentes (Feldman & Levy, 2005; Chen & Ni, 2006; Chen, 2007; Doyle *et al.,* 2008; Hegarty & Hiscock, 2008; Leitch & Leitch, 2008; Soltis & Soltis, 2009). Je les décris dans ce chapitre en me focalisant principalement sur la régulation de l'appariement méiotique et les remaniements structuraux observés chez les espèces allopolyploïdes.

I.4.1 Remaniements structuraux : dynamique et mécanismes

Les données moléculaires suggèrent que les génomes polyploïdes subissent des changements dynamiques et fréquents de l'ADN en réponse au « choc génomique » que constituent l'hybridation (Mc Clintock, 1984) et la duplication du génome. Toutefois, des résultats contrastés ont été obtenus quant à la fréquence et au « timing » des remaniements structuraux induits par la polyploïdie (et l'hybridation interspécifique).

Song et *al.* (1995) ont été les premiers à mettre en évidence des changements majeurs dans l'organisation des génomes des allotétraploïdes synthétiques de *Brassica* et ont détecté (en utilisant des RFLP) des profils non additifs des fragments parentaux chez ces synthétiques. De même, d'importants remaniements structuraux ont été observés chez les

allopolyploïdes synthétiques (et naturels) de blé. Ainsi, il a été suggéré que l'allopolyploïdie chez le blé s'accompagne d'une élimination rapide et non aléatoire de séquences non codantes présentes en peu de copies (Feldman *et al.,* 1997; Liu *et al.,* 1998a ; Ozkan *et al.,* 2001). Ces séquences sont présentes chez tous les parents diploïdes alors qu'elles sont spécifiques d'un chromosome (CSS) ou d'un génome (GSS) chez les polyploïdes.

L'élimination de séquences chez les blés synthétiques concerne une large fraction du génome. Ainsi, 14% des loci *d'Aegilops sharonensis* sont éliminés chez les allotétraploïdes issus d'un croisement entre *Aegilops sharonensis* et *Aegilops umbellulata* (Shaked et *al.,* 2001). En utilisant l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), Han *et al.* (2005) ont mis en évidence une élimination rapide de 70 à 90% des copies d'une famille de séquences répétées chez différents polyploïdes synthétiques. Par ailleurs, Ozkan *et al.* (2003) ont mesuré par cytométrie de flux le contenu en ADN nucléaire de différents polyploïdes synthétiques et ont observé une perte d'ADN d'environ 2pg chez les néopolyploïdes (20 pg) par rapport à la somme de leur géniteurs diploïdes (22 pg).

Ainsi, alors qu'une large fraction du génome semble être perdue chez les allotétraploides synthétiques des genres *Triticum* et *Aegilops* (Feldman *et al.,* 1997; Liu *et al.,* 1998a; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked et *al.,* 2001), je n'ai pas observé ce type de changements génétiques chez les allohexaploïdes synthétiques analysés lors cette thèse (*voir résulats et discussions chapitre I*).

De même, peu de changements structuraux ont été observés chez les cotons synthétiques (Liu *et al.,* 2001) ainsi que chez les jeunes espèces polyploïdes telles que les spartines (Baumel *et al.,* 2002; Salmon *et al.,* 2005) et les Tragopogons (Buggs *et al.,* 2009).

Chez ces *Tragopogons*, des remaniements ont été observés dans les populations naturelles (Buggs *et al.,* 2009; Tate *et al.,* 2009) mais pas chez les polyploïdes synthétiques de première génération (Buggs *et al.,* 2009) ce qui suggère que les remaniements se sont produits au cours de l'évolution et non directement après l'évènement de polyploïdisation.

Il est important de signaler que plusieurs études ont montré que les changements structuraux se font de manière uniparentale. Ainsi, Ozkan *et al.* (2001) ont observé chez l'allopolyploïde synthétique *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata* que 14% des loci d'*Ae. sharonensis* sont éliminés contre seulement 0,5% des loci d'*Ae. umbellulata.*

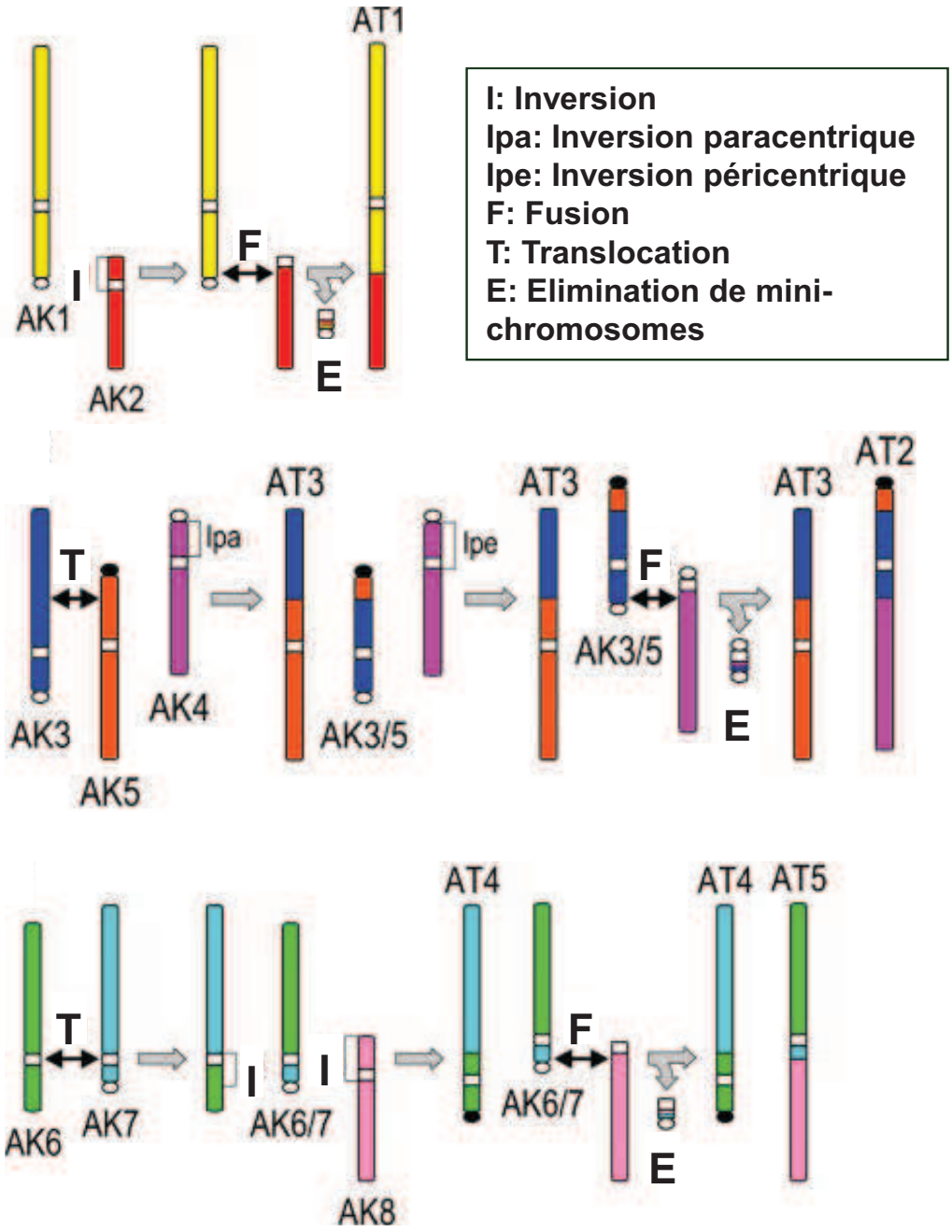

Figure 5 : Evolution du nombre de chromosomes au sein du genre Arabidopsis (d'après Lysack et *al.,* 2006).

Le nombre de chromosomes chez *Arabidopsis thaliana* (5 chromosomes : AT1 à AT5) a été réduit par rapport à *A. lyrata* (8 chromosomes : AK1 à AK8) par une succession de remaniements chromosomiques de type translocation, inversion, et élimination de minichromosomes.

Il en est de même pour le Triticale où la majorité des remaniements sont dus à une perte des fragments du génome du seigle (Ma *et al.,* 2004; Bento *et al.,* 2008).

Par ailleurs, Gaeta *et al.* (2007) ont détecté des remaniements génétiques sur presque tous les chromosomes de *Brassica napus* (36/38) et ont observé qu'ils n'ont pas lieu de manière aléatoire. En effet, la fréquence des changements génétiques n'est pas la même pour tous les chromosomes avec la plus haute fréquence observée sur le chromosome C1 (20.8%) alors que la fréquence des changements génétiques est de 7.9% pour le chromosome homéologue A1 (Gaeta *et al.,* 2007).

Les séquences remaniées peuvent être de natures différentes mais il semblerait que les séquences répétées soient souvent sujettes aux remaniements. Chez les blés allopolyploïdes, les remaniements concernent principalement des séquences non codantes (Feldman *et al.,* 1997 ; Liu *et al.,* 1998ab; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Han *et al.,* 2005; Khasdan *et al.,* 2010) même si une perte de gènes a également été mise en évidence (Kashkush *et al.,* 2002). Par exemple, les gènes codant les ARN ribosomiques sont souvent réarrangés et ce dans différentes espèces. Ainsi, Shcherban *et al.* (2008) ont documenté l'élimination rapide et uniparentale de ces loci chez les allopolyploïdes synthétiques issus du croisement *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata*. De même, une perte, gain et/ou réorganisation des NOR et des loci 5S a lieu dès les premières générations après la polyploïdisation chez l'allotétraploïde *Arabidopsis suecica.* Ceci entraine des remaniements chromosomiques, dont certains ressemblent à ceux identifiés chez les polyploïdes naturels (Pontes *et al.,* 2004). Lim *et al.* (2008) ont également observé des tailles et des profils d'expressions des gènes codant les ARN ribosomiques variables chez les allotétraploïdes naturels *Tragopogon mirus* et *Tragopogon miscellus*.

Différents types de remaniements structuraux se produisent et s'accumulent au fil du temps entrainant ainsi une évolution structurale des génomes polyploïdes.

Ainsi, des translocations inter-génomiques sont souvent mises en évidence chez les allopolyploïdes naturels de tabac (Leitch & Bennett, 1997), de colza (Udall *et al.,* 2005) et de blé (Badaeva *et al.,* 2007). Outre ces remaniements chromosomiques majeurs, des réarrangements affectant des loci particuliers ont été documentés chez les allopolyploïdes naturels de blé, par exemple au niveau du locus *Ph1* (Griffiths *et al.,* 2006; Al Kaff *et al.,* 2008) et du locus *Ha* (Chantret *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2008; Ragupathy & Cloutier, 2008).

Par ailleurs, l'accumulation de ces remaniements chromosomiques peut entraîner une restructuration importante du caryotype. Ainsi, afin de reconstituer l'évolution structurale

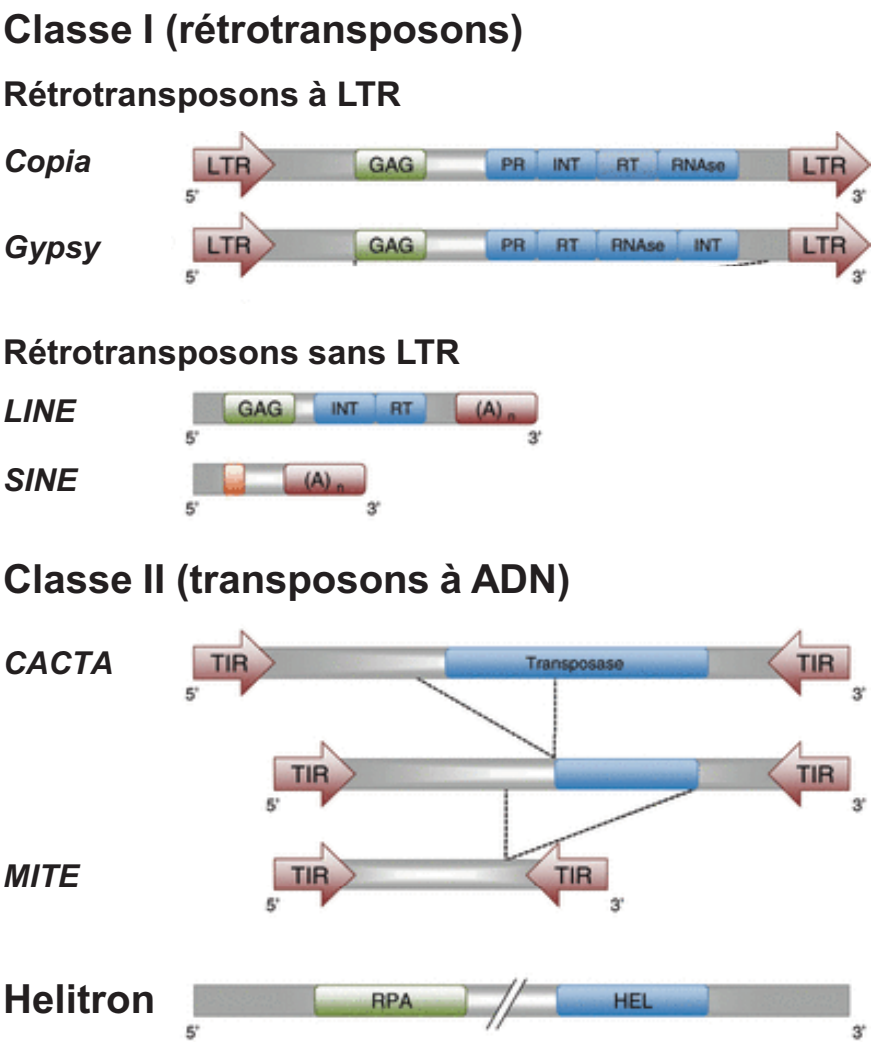

Figure 6 : Eléments transposables de classe I (rétroéléments) et de classe II (transposons à ADN) observés dans le génome des Triticées (modifié de Parisod et *al.,* 2009).
LTR: Long terminal repeats, TIR: terminal inverted repeats, LINE: Long interspersed nuclear elements, SINE: Short interspersed nuclear elements, MITE: Miniature inverted-repeat transposable elements, GAG: proteine capside, PR: protease, INT: intégrase, RT: reverse transcriptase, RNAse: ribonuclease H, RPA: réplicase A, HEL: hélicase.

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN répétées capables de se déplacer et de modifier leur nombre de copies au sein du génome. On distingue en général les éléments de **classe I (rétroéléments)** qui utilisent un intermédiaire ARN pour transposer et les éléments de **classe II** communément appelés transposons à ADN (Wicker *et al.,* 2007). Ces différents mécanismes de transpositions conditionnent la propagation de ces éléments dans le génome. Ainsi, suivant un mécanisme de **'copier-coller',** les éléments de classe I génèrent une nouvelle copie de l'élément à partir de la copie originale qui va s'insérer à une autre place dans le génome alors que pour les éléments de classe II, la copie originale est excisée puis réintégrée à un endroit différent du génome (mécanisme de **'couper-coller'**).

d'*Arabidopsis thaliana* à partir du génome ancêtre, Lysak *et al*. (2006) ont pu montrer que la réduction du nombre de chromosomes de 8 à 5 depuis la divergence avec *Arabidopsis lyrata*, il y a environ 5 millions d'années (Ma), résultait de la succession d'évènements de type inversion, translocation et fusion (Figure 5).

Ces modifications structurales, dont la fréquence et la nature est très variable selon les taxons, pourrait contribuer aux changements de l'expression des gènes observés chez les polyploïdes et que nous étudierons ci-dessous (paragraphe I.4.3).

Les mécanismes responsables des réarrangements structuraux

Plusieurs hypothèses quant aux mécanismes moléculaires susceptibles d'être à l'origine des remaniements structuraux observés ont été émises. Ces remaniements semblent être liés à l'occurrence de cassures doubles brins pouvant être dues à des évènements de recombinaisons et à des anomalies méiotiques mais aussi à des évènements de transpositions. Ainsi, les échanges intergénomiques (translocations réciproques ou non réciproques entre chromosomes homéologues) au cours de la méiose sont probablement à l'origine de la plupart des pertes de séquences observées chez les *Brassica* synthétiques (Osborn *et al.,* 2003a; Udall *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2007; Gaeta & Pires, 2010).

Les conversions géniques ou les crossing-overs inégaux sont les mécanismes les plus souvent invoqués pour expliquer l'évolution, parfois concertée (Wendel *et al.*, 1995; Belyayev *et al.*, 2000; Wendel, 2000) des séquences d'ADN répétées en tandem (comme les ADN ribosomaux).

Des anomalies méiotiques ont été détectées chez les allotétraploïdes d'*Arabidopsis* mais leur lien avec la recombinaison homéologue n'a pas été démontré (Comai *et al.,* 2003; Madlung *et al.,* 2005).

Les réarrangements peuvent également se produire par le biais des éléments transposables. La figure 6 décrit les différentes classes d'éléments transposables et leurs modes de transpositions. Ces éléments répétés, de part leur transposition et leur dispersion dans le génome, peuvent servir de matrice pour des recombinaisons ectopiques (Chantret *et al.,* 2005) générant ainsi des réarrangements chromosomiques.

Les importants remaniements structuraux observés chez le blé peuvent être dus à des évènements de transpositions. Toutefois, aucune explosion de ces évènements de

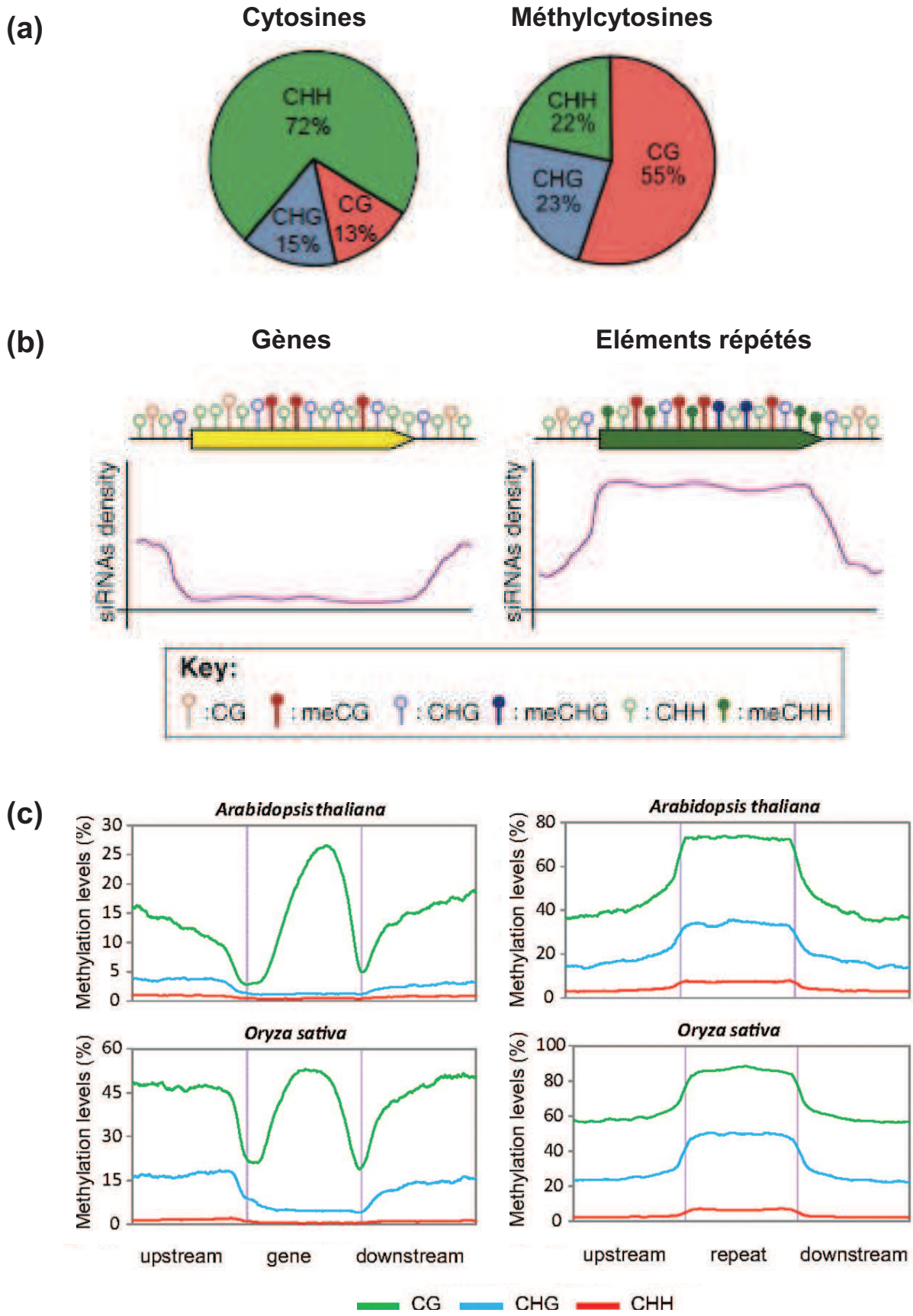

Figure 7 : Fréquence, distribution et conservation de la méthylation de l'ADN dans différents contextes de séquences.

(a) Fréquence des cytosines et des methylcytosines au niveau des CG, CHG et CHH (avec H : A, C ou T) chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Lister et *al.,* 2008).

(b) Méthylation de l'ADN au niveau des gènes et des éléments répétés (et lien avec la densité en siRNA (d'après Roudier et *al.,* 2009).

(c) Comparaison de la méthylation de l'ADN entre Arabidopsis et le riz (d'après Feng et *al.,* 2010).

transposition après la polyploïdisation n'a été mise en évidence chez ces allopolyploïdes. En revanche, les évènements de recombinaisons illégitimes sont à l'origine des remaniements observés chez les blés polyploïdes naturels comme pour le locus *Ha* (Chantret *et al.,* 2005; Charles *et al.,* 2009).

J'ai pu montrer au cours de cette thèse que l'appariement et la recombinaison homéologue peuvent être à l'origine de certains remaniements structuraux observés chez les allopolyploïdes de blé (*voir résultats chapitre 1*).

I.4.2 Changements épigénétiques

Conjointement ou indépendamment des remaniements génétiques, des changements épigénétiques, notamment de la méthylation de l'ADN ont été mis en évidence dans les différents modèles polyploïdes évoqués ci-dessus.

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la stabilisation du génome en (i) régulant l'expression des gènes, (ii) ciblant les séquences répétées et notamment les éléments transposables (ET), dont elle réprime l'activité, (iii) coordonnant et stabilisant (grâce à la méthylation des CG) la mémoire de l'information épigénétique afin que celle-ci soit transmise fidèlement au cours des générations (Mathieu *et al.,* 2007).

La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement méthyle en position 5 des cytosines. Chez les plantes, la méthylation de l'ADN concerne les cytosines en contexte CG, CHG et CHH (avec H : A, C ou T). Les études du méthylome d'*Arabidopsis thaliana* obtenu par séquençage bisulfite montrent un degré de la méthylation variable selon les contexte de séquence, avec les CG hautement méthylés (55%) et les CHG et CHH moyennement méthylés (Figure 7a; Lister *et al.,* 2008; Cokus *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2010).

Les trois contextes de méthylation (CG, CHG et CHH) sont présents au sein des séquences répétées et des éléments transposables avec un enrichissement en CHG et CHH méthylés. Les éléments répétés sont généralement méthylés dans tous les contextes de séquence et sur toute leur longueur (Figure 7b-c; Lister *et al.,* 2008; Cokus *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2010 ; Saze & Kakutani, 2010) et peuvent être ciblés par la machinerie des ARN interférents (Figure 7b, Slotkin *et al.,* 2009; Teixeira *et al.,* 2009).

En revanche, la méthylation du corps du gène concerne très majoritairement les CG (Figure 7b-c; Lister *et al.,* 2008; Cokus *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2010; Saze & Kakutani, 2010).

Le rôle de cette méthylation du corps du gène, observée dans différents eucaryotes reste cependant mal compris, elle semblerait être corrélée à une légère augmentation du niveau transcriptionnel (Teixeira & Colot, 2009; Saze & Kakutani, 2010).

Par ailleurs, cette distribution de la méthylation de l'ADN semble être conservée entre arabidopsis et le riz (Figure 7c; Feng *et al.,* 2010) ce qui suggère qu'un profil similaire de la méthylation de l'ADN pourrait être observé chez le blé.

La fonction la mieux caractérisée de la méthylation de l'ADN est le maintien des éléments transposables à l'état inactif. Chez le blé, dont le génome est composé à plus de 80% d'ET, ce mécanisme joue potentiellement un rôle majeur. Si c'est le cas, comment cette régulation est elle affectée par l'hybridation et la duplication du génome?

De nombreuses études montrent que l'hybridation et la polyploïdie s'accompagnent de changements de la méthylation de l'ADN. Ainsi, une altération de la méthylation des cytosines dans 13% des loci chez les hybrides interspécifiques comme chez les polyploïdes synthétiques et concernant aussi bien séquences répétées (tel que les ET) que les séquences présentes en peu de copies a été observée chez les allotétraploïdes synthétiques de blé (Shaked *et al.,* 2001).

Par ailleurs, même si les changements génétiques sont rares (mais ciblés) en génération S0 (S : selfed) chez des polyploïdes de *Brassicas*, Lukens *et al.* (2006) ont observé que les changements épigénétiques de type méthylation des cytosines se produisent à une fréquence beaucoup plus élevée et de manière non aléatoire. De même, d'importants changements non aléatoires de la méthylation de l'ADN on été observés chez les polyploïdes d'*Arabidopsis*, entraînant une reprogrammation de l'expression des gènes ainsi qu'une irrégularité phénotypique chez ces allotétraploïdes (Madlung *et al.,* 2002).

De nombreuses modifications épigénétiques ont également été détectées chez les spartines avec une grande proportion des séquences parentales différentiellement méthylées chez les formes allopolyploïdes (Salmon *et al.*, 2005; Parisod *et al.,* 2009).

Dans le chapitre 2 de ce manuscrit, je m'attacherai à la caractérisation des profils de methylation au niveau des gènes et des éléments transposables dans les premières générations des allohexaploides synthétiques de blé.

I.4.3 Reprogrammation de l'expression des gènes

La caractérisation de l'expression des gènes dans différents modèles allopolyploïdes indique que plusieurs gènes se comportent suivant un modèle additif, c'est-à-dire que l'expression des gènes chez les polyploïdes correspond à une combinaison des profils d'expression parentaux. D'autre part, une proportion de gènes, variable selon les polyploïdes, montre une déviation par rapport à ce modèle et de nouveaux profils d'expression (non additifs) sont alors observés. Ceci concerne ~5% des gènes chez les allotétraploïdes synthétiques d'*Arabidopsis* (Wang *et al.,* 2006), 1 à 6% chez le coton (Adams *et al.,* 2004, Rapp *et al.,* 2009) et ~5% chez *Senecio* (Hegarty *et al.,* 2005).

La reprogramation de l'expression des gènes chez les blés allohexaploïdes a été peu étudiée. He *et al.* (2003) on décrit, en utilisant la technique des cDNA-AFLP, que 7.7% des transcrits montrent un profil d'expression chez les allohexaploïdes synthétiques de blé différent de celui de leurs géniteurs.

En utilisant une puce Affymetrix GeneChip® blé (55,049 transcrits), Chagué *et al.* (2010) ont observé que l'expression de plus de 93% des transcrits est additive. L'expression de plus de 2000 gènes (~7%) se faisant de manière non additive chez ces allohexaploïdes synthétiques. Cette étude effectuée dans notre laboratoire et à laquelle j'ai contribué suggère que la reprogrammation de l'expression des gènes est rapidement établie lors de l'allopolyploïdie et hautement conservée à travers les générations, comme le montre la comparaison faite entre les allohexaploïdes synthétiques et naturels de blé (Chagué *et al.,* 2010).

Par ailleurs, tandis que chez les allopolyploïdes d'*Arabidopsis* une répression concernant les gènes surexprimés dans l'un des géniteurs par rapport à l'autre a été observée (Wang *et al.,* 2006). Chez le coton, il a été suggéré que l'un des génomes parentaux contribue plus à l'expression dans l'allopolyploïde que l'autre génome (Rapp *et al.,* 2009). En revanche, aucun phénomène de «tendance» d'expression envers un des génomes parentaux ou de dominance d'un des génomes parentaux n'a été observée chez le blé (Chagué *et al.,* 2010).

Mécanismes responsables de la reprogrammation de l'expression des gènes dans les polyploïdes

Les gènes dupliqués suite à un événement de polyploïdie peuvent avoir plusieurs « destins » (Lynch & Force, 2000; Adams *et al.,* 2004;Adams & Wendel, 2005a) :

L'élimination d'une copie ou altération de sa séquence aboutissant à une perte de fonction (pseudogénéisation). La redondance apportée par la polyploïdie entraine le relâchement de la pression de sélection sur une des deux copies, favorisant ainsi l'accumulation de mutations puis leur élimination.

D'autres mécanismes, autres que la délétion de gènes, peuvent affecter le devenir et l'expression des gènes dupliqués (Soltis *et al.,* 2004; Comai, 2005, Chen & Ni, 2006) :

- Acquisition d'une nouvelle fonction (néo-fonctionnalisation),
- Spécialisation des copies homéologues et expression différente selon les tissus ou le stade de développement (sous-fonctionnalisation),
- Maintien des gènes dupliqués au cours de l'évolution.

La rétention des gènes dupliqués peut contribuer à mettre en place de réseaux de régulation et d'interaction plus complexes et à créer un effet dosage.

La néo-fonctionnalisation et la sous-fonctionnalisation permettent aussi d'expliquer la rétention des gènes dupliqués (Adams *et al.,* 2004;Adams &Wendel, 2005a).

Bien que certains cas de néo-fonctionnalisation aient récemment été identifiés chez les cotons synthétiques par Chaudhary *et al.* (2009), il est plus vraisemblable que l'évolution de la fonction des gènes, et des réseaux de gènes participant à une même voie métabolique, soit un processus lent car elle nécessite la mutation et la co-évolution de nombreux gènes (Adams & Wendel, 2005a).

Très récemment, des travaux réalisés sur *Arabidopsis* suggèrent un rôle des gènes dupliqués par la polyploïdie pour moduler et diversifier les changements d'expression des gènes en réponse à des chocs environnementaux ou génomiques (tel que les évènements de polyploïdisation récurrents) (Ha *et al.,* 2009a). Les auteurs ont montré que la proportion des gènes dupliqués chez les géniteurs ayant une expression non additive chez les polyploïdes (naturel et synthétiques) est significativement plus élevée que celle des gènes présents en copie unique.

Les travaux réalisés par Shitsukawa *et al.* (2007), sur trois gènes homéologues à MADS Box de la classe E chez le blé hexaploïde, illustrent bien certains de ces mécanismes. En effet, alors que l'homéologue sur le génome A subit une altération structurale de sa

séquence (insertion d'une large séquence au niveau du domaine K) aboutissant à une non fonctionnalisation, la structure des deux autres homéologues (B et D) reste intacte. Toutefois, l'homéologue B est préférentiellement inactivé suite à la méthylation des cytosines. Ainsi, les auteurs ont montré que les trois homéologues sont régulés différemment par des mécanismes génétiques et épigénétiques.

En plus de ces changements génétiques et épigénétiques, d'autres mécanismes peuvent causer des variations de l'expression; notamment l'altération ou l'incompatibilité des « interactions régulatrices », l'effet dose, la partition et la compensation ainsi que la sous-fonctionnalisation (Comai *et al.,* 2000; Birchler *et al.,* 2003; Osborn *et al.,* 2003b; Riddle & Birchler, 2003; Adams *et al.,* 2005b; Hovav *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2009).

Il a également été démontré que l'activation transcriptionnelle des rétroéléments peut contribuer à modifier l'activité des gènes adjacents. Ainsi, l'activation transcriptionnelle du rétrotransposon à LTR Wis2-1A inséré en 3' UTR entraîne une transcription antisens du gène aboutissant à l'inactivation de son expression. Par contre, l'insertion du même élément Wis dans le bon sens de transcription en position 5' du gène (5'UTR) aboutit à l'activation de ce gène (Kashkush *et al.,* 2003). De même, Madlung *et al.* (2005) ont mis en évidence une activation transcriptionnelle de plusieurs ET mais leur transposition semble limitée**.** Cette activation est corrélée à une déméthylation des éléments qui étaient méthylés chez les espèces parentales.

D'autres mécanismes, comme les ARN interférents, pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes dupliqués et notamment dans l'inactivation réciproque des gènes homéologues et dans la sous-fonctionnalisation des copies homéologues (Chen & Ni, 2006).

Il a récemment été suggéré par Ha *et al.* (2009b) que les siRNA associés aux éléments répétés jouent un rôle dans le maintien d'une stabilité génomique et chromatinienne alors que les miRNA assurent la diversité de l'expression des gènes.

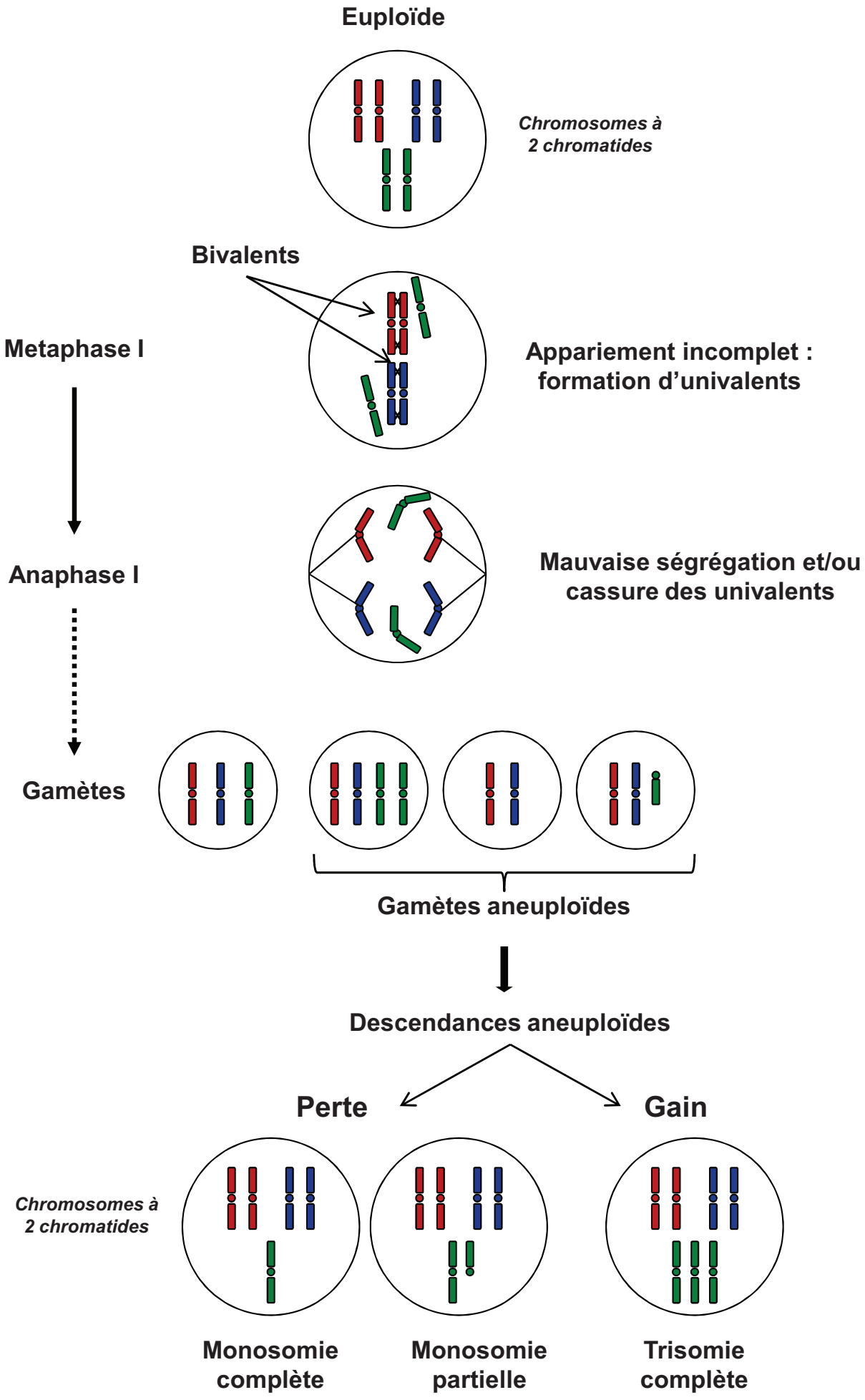

Figure 8 : Origine et types d'aneuploïdes.

II. L'aneuploïdie : effets sur la structure et l'expression des génomes

L'aneuploïdie consiste en la perte ou le gain d'un ou plusieurs chromosomes ou fragments de chromosomes (Figure 8). Plusieurs anomalies méiotiques peuvent être à l'origine de l'aneuploïdie (Figure 8), la non-disjonction des chromosomes et/ou chromatides pendant la méiose en étant la principale source.

L'aneuploïdie est peu tolérée chez les animaux. Chez l'homme, elle est souvent associée à des retards développementaux tels que la trisomie 21 et à certains cancers (Matzke *et al.,* 2003). L'aneuploïdie n'est cependant pas toujour délétère et peut être dans certains cas percistente. L'exemple le plus connu concerne les chromosomes B. Ces chromosomes surnuméraires ont été observés chez diverse espèces végétales et animales et semblent avoir leur propre « pathway évolutif » (revue dans Camacho *et al.,* 2000). Il exite d'autres cas d'aneuploïdie non délétère comme par exemple l'occurrence de tissus aneuploïdes dans le cervaux qui semblent jouer un rôle fonctionnel (Kingsbury *et al.,* 2005).

Les plantes semblent être plus tolérantes à l'aneuploïdie. Des individus aneuploïdes peuvent apparaître spontanément au sein des populations diploïdes (Khush, 1973). Les 12 lignées trisomiques possibles de *Datura stramonium* à l'origine de diverses variations phenotypiques consistituent un excellent exemple de tolérance et de variabilité phénotypique induite par l'aneuploidie. Ainsi, pour chacun des chromosomes trisomiques un phenotypes différent a été observé (Blakeslee, 1922). Chez les espèces polyploïdes plus ou moins récentes, la fréquence des individus aneuploïdes est nettement plus importante et varie d'une espèce à l'autre (revue dans Henry *et al.,* 2006). Ainsi, le pourcentage d'aneuploïdes dans les populations tétraploïdes atteint 50% pour le maïs alors qu'il est < 6% chez la luzerne. Par ailleurs, Henry *et al.,* (2006) ont montré que 25% de la descendance des tétraploïdes d'*A. thaliana* est aneuploïde (la majorité présentant un chromosome surnuméraire). Les aneuploïdes sont couramment rencontrés dans les populations naturelles de blés hexaploïdes (Riley & Kimber, 1961) et causent des problèmes d'homogénéité variétale retardant ou empêchant le processus d'inscription des variétés commerciales. De plus, la fréquence d'aneuploïdie est variable au sein des lignées et des variétés hexaploïdes (Storlie & Talbert, 1993; Worland & Law, 1985).

Cette bonne aptitude à tolérer l'aneuploïdie a été exploitée par Sears (1954) pour développer les lignées monosomiques, nulli-tétrasomiques, ditélosomiques et double

ditélosomiques issus du cultivar Chinese Spring et qui ont été depuis largement utilisées dans les études génétiques (Law & Worland, 1973). Plus récemment, Endo & Gill (1996) ont développé une série de lignées présentant des délétions de longueur variable pour chacun des 21 chromosomes (et ont permis de définir les BINs de délétions).

Peu de choses sont connues quant à l'origine et à la variabilité de l'aneuploïdie. Une partie du travail réalisé au cours de cette thèse aura permis de montrer l'origine de l'aneuploïdie chez les allohexaploïdes synthétiques de blé (Mestiri *et al.,* 2010 ; *voir partie résultats*).

Il a été suggéré que l'aneuploïdie a un impact plus important sur le phénotype que la polyploïdie (Birchler & Veitia, 2007). En effet, les processus cellulaires sont sensibles aux changements de la « balance de gènes » : le bon fonctionnement d'un complexe protéique, par exemple, nécessite une relation stœchiométrique entre les produits des différents gènes impliqués et l'altération de la « dose » de chacun ou d'un de ces gènes perturbe cet équilibre (Birchler & Veitia, 2007). L'aneuploïdie constitue une altération de cette « balance de gènes » à l'échelle chromosomique et a de ce fait un effet majeur sur la structure et l'expression des génomes, qui sont probablement à l'origine des modifications phénotypiques observées.

III. La méiose chez les espèces polyploïdes

La méiose est un événement central dans le cycle de vie des eucaryotes. Elle assure la transition d'une phase diploïde à une phase haploïde. Ainsi, une cellule diploïde (2n), contenant deux jeux de chromosomes homologues, l'un maternel, l'autre paternel, donne naissance à quatre cellules haploïdes (n), possédant un unique jeu de chromosomes (généralement recombinés) et qui se développe en gamètes (n). La fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle lors de la fécondation rétablira l'état diploïde.

La méiose diffère de la mitose par une étape de séparation des paires de chromosomes homologues, précédant la ségrégation des chromatides sœurs (Figure 9). En effet, les chromosomes homologues s'associent en bivalents puis ségrégent lors de la première division (méiose I, division réductionnelle), tandis que les chromatides sœurs se séparent seulement lors de la deuxième division (méiose II, division équationnelle) qui s'apparente elle à une mitose.

L'appariement et la recombinaison des chromosomes homologues constituent un préalable requis pour leur séparation correcte. Cette étape est compliquée chez les espèces polyploïdes du fait de la présence de plusieurs jeux de chromosomes apparentés (chromosomes homologues et homéologues) qui présentent suffisamment de similitudes pour s'apparier et recombiner (Moore, 2002 ; Cifuentes *et al.,* 2009).

Je développerai dans un premier temps les principales étapes et mécanismes de la méiose chez un organisme diploïde (en me limitant aux angiospermes et me basant principalement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*) puis je détaillerai le déroulement de la méiose chez les espèces allopolyploïdes ainsi que son rôle potentiel dans la stabilisation de ces espèces.

III.1 La méiose et la recombinaison chez les espèces diploïdes

III.1.1 Généralités et mécanismes de base

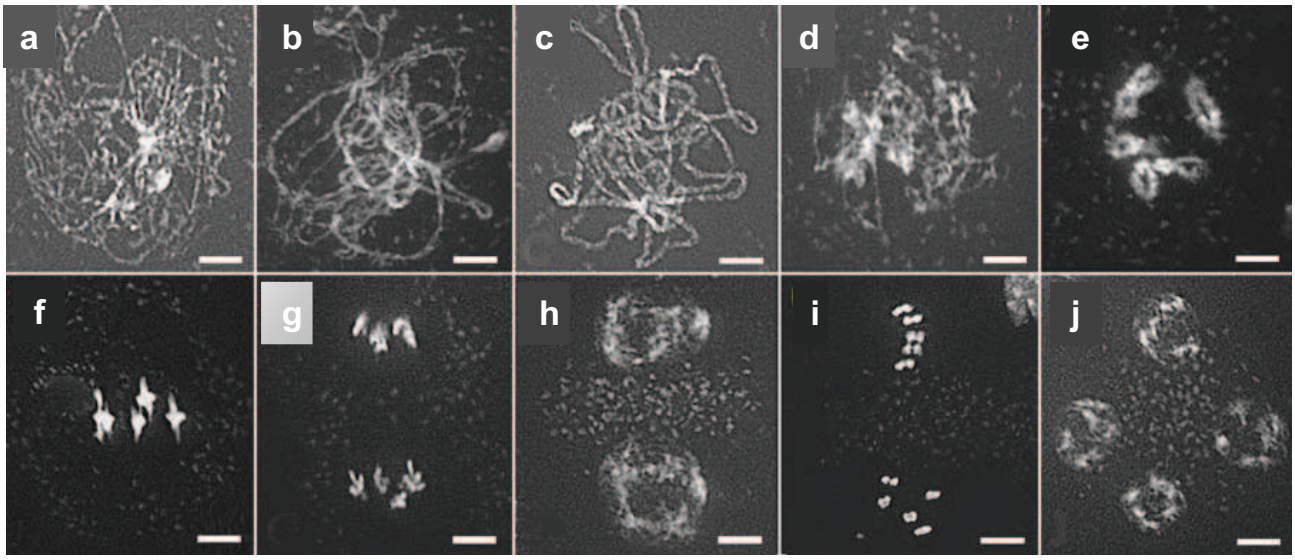

Figure 9 : Les stades de la méiose (méiocytes mâles) chez l'espèce diploïde *A. thaliana* (2*n*=2*x*=10) révélés par une coloration au DAPI (d'après Hamant et *al.,* 2006).
a-e : Prophase I,
a: Leptotène, b: Zygotène, les chromosomes commencent à se condenser, c: Pachytène, les chromosomes homologues sont appariés sur toute leur longueur, d: Diplotène, e: Diacinèse, les chromosomes homologues ne sont plus associés qu'au niveau des chiasmas.
f: Métaphase I, les cinq bivalents sont alignés sur la plaque métaphasique,
g: Anaphase I, séparation des chromosomes homologues,
h: fin Télophase I - début Prophase II,
i: Métaphase II, les chromosomes s'alignent en deux lots au niveau de la plaque métaphasique,
j: Télophase II, décondensation des chromosomes et formation de tétrades

Les chromosomes, répliqués au cours de la phase S pré-méiotique, subissent deux divisions cellulaires (méiose I et méiose II). Chaque division comprend quatre étapes successives : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 9).

La prophase I, étape la plus complexe de la méiose, se décompose chronologiquement en 5 sous- étapes : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diacinèse (revue par Kleckner, 2006; Haman *et al.,* 2006; Figure 9).

Au stade leptotène, les chromosomes se condensent et s'individualisent progressivement sous forme de filaments. Les tèlomères des chromosomes s'attachent à la membrane nucléaire et se regroupent chez les plupart des espèces sous la forme de « bouquet télomérique » (Martinez-Perez *et al.,* 1999 ; Harper *et al.,* 2004). En milieu de leptotène, les nodules précoses de recombinaison commencent à apparaîtres et marquent les sites où la recombinaison est initiée (Hunter et Kleckner, 2001). C'est à la fin de ce stade que l'alignement présynaptique des chromosomes homologues est observé: les chromosomes apparaissent alignés sans pour autant être appariés (Loidl, 1990).

Les homologues s'associent par paires en milieu de prophase, l'union la plus intime étant observéé au stade pachytène, où ils sont complètement appariés l'un à l'autre autour d'une structure protéique dense, le complexe synaptonémal (CS) qui s'étend sur toute la longueur de chaque paire de chromosomes homologues.

Le début de formation du CS marque la transition du stade leptotène au zygotène (revue par Kleckner, 2006). Le CS est initié à proximité des télomères ce qui suggère que la formation de « bouquet télomérique » est impliqué dans le processus de reconaissance des homologues (Martinez-Perez *et al.,* 1999 ; Harper *et al.,* 2004).

Le pachytène debute lorsque le CS s'étend sur toute la longeur de chaque paire de chromosomes. Les bivalents sont alors formés et se maintiennent jusqu'à la fin de la métaphase I. La recombinaison méiotique se produit simultanément et entraine la formation de crossing-over (CO), échanges physiques entre des chromatides homologues visualisables en cytologie sous forme de chiasmas. C'est l'association de ces CO et de la cohésion des chromatides sœurs qui assure le maintien des bivalents après la disparition du CS (dépolymérisation progressive du CS au stade diplotène).

Les bivalents commencent à migrer vers la plaque métaphasique au cours de la diacinèse et seront positionnés correctement en métaphase I. Les centromères des chromosomes homologues se placent alors de part et d'autre de la plaque métaphasique. La cohésion des chromatides sœurs sera relâchée (sauf au niveau des centromères) afin de permettre la ségrégation des homologues lors de l'anaphase I. La ségrégation correcte des

chromosomes homologues nécessite la formation de bivalents stables en métaphase I de la méiose, stabilité assurée principalement par la formation de CO mais également par la mise en place du CS et la cohésion des chromatides sœurs (Haman *et al.,* 2006).

Les chromosomes se décondensent en télophase I avant de se condenser à nouveau au cours de la prophase de la seconde division méiotique. En métaphase II, les centromères des chromosomes constitués de deux chromatides sœurs sont regroupés sur la plaque métaphasique. La cohésion centromérique des chromatides sœurs est alors perdue, leur permettant de ségréger à l'anaphase II. A la télophase II, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire est reformée.

A l'issue de la méiose, on aboutit dans le cas des plantes fleurs, à quatre cellules filles haploïdes:

- 4 mégaspores issues d'un méiocyte femelle (cellule mère de mégaspores) dont une seule des quatre mégaspores subit 3 mitoses successives pour donner le sac embryonnaire ou gamétophyte femelle.
- 4 microspores issues d'un méiocyte mâle (cellule mère de pollen), chaque microspore se différencie en gamétophyte mâle ou grain de pollen après une ou deux mitoses (selon les espèces).

III.1.2 Correspondance entre appariements, chiasmas et crossing-over

Lorsque la méiose se déroule en situation régulière, les bivalents observés en métaphase I de la méiose sont chiasmatiques, reflétant l'occurrence de CO et donc d'évènements de recombinaison (Jones, 1984). Par contre, chez les hybrides interspécifiques (où la méiose est irrégulière), on observe en métaphase I de méiose des associations non chiasmatiques entre chromosomes, dites secondaires de type « end-to-end » ou « side-by-side » (Orellana, 1985 ; Benavente *et al.,* 1996).

Chez les espèces où les chromosomes sont de grandes tailles, comme pour le blé, il possible de distinguer en cytologie les bivalents chiasmatiques des associations secondaires..

Chez certains allopolyploïdes, l'appariement peut se faire entre chromosomes homéologues mais aucune étude n'a montré que tous ces bivalents ou multivalents intergénomiques sont chiasmatiques.

Dans ma thèse, j'emploierai le terme appariement pour désigner l'association des chromosomes sous forme de bivalents (ou multivalents) en métaphase I de la méiose.

III.2 La méiose et la recombinaison chez les espèces allopolyploïdes

Comme on a pu le voir dans le paragraphe I.1, les espèces allopolyploïdes possèdent au moins deux jeux de chromosomes homéologues qui, du fait de leur origine commune, ont conservé suffisamment de similarité pour s'apparier et recombiner (comme en attestent les résultats obtenus au cours de cette thèse, *voir partie résultats*). Malgré ce contexte chromosomique complexe, certaines espèces polyploïdes ont stabilisé leur comportement méiotique pour obtenir un appariement strictement diploïde, c'est-à-dire une formation de bivalents exclusivement entre chromosomes homologues.

Cette diploïdisation du comportement méiotique est indispensable pour assurer la ségrégation correcte des chromosomes et par conséquent la stabilité du génome et la fertilité des plantes. En effet, si les chromosomes homéologues s'appariaient et recombinaient, de nombreuses irrégularités méiotiques seraient obtenues et aboutiraient entre autre à la production de gamètes aneuploïdes (Sanchez-Moran *et al.,* 2001) et/ou de gamètes remaniés, qui ne sont généralement pas viables, entrainant de l'aneuploïdie, une baisse de la fertilité et de la « fitness » (Ramsey & Schemske, 2002).

La stabilisation du comportement méiotique est assurée par une combinaison de plusieurs mécanismes, notamment :

- la différenciation des chromosomes homéologues au travers des divergences de structures et de séquences.
- la mise en place de facteurs génétiques limitant l'appariement et la recombinaison homéologue.

Il a été suggéré, chez les blés polyploïdes, que la divergence des chromosomes homéologues par des réarrangements structuraux rapides serait un mécanisme permettant de réduire les possibilités d'appariement entre ces chromosomes homéologues (Levy & Feldman, 2004; Feldman & Levy, 2005, 2009). Cependant, les travaux réalisés au laboratoire montrent que la différentiation entre les génomes A, B et D du blé (prolifération différentielle des éléments transposables) a eu lieu avant la polyploïdisation (Charles *et al.,* 2008). De plus, Comai *et al.* (2003) ont montré que l'appariement se faisait principalement entre chromosomes homologues et ce dès les premières générations chez les polyploïdes synthétiques d'*arabidopsis* sans pour autant observer une réorganisation structurale des homéologues suggérant ainsi un contrôle génétique de l'appariement.

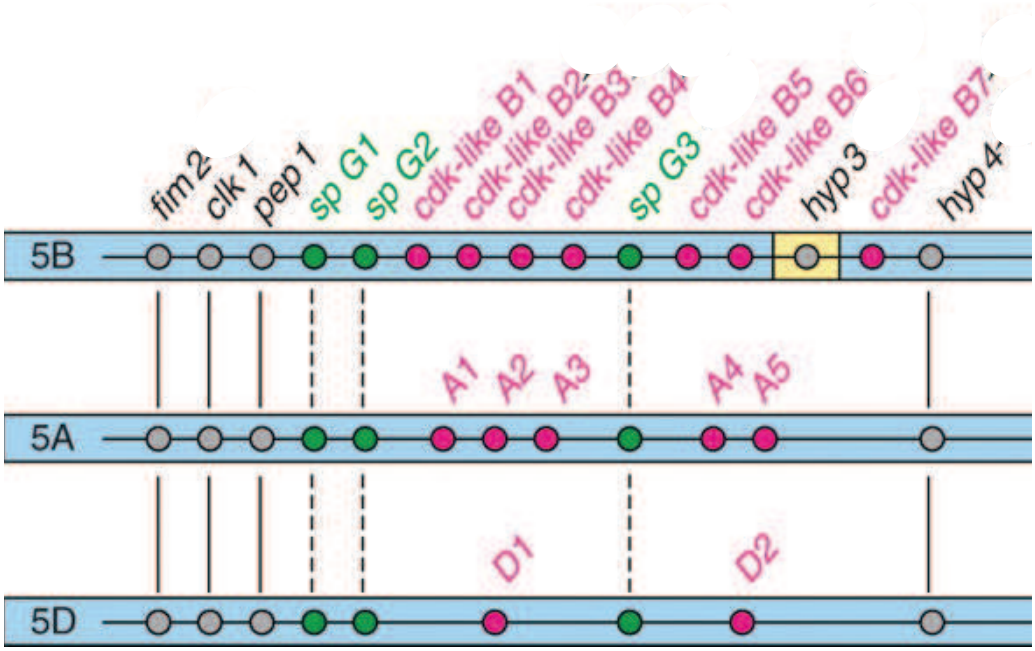

Figure 10 : Représentation schématique de la structure du locus *Ph1* chez le blé (d'après Al-Kaff et *al.,* 2008 ; Griffith et *al.,* 2006).
Les barres bleues représentent la région du chromosome 5B portant le locus *Ph1* ainsi que les régions homéologues sur les chromosomes 5A et 5B ; le carré jaune représente l'insertion du segment d'hétérochromatine correspondant pour une partie à celui trouvé dans la région subtélomérique du chromosome 3A.
Les cercles roses représentent les gènes types *cdk* dont le nombre varie entre les trois régions homéologues.
Les cercles gris et verts représentent des gènes conservés dans les trois régions homéologues.

En effet, des gènes contrôlant l'appariement et la recombinaison homéologue ont été identifiés dans de nombreuses espèces polyploïdes naturelles telles que le blé, le colza, le coton, l'avoine ou encore la fétuque (revue dans Jenczewski & Alix, 2004). Toutefois, ces systèmes n'ont pas tous fait l'objet d'études détaillées, à l'exception de *PrBn* chez le colza (Jenczewski *et al.,* 2003; Nicolas *et al.,* 2009; Cifuentes *et al.,* 2009) et surtout de *Ph1* chez le blé, le seul système à effet majeur a avoir été caractérisé (Griffiths *et al.,* 2006; Al Kaff *et al.,* 2008).

Le locus Ph1 du blé: description et modes d'actions

Plusieurs loci susceptibles de contrôler l'appariement ont été documentés chez le blé (Sears, 1976). En particulier, l'absence totale d'appariement entre chromosomes homéologues en métaphase I de la méiose chez les blés polyploïdes (comportement méiotique diploïde) est sous le contrôle d'un locus majeur dominant, le locus *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*). Ce locus est localisé sur le bras long du chromosome 5B (Riley & Chapman, 1958).

Après un demi siècle d'investigation, la région de 2,5 Mb contenant le locus *Ph1* a été séquencée et caractérisée par l'équipe de G. Moore (Griffiths *et al.,* 2006; Al Kaff *et al.,* 2008). Ces travaux ont montré que le locus *Ph1* correspond à un cluster de gènes type *cdk* (*cyclin dependend kinase*). L'étude comparée de l'organisation de ce locus entre les différents génomes et espèces du blé montre qu'il est interrompu par un segment d'hétérochromatine le distinguant ainsi de ses loci homéologues sur les chromosomes 5A et 5D (Figure 10). Ces loci diffèrents également par le nombre de copies type *cdk* présent : 7, 5 et 2 pour le 5B, 5A et 5D respectivement (Figure 10).

Aucune espèce diploïde ne possède l'organisation du locus *Ph1* des blés allopolyploïdes (*Triticum aestivum* et *T. turgidum*) alors qu'elle est présente chez *T. timophevii* (2*n*=4*x*=28, AAGG), un autre allotétraploïde naturel de blé (Griffiths *et al.,* 2006). Ceci suggère que cet allèle *Ph1* spécifique des polyploïdes a évolué de façon concomitante à la polyploïdisation et qu'il a été maintenu, par flux de gènes, dans différents polyploïdes naturels de blé (Griffiths *et al.,* 2006).

Par ailleurs, Al Kaff *et al.* (2008) ont montré que ces gènes type *cdk* sont proches de *Cdk2* de l'homme, un homologue fonctionnel d'Ime2 (*Inducer of meiosis 2*) de la levure. Il a été montré que ces kinases (Cdk2/Ime2) affectent des processus durant la réplication et la

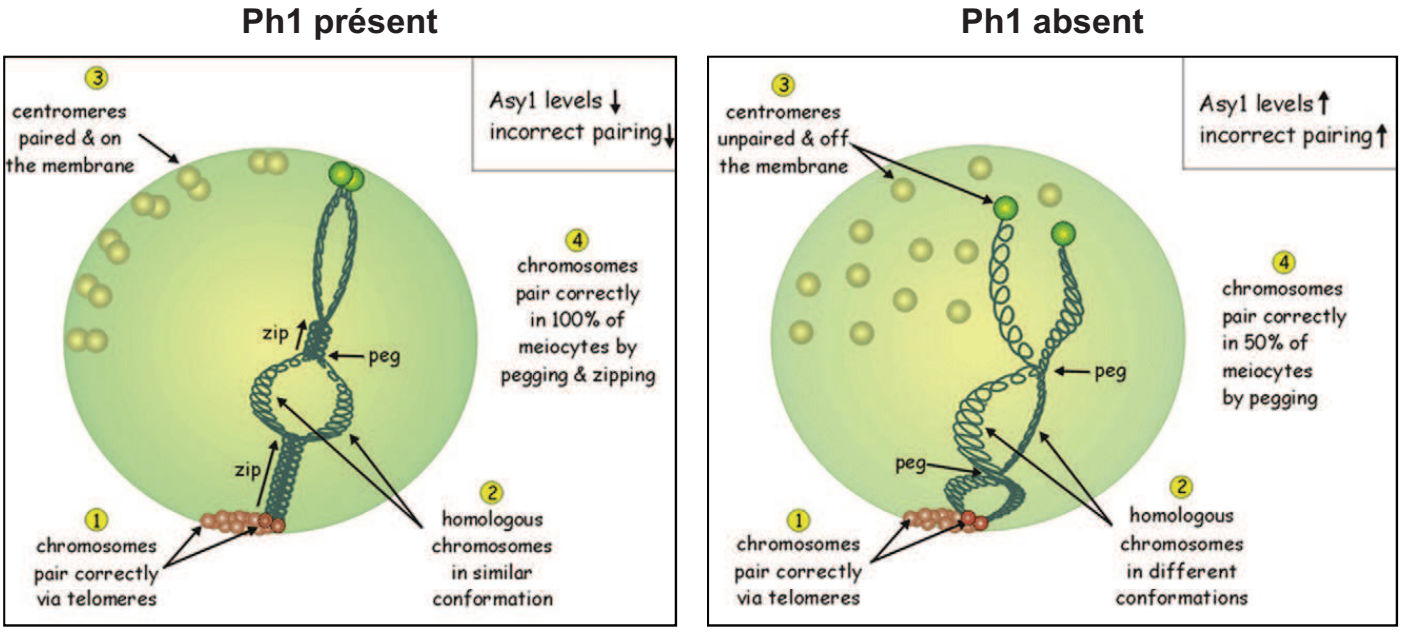

Figure 11 : Modèle proposé pour le mode d'action du locus *Ph1* (d'après Moore & Shaw, 2009).

formation des cassures double brins ainsi que lors de la synapse (Wan *et al.,* 2008; Szwarcwort-Cohen *et al.,* 2009).

Le clonage et la caractérisation moléculaire du locus *Ph1* n'a pas permis d'en élucider le mode d'action. L'hypothèse émise par l'équipe de G. Moore stipule que les gènes type *Cdk* du blé agissent suivant un mécanisme similaire à celui des gènes *Cdk2* et *Ime2* (Moore & Shaw, 2009).

A ce jour, il a été démontré que le locus *Ph1* agit sur plusieurs processus méiotiques :
- l'alignement pré-méiotique des chromosomes (Feldman, 1993; Martinez-Perez *et al.,* 2001)
- l'organisation de la chromatine (Prieto *et al.,* 2005; Colas *et al.,* 2008)
- la synapse (Holm & Wang, 1988)
- la recombinaison (Luo *et al.,* 1996).

Chez les espèces polyploïdes, les centromères sont associés au cours de la phase pré-méiotique, ce qui n'est pas le cas des espèces diploïdes. Cette association pré-méiotique des centromères chez les blés polyploïdes regroupe généralement des chromosomes non homologues (Martinez-Perez *et al.,* 1999) et est indépendante de la présence de *Ph1* (Corredor *et al.,* 2007). Par contre, il semblerait que *Ph1* agisse sur la correction des appariements des centromères non homologues au début de la méiose, associations qui sont converties en paires de centromères homologues, vraisemblablement lorsque se forment les sept clusters de centromères (Martinez-Perez *et al.,* 2001; Moore, 2002).

La formation de bouquets de télomères semble être indépendante de la présence de *Ph1* puisque l'association des télomères au début de la méiose (stade leptotène) est observée aussi bien chez les mutants *Ph1* que chez les polyploïdes naturels (Figure 11), suggérant ainsi que ces régions trouvent correctement leurs homologues indépendamment de *Ph1* (Moore, 2002; Colas *et al.,* 2008). Toutefois, même si les chromosomes homologues sont associés au niveau de leurs télomères en l'absence de *Ph1*, l'appariement et la synapse ne se font correctement que dans 50% des méiocytes (Moore & Shaw, 2009; Figure 11).

Par ailleurs, Corredor *et al.* (2007) ont montré que les régions subtélomériques jouent un rôle important dans la reconnaissance des chromosomes amenés à s'apparier.

Il a été également montré que cette reconnaissance des chromosomes est associée à un changement dans la conformation de la chromatine (Prieto *et al.,* 2005; Colas *et al.,* 2008). En effet, Prieto *et al.* (2005) ont observé que le pourcentage d'homologues appariés de façon

correcte correspond au pourcentage de chromosomes homologues ayant une compaction chromatinienne identique au début de la méiose. Ainsi, en présence de *Ph1*, on assiste à une synchronisation du remodelage de la chromatine afin d'augmenter la spécificité des interactions chromosomiques. Par contre, en absence de *Ph1*, l'état de conformation des chromosomes est altéré par une asynchronisation précoce du remodelage de la chromatine, ce qui augmente les possibilités d'interactions entre chromosomes homéologues (Figure 10) (Prieto *et al.,* 2005; Colas *et al.,* 2008; Moore & Shaw, 2009).

Ph1 régulerait l'activité globale des gènes types *cdk*. En effet, la plupart des gènes type *cdk* du 5A et 5D ne sont pas transcrits en présence de *Ph1*. Al Kaff *et al.* (2008) ont montré une activation de ces gènes lorsque *Ph1* est absent. De plus, *Ph1* empêcherait les interactions entre chromosomes homéologues en régulant le niveau d'expression de *TaASY1* (*Triticum aestivum Asynapsis 1*) qui code des protéines associées au CS (Boden *et al.,* 2009). Les auteurs ont montré que *TaASY1* est requis pour la synapse et que l'absence de *Ph1* entraine une surexpression de *TaASY1*.

D'autres régulateurs de l'appariement ont été identifiés chez le blé (Sears, 1976). Le locus *Ph2*, localisé sur le bras court du chromosome 3D (Mello-Sampayo, 1968), est le plus caractérisé. Il agirait sur la progression de la synapse, le mutant étant partiellement asynaptique (Martinez *et al.,* 2001).

Ainsi, le comportement méiotique chez ces espèces polyploïdes a nécessité quelques adaptations qui se sont faites sur le long terme. Comment se passe la méiose chez les néo-polyploïdes?

En général, les polyploïdes synthétiques ont un comportement méiotique plus instable (formation de multivalents, d'univalents) qui génère un nombre plus élevé de remaniements génomiques (translocations, aneuploïdies) (Ramsey & Schemske, 2002).

J'ai ainsi analysé l'effet de la variabilité des génomes des espèces parentales sur la stabilité des allohexaploïdes et allotétraploïdes synthétiques en comparant l'appariement méiotique, le taux d'aneuploïdie ainsi que les changements génétiques (*Voir résultats, Chapitre I*).

Tableau 1 : Production, surface et rendement en céréales obtenus en France, en Europe et dans le Monde pour la campagne 2008-2009 (source : http://faostat.fao.org/).

Cultures	Production (tonnes)			Surface cultivée (ha)			Rendement (Hg/ha)		
	France	Europe	Monde	France	Europe	Monde	France	Europe	Monde
Blé	39001700	248055737	689945712	5492460	61596972	223256097	71009	40270	30861
Maïs	15818500	93136499	822712527	1702030	15476021	161016542	92939	60181	51094
Riz	89200	3473002	685013374	16440	596531	158955388	54257	58219	43094
Total Céréales	70094279	504364944	2525106874	9611461	127315166	713443557	72927	39615	35393

IV. Le blé, excellent modèle pour étudier la dynamique des génomes allopolyploïdes

Outre son importance économique nationale et internationale, le blé constitue un modèle intéressant pour étudier les effets de la polyploïdie et comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilisation et le succès des espèces polyploïdes.

IV.1 Espèce cultivée d'intérêt socio-économique majeur

La culture moderne du blé est essentiellement basée sur deux espèces allopolyploïdes ; le blé dur allotétraploïde (*T. durum*, 2*n*=4*x*=28, BBAA) et le blé tendre allohexaploïde (*T. aestivum*, 2*n*=6*x*=42, BBAADD). Le diploïde *T. monococcum* (2*n*=2*x*=28, A^mA^m) est également une espèce cultivée mais à une échelle nettement moins importante que *T. aestivum* et *T. durum*.

Le blé occupe aujourd'hui la deuxième place mondiale dans la production céréalière (689 millions de tonnes en 2008 selon les statistiques de la FAO) et représente la plus grande superficie mondiale emblavée avec 223 millions d'hectares (Mha). C'est aussi la céréale la plus importante en France, avec 39 millions de tonnes (Mt) produites en 2008 pour une surface cultivée de 5,5 Mha (Tableau 1).

Le blé, avec le riz, constitue la base de la nutrition humaine. Le blé tendre est principalement utilisé pour la production de farines, produits de base dans l'industrie du pain et de la biscuiterie. Le blé dur trouve notamment son utilisation dans l'industrie des pâtes alimentaires et dans la production de semoules.

Les rendements très élevés en France (71 quintaux en moyenne par hectare en 2008), Allemagne et au Royaume-Uni, assurent à l'union européenne une place de leader mondial dans la production de blé (248 Mt en 2008). Cependant, les réserves mondiales de blé sont en nette diminution (rapport SOFA de 2008) et ces niveaux de production peinent à satisfaire la demande mondiale qui ne cesse de s'accroître avec l'augmentation de la population.

Par conséquent, il est important d'améliorer le rendement et la qualité nutritionnelle du blé et cela dans une perspective d'agriculture durable. La compréhension de son génome et de son évolution est un des moyens d'y contribuer.

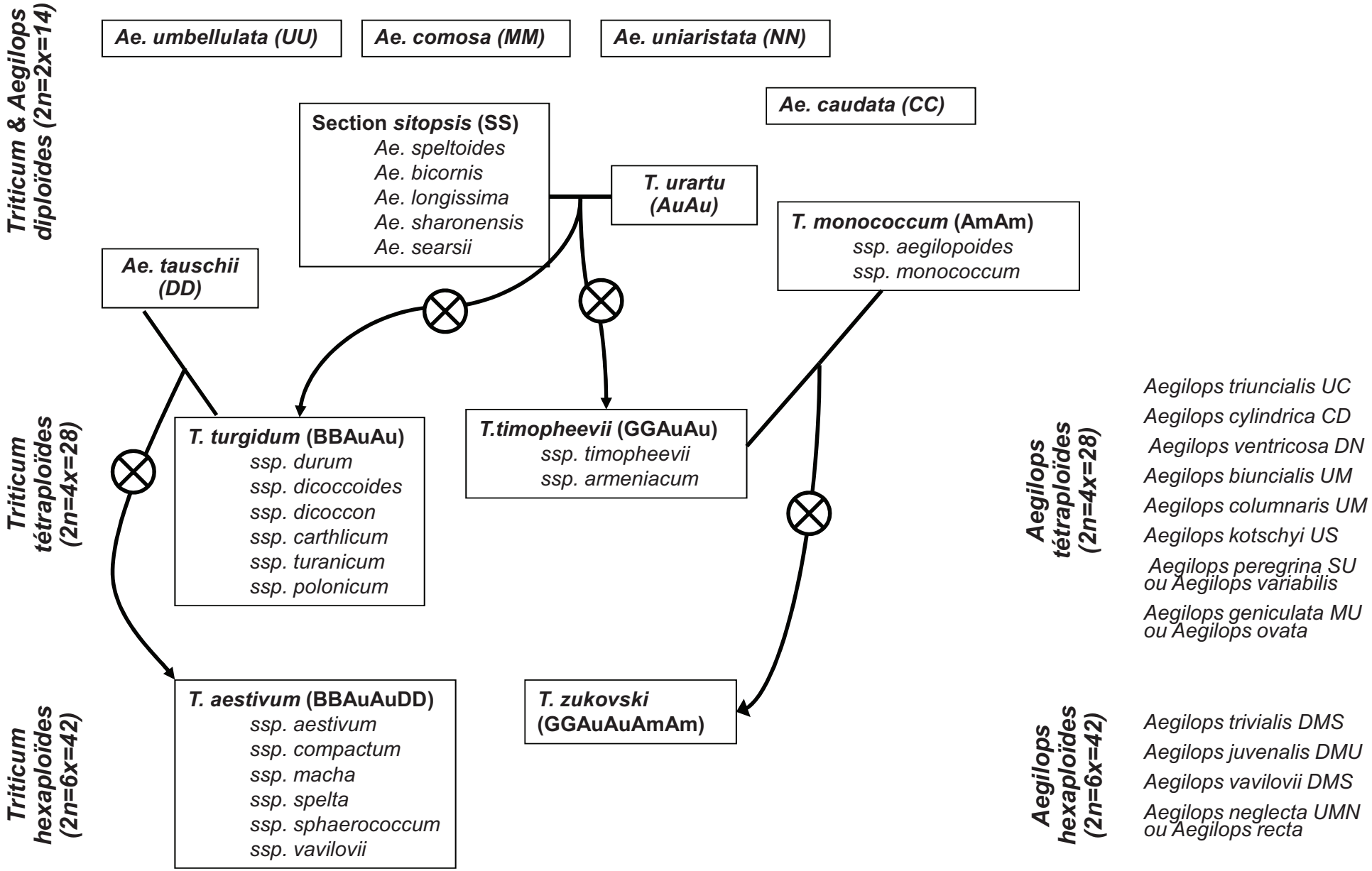

Figure 12 :Origine des espèces allopolyploïdes des genres *Triticum* et *Aegilops* par évènements de polyploïdisation (d'après Feldman et *al.,* 1995).

IV.2 Evolution et Organisation des génomes du blé

IV.2.1 Allopolyploïdes de la tribu des *Triticeae*

Les différentes espèces de blé (*Triticum* et *Aegilops*) sont des angiospermes monocotylédones appartenant à la tribu des *Triticeae* de la famille des *Poaceae.*

On retrouve dans cette tribu de nombreuses espèces annuelles et pérennes dont des céréales économiquement importantes tel que l'orge, le seigle ou encore le triticale.

Différentes classifications des *Triticeae* ont été proposées et varient en fonction des critères (morphologiques, cytologiques et moléculaires) utilisés pour différencier ces espèces. Un effort d'unification des informations issues de ces différentes et inconsistantes classifications a été entrepris et les données ont été compilées dans la « classification » GrainTax. La figure 12, présentant les principales espèces des genres *Triticum* et *Aegilops*, se base sur cette classification.

Les génomes de ces espèces (désignés par les lettres A, B, C,…) sont tous constitués d'un nombre de chromosomes multiple de 7.

Les génomes des espèces du blé sont de très grandes tailles, allant de 4,7 Gb pour l'espèce diploïde *T. urartu* (AA) à 16,7 Gb pour le blé tendre hexaploïde *T. aestivum* ssp. *aestivum* (BBAADD). De plus, d'importantes variations de taille, pouvant atteindre plusieurs centaines de Mb, ont été observées pour des espèces ayant le même niveau de ploïdie (Bennett & Smith 1976, 1991, http://data.kew.org/cvalues/homepage.html).

La polyploïdie et la prolifération des éléments transposables (ETs) sont probablement responsables de l'augmentation ainsi que de la variation des tailles des génomes de ces espèces.

IV.2.2 Evolution par évènements de polyploïdisations fréquents et récurrents

L'étude des duplications dans les génomes complets et l'analyse des paralogues dans les bases de données d'EST ont confirmé qu'au moins une duplication complète du génome a eu lieu il y a 70 Ma (paléotétraploidisation ρ) et est commune à toutes les *Poaceae* (Tang *et al.,* 2008). Suite à cet évènement de polyploïdisation ancestral, qui semble avoir concerné un génome possédant un set de 5 ou 7 chromosomes ancestraux, les *Poaceae* ont divergé grâce à des évènements de translocations et de fusion de chromosomes (Salse *et al.,* 2008a; Devos, 2010; Figure 13).

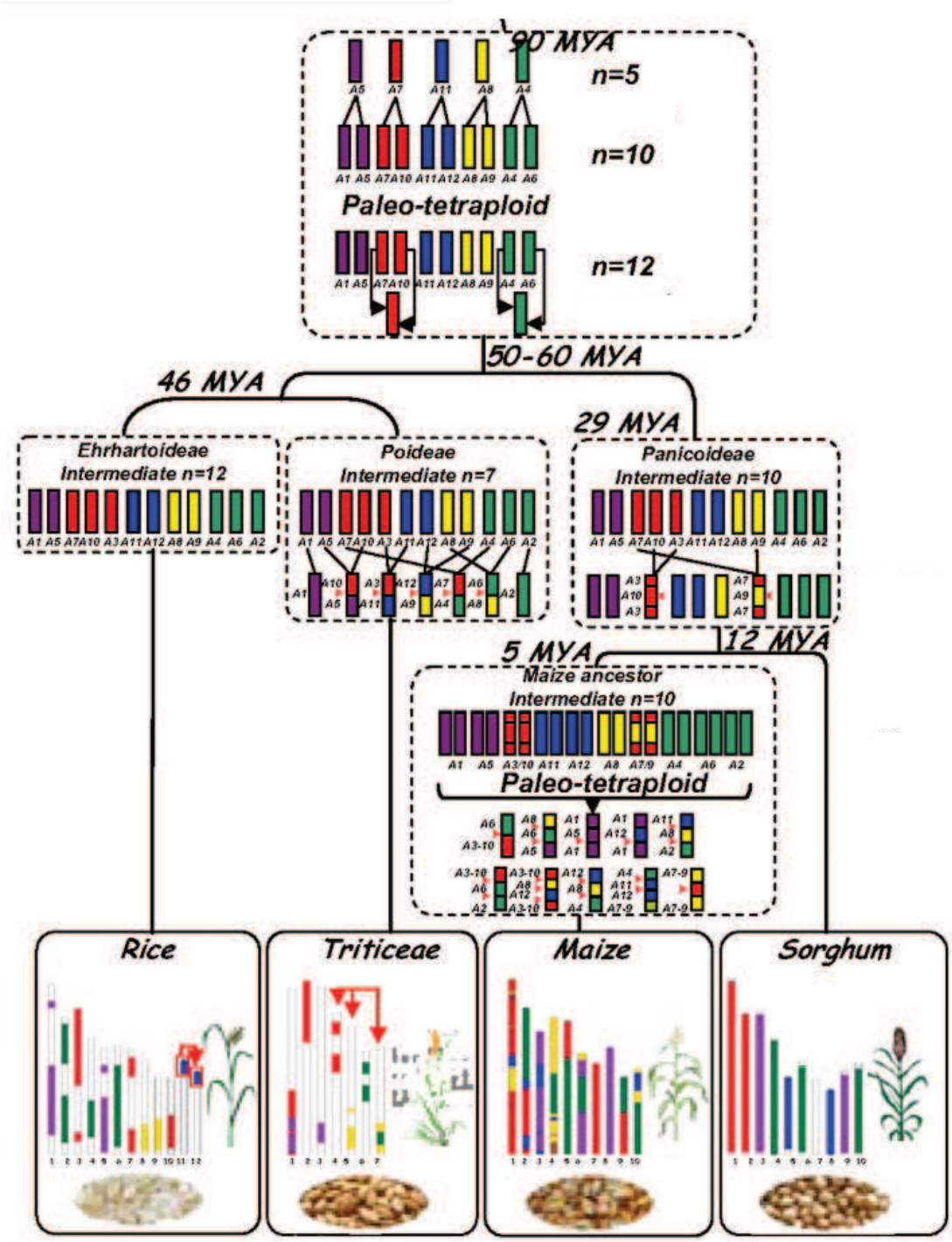

Figure 13 : Evolution de la structure des chromosomes du blé, du riz, du sorgho et du maïs à partir des 5 chromosomes ancestraux (d'après Salse *et al.,* 2009).

Il existe un autre événement de duplication totale du génome plus ancien (σ, il y a plus de 200 Ma) dont la date reste à préciser. Il semblerait néanmoins que cet évènement se soit produit chez les monocotylédones peu après leur divergence des dicotylédones (Tang *et al.,* 2010).

En plus de ces événements de polyploïdisation anciens, communs aux *Poaceae*, (Salse *et al.,* 2008a; Tang *et al.,* 2010), les différentes espèces du blé appartenant aux genres *Triticum* et *Aegilops,* ont subi au cours de leur évolution différents événements de polyploïdisation relativement récents aboutissant à l'apparition de nombreuses espèces tétraploïdes et hexaploïdes (Figure 12) dont les blés cultivés de nos jours, le blé dur (*T. turgidum* ssp. *durum,* 2*n*=4*x*=28, BBAA) et le blé tendre (*T. aestivum* ssp. *aestivum*, 2*n*=6*x*=42, BBAADD).

Le blé à pain hexaploïde résulte par exemple de deux événements de polyploïdisation successifs. En effet, un premier événement, impliquant l'espèce diploïde *T. urartu* (2*n*=2*x*=14, AA) donneur du génome A et une espèce de la section *sitopsis* donneur du génome B (Feldman *et al.,* 1995; Blake *et al.,* 1999; Huang *et al.,* 2002; Dvorak *et al.,* 2006), a eu lieu il y a environ 0,5 millions d'années et a conduit à l'apparition du blé tétraploïde *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (2*n*=4*x*=28, BBAA) ou amidonnier sauvage (Figure 1 dans Mestiri *et al.,* 2010). Si le donneur du génome A est bien caractérisé comme étant l'espèce sauvage diploïde *T. urartu,* le donneur du génome B reste à identifier. Ce donneur appartiendrait à la section *sitopsis* des *Aegilops* (génome SS) qui regroupe cinq espèces. Des travaux de phylogénie et de cytogénétique tendent à montrer que *Ae. speltoides* (2*n*=2*x*=14, SS) serait l'espèce la plus proche du donneur du génome B (Vedel *et al.,* 1981; Raskina *et al.,* 2002; Salse *et al.,* 2008b).

Un deuxième événement de polyploïdisation ayant eu lieu il y a environ 7000-12000 ans, entre le blé tétraploïde domestiqué, *T. turgidum* spp. *dicoccum* (2n=4x=28, BBAA), connu sous le non d'amidonnier et l'espèce diploïde sauvage *Ae. tauschii* (2n=2x=14, DD) a donné le blé tendre allohexaploïde actuellement cultivé *T. aestivum* ssp. *aestivum* (2n=6x=42, BBAADD) (Kihara 1944, McFaden & Sears 1946, Feldman *et al.,* 1995, Nesbitt et Samuel 1996) (Figure 1 dans Mestiri *et al.,* 2010).

Comme nous venons de le voir, les espèces progénitrices des blés polyploïdes sont relativement bien caractérisées ce qui donne la possibilité de recréer des polyploïdes similaires ou non à ceux existant dans la nature. Ces polyploïdes dits synthétiques

représentent un matériel idéal pour étudier les effets immédiats de la polyploïdie. Les travaux effectués au cours de cette thèse ont donc été réalisés sur ce type de matériel végétal.

IV.2.3 Importance de la prolifération des éléments transposables dans les génomes du blé

Les génomes du blé sont particulièrement riches en éléments transposables qui représentent plus de 80% de leurs séquences génomiques (Paux *et al.,* 2006; Charles *et al.,* 2008).

De part leur mécanisme de transposition (mecanisme de 'copier-coller'), les rétroéléments sont plus invasifs et susceptibles de se retrouver en plus grand nombre de copies dans le génome. En effet, ces rétroéléments représentent plus de 60% du génome du blé (Paux *et al.,* 2006, Charles *et al.,* 2008).

L'activation (transcriptionnelle et transpositionnelle) de ces éléments transposables répond aussi bien aux stress abiotiques et biotiques (revue dans Grandbastien et *al.,* 2005) qu'au « choc génomique » que peut représenter l'hybridation (McClintock, 1984) ainsi que la polyploïdie (*revue dans* Parisod et *al.,* 2009).

Cette activation des éléments transposables peut avoir un impact majeur sur l'organisation et le fonctionnement des génomes polyploïdes. En effet, il est aujourd'hui admis que leur transposition s'accompagne de divers remaniements structuraux (cassures chromosomiques, délétions…) et/ou d'un changement de l'expression des gènes (Soltkin & Martienssen, 2007). En effet, l'insertion d'un élément transposable dans une séquence codante peut générer un allèle nul. Par ailleurs, l'activation transcriptionnelle d'un élément, inséré à proximité d'un gène, peut entrainer l'activation ou l'inactivation de ce gène adjacent.

De plus, les éléments transposables sont régulés par des mécanismes épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN qui peut être altérée chez les espèces polyploïdes.

Ainsi, la polyploïdie entrainerait l'activation des éléments transposables, probablement suite à une modification des mécanismes épigénétiques qui les régulent; activation qui a son tour induit une réorganisation des génomes allopolyploïdes.

L'abondance de ces éléments transposables, leur impact sur la structure et l'expression du génome semblent indiquer qu'ils jouent un rôle central au sein du génome du blé.

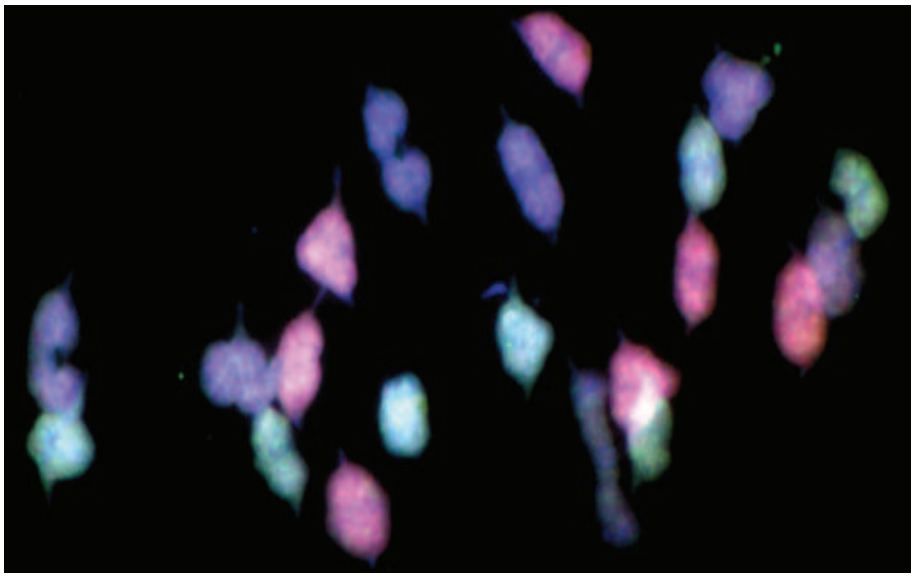

Figure 14 : Appariement entre chromosomes homologues en métaphase I de la méiose chez un blé polyploïde possédant le locus *Ph1*.
L'hybridation de type GISH montre la formation de 20 bivalents anneaux (7 du génome A, en rouge ; 7 du génome D, en vert et 6 du génome B en bleu) et d'un bivalent droit du génome B.

IV.3 Comportement diploïde à la méiose

Les espèces *T. turgidum* et *T. aestivum* contiennent le locus *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*), qui comme ont a pu le voir dans le paragraphe III.2, contrôle la formation de bivalents exclusivement entre chromosome homologues à la métaphase I de la méiose (Figure 14). L'organisation spécifique de *Ph1* sur le chromosome 5B a été obervée chez tous les blés polyploïdes mais n'est présente dans aucune autre espèce diploïde des genres *Triticum* et *Aegilops*, alors qu'elle est présente chez *T. timopheveii* (2*n*=4*x*=28, AAGG), un autre blé allotétraploïde naturel. Ceci suggère que le locus *Ph1* est apparu peu après l'évènement de polyploïdisation et qu'il a été maintenu, grâce au flux de gènes, dans différents allopolyploïdes naturels de blé (Griffiths *et al.,* 2006).

L'existence de différents polyploïdes à l'état naturel, ainsi que la possibilité de néo-synthétiser des polyploïdes en conditions de laboratoire (hybridation interspécifique suivi de doublement chromosomique) mais également la richesse en éléments transposables et un comportement diploïde de l'appariement homologue font donc du blé un excellent modèle pour étudier la polyploïdie et ses effets et mieux cerner les mécanismes impliqués dans la stabilisation et le succès des espèces polyploïdes.

V. Contexte et objectifs de la thèse

Le groupe OEPG (Organisation et Evolution des Génomes des Plantes) de l'URGV que j'ai intégré pour réaliser ma thèse travaille sur des thématiques visant à comprendre l'organisation, l'évolution et le fonctionnement des génomes des espèces polyploïdes; les deux systèmes étudiés étant les blés et les *Brassica*.

Les travaux pionniers de cette équipe ont permis d'élucider les premiers mécanismes d'élimination de gènes chez les polyploïdes naturels de blé (Chantret *et al.,* 2005). En effet, ces travaux ont montré que l'absence du locus de la dureté de la graine *Ha* (Hardness locus) dans les génomes A et B des blés durs et tendres était due à sa délétion par une recombinaison illégitime d'ADN impliquant des éléments transposables. Si ces travaux ainsi que d'autres (Buggs *et al.,* 2009) ont montré que des remaniements structuraux se produisent sur le long terme, les premières étapes de formation des allopolyploïdes restent plus controversées. Ainsi, alors que une large fraction du génome est prétendue perdue chez les allotétraploïdes synthétiques des genres *Triticum* et *Aegilops* (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001), très peu de remaniements ont été observés chez les jeunes spartines (Baumel *et al.*, 2002; Salmon *et al.*, 2005), *Tragopogons* (Buggs *et al.,* 2009) ainsi que chez les cotons synthétiques (Liu *et al.,* 2001). Dans ce contexte, je me suis attachée à la caractérisation systématique du comportement méiotique, ainsi que les changements génétiques et épigénétiques qui accompagnent les premières étapes de formation des blés allopolyploïdes.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre du Projet ANR-Biodiversité. Ce projet collaboratif (entre plusieurs équipes françaises) a pour objectif principal l'analyse des effets de la polyploïdie sur la biodiversité et l'évolution des génomes des plantes. L'intérêt était de comparer différents systèmes allopolyploïdes : Blé, Colza, Spartine et Tabac en utilisant une approche multidisplinaire afin d'élucider les mécanismes moléculaires responsables du succès évolutif des espèces allopolyploïdes. Mon travail de thèse a également bénéficié de la collaboration de mon équipe avec celle de Joseph Jahier de l'INRA de Rennes spécialisée entre autres dans l'étude de la méiose des blés polyploïdes.

Ceci m'a permis d'entreprendre une approche originale, en étudiant pour la première fois l'appariement méiotique en lien avec les changements génétiques et épigénétiques (la

méthylation de l'ADN) chez les allopolyploïdes synthétiques de blé. Ce travail, couplé à ma participation à la caractérisation des changements d'expression, également entrepris au laboratoire, nous a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilisation et le succès des blés allopolyploïdes.

Comme je l'ai précisé ci-dessus, le blé offre l'avantage de produire une large gamme de polyploïdes synthétiques similaires ou non à ceux observés dans la nature. Ceci, couplé au fait que le locus *Ph1* est absent des espèces diploïdes, nous donne la possibilité de comparer des allopolyploïdes présentant ou non le locus *Ph1*, et donc d'explorer l'impact de l'instabilité méiotique sur l'occurrence des changements génétiques. Les résultats de ces travaux sont présentés en section II, chapitre I.

Ainsi, dans un premier temps mon étude a porté sur les allohexaploïdes synthétiques issus de croisements entre plusieurs génotypes de *T. turgidum* (BBAA, 2n=4x=28) et diverses accessions d'*Ae. taushii* (DD, 2n=2x=14), respectivement donneurs des génomes AB et D. J'ai ainsi analysé l'effet de la variabilité des génomes AB et D des espèces parentales sur la stabilité méiotique des allohexaploïdes correspondants. Plus de 41 allohexaploïdes synthétiques de blé ont été produits et analysés au cours des trois premières générations en caractérisant l'appariement des chromosomes en métaphase I de la méiose, la fréquence d'aneuploïdie ainsi que les changements génétiques. Les résultats de ces travaux, publiés dans la revue *New Phytologist,* sont présentés en partie A du chapitre I.

Je me suis également impliquée dans la caractérisation du comportement méiotique (nature et variabilité de l'appariement chromosomique en métaphase I) en lien avec les changements structuraux chez des allotétraploïdes synthétiques dépourvus de l'activité *Ph1* et représentant diverses combinaisons des génomes A, S et D de blé (genres *Triticum* et *Aegilops*). Notre hypothèse de départ était que l'absence de *Ph1* entraine des appariements chiasmatiques entre chromosomes homéologues (recombinaison homéologue) pouvant être à l'origine de certains remaniements structuraux.

Je me suis également intéressée au cours de ma thèse aux changements de l'état de méthylation de l'ADN qui peuvent se produire dans les premières générations de la formation des allopolyploïdes, après l'hybridation et la duplication du génome. Ainsi, des changements

de la méthylation de l'ADN on été observés dans différents systèmes allopolyploïdes (Liu & Wendel, 2003; Rapp & Wendel, 2005) et semblent entrainer une reprogrammation de l'expression des gènes (Osborn *et al.,* 2003b) ainsi que des modifications phénotypiques (Madlung *et al.,* 2002). L'objectif de ce travail présenté en Section II, chapitre II, a été de caractériser l'étendue des changements de méthylation de l'ADN chez des allohexaploïdes synthétiques de blé. Ce matériel offre la possibilité d'étudier la méthylation de l'ADN en lien avec la régulation de l'expression des gènes. L'originalité de mon travail a été de comparer, pour la première fois sur le blé, la méthylation de l'ADN au niveau des séquences codantes et des séquences répétées.

Section II
Résultats & Discussions

Chapitre I
Caractérisation du comportement méiotique et des changements structuraux chez les allopolyploïdes de blé

I. Introduction et contexte

Les projets divers de séquençage des génomes ainsi que d'EST ont révélé des événements de polyploïdisation fréquents et récurrents chez les angiospermes (Blanc & Wolf, 2004; Cui *et al.,* 2006; Schlueter *et al.,* 2004; Jaillon *et al.,* 2007; Tang *et al.,* 2008). Par ailleurs, l'étude des polyploïdes naturels dont les évènements de polyploïdisation peuvent être considérés comme relativement récents (1-2 Ma), ont permis la mise en évidence des changements survenant sur le moyen terme de l'évolution de ces polyploïdes. Ces études sur les polyploïdes naturels se basent principalement sur des approches de génomique comparative telles que celles entreprises pour le locus *Ha* chez le blé (Chantret *et al.,* 2005; Charles *et al.,* 2009).

La caractérisation précise des différents effets de l'allopolyploïdie nécessite de comparer les polyploïdes à leurs géniteurs. Malheureusement, les polyploïdes naturels et leurs espèces pro-génitrices (parfois difficiles à identifier précisément) ont plus ou moins divergé depuis l'événement de polyploïdisation, rendant difficile voire impossible la détection des effets dus à la polyploïdie. La possibilité de synthétiser en conditions expérimentales des néo-polyploïdes offre l'avantage de pouvoir comparer directement les polyploïdes à leurs géniteurs et étudier l'impact de la polyploïdisation au cours des premières générations.

Au cours des 10 dernières années, la caractérisation des effets à court terme de la polyploïdie, principalement par l'analyse de polyploïdes synthétiques, a fait l'objet de nombreuses communications dont les conclusions étaient parfois contradictoires. Il a été suggéré que l'allopolyploïdie chez ces amphiploïdes s'accompagne d'important changements structuraux (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2005; Shcherban *et al.,*2008; Khasdan *et al.,* 2010; Kraistshtein *et al.,* 2010).

Feldman *et al.* (1997) puis Ozkan *et al.* (2001) ont suggéré des éliminations rapides, non aléatoires et reproductibles des séquences ADN, dits 'chromosome et génome spécifiques' chez les allotétraploïdes synthétiques et naturels du blé. Ces séquences sont présentes chez les géniteurs mais absentes d'un chromosome ou d'un génome chez les allopolyploïdes. En utilisant les mêmes allotétraploïdes, il a été suggéré que 14% d'un des génomes parentaux pouvaient être spécifiquement éliminés chez ces allotétraploïdes (Shaked

et al., 2001) et que ces éliminations impliquent principalement les éléments répétés (Han *et al.,* 2005, Shcherban *et al.,* 2008). Ces changements génétiques majeurs, dont les mécanismes restent à identifier, contrastent avec la stabilité structurale observée notamment chez les cotons (Liu *et al.,* 2001) mais aussi chez les jeunes spartines (Baumel *et al.,* 2002) et les tragopogons synthétiques (Buggs *et al.,* 2009).

Dans ce contexte, j'ai démarré la préparation de ma thèse dans l'objectif de confirmer les changements structuraux plus ou moins importants chez le blé (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2005; Shcherban *et al.,* 2008) et surtout de disséquer leurs mécanismes moléculaires et leurs bases génétiques. Les premières caractérisations que j'ai effectuées sur des allopolyploïdes synthétiques de blé, fournis dans le cadre d'une collaboration avec Moshé Feldman, avec des marqueurs locus spécifiques basés sur la PCR n'ont pas pu confirmer les remaniements importants dits révolutionnaires précédemment décrits sur ce matériel.

J'ai ainsi orienté mon travail de thèse vers la caractérisation fine des premières générations des allopolyploïdes de blé (genres *Triticum* & *Aegilops*). J'ai alors analysé (i) l'impact de l'appariement (homologue ou homéologue) sur la formation des aneuploïdes et la dynamique des changements génétiques, (ii) l'effet de la variabilité des génomes parentaux sur la stabilité des néo-allopolyploïdes de blé.

Pour ce faire, deux principaux types d'allopolyploïdes synthétiques ont été générés et analysés en utilisant des méthodes cytogénétiques et moléculaires:

- Les allohexaploïdes synthétiques (BBAADD, 2n=6x=42) issus d'évènements d'hybridation interspécifique entre *T. turgidum* (BBAA, 2n=4x=28) et *Ae. tauschii* (DD, 2n=2x=14), suivis de doublement chromosomique spontané. Ces allohexaploïdes sont similaires au blé naturel (*T. aestivum*) et possèdent le locus *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) qui restreint l'appariement aux chromosomes homologues lors de la méiose (Griffiths *et al.,* 2006).
- Les allotétraploïdes synthétiques issus d'hybridations entre des espèces diploïdes des genres *Triticum* and *Aegilops* suivies d'un doublement à la colchicine et combinant donc diverses combinaisons des génomes A, S et D. Ces allotétraploïdes ne possèdent pas le locus *Ph1*.

La caractérisation de la nature de l'appariement méiotique (homologue et/ou homéologue) chez les allohexaploïdes et allotétraploïdes synthétiques a été réalisée en

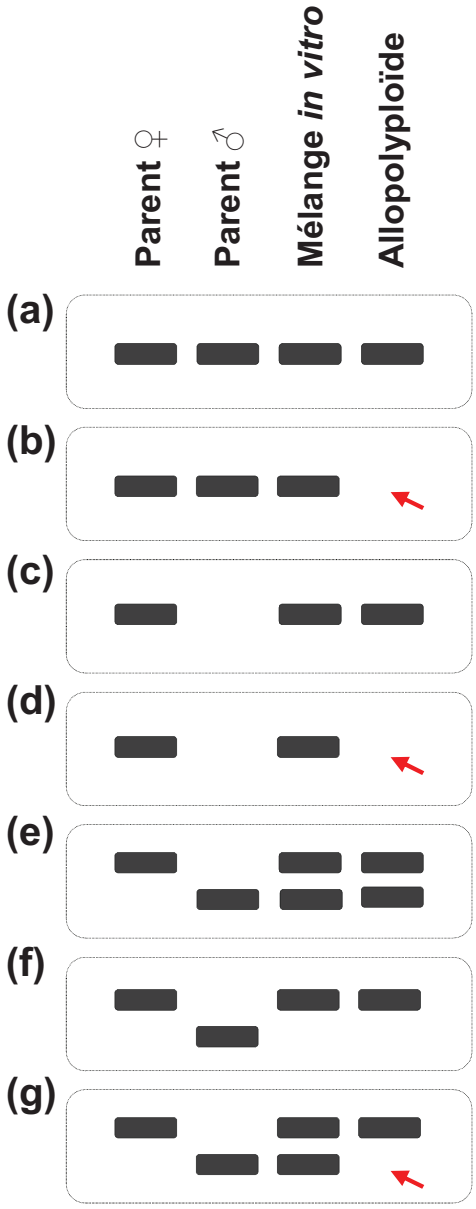

Figure 15 : Représentation schématique des profils d'amplifications additifs et non additifs obtenus chez allopolyploïdes synthétiques en comparaison avec les profils obtenus chez les géniteurs et le mélange *in vitro* des ADN parentaux.

(a)Marqueur monomorphe (absence de polymorphisme entre géniteurs) ne montrant pas de changements génétiques chez l'allopolyploïde (profil additif).

(b)Marqueur monomorphe montrant un changement génétique (flèche rouge) chez l'allotétraploïde (profil non additif).

(c)Marqueur montrant un polymorphisme de présence/absence (PAP) entre géniteur et un profil additif chez l'allopolyploïde.

(d)Marqueur PAP montrant un profil non additif chez l'allopolyploïde caractéristique d'un changement génétique (flèche rouge).

(e)Marqueur montrant un polymorphisme de taille (ASP) entre géniteurs et le même profil additif chez l'allopolyploïde et le mélange *in vitro* des ADNs parentaux.

(f)Marqueur ASP montant l'amplification d'un seul homéoallèle chez l'allopolyploïde et le mélange *in vitro*. Cette amplification préférentielle résulte d'une compétition entre homéoallèles lors de la PCR.

(g)Marqueur ASP montrant l'amplification d'un seul homéoallèle chez l'allopolyploïde alors que les deux homéoallèles sont amplifiés dans le mélange in vitro des ADNs parentaux. Cette déviation par rapport à l'additivité est caractéristique d'un remaniement génétique (flèche rouge).

métaphase I des Cellules Mères de Pollen (CMP) en utilisant la méthode de GISH qui permet l'identification non équivoque des génomes A, B (ou S) et D.

Une approche PCR a été utilisée pour caractériser les changements génétiques au niveau de séquences codantes (marqueurs PCR issus d'EST) et répétées (marqueurs issus de SSR et d'éléments transposables). La démarche adoptée repose sur la comparaison des profils d'amplification observés chez les allopolyploïdes synthétiques à ceux obtenus pour leurs géniteurs respectifs et surtout le mélange *in vitro* des ADN parentaux, utilisé comme témoin d'additivité (Figure 15). Un marqueur est considéré comme « réarrangé » dans un allopolyploïde si le profil d'amplification obtenu pour certaines ou toutes les plantes est différent de celui observé pour le mélange des ADN parentaux (Figure 15).

Dans la première partie (A) de ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux allohexaploïdes synthétiques possédant le locus *Ph1*. L'objectif de cette étude a été d'analyser l'effet de la variabilité des génomes AB et D des espèces progénitrices sur la stabilité des allohexaploïdes résultants. Je me suis donc attachée à caractériser le comportement méiotique, l'aneuploidie et les changements génétiques au cours des trois premières générations des allohexaploïdes synthétiques et naturels de blé. Ces travaux sont présentés sous forme d'un article (Mestiri *et al.,* 2010) publié dans la revue *New Phytologist*.

La deuxième partie (B) est consacrée à l'étude des allotétraploïdes synthétiques dépourvus de *Ph1*. Au cours de ce travail, des changements génétiques ont été mis en évidence chez ces allotétraploïdes et leurs possibles liens avec l'appariement homéologue seront discutés.

Chapitre I-A : Article

Mes résultats et discussions ont été publiés en 2010:

Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity.

Mestiri Imen, Chagué Véronique, Tanguy Anne-Marie, Huneau Cecile, Huteau Virginie, Belcram Harry, Coriton Olivier, Chalhoub Boulos, Jahier Joseph

New Phytologist **(2010) 186 :86-101**

New Phytologist

Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity

Imen Mestiri[1], Véronique Chagué[1], Anne-Marie Tanguy[2], Cecile Huneau[1], Virginie Huteau[2], Harry Belcram[1], Olivier Coriton[2], Boulos Chalhoub[1] and Joseph Jahier[2]

[1]Organization and Evolution of Plant Genomes (OEPG), Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV), UMR INRA 1165 – CNRS 8114 – UEVE, 91057 Evry Cedex, France; [2]Unité Mixte de Recherches INRA – Agrocampus Rennes, Amélioration des Plantes & Biotechnologies Végétales, 35653 Le Rheu, France

Author for correspondence:
Boulos Chalhoub
Tel: +33 160874503
Email: chalhoub@evry.inra.fr

Received: *14 September 2009*
Accepted: *14 December 2009*

New Phytologist (2010) **186**: 86–101
doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03186.x

Key words: allopolyploid stability, aneuploidy, chromosome pairing, DNA rearrangement, meiosis, wheat.

Summary

• To understand key mechanisms leading to stabilized allopolyploid species, we characterized the meiotic behaviour of wheat allohexaploids in relation to structural and genetic changes.

• For that purpose, we analysed first generations of synthetic allohexaploids obtained through interspecific hybridization, followed by spontaneous chromosome doubling, between several genotypes of *Triticum turgidum* and *Aegilops tauschii* wheat species, donors of AB and D genomes, respectively.

• As expected for these *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) gene-carrying allopolyploids, chromosome pairing at metaphase I of meiosis essentially occurs between homologous chromosomes. However, the different synthetic allohexaploids exhibited progenitor-dependent meiotic irregularities, such as incomplete homologous pairing, resulting in univalent formation and leading to aneuploidy in the subsequent generation.

• Stability of the synthetic allohexaploids was shown to depend on the considered genotypes of both AB and D genome progenitors, where few combinations compare to the natural wheat allohexaploid in terms of regularity of meiosis and euploidy. Aneuploidy represents the only structural change observed in these synthetic allohexaploids, as no apparent DNA sequence elimination or rearrangement was observed when analysing euploid plants with molecular markers, developed from expressed sequence tags (ESTs) as well as simple sequence repeat (SSR) and transposable element sequences.

Introduction

Polyploidy, or the occurrence of more than two sets of chromosomes in a single nucleus, is a widespread and important evolutionary process of eukaryotic evolution and is particularly common in plants (Adams & Wendel, 2005a; Soltis *et al.*, 2009). During the last decade, various expressed sequence tag (EST) and genome sequencing projects revealed frequent and sometimes recurrent rounds of ancient polyploidy in angiosperms (Blanc & Wolfe, 2004; Schlueter *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2006; Jaillon *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Allopolyploids combine two or more divergent homoeologous genomes, usually through interspecific or intergeneric hybridization, followed by chromosome doubling. The geographic distribution of allopolyploid species often exceeds that of their diploid progenitors, suggesting that polyploidy may confer enhanced fitness (Stebbins, 1950).

In plants, it has been found that allopolyploidy is associated with changes at the genetic level (Song *et al.*, 1995; Ozkan *et al.*, 2001; Rieseberg, 2001; Shaked *et al.*, 2001; Gaeta *et al.*, 2007) as well as the gene expression and/or epigenetic levels (Kashkush *et al.*, 2003; Adams & Wendel, 2005b; Wang *et al.*, 2006; Flagel *et al.*, 2008; Hovav *et al.*, 2008;

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Rapp *et al.*, 2009), the importance of which depends on the analysed polyploid model. These changes are thought to be necessary for morphological novelty, diversification and preservation of the new polyploid species (Comai, 2005; Chen, 2007; Leitch & Leitch, 2008; Soltis *et al.*, 2009).

A fundamental issue to understand mechanisms leading to stabilized allopolyploid species is to decipher their meiotic behaviour in relation to genetic, functional and epigenetic changes. A prerequisite for regular meiosis in allopolyploids is correct chromosome pairing, that is, with pairing restricted to homologues. It appears that the stabilization of chromosome pairing in allopolyploids is achieved through the combination of several mechanisms. It has been suggested that wheat allopolyploids can undergo rapid structural rearrangements of DNA sequences, thus increasing divergence between homoeologous chromosomes and decreasing possibilities of homoeologous pairing (Levy & Feldman, 2004; Feldman & Levy, 2005). By contrast, Comai *et al.* (2003) showed that *Arabidopsis* synthetic allopolyploids were capable of homologous pairing in the early generations after polyploidization, without observing important structural reorganization of homoeologous genomes. Thus, in these cases, the diploid-like behaviour is likely under genetic control.

The wheat species (genera *Triticum* and *Aegilops*) have particularly evolved through frequent allopolyploidization events, giving rise to a number of allopolyploids whose genome constitutions have been cytogenetically characterized for more than 50 yr (Kihara, 1954). Among these, two successive allopolyploidization events have led to the formation of the widely cultivated allohexaploid wheat *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD), also known as common or bread wheat (Fig. 1a). The first event led to the formation of the durum or the pasta allotetraploid wheat, *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB) and occurred less than 0.5 million yr ago, between the diploid species *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) and an unidentified diploid *Aegilops* species of the section *Sitopsis*, donor of the B genome (Feldman *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002). The second allopolyploidization event occurred upon domestication 7000–12 000 yr ago, between the early-domesticated tetraploid *T. turgidum* ssp. *dicoccum* and the goatgrass diploid species *A. tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD), resulting in the allohexaploid wheat (Kihara, 1944; McFadden & Sears, 1946; Feldman *et al.*, 1995; Nesbitt & Samuel, 1996).

Triticum turgidum and *T. aestivum* contain the *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) locus, which controls the exclusive formation of homologous bivalents at metaphase I of meiosis (Riley & Chapman, 1958), thus representing a model of choice for a gene controlling diploid-like behaviour in these polyploid species. Cloning of the *Ph1* gene, after decades of investigation, has shown that the *Ph1* allele of the wheat allopolyploids is not present in any diploid wheat species, whereas it is present in *T. timopheveii* ($2n = 4x = 28$, AAGG), another natural wheat allotetraploid (Griffiths *et al.*, 2006). This suggests that the 'polyploid-specific' *Ph1* allele has probably evolved concomitantly with allopolyploidization events, and has been maintained, through gene flow, in different natural wheat allopolyploids (Griffiths *et al.*, 2006).

It is believed that the existing natural wheat allohexaploid *T. aestivum* likely arose from only one or a few hybridization events between *T. turgidum* and *A. tauschii* (Talbert *et al.*, 1998). Aneuploidy is common in natural hexaploid wheats, probably because its allohexaploid nature makes it more tolerant to loss or gain of a chromosome or a chromosome arm (Sears, 1954). However, the basis of occurrence of aneuploids is poorly understood, although variability between hexaploid lines has been observed (Worland & Law, 1985; Storlie & Talbert, 1993).

The objective of the present study is to analyse the effect of variability of AB and D genome progenitors on the stability of the resulting wheat allohexaploids. More than 41 synthetic wheat allohexaploids were produced and evaluated across the first three generations for chromosome pairing at metaphase I of meiosis, aneuploidy as well as structural changes at the molecular level. We demonstrated and determined, for the first time, that lack of homologous chromosome pairing (bivalent failure), and thus univalency, during metaphase I of meiosis leads to aneuploidy in the following generation, the frequency of which depends on variability of AB and D genome progenitors. No DNA sequence elimination or rearrangements were seen in euploid plants of the wheat allohexaploids, suggesting that aneuploidy is the only structural change occurring in the early generations of these allopolyploids.

Materials and Methods

Plant material and experimental scheme

Thirty-three *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$, DD) accessions available in the INRA collection from different geographic origins and belonging to either subspecies *tauschii* or *strangulata* were hybridized as male parents to two AB genome progenitors, *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* cv Joyau ($2n = 4x = 28$, AABB) and 'Tetra Courtot' ($2n = 4x = 28$, AABB). Tetra Courtot is the tetraploid component of the hexaploid wheat cv Courtot ($2n = 6x = 42$, AABBDD), extracted in our laboratory (J. Jahier, unpublished) by six successive backcrosses (Fig. 1b), according to the procedure described by Kerber (1964). Seeds of Joyau, Tetra Courtot and *A. tauschii* accessions devoted to crosses were produced through selfing. The synthetic allohexaploids were prefixed JOY or TC to designate cv Joyau or Tetra Courtot, respectively, as donors of the AB genomes, followed by the *A. tauschii* accession number to designate the D genome donor (Table 1).

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

New Phytologist

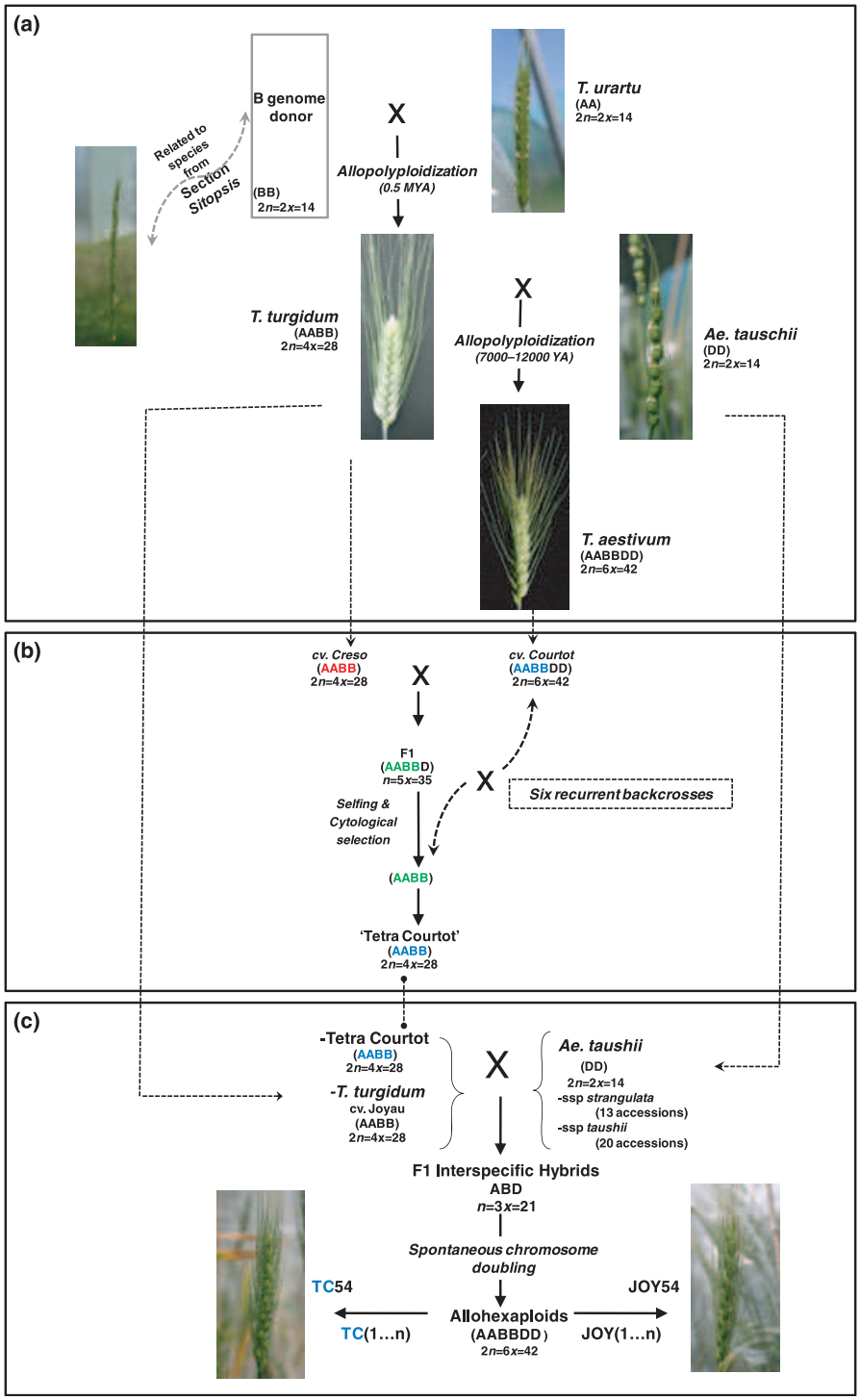

Fig. 1 Evolution and origin of natural and synthetic wheat allohexaploids. (a) Evolution of wheat species (genera *Triticum* and *Aegilops*) through allopolyploidization events (from Kihara, 1944; McFadden & Sears, 1946; Feldman *et al.*, 1995; Nesbitt & Samuel, 1996; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002). (b) Schematic representation of extraction of the tetraploid component 'Tetra Courtot' ($2n = 4x = 28$, AABB) from the French bread hexaploid wheat cv Courtot (Courtot/cv Creso // 6* Courtot), according to Kerber (1964). (c) Synthetic wheat allohexaploids were obtained through hybridization between two AB genome progenitors and 33 accessions of *Aegilops tauschii*, followed by spontaneous chromosome doubling. Designation names of the 41 synthetic allohexaploids are given in Table 1. Spike photos of two of them, TC54 and JOY54, derived from crosses between Tetra Courtot or cv Joyau and the same *A. tauschii* accession 54, are presented.

All F1 embryos were *in vitro* rescued, and F1 seedlings were grown and selfed to produce a few seeds that we called the S0 generation. These were sown and surveyed for chromosome doubling and aneuploidy (Table 1).

A subset of 10 synthetic wheat allopolyploids (five Joyau (JOY) and five Tetra Courtot (TC), four of each having a common *A. tauschii* parent) were chosen for detailed analysis of meiotic behaviour and aneuploidy as well as DNA rearrangements, across the two subsequent S1 and S2 generations, according to the scheme presented in Fig. 2.

Because wheat allohexaploids are annual, the different generations were produced over successive years. At each generation, seeds of the different genotypes were germinated in Petri dishes (in late November). Two-centimetre root tips were collected from at least 20 seeds, and the germinated seeds were grown in pots. At the four- to five-leaf stage, the shoots were sampled for DNA analysis, and the seedlings were vernalized in a cold room for 2 months. Meanwhile, chromosome counts were performed. Only euploid plants with 42 chromosomes were transplanted in

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Table 1 Synthetic wheat allohexaploids[a] produced by hybridizing *Triticum turgidum* cvs Joyau and Tetra Courtot, as AB genome progenitors with several accessions of *Aegilops tauschii* ssp. *tauschii* (T) and *A. tauschii* ssp. *strangulata* (S) as D genome progenitors

A. tauschii parents		Tetraploid wheat parents	
Accession number	Subspecies	*T. durum* cv Tetra Courtot	*T. durum* cv Joyau
A. tauschii acc.25	*T*	–	JOY 25[b] [7–3][d]
A. tauschii acc.36	*S*	TC36[b,c] [16–0]	JOY36[b,c] [14–11]
A. tauschii acc.54	*T*	TC54[b,c] [12–7]	JOY54[b,c] [22–3]
A. tauschii acc.59	*S*	TC59[b] [6–4]	–
A. tauschii acc.109	*S*	TC109[b] [18–2]	JOY109[b] [14–6]
A. tauschii acc.110	*T*	TC110[b] [6–6]	JOY110[b] [15–4]
A. tauschii acc.7	*T*	-	JOY7 [6–1]
A. tauschii acc.12	*S*	TC12 [3–2]	JOY12 [8–5]
A. tauschii acc.13	*T*	TC13 [36–14]	JOY13 [7–7]
A. tauschii acc.14	*T*	–	JOY14 [11–4]
A. tauschii acc.15	*S*	TC15 [7–3]	–
A. tauschii acc.16	*T*	TC16 [6–3]	–
A. tauschii acc.22	*T*	TC22 [18–3]	–
A. tauschii acc.37	*S*	TC37 [15–4]	–
A. tauschii acc.53	*S*	TC53 [8–4]	–
A. tauschii acc.55	*T*	–	JOY55 [10–0]
A. tauschii acc.56	*T*	–	JOY56 [9–6]
A. tauschii acc.60	*T*	TC60 [6–4]	–
A. tauschii acc.80	*S*	–	JOY80 [9–1]
A. tauschii acc.85	*T*	–	JOY85 [11–4]
A. tauschii acc.87	*T*	–	JOY87 [13–2]
A. tauschii acc.89	*T*	–	JOY89 [5–1]
A. tauschii acc.90	*S*	TC90 [34–16]	JOY90 [6 -9]
A. tauschii acc.97	*S*	TC97 [12–3]	–
A. tauschii acc.102	*S*	TC102 [11–1]	JOY102 [7–5]
A. tauschii acc.111	*T*	–	JOY111 [12–3]
A. tauschii acc.112	*T*	–	JOY112 [9–6]
A. tauschii acc.113	*T*	–	JOY113 [9–6]
A. tauschii acc.119	*S*	–	JOY119 [11–4]
A. tauschii acc.135	*T*	–	JOY135 [10–4]
A. tauschii acc.138	*T*	TC138 [3–0]	–
A. tauschii acc.141	*S*	TC141 [10–6]	–
A. tauschii acc.150	*T*	TC150 [5–7]	–

[a]Synthetic allohexaploids designation: JOY and TC for cultivars Joyau and Tetra Courtot, respectively, progenitors of the AB genome; numbers correspond to those of *A. tauschii* accessions.
[b]Meiotic stability analyzed.
[c]DNA rearrangement analyzed.
[d][Euploid–aneuploid] plant numbers.

late January to a plastic tunnel in which the temperature did not exceed 25°C until meiosis. The same parental genotype plants used in the first year to produce the interspecific hybrids were sampled for DNA analysis and comparisons with their allohexaploid progenies. The natural allohexaploid wheat cvs Courtot and Isengrain were simultaneously analysed as controls.

Cytological analysis

Chromosome counts in root-tip meristems Chromosome counts in root-tip cells of germinated seeds were made using a standard Feulgen technique as described by Jahier & Tanguy (1992).

Analysis of meiotic behaviour Anthers at metaphase I were collected, fixed in ethanol-acetic acid solution, squashed in acetocarmine and counterstained with carbol fuchsin (Jahier & Tanguy, 1992). At this stage of meiosis, and similar to examples illustrated in Fig. 3, the main types of chromosome associations can be: (1) univalent, where the chromosome is not associated with any other from either a homologous or homoeologous genome, (2) bivalent, where two homologous chromosomes are associated at both arm-ends (ring bivalents) or at one arm-end (rod bivalent), or (3) tri- and/or tetravalent, where more than two apparent chromosomes are associated. The rate of chromosome pairing, calculated as the number of bound chromosome arms (NBCA) per pollen mother cell (PMC), was calculated as: (1 × rod bivalents) + (2 × ring bivalents) + (2 × chain trivalents) + (3 × chain tetravalent) + (4 × ring tetravalent).

At least 50 PMCs were analysed per plant and the mean average per PMC are presented.

Genomic *in situ* hybridization (GISH) Chromosomal preparation and genomic *in situ* hybridization (GISH) were carried out as described in Coriton *et al.* (2009). Fluorescence images were captured using a CoolSnap HQ camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) on an Axioplan 2 microscope (Zeiss) and analysed using MetaVue™ (Universal Imaging Corporation, Downington, PA, USA).

DNA isolation, primer design and PCR marker analysis Genomic DNA was extracted from young leaves sampled at the four- to five-five leaf stage, as described by Charles *et al.* (2008). Primer design was performed for a set of 792 nonredundant ESTs assigned to the homoeologous group 3 (Qi *et al.*, 2004, http://wheat.pw.usda.gov/wEST/binmaps/wheat3_rice.html) using the program PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Primer sequences of the 141 simple sequence repeat (SSR) markers (Sourdille *et al.*, 2004) and the 206 bacterial artificial chromosome (BAC) sequence-derived markers (Paux *et al.*, 2006, 2008) were found at the following addresses, respectively: http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/Sourdille and www.sciencemag.org/cgi/content/full/322/5898/101/DC1. Reference ESTs and sequences of the designed or used primers are listed in Supporting Information, Table S1.

Polymerase chain reactions were performed according to Charles *et al.* (2008) in a 10 μl final volume with 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 500 nM of each primer, 0.2 U of *Taq* polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) and 25 ng of template DNA and using the same PCR program.

For the survey of genomic changes, amplification patterns observed in synthetic wheat allohexaploids were com-

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

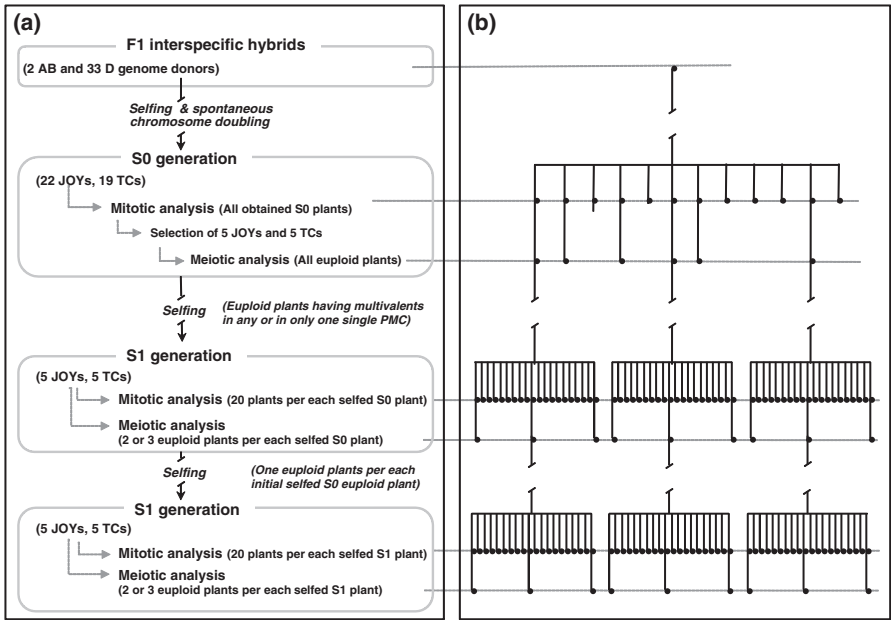

Fig. 2 Experimental scheme used for the study of meiotic behaviour and aneuploidy of the synthetic wheat allohexaploids. (a) Production of the synthetic wheat allohexaploids and their mitotic and meiotic characterization across the first three selfed generations (S0, S1 and S2). (b) An example, detailing the number of plants produced and characterized for the synthetic wheat allohexaploid TC110. Each plain circle indicates one analysed plant. The number of produced and analysed plants for the different synthetic allohexaploids can be found in Tables 1 and 2. Only euploid plants were selected for meiotic and DNA analysis and those displaying multivalents in more than one pollen mother cell (PMC) out of 50 analysed in S0 and S1 generations were discarded from the study.

pared with those obtained for their respective progenitors and with the *in vitro* mixture of parental DNAs, as control for the additivity hypothesis. Accordingly, a marker was considered as additive (and nonrearranged) in a specific wheat allohexaploid if the amplification profile of all plants was similar to that observed in the mixture of parental DNAs. By contrast, it was considered as nonadditive (and 'rearranged') if the amplification profile of all or some of its plants was different from the mixture of parental DNAs.

Results

Production of synthetic wheat allohexaploids by interspecific hybridization and spontaneous chromosome doubling

F1 interspecific hybrids ($n = 3x = 21$, ABD) were successfully obtained by crossing 33 accessions of *A. tauschii* as male parent with two AB genome progenitors, as female parents, followed by embryo rescue (Fig. 1c, Table 1). The F1 interspecific hybrid plants were sterile on almost the entire spikes, but 41 of them formed a few viable seeds that we designated as the S0 generation. These S0 seeds were sown, and chromosome counts were performed in root tips. Various frequencies of euploid plants with completely doubled genomes ($2n = 6x = 42$, AABBDD) as well as aneuploid plants were observed (Table 1). Overall, out of 622 S0 plants, 184 (29.6%) were aneuploids. Because of the limited number of obtained S0 seeds, no statistical analyses were performed in order to assess differences in the frequency of aneuploidy between the 41 allohexaploids or to point out a progenitor effect.

Most aneuploid plants (74.8%) at this S0 generation, and also in subsequent generations, had a chromosome number < 42 (such as 40, 40 + *t*, 41, 41 + *t*, with *t* standing for telocentric), with 28.7% of them containing a telocentric chromosome.

Spontaneous chromosome doubling in the hybrid, which most likely occurred when natural allohexaploid wheat was formed, was chosen in our study, and no colchicine treatment was applied. This mode of genome doubling might have occurred through the formation of unreduced gametes, which is favoured by the fact that chromosomes are maintained as univalents in gametes of wheat F1 interspecific haploid hybrids carrying the *Ph1* gene (Fukuda & Sakamoto, 1992; Xu & Dong, 1992; Jauhar, 2007). Our investigation of F1 interspecific hybrids confirms the predominance of univalency of chromosomes at meiosis metaphase I where > 92% of studied PMCs showed 21 univalents, as exemplified in Fig. 3(a) for the synthetic allohexaploid TC54. The remaining 8% show one single rod bivalent each, and no chromosomal associations in ring bivalents or multivalents were observed.

Euploid plants of the synthetic wheat allohexaploids display a similar overall phenotype as the natural hexaploid wheat (Fig. 1c), although some phenotypic differences were noticeable in some synthetic allohexaploids, the most conspicuous one being the tough glumes.

A subset of 10 synthetic allohexaploids (five JOYs and five TCs, four of each having common *A. tauschii* parents), showing different frequencies of aneuploidy in the S0 generation (Table 1), were chosen for further analysis of meiotic behaviour and aneuploidy as well as structural DNA rearrangements, in the S0 and subsequent S1 and S2 generations.

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

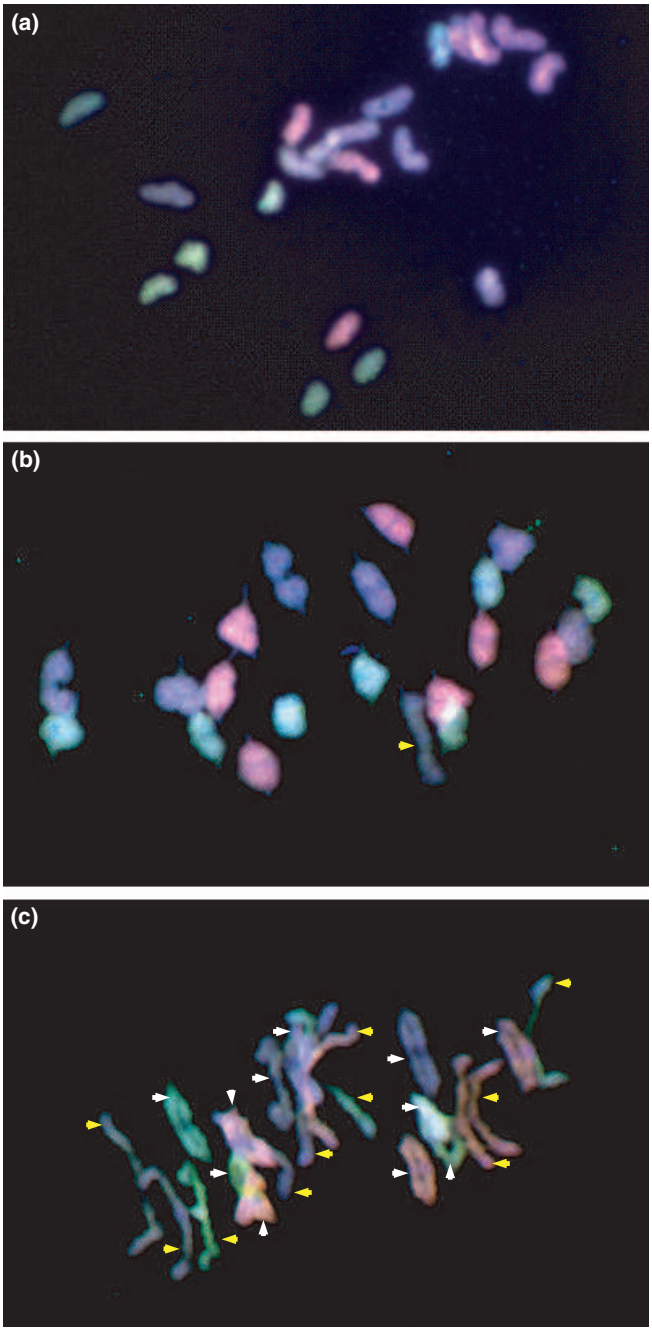

Fig. 3 Chromosome pairing at metaphase I of meiosis of F1 interspecific hybrids and two contrasted synthetic wheat allohexaploids, using the genomic *in situ* hybridization (GISH) method. (a) F1 interpecific hybrid derived from a cross between Tetra Courtot ($2n = 4x = 28$, AABB) and accession 54 of *Aegilops tauschii*, showing 21 univalents with no homoeologous pairing. (b) Synthetic allohexaploid JOY109 (generation S1) displaying a nearly complete homologous pairing with 20 rings and one B genome rod bivalent (yellow arrow). (c) Synthetic allohexaploid JOY25 (generation S1) displaying incomplete homologous pairing with 10 rod bivalents (yellow arrows) and 11 ring bivalents (white arrows). Detailed description of hybrids and synthetic wheat allohexaploids is given in Table 1 and the averages of the different chromosome configurations are given in Table 2. See the Materials and Methods section for information on the GISH method. GISH painting: A genome, red; B genome, blue; D genome, green.

Analysis of meiotic behaviour

Chromosome pairing at metaphase I of meiosis was analysed for euploid plants of generations S0, S1 and S2 of the 10 chosen synthetic wheat allohexaploids as well as for the natural wheat allohexaploid cvs Courtot and Isengrain (Table 2).

Predominance of homologous pairing and origin of multivalent formation As expected for wheat allopolyploids carrying the *Ph1* gene, most euploid plants belonging to the studied synthetic or natural wheat allohexaploids display regular meiosis in which homologous chromosome pairing is dominant (to be discussed later).

Depending on the allohexaploid considered, variable proportions of euploid plants displayed a multivalent in one or more PMCs out of the 50 analysed. These represent 15.4 and 6.4% euploid plants for synthetic and natural allohexaploids, respectively (data not shown). We did not observe any evidence of homoeologous pairing when performing GISH experiments, suggesting that the origin of formation of these multivalents might be related to mechanisms other than homoeologous recombination. Among these, nonreciprocal translocation generated in the preceding generations or 'apparent euploidy', that is, plants having the expected number of chromosomes but corresponding in reality to trisomic for one chromosome and monosomic for its homoeologue, could lead to multivalent formation (see the Discussion section).

Based on these arguments and in order to allow comparison of homologous pairing considering only the 'most likely true' euploid plants, we discarded those 'apparent euploid' plants displaying higher proportion of multivalent than those of natural wheat allohexaploid, that is, more than one PMC out of the 50 analysed. It is important to note that the proportion of plants displaying multivalents in more than one PMC was more important in the S0 (11%) than in S1 (4.8%) and S2 (5.3%) generations as well as in natural wheat allohexaploids (2.1%) (data not shown). Furthermore, multivalent formation was lower in those allohexaploids that show the most regular homologous pairing, such as TC36 and TC109 (data not shown), as well as the natural allohexaploid wheat lines. Euploid plants displaying one multivalent in only one PMC (9.4% for synthetic and 4.3% for natural wheat allohexaploids) were kept and included in the analysis presented in Table 2.

Progenitor-dependent variability and evolution of homologous pairing across early generations Pairing was regular and almost restricted to homologous chromosomes in the two natural hexaploid wheat cultivars used as controls (Table 2). Most chromosomes paired with their homologues to form essentially ring bivalents, but rod bivalents and univalents are also observed, resulting in a NBCA close

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Table 2 Chromosome configurations and aneuploid frequencies observed across the first three generations (S0, S1 and S2) of the 10 synthetic wheat allohexaploids as well as across three experiments of two cultivars of natural wheat allohexaploids

		Meiotic analysis: mean number of the chromosome configuration types per PMC[b]						Mitotic analysis	
Synthetic and natural wheat allohexaploids[a]	Generations	Analysed euploid plants	Univalents	Bivalents			Tri- & tetravalents[c]	Euploid plants	Aneuploid plants
				Total	Ring	Rod			
TC36	S0	–	–	–	–	–	–	16	0
	S1	1	0.28	20.85	19.66	1.19	0	37	4
	S2	4	0.5	20.75	17.78	2.97	0	19	0
TC54	S0	6	0.64	20.63	16.77	3.86	0.02	12	7
	S1	12	0.45	20.74	16.64	4.10	< 0.01	107	11
	S2	12	0.42	20.79	16.82	3.97	0	98	7
TC59	S0	5	0.66	20.67	16.74	3.93	0	6	4
	S1	14	0.46	20.76	16.46	4.3	0.02	90	9
	S2	10	0.40	20.80	17.11	3.69	0	75	7
TC109	S0	8	0.11	20.94	19.49	1.45	< 0.01	18	2
	S1	16	0.24	20.88	18.05	2.83	< 0.01	150	5
	S2	16	0.15	20.92	18.89	2.03	< 0.01	127	5
TC110	S0	3	0.99	20.5	16.36	4.14	0	6	6
	S1	5	0.44	20.78	16.38	4.40	0	53	6
	S2	6	0.52	20.74	16.18	4.56	< 0.01	52	2
JOY25	S0	6	4.42	18.79	11.52	7.27	0	7	3
	S1	13	8.72	16.64	7.20	9.44	0	82	36
	S2	7	6.95	17.54	8.64	8.9	0	53	54
JOY36	S0	1	1.55	20.22	15.17	5.05	0	14	11
	S1	5	2.33	19.83	13.7	6.13	0	19	12
	S2	4	2.12	19.93	13.81	6.12	0	21	16
JOY54	S0	8	1.56	20.22	15.11	5.11	0	22	3
	S1	13	3.01	19.5	12.59	6.91	0	114	38
	S2	17	1.36	20.32	14.90	5.42	< 0.01	94	47
JOY109	S0	6	0.40	20.80	18.03	2.77	0	14	6
	S1	13	0.5	20.74	18.08	2.66	0	84	13
	S2	10	0.68	20.66	17.24	3.42	< 0.01	79	8
JOY110	S0	5	2.61	19.69	13.18	6.51	0	15	4
	S1	16	2.67	19.67	13.10	6.57	< 0.1	67	31
	S2	12	2.1	19.95	13.69	6.26	0	54	21
cv Courtot		5	0.16	20.92	18.69	2.23	0	19	1
		9	0.16	20.92	18.70	2.22	< 0.01	88	2
		9	0.12	20.94	19.15	1.79	0	70	1
cv Isengrain		5	0.24	20.88	19.10	1.78	0	20	0
		10	0.18	20.91	19.25	1.66	< 0.01	93	3
		8	0.26	20.86	18.97	1.88	< 0.01	88	3

[a]A detailed description of synthetic allohexaploids is given in Table 1.
[b]At least 50 pollen mother cells (PMCs) were analysed per plant.
[c]Plants presenting multivalents in more than one PMC out of 50 analysed were discarded, along with their progenies.

to 40 in these natural allohexaploids (Table 2, Fig. 4). In comparison, the mean NBCA per PMC for the 10 synthetic wheat allohexaploid in generation S0 varied from 30.16 for JOY25 to 39.73 for TC109; the latter is close to that of the two wheat cultivars (Table 2, Figs 3b,c, 4). Interestingly, a significantly higher ($P < 0.01$) frequency of pairing was observed in TC allohexaploids derived from a cross involving Tetra Courtot as the AB genome donors (NBCA varying from 36.87 to 39.73) than in the JOY allohexaploids involving cv Joyau (NBCA varying from 30.16 to 38.52) (Table 2, Fig. 4). Similarly, *A. tauschii* ssp. *strungulata* acc. 109 gave synthetic allohexaploids displaying more chromosome associations with both tetraploid AB genome progenitors than any other *A. tauschii* accession (Figs 3b, 4, Table 2). Both high and low frequencies of pairing were displayed in synthetic allohexaploids with accessions from both subspecies of *A. taushcii* (Figs 3c, 4, Table 2). Thus, the data do not highlight any evidence of general subspecies effect of *A. tauschii*.

The frequency of pairing did not vary across generations S1 and S2 of the five TC synthetic allohexaploids (Table 2, Fig. 4), except for TC36, in which differences were

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

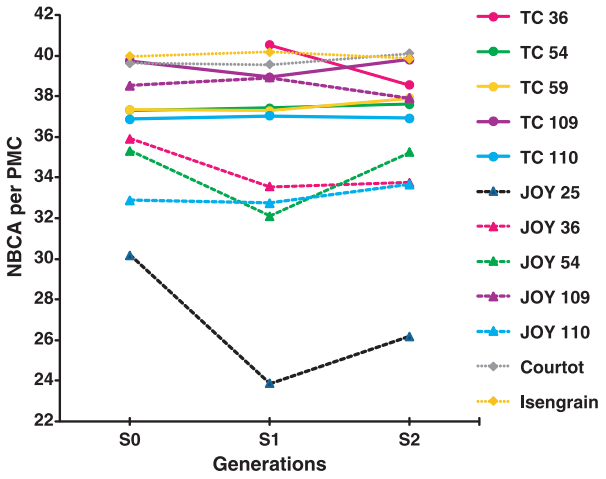

Fig. 4 Evolution of chromosome pairing, illustrated by the mean number of bound chromosome arms (NBCA), in 10 synthetic wheat allohexaploids across generations S0, S1 and S2 as well as in cultivars Courtot and Isengrain of the natural hexaploid wheat. Detailed description of the 10 synthetic wheat allohexaploids is given in Tables 1 and 2. NBCA were calculated as follows: (1 × rod bivalents) + (2 × ring bivalents) + (2 × chain trivalents) + (3 × chain tetravalent) + (4 × ring tetravalent). At least 50 pollen mother cells (PMCs) were analysed per plant and the mean value per PMC is presented.

observed (NBCA equal to 40.51 and 38.53 for S1 and S2, respectively). This can be an effect of sampling for this particular synthetic allohexaploid, as only one plant was analysed in the S1 generation. By contrast, the frequency of homologous pairing for the group of JOY synthetic allohexaploids, except JOY110, was more variable across generations, although it was consistently lower than any corresponding TC allohexaploid having the same D genome donor (Fig. 4). For example, the two synthetic allohexaploids, JOY25 and JOY54, display a more noteworthy lack of pairing in the S1 generation (Fig. 4). This could explain the fact that, besides the effects of AB and D genome variability (see below discussion), significant generation as well as genotype × generation effects were observed ($P < 0.0001$). On the other hand, whatever the variation observed, Fig. 4 does not show any tendency towards an increase or decrease of pairing across generations. Moreover, within each synthetic allohexaploid, the different progenies were separately examined and none of them indicated any trend toward a more or less regular homologous pairing when compared with others (data not shown).

Formation and genome origin of univalents Lack of homologous pairing resulted in more univalents as well as rod bivalent formation (Table 2).

The use of the GISH method, which allows the resolution of the A, B and D genomes with three different painting colours (see the Materials and Methods section) allows us to check whether pairing failure, leading to univalent formation, affects these three component wheat genomes equally. This has been investigated for four synthetic and two natural wheat allohexaploids (Table 3). Although there was a significant difference between the S0 and S1 data for TC54 and JOY54, the pattern of univalency was consistent over the generations and for the four synthetic wheat allohexaploids. Univalency is mainly observed for the D genome, and then to a slightly lesser extent for the B genome, whereas frequency of A univalents is significantly lower (Table 3). In the two natural wheat allohexaploids, the three genomes were affected equally.

Aneuploidy in S1 and S2 generations

We evaluated the frequency of aneuploidy and its evolution across the S1 and S2 generations of the 10 synthetic wheat allohexaploids. The number of analysed plants was higher in these generations than in the S0 generation as there was no limit in seed availability (Table 2).

A significant effect of the AB genome progenitor was observed in both S1 and S2 generations. This effect is similar to that observed for meiotic pairing (Table 2). On average, TC allohexaploids produced 7.4 and 5.4% aneuploids in the S1 and S2 generations, respectively, whereas the frequency of aneuploidy for JOY allohexaploids was higher, with 26.2 and 32.7%, respectively. There was also a significant effect of the D genome-progenitor genotypes. For example, TC109 exhibited the lowest frequency of aneuploids (3.6%), which is similar to that observed in the two reference natural hexaploid wheat cultivars (2.6%, over three different evaluations) (Table 2).

Table 3 Genomic origin of univalents observed in generations S0 and S1 of four synthetic wheat allohexaploids

Wheat allohexaploids	Generations	Number of univalents	Genomic source (%)		
			A	B	D
Synthetic					
TC54	S0	100	14	50	36
	S1	196	2.04	48.98	48.98
	Mean		8.02	49.49	42.49
TC110	S0	100	8	40	52
	S1	168	3.6	42.86	53.57
	Mean		5.8	41.43	52.78
JOY54	S0	100	0	24	76
	S1	196	3.06	52.04	44.90
	Mean		1.53	38.02	60.45
JOY110	S0	100	4	44	52
	S1	198	2.02	45.45	52.53
	Mean		3.01	44.72	52.27
Natural					
Courtot		25	36	32	32
Isengrain		53	33.96	33.96	32.08

A detailed description of synthetic allohexaploids is given in Table 1.

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

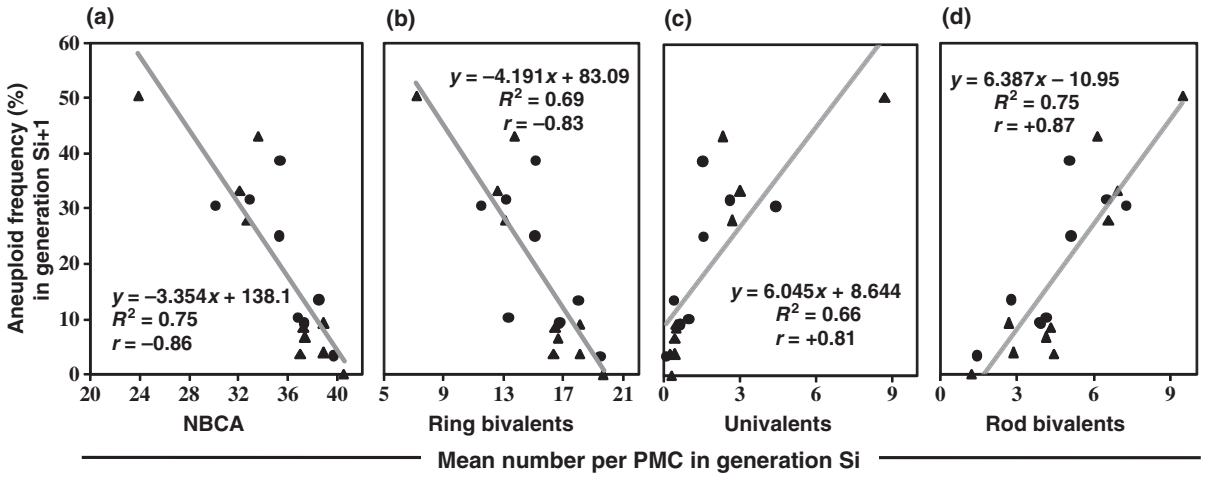

Fig. 5 Correlations between different components of the meiotic behaviour assessed for the S*i* generation (S0 and S1) of 10 synthetic allohexaploids and the frequency of aneuploidy, observed in the subsequent S*i* +1 (S1 and S2) generation. Each component of meiotic behaviour is indicated at the bottom of the corresponding graph. Circles, S0/S1 comparison; triangles, S1/S2 comparison. Detailed description of the 10 synthetic wheat allohexaploids is given in Tables 1 and 2.

Correlation between meiotic behaviour and aneuploid formation

We addressed the effects of incomplete homologous pairing, which led to the formation of univalents and rod bivalents, on chromosomal stability and aneuploid formation. This question was evaluated for the 10 synthetic allohexaploids by calculating correlations between the components of meiotic behaviour, such as frequencies of univalents, rod and ring bivalents, NBCA per PMC, in generations S0 and S1 and the frequency of aneuploidy observed in subsequent generations (Fig. 5).

A significant negative correlation ($r = -0.86$) was observed between aneuploid frequency in generations S1 and S2 and the NBCA in generations S0 and S1 (Fig. 5a), as well as with the mean number of ring bivalents ($r = -0.83$, Fig. 5b).

By contrast, the significant positive correlation ($r = +0.81$) between the average number of univalents per PMC and the frequency of aneuploids (Fig. 5c) suggested that some of the univalents were laggard chromosomes, for which migration to the poles was altered. The mean number of rod bivalents per PMC was highly correlated with aneuploidy ($r = +0.87$, Fig. 5d) as well as with number of univalents ($r = +0.88$).

Altogether, these observations suggest that the higher the number of univalents and/or rod bivalents observed during meiosis, the higher the frequency of aneuploid plants that will be observed in the subsequent generation.

No evidence for DNA rearrangement as evaluated by PCR-based markers

For analysis of structural changes at the DNA level, we chose in this study four synthetic allohexaploids, TC36, TC54, JOY36 and JOY54, which allow comparison of two AB genome progenitors, each crossed with two D genome progenitors (Tables 1, 4).

Euploid plants from the S0, S1 and S2 generations with the expected number of 42 chromosomes and regular meiosis were analysed and compared with their respective progenitors, using various types of PCR-based markers (Table 4). DNA mixture of the two progenitors was also analysed as a control for the additivity hypothesis.

At the whole-genome level, analyses were conducted with 141 SSR markers (Sourdille *et al.*, 2004) that were chosen in a way to cover each of the 42 wheat chromosome arms with two to four markers. An analysis with higher-density marker coverage was also conducted with 792 markers developed from EST sequences that map to wheat homoeologous group 3 (Qi *et al.*, 2004) and 206 other markers developed from BAC-end sequences (Paux *et al.*, 2006, 2008) that map to wheat chromosome 3B specifically. These latter markers were composed primarily (87%) of transposable element sequences (Paux *et al.*, 2006, 2008; Charles *et al.*, 2008). Thus, the three types of markers allowed us to test three different classes of wheat DNA sequences, with putatively different selection pressures.

Based on the pattern of amplification observed on the progenitor species, PCR-based markers were classified as one of the following:

(1) Monomorphic amplification patterns. These normally amplify both progenitor alleles and allow the identification of genomic rearrangements if one of the homoeoalleles changes in size or if both homoeoalleles are eliminated in synthetic wheat allohexaploids.

(2) Polymorphic amplification patterns. These can consist of either of the following:

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Table 4 Summary of PCR-based markers analysed across three successive generations (S0, S1 and S2) of four synthetic wheat allohexaploids as compared with their respective progenitors and with *in vitro* mixtures of parental DNAs

Marker types	Synthetic allohexaploids[a]	Total number of markers		Monomorphic	Polymorphic	
		Tested	Scored		PAP	ASP
ESTs	JOY36	792	652[b] + 23[c]	524 [b] + 8[c]	102[b] + 12[c]	26 [b] + 7[c] (19 + 3)
	JOY54	792	652 + 25	524 + 8	102 + 10	26 + 7 (19 + 4)
	TC36	792	652 + 31	524 + 10	102 + 13	26 + 8 (19 + 3)
	TC54	792	652 + 30	524 + 11	102 + 12	26 + 7 (19 + 4)
SSR	JOY36	141	58 + 17	7 + 0	34 + 6	17 + 11 (9 + 7)
	JOY54	141	58 + 17	7 + 4	34 + 4	17 + 9 (9 + 4)
	TC36	141	58 + 17	7 + 3	34 + 6	17 + 8 (9 + 4)
	TC54	141	58 + 17	7 + 5	34 + 4	17 + 8 (9 + 5)
BAC sequence-based	JOY36	93	73 + 8	8 + 2	58 + 3	7 + 3 (6 + 1)
	JOY54	93	73 + 8	8 + 2	58 + 4	7 + 2 (6 + 1)
	TC36	93	73 + 8	8 + 1	58 + 3	7 + 4 (6 + 2)
	TC54	93	73 + 8	8 + 1	58 + 4	7 + 3 (6 + 1)
Supplementary BAC sequence-based	JOY36 and JOY54	113	52	7	43 (0)	2 (1)

ASP, PAP, allele size and presence/absence polymorphisms observed between progenitors, respectively; ESTs, expressed sequence tags; SSR, simple sequence repeat; BAC, bacterial artificial chromosome.
Numbers in brackets refer to the number of nonadditive patterns observed in all allopolyploid plants but also in the *in vitro* mixture of parental DNAs and thus resulting from a PCR competition between homoeoalleles.
Marker primer sequences and detailed PCR profiling are supplied in Supporting Information, Table S1.
[a]A detailed description of synthetic allohexaploids is given in Table 1.
[b]These markers show similar profiling and polymorphism in all four couples of AB and D genome progenitors and derived synthetic allohexaploids.
[c]These markers show specific polymorphism in the corresponding AB and D genome progenitors and the derived synthetic allohexaploid.

(a) presence/absence polymorphism (PAP), where only one progenitor allele is amplified in one of the progenitor species;
(b) allele size polymorphism (ASP), where both progenitor alleles are amplified in progenitor species but exhibit band size polymorphism.

Presence/absence polymorphism and ASP markers could allow the identification of a single parental homoeoallele rearrangement that can be either elimination, and in this case no PCR amplification of the specific allele is observed, or amplification of another and/or additional bands of different sizes.

Results on all four synthetic wheat allohexaploids for all types of markers, reproduced in two different PCR experiments, are summarized in Table 4, and examples of profiling of the main marker types are presented in Fig. 6.

Some of the markers gave very complex and nonspecific PCR amplification patterns and were discarded. However, more than 831 markers (81%) were scored on all four synthetic wheat allohexaploids in addition to the 52 BAC sequence-derived markers tested only on JOY allohexaploids (Table 4).

As could be expected for expressed and, most likely, coding sequences, our analysis revealed that almost 78.4% of the EST-based markers amplified at least one homoeoallele in each progenitor species (Table 4). This left 16.8% homoeoallele-specific EST-based markers, exhibiting PAP (112–115, depending on the synthetic allohexaploid considered), which when added to 4.8% of ASP (33–34 markers) represented 21.6% of the EST-based polymorphic markers.

The amplification of both progenitor homoeoalleles decreased significantly for the other two types of PCR-based markers. Indeed, 52% of SSR markers (38–40, depending on the synthetic allohexaploid considered) and 75.9% of BAC sequence-derived markers (61–62) were homoeoallele-specific, exhibiting PAP (Table 4). These, when added to 34.6 and 12.3% of the observed ASP, represented a total of 86.6% SSRs and 88.2% BAC sequence-derived markers that were polymorphic between progenitor species.

It is important to note that most of the monomorphic (98, 58 and 80% of EST-derived, SSR, and BAC sequence-derived, respectively), ASP (76, 61 and 64% of EST-derived, SSR, and BAC sequence-derived, respectively) and PAP (88% for all three types) markers were shared among all four progenitor species. Thus, the majority of the exhibited polymorphism was among progenitor species, and intraspecies polymorphism was very low (Table 4). Few EST-based markers were found to be polymorphic between AB progenitors (1.6%) or D progenitors (3.7%), while 26.5% of the SSR markers were polymorphic between Joyau and Tetra Courtot, and 46.4% between both *A.*

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

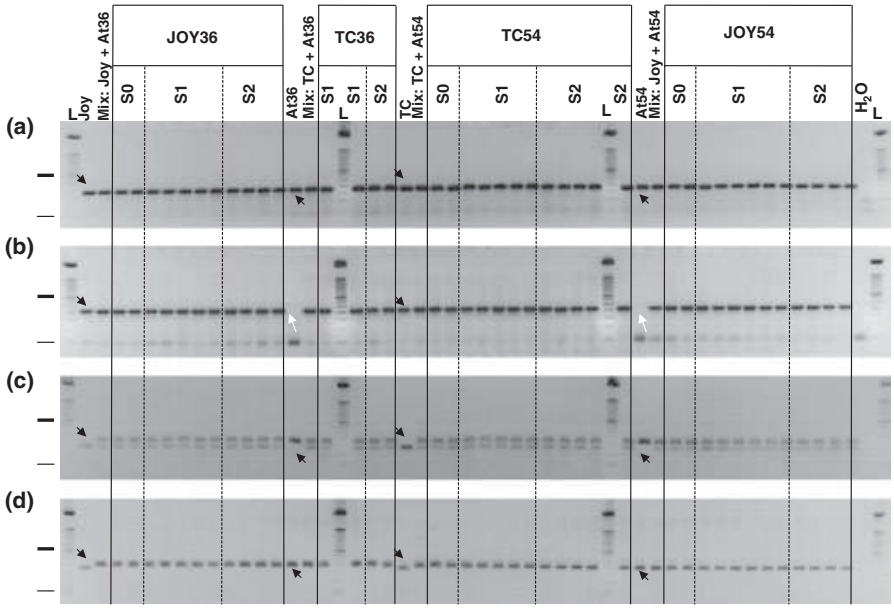

Fig. 6 Examples of main types of PCR-based markers profiled on plants from generations S0, S1 and S2 of four synthetic wheat allohexaploids, their respective progenitors and the mixture of equal amounts of progenitor DNAs. (a) A PCR-based marker showing no polymorphism between progenitors (monomorphic) and no change in synthetic allohexaploids. (b) A PCR-based marker showing a presence/absence polymorphism (PAP) and additivity in the analysed plants of the synthetic allohexaploids. (c) A PCR-based marker showing allele size polymorphism (ASP) between progenitors (indicated by arrows) and complete additivity (amplification of both homoeoalleles) in the analysed plants of the synthetic allohexaploids and in mixtures of progenitor DNA. (d) A PCR-based marker showing ASP between progenitors and apparent nonadditivity (amplification of one single homoeoallele) in all the analysed plants of the synthetic allohexaploids as well as mixtures of progenitor DNA. This deviation from additivity is the result of competition for PCR amplification between progenitor homoeoalleles and not of DNA rearrangements. Three per cent gel agarose was used. Black arrows, amplified homoeoalleles of AB genome progenitor or D genome progenitor; white arrows, nonamplified homoeoalles for PAP. L, 50 pb ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); bands of size 350 and 50 bp are indicated by thick and thin dashes on the left of gels. MIX, a mixture of equal amounts of progenitor DNA used as control for the additivity hypothesis. Joy and TC, cv Joyau and cv Tetra Courtot progenitors of AB genome, respectively. At36 and At54, accessions 36 and 54 of the *Aegilops tauschii* progenitor of the D genome, respectively. H_2O: control; where water was used instead of DNA. S0, S1 and S2, plants of the selfed generations S0, S1 and S2 of the four synthetic allohexaploids. Each lane represents a different plant.

tauschii subspecies (data not shown). On the other hand, 7 and 10.5% of the BAC sequence-derived markers were polymorphic between tetraploid and diploid progenitors, respectively (data not shown).

None of the tested plants of the four synthetic wheat allohexaploids showed rearrangements of parental alleles for all of those markers classified as monomorphic (Table 4, Fig. 6a). It is important to note that for these monomorphic markers, it was not possible to check whether one of the progenitor homoeoalleles was deleted and/or rearranged (and thus not amplified) in the synthetic allohexaploid, because the other homoeoallele amplified a band of the same size.

Similarly, all of those markers exhibiting PAP between progenitors were amplified in all tested plants of the four synthetic allohexaploids and thus showed no evidence for rearrangements regardless of which sequence class they were derived from (Table 4, Fig. 6b).

By contrast, nonadditive amplification patterns were observed for an important proportion of ASP markers (68% for EST-derived, 54% for SSRs and 73% of BAC sequence-derived). In these cases, only one of the progenitor homoeoalleles was amplified in all tested plants and generations of a given wheat synthetic allohexaploid and also in the mixture of progenitor DNAs (Table 4, Fig. 6d). This indicates that the missing allele was not the result of sequence elimination but likely resulted from a competition for PCR amplification of both progenitor homoeoalles in a single sample aliquot.

Altogether, the results obtained showed no evidence for apparent DNA rearrangements or sequence elimination in the analysed synthetic wheat allohexaploids.

Discussion

In order to understand key mechanisms leading to stabilized allopolyploid species, we characterized the meiotic behaviour of wheat allohexaploids in relation to structural and genetic changes. The stability of synthetic allohexaploids was shown to be dependent on the variability of *T. turgidum* and *A. tauschii* wheat species, donors of the AB and D genomes, respectively, in which a few combinations behave like natural wheat allohexaploids in terms of meiotic stability and reduced aneuploidy.

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Stability and success of a polyploid species depend on the regularity of chromosome association in meiocytes. Most of the synthetic allohexaploids exhibit chromosomes that pair with their homologues at metaphase I of meiosis to form bivalents, whereas others do not pair and form univalents. We did not observe any evidence for homoeologous pairing, indicating that the *Ph1* gene is efficient as a suppressor of homoeologous pairing in both the synthetic and natural wheat allohexaploids. Thus, the origin of formation of multivalents might be related to other mechanisms than homoeologous recombination. Indeed, it was proposed some time ago that univalents in wheat are subjected to centric misdivision and chromosome breakage, which can fuse to give rise to translocated chromosomes (Sears, 1952) that are not formed by homoeologous recombination. If the latter are transmitted to progeny, the resultant genotypes would be genetically unbalanced, with meiosis necessarily showing more or less multivalent formation. Another common phenomenon that also occurred in polyploid wheat is apparent euploidy, that is, plants having the expected number of chromosomes but corresponding in reality to trisomy for one chromosome and monosomy for its homoeologue could lead to multivalent formation. These explanations for multivalent formation are supported by the fact that the observed frequency of plants displaying multivalents was higher in those allohexaploids exhibiting higher univalent formation (data not shown). Moreover, multivalents were more frequent in the S0 than in the S1 and S2 generations (11, 4.8 and 5.3% for the S0, S1, and S2 generations, respectively). The S0 generation is the selfed progeny of F1 haploid interspecific hybrids in which nearly all chromosomes were unpaired, thus probably giving more translocated chromosomes or more unbalanced chromosome transmission in the following generation. In natural hexaploid wheat, one PMC with a multivalent is usually observed (Table 2). Therefore, all euploid plants displaying a multivalent in more than one PMC were systematically discarded, and their progenies were not kept for analysis in subsequent generations in order to allow comparison of homologous pairing, considering only the most likely confirmed euploid plants.

The GISH method used in our study allows assignment of the formed univalents to the A, B or D genomes. Our observations on natural wheat allohexaploids corroborated those of Sallee & Kimber (1978), which showed that the frequency of homologous pairing is similar for the three genomes. However, it was intriguing to find out that the pattern of univalency was different in synthetic wheat allohexaploids where few univalents belong to the A genome. Bennett & Smith (1972) and Bennett & Kaltsikes (1973) found that the duration of meiosis in cereals is generally shorter in polyploids than in diploids. This different kinetics of meiosis could explain the failure of pairing, and consequently unbalanced univalent formation for the D genome, of which the ploidy context suddenly 'changed' from diploid (in *A. tauschii*) to hexaploid (in the synthetic allohexaploids) levels. The failure of pairing would be a direct consequence of change in ploidal level. However, the different kinetics of meiosis cannot explain why univalents are more frequent for the B than for the A genome: both genomes were 'co-resident' in the same nucleus, and their meiosis was regular in both *T. turgidum* Tetra Courtot and Joyau (data not shown). Deeper investigations, such as the study of univalency in tetraploid wheat, are needed to explain this phenomenon.

Aneuploidy is common in natural allohexaploid wheat (Riley & Kimber, 1961), probably because of its hexaploid nature, making it more tolerant to loss or addition of a chromosome or a chromosome arm. This ability has been largely exploited to develop monosomic, ditelosomic, double ditelosomic and nullitetrasomic wheat lines (Sears, 1954) that were useful to locate genetic factors on the chromosomes (Law & Worland, 1973). The basis of occurrence of aneuploids is still poorly understood, although variability between hexaploid lines and varieties was observed (Worland & Law, 1985; Storlie & Talbert, 1993) and cause, in some cases, homogeneity problems, hindering their registration as commercial varieties.

Even though less material was analysed, the frequency of aneuploids is higher in the S0 than in the S1 and S2 generations of TC and JOY synthetic wheat allohexaploids. This may be explained by the fact that aneuploidy is a consequence of the process involved in the formation of the S0 generation, which is different from that of S1 and S2 generations. For the S0 generation, doubling of chromosomes has been considered as resulting from the production of unreduced gametes, caused by failure of nuclear division (restitution nuclei), in F1 haploid interspecific hybrids, which is favored by univalency of chromosomes in most PMCs of these *Ph1*-carrying hybrids (Fukuda & Sakamoto, 1992; Xu & Dong, 1992; Jauhar, 2007; and our results). One or more chromosomes may be excluded from the restitution nuclei, during unreduced gamete formation, leading to aneuhaploid gamete and then to aneuploid S0 plants. By contrast, plants of S1 and S2 generations are the progenies of S0 and S1 euploid plants, where gametes are reduced. In this case, aneuploidy was shown to be the consequence of incomplete homologous chromosome pairing, leading to univalent formation at metaphase I of meiosis of the preceding generation.

We showed an effect of genotypes of the AB and D progenitors on the stability of the resulting allohexaploids. Meiotic behaviour was much more regular and aneuploid frequency was lower in the synthetic wheat allohexaploids involving Tetra Courtot as the AB genome progenitor than in those involving *T. turgidum* cv Joyau. This could be explained by the origin of Tetra Courtot which has been extracted from the natural wheat allohexaploid, *T. aestivum* cv Courtot. It is possible that the AB genome extracted

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

from a natural wheat allohexaploid might have been selected or might have undergone modifications for more regular meiotic behaviour and thus genomic stability. Similarly, our results showed that meiotic and chromosomal stability of the wheat allohexaploids depends on the genotype of the *A. tauschii* D genome progenitor. Overall, it seems that regulatory networks for meiosis in both the diploid and the tetraploid progenitors act additively in the synthetic wheat allohexaploids. Indeed, the most regular meiosis and lowest aneuploid frequency were observed when combining *A. tauschii* ssp. *strangulata* accession 109 with Tetra Courtot, which leads to more stable polyploids than those from any other progenitor genotypes. It would be interesting to map and identify these genes using, for example, a segregating population between two contrasting TC and JOY synthetic allohexaploids. The progenitor-dependent stability of wheat allohexaploids corroborates findings that only one or a few hybridization events led to the present-day natural wheat allohexaploids (Talbert *et al.*, 1998), which may have been retained for stability through natural and human selection. More generally, it may also explain discrepancies in stability between natural and synthetic forms observed for other allopolyploid models (Pontes *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2007).

Various levels of DNA sequence rearrangements have been reported for different allopolyploid plant models, such as *Brassica* (Song *et al.*, 1995; Lukens *et al.*, 2006; Gaeta *et al.*, 2007; Szadkowski *et al.*, 2010), *Triticale* (Ma *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2008) and *Arabidopsis* (Comai *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2004; Madlung *et al.*, 2005), while no evidence for sequence elimination was found in synthetic cotton allopolyploids (Liu *et al.*, 2001) and other wheat allohexaploids (He *et al.*, 2003).

Our study shows that none of the four analysed synthetic wheat allohexaploids displayed, across the first three generations, 'real' nonadditive variation of the PCR-based markers developed from three different classes of DNA sequences (SSRs, TE-based, ESTs) (Table 4). Similarly, no evidence for sequence elimination was observed for silenced transcripts of synthetic wheat allohexaploids (He *et al.*, 2003; Bottley *et al.*, 2006; V. Chagué, J. Just, I. Mestiri, S. Balzergue, A-M. Tanguy, C. Huneau, V. Huteau, H. Belcram, O. Coriton, J. Jahier, B. Chalhoub, unpublished), whereas other investigations reported important sequence elimination in other wheat synthetic allopolyploids (Feldman *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998a,b; Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001; Kashkush *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005). These different conclusions can be better explained by considering both the wheat genome combinations and technical/analytical differences among studies from the other hand. First, conclusions on the importance of rapidly eliminated DNA sequences in wheat allopolyploids were based on some allotetraploids that do not have the *Ph1* gene (Shaked *et al.*, 2001), although allohexaploids were also reported as showing rearrangements for a few loci (Liu *et al.*, 1998a,b; Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001). Second, in these latter cases, the methods used to assess DNA sequence elimination were based on methyl-sensitive or nonsensitive restriction enzymes. Furthermore, although both Southern blot and amplified fragment length polymorphism (AFLP) banding patterns were reproducible, no *in vitro* mixture of parental DNA was used to test the hypothesis of deviation from additivity (Liu *et al.*, 1998a,b; Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001). Our molecular investigation showed that apparent deviation from additivity was similar in all four synthetic allohexaploids and in the mixture of parental DNAs, allowing us to conclude that it most likely resulted from something other than DNA elimination, such as homoeoallele competition during PCR amplification.

Finally, it is important to note that in all previously studied wheat allopolyploids, all progenies of a given synthetic allopolyploid showed the same pattern of rearranged or nonrearranged markers (Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001). In contrast to these data, differences between individual plants of *Brassica* synthetic allopolyploids were observed and were shown to be driven by homoeologous recombination or transposition (Song *et al.*, 1995; Lukens *et al.*, 2006; Gaeta *et al.*, 2007; Szadkowski *et al.*, 2010). This high amount of homoeologous recombination could not occur in our synthetic allohexaploid wheat carrying the *Ph1* gene, which restricts meiotic pairing to homologous chromosomes, which was also confirmed in the present study.

Nevertheless, the apparent genome additivity observed in the early generations of the synthetic wheat allohexaploids analysed in the present study or in other studies (He *et al.*, 2003) does not exclude 'for ever' the possibility of the occurrence of other genetic changes, nor does it refute the conclusions from previous work (Feldman *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998a,b; Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.*, 2001). The ideal demonstration that genetic changes do occur in allohexaploid wheat is the observation that the extracted AB components show reduced viability and vigour and exhibit a high incidence of sterility (Kerber, 1964; Kaltsikes *et al.*, 1969; and our observations), as compared with *T. turgidum* spp. *dicoccum*. These observations are also corroborated by rearrangements, other than homoeologous recombinations, revealed when analysing specific loci of natural wheat allopolyploids. This is exemplified by rearrangements leading to the *Ph1* gene (Griffiths *et al.*, 2006) or by those observed at the *Hardness* locus of polyploid wheats (Chantret *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Ragupathy & Cloutier, 2008). Thus, the importance and rate of genetic changes should be considered and scaled based on their occurrence during the short- and long-term periods of wheat allohexaploid evolution. Buggs *et al.* (2009) observed that gene loss and silencing occurred in the natural allotetraploid *Tragopogon*

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

miscellus but not in the newly synthetic allotetraploid, thus illustrating possible progenitor as well as long-term evolutionary effects.

In conclusion, our investigation pinpoints particular aspects of response to polyploidy in wheat allohexaploids having the *Ph1* gene that prevents homoeologous chromosome pairing. Progenitor-dependent irregularities in homologous chromosome pairing lead to variability in aneuploidy. The latter represents the major structural change observed in the early generations of the euploid wheat allohexaploids, whereas no DNA sequence elimination or other rearrangements were observed.

Acknowledgements

This project was supported by the ANR (Agence Nationale pour la Recherche)-Biodiversité project (ANR-05-BDIV-015). IM was funded by a fellowship of the French Research Ministry (MENRT). We sincerely thank Professor M. Feldman (Weizmann Institute of Science, Israel) for valuable discussions, the editor Pamela Soltis and anonymous reviewers for valuable criticisms and for help improving the presentation of the paper.

References

Adams KL, Wendel JF. 2005a. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 135–141.

Adams KL, Wendel JF. 2005b. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* **21**: 539–543.

Bennett MD, Kaltsikes PJ. 1973. The duration of meiosis in a diploid rye, a tetraploid wheat and a hexaploid triticale derived from them. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **15**: 671–679.

Bennett MD, Smith JB. 1972. The effects of polyploidy on meiotic duration and pollen development in cereal anthers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **181**: 81–107.

Bento M, Pereira HS, Rocheta M, Gustafson P, Viegas W, Silva M. 2008. Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in triticale. *PLoS ONE* **3**: e1402.

Blake NK, Lehfeldt BR, Lavin M, Talbert LE. 1999. Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat. *Genome* **42**: 351–360.

Blanc G, Wolfe KH. 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**: 1667–1678.

Bottley AM, Xia G, Koebner RMD. 2006. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat. *Plant Journal* **47**: 897–906.

Buggs RJ, Doust AN, Tate JA, Koh J, Soltis K, Feltus FA, Paterson AH, Soltis PS, Soltis DE. 2009. Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. *Heredity* **103**: 73–81.

Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P *et al.* 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* **17**: 1033–1045.

Charles M, Belcram H, Just J, Huneau C, Viollet A, Couloux A, Segurens B, Carter M, Huteau V, Coriton O *et al.* 2008. Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. *Genetics* **180**: 1071–1086.

Chen ZJ. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 377–406.

Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**: 836–846.

Comai L, Tyagi AP, Lysak MA. 2003. FISH analysis of meiosis in Arabidopsis allopolyploids. *Chromosome Research* **11**: 217–226.

Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* **12**: 1551–1568.

Coriton O, Barloy D, Huteau V, Lemoine J, Tanguy AM, Jahier J. 2009. Assignment of *Aegilops variabilis* Eig chromosomes and translocations carrying resistance to nematodes in wheat. *Genome* **52**: 338–346.

Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A *et al.* 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* **16**: 738–749.

Feldman M, Levy AA. 2005. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 250–258.

Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA, Vega JM. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* **147**: 1381–1387.

Feldman M, Lupton F, Miller T. 1995. *Wheats*. London, UK: Longman Scientific.

Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J. 2008. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* **6**: 16.

Fukuda K, Sakamoto S. 1992. Cytological studies on unreduced male gamete formation in hybrids between tetraploid emmer wheats and *Aegilops squarrosa* L. *Japanese Journal of Breeding* **42**: 255–266.

Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* **19**: 3403–3417.

Griffiths S, Sharp R, Foote TN, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, Moore G. 2006. Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**: 749–752.

Han F, Fedak G, Guo W, Liu B. 2005. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. *Genetics* **170**: 1239–1245.

He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. 2003. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* **52**: 401–414.

Hovav R, Udall JA, Chaudhary B, Rapp R, Flagel L, Wendel JF. 2008. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**: 6191–6195.

Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P. 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 8133–8138.

Jahier J, Tanguy AM. 1992. Appariement des chromosomes chez les triticées. In: Jahier J, ed. *Techniques de cytogénétique végétale*, 46–47 INRA Editions, Paris, France.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C *et al.* 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–467.

Jauhar PP. 2007. Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force. *Journal of Heredity* **98**: 188–193.

Kaltsikes PJ, Evans LE, Larter EN. 1969. Morphological and meiotic characteristics of the extracted AABB tetraploid component of three

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

varieties of common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **11**: 65–71.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* **160**: 1651–1659.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* **33**: 102–106.

Kerber ER. 1964. Wheat: reconstitution of the tetraploid component (AABB) of hexaploids. *Science* **143**: 253–255.

Kihara H. 1944. Discovery of the DD analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agricultural Horticulture* **19**: 889–890.

Kihara H. 1954. Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser-method. *Cytologia* **19**: 336–342.

Law CN, Worland AJ. 1973. Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis. *Plant Breeding Institute annual report for 1972*: 25–65.

Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* **320**: 481–483.

Levy AA, Feldman M. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 607–613.

Li W, Huang L, Gill BS. 2008. Recurrent deletions of puroindoline genes at the grain hardness locus in four independent lineages of polyploid wheat. *Plant Physiology* **146**: 200–212.

Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC, Wendel JF. 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **44**: 321–330.

Liu B, Vega JM, Feldman M. 1998a. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* **41**: 535–542.

Liu B, Vega JM, Segal G, Abbo S, Rodova M, Feldman M. 1998b. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome* **41**: 272–277.

Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn T. 2006. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiology* **140**: 336–348.

Ma XF, Fang P, Gustafson JP. 2004. Polyploidization-induced genome variation in triticale. *Genome* **47**: 839–848.

Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L. 2005. Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. *Plant Journal* **41**: 221–230.

McFadden ES, Sears ER. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* **37**: 81–89.

Nesbitt M, Samuel D 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. In: *First International Workshop on Hulled Wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 4*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 41–100.

Nicolas SD, Le Mignon G, Eber F, Coriton O, Monod H, Clouet V, Huteau V, Lostanlen A, Delourme R, Chalhoub B *et al.* 2007. Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of *Brassica napus* haploids. *Genetics* **175**: 487–503.

Ozkan H, Levy AA, Feldman M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* **13**: 1735–1747.

Paux E, Roger D, Badaeva E, Gay G, Bernard M, Sourdille P, Feuillet C. 2006. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant Journal* **48**: 463–474.

Paux E, Sourdille P, Salse J, Saintenac C, Choulet F, Leroy P, Korol A, Michalak M, Kianian S, Spielmeyer W *et al.* 2008. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* **322**: 101–104.

Pontes O, Neves N, Silva M, Lewis MS, Madlung A, Comai L, Viegas W, Pikaard CS. 2004. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**: 18240–18245.

Qi LL, Echalier B, Chao S, Lazo GR, Butler GE, Anderson OD, Akhunov ED, Dvorak J, Linkiewicz AM, Ratnasiri AA *et al.* 2004. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* **168**: 701–712.

Ragupathy R, Cloutier S. 2008. Genome organisation and retrotransposon driven molecular evolution of the endosperm Hardness (Ha) locus in *Triticum aestivum* cv Glenlea. *Molecular Genetics and Genomics* **280**: 467–481.

Rapp RA, Udall JA, Wendel JF. 2009. Genomic expression dominance in allopolyploids. *BMC Biology* **7**: 18.

Rieseberg LH. 2001. Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions. *Current Biology* **11**: R925–R928.

Riley R, Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **182**: 713–715.

Riley R, Kimber G. 1961. Aneuploids and the cytogenetic structure of wheat varietal populations. *Heredity* **16**: 275–290.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365–386.

Sallee PJ, Kimber G 1978. An analysis of the pairing of wheat telocentric chromosomes. In S. Ramanujam ed. : *Fifth international wheat genetics symposium*. Indian Society of Genetics & Plant Breeding. New Delhi, India, 408–419.

Schlueter JA, Dixon P, Granger C, Grant D, Clark L, Doyle JJ, Shoemaker RC. 2004. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome* **47**: 868–876.

Sears ER. 1952. Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma* **4**: 535–550.

Sears ER. 1954. The aneuploids of common wheat. *Bulletin of the Missouri Agricultural Experimental Station* **572**: 1–59.

Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* **13**: 1749–1759.

Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK *et al.* 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.

Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 7719–7723.

Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown-Guedira GL, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M. 2004. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional and Integrative Genomics* **4**: 12–25.

Stebbins GL. 1950. *Variation and evolution in plants*. New York, NY, USA: Columbia University Press.

Storlie EW, Talbert LE. 1993. Cause of tall off-types in a semidwarf spring wheat. *Crop Science* **33**: 1131–1135.

Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M, Huneau C, Belcram H, Coriton O, Manzanares-Dauleux M, Delourme R, King G *et al.* 2010. The first meiosis of resynthesized Brassica napus, a genome blender. *New Phytologist* **186**: 102–112.

Talbert LE, Smith LY, Blake NK. 1998. More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. *Genome* **41**: 402–407.

Tang H, Wang X, Bowers JE, Ming R, Alam M, Paterson AH. 2008. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. *Genome Research* **18**: 1944–1954.

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Wang J, Tian L, Lee HS, Chen ZJ. 2006. Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in Arabidopsis allopolyploids. *Genetics* **173**: 965–974.

Worland AJ, Law CN. 1985. Aneuploidy in semi dwarf wheat varieties. *Euphytica* **34**: 317–327.

Xu S, Dong Y. 1992. Fertility and meiotic mechanisms of hybrids between chromosome autoduplication tetraploid wheats and *Aegilops* species. *Genome* **35**: 379–384.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Table S1 Primer sequences and detailed description of polymorphism observed for the whole set of PCR-based markers derived from expressed sequence tags (ESTs), simple sequence repeat (SSR) and bacterial artificial chromosome (BAC) sequences

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at **www.newphytologist.org**.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *Early View* – our average submission to decision time is just 29 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £151 in Europe/$279 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (**newphytol@lancaster.ac.uk**; tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office (**newphytol@ornl.gov**; tel +1 865 576 5261).

No claim to original French government works
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Chapitre I-B :
Appariement homéologue, aneuploïdie et changements structuraux chez les allotétraploïdes synthétiques de blé (genres *Triticum* et *Aegilops*).

I. Introduction

L'étude présentée en partie (A) a été réalisée sur les allohexaploïdes synthétiques issus de croisements entre plusieurs génotypes de *T. turgidum* (BBAADD, 2n=4x=28) et diverses accessions d'*Ae. tauschii* (DD, 2n=2x=14), respectivement donneurs des génomes AB et D. J'ai ainsi analysé l'effet de la variabilité des génomes AB et D des espèces parentales sur la stabilité des allohexaploïdes synthétiques en comparant l'appariement méiotique, le taux d'aneuploïdie ainsi que les changements génétiques. J'ai ainsi confirmé l'absence d'appariement entre chromosomes homéologues et montré une variabilité de l'appariement homologue, dépendante des génotypes parentaux. Par ailleurs, l'aneuploïdie représente la principale modification structurale observée chez ces allohexaploïdes synthétiques de blé possédant le locus *Ph1* et aucun changement génétique de type délétion de séquences n'a été mis en évidence chez des plantes euploïdes en utilisant des marqueurs moléculaires issus d'EST, de SSR et d'éléments transposables (Mestiri *et al.,* 2010) ou en analysant des transcrits sous-exprimés chez ces allohexaploïdes (Chagué *et al.,* 2010).

L'étude que je présente dans cette deuxième partie repose sur l'analyse d'allotétraploïdes synthétiques représentant diverses combinaisons des génomes A, S et D (Figure 16). Ces allotétraploïdes, que j'ai produits pendant ma thèse, sont dépourvus du locus *Ph1*. Des appariements chiasmatiques entre chromosomes homéologues pourraient donc avoir lieu dans ce matériel.

La stabilisation du comportement méiotique est assurée par la combinaison de plusieurs mécanismes, notamment par le biais d'un contrôle génétique comme le gène *Ph1* chez le blé (Griffiths *et al.,* 2006) ou à travers la divergence des génomes homéologues.

Il a été suggéré que les remaniements observés chez les blés permettent d'augmenter la divergence entre chromosomes homéologues et ainsi assurer un comportement de diploïde à la méiose (Feldman & Levy, 2005). Bien que plausible, ce scénario n'est pas le seul envisageable, surtout que les travaux de génomique comparée ont bien montré que la divergence des génomes des blés a lieu avant les évènements de polyploïdisation naturels (Wicker *et al.,* 2003; Chantret *et al.,* 2005; Gu *et al.,* 2006; Charles *et al.,* 2008). Il est donc intéressant d'envisager que la divergence entre les géniteurs est un préalable requis pour obtenir un polyploïde stable.

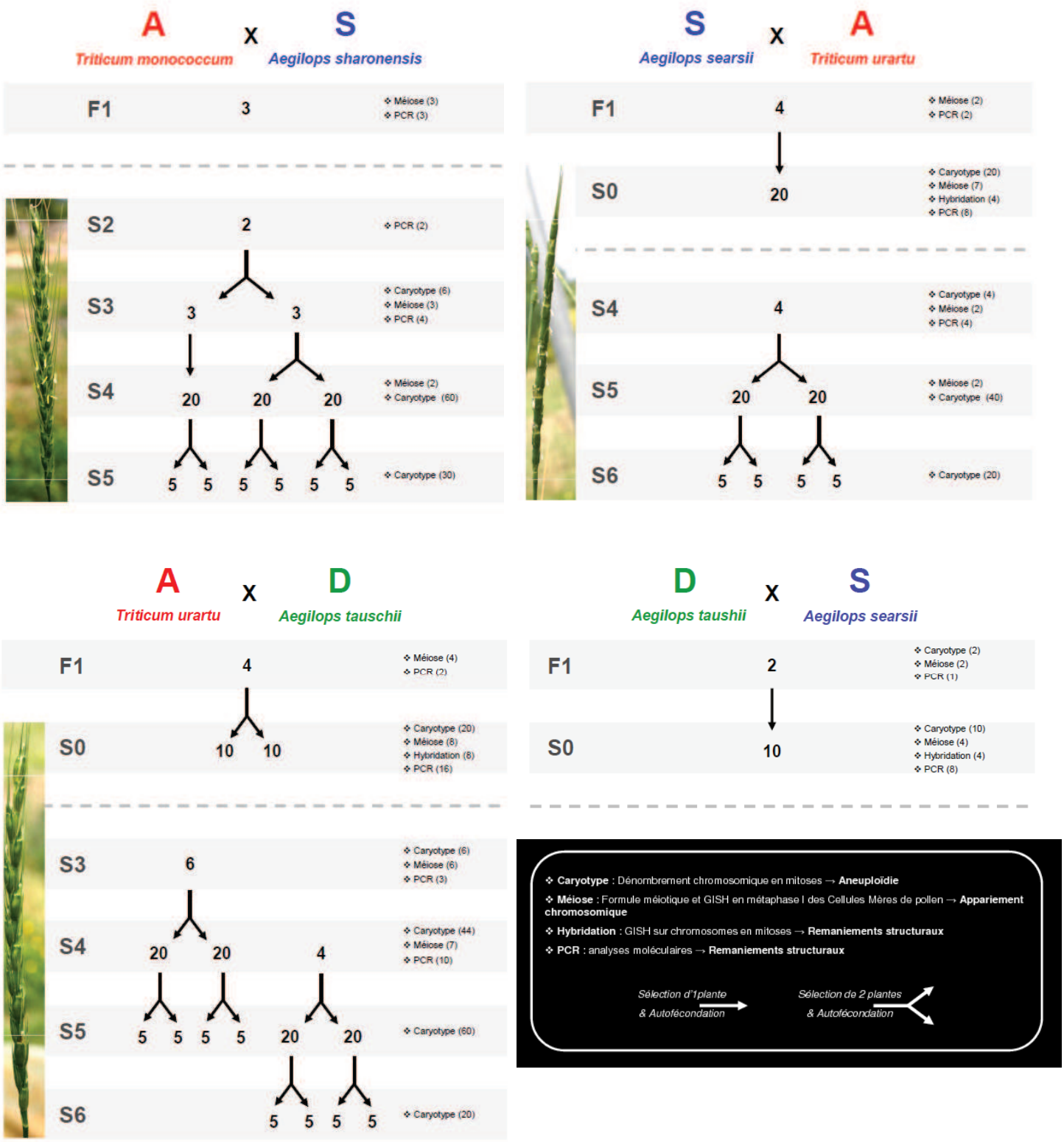

Figure 16 : Schéma expérimental suivi pour étudier le comportement méiotique, l'aneuploïdie et les remaniements structuraux chez les allotétraploïdes sélectionnés.
F1-S0: hybrides interspécifiques et allotétraploïdes synthétiques en génération S0 développés au cours de ma thèse.
S2 à S6: allotétraploïdes synthétiques collectionnés (collaboration Moshe Feldman, Weizman Institute, Israël).

Je me suis donc intéressée dans un premier temps à caractériser la nature de l'appariement chez les hybrides interspécifiques et les allotétraploïdes correspondants. L'effet de la combinaison des génomes sur cet appariement a aussi été analysé.

Je me suis ensuite attachée à caractériser les changements génétiques chez ces allotétraploïdes en combinant deux approches (i) l'hybridation GISH (ii) l'approche PCR décrite et utilisée dans la partie (A) (Mestiri *et al.,* 2010; Figure 15).

Les mêmes marqueurs PCR ne montrant pas de remaniements structuraux chez les allohexaploïdes synthétiques ont été utilisés afin d'étudier les conséquences de l'absence de *Ph1* sur ces séquences. Ces marqueurs ne couvrent cependant pas tout le génome puisqu'ils appartiennent majoritairement au groupe d'homéologie 3. L'hybridation GISH permet d'observer des réarrangements importants de type grandes translocations à l'échelle du génome entier et permet d'étudier des éventuelles corrélations avec l'appariement homéologue.

II. Matériels et méthodes

II.1 Hybridation interspécifique, sauvetage d'embryons et doublement chromosomique

Les différentes lignées des genres *Triticum* et *Aegilops* utilisées pour la production d'hybrides interspécifiques F1 et d'allopolyploïdes synthétiques sont répertoriées dans le Tableau 2. Elles ont été maintenues dans la collection INRA par autofécondation. Les plantes utilisées comme géniteurs ont été ensachées et autofécondées afin de pouvoir comparer les hybrides interspécifiques F1 et les allotétraploïdes synthétiques obtenus à leurs géniteurs respectifs. Les croisements interspécifiques ont été réalisés en suivant un schéma diallèle et tous les embryons F1 obtenus après castration et pollinisation manuelle ont été « sauvés » *in vitro* (sauvetage d'embryon). Les grains ont été collectés entre 10 et 15 jours après la pollinisation. Les embryons immatures ont été excisés en conditions stériles et placés sur milieu de culture de Murashige & Skoog (Sigma). Les jeunes plantes F1 obtenues *in vitro* ont ensuite été transférées en serre. Au stade 4-5 feuilles, un échantillon de feuilles a été collecté pour effectuer les analyses moléculaires et les plantules ont été traitées à la colchicine 2,5% (Sigma) pendant 3h30 pour produire des allotétraploïdes synthétiques. D'autres plantes n'ont pas été traitées à la colchicine et ont été cultivées jusqu'à la floraison afin de tester la possibilité de doublement spontané (formation de grains).

Après la vernalisation, les hybrides F1 ont été maintenus en serre jusqu'à leur maturité. Les anthères au stade de la méiose ont été collectées et les plantes ensachées juste avant la floraison pour éviter des fécondations non contrôlées. Les grains ainsi produits correspondent à la génération S0.

Un sous ensemble d'allotétraploïdes représentant trois différentes combinaisons entre les génomes A, S et D a été sélectionné pour une analyse détaillée du comportement méiotique et des éventuels changements structuraux selon le schéma présenté en figure 16.

Nous avons inclu dans cette étude trois autres allotétraploïdes similaires à ceux produits au cours de cette thèse et fournis par le Pr. Moshe Feldman (Weizmann Institute of

Science, Rehovot, Israël). Ceux-ci ont été autofécondés pour produire les générations S3, S4 S5 et S6 (Figure 16).

II.2 Méthodes d'analyses cytogénétiques

II.2.1 Dénombrement chromosomique par observation de mitoses somatiques

Les dénombrements chromosomiques sont réalisés sur les cellules méristématiques des pointes racinaires. Les méristèmes sont prélevés sur des racines issues de grains germés. La préparation, la coloration et le montage des lames ont été réalisés en utilisant la technique standard décrite par Jahier & Tanguy (1992).

II.2.2 Comportement méiotique dans les CMP

L'observation des appariements chromosomiques en méiose est faite sur les CMP en métaphase I de méiose. Les anthères sont prélevées sur les épis des premières talles puis fixées dans une solution d'éthanol/acide acétique et dilacérées sur une lame dans une goutte de carmin acétique. Le montage des lames est réalisé en quatre étapes: coloration au carmin acétique, régression à l'acide acétique, étalement et contre coloration à la fushine carbolique (Jahier & Tanguy, 1992).

L'observation des différents comportements méiotiques (univalents, bivalents droits et anneaux, trivalents…) est pratiquée sur les CMP d'une même préparation, en microscopie optique et aboutit à l'établissement d'un comportement méiotique. Cinquante CMP en moyenne ont été analysées par plante.

II.2.3 Hybridation génomique in situ (GISH)

L'hybridation génomique *in situ* a été réalisée sur:

- Les chromosomes en méiose pour étudier la nature de l'appariement chromosomique.
- Les chromosomes en mitose pour identifier des remaniements chromosomiques.

Les chromosomes en méiose et en mitose ont été préparés selon la technique standard

d'écrasement. L'hybridation GISH a été réalisée selon le protocole décrit dans Mestiri *et al.* (2010) en utilisant comme sonde l'ADN des parents des hybrides et des allotétraploïdes.

II.3 Méthodes d'analyses moléculaires

L'ADN a été extrait à partir des jeunes feuilles échantillonnées au stade 4-5 feuilles selon le protocole décrit par Graner *et al.* (1990).

Les mêmes marqueurs PCR issus d'EST et de SSR utilisés dans le chapitre I-A pour analyser les changements génétiques chez les allohexaploïdes synthétiques ont été utilisés. Les réactions et amplification PCR ont été effectuées suivant le même protocole décrit dans Mestiri *et al.* (2010).

De même, l'étude des changements génétiques repose sur la comparaison des profils d'amplification observés chez les allotétraploïdes synthétiques à ceux obtenus pour leurs géniteurs respectifs et le mélange *in vitro* des ADN parentaux. Un marqueur est considéré comme « réarrangé » dans un allotétraploïde si le profil d'amplification obtenu pour certaines ou toutes les plantes est différent de celui observé pour le mélange des ADN parentaux (Figure 15).

Tableau 2 : Hybrides F1 interspécifiques et allotétraploïdes synthétiques (hybrides doublés) obtenus par croisements entre différentes espèces de blé (*Triticum* et *Aegilops*).

♀ \ ♂		Génomes SS			Génomes AA			Génomes DD	
		Ae. longissima acc. TL01	*Ae. sharonensis* acc. TH02	*Ae. searsii* acc. TE01	*T. urartu* acc. TMU38	*T. urartu* acc. TMU01	*T. monococcum* acc. TMB02	*Ae. tauschii* acc. TQ27	*Ae. tauschii* acc. Ats36
Génomes SS	*Ae. longissima* acc. TL01	-	-	-	0	0	*15* (0)	0	*1* (0)
	Ae. sharonensis acc. TH02	-	-	-	0	0	*15* (0)	0	0
	Ae. searsii acc.TE01	-	-	-	*1* (1)	*2* (0)	*1* (0)	*7* (0)	0
Génomes AA	*T. urartu* acc. TMU38	0	0	0	-	-	-	*25* (6)	0
	T. urartu acc. TMU01	0	0	0	-	-	-	0	*1* (1)
	T. monococcum acc. TMB02	0	*3* (0)	0	-	-	-	*25* (1)	*2* (2)
Génomes DD	*Ae. tauschii* acc. TQ27	0	0	*2* (1)	*11* (4)	*11* (6)	0	-	-
	Ae. tauschii acc. Ats36	0	0	*6* (0)	*1* (1)	*16* (3)	0	-	-

- croisements non réalisés.
Les chiffres en italique indiquent le nombre d'hybrides obtenus pour chaque croisement.
Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre d'hybrides doublés à la colchicine (allotétraploïdes).

III. Résultats

III.1 Production d'allotétraploïdes synthétiques par hybridation interspécifique et doublement chromosomique

III.1.1 Hybridation interspécifique et sauvetage d'embryons

Afin de produire des allotétraploïdes synthétiques représentant diverses combinaisons des génomes A, D et S, l'hybridation interspécifique a été réalisée en utilisant six espèces diploïdes des genres *Triticum* et *Aegilops* (Tableau 2).

En raison d'une floraison décalée entre deux géniteurs ou d'une production de pollen insuffisante, toutes les combinaisons possibles de génomes n'ont pas été réalisées et d'autres n'ont été faites que sur quelques fleurs. Au total, 108 épis, représentant 42 combinaisons de génotypes ont été émasculés et pollinisés. Sur les 615 grains obtenus, 369 embryons ont été excisés et placés sur un milieu de culture de Murashige & Skoog pour le sauvetage *in vitro*. Parmi ceux-ci, 61% ne se sont pas développés ou ont formé des cals. Les autres se sont développés correctement et ont donné des jeunes plantes qui ont pu être transplantées en serre. Un total de 143 hybrides interspécifiques, représentant 18 combinaisons de croisement (parmi les 42 réalisées), a pu être obtenu par hybridation et sauvetage d'embryon (Tableau 2). 10 hybrides n'ont pas survécu jusqu'à la période de floraison.

Nous avons pu observer une réponse variable à l'hybridation et au sauvetage d'embryon en fonction des espèces impliquées dans les croisements. Les combinaisons AS se sont avérées récalcitrantes avec seulement trois hybrides issus d'un seul croisement *T. monococcum* (acc. TMB02) x *Ae. sharonensis* (acc. TH02) sur les neuf tentées (Tableau 2). Au contraire, les combinaisons SA sont plus fructueuses avec 34 hybrides obtenus, particulièrement lorsque *Triticum monococcum* est utilisé comme donneur mâle (31 hybrides) (Tableau 2). Ce résultat peut s'expliquer par la floraison décalée chez *Ae. longissima* et *Ae. sharonensis* (seulement quelques fleurs disponibles pour les croisements impliquant ces deux espèces comme donneurs mâles ou femelles) et la capacité de *T. monococcum* a être une bonne espèce pollinisatrice. La floraison asynchrone pourrait également expliquer le faible nombre de combinaisons SD/DS réussies (8 hybrides par combinaison) parmi lesquelles les

Tableau 3 : Proportions des différents types d'appariements chromosomiques observés au stade métaphase I de la méiose chez différents hybrides interspécifiques F1.

Combinaison génomique	Croisements		Hybrides analysés	Cellules analysées	Univalents	Bivalents			Multivalents			
	Géniteur ♀	Géniteur ♂				Droits	Anneaux	Total	III	IV	V	Total
SA	*Ae. searsii* acc. TE01	*T. urartu* acc. TMU38	1	39	11.59	1	0.13	1.13	0.05	-	-	0.05
	Ae. searsii acc. TE01	*T. urartu* acc. TMU01	1	40	10.52	1.3	0.075	1.375	0.075	0.125	-	0.2
		moyenne SA			*11.06*	*1.15*	*0.1*	*1.25*	*0.0625*	*0.0625*	-	*0.125*
DA	*Ae. taushii* acc. TQ27	*T. urartu* acc. TMU38	4	209	10.51	1.48	0.23	1.71	0.014	-	-	0.014
AD	*T. urartu* acc. TMU38	*Ae. taushii* acc. TQ27	4	197	9.96	1.63	0.32	1.94	0.05	-	-	0.05
SA^m	*Ae. longissima* acc. TL01	*T.monococcum* acc. TMB02	2	123	10.32	1.48	0.22	1.7	0.095	-	-	0.095
	Ae.sharonensis acc. TH02	*T.monococcum* acc. TMB02	4	215	8.09	2.26	0.42	2.68	0.0776	0.046	0.005	0.129
	Ae. searsii acc. TE01	*T.monococcum* acc. TMB02	1	53	9.05	1.91	0.49	2.4	0.038	0.018	-	0.056
		moyenne SA^m			*8.86*	*1.98*	*0.37*	*2.36*	*0.08*	*0.03*	*0.003*	*0.11*
A^mS	*T.monococcum* acc. TMB02	*Ae.sharonensis* acc. TH02	3	122	8.42	2.22	0.32	2.54	0.118	0.036	-	0.154
DS	*Ae. taushii* acc. TQ27	*Ae. searsii* acc. TE01	2	130	7.44	2.48	0.36	2.84	0.0013	0.006	-	0.019
SD	*Ae. searsii* acc. TE01	*Ae. taushii* acc. TQ27	4	183	6.16	3.08	0.74	3.81	0.005	-	-	0.005

hybrides produits ont tous *Ae. searsii* comme parent mâle ou femelle (7 et 8 hybrides respectivement) (Tableau 2).

De plus, la plupart des croisements réalisés entre les espèces de génome A et celles de génome D ont réussi et plus d'hybrides ont été obtenus lorsque *Triticum urartu* était impliqué dans le croisement à la place de *Triticum monococcum* avec 65 et 25 hybrides respectivement (Tableau 2).

III.1.2 Doublement chromosomique

Jusqu'à présent, aucun allotétraploïde synthétique du groupe blé (*Triticum* et *Aegilops*) dérivant de doublement chromosomique spontané par la voie des gamètes non-réduits n'a été décrit. Les traitements à la colchicine sont habituellement utilisés pour produire ces allotétraploïdes synthétiques du groupe blé alors que le doublement chromosomique spontané est communément observé lors de la production d'allohexaploïdes synthétiques (Mestiri *et al.,* 2010). Afin d'obtenir des allotétraploïdes suivant ces deux voies (artificielle et spontanée), nous avons décidé de fragmenter chaque hybride en deux « clones » :

- un clone non traité pour observer d'éventuels cas de doublements chromosomiques spontanés.
- un clone traité à la colchicine pour induire une duplication globale du génome.

Tous les hybrides non traités s'étant avérés totalement stériles, aucun allotétraploïde n'a été obtenu via la production de gamètes non réduits. Un hybride issu d'un croisement entre *Ae. longissima* et *Ae. tauschii* (Ats36), a montré un développement anormal des organes floraux (pistillodie).

Les 55 hybrides interspécifiques F1 qui ont survécu aux traitements à la colchicine (sur les 94 traités) présentaient très peu de fleurs fertiles. 26 d'entre eux ont produit des grains viables désignés « génération S0 ».

Les 26 allotétraploïdes obtenus représentent 10 combinaisons génomiques différentes (dont deux combinaisons réciproques) sur les 18 combinaisons d'hybrides F1 précédemment obtenues (Tableau 2).

Nos résultats indiquent que tous les hybrides F1 ne répondent pas de la même façon au traitement à la colchicine. En effet, aucun allotétraploïde n'a été obtenu pour les combinaisons AS et SD et un seul allotétraploïde a été produit pour les combinaisons DS et SA. Un nombre important d'hybrides interspécifiques F1 n'ayant pas survécu aux traitements à la colchicine,

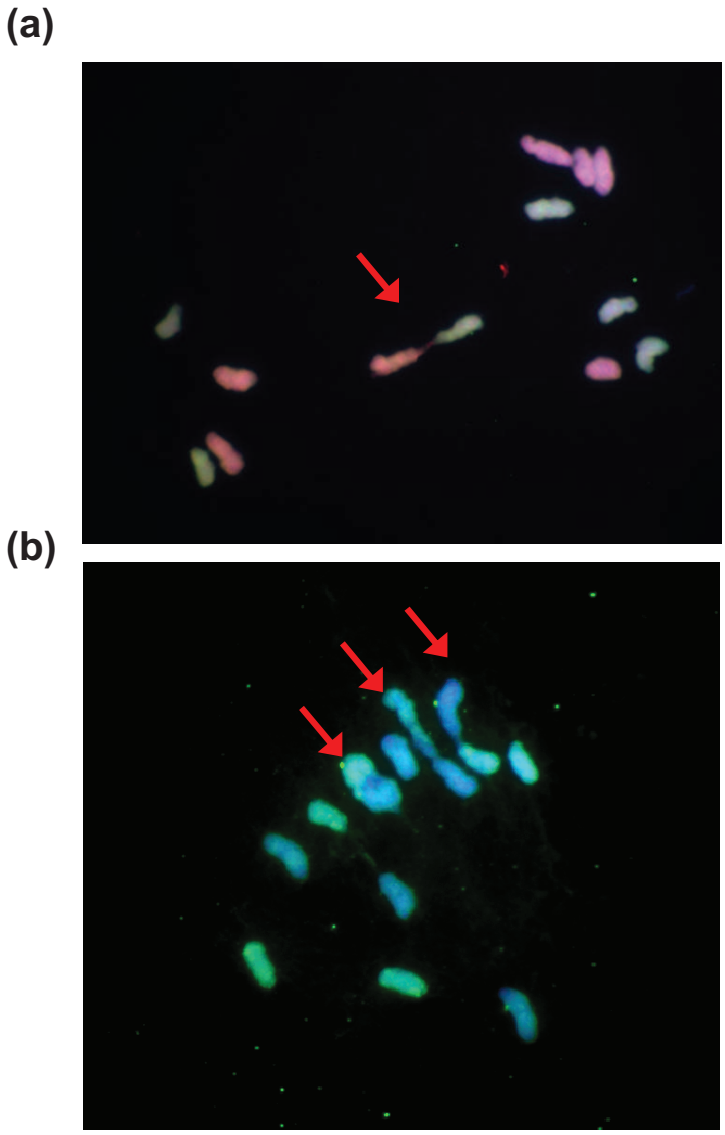

Figure 17 : Appariements homéologues en métaphase I de la méiose, mis en évidence par GISH, chez les hybrides interspécifiques F1 dépourvus du locus *Ph1*.
(a)Cellule Mère de Pollen (CMP) de l'hybride interspécifique (AD, n=2x=14) issu du croisement entre *T. urartu* (AA, 2n=2x=14) et *Ae. tauschii* (DD, 2n=2x=14) montrant un bivalent droit allosyndétique (flèche rouge).
(b)CMP de l'hybride interspécifique (DS, n=2x=14) issu du croisement entre le même *Ae. tauschii* et *Ae. searsii* (SS, 2n=2x=14) montrant trois bivalents allosyndétiques (un anneau et deux droits indiqués par les flèches rouges) et 8 univalents.
Coloration GISH : Génome A en rouge, génome S en bleu et génome D en vert.

seuls quelques allotétraploïdes ont été obtenus après le doublement chromosomique (3, 4, 4 et 6 pour les combinaisons AS, SD, DS et SA respectivement).

Au contraire, 50% et 77,8% des hybrides AD et DA respectivement, ont donné des allotétraploïdes après doublement. Ceci est corrélé avec le nombre plus important (38) de plantes F1 issues de croisements entre des espèces parentales de génome A et celles de génome D utilisées pour le doublement chromosomique.

Certaines combinaisons tentées mais non obtenues (Tableau 2) ont été décrites par Ozkan *et al.* (2001). Cela indique que l'échec du doublement chromosomique serait plutôt dû à un dosage inadapté de la colchicine ou à un temps de traitement inadéquat qu'à une « insensibilité génomique au traitement ».

III.2 Etude de la méiose des hybrides interspécifiques

Le comportement méiotique de certains hybrides et de leurs allotétraploïdes correspondant de génération S0 ont été analysés ainsi que d'autres allotétraploïdes de générations « avancées » (S2 à S4) fournis par le professeur Moshe Feldman.

III.2.1 Appariements homéologues récurrents chez les hybrides interspécifiques haploïdes

L'appariement des chromosomes en métaphase I de la méiose a été étudié chez plusieurs hybrides issus de croisements entre des espèces diploïdes de génome A, S et D.

Les hybrides haploïdes (n=2x=14) possèdent deux génomes homéologues. Nous avons pu confirmer ceci par des analyses cytologiques (Tableau 3). La méthode de GISH, qui permet l'identification non équivoque des génomes A, S et D, a été utilisée pour identifier les appariements homéologues chez ces hybrides F1 haploïdes dépourvus d'activité *Ph1*. Contrairement aux allohexaploïdes synthétiques de blé (Mestiri *et al.,* 2010), nous avons pu observer très clairement la présence d'appariements entre les chromosomes a priori homéologues chez tous les hybrides F1 haploïdes analysés (Figure 17). En effet, en l'absence de leur homologues, certains chromosomes s'apparient avec leur homéologues (ou parahoméologues) pour former des bivalents et, dans une moindre mesure, des multivalents. Comme nous allons le voir ci-dessous, la fréquence de ces évènements varie en fonction du génome (A, S ou D) des espèces diploïdes impliquées dans le croisement.

III.2.2 Effets de la combinaison génomique sur la fréquence d'appariements homéologues

Tableau 4 : Proportions des différents types d'appariements chromosomiques des allotétraploïdes synthétiques de génération S0 issus de croisements entre *T. urartu* acc. TMU38 (2n=2x=14, AA), *Ae. searsii* acc. TE01 (2n=2x=14, SS) et *Ae. taushii* acc. TQ27 (2n=2x=14, DD).

Allotétraploïde synthétique	Plantes analysées [a]	CMP analysées	Univalents	Bivalents			Multivalents			
				Droits	Anneaux	Total	III	IV	Autres	Total
SSAA = *Ae. searsii* x *T. urartu*	S0-1-2	36	0.25	1.53	12.17	13.69	0.08	0.03	0.00	0.11
	S0-1-3	56	0.68	2.38	11.04	13.41	0.00	0.13	0.00	0.13
	S0-1-4	44	0.05	1.09	12.64	13.73	0.00	0.09	0.02	0.11
	S0-1-9	61	0.11	1.13	12.33	13.46	0.02	0.23	0.00	0.25
	S0-1-10	75	0.05	1.99	11.83	13.81	0.00	0.08	0.00	0.08
	S0-1-13	26	0.15	1.46	12.38	13.85	0.00	0.04	0.00	0.04
	S0-1-14	30	0.00	0.97	12.90	13.87	0.00	0.07	0.00	0.07
AADD = *T. urartu* x *Ae. taushii*	S0-3-1[b]	32	0.28	1.63	11.88	13.50	0.03	0.16	0.00	0.19
	S0-3-7[b]	41	0.27	1.07	11.10	12.17	0.12	0.76	0.00	0.88
	S0-3-10[b]	101	0.44	1.74	11.76	13.5	0.065	0.065	0.00	0.13
	S0-3-11[b]	76	0.12	1.26	12.29	13.55	0.015	0.18	0.00	0.195
	S0-3-13[b]	64	0.30	1.53	11.99	13.52	0.035	0.135	0.00	0.17
	S0-5-3[c]	39	0.46	1.51	11.46	12.97	0.05	0.36	0.00	0.41
	S0-5-13[c]	35	1.43	1.63	10.97	12.60	0.11	0.26	0.00	0.37
	S0-5-14[c]	71	0.23	0.94	12.18	13.13	0.04	0.34	0.00	0.38
DDSS = *Ae. taushii* x *Ae. searsii*	S0-1-2	52	0.25	0.90	11.98	12.88	0.10	0.42	0.00	0.52
	S0-1-3	44	0.16	0.70	11.73	12.43	0.02	0.73	0.00	0.75
	S0-1-5	66	0.53	1.62	11.47	13.09	0.05	0.29	0.00	0.33
	S0-1-12	37	0.49	1.89	11.24	13.14	0.05	0.27	0.00	0.32

[a] Uniquement les plantes euploïdes (2n=4x=28) ont été analysées.
CMP : Cellule Mère de Pollen.
Les allotétraploïdes AADD sont issus de deux hybrides F1 indépendants, F1-3 (b) et F1-5 (c).

Si l'appariement entre chromosomes homéologues se produit chez tous les hybrides interspécifiques analysés, une variabilité de la fréquence de ces appariements homéologues a également été observée. En effet, les hybrides de combinaison génomique DS/SD présentent plus de bivalents allosyndétiques (entre chromosomes homéologues) et moins d'univalents que les autres hybrides étudiés (Tableau 3). L'analyse du nombre moyen de chromosomes non appariés par CMP montre que les hybrides de combinaison génomique SD présentent moins d'univalents que les hybrides SA avec respectivement 6,16 et 11,06 univalents par CMP (Tableau 3). De même, les hybrides DS présentent moins d'univalents que les hybrides DA ou AD (Tableau 3). Nos résultats soulignent également des différences dans le profil d'appariement en fonction de l'origine du donneur du génome A. En effet, les hybrides dont le génome A provient de *T. urartu* présentent moins d'appariements homéologues que ceux portant un génome A apporté par *T. monococcum*. Par exemple, les hybrides résultants du croisement entre *Ae. searsii* et *T. urartu* présentent 11,06 univalents et 1,25 bivalents alors que les hybrides issus du croisement entre *Ae. searsii* et *T. monococcum* possèdent moins d'univalents (9,05) et plus de bivalents (2,40) en métaphase I de méiose (Tableau 3).

Nous avons également observé des cas fréquents d'associations dites secondaires (« end to end » / « side by side ») chez tous les hybrides analysés et considérées comme non chiasmatiques (Orellana, 1985; Benavente *et al.,* 1996).

III.3 Etude de la méiose chez les allotétraploïdes synthétiques

L'appariement chromosomique en métaphase I de la méiose dans les CMP a été analysé chez trois allotétraploïdes synthétiques de génération S0 issus du doublement des génomes des hybrides interspécifiques F1 analysés ci-dessus. Trois autres allotétraploïdes synthétiques de générations S3 à S5, similaires à ceux obtenus dans cette thèse, ont également été inclus dans l'analyse (fournis par le Pr. Moshe Feldman).

III.3.1 Comportement méiotique des allotétraploïdes synthétiques en génération S0

Trois allotétraploïdes synthétiques, partageant au moins un même géniteur diploïde (*T. urartu* ou *Ae. tauschii* ou *Ae. searsii*), ont été choisis pour mener cette étude.

Ainsi, 8 plantes AADD de génération S0, issus de deux hybrides indépendants provenant de croisements entre *T. urartu* x *Ae. tauschii*, ont été analysées (Tableau 4).

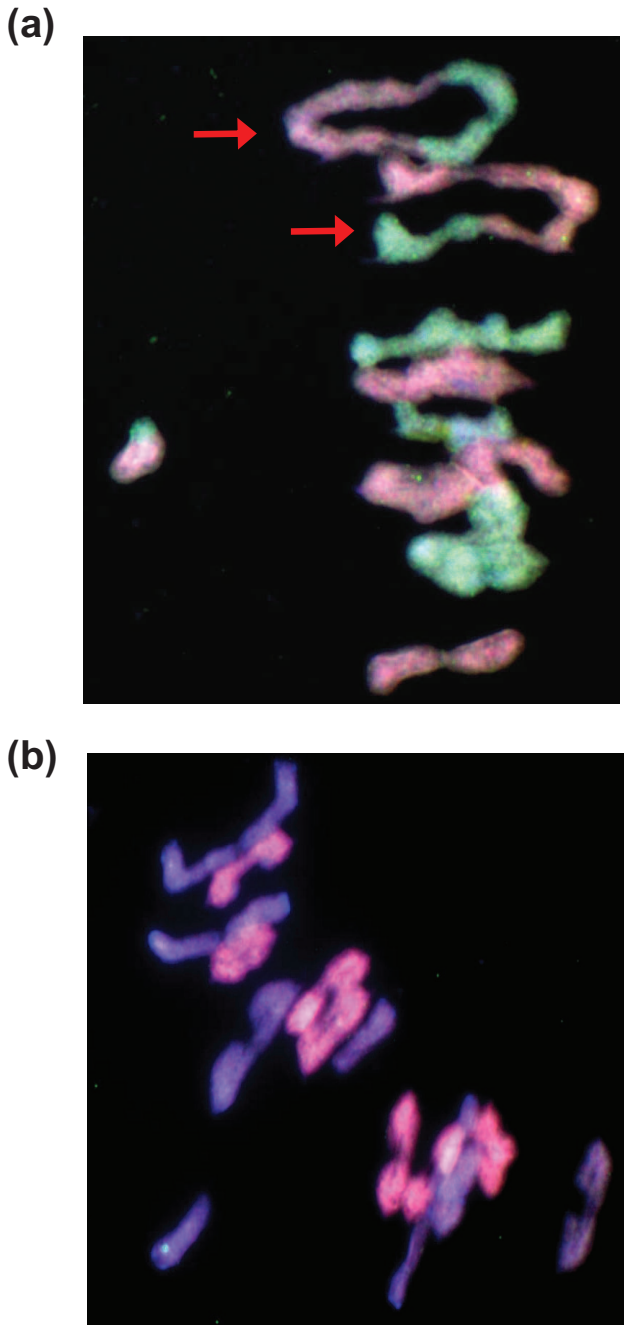

Figure 18 : Appariement chromosomique en métaphase I de la méiose chez deux allotétraploïdes synthétiques présentant un comportement méiotique contrasté.
(a) CMP de l'allotétraploïde synthétique (AADD, 2n=4x=28) issu du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii* montrant 2 multivalents (flèches rouges).
(b) CMP de l'allotétraploïde synthétique (SSAA, 2n=4x=28) issu du croisement entre *Ae. searsii* et *T. urartu* montrant 14 bivalents.
Coloration GISH : Génome A en rouge, génome S en bleu et génome D en vert.

4 et 7 plantes S0 issues respectivement des uniques hybrides *Ae. tauschii* x *Ae. searsii* (DDSS) et *Ae. searsii* x *T. urartu* (SSAA) ont également été analysées (Tableau 4).

Nous avons observé une variabilité du comportement méiotique en fonction du génotype des espèces parentales impliquées dans les croisements. En effet, les allotétraploïdes synthétiques DDSS issus du croisement entre *Ae. tauschii* et *Ae. searsii* montrent un taux de multivalents plus élevés que les deux autres allotétraploïdes étudiés avec 0.48 multivalents par CMP contre 0.29 et 0.11 respectivement pour les allotétraploïdes AADD (*T. urartu* x *Ae. tauschii*) et SSAA (*Ae. searsii* x *T. urartu*) (Tableau 4).

Nous avons observé des différences importantes entre plantes sœurs de génération S0 issues d'un même hybride F1. Par exemple, l'allotétraploïde S0-3-7 (*T. urartu* x *Ae. tauschii*) présente un comportement méiotique assez différent des quatre autres plantes sœurs allotétraploïdes issues du même hybride F1. En effet, un taux élevé de 0.88 multivalents par CMP a été observé pour la plante S0-3-7 alors que ce taux varie entre 0.13 et 0.19 pour les quatre autres plantes analysées. Un nombre de bivalents de 12.17 par CMP a été obtenu pour cette plante alors que ce taux est supérieur à 13.40 pour les quatre autres plantes sœurs (Tableau 4).

L'une des hypothèses privilégiées pour expliquer ce taux élevé de multivalents serait l'existence de remaniements chromosomiques survenus lors de la méiose des hybrides doublés. Les résultats détaillés dans le paragraphe III.5.2 semblent confirmer cette hypothèse.

III.3.2 Comportement méiotique des allotétraploïdes synthétiques des générations S3 à S5

L'appariement chromosomique en métaphase I a été analysé dans les générations S3 à S5 chez trois allotétraploïdes synthétiques issus des croisements suivants:

- *T. urartu* x *Ae. tauschii*
- *Ae. searsii* x *T. urartu*
- *T. monococcum* x *Ae. sharonensis*

Comme nous pouvons observer sur la figure 18, une variabilité du comportement méiotique a également été observée entre les allotétraploïdes AADD et les allotétraploïdes AASS/SSAA. Les résultats obtenus montrent que les allotétraploïdes de combinaison génomique AADD, issus d'un croisement entre *T. urartu* et *Ae tauschii,* présentent le plus grand nombre de multivalents: 1,32 multivalents par cellule et seulement 10,74 bivalents (Tableau 5, Figure 18). Lorsque *Ae. searsii* est croisé avec *Ae. tauschii*, le nombre de

Tableau 5 : Proportions des différents types d'appariements chromosomiques des allotétraploïdes synthétiques au cours des générations S3 à S5.

Allotétraploïdes synthétiques	Plantes analysées	Univalents	Bivalents			Multivalents			
			Droits	Anneaux	Total	III	IV	V	Total
AASS = *T. monococcum* acc. TMB02 x *Ae. sharonensis* acc. TH02	$2^a + 2^b$	0.45	2.01	11.34	13.35	0.0375	0.185	-	0.22
SSAA = *Ae. searsii* acc. TE01 x *T. urartu* acc. TMU01	$2^b + 2^c$	0.84	2.89	10.19	13.08	0.12	0.16	0.005	0.285
AADD = *T. urartu* acc. TMU38 x *Ae. taushii* acc. TQ27	$1^{a*} + 5^b$	1.57	2.5	8.24	10.74	0.35	0.97	-	1.32

Nous avons considéré les moyennes entre générations puisque aucune différence significative n'a été observée entre ces générations.

[a] Nombre de plantes analysées en génération S3.

[b] Nombre de plantes analysées en génération S4.

[c] Nombre de plantes analysées en génération S5.

***** trois plantes ont été initialement sélectionnées, l'une d'entre elles, étant aneuploïde a été retirée de l'analyse. Pour l'autre, très peu de CMP au stade métaphase I étaient disponibles pour permettre d'établir un comportement correct et elle n'a donc pas été analysée.

multivalents diminue significativement. En effet, les allotétraploïdes SSAA sont plus stables, avec seulement 0,29 multivalents par CMP. Un taux similaire de multivalents (0.22) a également été observé pour les allotétraploïdes AASS issus du croisement entre *T. monococcum* et *Ae. sharonensis* (Tableau 5, Figure 18).

III.4 L'aneuploïdie chez les allotétraploïdes synthétiques

J'ai montré dans le chapitre précédent que l'aneuploïdie chez les allohexaploïdes synthétiques de blé est fortement corrélée à l'appariement incomplet entre chromosomes homologues (formation d'univalents et de bivalents droits) dont le taux varie en fonction du génotype des géniteurs AB et D utilisés lors du croisement (Mestiri *et al.,* 2010; *voir chapitre I-A*).

Ici, nous étudions l'aneuploïdie chez les allotétraploïdes synthétiques, dépourvus de l'activité *Ph1*. Nous avons analysé la fréquence d'aneuploïdes dans la descendance des trois allotétraploïdes synthétiques de générations avancées. Nos données montrent que la fréquence d'aneuploïdes est faible mais varie en fonction de la combinaison génomique (Tableau 6). En effet, les allotétraploïdes présentant un fort taux d'appariement homéologue montrent la plus haute fréquence d'aneuploïdes (4,4%). Au contraire, une fréquence d'aneuploïdes plus basse (1,3%) a été mesurée chez les allotétraploïdes AASS qui montraient un faible taux d'appariement homéologue (Tableau 6).

III.5 Changements structuraux chez les allotétraploïdes synthétiques

Nous avons cherché à déterminer l'occurrence des changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques dépourvus de *Ph1* et ce en analysant des plantes euploïdes avec d'une part des marqueurs PCR locus spécifiques, d'autre part l'hybridation *in situ* génomique permettant d'identifier des échanges entre chromosomes homéologues.

III.5.1 Analyse moléculaire avec des marqueurs locus-spécifiques

Comme dans le cas de l'identification des changements génétiques chez les allohexaploïdes synthétiques, nous avons comparé les profils d'amplification PCR obtenus

Tableau 6 : Nombre d'aneuploïdes chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S4 à S6.

Allotétraploïdes synthétiques				Plantes analysées	
Combinaison génomique	Géniteur ♀	Géniteur ♂	Générations	Euploïdes	Aneuploïdes
AASS	*T. monococcum* acc. TMB02	*Ae. sharonensis* acc. TH02	S4	48	0
			S5	29	1
SSAA	*Ae. searsii* acc. TE01	*T. urartu* acc. TMU01	S5	30	2
			S6	10	0
AADD	*T. urartu* acc. TMU01	*Ae. taushii* acc. TQ27	S4	37	1
			S5	53	4
			S6	19	0

pour les allotétraploïdes à ceux des géniteurs et du mélange des ADN parentaux (*voir Matériel et Méthode* ; *Chapitre I-A*).

De plus, nous avons utilisé les mêmes marqueurs issus d'EST et de SSR qui ne présentaient aucun changement génétique chez les allohexaploïdes synthétiques analysés. Les marqueurs issus des ET étant spécifiques du génome B (Paux *et al.,* 2006, 2008 ; Charles *et al.,* 2008) n'auraient pas été amplifiés chez les géniteurs diploïdes de génome A, S ou D et n'ont donc pas été utilisés.

Au total, 969 marqueurs issus d'EST et 141 marqueurs issus de SSR ont été testés sur trois allotétraploïdes synthétiques (générations S2 à S4) représentant diverses combinaisons des génomes A, S, D et présentant d'importantes variations dans la fréquence d'appariements homéologues. Seules les plantes euploïdes (2n=4x=28) ont été analysées.

III.5.1.1. Polymorphisme entre espèces parentales

Marqueurs monomorphes

Pour les trois allotétraploïdes étudiés, 74.2% des marqueurs issus d'EST, amplifient au moins un homéoallèle de taille identique dans chaque espèce parentale, générant ainsi un profil monomorphe (Tableau 7).

Le polymorphisme augmente considérablement pour les marqueurs issus de séquences répétées de type SSR. En effet, seulement 18.1% des marqueurs SSR sont monomorphes (Tableau 7).

Marqueurs polymorphes

Pour l'ensemble des allotétraploïdes testés, 25.8% des marqueurs issus d'EST sont polymorphes entre les espèces parentales de chacun des trois allotétraploïdes synthétiques (Tableau 7) alors que ce taux de polymorphisme est beaucoup plus élevé (81.9%) pour les marqueurs issus de SSR.

Deux types de polymorphisme entre espèces parentales ont été observés: un polymorphisme de type présence/absence (PAP) et un polymorphisme de taille (ASP) :

- PAP

Tableau 7 : Synthèse des résultats d'amplification PCR observés chez les allotétraploïdes synthétiques (génération S3/S4) représentant diverses combinaisons des génomes A, D et S.

Type de marqueur	Allotétraploïdes synthétiques	Total de marqueurs		Monomorphes	Polymorphes	
		Testés	Amplifiés		PAP	ASP
EST	AADD = *T. urartu* acc. TMU38 x *Ae. taushii* acc. TQ27	969	701	528	140 (1[a])	33 (15[b] +1[c])
	SSAA = *Ae. searsii* acc. TE01 x *T. urartu* acc. TMU01	969	696	511	151	34 (10[b])
	AASS = *T. monococcum* acc. TMB02 x *Ae. sharonensis* acc. TH02	969	692	512	155	25 (9[b])
SSR	AADD = *T. urartu* acc. TMU38 x *Ae. taushii* acc. TQ27	141	78	14	42 (3[a])	22 (17[b])
	SSAA = *Ae. searsii* acc. TE01 x *T. urartu* acc. TMU01	141	63	13	33	17 (11[b])
	AASS = *T. monococcum* acc. TMB02 x *Ae. sharonensis* acc. TH02	141	57	9	32	16 (6[b])

Les chiffres entre parenthèses représentent les profils non additifs avec :
[a] marqueurs PAP montrant une différence entre les profils d'amplification d'un ou plusieurs polyploïdes et celui du mélange d'ADN parentaux,
[b] marqueurs ASP montrant un profil non additif résultant d'une compétition entre homéoallèles lors de la PCR,
[c] marqueurs ASP montrant un profil non additif résultant d'un changement génétique.

Il s'agit d'un polymorphisme caractérisé par l'amplification de l'homéoallèle d'une seule espèce parentale et de la non amplification dans l'autre espèce parentale d'un allotétraploïde synthétique donné.

Les marqueurs présentant un polymorphisme de type présence/absence représentent 21.4% des marqueurs issus d'EST (140 à 155 marqueurs en fonction du croisement analysé) et 54.1% des marqueurs issus de SSR (32 à 42 marqueurs) (Tableau 7).

Notons que pour ces marqueurs PAP, je n'ai pas observé de biais d'amplification vers un des génomes parentaux. Sur les 140 marqueurs issus d'ESTs et 42 marqueurs issus de SSR montrant un PAP entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*, 64 (ESTs) et 24 (SSR) sont absents dans le génome A. Les autres marqueurs (76 et 18) sont absents du génome D.

De manière similaire, 63 des 151 marqueurs issus d'EST ainsi que 22 des marqueurs issus de SSR montrant un PAP entre *Ae. searsii* et *T. urartu* n'amplifient pas le génome A. En ce qui concerne les 155 et 32 marqueurs issus respectivement d'EST et SSR et montrant un PAP entre *T. monococcum* et *Ae. sharonensis*, 78 et 11 n'amplifient pas le génome A.

- ASP

Le polymorphisme de taille concerne les marqueurs présentant des tailles de produits PCR différentes entre les espèces parentales diploïdes d'un des allotétraploïdes synthétiques étudiés, distinguant ainsi les homéoallèles. 4.4% et 27.8% des marqueurs issus respectivement d'EST et de SSR présentent un ASP (Tableau 7).

III.5.1.2. Changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques

Aucun des marqueurs monomorphes ne montre, sur l'ensemble des plantes analysées, un profil d'amplification PCR différent de ceux des deux espèces parentales et du mélange des ADN parentaux (Tableau 7).

Ne pouvant pas distinguer les deux homéoallèles parentaux avec ces marqueurs monomorphes, seuls les cas de délétion des deux allèles parentaux chez les polyploïdes synthétiques peuvent être identifiés, ce qui n'a pas été le cas. Pour ces marqueurs monomorphes, il n'a donc pas été possible de vérifier si un des homéoallèles parentaux est réarrangé puisque l'autre homéoallèle est amplifié à la même taille et même position (Figure 15).

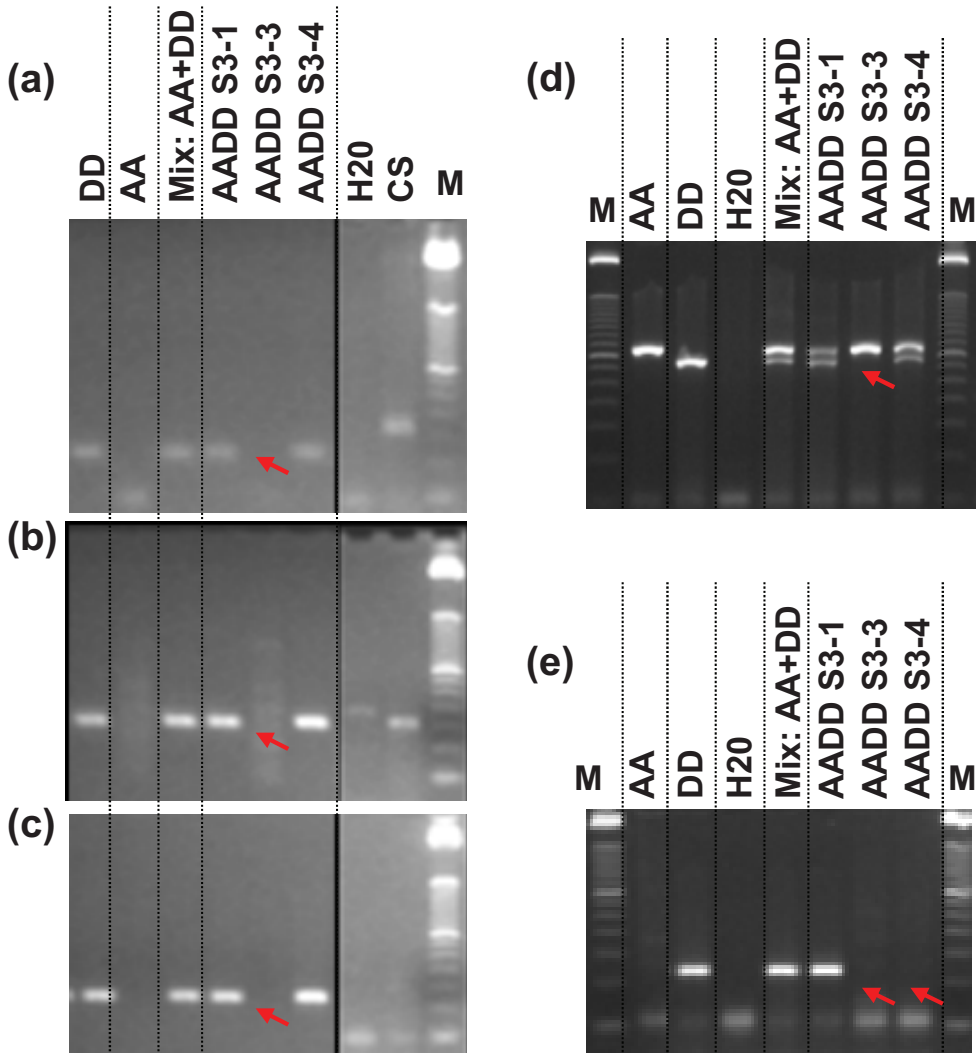

Figure 19 : Changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques (AADD, 2n=2x=28) en génération S3 issus du croisement entre *T. urartu* (AA, 2n=2x=14) et *Ae. tauschii* (DD, 2n=2x=14).

(a), (b) et (c) correspondent aux profils d'amplifications obtenus pour les marqueurs SSR (*Xgwm*533-3B, *Xgwm*161-3D, *Xgwm*183-3D respectivement) montrant un PAP entre géniteurs et un changement génétique au niveau de la plante euploïde S3-3.

(d) Marqueur ASP issus d'EST (BE423817) montrant un changement génétique au niveau de la plante euploïde S3-3. Les plantes sœurs S3-1 et S3-4 présentent un profil additif.

(e) Marqueur PAP issus d'EST (BF292454) montrant un changement génétique au niveau des plantes sœurs S3-3 et S3-4.

Les remaniements génétiques sont indiqués par des flèches rouges.

M: Marqueur de taille (50pb)

Par ailleurs, aucun cas de disparition de la copie amplifiée auparavant chez l'une des espèces parentales n'a été mis en évidence pour les marqueurs PAP chez les allotétraploïdes *Ae searsii* x *T urartu* et *T. monococcum* x *Ae. sharonensis*. Par contre, trois marqueurs SSR ainsi qu'un marqueur EST ont montré une déviation par rapport à l'additivité et ce spécifiquement dans les allotétraploïdes AADD (Tableau 7, Figure 19).

Théoriquement, le polymorphisme de taille entre les deux espèces parentales d'un même allotétraploïde devrait générer, en cas de non-réarrangement, un profil additif (des deux allèles amplifiés) chez les descendants polyploïdes. Pour ces marqueurs ASP, 16 à 24 marqueurs EST et 5 à 10 marqueurs SSR ont un profil additif (Tableau 7).

Des profils d'amplifications non additifs ont été cependant observés pour une proportion importante de marqueurs ASP (38% pour EST et 60% SSR) (Tableau 7). Dans ce cas, seulement un des homéoallèles parentaux est amplifié dans toutes les plantes et générations testées d'un allotétraploïde donné. Cependant l'amplification non additive concerne également le mélange des ADN parentaux, utilisé comme témoin d'additivité. Ceci indique que l'allèle non amplifié n'est pas le résultat d'un réarrangement génétique mais plutôt le résultat d'une compétition entre homéoallèles lors de la PCR.

Seul l'allotétraploïde synthétique *T. urartu* x *Ae. tauschii* (AADD) montre un marqueur pour lequel un seul allèle est amplifié dans l'allotétraploïde synthétique, mais les deux allèles du marqueur sont amplifiés dans le mélange des ADN parentaux (Tableau 7, Figure 19). L'hypothèse d'amplification préférentielle d'un homéoallèle par rapport à un autre lors de la PCR est donc invalide et il s'agirait bien d'un homéoallèle réarrangé pour ce seul allotétraploïde *T. urartu* x *Ae. tauschii.*

Notons que les trois marqueurs SSR réarrangés dans l'allotétraploïde AADD ne montrent aucune amplification dans les deux autres allotétraploïdes, ces trois marqueurs étant spécifiques du génome D.

Ainsi nous avons montré que 1.8% des 55 marqueurs ASP ainsi que 2.2% des 182 marqueurs PAP sont réarrangés spécifiquement dans l'allotétraploïde synthétique *T. urartu x Ae. tauschii* (AADD). De manière intéressante, les cinq marqueurs réarrangés ciblent aussi bien des séquences codantes que répétées et concernent uniquement les homéoallèles du géniteur de génome D *Ae. tauschii.* Aucun remaniement n'a affecté l'homéoallèle du géniteur *T. urartu*.

De plus, les trois marqueurs SSR et les deux marqueurs issus d'EST sont localisés sur le groupe d'homéologie 3. En outre, les deux marqueurs ESTs sont cartographiés sur le même BIN (Breakpoint Interval) de délétion, le 3BS8(0.78-1) situé en région distale sur le bras court du chromosome 3 (Qi *et al.,* 2004).

Variations intra- et trans-générationnelles

En ce qui concerne l'allotétraploïde *T. urartu* x *Ae. tauschii* (AADD), l'analyse ci-dessus a été réalisée sur trois plantes sœurs de génération S3 (notées S3-1, S3-3 et S3-4) présentant le nombre attendu de 28 chromosomes. Etant aneuploïde, la plante S3-2 n'a pas été inclue dans l'étude (Tableau 5). Des différences entre ces plantes sœurs ont été identifiées. En effet, sur les cinq marqueurs réarrangés, quatre le sont dans une seule de ces trois plantes sœurs (S3-3) et un marqueur, issus d'EST et présentant un PAP, montre une déviation par rapport à l'additivité dans deux plantes sœurs (S3-3 et S3-4) alors que l'autre plante suit les profils du géniteur A et du mélange des ADN parentaux (Figure 19).

Afin de déterminer si ces remaniements sont transmis à la descendance, nous avons sélectionné 10 plantes euploïdes issus de l'allotétraploïde S3-3. Nous avons ainsi montré que ces cinq remaniements sont transmis à l'ensemble de la descendance. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de remaniement de l'homéoallèle du génome A pour ce marqueur ASP issus d'EST dont l'homéoallèle D est réarrangé.

Toutefois, nous n'avons pas vérifié si de nouveaux remaniements surviennent dans la descendance de la plante S3-3 ainsi que dans celle de ces plantes sœurs euploïdes.

J'ai pu montrer dans cette partie que des changements génétiques apparaissent spécifiquement chez ces allotétraploïdes AADD caractérisés, rappelons le, par un fort taux d'appariement homéologue. Cet appariement entre chromosomes homéologues à également été observée chez les allotétraploïdes AADD de génération S0 que j'ai produit au cours de cette thèse. La question qui se pose donc est :

Les changements génétiques sont-ils causés par ces appariements homéologues observés chez les allotétraploïdes?

Signalons qu'un comportement méiotique irrégulier a également été observé chez les allotétraploïdes DDSS de génération S0. Par contre, les allotétraploïdes SSAA présentent un comportement méiotique relativement stable avec peu de multivalents, comme c'est le cas des

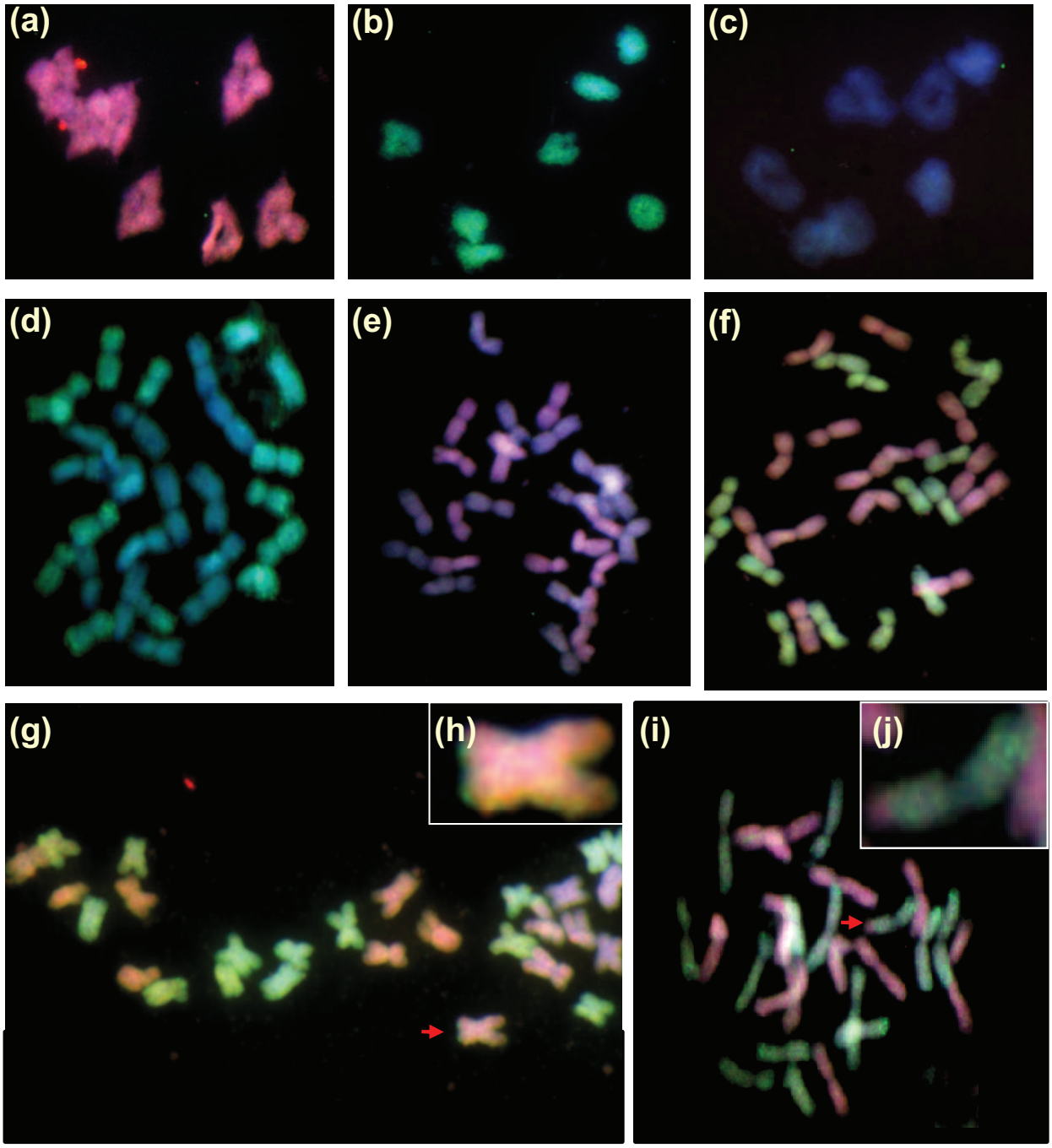

Figure 20 : Remaniements chromosomiques identifiés par GISH chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S0 issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*.

Une stabilité chromosomique a été mise en évidence en métaphase I de la méiose pour les espèces parentales *T. urartu* (a), *Ae. tauschii* (b) et *Ae. searsii* (c).

Les cellules en mitose des allotétraploïdes DDSS (d) et SSAA (e) issus respectivement des croisements *Ae. tauschii* x *Ae. searsii* et *Ae. searsii* x *T. urartu* ne montrent pas de remaniements chromosomiques.

(f) à (k) illustrent les résultats obtenus pour les allotétraploïdes AADD issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. taushii.*

(f) allotétraploïde ne présentant pas de remaniement chromosomique.

(g) et (i) allotétraploïdes présentant chacun un remaniement chromosomique (flèche rouge).

(h) et (j) agrandissement des remaniements chromosomiques observés.

Coloration GISH : Génome A en rouge, génome S en bleu et génome D en vert.

allotétraploïdes SSAA et AASS de générations S2-S4 pour lesquels nous avons mis en évidence une stabilité génétique.

III.5.2 Analyse cytogénétique et identification de réarrangements chromosomiques

Pour chaque combinaison d'allotétraploïdes, quatre plantes sœurs S0, pour lesquelles on dispose de données issues de marqueurs SSR, ont été analysées par GISH. L'hybridation GISH a été réalisée sur les méristèmes de pointes racinaires en cours de mitose. Deux pointes racinaires par plante ont été utilisées pour les expériences d'hybridation et environ 15 cellules par pointe racinaire ont été analysées.

Nous avons observé des évènements de translocations dans deux allotétraploïdes S0 issus d'un même croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*. Les deux autres allotétraploïdes issus du même croisement ainsi que les géniteurs diploïdes ne montrent pas ce type de changements structuraux (Figure 20).

Les translocations peuvent se produire de A vers D ou de D vers A et n'impliquent qu'un chromosome par cellule (Figure 20).

Nos résultats montrent que non seulement des changements structuraux ont lieu après la polyploïdisation, mais aussi qu'ils sont spécifiques aux allotétraploïdes AADD. En effet, aucun évènement de translocation n'a pu être mis en évidence chez tous les allotétraploïdes SSAA et DDSS analysés (Figure 20).

Pour *T. urartu* x *Ae. tauschii*, la plante S0-3-7 montrant ces remaniements chromosomiques présente le comportement méiotique le plus instable avec le nombre de multivalent le plus élevé comptabilisé (Tableau 5). La mort de la plante S0-3-2, avant la période de floraison, nous a empêché d'établir cette corrélation pour celle ci.

De manière intéressante, des réarrangements chromosomiques sont également observés dans la descendance de l'allotétraploïde S3-3 de génome AADD montrant des changements génétiques (Figure 21). En effet, sur quatre plantes euploïdes analysées en GISH, l'une présentait de nombreux réarrangements chromosomiques alors que les trois autres ne présentaient pas ce type de remaniements (en revanche, une de ces plantes présente une euploïdie apparente, c'est-à-dire 15 chromosomes A et 13 chromosomes D).

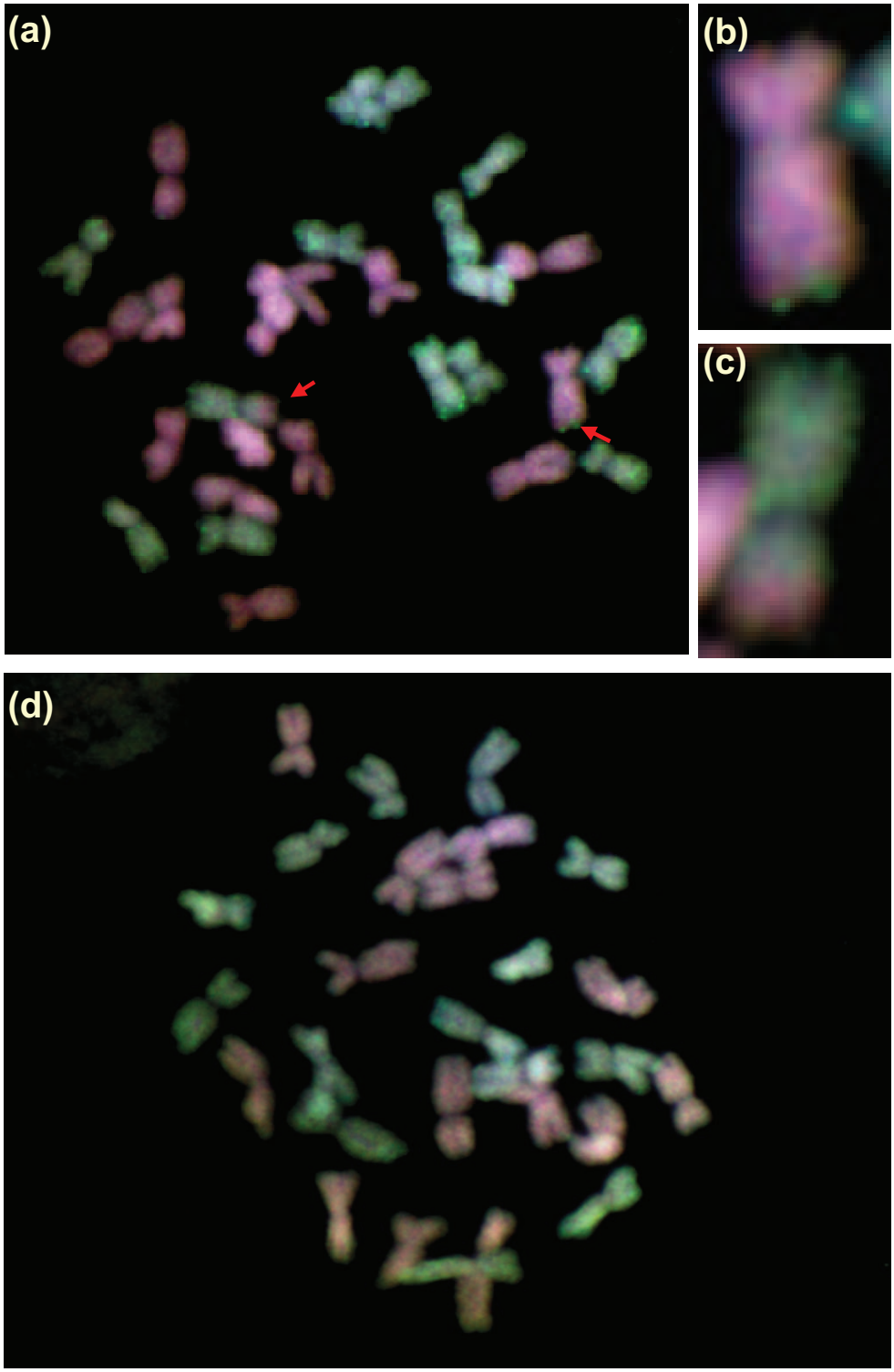

Figure 21 : Remaniements chromosomiques identifiés par GISH chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S5 issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*.
(a) cellule en mitose de l'allotétraploïde AADD présentant deux remaniements chromosomiques indiqués par une flèche rouge.
(b) et (c) agrandissement des remaniements chromosomiques observés chez le même allotétraploïde.
(d) cellule en mitose d'une plante AADD sœur ne présentant pas de remaniements chromosomiques.

Une expérience préliminaire réalisée à l'aide des 3 marqueurs SSR et 2 marqueurs EST réarrangés en génération S3 spécifiquement chez l'allotétraploïde AADD n'a pas montré que ces marqueurs étaient réarrangés en génération S0 des allotétraploïdes AADD.

Un jeu supplémentaire de 50 SSR a également été utilisé pour tenter de détecter de nouveaux remaniements. Aucun de ces marqueurs n'a toutefois montré de changement génétique sur l'ensemble des hybrides et allotétraploïdes de génération S0 analysés.

IV. Discussion

Au cours de ce travail, j'ai caractérisé la nature et la variabilité de l'appariement chromosomique au stade métaphase I de la méiose, en lien avec les changements structuraux chez des allotétraploïdes synthétiques de blé. L'objectif de ce travail étant de mieux comprendre les premières étapes accompagnant la formation des allotétraploïdes synthétiques dépourvus du locus *Ph1*.

Effet de la divergence des génomes parentaux sur l'appariement chez les hybrides interspécifiques

J'ai tout d'abord montré l'existence d'appariements entre chromosomes homéologues chez l'ensemble des hybrides interspécifiques haploïdes (1n) analysés et dont la fréquence varie en fonction des génomes des espèces impliquées dans les croisements (Figure 17, Tableau 4).

Rappelons que nous n'avons pas observé ce type d'appariement chez les hybrides interspécifiques haploïdes du *T. turgidum* x *Ae. tauschii* (BAD, n=3x=21). Ces derniers se caractérisent par une absence d'appariements homéologues en métaphase I: les chromosomes restant à l'état d'univalents en absence de leurs homologues (Mestiri *et al.,* 2010). Cette absence d'appariement est due à la présence du locus *Ph1* apporté par le géniteur tétraploïde *T. turgidum* (BBAA, 2n=4x=28). Le locus *Ph1* unique aux blés tétraploïdes et hexaploïdes naturels n'a pas été retrouvé chez les espèces diploïdes (genres *Triticum* et *Aegilop*s) (Griffiths *et al.,* 2006), et explique en partie l'existence des appariements homéologues observés chez les hybrides interspécifiques issus de croisements entre ces dernières (Figure 17, Tableau 4). Toutefois, l'absence de *Ph1* n'explique pas la variabilité du taux d'appariement homéologues chez les hybrides analysés. Les analyses cytogénétiques effectuées sur 26 hybrides interspécifiques représentant 10 combinaisons de croisements entre des espèces de génomes A (*T. urartu* et *T. monococcum ssp aegilopoides*), S (*Ae. searsii*, *Ae. sharonensis*, *Ae. longissima*) et D (*Ae. tauschii*) montrent une forte variabilité des appariements homéologues en fonction des combinaisons des génomes considérées. En effet, j'ai montré que la fréquence d'appariement entre homéologues (généralement sous forme de bivalents) est plus élevée chez les hybrides issus de croisements entre *Ae. tauschii* (génome

D) et *Ae. searsii* (génome S) que ceux issus de croisements entre le même *Ae. searsii* et *T. urartu* (génome A). Ces résultats sont en accord avec ceux de Lucas & Jahier (1988) qui ont étudié des hybrides interspécifiques similaires à ceux produits pendant cette thèse. Ces auteurs ont montré que l'appariement chromosomique entre le génome D d'*Ae. tauschii* et le génome S d'*Ae. longissima* (7.38 associations) est aussi élevé que entre le génome D d'*Ae. tauschii* et le génome A de *T. urartu* (7.23 associations). Ces auteurs ont également observé un faible taux d'appariement chromosomique chez les hybrides combinant les génomes A et S (1.29 associations). De même, Cunado & Santos (1999) ont étudié le comportement méiotique (prophase et métaphase) d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre diverses espèces du genre *Aegilops* (génomes D, N, M et U) et ont également observé un effet des génomes parentaux sur le taux d'appariement homéologue.

L'étude du comportement méiotique des hybrides interspécifiques F1 a donc montré qu'en absence de leurs homologues, certains chromosomes s'apparient avec leurs homéologues, et le taux de cet appariement diffère en fonction des génomes parentaux considérés.

Variabilité de l'appariement homéologue chez allotétraploïdes synthétiques

Après doublement des hybrides haploïdes F1 (1n), l'analyse du comportement méiotique des allotétraploïdes synthétiques (2n) issus de la première génération doublée (S0) a mis en évidence l'existence d'appariements homéologues se traduisant par la formation de multivalents (Tableau 5). La technique GISH utilisée nous a permis de vérifier que les multivalents impliquent des chromosomes homéologues et que les bivalents sont autosyndétiques (constitués de chromosomes homologues) (Figure 18).

Il est important de signaler que cet appariement homéologue n'a en aucun cas été observé chez les allohexaploïdes synthétiques analysés dans le chapitre I-A et possédant le locus *Ph1* (Mestiri *et al.,* 2010). Ce résultat n'est pas surprenant puisque contrairement à ces allohexaploïdes, les allotétraploïdes analysés dans ce chapitre ne possèdent pas le locus *Ph1*. De plus, l'appariement homéologue se produisait déjà chez les hybrides interspécifiques F1 (Figure 17, Tableau 4), même si dans ce dernier cas les contraintes ne sont pas les mêmes car chaque chromosome se trouve en une seule copie. Chez ces allotétraploïdes, chaque chromosome possède son homologue mais certains chromosomes s'apparient avec leurs homéologues.

De manière assez intéressante, la fréquence de multivalents et donc le taux d'appariements homéologues chez les allotétraploïdes synthétiques sont en bonne corrélation avec celui observé dans leurs hybrides F1 respectifs et varient donc en fonction des génomes des espèces parentales. Ainsi un taux d'appariements homéologues élevé a été observé chez les allotétraploïdes DDSS et AADD alors qu'il est faible chez les allotétraploïdes AASS (Figure 18, Tableau 5). Ce résultat a été confirmé sur des générations plus avancées (S3-S4) obtenues indépendamment (col. Moshe Feldman, Weizmann institute, Israel). En effet, nous avons également observé que les appariements homéologues sont importants chez les générations avancées des allotétraploïdes AADD alors que les allotétraploïdes AASS et SSAA présentent très peu de multivalents (Tableau 5 Figure 18). La stabilité des allotétraploïdes de combinaison AASS ou SSAA corrèle avec le fait que le tétraploïde naturel *T. turgidum* relativement stable associe une combinaison similaire de génomes: le génome A et le génome B (proche du génome S).

La stabilité du comportement méiotique observée chez les allotétraploïdes de génome AASS peut s'expliquer par une combinaison de plusieurs facteurs, notamment :

- L'existence d'une divergence de structures et de séquences entre les génomes A et S, plus importante qu'entre génome A et D et aussi D et S, qui ont connu une prolifération différentielle des éléments transposables (Salse *et al.,* 2008b; Chalupska *et al.,* 2008; Charles *et al.,* 2008; Harry Belcram, *Comm. Pers.*). Plusieurs études ont également souligné l'importance de la divergence des génomes parentaux dans la formation des polyploïdes stables (Ramsey & Schemske, 1998; Paun *et al.,* 2009; Soltis & Soltis, 2009).
- L'existence de facteurs génétiques, limitant l'appariement et la recombinaison homéologue, apportés par l'un des génomes parentaux. Il est de ce fait important que la structure de l'homologue du gène *Ph1* dans le génome S d'*Ae. speltoides* semble être très proche de celui du génome B des espèces polyploïdes, alors que ceux des génomes A et D sont plus divergents (Al-Kaff *et al.,* 2008).

Il serait intéressant d'étudier l'évolution du comportement méiotique sur plusieurs générations afin d'analyser le processus de stabilisation. Le matériel que j'ai produit est très intéressant de ce point de vue puisque il comporte plusieurs combinaisons génomiques ainsi que des individus présentant de remaniements structuraux en génération S0 alors que d'autres non. Ce travail permettrait d'étudier l'impact de ces remaniements sur la stabilisation des

polyploïdes. Les remaniements vont-ils induire une instabilité accrue ou au contraire peuvent-ils induire une stabilisation? Est-ce que ces remaniements vont être contre sélectionnés?

De récentes études chez les blés ont suggéré la stabilisation du comportement méiotique au cours des premières générations (S1 à S3) et établi une corrélation positive entre appariement, fertilité et élimination de 'low copy non coding DNA' (Ozkan & Feldman, 2009). Toutefois, ces auteurs n'ont analysé qu'une seule plante par génération, ce qui n'est pas suffisant à mon avis pour établir des corrélations significatives.

Les allotétraploïdes analysés sont issus de doublement à la colchicine et aucun cas de doublement par la voie des gamètes non réduits n'a été observé. L'existence d'une composante environnementale dans la formation de gamètes non réduits (Ramsey & Schemske, 1998) peut néanmoins expliquer ce résultat.

La possibilité que certains génotypes parentaux puissent avoir une meilleure aptitude à former des gamètes non réduits a été observée par Ramsey & Schemkse (1998). Récemment, un gène *AtPS1* (*Arabidopsis thaliana Parallel Spindle 1*) impliqué dans la formation de gamètes non réduits a été isolé et caractérisé chez *Arabidopsis thaliana* (d'Erfurth *et al.,* 2008). De même, il pourrait exister, chez les blés (*Triticum & Aegilops*) une composante génétique qui modulerait la capacité de combinaisons de génomes parentaux à produire des gamètes non réduits.

Instabilité méiotique et taux d'aneuploïdes

J'ai pu montrer que l'appariement homéologue se traduit par la formation de multivalents (impliquant des chromosomes homéologues) chez les allotetraploïdes synthétiques. Comme attendu, ces méioses irrégulières entraînent la formation de plantes aneuploïdes dans la descendance des allotétraploïdes synthétiques étudiés (Tableau 6). La fréquence d'aneuploïdie est toutefois beaucoup moins élevée (ne dépassant pas 4.5%) comparé à celle obtenue chez les allohexaploïdes synthétiques pouvant atteindre plus de 30% (Mestiri *et al.,* 2010). Néanmoins, j'ai montré que la formation d'aneuploïdes chez les allohexaploïdes synthétiques n'est pas liée à l'appariement homéologue (le locus *Ph1* est présent) mais plutôt à l'appariement homologue incomplet (formation d'univalents et de bivalents droits) (voir Chapitre I-A).

Par ailleurs il est connu que l'aneuploïdie est moins fréquente chez les blés durs tétraploïdes que chez les blés hexaploïdes. La majorité du stock aneuploïde du blé (dont une

bonne partie à été produit par Sears en 1954), est majoritairement composé d'aneuploïdes issus d'hexaploïdes et il est plus difficile d'obtenir des monosomiques issus de tétraploïdes par exemple (Joseph Jahier, *Comm. Pers*.).

Comme attendu, une corrélation négative est observé entre le taux d'appariement homéologue et la fréquence de plantes aneuploïdes observée à la génération suivante. La fréquence la plus haute de plantes aneuploïdes est observée chez les allotétraploïdes qui montrent le plus fort taux d'appariement homéologue comme les allotétraploïdes AADD (Tableau 6).

Les aneuploïdes sont souvent observés chez diverses espèces polyploïdes (voir Ramsey & Schemske, 2002) et il est généralement admis que ces aneuploïdes survivent et sont, dans certaines conditions, capables d'entrer en compétition avec les euploïdes (Ramsey & Schemske, 2002). Toutefois, les conditions favorisant l'établissement des aneuploïdes ainsi que leurs effets sur la viabilité et fertilité des polyploïdes sont peu connues. Des études moléculaires et cytogénétiques couplées aux données phénotypiques sur plusieurs générations permettraient de mieux comprendre l'avantage que peut constituer l'aneuploïdie.

Appariements homéologues et remaniements chromosomiques chez allotétraploïdes synthétiques

Nous avons observé d'importants remaniements chromosomiques, de type translocation, dès la première génération (S0) après polyploïdisation, uniquement chez les allotétraploïdes combinant les génomes A et D (Figure 20; Figure 21).

L'absence de remaniements chromosomiques chez l'hybride interspécifique (Figure 17) nous amène à penser que ces remaniements sont issus d'événement de recombinaison homéologue lors de la première méiose des hybrides doublés.

A cause de leurs associations en métaphase I chez les hybrides interspécifiques, ainsi que des données de séquences génomiques, il est généralement admis que ces deux génomes sont relativement plus proches entre eux qu'avec les autres génomes (Charles *et al.,* 2008; Chalupska *et al.,* 2008; Salse *et al.,* 2008b). Ceci est en accord avec les résultats de Sanchez Moran *et al.* (2001) qui ont montré par une approche similaire à la notre (GISH) que les remaniements chromosomiques concernent principalement les génomes A et D chez les allohexaploïdes BBAADD où le locus *Ph1* a été délété (mutant *ph1b* et nullisomique 5B). Ils

ont également observé chez ces plantes une instabilité chromosomique avec la formation d'aneuploïdes et d'euploïdes apparents.

D'autres remaniements chromosomiques ont été identifiés chez les allotétraploïdes synthétiques AADD de générations plus avancées fournis par le Pr. Moshe Feldman. L'analyse de la méiose par GISH de l'allotétraploïde AADD présentant des changements génétiques (plante S3-3) a également révélé la présence de remaniements chromosomiques. La localisation distale des translocations observées corrobore celle des deux marqueurs réarrangés issus d'EST. Ces deux marqueurs sont en effet cartographiés sur le BIN3BS8(0.7-1) localisé en position distale sur le bras court du chromosome 3B. Ceci nous amène à penser que ces remaniements observés par PCR ne sont autre que le reflet des translocations non réciproques observées par GISH. La caractérisation des chromosomes transloqués et la cartographie fine de la zone transloquée nous permettra de valider ce résultat.

Nous avons également identifié des remaniements chromosomiques dans la descendance de cet allotétraploïde AADD (plante S3-3) (Figure 21) ainsi que des aneuploïdes (euploïdes apparents). Ces remaniements sont similaires (toujours en position distale) à ceux observés chez les allotétraploïdes AADD de génération S0 mais affectent plus de chromosomes et ne semblent pas impliquer le même bras chromosomique (Figure 20, I-7).

Les travaux menés par Madlung *et al.* (2005) montrent que l'allopolyploïdie peut s'accompagner d'une instabilité méiotique générant des remaniements chromosomiques chez les allotétraploïdes synthétiques d'Arabidopsis mais induisant peu de remaniements à certains loci spécifiques.

Le fait de ne pas avoir observé de remaniements chromosomiques chez les allotétraploïdes DDSS est surprenant puisque ces allotétraploïdes présentent des appariements entre chromosomes homéologues. L'existence d'une sélection (gamétique ou sporophytique) à l'encontre des produits de crossing-over homéologues impliquant les génomes D et S pourrait expliquer ce résultat.

En revanche, l'absence de remaniements chromosomiques chez les allotétraploïdes AASS/SSAA n'est pas surprenante. En effet, très peu d'instabilité méiotique a été observée chez les allotétraploïdes combinant les génomes A et S. Sanchez-Moran *et al.* (2001) n'ont pas observé de remaniements chromosomiques chez les mutants *ph1c* (allotétraploïdes de

génome BBAA présentant une mutation au niveau du locus *Ph1*) et très peu de remaniements ont concerné les génomes A et B des mutants allohexaploïdes *ph1b* ainsi que des lignées nullisomiques pour le chromosome 5B (Joseph Jahier, *Comm. Pers*). De plus, très peu d'appariements homéologues entre A et B ont été observés chez ces mutants. Il semble donc que l'absence de remaniement serait dû à la forte divergence de séquences entre les deux génomes.

Changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques

Des remaniements structuraux ont été mis évidence dans différents systèmes allopolyploïdes tel que les *Brassica* (Song *et al.,* 1995; Lukens *et al.,* 2006; Gaeta *et al.,* 2007; Szadkowski *et al.,* 2010), le Triticale (Ma *et al.,* 2004; Bento *et al.,* 2008), Tragopogon (Buggs *et al.,* 2009), Arabidopsis (Comai *et al.,* 2000; Pontes *et al.,* 2004; Madlung *et al.,* 2005). En revanche, très peu de remaniements structuraux semblent accompagner l'hybridation interspécifique ou l'allopolyploïdie chez le coton (Liu *et al.,* 2001).

Chez les espèces des genres *Triticum* et *Aegilops*, certains travaux ont mis en évidence d'importants remaniements structuraux (Feldman *et al.,* 1997; Liu *et al.,* 1998ab; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Han *et al.,* 2005; Khasdan *et al.,* 2010) alors que d'autres montrent une stabilité au niveau structural (He *et al.,* 2003; Chagué *et al.,* 2010; Mestiri *et al.,* 2010).

Nous avons précédemment montré que l'aneuploïdie représente la principale modification structurale observée chez les allohexaploïdes synthétiques du blé possédant le locus *Ph1* et qu'aucun changement génétique de type délétion de séquences n'a été mis en évidence chez des plantes euploïdes en utilisant des marqueurs moléculaires issus d'EST, de SSR et d'éléments transposables (Mestiri *et al.,* 2010) ou en analysant des transcrits silencés chez ces allohexaploïdes (Chagué *et al.,* 2010).

Comme je l'ai précisé dans le chapitre I-A, ces conclusions divergentes peuvent être expliquées par les diverses approches méthodologiques utilisées et les combinaisons d'allopolyploïdes analysées ; les éliminations de séquences ayant majoritairement été observées chez des allotétraploïdes synthétiques ne possédant pas le locus *Ph1* (Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Han *et al.,* 2005). Ces auteurs n'ont pas utilisé de témoins à l'additivité. L'étude présentée dans ce chapitre de la thèse a été réalisée sur ce type d'allotétraploïdes synthétiques ne possédant pas le locus *Ph1* et montre également que des changements génétiques et des remaniements chromosomiques se produisent tôt après polyploïdisation. Cependant, la fréquence des changements génétiques que j'ai mis en

évidence est nettement moins élevée que ce qui a été précédemment observé sur blé (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Han *et al.,* 2005).

Cette étude a également révélé que **les remaniements observés sont uniparentaux** : les homéoallèles réarrangées correspondent uniquement à ceux du génome D d'*Ae. tauschii* (Figure 19). Ce phénomène a été observé dans plusieurs systèmes polyploïdes. Ainsi, Ozkan *et al.* (2001) ont observé chez l'allopolyploïde synthétique *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata* que 14% des loci d'*Ae. sharonensis* sont éliminés contre seulement 0,5% des loci d'*Ae. umbellulata.* Il en est de même pour le Triticale où la majorité des remaniements sont dues à une perte des fragments du seigle (Ma *et al.,* 2004; Bento *et al.,* 2008).

Par ailleurs, Gaeta et *al.* (2007) ont observé une asymétrie dans la fréquence des changements génétiques chez *Brassica napus* : la plus haute fréquence a été observée sur le chromosome C1 (20.8%) alors que la fréquence des changements génétiques est de 7.9% pour le chromosome homéologue A1 (Gaeta *et al.,* 2007). Les travaux de Nicolas *et al.* (2007, 2009) ont abouti à la même conclusion.

De manière intéressante, nous avons également noté en réalisant les GISH que les aneuploïdes de type AADD (*T. urartu* x *Ae. tauschii)* ainsi que les « euploïdes apparents » (présentant un jeu chromosomique déséquilibré, par exemple 15 chromosomes du génome A et 13 du génome D) se caractérisent par la perte d'un chromosome du génome D. Toutefois, il est important de rappeler que les changements génétiques ont été observés sur des euploïdes présentant un jeu de chromosomes complet (14 chromosomes du génome A et 14 chromosomes du génome D). Les changements génétiques ne sont donc pas liés à l'aneuploïdie.

L'observation de ces aneuploïdes et « euploïdes apparents » chez les polyploïdes souligne la nécessité de vérifier le contenu chromosomique des différentes plantes avant de les étudier au niveau génétique, épigénétique et transcriptomique.

Plusieurs études menées sur les allopolyploïdes synthétiques des genres *Triticum* et *Aegilops* ont révélé que des changements génétiques apparaissent dès les premières générations suivant l'allopolyploïdisation (générations S0 à S4) voire même après l'hybridation (Shaked *et al.,* 2001; Ozkan *et al.,* 2001). Au cours de ce travail, l'hybride interspécifique ainsi que les générations S0, S1 et S2 de l'allotétraploïde synthétique *T. urartu x Ae. tauschii (AADD)* n'étant pas disponibles, il n'a pas été possible de déterminer l'étape au cours de laquelle les réarrangements se sont produits. Pour cette raison, des hybrides

interspécifiques F1 et leurs allotétraploïdes correspondant de génération S0 ont été produits. Outre l'analyse du « timing » des changements génétiques, ce nouveau matériel permettra de déterminer si les mêmes changements génétiques seront observés dans des allotétraploïdes AADD obtenus indépendamment. De plus, ce matériel offre la possibilité de confirmer la spécificité des remaniements observés pour ce croisement.

Les changements génétiques observés chez les allotétraploïdes synthétiques de générations S3 et S4 n'ont pas été observés chez les allotétraploïdes AADD de génération S0 obtenus indépendamment. Ce résultat suggère que ces changements génétiques peuvent survenir plus tard, ou bien qu'ils sont issus d'évènements aléatoires.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les éliminations des séquences parentales et les réarrangements chromosomiques chez les allopolyploïdes naturels et synthétiques. Les irrégularités méiotiques, les recombinaisons illégitimes et homologues inégales (Devos *et al.,* 2002; Vitte & Bennetzen, 2006), ou les recombinaisons entre génomes homéologues (Udall *et al.,* 2005; Nicolas *et al.,* 2007; Gaeta & Pires, 2010) ainsi que l'activation transpositionelle des éléments transposables font partie des mécanismes pouvant causer ces restructurations.

Chez les polyploïdes naturels de blés, plusieurs cas de recombinaison illégitime impliquant ou non des éléments transposables et aboutissant majoritairement à des délétions ont été identifiés (Chantret *et al.,* 2005; Charles *et al.,* 2008, 2009).

Les résultats présentés dans les partie A et B de ce chapitre suggèrent que les remaniements chromosomiques observés résultent d'évènements de recombinaisons homéologues chez les allotétraploïdes synthétiques analysés.

De plus, il est connu que les chiasmas chez les blés sont plus fréquents dans les régions distales (Lukaszweski *et al.,* 1995; Akhunov *et al.,* 2003) ce qui concorde avec la localisation distale des remaniements chromosomiques identifiés (Figures 20 et 21). De plus, deux des remaniements observés par PCR sont situés en position distale sur le BIN 3BS8(0.7-1).

Chapitre II :
Caractérisation des changements de l'état de méthylation de l'ADN chez les allohexaploïdes synthétiques de blé génétiquement stables

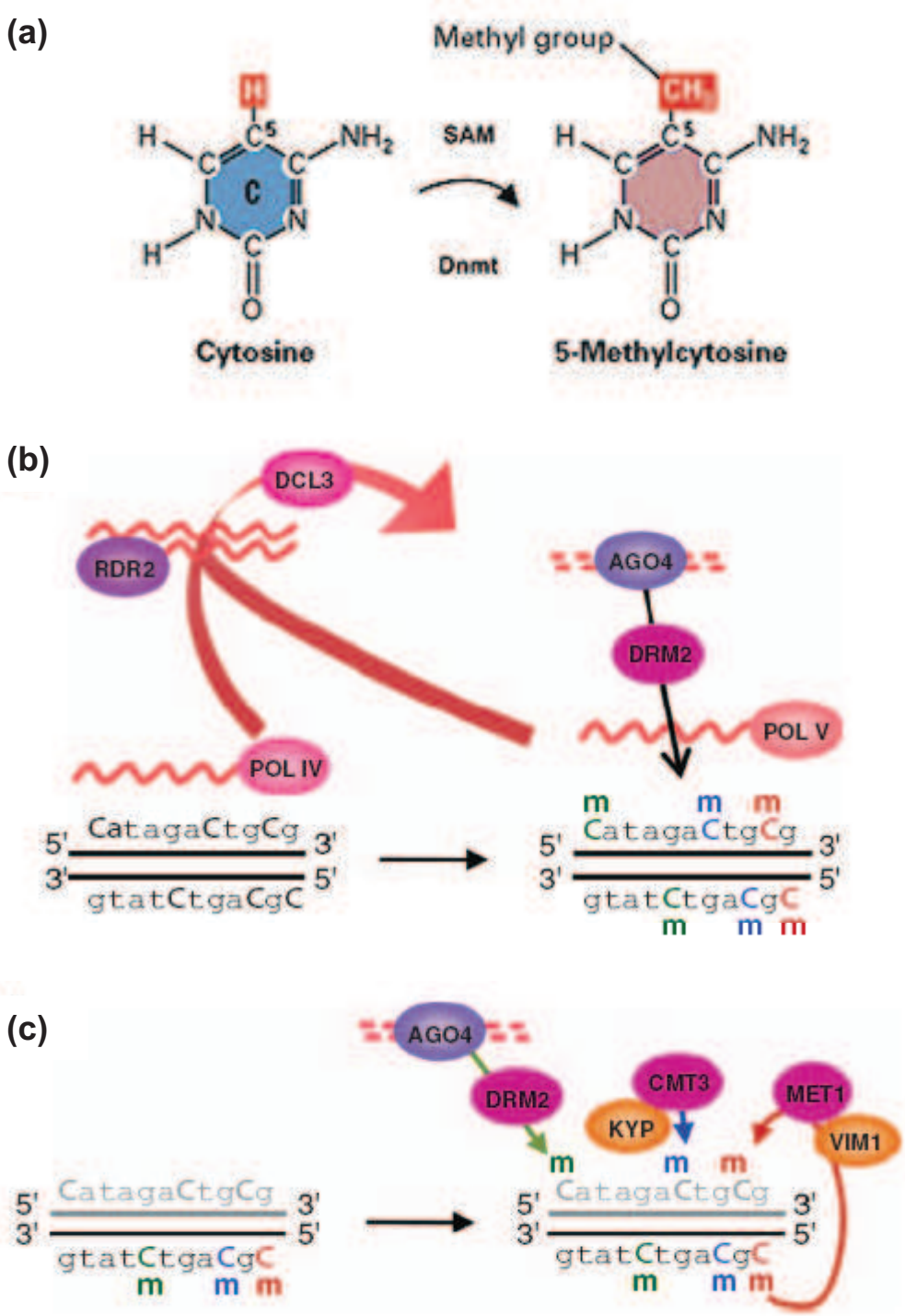

Figure 22: Etablissement et maintenance de la méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana.*

(a) Réaction de méthylation assurée par des ADN méthyltransférases (Dnmt) qui transfèrent un groupement méthyle de la S-adénosyl-méthionine (SAM-CH_3) sur le carbone en position 5 du cycle.

(b) Méthylation *de novo* (d'après Teixeira & Colot, 2010).

(c) Méthylation de maintenance (d'après Teixeira & Colot, 2010).

^{m}C: méthylation des CHH, ^{m}C: méthylation des CHG, ^{m}C: méthylation des CG.

RDR2: RNA-Dependant RNA Polymerase, AGO4: ARGONAUTE 4, POL IV, V: POLYMERASE IV, V, DCL3: DICER LIKE 3, DRM2: DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2, CMT3: CHROMOMETHYLTRANSFERASE 3, MET1: METHYLTRANSFERASE 1, KYP: KRYPTONITE, VIM1:VARIANT IN METHYLATION 1

I. Introduction

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique que l'on retrouve chez la plupart des eucaryotes et consiste en l'addition d'un groupement méthyle (-CH3) provenant de la *S*-adénosyl-méthionine sur un résidu cytosine (Figure 22a).

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN n'affecte que les cytosines en contexte CG (Bird, 2002). En revanche, chez les plantes, les cytosines peuvent être méthylées en contexte symétrique CG et CHG ou asymétrique CHH (où H: A, C ou T) (voir *Introduction bibliographique, paragraphe I.4.2*).

La méthylation de l'ADN est rendue possible grâce à la catalyse réalisée par un groupe conservé de protéines : les ADN méthyltransférases (Colot & Rossignol, 1999; Finnegan & Kovac, 2000 ; Pavlopoulou & Kossida, 2007).

Chez les mammifères, deux familles d'ADN-méthyltransférases, Dnmt1 et Dnmt3 assurent la méthylation des CG (Bestor, 2000).

Chez *Arabidopsis*, les ADN-méthyltransférases les mieux caractérisées et impliquées dans la maintenance et/ou l'établissement de la méthylation de l'ADN sont (Figures 22b, 22c):

- MET1 (Méthytransférase 1 qui appartient à la famille Dnmt1),
- DRM1 et 2 (Domains Rearranged Methyltransferases 1 et 2 qui sont des homologues de la famille Dnmt3),
- CMT3 (Chromométhyltransférase 3 appartenant à la famille CMT et unique aux plantes).

La **méthylation de maintenance** intervient après la réplication de l'ADN sur le brin néosynthétisé en incorporant des groupements méthyles de façon symétrique au brin parental méthylé (Figure 22c).

La maintenance de la méthylation au niveau des sites CG, CHG et CHH n'est pas assurée par les même ADN-méthyltransférases. En effet, la maintenance de la méthylation des CG est principalement assurée par MET1 et celle des CHG par l'activité ADN méthyltranférase de maintenance de CMT3. DRM2 assure la maintenance des CHH (site asymétrique) et fait intervenir la voie appelée « RNA direct DNA methylation » (RdDM) (Figure 22c).

L'**établissement de la méthylation ou méthylation *de novo*** correspond à la méthylation de nouveaux résidus cytosines (antérieurement non méthylés) en dehors de la phase de réplication. Cette voie revet une signification biologique majeure puisqu'elle ciblerait principalement les éléments répétés et ainsi que les transgènes (Huettel *et al.,* 2007; Law & Jacobsen, 2010).

Elle se fait par le biais de la voie RdDM qui selon le modèle actuel assure le recrutement de DRM2 pour établir la méthylation sur les sites CG, CHG et CHG (Wassenegger, 1994). Selon ce modèle, l'ARN polymérase IV (POL IV) spécifique des plantes transcrit les séquences cibles (correspondant généralement à des éléments répétés) et produit des ARNs long simple brins qui serviront de matrice à une ARN polymérase ARN dépendante (nommée RDR2) pour fabriquer des ARN double brins. Ceux-ci sont alors clivés par une RNase III (DICER LIKE3) pour produire des siRNA (short interfering RNA) de 24 nucléotides. Ces siRNA guident la machinerie protéique RdDM (Complexe ARGONAUTE 4 :AGO4, POL V) pour recruter DRM2 qui établie la méthylation sur les sites CG, CHG et CHG (Figure 22b) (revue dans Law & Jacobsen, 2010; Teixeira & Colot, 2010).

L**a déméthylation**, ou la perte de la méthylation de l'ADN, peut se produire de façon **passive**, c'est-à-dire en l'absence du maintien de la méthylation après la division cellulaire ou de façon **active** par une voie enzymatique transformant les méthylcytosines en cytosines. Ces enzymes sont des ADN glycosylases qui effectuent une excision puis un remplacement de base suivi d'une réparation de l'ADN (Zhu, 2009; Gehring *et al*., 2009). Plusieurs protéines ont été caractérisées chez les *Arabidopsis*: REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1), DEMETER (DME) DEMETER-LIKE (DML2) et DML3 (Penterman *et al*., 2007 ; revue dans Teixeira & Colot, 2010).

Il est largement admis que la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la **stabilisation du génome**. Elle s'exerce principalement sur les **éléments transposables**, constituants majeurs de nombreux génomes animaux ou végétaux, en les maintenant à l'état inactif (Chandler & Walbot, 1985; Martienssen et Colot, 2001). Elle régule également **l'expression des gènes**. S'il est bien connu que la méthylation des régions promotrices des gènes entraîne une sous expression, le rôle de la méthylation du corps du gène, conservée dans différents eucaryotes, reste mal compris. Il semblerait cependant que cette méthylation est corrélée à une légère augmentation du niveau transcriptionnel (Teixeira & Colot, 2009; Feng *et al.,* 2010; Saze & Kakutani, 2010).

Chez les plantes, la méthylation de l'ADN a été décrite comme transmise de manière stable au cours des générations; une modification ou altération de la méthylation peut alors survenir et être fixée de manière stable au fil des générations.

De récentes études ont montré que la méthylation de l'ADN est plus dynamique que ce qu'ont pouvait penser. Ainsi, Teixeira *et al.* (2009) ont montré qu'il existe un mécanisme de correction des défauts de méthylation faisant intervenir les ARN interférents chez *Arabidopsis*. Ces travaux ont montré que la reméthylation vise spécifiquement certains éléments transposables ciblés par des siRNA.

Plus particulièrement, la méthylation semble être dynamique au cours de la phase reproductive chez les plantes. De récents travaux proposent que les profils de méthylation observés au niveau des cellules végétatives du pollen et de la cellule centrale de l'ovule, qui ne contribuent pas à la formation de l'embryon, dicterait la méthylation dans les générations ultérieures (Hsieh *et al.,* 2009; Soltkin *et al.,*2009; Jullien & Berger, 2010; Martienssen, 2010).

De nombreuses avancées dans les processus de méthylation et de déméthylation de l'ADN ont été apportées par l'étude de mutants, notamment d'*Arabidopsis* et ont mis en évidence l'importance de la méthylation de l'ADN dans le développement et son rôle dans l'inactivation des ETs.

Deux mutants (*met1* et *ddm1 : decrease in DNA methylation 1*) sont particulièrement bien étudiés et actuellement utilisés pour générer des epiRILs (epigenetic Recombinant Inbred Lines) (Johannes *et al.,* 2009 avec *ddm1*; Reinders *et al.,* 2009 avec *met1*).

- Les mutants *met1* dont l'activité ADN méthyltransférase 1 est inhibée. Ils présentent une hypométhylation principalement des sites CG ainsi que des anomalies de développement (Finnegan *et al*., 1996; Saze *et al*., 2003). Ces effets sont transmissibles au cours des divisions cellulaires et se maintiennent sur plusieurs générations (Finnegan *et al*., 1996).

  Les travaux de Mathieu *et al.* (2007) montrent qu'en l'absence de méthylation des CG (analyses des mutants *met1* sur plusieurs génération), des patrons épigénétiques nouveaux et aberrants se forment au cours des générations, suggérant que la méthylation des CG coordonne la mémoire de l'information épigénétique afin que celle-ci soit transmise fidèlement au cours des générations. Chez les mammifères, les mutants *dnmt1* sont létaux à l'état embryonnaire (Bird, 2002).

- Les mutants *ddm1* (DDM1 code pour un facteur de remodelage de la chromatine) d'*Arabidopsis* (Finnegan et Denis, 1993 ; Vongs *et al.*, 1993 ; Richards, 1997) présentent une hypométhylation globale du génome qui conduit à une activation des ET (Gendrel *et al*., 2002).

Chez l'homme, il est aujourd'hui clair que les défauts de méthylation de l'ADN jouent un rôle majeur dans le développement de certains cancers: l'hyperméthylation induisant une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Taby & Issa, 2010).

Comme nous avons pu le voir, la méthylation de l'ADN assure une intégrité structurale et fonctionnelle du génome. Si cette marque épigénétique peut être altérée en condition de stress (Verhoeven *et al.,* 2010), comment répond-elle aux chocs génomiques que peut constituer l'hybridation et la polyploïdie?

De nombreuses études ont en effet mis en évidence que l'hybridation et la polyploïdie s'accompagnent d'une altération des profils de méthylation parentaux dans divers systèmes polyploïdes (auto- et allopolyploïdes) (Shaked *et al.,* 2001; Madlung *et al.,* 2002; Parisod *et al.,* 2009; Kraitshtein *et al.,* 2010). Ces changements de la méthylation de l'ADN semblent entrainer une reprogrammation de l'expression des gènes ainsi que des modifications phénotypiques et contribueraient à la stabilisation de ces polyploïdes (revue Rapp & Wendel, 2005; Jackson & Chen, 2009). Par exemple, Madlung *et al.* (2002) ont montré que le traitement à la 5-azadeoxycytidine (agent chimique inhibant les ADN méthyltransférases) induit une instabilité phénotypique accrue chez les allotétraploïdes d'*Arabidopsis* comparés aux géniteurs.

De précédents travaux réalisés sur des blés polyploïdes en utilisant des techniques ciblant des sites spécifiques (comme par exemple le site 5'-CCGG-3') reconnus par des enzymes de restriction sensibles ou pas à la méthylation des cytosines au niveau de ces sites (technique MSAP : Methyl Sensitive Amplified Polymorphism) ont permis d'apprécier la méthylation de l'ADN au niveau des séquences d'ADN présentant ces sites (Shaked *et al.,* 2001) ou dans des séquences de familles de rétrotransposons à LTR (Kraitshtein *et al.,* 2010). Si ces études ont montré que l'allopolyploïdie entraine des changements de l'état de méthylation des copies parentales chez les allopolyploïdes synthétiques, ces études n'ont pas

caractérisé en détail (dans les différents contextes de séquences), ni de manière quantitative la méthylation de l'ADN au niveau des gènes et des éléments transposables.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre II est de caractériser l'étendue des changements de méthylation de l'ADN chez des allohexaploïdes synthétiques de blé que j'ai caractérisé comme ne présentant pas de changements génétiques de type délétion de séquences ADN (Mestiri *et al.,* 2010), mais montrant des modifications des profils d'expression (Chagué *et al.,* 2010). Une comparaison des effets de l'allopolyploïdie sur la méthylation de l'ADN au niveau des séquences codantes et des séquences répétées a été donc réalisée en utilisant une approche «semi quantitative» et en distinguant les différents contextes de séquences décrits ci- dessus.

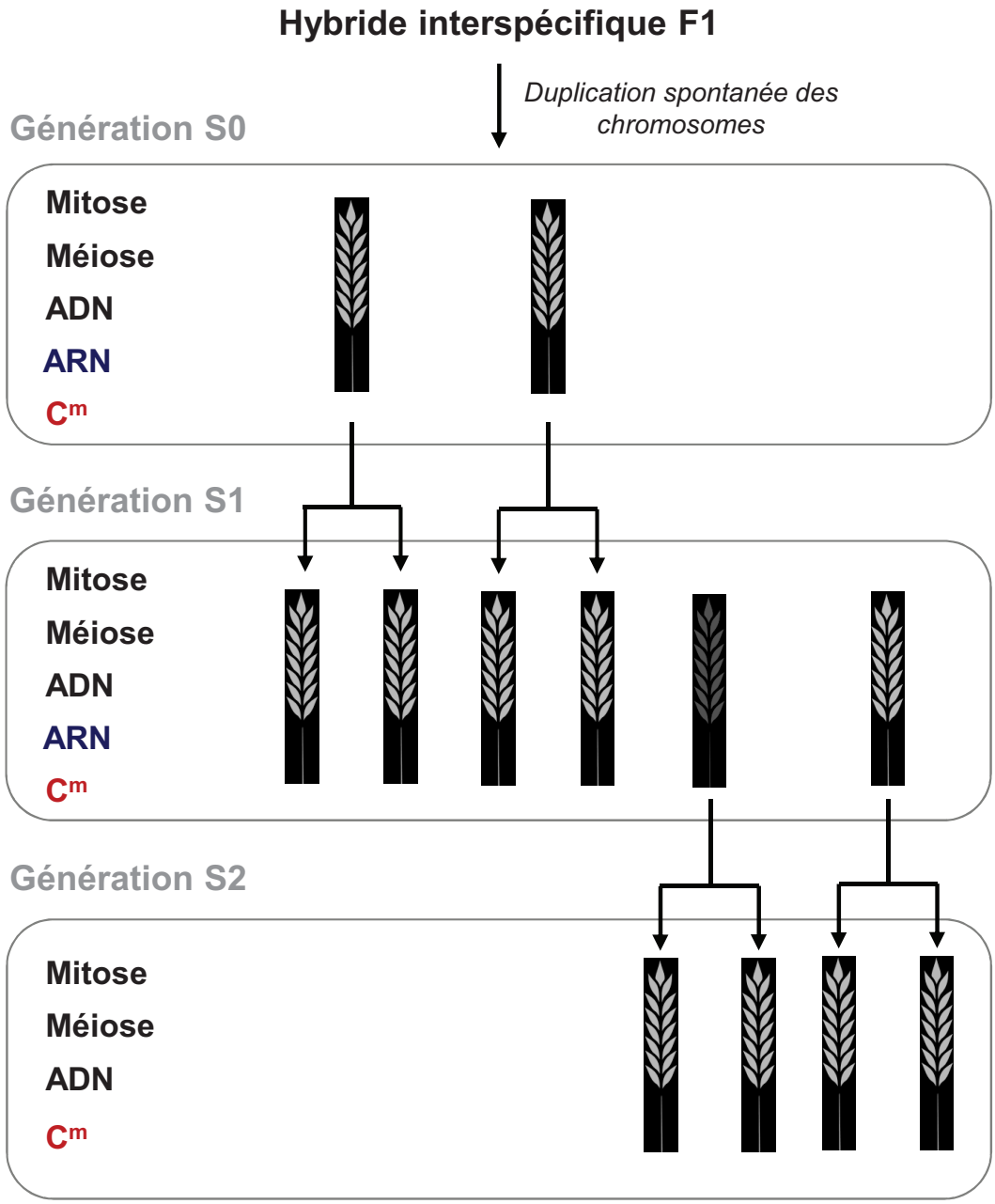

Figure 23 : Types d'analyses réalisées sur les générations S0, S1 et S2 des allohexaploïdes synthétiques étudiés (JOY36 et JOY54).
L'épis grisé correspond à une plante S1 non disponible pour les allohexaploïdes JOY36, 11 et 12 plantes ont donc été analysées pour JOY36 et JOY54 respectivement.
Mitose : dénombrement chromosomique
Méiose : appariement chromosomique
ADN : remaniements au niveau de l'ADN
ARN : transcriptome
C^m : Méthylation de l'ADN
Les résultats des analyses mitotiques, méiotiques et ADN sont présentés dans l'article Mestiri *et al.,* 2010 et ont montré que les plantes sélectionnées sont euploïdes (2n=6x=42) et génétiquement stables (absence de remaniements génétiques).
Les résultats des analyses transcriptomiques sont présentés dans l'article Chagué *et al.,* 2010.

II. Matériels et méthodes

II.1 Allohexaploïdes synthétiques

Deux allohexaploïdes synthétiques ont été choisis pour mener cette étude : JOY36 et JOY54, qui partagent le même géniteur tétraploïde (*Triticum turgidum* cv. Joyau, AABB) mais pour lesquels les donneurs du génome D sont différents : *Ae. taushii* ssp. *strangulata* accession 36 (Ats36) pour JOY36 et *Ae. taushii* ssp. *taushii* accession 54 (Att54) pour JOY54. Ainsi, la comparaison des profils de méthylation entre JOY36 et JOY54 nous permettra d'étudier également l'effet de la variabilité du géniteur diploïde de génome D.

Les même plantes euploïdes caractérisées au cours des générations S0, S1 et S2 comme ne présentant pas de changements génétiques (Mestiri *et al.,* 2010) mais des changements d'expression (Chagué *et al.,* 2010) ont été sélectionnées pour analyser les changements de l'état de la méthylation de l'ADN.

La figure 23 schématise les différentes analyses réalisées sur le matériel allohexaploïde sélectionné.

II.2 Principe de la méthode Methyl Sensitive Polymerase Chain Reaction (MSPCR): Analyse et interprétation des changements de méthylation

II.2.1 Sensibilité de HpaII et MspI à la méthylation des cytosines au site 5'-CCGG-3'

L'analyse des changements de méthylation de l'ADN effectuée ici repose sur l'utilisation de deux enzymes de restriction, *Hpa*II et *Msp*I qui reconnaissent la même séquence nucléotidique 5'-CCGG-3', mais qui présentent une sensibilité différente à la méthylation des cytosines au niveau de ce site (Figure 24a). En effet, *Hpa*II est sensible à la méthylation des deux cytosines alors que *Msp*I n'est sensible qu'à la méthylation de la cytosine externe (la digestion a lieu quand la cytosine interne est méthylée) ce qui nous permet de suivre l'état de méthylation de la cytosine interne au niveau de ce site et donc d'étudier la méthylation dans le contexte de séquences CG (Figure 24a). Toutefois, la technique utilisée ne nous permet pas d'étudier spécifiquement la méthylation dans le contexte CHG. En effet, *Msp*I et *Hpa*II étant toutes les deux sensibles à la méthylation de la

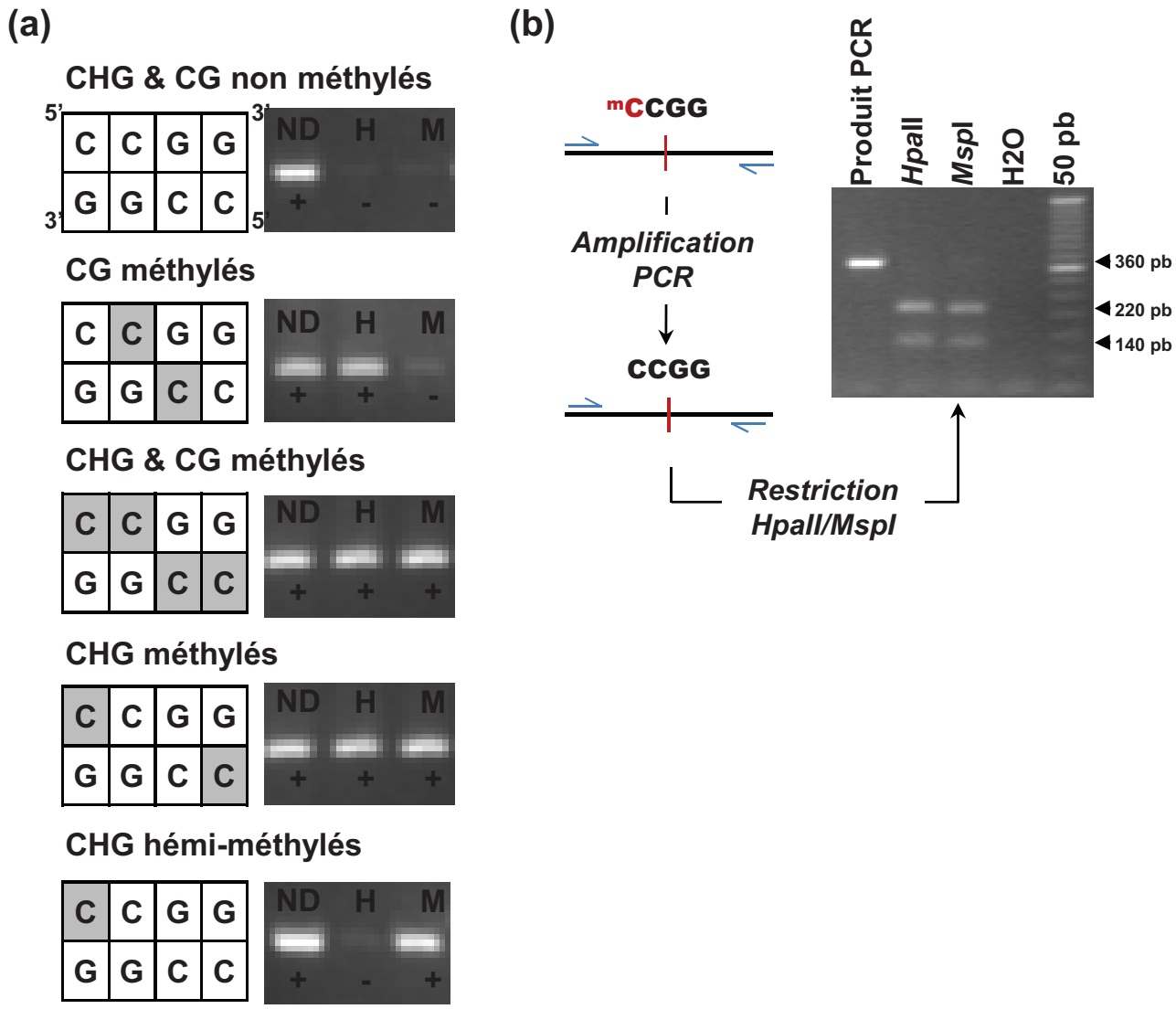

Figure 24 : Analyse de la méthylation de l'ADN en utilisant les isoschizomères *Hpa*II et *Msp*I.
(a) Sensibilité de *Hpa*II et *Msp*I à la méthylation des cytosines au niveau du site 5'-CCGG-3' et profils d'amplifications correspondants obtenus par MSPCR.
(b) Vérification de la présence d'un site 5'-CCGG-3' par digestion avec *Hpa*II et *Msp*I après l'amplification PCR.
ND: Non digéré, H: digéré par *Hpa*II, M: digéré par *Msp*I.

cytosine externe (sur les deux brins), il est impossible de distinguer les profils montrant à la fois une méthylation des CHG et des CG (5'-$^{m}C^{m}$CGG-3') d'une part, de ceux montrant uniquement une méthylation des CHG (5'-^{m}CCGG-3') d'autre part (Figure 24a). Cependant, ces profils permettent de donner une indication sur la méthylation des résidus CHG et seront donc analysés dans ce sens.

Il est à noter que bien que sensible à la méthylation de la cytosine externe sur les deux brins, *Hpa*II est susceptible de digérer les sites dans lesquels la cytosine externe est hémi-méthylée (méthylation sur un seul brin), ce qui n'est pas le cas de *Msp*I. Nous somme donc en mesure d'étudier l'hémi-méthylation des CHG.

II.2.2 Extraction d'ADN, digestions enzymatiques et PCR semi quantitative

Préparation de l'ADN génomique foliaire

L'ADN a été extrait, selon le protocole présenté dans Graner *et al.* (1990), à partir d'échantillons foliaires récoltés au stade 5 feuilles.

Marqueurs PCR analysés et vérification de la présence de sites 5'-CCGG-3'

Les marqueurs PCR analysés sont issus des mêmes séries de marqueurs utilisés tout au long du chapitre I pour l'analyse des changements structuraux, représentant donc des séquences géniques (EST) et des éléments transposables (ET). Ceux présentant le site 5'-CCGG-3' ont été sélectionnés pour l'analyse des changements de méthylation présentés dans ce chapitre.

La présence de sites 5'-CCGG-3' dans ces marqueurs a été prédite à partir des séquences disponibles puis confirmée par digestion (avec *Hpa*II et *Msp*I) des produits amplifiés par PCR (les produits amplifiés n'étant pas méthylés), sur au moins un des trois ADN parentaux. Si le fragment amplifié est digéré, cela signifie qu'il possède au moins un site 5'-CCGG-3' au niveau de sa séquence (Figure 24b). Ce contrôle nous permet d'éliminer tous les marqueurs n'ayant pas de sites 5'-CCGG-3' et donc non informatifs pour l'analyse de la méthylation des cytosines par l'approche développée dans ce chapitre.

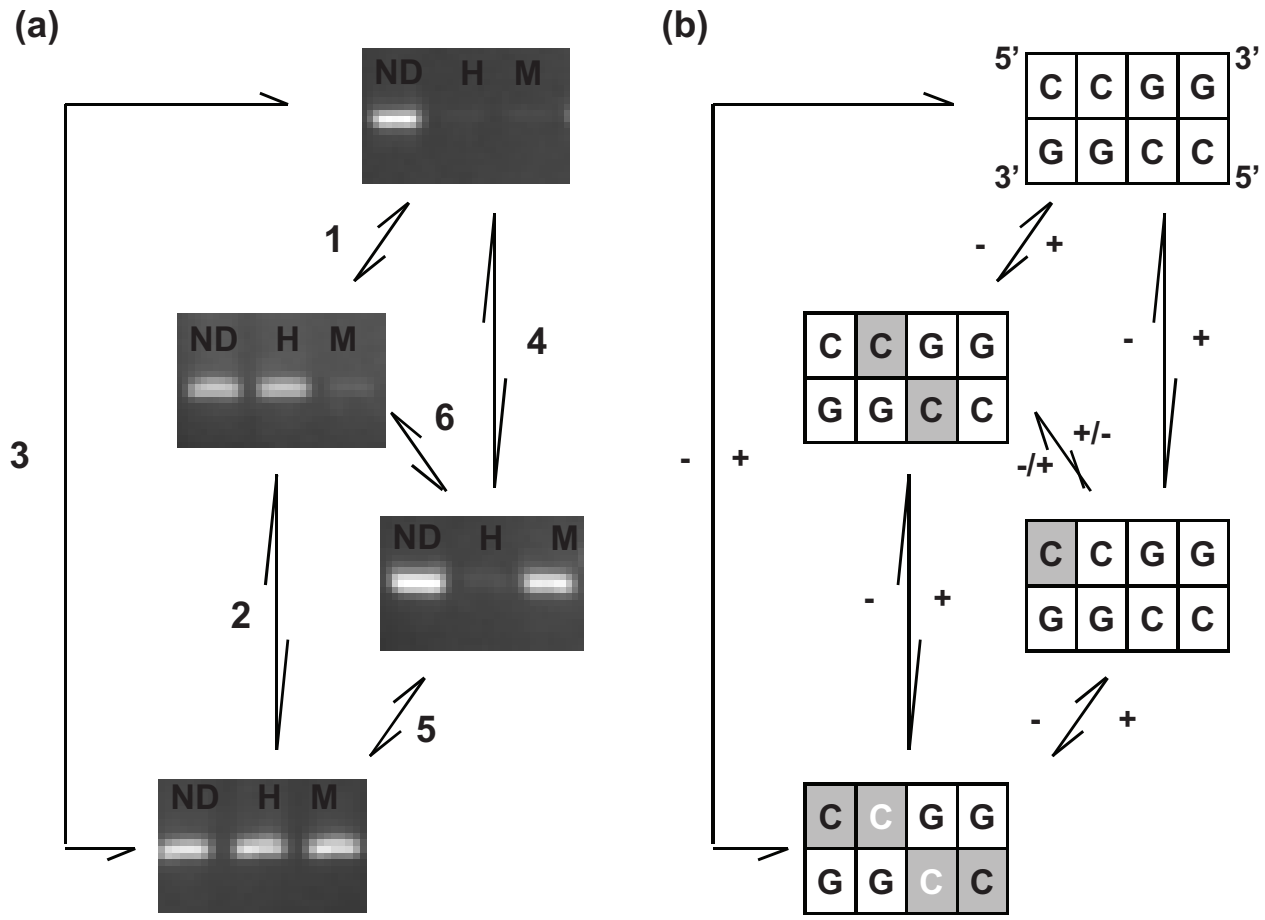

Figure 25 : Identification des changements de l'état de méthylation au niveau d'un homéoallèle.

Profils d'amplifications obtenus (a) et états de méthylation correspondants (b).

Les rectangles représentent le site 5'-CCGG-3' double brin, les carrés grisés correspondent aux cytosines méthylées.

Lorsque nous ne sommes pas en mesure de déterminer si les deux cytosines ou uniquement la cytosine externe est méthylée, la cytosine est représentées en blanc.

Les flèches indiquent un changement de l'état de méthylation : + Gain d'un groupement méthyle, - Perte d'un groupement méthyle.

ND: Non digéré, H: digéré par *Hpa*II, M: digéré par *Msp*I.

Digestion comparative de l'ADN

Pour chacun des ADN génomiques, 3µg d'ADN ont été digéré avec les deux enzymes de restrictions dans un volume final de 300 µl en présence de 30 U d'enzymes et 10 µl de tampon de l'enzyme. Chaque échantillon a été digéré pendant 4 heures à 37°C suivi d'une étape de dénaturation de l'enzyme à 65°C pendant 20 minutes. Pour chacun des allopolyploïdes, un témoin à l'additivité constitué d'un mélange des ADN parentaux a également été analysé.

La qualité et la quantité des produits digérés ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2%.

Amplifications PCR

Les ADN digérés avec les deux enzymes de restrictions ainsi que les ADN non digérés ont servi de matrices pour les amplifications PCR.

Comme les changements du niveau de méthylation peuvent être quantitatifs, une approche «semi-quantitative» a été adoptée afin de pouvoir comparer les produits d'amplification dans la phase exponentielle de l'amplification PCR, et étudier 'quantitativement' l'état de méthylation des cytosines.

Les profils d'amplifications observés chez les allohexaploïdes synthétiques ont été comparés à ceux obtenus pour leurs géniteurs respectifs et pour le mélange *in vitro* des ADN parentaux comme témoin de l'additivité.

Les changements de méthylation identifiables sont illustrés dans la Figure 25.

Au total, trois répétitions 'techniques' de digestions d'ADN et d'amplification PCR ont été réalisées sur chacun des ADN afin de confirmer les changements de méthylation observés.

III. Résultats

Les mêmes plantes euploïdes des générations S0, S1 et S2 des allohexaploïdes synthétiques JOY36 et JOY54 utilisées dans le chapitre I-a (Mestiri et *al.,*2010) ont été analysées et comparées à leurs géniteurs respectifs et aux mélanges d'ADN parentaux.

Au total, 276 marqueurs PCR utilisés par Mestiri et *al.* (2010) dont 145 sont issus d'ESTs et 131 d'éléments transposables, montrant des profils PCR simples (bande unique) (chapitres I-A) et la présence de site 5'-CCGG-3' sur l'analyse des séquences disponibles ont été sélectionnés. Un tri a été réalisé sur ces marqueurs pour confirmer la présence du site 5'-CCGG-3' (Figure 24b). Ceci a été effectué en digérant les produits PCR amplifiés sur les trois lignées parentales par les deux enzymes de restrictions *Hpa*II et *Msp*I (le produit PCR n'étant pas méthylé). Les marqueurs montrant la présence du site 5'-CCGG-3' (produit PCR digéré) chez au moins un géniteur ont été retenus pour la comparaison des changements de méthylation dans les polyploïdes synthétiques :

- 93 marqueurs issus d'EST appartenant au groupe d'homéologie 3 du blé (Qi *et al.,* 2004).
- 61 marqueurs issus de jonctions entre éléments transposables identifiées sur le chromosomes 3B du blé (Paux *et al.,* 2006, 2008 ; Charles et *al.,* 2008).

III.1 Taux de méthylation des cytosines chez les espèces *T. turgidum* et *Ae. taushii*

Pour chaque type de marqueurs et chaque géniteur nous avons analysé ceux présentant au moins un site 5'-CCGG-3' et les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Pour le géniteur tétraploïde *T. turgidum* cv. Joyau, 38% (31 marqueurs) des 82 marqueurs issus d'EST et présentant au moins un site 5'-CCGG-3' sont méthylés alors que pour les 61 marqueurs issus d'ET, cette valeur atteint 98% (60 marqueurs).

En ce qui concerne les géniteurs diploïdes *Ae. tauschii* (Ats36 et Att54), 30 et 21% des marqueurs issus d'ESTs sont méthylés pour Ats36 et Att54 respectivement. 100% des 13 marqueurs issus d'ETs communs aux deux géniteurs diploïdes sont méthylés.

Comme attendu, ces résultats montrent que les marqueurs issus d'ET sont hautement méthylés en comparaison avec les marqueurs issus d'EST. Ce taux de méthylation différentiel

Tableau 8 : Taux de méthylation des résidus cytosines chez *T. turgidum* et *Ae. Taushii.*

Espèce génitrice	Type de marqueurs	Nombre de marqueurs amplifiés[a]	Profil de méthylation			
			Non méthylés	Méthylés		
				CG	CHG[b]	CHG hémi-méthylés
Joyau	EST	82	51	13	18	0
	TE	61	1	9	51	0
Ats36	EST	56	38	9	8	1
	TE	13	0	1	12	0
Att54	EST	53	42	5	6	0
	TE	13	0	1	12	0

[a] Marqueurs montrant une amplification dans chacune des espèces et présentant au moins un site 5'-CCGG-3'.
[b] CHG: cas où nous ne somme pas en mesure de distinguer le profil (5'- ^{m}CCGG-3') du profil (5'-^{m}C^{m}CGG-3') (voir *Matériel et Méthodes*, Figure 1c).

Tableau 9 : Marqueurs monomorphes et polymorphes entre *T. turgidum* et *Ae. taushii* ssp. *strangulata* (Ats36) d'une part, entre *T. turgidum* et *Ae. taushii* ssp. *taushii* (Att54) d'autre part.

Type de marqueur	Comparaison	Nombre total de marqueurs	Monomorphes	Polymorphes	
				PAP	ASP
EST	Joyau vs Ats36	93	34[a]+2[b]	44[a]+3[b]	5[a]+5[b]
	Joyau vs Att54	92	34+2	44+2	5+5
TE	Joyau vs Ats36	60	10	49	1
	Joyau vs Att54	61	10+1	49	0

[a] Marqueurs montrant les mêmes profils (monomorphes et polymorphes) chez les deux couples de géniteurs.
[b] Marqueur montrant une spécificité des profils pour chaque couple de géniteurs.
PAP : polymorphisme de présence/absence, ASP : polymorphisme de taille.

des gènes et des éléments transposables a été mis en évidence dans d'autres études, notamment chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.,* 2006 ; Lister *et al.,* 2008 ; Cokus *et al.,* 2008).

De plus, pour le géniteur tétraploïde Joyau, 22% (18 sur 82) des marqueurs issus d'EST sont méthylés au niveau des CHG (et éventuellement des CG, *voir matériel & méthodes*) alors que ce type de profil de méthylation concerne 83.6% (51 sur 61) des marqueurs issus d'ET. Par contre, les taux de méthylation des résidus CG semblent similaires pour les ESTs (15.8% des marqueurs) et les ET (14.8% des marqueurs). Pour ces marqueurs issus de TE, il semble donc que la méthylation dominante soit celle des CHG (et éventuellement des CG). Un profil similaire de méthylation a été observé chez les géniteurs diploïdes de génome D, Ats36 et Att54, avec également un enrichissement de la méthylation sur les CHG (et éventuellement les CG?) au niveau des marqueurs issus d' ET : 92% (12 sur 13) des marqueurs issus de ET sont méthylés dans ce type de contexte. Seulement 9 (16%) et 6 (11%) marqueurs issus d'EST sont méthylés dans ce contexte chez Ats36 et Att54 respectivement.

III.2 Méthylation de l'ADN chez les allohexaploïdes synthétiques JOY36 et JOY54

Dans le chapitre I-A, les marqueurs utilisés pour caractériser les changements génétiques ont été classés en trois catégories en fonction de la comparaison des profils d'amplification entre les deux géniteurs de chacun des allohexaploïdes: monomorphes, PAP et ASP (Mestiri *et al.,* 2010).

Le tableau 9 détaille le nombre de marqueurs issus d'EST et d'ET, précédemment classés comme étant monomorphes, PAP ou ASP et utilisés ici pour l'analyse des changements de méthylation.

Les marqueurs monomorphes ne permettent pas de suivre l'état de méthylation de chaque homéoallèle chez les allopolyploïdes. Ainsi, si un changement de la méthylation est observé (c'est-à-dire une différence quantitative par rapport au mélange des ADN parentaux), nous ne somme pas en mesure de distinguer la contribution de l'homéoallèle du parent AB de celle du parent D (les deux homéoallèles étant amplifiés à une même taille).

En revanche, les marqueurs montrant un polymorphisme génétique de présence/absence (PAP) ou un polymorphisme de taille (ASP) permettent de suivre l'état de

Tableau 10 : Profils additifs et non additifs observés pour les marqueurs monomorphes.

		Profil d'amplification [a]				EST		TE	
Hypothèse d'additivité		AB	D	M	S	JOY36	JOY54	JOY36	JOY54
Profils additifs	AB≠D	+++	/	+++	+++	0	1	0	0
M=S		+++	+--	+++	+++	1	1	0	0
		++-	+--	++-	++-	1	2	0	0
	AB=D	+++	+++	+++	+++	3	2	10	11
		++-	++-	++-	++-	4	3	0	0
		+--	+--	+--	+--	27	25	0	0
Profils non additifs	AB≠D								
M≠S	AB=D	+--	+--	+--	++-	0	2	0	0

[a] La correspondance entre les profils d'amplification et les états de méthylation est détaillée dans la figure 24a et la figure25.
(+) bande présente, (-) bande absente, (/) homéoallèle amplifié mais ne portant pas de site 5'-CCGG-3'.

Tableau 11 : Nature de la jonction couverte par les marqueurs issus de TE montrant une amplification dans *T. turgidum* et *Ae. taushii*.

				Profils d'amplification	
Nom	Jonction	Taille attendue (pb)	Taille observée (pb)	Joyau vs Ats36	Joyau vs Att54
cfp9	Line + low copy	223	220	M	M
cfp1707	Gypsy+low copy	303	300	M	M
cfp1728	Cacta+Mite	446	450	M	M
cfp1944	Gypsy+Cacta	163	160	M	M
cfp1984	Gypsy+Athila	390	390	M	M
cfp2092	Gypsy+Gypsy	149	150	M	M
cfp3108[a]	Low copy+Copia	356	330/350[c]	ASP	M
cfp3382	Gypsy+Gypsy	139	550	M	M
rlg74	Gypsy+Gypsy	296	400	M	M
rlg134	Gypsy[b]	281	300	M	M
rlc145	Copia[b]	255	220	M	M

Les marqueurs « cfp » sont issus de Paux *et al.,* 2006, 2009.
Les marqueurs « rlg/rlc » sont issus de Charles *et al.,* 2008.
[a] Marqueur montant une modification de la méthylation spécifiquement chez les allohexaploïdes JOY36.
[b] Marqueur correspondant à un contrôle interne d'un élément et non une jonction.
[c] Marqueur amplifié à la taille attendue sur Att54 (350pb) mais pas sur Ats36 (330pb).
M : monomorphes, ASP : polymorphisme de taille

méthylation des homéoallèles parentaux dans les allopolyploïdes. Ainsi, les marqueurs PAP nous permettent de suivre l'état de méthylation de l'homéoallèle amplifié et les marqueurs présentant un ASP et au moins un site 5'-CCGG-3' chez les deux géniteurs permettent de suivre l'état de méthylation des deux homéoallèles parentaux.

La figure 25 schématise les changements identifiables de l'état de méthylation d'un homéoallèle.

Pour chaque catégorie de marqueurs, l'analyse des changements de méthylation de l'ADN repose sur la comparaison des profils d'amplifications obtenus chez les allohexaploïdes synthétiques aux profils obtenus pour le mélange *in vitro* des ADN parentaux. Rappelons-le, ce témoin, permet de tester l'hypothèse d'additivité ou de non-additivité de la méthylation chez ces allohexaploïdes. Ainsi, les profils de méthylation observés chez les allopolyploïdes ont été classés comme étant additifs ou non additifs selon qu'ils présentent ou non une différence par rapport aux mélanges des ADN parentaux.

III.2.1 Marqueurs monomorphes

Les marqueurs monomorphes ont été subdivisés en deux catégories selon la présence d'au moins un site 5'-CCGG-3' chez les deux géniteurs ou l'un des deux géniteurs. De plus, les marqueurs présentant à la fois un site 5'-CCGG-3' chez les deux géniteurs et un même profil de méthylation chez ces deux géniteurs sont distingués des marqueurs présentant des profils de méthylation différents.

Marqueurs monomorphes issus d'EST

36 marqueurs sont génétiquement monomorphes entre Joyau et Ats36 et entre Joyau et Att54. Parmi ceux-ci, 2 (JOY36) et 4 (JOY54) présentent des profils de méthylation différents entre les géniteurs AB et D mais aucune déviation par rapport à l'additivité dans toutes les plantes des allohexaploïdes synthétiques analysées. Cependant, ils se comportent comme l'homéoallèle méthylée du géniteur de génome AB (Tableau 10).

Les autres marqueurs, 34 (JOY36) et 32 (JOY54) présentent le même profil de méthylation entre les géniteurs (AB=D) (Tableau 10).

- Pour JOY36, les 34 marqueurs présentent un profil additif : les allohexaploïdes, le mélange *in vitro* et les deux géniteurs suivent le même profil

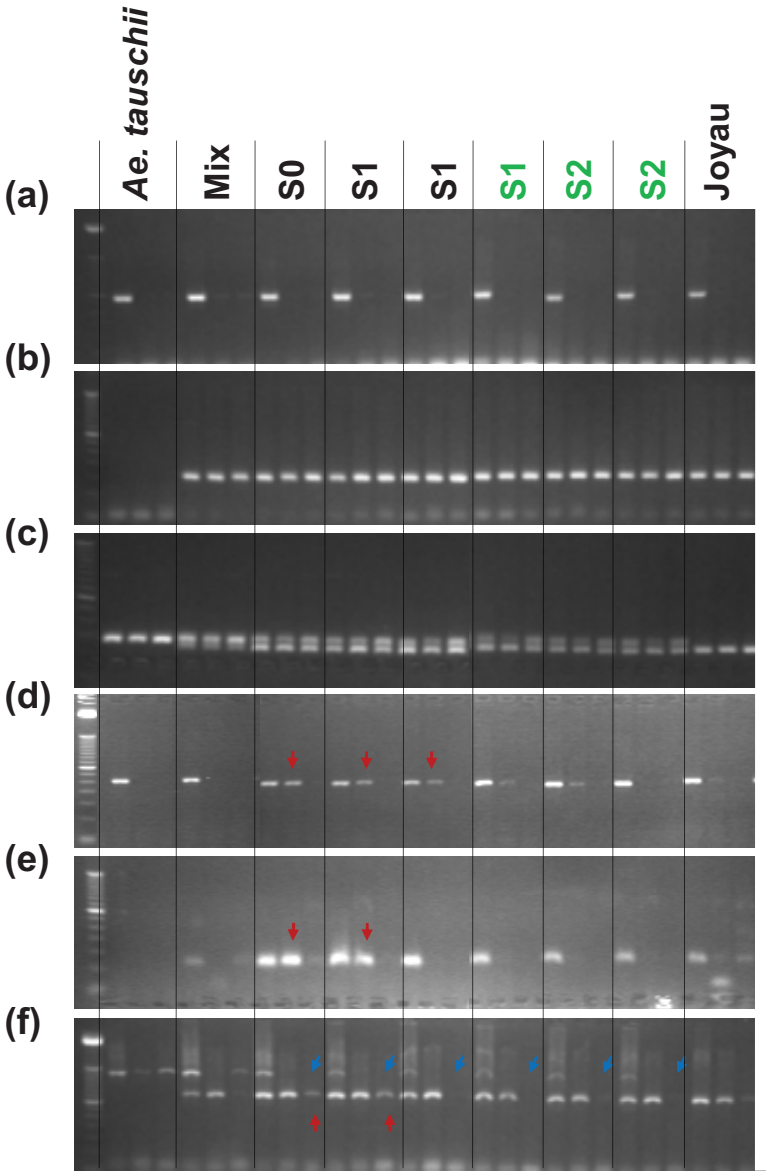

Figure 26 : Exemples de profils additifs et non additifs de la méthylation des cytosines chez les allohexaploïdes synthétiques.

(a) Marqueur monomorphe présentant un profil additif (Joyau=Ats36=Mix= S= +--).
(b) Marqueur PAP présentant un profil additif (Joyau=Mix= S=+++).
(c) Marqueur ASP présentant un profil additif (Joyau=Ats36=Mix= S= +++).
(d) Marqueur monomorphe présentant un profil non additif. Ici nous ne sommes pas en mesure de déterminer sur quel homéoallèle le gain de méthylation (flèche rouge) s'est effectué.
(e) Marqueur PAP présentant un profil non additif (Joyau=Mix **= +--≠** S= ++-) avec un gain de méthylation concernant l'homéoallèle AB (flèches rouges).
(f) Marqueur ASP présentant un profil non additif montant une perte de méthylation sur l'homéoallèle D (flèches bleues) et un gain de méthylation sur l'homéoallèle AB (flèches rouges).

(AB=D=M=S, Figure 26a). Parmi eux, 27 ne sont pas méthylés, 4 sont méthylés sur les CG et 3 sur les CHG (et éventuellement CG).

- Pour JOY54, 30 marqueurs présentent ce type de profils additifs alors que 2 marqueurs (non méthylés chez les deux géniteurs) montrent une déviation par rapport au mélange *in vitro*. La figure 26d illustre un changement sur la lignée 1 de JOY54. Nos résultats montrent que le changement de méthylation chez les allohexaploïdes JOY54 représente un gain de méthylation sur un résidu CG. Cependant, nous ne somme pas en mesure de déterminer si ce gain concerne les deux homéoallèles ou un seul. Par ailleurs, les gains de méthylation n'ont pas été observés sur toutes les plantes analysées : des différences entre plantes sœurs et entre générations ont été observées. La figure 27 schématise les variations intra- et trans-générationnelles observées qui seront détaillées-ci dessous.

Marqueurs monomorphes issus d'éléments transposables

Les marqueurs monomorphes (10 et 11 respectivement entre Joyau et Ats36 et entre Joyau et Att54) montrent le même profil de méthylation des cytosines entre les géniteurs, le mélange d'ADN parentaux et les allohexaploïdes: 100% de ces marqueurs sont méthylés au niveau des CHG (et éventuellement des CG) (Tableau 10). La polyploïdie n'a donc pas entrainé une déméthylation de ces marqueurs issus d'ET chez les allohexaploïdes.

Ces 10 marqueurs sont communs aux deux allopolyploïdes et sont amplifiés sur les trois géniteurs. Ce résultat peut paraître surprenant puisque ces marqueurs sont issus de sites d'insertions d'éléments transposables provenant du chromosome 3B et en devraient pas se retrouver aussi bien conservés sur le génome D d'*Ae. taushii*. Ces marqueurs ont été développés à l'INRA de Clermont-Ferrant (Paux *et al.,* 2006). L'analyse des séquences que j'ai réalisée a confirmé qu'une partie de la séquence de ces marqueurs correspond bien à des éléments transposables (Tableau 11).

Tableau 12 : Profils additifs et non additifs observés pour les marqueurs PAP.

	Profil d'amplification [a]				EST		TE	
Hypothèse d'additivité	AB	D	M	S	JOY36	JOY54	JOY36	JOY54
Profils additifs	+++	---	+++	+++	12	13	38	38
M=S	++-	---	++-	++-	5	4	9	9
	+--	---	+--	+--	18	18	1	1
	---	+++	+++	+++	1	1	0	0
	---	++-	++-	++-	1	1	0	0
	---	+--	+--	+--	6	6	0	0
Profils non additifs	+++	---	+++	++-	1	0	0	0
M≠S	+++	---	+++	+--	0	1	1	1
	+--	---	+--	++-	2	2	0	0
	---	+++	+++	+--	1	0	0	0

[a] La correspondance entre les profils d'amplification et les états de méthylation est détaillée dans la figure 24a et la figure 25.
(+) bande présente, (-) bande absente

III.2.2 Marqueurs polymorphes

PAP issus d'EST

47 et 46 marqueurs présentent un polymorphisme de présence/absence entre Joyau et Ats36 et entre Joyau et Att54 respectivement. Contrairement aux marqueurs monomorphes, ces marqueurs PAP permettent de suivre sans ambiguïté l'état de méthylation de l'homéoallèle amplifié.

43 marqueurs montrent un profil additif chez les allohexaploïdes (Tableau 12, Figure 26b). Parmi ceux-ci, 35 suivent le profil du géniteur AB (car seul l'homéoallèle AB est amplifié) et 8 celui du géniteur D avec :

- 13 et 14 marqueurs méthylés sur les CHG (et éventuellement les CG).
- 6 et 5 marqueurs méthylés sur les CG.
- 24 marqueurs non méthylés.

4 et 3 marqueurs PAP montrent des modifications des profils de méthylation chez les allohexaploïdes en comparaison avec le mélange et les géniteurs (Tableau 12). 3 modifications concernent l'homéoallèle AB et une seule l'homéoallèle D de At3s6 (évènement de perte de la méthylation spécifiquement chez les allohexaploïdes JOY36).

Les 2 modifications de la méthylation sur l'homéoallèle AB se font de manière répétable chez les deux allohexaploïdes JOY36 et JOY54 et consistent en un gain de méthylation sur les résidus CG. Ces changements ne concernant pas toutes les plantes analysées. Un de ces marqueurs montrant un changement de méthylation sur l'homéoallèle AB est présenté en Figure 26e.

Les deux autres changements sont spécifiques de chaque allohexaploïde. Nous avons ainsi observé :

- Une perte de méthylation des cytosines en contexte CHG sur l'homéoallèle AB chez les allohexaploïdes JOY36. Ce changement est apparu en S0 de la lignée « 1 » de JOY36 et a été transmit à une S1 mais pas à sa plante sœur.
- Une perte de la méthylation des cytosines sur les CHG (et éventuellement les CG), toujours sur l'homéoallèle AB et ce chez toutes les plantes de JOY54.

Tableau 13 : Profils additifs et non additifs de méthylation observés pour les marqueurs ASP dans les allohexaploïdes JOY36 et JOY54.

		Profil d'amplification [a]				EST		TE	
Hypothèse d'additivité		AB	D	M	S	JOY36	JOY54	JOY36	JOY54
Profils additifs	AB≠D	/	+++	+++	+++	1	1	0	0
M=S		/	++-	++-	++-	2	1	0	0
		/	+--	+--	+--	0	1	0	0
		+++	/	+++	+++	1	0	0	0
		++-	/	++-	++-	0	2	0	0
		+++		+++	+++				
			+--	+--	+--	1	1	0	0
		++-		++-	++-				
			+--	+--	+--	0	2	0	0
	AB=D	++-		++-	++-				
			++-	++-	++-	2	0	0	0
		+--		+--	+--				
			+--	+--	+--	1	2	0	0
Profils non additifs	AB≠D		+-+	+-+	+--				
M≠S		++-		++-	+++	1	0	0	0
	AB=D	++-		++-	++-				
			++-	++-	+--	1	0	0	0
		+++		+++	+++				
			+++	+++	+--	0	0	1	0

[a] La correspondance entre les profils d'amplification et les états de méthylation est détaillée dans la figure 24a et la figure 25.

(+) bande présente, (-) bande absente, homéoallèle amplifié mais ne portant pas de site 5'-CCGG-3'.

PAP issus d'ET

49 marqueurs PAP présentent un site 5'-CCGG-3' sur l'allèle amplifié et représentent tous une absence de l'homéoallèle D. Ce résultat n'est pas surprenant puisque ces marqueurs ciblent des jonctions entre éléments transposables spécifiques au chromosome 3 du génome B. L'absence d'amplification du génome D est donc attendue (Tableau 12).

Parmi ceux-ci, 48 ne montrent pas de changement de la méthylation entre le géniteur AB, le mélange des ADN parentaux et les allohexaploïdes; avec 38 marqueurs méthylés sur les CHG (et éventuellement les CG), 9 méthylés sur les CG et 1 seul non méthylé.

La majorité (98%) des marqueurs PAP issus d'ET sont donc méthylés chez le géniteur AB et la polyploïdie ne semble pas altérer leur état de méthylation. En effet, 1 seul marqueur PAP issus d'ET est déméthylé de manière répétable chez les deux allohexaploïdes JOY36 et JOY54.

ASP issus d'EST

Un marqueur présentant un polymorphisme de taille entre géniteurs mais dont l'homéoallèle présentant le site 5'-CCGG-3' n'est pas amplifié dans les allohexaploïdes JOY36 et JOY54 ainsi que dans le mélange d'ADN parentaux a été écarté de l'analyse. La déviation par rapport à l'additivité, causée par une compétition entre homéoallèles lors de la PCR et non par un remaniement génétique comme démontré dans le chapitre I, ne nous permet pas de suivre l'état de méthylation de la copie d'intérêt.

- 9 marqueurs dont 4 communs aux deux allohexaploïdes synthétiques présentent un ASP. Parmi ceux-ci, 3 (JOY36) et 4 (JOY54) permettent de suivre l'état de méthylation d'un seul homéoallèle. L'autre homéoallèle ne présentant pas de site 5'-CCGG-3' (Tableau 13). Aucun ne montre de changements de méthylation dans les deux allohexaploïdes.
- Les 6 et 5 autres marqueurs ASP présentant un polymorphisme de taille entre Joyau et Ats36 et entre Joyau et Att54 respectivement (5 en communs), présentent un site 5'-CCGG-3' chez les deux géniteurs. On peut donc suivre l'état de méthylation des deux homéoallèles parentaux (Tableau 13).
  - 4 et 5 marqueurs présentent un profil additif, l'état de méthylation de chaque homéoallèle reste inchangé pour ces marqueurs dans les deux allohexaploïdes synthétiques (Figure 26c).

Tableau 14: Profils additifs et non additifs de la méthylation chez les allohexaploïdes synthétiques.

Types de marqueurs	Type d'allohexaploïdes	Nombre total de marqueurs	Profils additifs	Profils non additifs						
				Pertes			Gains			
				CG	CHG	?	CG	CHG	?	Autre*
EST	JOY36	92	86	1	1	1	2	-	-	1
	JOY54	91	86	-	-	1	4	-	-	-
TE	JOY36	60	58	-	-	2	-	-	-	-
	JOY54	60	59	-	-	1	-	-	-	-

? : cas où nous ne somme pas en mesure de distinguer les changements concernent les CHG et les CG de ceux concernant uniquement les CHG.

* marqueur montrant à la fois un gain (sur l'homéoallèle AB) et une perte (sur l'homéoallèle D) de la méthylation de l'ADN.

- En revanche, les allohexaploïdes JOY36 montrent une modification de l'état de méthylation des homéoallèles parentaux, pour les deux marqueurs restant:
  - Un marqueur montrant une altération de l'état de méthylation des deux homéoallèles : un gain de méthylation sur les CHG de l'homéoallèle du parent tétraploïde Joyau et une perte de l'hémi-méthylation des CHG s'opérant sur l'homéoallèle de géniteur diploïde Ats36 (Figure 26f).
  - Un marqueur montrant une perte de la méthylation sur les CG de l'homéoallèle D.

ASP issus d'ET

Pour ces marqueurs basés sur l'amplification de fragments d'ADN correspondant aux sites d'insertions ou jonctions d'éléments transposables, identifiés sur le chromosome 3B, un seul présentait un polymorphisme de taille entre Joyau et Ats36. Les deux homéoallèles parentaux présentent une méthylation des CHG (et éventuellement les CG). Une déviation par rapport à l'additivité, causée par une perte de la méthylation des cytosines en contexte CHG sur l'homéoallèle du génome D chez toutes les plantes analysées de l'allohexaploïde JOY36, a été identifiée. L'homéoallèle AB n'est pas affecté (Tableau 13).

III.2.3 Pertes et gains de la méthylation de l'ADN en réponse à l'allopolyploïdie

L'ensemble des résultats obtenus tend à montrer que la majorité des profils de méthylation observés chez les allohexaploïdes synthétiques est de type additif. En effet, ~94% et ~97.5% des marqueurs issus respectivement d'EST et d'ET ne montrent aucune différence significative des profils méthylation entre les allohexaploïdes et le mélange d'ADN parental (Tableau 14).

Des changements de méthylation (perte et/ou gain) ont néanmoins été observés dès les premières générations et peuvent être transmis ou non à la descendance. Ainsi, 6% (6 et 5 marqueurs dont 2 communs) des marqueurs issus d'EST et 2.5% (2 et 1 dont un commun) des marqueurs issus de TE montrent une déviation par rapport à l'additivité chez les allohexaploïdes synthétiques JOY36 et JOY54 respectivement (Tableau 14). Ces changements des profils de méthylation chez les allohexaploïdes synthétiques peuvent impliquer soit des évènements de perte de la méthylation sur un résidu cytosine, soit des

évènements de gain de méthylation, soit les deux. La figure 25 schématise les types de changements identifiables avec la technique utilisée.

- Les changements de méthylation affectant les marqueurs issus d'ET (2 et 1 marqueurs respectivement pour JOY36 et JOY54) sont tous de type perte de la méthylation, principalement sur les CHG (et éventuellement CG) (Tableau 14).
- Les changements de méthylation affectant les marqueurs issus d'EST (6 et 5 marqueurs pour chacun JOY36 et JOY54 dont 2 communs) ne suivent pas une tendance particulière de gain et/ou de perte de méthylation.

Alors que la majorité des gains de méthylation concernent les CG, les déméthylations ont été observées dans différents contextes de séquences (Tableau 14). En effet, nous avons observé des profils non additifs causés soit par une perte de la méthylation sur les CG, soit par une perte de la méthylation sur les CHG. Pour deux marqueurs, nous n'étions pas en mesure de déterminer si la déméthylation a uniquement impliqué les CHG ou les CHG couplé aux CG (Tableau 14).

III.3 Variations intergénérationnelles de la méthylation

Tout d'abord, rappelons que cette analyse a été réalisée sur des plantes des générations S0, S1 et S2 obtenues suivant le schéma présenté dans la figure 27 et représentant au final 4 lignées indépendantes analysées dans chacun des allohexaploïdes. Nous avons ainsi la possibilité de comparer les changements de méthylation survenant des générations S0 vers S1 et des générations S1 vers S2, ainsi que la comparaisons des générations S0, S1 et S2 indépendantes (intra-générationnelle).

Nous avons tout d'abord estimé le nombre d'événements de pertes ou gains de méthylation observés à une génération donnée et maintenus dans la descendance ainsi que les changements non transmis à la génération descendante (Figure 27).

Changements de méthylation survenant à la génération S0 et leurs descendances S1

- Pour JOY36, un total de 10 changements sont apparus en S0 (6 en S0 de la lignée 1 et 4 dans la S0 de la lignée 2) dont 4 ont été transmis à toute la descendance S1 (2 et 2 changements transmis aux deux S1 pour les lignées 1 et 2 respectivement), 3

Tableau 15 : Profils additifs (M=S) et non additifs (M ≠ S) et détail de la contribution des homéoallèles AB et D.

		Homéoallèles AB			Homéoallèles D		
Type d'allohexaploïdes	Type de marqueurs	M = S	M ≠ S	Total	M = S	M ≠ S	Total
JOY36	PAP	83	4	87	8	1	9
	ASP	7	1	8	6	3	9
	Total	90	5	95	14	4	18
JOY54	PAP	83	4	87	8	0	8
	ASP	7	0	7	7	0	7
	Total	90	4	94	15	0	15

n'ont pas été transmis (observés uniquement en S0) et 2 ont été transmis seulement à l'un des deux descendants S1 (Figure 27).

- 6 changements sont apparus dans les deux plantes S0 de JOY54, la majorité (5) est maintenue dans la descendance des deux S0.

Si ces changements sont apparus dès la première génération (S0) suivant l'évènement de polyploïdisation, d'autres ne sont apparus que dans la descendance S1 de ces S0.

- Parmi ceux-ci, trois sont observés sur les deux plantes S1 sœurs de chaque lignée JOY36 (quatre S2 au total) et un n'est observé que sur l'une des deux plantes sœurs de la lignée 2.
- Dans le cas de JOY54, deux évènements de changements de méthylation (pour le même marqueur) sont apparus en S1 et ont été observés sur les deux plantes sœurs de chaque lignée.

Nous ne pouvons pas suivre ces changements de méthylation survenus dans la descendance S2 de ces plantes des S1 puisque les générations descendantes S2 n'ont pas été analysées pour les lignées « 1 » et « 2 » (Figure 27). A la place, deux autres plantes S1 indépendantes correspondants à des lignées indépendantes (3 et 4) et leurs descendance S2 ont été suivies (Lignées « 3 » et « 4 », Figure 27).

Changements de méthylation survenant dans les génération S1 et leurs descendances S2

Les résultats obtenus pour JOY54 sur deux lignées indépendantes (lignées « 3 » et « 4 ») composées de deux S1 et leurs descendants respectifs (4 plantes S2 au total) montrent que sur les 6 évènements observés en S1, 5 ont été transmis à toute la descendance et un a été transmis à l'un des deux descendants S2 (pour la lignée 3 de JOY54).

Pour JOY36, une seule lignée nous a permis de suivre les changements se produisant entre S1 et S2. Pour cette lignée, quatre évènements ont été observé en S2 : deux sont apparus à cette génération alors que les deux autres ont été hérités de la S1.

III.4 Effet de la variabilité du génome D

Comme nous avons pu le voir ci-dessus, l'utilisation de marqueurs polymorphes nous a permis de distinguer des homéoallèles parentaux. Il est donc possible d'étudier l'effet des

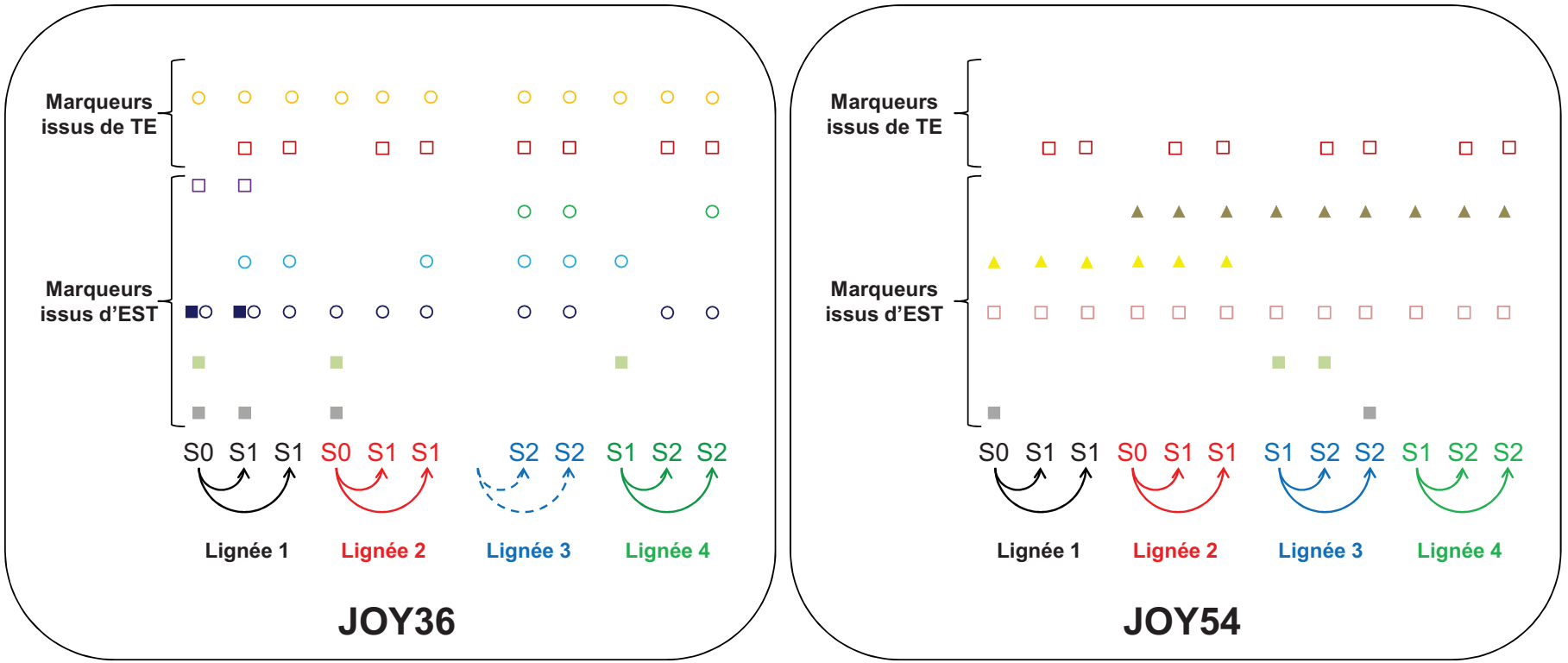

Figure 27 : Variations intergénérationnelles de la méthylation de l'ADN chez les quatre lignées indépendantes des allohexaploïdes JOY36 et JOY54.

L'ensemble des marqueurs montrant des changements de méthylation chez les allohexaploïdes sont figurés, chaque marqueur étant représenté par une couleur.

Les carrés et les cercles montrent les changements de méthylation sur l'homéoallèle de parent Joyau (génome AB) et d'*Ae. taushii* (génome D) respectivement.

Les triangles représentent les changements pour lesquels nous ne sommes pas en mesure de déterminer quel homéoallèle parental est concerné.

Les évènements de gain de méthylation sont représentés par des carrés, cercles ou triangles pleins alors que les pertes de méthylation sont schématisées par les forme vides.

géniteurs AB et D ainsi que l'effet de la variabilité du génome D. Les deux allohexaploïdes analysés partagent le même géniteur AB mais pas le même géniteur D.

Nous avons ainsi observé que sur les 95 homéoallèles AB suivis, 5 (5%) sont sujet à des changements de méthylation chez les polyploïdes JOY36 (Tableau 15). En ce qui concerne les homéoallèles D de Ats36, 22% (4 sur les 18 homéoallèles d'Ats36 suivis) sont modifiées chez les JOY36 (Tableau 15). Ces modifications de l'état de méthylation des homéoallèles D sont spécifiques de Ats36 puisque les 7 homéoallèles de Att54 suivis ne sont pas altérés chez les allohexaploïdes JOY54 (Tableau 15).

De plus, la comparaison des deux allohexaploïdes synthétiques JOY36 et JOY54 sur plusieurs générations suggère que les changements de méthylation ne suivent pas le même profil. Ainsi, si les changements observés à une génération donnée de JOY54 sont dans la plupart des cas transmis à la descendance, un nombre important (15%) d'évènements non héritables a été mis en évidence chez JOY36 (Figure 27).

IV. Discussion

Au cours de ce travail, j'ai utilisé la méthode MSPCR, basée sur l'amplification PCR d'ADN préalablement digéré par des enzymes de restriction reconnaissant les mêmes sites 5'-CCGG-3' et ayant des sensibilités différentes à la méthylation des cytosines. Le but est d'évaluer les changements de la méthylation de l'ADN associés à l'allopolyploïdie chez les allohexaploïdes synthétiques de blé, en comparant à la fois des séquences issus de gènes et d'éléments transposables (région flanquant l'insertion d'ET souvent composées d'autres ET).

La sensibilité différentielle des isoschizomères *Hpa*II et *Msp*I à la méthylation des cytosines au niveau du site 5'-CCGG-3' nous a permis de suivre semi-quantitativement les changements de méthylation des cytosines en contextes CG et CHG chez les allohexaploïdes synthétiques.

Nos résultats comparés à ceux obtenus au niveau de l'ADN génomique sur les même séquences et les mêmes allopolyploïdes (Mestiri *et al.,* 2010) et au niveau transcriptomique (Chagué *et al.,* 2010) permettent d'apprécier les effets de l'allopolyploïdie à différents niveaux.

Changements de méthylation induits par l'allopolyploïdie au niveau des gènes et des éléments transposables

A l'exception du coton (Liu *et al.,* 2001), des changements de méthylation ont été observés dans divers systèmes polyploïdes (*Arabidopsis*: Madlung *et al.,* 2002 ; *Brassicas*: Lukens *et al.,* 2006; Gaeta *et al.,* 2007 ; Xu *et al.,* 2009 ; *Triticum & Aegilops*: Shaked *et al.,* 2001; *Spartina*: Salmon *et al.,* 2005; Parisod *et al.,* 2009; *Cucumis*: Chen & Chen, 2008). Ces auteurs ont notamment reporté que les changements d'états de méthylation de l'ADN affectent les gènes, les ET ainsi que de l'ADN non codant. Toutefois, la plupart de leurs résultats ont été principalement obtenus avec la méthode MSAP qui ne permet pas de cibler des loci spécifiques.

A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à la comparaison des changements de méthylation en analysant deux fractions du génome (gènes et éléments transposables) ne subissant pas les mêmes pressions de sélection.

Chez les Spartines, Parisod *et al.* (2009) ont comparé les données obtenues par MSTD (Methyl Sensitive Transposons Display) à celles obtenues par MSAP (Methyl Sensitive Amplified Polymorphism) et ont conclu qu'une proportion plus importante de modifications de la méthylation de l'ADN s'effectue dans l'environnement des ET (séquences flanquant l'insertion d'ET). Toutefois, ces conclusions peuvent être biaisées puisque la proportion des ET dans le génome des Spartines est encore inconnue.

L'allopolyploïdie s'accompagne d'une altération modérée de la forte méthylation des éléments transposables

Il a été suggéré que les ET, flanquant la plupart des gènes, contribuent à leur régulation transcriptionnelle (Biémont & Vieira, 2006; Lockton & Gaut, 2009; Martin *et al.,* 2010). Le blé est très riche en ET qui représentent plus de 80% du génome (Paux *et al.,* 2006; Charles *et al.,* 2008). De ce fait, le maintien des ET à l'état inactif, assuré en grande partie par la méthylation de l'ADN serait essentiel à la stabilisation du génome du blé. J'ai montré au cours de ma thèse que l'allohexaploïdie s'accompagne d'une altération modérée (2,5%) de la forte méthylation des ET, observée dans leur géniteurs. En effet, j'ai pu montrer dans un premier temps que 98 à 100% des marqueurs issus d'ET étaient méthylés chez géniteurs AB et D respectivement et que 97,5 % restaient également méthylés chez les allopolyploïdes. Les 2,5% restants représentent deux marqueurs issus d'ET correspondant à des jonctions *Gypsy-Low copy* et montrent une perte de méthylation sur les CHG (et éventuellement les CG) chez les allopolyploïdes. Il est intéressant de remarquer qu'un de ces marqueurs est déméthylé de manière répétable chez les deux allohexaploïdes. Mes travaux étant de type descriptif, il est actuellement difficile de déterminer si ces déméthylations se font de manière passive (en absence de maintenance pour ces ET) ou de manière active.

Ainsi il serait intéressant de caractériser plus finement les changements de méthylation des ET en:

- Evaluant l'impact de ces déméthylations sur l'activation transcriptionnelle de ces éléments transposables.
- Analysant l'étendue de ces déméthylations au niveau de l'ET lui-même (c'est-à-dire sur toute sa longueur) mais également des régions flanquant son insertion. Il est à rappeler que j'ai analysé la méthylation des résidus CG et estimé celle des résidus CHG sans toutefois étudier la méthylation au niveau de CHH. Or de nombreux

travaux ont montrés que les ET sont généralement méthylés sur toute leur longueur et dans les trois contextes de séquences (CG, CHG, CHH) (Cokus *et al.,* 2008; Lister *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2010). Un traitement bisulfite, suivi d'une étape de clonage et de séquençage permettrait une caractérisation plus fine (au niveau des trois contextes de séquences) de ces déméthylations.

L'allopolyploïdie induit des changements de méthylation plus importants au niveau des gènes

Une proportion plus importante de changements de méthylation de l'ADN a été observée au niveau des gènes (5-7,5%) que des ET. Ces changements sont majoritairement des gains de méthylation (3/6 et 4/5 pour respectivement JOY36 et JOY54). De manière intéressante, deux changements (gain de méthylation sur l'homéoallèle AB) se font de manière répétable chez les deux allohexaploïdes JOY36 et JOY54. Chez *Arabidopsis thaliana*, il semblerait que la méthylation des CG observée dans le corps des gènes entraine une légère augmentation de l'expression du niveau transcriptionnel (Teixeira & Colot, 2009; Feng *et al.,* 2010; Saze & Kakutani, 2010).

Quel est l'impact de ces changements de l'état de méthylation des gènes sur leur expression?

La méthylation des gènes a été étudiée en utilisant des marqueurs issus de séquences exprimées (EST), ce qui signifie que nous avons analysé la méthylation au niveau du corps du gène et probablement pas au niveau des régions promotrices. Peu de choses sont connues quant au rôle joué par la méthylation du corps de gènes, mais chez *Arabidopsis* les études ont montré que 20 à 30 % des gène sont méthylés au niveau de leur corps et que cette méthylation est limitée aux CG (Cokus *et al.,* 2008; Lister *et al.,* 2008).

De manière intéressante, nous avons observé un taux similaire chez les espèces de blé (*Triticum* et *Aegilops*) analysées: ~30% des marqueurs issus d'EST sont méthylés chez les géniteurs et les allohexaploïdes.

En revanche, cette méthylation des gènes chez les blés n'est pas restreinte au CG. En effet, les marqueurs issus d'EST montrent également une méthylation des CHG qui reste toutefois beaucoup plus faible que celle observée sur les ET. Des résultats similaires ont été récemment observés chez le blé naturel par Cantu *et al.* (2010).

On peut penser que ces différences entre Blé et Arabidopsis (méthylation des CHG observée chez le blé mais pas chez Arabidopsis) peuvent être liées à l'abondance des éléments

transposables dans le génome du blé qui flanquent la plupart des gènes (Charles *et al.,* 2008; Paux *et al.,* 2008). En effet, les données de séquençage bisulfite, qui ont montré que la méthylation du corps du gène est principalement de type CG, ont été obtenues sur des espèces modèles, à petit génome et comportant une moindre proportion de ET (revue dans Feng *et al.,* 2010).

L'allopolyploïdie induit des changements de méthylation héritables

L'étude des changements de la méthylation de l'ADN à été réalisée sur les premières générations (S0, S1 et S2) et nous a permis d'apprécier l'héritabilité ou non des changements de méthylation observés. J'ai ainsi pu montrer que la majorité des changements de l'état de méthylation (perte ou gain) identifiés à une génération donnée sont fidèlement transmis à la génération descendante. De même, la majorité des changements de méthylation observés en génération S0 des colzas synthétiques se trouvent fixés en S5 (Lukens *et al.,* 2006 et Gaeta *et al.,* 2007).

De manière intéressante, des cas de réversion ont été identifiés dans notre étude ainsi que dans celles mentionnées ci-dessus (Gaeta *et al.,* 2007). Les mécanismes impliqués dans ces réversions des profils de méthylation restent à déterminer.

Effets du géniteur de génome D

De nombreuses études ont montré que les changements de méthylation ne se font pas de manière équilibrée sur les génomes parentaux (Shaked *et al.,* 2001; Lukens *et al.,* 2006 ; Gaeta *et al.,* 2007 ; Xu *et al.,* 2009 ; Chen & Chen, 2008 ; Parisod *et al.,* 2009). Ainsi, il semblerait que les changements de méthylation observés chez les spartines affectent le plus souvent le génome maternel (Parisod *et al.,* 2009). Chez les *Brassicas* synthétiques (CCAA) Lukens *et al.* (2006) puis Gaeta *et al.* (2007) ont observé un biais de méthylation vers le génome A (voir toutefois Xu *et al.,* 2009).

Nous avons également observé un biais vers l'un des génomes parentaux mais qui n'est pas le même chez les deux allohexaploïdes étudiés. En effet, les changements de méthylation observés chez les allohexaploïdes JOY36 concernent majoritairement les homéoallèles du génome D (Ats36). En revanche, aucun changement n'a concerné l'homéoallèle D d'Att54 chez les allohexaploïdes JOY54. A notre connaissance, peu de

travaux ont montré l'effet de la variabilité des génotypes parentaux (ici celle d'*Ae. taushii*) sur les changements de méthylation chez le blé.

Il serait intéressant d'analyser la méthylation chez allohexaploïdes présentant des géniteurs AB différents de ceux analysés dans ce chapitre. Les allohexaploïdes TC36 et TC54 ne présentant pas de changements génétiques (Mestiri *et al.,* 2010) et pour lesquels nous disposons également de données d'expression sont en cours d'analyse au laboratoire.

Changement de la méthylation de l'ADN et régulation de l'expression des gènes.

En utilisant une puce Affymetrix GeneChip® blé (55,049 transcrits), nous avons montré que l'expression de plus 93% des transcrits est additive (S=MPV avec MPV : Mid Parent Value et S: allohexaploïde synthétique). L'expression de plus de 2000 gènes (~7%) se faisant de manière non additive (S< ou >MPV) chez ces allohexaploïdes synthétiques (Chagué *et al.,* 2010).

Nous avons analysé 47 transcrits « silencés » (S<MPV : profil non additif et sous exprimé) et montré que leur inactivation n'est en aucun cas due à une délétion (Chagué *et al.,* 2010), confirmant ainsi l'absence de remaniement génétiques observés sur les même allohexaploïdes synthétiques (Mestiri *et al.,* 2010; Chapitre I-A). Plusieurs mécanismes autres que les remaniements génétiques peuvent donc avoir affecté l'expression de ces gènes, notamment des changements de méthylation de l'ADN.

Partant de ce postulat, nous avons analysé la méthylation de l'ADN par la méthode MS-PCR de ces 47 gènes « silencés » chez les allohexaploïdes synthétiques. Les analyses préliminaires montrent que cinq gènes « silencés » sont également différentiellement méthylés (par rapport au mélange d'ADN parental) chez ces mêmes allohexaploïdes (*résultats non montrés*). Parmi ceux-ci, 3 montrent un gain de méthylation alors que les 2 autres montrent une perte de méthylation.

Toutefois la faible proportion de changements et le fait qu'ils concernent à la fois des pertes et des gains de méthylation ne nous permettent pas de proposer un modèle global de régulation de l'expression des gènes par des changements de la méthylation de l'ADN.

Section III
Conclusions générales & perspectives

Conclusions Générales & perspectives

Les premières caractérisations des allopolyploïdes synthétiques de blé ont suggéré des éliminations importantes de séquences ADN (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2005; Shcherban *et al.,* 2008) et les changements observés ont été décrits comme 'révolutionnaires'. Il a été suggéré que ces changements accentueraient la divergence entre génomes homéologues et permettraient ainsi la stabilisation des allopolyploïdes de blé (Feldman & Levy, 2005). D'autres travaux, menés par d'autres groupes, n'ont pas mis en évidence de remaniements structuraux dans un allohexaploïde synthétique de blé (He *et al.,* 2003).

Dans ce contexte, j'ai démarré la préparation de ma thèse avec l'objectif de débrouiller les conclusions contradictoires en confirmant éventuellement l'existence de changements structuraux et en disséquant leurs mécanismes moléculaires. J'ai ainsi orienté mon travail de thèse vers la caractérisation fine des premières générations des allopolyploïdes synthétiques de blé (genres *Triticum* et *Aegilops*) que j'ai collecté (Col. Moshé Feldman, Weizmann institute, Israel) ou obtenu au cours de ma thèse. J'ai analysé les conséquences de l'appariement des chromosomes homologues et homéologues lors de la méiose sur la formation des aneuploïdes et la dynamique des changements génétiques, en utilisant les techniques de cytogénétique les plus avancées. J'ai également cherché à caractériser finement les remaniements de loci spécifiques pouvant être induits par l'allopolyploïdie, ainsi que les changements de leur état de méthylation.

Mes travaux m'ont permis de préciser certains facteurs impliqués dans la stabilisation de ces blés néopolyploïdes (genres *Triticum* et *Aegilops*).

J'ai ainsi pu montrer (i) que la stabilité des allopolyploïdes dépend des génotypes des espèces parentales, (ii) que des remaniements génétiques peuvent être générés par des évènements de recombinaison homéologue, uniquement dans les allopolyploïdes où les chromosomes homéologues peuvent s'apparier lors de la méiose, (iii) que l'allopolyploïdie induit des changements de méthylation de l'ADN, dont certains seraient en lien avec leur expression et enfin, (iv) que les éléments transposables sont fortement méthylés dans les génomes parentaux et les allopolyploïdes avec seulement une proportion de 2,5% de déméthylation dans les allopolyploïdes.

Comportement méiotique et stabilisation des allopolyploïdes: effets de la variabilité des espèces et génotypes parentaux

Afin de se pérenniser, les espèces polyploïdes combinant plusieurs génomes dans leur noyaux doivent se comporter comme des diploïdes au cours de la méiose, surmontant ainsi les biais d'appariements entre chromosomes homéologues. Dans le cas contraire, ces appariements entraînent la formation de gamètes 'non équilibrés' et d'aneuploïdes dans les générations suivantes (Ramsey & Schemske, 1998; 2002). Divers mécanismes pourraient assurer la stabilisation du comportement méiotique, notamment :

(i) par le biais d'un contrôle génétique comme celui exercé par le locus *Ph1* chez le blé (Griffiths *et al.,* 2006; Al Kaff *et al.,* 2008),

(ii) à travers la divergence des génomes homéologues.

Mon étude illustre bien la convergence de ces deux mécanismes. J'ai tout d'abord montré au cours de ma thèse que l'appariement se faisait exclusivement entre chromosomes homologues chez les allohexaploïdes synthétiques de blé possédant le locus *Ph1*. Toutefois, j'ai observé que toujours en absence d'appariement homéologue (contrôlé par le locus *Ph1)*, l'appariement homologue peut être incomplet (formation d'univalents et de bivalents droits) et entraîner l'apparition d'aneuploïdes à la génération suivante, dont le taux dépend des génotypes des géniteurs utilisés.

Ainsi, les allohexaploïdes ayant 'Tétra Courtot'(composante tétraploide extraite du blé hexaploïde Courtot) comme donneur du génome AB, montrent un appariement homologue relativement complet et sont significativement plus stables que ceux ayant le tétraploïde naturel *T. turgidum durum* cv Joyau. De même, nous avons observé un effet différentiel des génomes D avec certaines accessions d'*Ae. tauschii*, comme par exemple Ats109, donnant des allohexaploïdes plus stables en ce qui concerne l'appariement homologue. Ainsi, peu de combinaisons de génotypes donneurs des génomes AB et D produisent des allohexaploïdes dont la stabilité est similaire à celle de l'allohexaploïde naturel. Par ailleurs, mes travaux suggèrent que des facteurs de cette stabilisation de l'appariement homologue lors de la méiose préexistaient dans les géniteurs du génome D. N'ayant analysé qu'un nombre limité de génotypes du géniteur tétraploïde, nous ne pouvons pas préciser si le génome AB du blé hexaploïde 'Tétra Courtot' portait déjà ces facteurs avant l'allohexaploïdie naturelle ou s'il a subi des modifications pour une méiose plus stable (par rapport à Joyau). L'analyse d'autres allohexaploïdes, obtenus avec d'autres génotypes du géniteur de génome AB, devrait permettre de mieux répondre à ces questions.

Le fait que le locus *Ph1* ne soit présent que chez les espèces polyploïdes du genre *Triticum* suggère son émergence peu de temps après l'évènement de polyploïdisation (Griffiths *et al.,* 2006). Existe-t-il d'autres facteurs qui ont assuré la stabilisation des polyploïdes naturels?

Il a été suggéré que la divergence des chromosomes homéologues par des réarrangements structuraux rapides chez les blés néopolyploïdes, dits changements révolutionnaires serait un mécanisme permettant de réduire les possibilités d'appariement entre ces chromosomes homéologues (Levy & Feldman, 2004; Feldman & Levy, 2005; 2009).

Cette hypothèse est plausible mais la caractérisation de ces allopolyploïdes synthétiques de blé (col. Moshé Feldman, Weizmann Institute, Israel), ainsi que d'autres polyploïdes obtenus au cours de ma thèse, avec des marqueurs PCR spécifiques de loci et utilisant un témoin d'additivité, n'ont pas confirmé ces remaniements massifs des séquences ADN précédemment décrits sur ce matériel (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Feldman & Levy 2005; Han *et al.,* 2005; Scherban *et al.,* 2008) (*voir plus loin*).

Il est à rappeler que les travaux d'analyse comparée de séquences ont montré une divergence importante des génomes du blé même à l'état diploïde, où l'espace ET, constituant plus de 80% de ces génomes, est différent entre les génomes A, B, D et S. L'essentiel de cette divergence est antérieur aux évènements de polyploïdisation naturels (Wicker *et al.,* 2003; Chantret *et al.,* 2005; Gu *et al.,* 2006; Charles *et al.,* 2008).

J'ai par ailleurs observé qu'en absence du locus *Ph1*, certains allotétraploïdes synthétiques étaient plus stables que d'autres en ce qui concerne l'appariement (peu multivalents) en plus de l'absence de remaniements structuraux. Les combinaisons des génomes donnant les allotétraploïdes les plus stables sont celles combinant les génomes A et S et les moins stables sont celles combinant les génomes A et D. Il est à signaler que les génomes A et S, qui sont les plus proches des génomes A et B des blés polyploïdes naturels stables, sont plus divergents entre eux par leurs séquences que les génomes A et D (Chalupska et *et al.,* 2008; Salse *et al.,* 2008b; Mathieu Charles & Harry Belcram, *Comm. Pers.).*

Ainsi mes résultats de thèse suggèrent que la formation d'un allotétraploïde stable est corrélée à la divergence préalable entre les chromosomes homéologues des espèces parentales impliquées, réduisant ainsi les chances d'appariement homéologue. Au cours de l'évolution de ces allopolyploïdes, des remaniements structuraux peuvent apparaître, favorisés par la

divergence initiale des génomes parentaux et un relâchement de la pression de sélection dû à la duplication globale du génome. Certains de ces remaniements auraient pu avoir accentué la stabilité des allopolyploïdes et avoir été sélectionnés dans la nature, comme par exemple le remaniement ayant abouti à l'émergence de la forme allélique du locus *Ph1* sur le chromosome 5B, spécifique aux blés polyploïdes (Griffiths *et al.,* 2006; Al-Kaff *et al.,* 2008).

J'ai par ailleurs montré qu'en l'absence d'appariements homéologues, la stabilité méiotique de l'appariement homologue (complet) chez les allohexaploïdes portant le locus *Ph1* est dépendante de la diversité intraspécifique des géniteurs et serait due à d'autres facteurs que ceux intervenant sur l'appariement homéologue. Il serait intéressant d'identifier ces facteurs par des approches de génomique et de clonage positionnel, utilisant des populations en ségrégation déjà produites (Joseph Jahier, *Comm. Pers.*)

Changements génétiques induits par l'allopolyploïdie: révolutionnaires ou évolutionnaires?

La caractérisation des effets à court terme de la polyploïdie, principalement par l'analyse de polyploïdes synthétiques, a fait l'objet de nombreuses communications dont les conclusions étaient contradictoires.

Ainsi, la stabilité structurale observée notamment chez les cotons (Liu *et al.,* 2001) mais aussi chez les jeunes spartines (Baumel *et al.,* 2002) et les *Tragopogons* synthétiques (Buggs *et al.,* 2009) contraste avec les changements dit révolutionnaires chez le blé, dont les mécanismes n'ont pas été identifiés et pouvant apparemment mener à l'élimination rapide de plus de 14% d'un des génomes parentaux (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2005; Shcherban *et al.,* 2008). Il est à signaler que d'autres travaux chez le blé ont également suggéré une stabilité structurale (He et al. 2003)

Dans l'objectif d'élucider ces résultats contradictoires, j'ai caractérisé des allopolyploïdes de blé fournis par Moshé Feldman ainsi que d'autres plus représentatifs produits au cours de ma thèse. Mon étude s'est notamment basée sur: (i) l'analyse plus précise de loci spécifiques, avec des marqueurs basées sur la PCR; et (ii) l'utilisation d'un témoin d'additivité, constitué par un mélange d'ADN parentaux dans un même tube, simulant ainsi *in vitro* un polyploïde où les deux génomes parentaux seraient simplement additionnés sans remaniements. Mes résultats n'ont pas confirmé les remaniements 'dits révolutionnaires' des séquences ADN précédemment décrits sur ce type de matériel. Il est à noter que si je n'avais

pas utilisé un témoin d'additivité, comme dans les études précédentes (Feldman *et al.,* 1997; Ozkan *et al.,* 2001; Shaked *et al.,* 2001; Kashkush *et al.,* 2002; Han *et al.,* 2005; Shcherban *et al.,* 2008), j'aurai faussement considéré que des remaniements structuraux affectaient entre 9 et 13% des loci analysés. En effet, la déviation observée dans les allopolyploïdes synthétiques par rapport aux parents pour ces loci était également observée dans le témoin d'additivité, ce qui signifie qu'elle est due à des biais techniques et non pas à des remaniements.

Peu de temps après la publication de mes principales conclusions basées sur ces résultats (Mestiri *et al.,* 2010), l'équipe de Khalil Kashkush (Hebrew University, Israel) a publié deux études (Khasdan *et al.,* 2010 ; Kraistshtein *et al.,* 2010) décrivant des remaniements des séquences d'ADN sur des allohexaploïdes synthétiques.

Dans la première étude (Khasdan *et al.,* 2010), les auteurs prétendent qu'un marqueur PCR spécifique de l'homéoallèle du génome D (dont la séquence ADN est de type non assignée) est perdu de façon répétable à la génération S2 de l'allohexaploïde que nous avions également caractérisé. J'ai donc analysé le marqueur en question sur des plantes des générations (S2 à S5) du même allohexaploïde. J'ai notamment observé que:

- L'homéoallèle du génome D était absent dans certaines plantes S2 (fournies par M. Feldman) et présent dans d'autres, alors que Khasdan *et al.* (2010) l'ont toujours trouvé absent dans la génération S2.
- Par contre, les descendances des plantes S2 où l'homéoallèle du génome D est présent ne montrent aucun remaniement, ni à la génération S3 ni aux générations ultérieures, contrairement à ce que suggèrent Khasdan *et al.* (2010).
- Par ailleurs, une diversité d'absence et de présence de ce marqueur dans les différentes accessions d'*Ae. tauschii* a été également observée.

Ainsi le timing de la délétion de ce marqueur (génération S2) et sa répétabilité décrite par Khasdan *et al.* (2010) n'ont pas été confirmés dans mes conditions où un nombre plus important de plantes du même allohexaploïde a été analysé de façon précise. Les conclusions différentes de Kashdan *et al.* (2010) seraient dues au fait que leurs plantes des générations S2, S3 et S4 ont été produites à partir d'une seule plante S1 n'ayant probabement pas l'homéoallèle du génome D. Les auteurs auraient par ailleurs resynthétisé l'allohexaploïde de façon indépendante en utilisant un *Ae. tauschii* possédant l'homéoallèle du génome D afin d'obtenir les plantes des générations S1. Les comparaisons des générations S1 ayant l'homéoallèle du génome D d'une part avec les plantes des générations S2, S3 et S4 n'ayant pas cet homéoallèle auraient faussement conduit à ces conclusions sur le timing et la

répétabilité des délétions. Mon analyse, dans laquelle j'ai suivi des générations successives de l'allohexaploïde descendant directement les unes des autres, suggère ainsi que la présence ou l'absence de cet homéoallèle dans certaines plantes de l'allohexaploïde seraient due à une ségrégation de cet homéoallèle qui aurait été à l'état d'hétérozygote dans le génome D du géniteur.

L'équipe de Khalil Kashkush a publié par la suite des conclusions sur le timing de changement de l'état de méthylation ainsi que l'élimination et la réinsertion des éléments transposables, malheureusement basées sur le même matériel et les mêmes générations inadéquates (Kraistshtein *et al.,* 2010).

Un projet de communication de notre équipe expliquant les problèmes conduisant à ces fausses conclusions est en cours de mise au point avec l'éditeur de la revue *Genetics*.

Ainsi, mes résultats suggèrent que si des changements génétiques peuvent se produire chez les allopolyploïdes de blé, ils ne sont pas révolutionnaires mais plutôt évolutionnaires. Seuls les allopolyploïdes ne possédant pas le gène *Ph1* et exhibant un fort taux d'appariements homéologues à la méiose, comme ceux combinant les génomes A et D, montrent des remaniements dans les premières générations. Combinés à la caractérisation par l'hybridation GISH, mes résultats suggèrent que ces remaniements seraient causés par des évènements de recombinaison homéologue. Ces remaniements auraient pour conséquence d'homogénéiser les chromosomes homéologues et faciliter les appariements homéologues, ce qui conduirait à un polyploïde de moins en moins stable.

De la même façon, chez le colza, des remaniements structuraux observés à une fréquence assez élevée ont été caractérisés comme causés par des translocations non réciproques homéologues (TNRH) et n'ont donc pas été qualifiés de révolutionnaires (Lukens *et al.,* 2006; Udall *et al.,* 2005; Gaeta *et al.,* 2007; Nicolas *et al.,* 2007; Gaeta & Pires, 2010).

Dans la nature, les remaniements structuraux peuvent être éliminés ou fixés selon l'avantage sélectif qu'ils confèrent. Divers exemples de remaniements structuraux s'étant produits et accumulés au cours du temps existent chez les populations naturelles des blés polyploïdes et témoignent de leurs avantages adaptatifs. Un des meilleurs exemples est la translocation 4AL-5AL-7BS qui est devenue une signature évolutive des blés polyploïdes. Cette importante translocation peut avoir conféré un avantage adaptatif et a de ce fait été retenue au cours de l'évolution (Naranjo, 1990). De même, chez le colza, les TNRH sont une source de variation pour plusieurs caractères d'intérêt agronomique comme la précocité de

floraison (Pires *et al.,* 2004), le rendement (Osborn *et al.,* 2003a) ou la résistance aux maladies (Zhao *et al.,* 2006).

L'équipe de Loren Rieseberg a également démontré que les remaniements structuraux qui ont accompagné la spéciation homoploïde de plusieurs espèces d'*Helianthus* ont permis à ces espèces de s'adapter et de coloniser de nouveaux milieux (Rieseberg *et al.,* 1995, 2007).

L'ensemble de mes travaux suggère ainsi l'absence de changements révolutionnaires lors de la formation des allopolyploïdes de blé. Ces remaniements sont de type évolutionnaire et se feraient sur le long terme comme en attestent les remaniements observés en analysant des allohexaploïdes naturels de blé (Chantret *et al.,* 2005; Griffiths *et al.,* 2006; Al-Kaff *et al.,* 2008; Li *et al.,* 2008; Ragupathy & Cloutier, 2008) et la diversité haplotypique importante des blés polyploïdes (Harry Belcram, *Comm. Pers.).*

Des conclusions similaires ont été émises afin d'expliquer les remaniements observés dans les populations naturelles de *Tragopogons* (Buggs *et al.,* 2009; Tate *et al.,* 2009) mais pas chez les polyploïdes synthétiques de première génération (Buggs *et al.,* 2009).

Changements de l'état de méthylation de l'ADN : contraste entre les séquences géniques et les séquences d'éléments transposables.

J'ai étudié les changements de méthylation de l'ADN chez des allohexaploïdes ne présentant pas de changements génétiques (Mestiri *et al.,* 2010) mais montrant une expression non additive pour plus de 7% des 30 000 gènes analysés (environ 2000) (Chagué *et al.,* 2010).

J'ai montré que l'allopolyploïdie induit des changements de méthylation qui concernent 5-6% les marqueurs géniques, issus des séquences d'EST. Certains changements affectent des gènes montrant également des changements d'expression dans les mêmes allohexaploïdes synthétiques. Des changements de la méthylation de l'ADN ont été observés dans différents systèmes allopolyploïdes (Liu & Wendel, 2003; Rapp & Wendel, 2005) et il a été montré que ces changements entraînent une reprogrammation de l'expression des gènes (Osborn *et al.,* 2003) ainsi que des modifications phénotypiques (Madlung *et al.,* 2002).

En revanche, une proportion moins importante (2,5%) de changements de la méthylation d'ADN affecte les éléments transposables. Ces derniers sont généralement méthylés chez les géniteurs et le restent chez les allopolyploïdes. Cette forte méthylation, maintenant probablement les éléments transposables à l'état inactif, concorde avec les travaux de divers groupes qui s'accordent à dire que la polyploïdie n'entraine pas une mobilisation des éléments transposables (revue dans Parisod *et al.,* 2010). Néanmoins, même relativement

faible (2,5%), le taux de déméthylation des séquences des ET observé dans les allohexaploïdes synthétiques représente une quantité importante pour un génome très riche en éléments transposables (plus de 80% du génome). Il serait intéressant d'élucider le rôle et les conséquences de cette déméthylation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adams, K. L., R. Percifield, and J. F. Wendel. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. Genetics **168**:2217-2226.

Adams, K. L., and J. F. Wendel. 2005a. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. Trends in Genetics **21**:539-543.

Adams, K. L., and J. F. Wendel. 2005b. Polyploidy and genome evolution in plants. Current Opinion in Plant Biology **8**:135-141.

Ainouche M, B. A., Salmon A. 2004. Spartina anglica C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid Biological Journal of the Linnean Society **82**:475-484.

Akhunov, E. D., A. W. Goodyear, S. Geng, L. L. Qi, B. Echalier, B. S. Gill, Miftahudin, J. P. Gustafson, G. Lazo, S. Chao, O. D. Anderson, A. M. Linkiewicz, J. Dubcovsky, M. La Rota, M. E. Sorrells, D. Zhang, H. T. Nguyen, V. Kalavacharla, K. Hossain, S. F. Kianian, J. Peng, N. L. Lapitan, J. L. Gonzalez-Hernandez, J. A. Anderson, D. W. Choi, T. J. Close, M. Dilbirligi, K. S. Gill, M. K. Walker-Simmons, C. Steber, P. E. McGuire, C. O. Qualset, and J. Dvorak. 2003. The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. Genome Res **13**:753-763.

Al-Kaff, N., E. Knight, I. Bertin, T. Foote, N. Hart, S. Griffiths, and G. Moore. 2008. Detailed Dissection of the Chromosomal Region Containing the Ph1 Locus in Wheat Triticum aestivum: With Deletion Mutants and Expression Profiling. Annals of Botany **101**:863-872.

Andreuzza, S., and I. Siddiqui. 2008. Spindle positioning, meiotic non reduction and polyploidy in plants. PLOS Genetics **4**:e1000272.

Aury, J. M., O. Jaillon, L. Duret, B. Noel, C. Jubin, B. M. Porcel, B. Segurens, V. Daubin, V. Anthouard, N. Aiach, O. Arnaiz, A. Billaut, J. Beisson, I. Blanc, K. Bouhouche, F. Camara, S. Duharcourt, R. Guigo, D. Gogendeau, M. Katinka, A. M. Keller, R. Kissmehl, C. Klotz, F. Koll, A. Le Mouel, G. Lepere, S. Malinsky, M. Nowacki, J. K. Nowak, H. Plattner, J. Poulain, F. Ruiz, V. Serrano, M. Zagulski, P. Dessen, M. Betermier, J. Weissenbach, C. Scarpelli, V. Schachter, L. Sperling, E. Meyer, J. Cohen, and P. Wincker. 2006. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate Paramecium tetraurelia. Nature **444**:171-178.

Badaeva, E. D., O. S. Dedkova, G. Gay, V. A. Pukhalskyi, A. V. Zelenin, S. Bernard, and M. Bernard. 2007. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. Genome **50**:907-926.

Baumel, A., M. Ainouche, R. Kalendar, and A. H. Schulman. 2002. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species Spartina anglica C.E. Hubbard (Poaceae). Mol Biol Evol **19**:1218-1227.

Belyayev, A., O. Raskina, A. Korol, and E. Nevo. 2000. Coevolution of A and B genomes in allotetraploid Triticum dicoccoides. Genome **43**:1021-1026.

Benavente, E., B. Fernandez-Calvin, and J. Orellana. 1996. Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH. Chromosoma **105**:92-96.

Bento, M., H. S. Pereira, M. Rocheta, P. Gustafson, W. Viegas, and M. Silva. 2008. Polyploidization as a retraction force in plant genome evolution: sequence rearrangements in triticale. PLoS One **3**:e1402.

Bestor, T. H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet **9**:2395-2402.

Biémont, C.and C. Viera. 2006. Genetics:junk DNA as en evolutionary force. Nature **443**:521-524.

Birchler, J. A., D. L. Auger, and N. C. Riddle. 2003. In search of the molecular basis of heterosis. Plant Cell **15**:2236-2239.

Birchler, J. A., and R. A. Veitia. 2007. The gene balance hypothesis: from classical genetics to modern genomics. Plant Cell **19**:395-402.

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes & Development **16**:6-21.

Blake, N. K., B. R. Lehfeldt, M. Lavin, and L. E. Talbert. 1999. Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat. Genome **42**:351-360.

Blakeslee, A. 1922. Variation in Datura due to changes in chromosome number. Am Nat. **56**: 16-31.

Blanc, G., and K. H. Wolfe. 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. Plant Cell **16**:1667-1678.

Boden, S. A., P. Langridge, G. Spangenberg, and J. A. Able. 2009. TaASY1 promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of Ph1. Plant Journal **57**:487-497.

Bretagnolle, F., Thompson, JD. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist **129**:1-22.

Brownfield, L., Kohler, C. 2010. Unreduced gametes formation in plants: mechanisms and prospects. Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erq371.

Buggs, R. J., A. N. Doust, J. A. Tate, J. Koh, K. Soltis, F. A. Feltus, A. H. Paterson, P. S. Soltis, and D. E. Soltis. 2009. Gene loss and silencing in Tragopogon miscellus (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. Heredity **103**:73-81.

Camacho, J.P.M., T.F. Sharbel, and L.W. Beukeboom. 2000. B-chromosome evolution. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **355**:163-178.

Cantu, D., Vanzetti, L.S., summer, A., Dubcovsky, M., Matvienko,M., Distelfeld,A., Michelmore,R.W., Dubcovsky,J. 2010. Small RNAs, DNA methylation and transposable elements in wheat. BMC Genomics **11**:1-15.

Chagué, V., J. Just, I. Mestiri, S. Balzergue, A. M. Tanguy, C. Huneau, V. Huteau, H. Belcram, O. Coriton, J. Jahier, and B. Chalhoub. 2010. Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids. New Phytologist **187**:1181-1194.

Chandler, V.L. and V. Walbot. 1985. DNA modifications of a maize transposable elements correlates with loss of activity. Proc Natl Acad Sci U S A **83**:1767-1771.

Chalupska, D., H. Y. Lee, J. D. Faris, A. Evrard, B. Chalhoub, R. Haselkorn, and P. Gornicki. 2008. Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes. Proc Natl Acad Sci U S A **105**:9691-9696.

Chantret, N., J. Salse, F. Sabot, S. Rahman, A. Bellec, B. Laubin, I. Dubois, C. Dossat, P. Sourdille, P. Joudrier, M. F. Gautier, L. Cattolico, M. Beckert, S. Aubourg, J. Weissenbach, M. Caboche, M. Bernard, P. Leroy, and B. Chalhoub. 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (Triticum and Aegilops). Plant Cell **17**:1033-1045.

Charles, M., H. Belcram, J. Just, C. Huneau, A. Viollet, A. Couloux, B. Segurens, M. Carter, V. Huteau, O. Coriton, R. Appels, S. Samain, and B. Chalhoub. 2008. Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. Genetics **180**:1071-1086.

Charles, M., H. Tang, H. Belcram, A. Paterson, P. Gornicki, and B. Chalhoub. 2009. Sixty Million Years in Evolution of Soft Grain Trait in Grasses: Emergence of the Softness Locus in the Common Ancestor of Pooideae and Ehrhartoideae, after their Divergence from Panicoideae. Molecular Biology and Evolution **26**:1651-1661.

Chaudhary, B., L. Flagel, R. M. Stupar, J. A. Udall, N. Verma, N. M. Springer, and J. F. Wendel. 2009. Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (gossypium). Genetics **182**:503-517.

Chen, Z. J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Annual Review of Plant Biology **58**:377-406.

Chen, L., and J. Chen. 2008. Changes of cytosine méthylation induced by wide hybridization and allopolyploidy in Cucumis. Genome **10**:789-799.

Chen, Z. J., and Z. Ni. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. Bioessays **28**:240-252.

Cifuentes, M., L. Grandont, G. Moore, A. M. Chevre, and E. Jenczewski. 2009. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. New Phytol **186**:29-36.

Cokus, S. J., S. H. Feng, X. Y. Zhang, Z. G. Chen, B. Merriman, and C. D. Haudenschild. 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. Nature **452**:215-219.

Colas, I., P. Shaw, P. Prieto, M. Wanous, W. Spielmeyer, R. Mago, and G. Moore. 2008. Effective chromosome pairing requires chromatin remodeling at the onset of meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **105**:6075-6080.

Colot, V., and J. L. Rossignol. 1999. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. Bioessays **21**:402-411.

Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. Nat Rev Genet **6**:836-846.

Comai, L., A. P. Tyagi, and M. A. Lysak. 2003. FISH analysis of meiosis in Arabidopsis allopolyploids. Chromosome Research **11**:217-226.

Comai, L., A. P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S. H. Reynolds, Y. Stevens, and B. Byers. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. Plant Cell **12**:1551-1568.

Corredor, E., A. J. Lukaszewski, P. Pachon, D. C. Allen, and T. Naranjo. 2007. Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. Genetics **177**:699-706.

Cui, L., P. K. Wall, J. H. Leebens-Mack, B. G. Lindsay, D. E. Soltis, J. J. Doyle, P. S. Soltis, J. E. Carlson, K. Arumuganathan, A. Barakat, V. A. Albert, H. Ma, and C. W. dePamphilis. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants.

Genome Research **16**:738-749.
Cuñado, N., and J. L. Santos. 1999. On the diploidization mechanism of the genus Aegilops: meiotic behaviour of interspecific hybrids. TAG Theoretical and Applied Genetics **99**:1080-1086.
Darlington, C. 1937. Recent Advances in Cytology.
Endo, T.R, and B S. Gill. 1996. The deletion stocks of common wheat. J of Heredity **87(4)**:295-307.
Erilova, A., L. Brownfield, V. Exner, M. Rosa, D. Twell, O.M. Scheid, L. Hennid and C. Kohler. 2009. Imprinting of the Polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in Arabidopsis. PLoS Genet **5**:e1000663.
d'Erfurth, I., L. Cromer, S. Jolivet, C. Girard, C. Horlow, Y Sun, L. Berchowitz, GP. Copenhaver, and R. Mercier. 2010. The CYCLIN-A CYCA1.2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. PLoS Genet **6**:e1000989.
d'Erfurth, I., S. Jolivet, N. Froger, O. Catrice, M. Novatchkova, and R. Mercier. 2009. Turning meiosis into mitosis. PLoS Biol **7**:e1000124.
d'Erfurth, I., S. Jolivet, N. Froger, O. Catrice, M. Novatchkova, M. Simon, E. Jenczewski, and R. Mercier. 2008. Mutations in AtPS1 (Arabidopsis thaliana parallel spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains. PLoS Genet **4**:e1000274.
Devos, K. M. 2010. Grass genome organization and evolution. Curr Opin Plant Biol **13**:139-145.
Devos, K. M., J. K. Brown, and J. L. Bennetzen. 2002. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. Genome Res **12**:1075-1079.
Doyle, J. J., L. E. Flagel, A. H. Paterson, R. A. Rapp, D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. F. Wendel. 2008. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. Annu Rev Genet **42**:443-461.
Dvorak, J., E. D. Akhunov, A. R. Akhunov, K. R. Deal, and M. C. Luo. 2006. Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. Molecular Biology of the Cell **23**:1386-1396.
Feldman, M. 1993. Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (Ph1) gene of wheat. Crop Science **33**:889-9113.
Feldman, M., and A. A. Levy. 2005. Allopolyploidy--a shaping force in the evolution of wheat genomes. Cytogenet Genome Res **109**:250-258.
Feldman, M., and A. A. Levy. 2009. Genome evolution in allopolyploid wheat--a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. J Genet Genomics **36**:511-518.
Feldman, M., B. Liu, G. Segal, S. Abbo, A. A. Levy, and J. M. Vega. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. Genetics **147**:1381-1387.
Feldman, M., F. Lupton, and T. Miller. 1995. Wheats. Longman Scientific, London, UK.
Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P. Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, J. Jain, S. H. Strauss, M. E. Halpern, C. Ukomadu, K. C. Sadler, S. Pradhan, M. Pellegrini, and S. E. Jacobsen. 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:8689-8694.

Finnegan, E. J., and E. S. Dennis. 1993. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from Arabidopsis thaliana. Nucleic Acids Res **21**:2383-2388.

Finnegan, E. J., and K. A. Kovac. 2000. Plant DNA methyltransferases. Plant Mol Biol **43**:189-201.

Finnegan, E. J., W. J. Peacock, and E. S. Dennis. 1996. Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:8449-8454.

Gaeta, R. T., and J. Chris Pires. 2010. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. New Phytol **186**:18-28.

Gaeta, R. T., J. C. Pires, F. Iniguez-Luy, E. Leon, and T. C. Osborn. 2007. Genomic changes in resynthesized Brassica napus and their effect on gene expression and phenotype. Plant Cell **19**:3403-3417.

Gehring, M., W. Reik, and S. Henikoff. 2009. DNA demethylation by DNA repair. Trends Genet **25**:82-90.

Gendrel, A. V., Z. Lippman, C. Yordan, V. Colot, and R. A. Martienssen. 2002. Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. Science **297**:1871-1873.

Grandbastien, M. A., C. Audeon, E. Bonnivard, J. M. Casacuberta, B. Chalhoub, A. P. Costa, Q. H. Le, D. Melayah, M. Petit, C. Poncet, S. M. Tam, M. A. Van Sluys, and C. Mhiri. 2005. Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. Cytogenet Genome Res **110**:229-241.

Graner, A., H. Siedler, A. Jahoor, R. G. Herrman, and G. Wenzal. 1990. Assessment of the degree and the type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). Theor. Appl. Genet. **80**:826-832.

Grant, V. 1981. Plant speciation.

Griffiths, S., R. Sharp, T. N. Foote, I. Bertin, M. Wanous, S. Reader, I. Colas, and G. Moore. 2006. Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. Nature **439**:749-752.

Gu, Y. Q., J. Salse, D. Coleman-Derr, A. Dupin, C. Crossman, G. R. Lazo, N. Huo, H. Belcram, C. Ravel, G. Charmet, M. Charles, O. D. Anderson, and B. Chalhoub. 2006. Types and rates of sequence evolution at the high-molecular-weight glutenin locus in hexaploid wheat and its ancestral genomes. Genetics **174**:1493-1504.

Ha, M., E. D. Kim, and Z. J. Chen. 2009a. Duplicate genes increase expression diversity in closely related species and allopolyploids. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:2295-2300.

Ha, M., J. Lu, L. Tian, V. Ramachandran, K. D. Kasschau, E. J. Chapman, J. C. Carrington, X. Chen, X. J. Wang, and Z. J. Chen. 2009b. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:17835-17840.

Hamant, O., H. Ma, and W. Z. Cande. 2006. Genetics of meiotic prophase I in plants. Annu Rev Plant Biol **57**:267-302.

Han, F., G. Fedak, W. Guo, and B. Liu. 2005. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (pGc1R-1a) in newly synthesized wheat allopolyploids. Genetics **170**:1239-1245.

Harlan, J., deWet, JMJ. 1975. The origins of polyploidy. The Botanical Review **41**:361-390.

Harper, L., I. Golubovskaya and WZ. Cande. 2004. A bouquet of chromosomes. J. Cell Science. **117**:4025-4032.

He, P., B. R. Friebe, B. S. Gill, and J. M. Zhou. 2003. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. Plant Molecular Biology **52**:401-414.

Hegarty, M. J., and S. J. Hiscock. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. Curr Biol **18**:R435-444.

Hegarty, M. J., J. M. Jones, I. D. Wilson, G. L. Barker, J. A. Coghill, P. Sanchez-Baracaldo, G. Liu, R. J. Buggs, R. J. Abbott, K. J. Edwards, and S. J. Hiscock. 2005. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the Senecio floral transcriptome during hybrid speciation. Mol Ecol **14**:2493-2510.

Henry, I. M., B. P. Dilkes, and L. Comai. 2006. Molecular karyotyping and aneuploidy detection in Arabidopsis thaliana using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. Plant J **48**:307-319.

Holm, P., Wang, X. 1988. The effect of chromosome 5B on synapsis and chiasma formation in wheat, triticum aestivum cv. Chinese Spring. Carlsberg Research Communications **53**:191-208.

Hovav, R., J. A. Udall, B. Chaudhary, R. Rapp, L. Flagel, and J. F. Wendel. 2008. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **105**:6191-6195.

Hsieh, T. F., C. A. Ibarra, P. Silva, A. Zemach, L. Eshed-Williams, and R. L. Fischer. 2009. Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. Science **324**:1451-1454.

Huang, S., A. Sirikhachornkit, X. Su, J. Faris, B. Gill, R. Haselkorn, and P. Gornicki. 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **99**:8133-8138.

Huettel, B., T. Kanno, L. Daxinger, E. Bucher, J. van der Winden, and A. J. M. Matzke. 2007. RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: A versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. Biochim Biophys Acta **1769**:358-374.

Jackson, S., and Z. J. Chen. 2009. Genomic and expression plasticity of polyploidy. Curr Opin Plant Biol **13**:153-159.

Jahier, J., and A. M. Tanguy. 1992. Appariement des chromosomes chez les triticées. Pp. 46-47 *in* J. Jahier, ed. Techniques de cytogénétique végétale.

Jaillon, O., J. M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Hugueney, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyere, A. Billault, B. Segurens, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C. Del Fabbro, M. Alaux, G. Di Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I. Le Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M. E. Pe, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. F. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quetier, and P. Wincker. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature **449**:463-467.

Jauhar, P. P. 2007. Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force. Journal of Heredity **98**:188-193.

Jenczewski, E., Alix, K. 2004. From diploids to allopolyploids: The emergence of efficient pairing control genes in plants. Critical reviews in plant sciences **23**:21-45.

Jenczewski, E., F. Eber, A. Grimaud, S. Huet, M. O. Lucas, H. Monod, and A. M. Chevre. 2003. PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (Brassica napus) haploids. Genetics **164**:645-653.

Johannes, F., E. Porcher, F. K. Teixeira, V. Saliba-Colombani, M. Simon, and N. Agier. 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. PLoS Genet **5**:e1000530.

Jones, G. H. 1984. The control of chiasma distribution. Symp Soc Exp Biol **38**:293-320.

Jullien, P. E., and F. Berger. 2010. DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? Trends Genet **26**:394-399.

Kashkush, K., M. Feldman, and A. A. Levy. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. Genetics **160**:1651-1659.

Kashkush, K., M. Feldman, and A. A. Levy. 2003. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. Nature Genetics **33**:102-106.

Khasdan, V., B. Yaakov, Z. Kraitshtein, and K. Kashkush. 2010. Developmental timing of DNA elimination following allopolyploidization in wheat. Genetics **185**:387-390.

Khush, G. S. 1973. Cytogenetics of aneuploids, New York.

Kihara, H. 1944. Discovery of the DD analyser, one of the ancestors of Triticum vulgare. Agricultural Horticulture **19**:889-890.

Kingsbury MA, B. Friedman, MJ McConnell, SK Rehen, AH. Yang *et al*. 2005. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. Proc Natl Acad Sci U S A **102**:6143-6147.

Kleckner N,. 2006. Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. Chromosoma **115:** 175-194.

Kraitshtein, Z., B. Yaakov, V. Khasdan, and K. Kashkush. 2010. The Genetic and Epigenetic Dynamics of a Retrotransposon After Allopolyploidization of Wheat. Genetics.

Law, J. A., and S. E. Jacobsen. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat Rev Genet **11**:204-220.

Leitch, A. R., and I. J. Leitch. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science **320**:481-483.

Leitch, I., Bennett, MD. . 1997. Polyploidy in angiosperms. Trends in Plant Science **2**:470-476.

Levy, A. A., and M. Feldman. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. Biological Journal of the Linnean Society **82**:607-613.

Li, W., L. Huang, and B. S. Gill. 2008. Recurrent deletions of puroindoline genes at the grain hardness locus in four independent lineages of polyploid wheat. Plant Physiology **146**:200-212.

Lim, K.-B., Ramanna,M. S. ,de Jong, J. H. ,Jacobsen, E. , van Tuyl,J. M. 2001. Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. TAG Theoretical and Applied Genetics **103**:219-230.

Lim, K. Y., D. E. Soltis, P. S. Soltis, J. Tate, R. Matyasek, H. Srubarova, A. Kovarik, J. C. Pires, Z. Xiong, and A. R. Leitch. 2008. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in Tragopogon (Asteraceae). PLoS One **3**:e3353.

Lister, R., R. C. O'Malley, J. Tonti-Filippini, B. D. Gregory, C. C. Berry, and A. H. Millar. 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. Cell **133**:523-536.

Liu, B., C. L. Brubaker, G. Mergeai, R. C. Cronn, and J. F. Wendel. 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. Genome **44**:321-330.

Liu, B., J. M. Vega, and M. Feldman. 1998a. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. Genome **41**:535-542.

Liu, B., J. M. Vega, G. Segal, S. Abbo, M. Rodova, and M. Feldman. 1998b. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. Genome **41**:272–277.

Liu, B., and J. F. Wendel. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. Molecular Phylogenetics and Evolution **29**:365-379.

Lockton, S., and B. S. Gaut. 2009. The contribution of transposable elements to expressed coding sequences in Arabidopsis. Journal of Molecular Evolution **68**:80-89.

Loidl, J. 1990 The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. Genome **33:**759-778.

Lucas, H., and J. Jahier. 1988. Phylogenetic relationships in some diploid species of <i>Triticineae:</i> cytogenetic analysis of interspecific hybrids. TAG Theoretical and Applied Genetics **75**:498-502.

Lukaszewski, A. J. 1995. Chromatid and Chromosome Type Breakage-Fusion-Bridge Cycles in Wheat (Triticum aestivum L.). Genetics **140**:1069-1085.

Lukens, L. N., J. C. Pires, E. Leon, R. Vogelzang, L. Oslach, and T. Osborn. 2006. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized Brassica napus allopolyploids. Plant Physiology **140**:336-348.

Luo, M. C., J. Dubcovsky, and J. Dvorak. 1996. Recognition of homeology by the wheat Ph1 locus. Genetics **144**:1195-1203.

Lynch, M., and A. Force. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. Genetics **154**:459-473.

Lysak, M. A., A. Berr, A. Pecinka, R. Schmidt, K. McBreen, and I. Schubert. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and related Brassicaceae species. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:5224-5229.

Ma, X. F., P. Fang, and J. P. Gustafson. 2004. Polyploidization-induced genome variation in triticale. Genome **47**:839-848.

Madlung, A., R. W. Masuelli, B. Watson, S. H. Reynolds, J. Davison, and L. Comai. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids. Plant Physiol **129**:733-746.

Madlung, A., A. P. Tyagi, B. Watson, H. Jiang, T. Kagochi, R. W. Doerge, R. Martienssen, and L. Comai. 2005. Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. Plant Journal **41**:221-230.

Martienssen, R. A. 2010. Heterochromatin, small RNA and post-fertilization dysgenesis in allopolyploid and interploid hybrids of Arabidopsis. New Phytol **186**:46-53.

Martienssen, R. A., and V. Colot. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. Science **293**:1070-1074.

Martin, A., C. Troadec, A. Boualem, M. Rajab, R. Fernandez, H. Morin, M. Pitrat, C. Dogimont, and A. Bendahmane. 2009. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. Nature **461**:1135-1138.

Martinez-Perez, E., Shaw, P. ,Reader, S. ,Aragon-Alcaide, L.,Miller, T.,Moore, G. . 1999. Homologous Chromosome Pairing in Wheat. Journal of Cell Science **112**:1761-1769.

Martinez-Perez, E., P. Shaw, and G. Moore. 2001. The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. Nature **411**:204-207.

Masterson, J. 1994. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. Science **264**:421-424.

Mathieu, O., J. Reinders, M. Caikovski, C. Smathajitt, and J. Paszkowski. 2007. Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. Cell **130**:851-862.

Matzke, M. A., M. F. Mette, T. Kanno, and A. J. Matzke. 2003. Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer? Trends Genet **19**:253-256.

McClintock, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. Science **226**:792-801.

McFadden, E. S., and E. R. Sears. 1946. The origin of Triticum spelta and its free-threshing hexaploid relatives. Journal of Heredity **37**:81–89.

Mello-Sampayo, T. 1968. Homoeologous chromosome pairing in pentaploid hybrids of wheat. Proceedings Third International Wheat Genetics.

Mestiri, I., V. Chague, A. M. Tanguy, C. Huneau, V. Huteau, H. Belcram, O. Coriton, B. Chalhoub, and J. Jahier. 2010. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. New Phytol **186**:86-101.

Moore, G. 2002. Meiosis in allopolyploids - the importance of 'Teflon' chromosomes. Trends Genet **18**:456-463.

Moore, G., and P. Shaw. 2009. Improving the chances of finding the right partner. Current Opinion in Genetics and Development **19**:99-104.

Muntzing, A. 1936. The evolutionary significance of autopolyploidy. Hereditas **21**:263-378.

Naranjo, T. 1990. Chromosome structure of durum wheat. TAG Theoretical and Applied Genetics **79**:397-400.

Nesbitt, M., and D. Samuel. 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats Pp. 41-100. First International Workshop on Hulled Wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 4, Rome : International Plant Genetic Resources Institute.

Newton, W., Pellew,C. 1929. Primula kewensis and its derivatives. Journal of Genetics **20**:405-467.

Nicolas, S. D., G. Le Mignon, F. Eber, O. Coriton, H. Monod, V. Clouet, V. Huteau, A. Lostanlen, R. Delourme, B. Chalhoub, C. D. Ryder, A. M. Chevre, and E. Jenczewski. 2007. Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of Brassica napus haploids. Genetics **175**:487-503.

Nicolas, S. D., M. Leflon, H. Monod, F. Eber, O. Coriton, V. Huteau, A. M. Chevre, and E. Jenczewski. 2009. Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in Brassica napus haploids and hybrids. Plant Cell **21**:373-385.

Orellana, J. 1985. Most of the homoeologous pairing at metaphase I in wheat-rye hybrids is not chiasmatic. Genetics **111**:917-931.

Osborn, T. C., D. V. Butrulle, A. G. Sharpe, K. J. Pickering, I. A. Parkin, J. S. Parker, and D. J. Lydiate. 2003a. Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in Brassica napus. Genetics **165**:1569-1577.

Osborn, T. C., J. C. Pires, J. A. Birchler, D. L. Auger, Z. J. Chen, H. S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R. W. Doerge, V. Colot, and R. A. Martienssen. 2003b. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends Genet **19**:141-147.

Otto, S. P., and J. Whitton. 2000. Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet **34**:401-437.

Ozkan, H., and M. Feldman. 2009. Rapid cytological diploidization in newly formed allopolyploids of the wheat (Aegilops-Triticum) group. Genome **52**:926-934.

Ozkan, H., A. A. Levy, and M. Feldman. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (Aegilops-Triticum) group. Plant Cell **13**:1735-1747.

Ozkan, H., M. Tuna, and K. Arumuganathan. 2003. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (aegilops-triticum) group. Journal of Heredity **94**:260-264.

Pang, M., A. W. Woodward, V. Agarwal, X. Guan, M. Ha, V. Ramachandran, X. Chen, B. A. Triplett, D. M. Stelly, and Z. J. Chen. 2009. Genome-wide analysis reveals rapid and dynamic changes in miRNA and siRNA sequence and expression during ovule and fiber development in allotetraploid cotton (Gossypium hirsutum L.). Genome Biol **10**:R122.

Parisod, C., A. Salmon, T. Zerjal, M. Tenaillon, M. A. Grandbastien, and M. Ainouche. 2009. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in Spartina. New Phytol **184**:1003-1015.

Paun, O., F. Forest, M. F. Fay, and M. W. Chase. 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. New Phytologist **182**:507-518.

Paux, E., D. Roger, E. Badaeva, G. Gay, M. Bernard, P. Sourdille, and C. Feuillet. 2006. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. Plant Journal **48**:463-474.

Paux, E., P. Sourdille, J. Salse, C. Saintenac, F. Choulet, P. Leroy, A. Korol, M. Michalak, S. Kianian, W. Spielmeyer, E. Lagudah, D. Somers, A. Kilian, M. Alaux, S. Vautrin, H. Berges, K. Eversole, R. Appels, J. Safar, H. Simkova, J. Dolezel, M. Bernard, and C. Feuillet. 2008. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. Science **322**:101-104.

Pavlopoulou, A., and S. Kossida. 2007. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: structure, function, and molecular evolution. Genomics **90**:530-541.

Penterman, J., R. Uzawa, and R. L. Fischer. 2007. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in Arabidopsis([lsqb]OA[rsqb]). Plant Physiol **145**:1549-1557.

Pires, J. C, J. Zhao, ME Schrantz, EJ Leon, PA Quijada, LN Lukens and TC. Osborn. 2004. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized Brassica polyploids (Brassicaceae). Biological Journal of the Linnean Society **82**:675-688.

Pontes, O., N. Neves, M. Silva, M. S. Lewis, A. Madlung, L. Comai, W. Viegas, and C. S. Pikaard. 2004. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid Arabidopsis suecica genome. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **101**:18240-18245.

Prieto, P., G. Moore, and S. Reader. 2005. Control of conformation changes associated with homologue recognition during meiosis. Theoretical and Applied Genetics **111**:505-510.

Pumphrey, M., J. Bai, D. Laudencia-Chingcuanco, O. Anderson, and B. S. Gill. 2009. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. Genetics **181**:1147-1157.

Qi, L., B. Echalier, S. Chao, G. Lazo, G. Butler, O. Anderson, E. Akhunov, J. Dvorak, A. Linkiewicz, and A. Ratnasiri. 2004. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. Genetics **168**:701 - 712.

Ragupathy, R., and S. Cloutier. 2008. Genome organisation and retrotransposon driven molecular evolution of the endosperm Hardness (Ha) locus in Triticum aestivum cv Glenlea. Molecular Genetics and Genomics **280**:467-481.

Ramsey, J., and D. W. Schemske. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics **29**:467-501.

Ramsey, J., and D. W. Schemske. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics **33**:589-639.

Rapp, R. A., J. A. Udall, and J. F. Wendel. 2009. Genomic expression dominance in allopolyploids. BMC Biology **7**:18.

Rapp, R. A., and J. F. Wendel. 2005. Epigenetics and plant evolution. New Phytol **168**:81-91.

Raskina, O., A. Belyayev, and E. Nevo. 2002. Repetitive DNas of wild emmer wheat (Triticum dicoccoides) and their relation to S-genome species: molecular cytogenetic analysis. Genome **45**:391-401.

Reinders, J., B. B. Wulff, M. Mirouze, A. Mari-Ordonez, M. Dapp, W. Rozhon, E. Bucher, G. Theiler, and J. Paszkowski. 2009. Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes. Genes Dev **23**:939-950.

Richards, E. J. 1997. DNA methylation and plant development. Trends Genet **13**:319-323.

Riddle, N. C., and J. A. Birchler. 2003. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. Trends Genet **19**:597-600.

Rieseberg, L. H., Chrystal, V.F.,Desrochers, A.M. 1995. Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization. Nature **375**:313-316.

Rieseberg, L. H., S. C. Kim, R. A. Randell, K. D. Whitney, B. L. Gross, C. Lexer, and K. Clay. 2007. Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers. Genetica **129**:149-165.

Riley, R., Kimber, G. 1961. Aneuploids and the cytogenetic structure of wheat varietal populations. Heredity **16**:275-290.

Riley, R., and V. Chapman. 1958. Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. Nature **182**:713-715.

Roudier, F., F. K. Teixeira, and V. Colot. 2009. Chromatin indexing in Arabidopsis: an epigenomic tale of tails and more. Trends Genet **25**:511-517.

Salmon, A., M. L. Ainouche, and J. F. Wendel. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in Spartina (Poaceae). Mol Ecol **14**:1163-1175.

Salse, J., M. Abrouk, S. Bolot, N. Guilhot, E. Courcelle, T. Faraut, R. Waugh, T. J. Close, J. Messing, and C. Feuillet. 2009. Reconstruction of monocotelydoneous proto-chromosomes reveals faster evolution in plants than in animals. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:14908-14913.

Salse, J., S. Bolot, M. Throude, V. Jouffe, B. Piegu, U. Masood Quraishi, T. Calcagno, R. Cooke, M. Delseny, and C. Feuillet. 2008a. Identification and Characterization of Shared Duplications between Rice and Wheat Provide New Insight into Grass Genome Evolution. Plant Cell.

Salse, J., V. Chague, S. Bolot, G. Magdelenat, C. Huneau, C. Pont, H. Belcram, A. Couloux, S. Gardais, A. Evrard, B. Segurens, M. Charles, C. Ravel, S. Samain, G. Charmet, N. Boudet, and B. Chalhoub. 2008b. New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: evolutionary relationships at the SPA genomic region with the S genome of the diploid relative Aegilops speltoides. BMC Genomics **9**:555.

Sanchez-Moran, E., E. Benavente, and J. Orellana. 2001. Analysis of karyotypic stability of homoeologous-pairing (ph) mutants in allopolyploid wheats. Chromosoma **110**:371-377.

Saze, H., and T. Kakutani. 2010. Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. Curr Opin Plant Biol.

Schlueter, J. A., P. Dixon, C. Granger, D. Grant, L. Clark, J. J. Doyle, and R. C. Shoemaker. 2004. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. Genome **47**:868-876.

Sears, E. R. 1954. The aneuploids of common wheat. Bulletin of the Missouri Agricultural Experimental Station **572**.

Sears, E. R. 1976. Genetic control of chromosome pairing in wheat. Annual Review of Genetics **10**:31-51.

Shaked, H., K. Kashkush, H. Ozkan, M. Feldman, and A. A. Levy. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. Plant Cell **13**:1749-1759.

Shcherban, A. B., E. D. Badaeva, A. V. Amosova, I. G. Adonina, and E. A. Salina. 2008. Genetic and epigenetic changes of rDNA in a synthetic allotetraploid, Aegilops sharonensis x Ae. umbellulata. Genome **51**:261-271.

Shitsukawa, N., C. Tahira, K. Kassai, C. Hirabayashi, T. Shimizu, S. Takumi, K. Mochida, K. Kawaura, Y. Ogihara, and K. Murai. 2007. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat. Plant Cell **19**:1723-1737.

Slotkin, R. K., and R. Martienssen. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nat Rev Genet **8**:272-285.

Slotkin, R. K., M. Vaughn, F. Borges, M. Tanurdzic, J. D. Becker, and J. A. Feijo. 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. Cell **136**:461-472.

Soltis, D. E., Soltis, P.S.,Pires, J.C.,Kovaria, A.,Tate, J.A.,Madrodiev, E. 2004. Recent and recurrent polyploidy in Tragopogon (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. Biological Journal of the Linnean Society **82**:485-501.

Soltis, D. E., V. A. Albert, J. Leebens-Mack, C. D. Bell, A. H. Paterson, C. F. Zheng, D. Sankoff, C. W. dePamphilis, P. K. Wall, and P. S. Soltis. 2009. Polyploidy and Angiosperm diversification. American Journal of Botany **96**:336-348.

Soltis, D. E., and P. S. Soltis. 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. Proc Natl Acad Sci U S A **92**:8089-8091.

Soltis, P. S., and D. E. Soltis. 2009. The role of hybridization in plant speciation. Annu Rev Plant Biol **60**:561-588.

Song, K., P. Lu, K. Tang, and T. C. Osborn. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **92**:7719-7723.

Stebbins, G. 1971. Chromosomal evolution in higher plants.

Stebbins, G. L. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.

Storlie, E. W., and L. E. Talbert. 1993. Cause of Tall Off-Types in a Semidwarf Spring Wheat. Crop Science **33**:1131-1135.

Szadkowski, E., F. Eber, V. Huteau, M. Lode, C. Huneau, H. Belcram, O. Coriton, M. J. Manzanares-Dauleux, R. Delourme, G. J. King, B. Chalhoub, E. Jenczewski, and A. M. Chevre. 2010. The first meiosis of resynthesized Brassica napus, a genome blender. New Phytol **186**:102-112.

Szwarcwort-Cohen, M., Z. Kasulin-Boneh, S. Sagee, and Y. Kassir. 2009. Human Cdk2 is a functional homolog of budding yeast Ime2, the meiosis-specific Cdk-like kinase. Cell Cycle **8**:647-654.

Taby, R., and J. P. Issa. 2010. Cancer Epigenetics. CA Cancer J Clin.

Tang, H., J. E. Bowers, X. Wang, and A. H. Paterson. 2010. Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:472-477.

Tang, H., X. Wang, J. E. Bowers, R. Ming, M. Alam, and A. H. Paterson. 2008. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. Genome Research **18**:1944-1954.

Tate, J. A., P. Joshi, K. A. Soltis, P. S. Soltis, and D. E. Soltis. 2009. On the road to diploidization? Homoeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid Tragopogon miscellus (Asteraceae). BMC Plant Biol **9**:80.

Teixeira, F., F. Heredia, A. Sarazin, F. Roudier, M. Boccara, C. Ciaudo, C. Cruaud, J. Poulain, M. Berdasco, M. Fraga, O. Voinnet, P Wincker, M Esteller ans V Colot. 2009. A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. Science **323**:1600 - 1604.

Teixeira, F. K., and V. Colot. 2009. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means. EMBO J **28**:997-998.

Teixeira, F. K., and V. Colot. 2010. Repeat elements and the Arabidopsis DNA methylation landscape. Heredity **105**:14-23.

Udall, J. A., P. A. Quijada, and T. C. Osborn. 2005. Detection of chromosomal rearrangements derived from homologous recombination in four mapping populations of Brassica napus L. Genetics **169**:967-979.

Van de Peer, Y., J. A. Fawcett, S. Proost, L. Sterck, and K. Vandepoele. 2009a. The flowering world: a tale of duplications. Trends in Plant Science **14**:680-688.

Van de Peer, Y., S. Maere, and A. Meyer. 2009b. OPINION The evolutionary significance of ancient genome duplications. Nature Reviews Genetics **10**:725-732.

Vedel, F., F. Quetier, Y. Cauderon, F. Drosba and G. Doussinault. 1981. Studies on maternal inheritance in polyploid wheat with cytoplasmic DNAs as genetic markers. Theoretical and Applied Genetics **59**:239-245.

Verhoeven, K. J., J. J. Jansen, P. J. van Dijk, and A. Biere. 2010. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. New Phytol **185**:1108-1118.

Vitte, C., and J. L. Bennetzen. 2006. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:17638-17643.

Vongs, A., T. Kakutani, R. A. Martienssen, and E. J. Richards. 1993. Arabidopsis-thaliana DNA methylation mutants. Science **260**:1926-1928.

Wan, L., H. Niu, B. Futcher, C. Zhang, K. M. Shokat, S. J. Boulton, and N. M. Hollingsworth. 2008. Cdc28-Clb5 (CDK-S) and Cdc7-Dbf4 (DDK) collaborate to initiate meiotic recombination in yeast. Genes Dev **22**:386-397.

Wang, J., L. Tian, H. S. Lee, and Z. J. Chen. 2006. Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in Arabidopsis allopolyploids. Genetics **173**:965-974.

Wassenegger, M., S. Heimes, L. Riedel, and H. L. Sanger. 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. Cell **76**:567-576.

Wendel, J. F., Doyle, J. 2005. polyploidy and evolution in plants. Journal Plant diversity and evolution genotypic and phenotypic variation in higher plants:97-118.

Wendel, J. F., A. Schnabel, and T. Seelanan. 1995. An unusual ribosomal DNA sequence from Gossypium gossypioides reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. Mol Phylogenet Evol **4**:298-313.

Wicker, T., F. Sabot, N. Hua Van, JL Bennetzen, P Capy, B Chalhoub, A Flavell, P Leroy, M Morgante, O Panaud, E Paux, P SanMiguel and AH. Schulman. 2007. A unified classification system of eukaryotic transposable elements. Nature Rev. Genet. **8**:973-982.

Wicker, T., R. Guyot, N. Yahiaoui, and B. Keller. 2003. CACTA transposons in Triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements. Plant Physiol **132**:52-63.

Wolfe, K. H., and D. C. Shields. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. Nature **387**:708-713.

Worland, A. J., and C. N. Law. 1985. Aneuploidy in semi dwarf wheat varieties. Euphytica **34**:317-327.

Xu, Y., L. Zhong, X. Wu, X. Fang, and J. Wang. 2009. Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized Brassica napus allopolyploids. Planta **229**:471-483.

Zhao, J., J. A. Udall, P. A. Quijada, C. R. Grau, J. Meng, and T. C. Osborn. 2006. Quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia sclerotiorum and its association with a homeologous non-reciprocal transposition in Brassica napus L. Theor Appl Genet **112**:509-516.

Zhu, J. K. 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. Annu Rev Genet **43**:143-166.

Annexes

Annexe I : Liste des figures

Figure 1. Formation de gamètes non réduits (2n) de type FDR, SDR et IMR. **11**

Figure 2. Formation de gamètes non réduits (2n) suite à une orientation parallèle des fibres du fuseaux chez les mutants atps1. **12**

Figure 3. Différentes voies de formation des allopolyploïdes : directe et indirecte. **13**

Figure 4. Occurrence des évènements de duplication du génome au cours de l'évolution des eucaryotes. **15**

Figure 5. Evolution du nombre de chromosomes au sein du genre *Arabidopsis*. **16**

Figure 6. Eléments transposables de classe I et de classe II observés dans le génome des Triticées. **17**

Figure 7. Fréquence, distribution et conservation de la méthylation de l'ADN dans différents contexte de séquences. **18**

Figure 8. Origine et types d'aneuploïdes. **23**

Figure 9. Les stades de la méiose chez l'espèce diploïde *A. thaliana* révélés par une coloration au DAPI. **26**

Figure 10. Représentation schématique de la structure du locus *Ph1* chez le blé. **29**

Figure 11. Modèle proposé pour le mode d'action du locus *Ph1*. **30**

Figure 12. Origine des espèces allopolyploïdes par évènements de polyploïdisation. **33**

Figure 13. Evolution de la structure des chromosomes du blé, du riz, du sorgho et du maïs. **34**

Figure 14. Appariement entre chromosomes homologues en métaphase I de la méiose chez un blé polyploïde possédant le locus *Ph1*. **36**

Figure 15. Représentation schématique des profils d'amplifications additifs et non additifs obtenus chez allopolyploïdes synthétiques. **44**

Figure 16. Schéma expérimental suivi pour étudier le comportement méiotique, l'aneuploïdie et les remaniements structuraux chez les allotétraploïdes sélectionnés. **56**

Figure 17. Appariements homéologues en métaphase I de la méiose, mis en évidence par GISH, chez les hybrides interspécifiques F1 dépourvus du locus *Ph1*. **61**

Figure 18. Appariement chromosomique en métaphase I de la méiose chez deux allotétraploïdes synthétiques présentant un comportement méiotique contrasté. **63**

Figure 19. Changements génétiques chez les allotétraploïdes synthétiques en génération S3 issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*. **67**

Figure 20. Remaniements chromosomiques identifiés par GISH chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S0 issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*. **69**

Figure 21. Remaniements chromosomiques identifiés par GISH chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S5 issus du croisement entre *T. urartu* et *Ae. tauschii*. **70**

Figure 22. Etablissement et maintenance de la méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*. **81**

Figure 23. Types d'analyses réalisées sur les générations S0, S1 et S2 des allohexaploïdes synthétiques étudiés (JOY36 et JOY54). **86**

Figure 24. Analyse de la méthylation de l'ADN en utilisant les isoschizomères *Hpa*II et *Msp*I. **87**

Figure 25. Identification des changements de l'état de méthylation au niveau d'un homéoallèle. **88**

Figure 26. Profils additifs et non additifs de la méthylation des cytosines chez les allohexaploïdes synthétiques. **92**

Figure 27. Variations intergénérationnelles de la méthylation de l'ADN chez les quatre lignées indépendantes des allohexaploïdes JOY36 et JOY54. **98**

Annexe II : Liste des tableaux

Tableau 1. Production, surface et rendement en céréales obtenus en France, en Europe et dans le Monde en 2008-2009. **32**

Tableau 2. Hybrides F1 interspécifique et allotétraploïdes synthétiques (hybrides doublés) obtenus par croisements entre différentes espèces de blé (*Triticum* et *Aegilops*). **59**

Tableau 3. Proportions des différents types d'appariements chromosomiques observés au stade métaphase I de la méiose chez différents hybrides interspécifiques F1. **60**

Tableau 4. Proportions des différents types d'appariements chromosomiques des allotétraploïdes synthétiques de génération S0 issus de croisements entre *T. urartu*, *Ae. searsii* et *Ae. taushii*. **62**

Tableau 5. Proportions des différents types d'appariements chromosomiques des allotétraploïdes synthétiques au cours des générations S3 à S5. **64**

Tableau 6. Nombre d'aneuploïdes chez les allotétraploïdes synthétiques de génération S4 à S6. **65**

Tableau 7. Synthèse des résultats d'amplification PCR observés chez les allotétraploïdes synthétiques (génération S3/S4) représentant diverses combinaisons des génomes A, D et S. **66**

Tableau 8. Taux de méthylation des résidus cytosines chez *T. turgidum* et *Ae. Taushii.* **90**

Tableau 9. Marqueurs monomorphes et polymorphes entre *T. turgidum* et *Ae. taushii* ssp. *strangulata* (Ats36) d'une part, entre *T. turgidum* et *Ae. taushii* ssp. *taushii* (Att54) d'autre part. **90**

Tableau 10. Profils additifs et non additifs observés pour les marqueurs monomorphes. **91**

Tableau 11. Nature de la jonction couverte par les marqueurs issus de TE montrant une amplification dans *T. turgidum* et *Ae. taushii*. **91**

Tableau 12. Profils additifs et non additifs observés pour les marqueurs PAP. **93**

Tableau 13. Profils additifs et non additifs de méthylation observés pour les marqueurs ASP dans les allohexaploïdes JOY36 et JOY54. **94**

Tableau 14. Profils additifs et non additifs de la méthylation chez les allohexaploïdes synthétiques. **95**

Tableau 15. Profils additifs (M=S) et non additifs (M ≠ S) et détail de la contribution des homéoallèles AB et D. **97**

Annexe III : Article

Genome wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids

Véronique Chagué, Jérémy Just, Imen Mestiri, Sandrine Balzergue, Anne-Marie Tanguy, Cecile Huneau,Virginie Huteau, Harry Belcram, Olivier Coriton, Joseph Jahier and Boulos Chalhoub

New Phytologist **(2010) 187 :1181-1194**

New Phytologist

Research

Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids

Véronique Chagué[1], Jérémy Just[1], Imen Mestiri[1], Sandrine Balzergue[1], Anne-Marie Tanguy[2], Cecile Huneau[1], Virginie Huteau[2], Harry Belcram[1], Olivier Coriton[2], Joseph Jahier[2] and Boulos Chalhoub[1]

[1]Organization and Evolution of Plant Genomes (OEPG), Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV), UMR INRA 1165 – CNRS 8114 – UEVE, F–91057 Evry Cedex, France; [2]Unité Mixte de Recherches INRA – Agrocampus Rennes, Amélioration des Plantes & Biotechnologies Végétales, F–35653 Le Rheu, France

Author for correspondence:
Boulos Chalhoub
Tel: +33 1 60874503
Email: chalhoub@evry.inra.fr

Received: *18 January 2010*
Accepted: *30 April 2010*

New Phytologist (2010) **187**: 1181–1194
doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03339.x

Key words: additive and nonadditive gene expression regulation, microarray, transgenerational stability, wheat.

Summary

- The present study aims to understand regulation of gene expression in synthetic and natural wheat (*Triticum aestivum*) allohexaploids, that combines the AB genome of *Triticum turgidum* and the D genome of *Aegilops tauschii*; and which we have recently characterized as genetically stable.
- We conducted a comprehensive genome-wide analysis of gene expression that allowed characterization of the effect of variability of the D genome progenitor, the intergenerational stability as well as the comparison with natural wheat allohexaploid. We used the Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array, on which 55 049 transcripts are represented.
- Additive expression was shown to represent the majority of expression regulation in the synthetic allohexaploids, where expression for more than *c*. 93% of transcripts was equal to the mid-parent value measured from a mixture of parental RNA. This leaves *c*. 2000 (*c*. 7%) transcripts, in which expression was nonadditive. No global gene expression bias or dominance towards any of the progenitor genomes was observed whereas high intergenerational stability and low effect of the D genome progenitor variability were revealed.
- Our study suggests that gene expression regulation in wheat allohexaploids is established early upon allohexaploidization and highly conserved over generations, as demonstrated by the high similarity of expression with natural wheat allohexaploids.

Introduction

Polyploidy, or the occurrence of more than two sets of chromosomes in one single nucleus, is a widespread and an important process of angiosperm evolution, where repeated polyploidization have been revealed in many species (Adams & Wendel, 2005a; Tang *et al.*, 2008; Soltis *et al.*, 2009; Van de Peer *et al.*, 2009). Autopolyploids combine multiple sets of the same or similar genomes in their nucleus, whereas allopolyploids contain two or more divergent homoeologous genomes, united by interspecific or intergeneric hybridization, followed by chromosome doubling. In plants, it has been found that allopolyploids undergo changes at the genetic level (Song *et al.*, 1995; Ozkan *et al.*, 2001; Rieseberg, 2001; Shaked *et al.*, 2001; Gaeta *et al.*, 2007) as well as at the gene expression and/or epigenetic levels (Kashkush *et al.*, 2003; Adams & Wendel, 2005b; Wang *et al.*, 2006; Flagel *et al.*, 2008; Hovav *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009), providing the potential for novelty and plasticity of the polyploid genomes (Comai, 2005; Chen, 2007; Leitch & Leitch, 2008; Soltis *et al.*, 2009). The extent and the 'timing' of these changes depend on the allopolyploid analysed but natural allopolyploids rarely correspond to a simple addition of progenitor genomes (Comai, 2005; Chen, 2007; Leitch & Leitch, 2008; Soltis *et al.*, 2009).

Wheat species (genera *Triticum* and *Aegilops*) in particular have evolved through frequent allopolyploidizations. Durum or pasta allotetraploid wheat *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB), was formed < 0.5 million yr ago (Feldman *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002) while the widely cultivated allohexaploid wheat *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD), also known as common or bread wheat, was formed more recently (7000–

© The Authors (2010)
[Correction added after first online publication on 6 August 2010: the copyright line was corrected from 'no claim to original US government works' to '© The Authors (2010)'.]
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

12 000 yr ago) (Kihara, 1944; McFadden & Sears, 1946; Feldman *et al.*, 1995; Nesbitt & Samuel, 1996). Concomitantly with the first allotetraploidization event, the *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) locus evolved. This locus enhances the exclusive pairing of homologous bivalents at metaphase I of meiosis and constitutes the main stabilizing factor of these wheat polyploids (Riley & Chapman, 1958; Griffiths *et al.*, 2006). While the relatively stable natural wheat allotetraploid *T. turgidum* cannot be resynthesized because the diploid progenitor of the B genome is unidentified, the natural wheat allohexaploid can be resynthesized as the progenitors of its AB genome (*T. turgidum*) as well as the D one (*Aegilops tauschii*) are available (Shaked *et al.*, 2001; He *et al.*, 2003; Mestiri *et al.*, 2010). Little is yet known about genetic changes and the regulation of gene expression in the wheat allopolyploids carrying the *Ph1* locus. In a recent study (Mestiri *et al.*, 2010), we showed that except for variation in homologous pairing, leading to chromosome instability and aneuploidy, no DNA sequence elimination or other rearrangements are observed when analysing euploid plants of newly synthesized allohexaploids.

Characterization of changes in gene expression in different allopolyploids has shown that many genes behave according to an additive model, whereby gene expression is a combination of expression patterns in the parents. However, some genes deviate from this model and novel patterns of expression (nonadditive) are observed. This is the situation with 5.2–5.6% of genes in *Arabidopsis* synthetic allotetraploids (Wang *et al.*, 2006), 1–6.1% in cotton (Adams *et al.*, 2004; Rapp *et al.*, 2009) and *c.* 5% in *Senecio* (Hegarty *et al.*, 2005). Regulation of gene expression in wheat allohexaploids has been the subject of only a few investigations. He *et al.* (2003) described, using cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP), that 7.7% of transcripts in a wheat synthetic allohexaploid showed profiles that were different from those of its progenitors. More recently, Pumphrey *et al.* (2009) reported that expression of *c.* 15% of 825 genes, 78% of which were differentially expressed between AB and D genome progenitors, were nonadditively expressed.

In *Arabidopsis* allopolyploids a biased repression was observed for nonadditively expressed genes that were also upregulated in one progenitor (compared with the other). In cotton, a phenomenon of 'gene expression dominance' was suggested where one parental genome contributes more to the expression in the allopolyploid than the other (Rapp *et al.*, 2009). Interestingly, reciprocal silencing, translational bias and expression divergences of homoeologous alleles were shown to occur frequently in the cotton natural and synthetic allopolyploids (Hovav *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2009).

The present study aimed to analyse gene expression regulation in wheat synthetic allohexaploids that were recently characterized as genetically stable (Mestiri *et al.*, 2010). We used the available Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array (http://www.affymetrix.com/) on which 55 049 different wheat transcripts are represented, allowing a genome-wide analysis of the wheat transcriptome. We report here a comprehensive analysis on: intra- and intergenerational variation and stability of additive and nonadditive changes in gene expression that follow the allohexaploid formation; the effect of variability of the D genome progenitor; as well as comparison with gene expression in the natural wheat allohexaploid.

Materials and Methods

Synthetic allohexaploids and growth conditions

Various wheat allohexaploids were obtained by interspecific hybridization between different genotypes of the tetraploids *T. turgidum* and several accessions of *A. tauschii*, followed by spontaneous chromosome doubling (Mestiri *et al.*, 2010). These were characterized as exhibiting different levels of meiotic stability and aneuploidy but no sequence elimination or rearrangements were seen (Mestiri *et al.*, 2010). For analysis of transcriptome changes, we chose in this study the allohexaploids JOY36 and JOY54 having *T. turgidum* spp. *durum* cv Joyau as AB genome donor and as D genome donors, *Ae. tauschii* spp. *stangulata* accession 36 (AtsD36) and *Ae. tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) respectively (Mestiri *et al.*, 2010). We compared the first-selfed (S_0) and second (S_1) generations of JOY54, and the first generation (S_0) of JOY36.

The same euploid plants characterized by Mestiri *et al.* (2010) as not displaying structural changes, were analysed for gene expression regulation compared with their progenitors as well as with mid-parent values (MPV).

All plants of progenitors and synthetic allohexaploids as well as the natural wheat allohexaploid (*T. aestivum*) cv Courtot were grown in growth chambers at 22°C and 16 h daylength.

RNA isolation

Shoot samples were harvested at 35 d old (fifth-leaf stage), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C. RNA was extracted from 200 mg starting material by using the Plant RNeasy Mini Kit with on-column DNAse digestion (Qiagen). All RNA samples were checked for their integrity on the Agilent 2100 Bioanalyzer according to the Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) specifications.

Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array hybridization

We used the available Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array, on which 55 049 transcripts are represented by probesets.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Total RNA extraction, reverse transcription, synthesis of the double-stranded cDNA, *in vitro* transcription of cRNA, labelling and hybridization on the Affymetrix GeneChip Wheat microarray were done using standard protocols as described by Krugman *et al.* (2010). Microarrays were scanned with the GeneChip Scanner 3000 7G piloted by the GeneChip Operating Software (GCOS). All these steps were performed on Affymetrix platform at URGV laboratory, Evry, France.

Gene expression was measured in two sister plants of each of the genotypes analysed: *T. turgidum* spp. *durum* cv Joyau, AttD54, AtsD36, the S_0 and S_1 generations of JOY54, the S_0 generation of JOY36 and the natural allohexaploid cv Courtot as well as an *in vitro* mixture of equal amounts of RNAs from progenitors in order to measure the MPVs, as described by Wang *et al.* (2006). This resulted in 18 samples that were hybridized and analysed.

Normalization of expression data

The raw '.CEL' files were imported into the R software (R Development Core Team, 2010) for data analysis. The 18 arrays were altogether normalized with gcRMA (Irizarry *et al.*, 2003), available in the BIOCONDUCTOR package. All raw and normalized data are available from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), accession number GSE20169 (Barrett *et al.*, 2005).

To build reference datasets for comparisons between the different genotypes, transcripts were considered as expressed (detected) in a given genotype when values of hybridization intensity (I), expressed as log-ratio after normalization, were higher than '3' ($I > 3$), the Affymetrix detection cut-off, in both biological replicates. If one or both replicates were inferior or equal to '3' ($I \leq 3$), the transcript was considered as 'not detected'. The Supporting Information, Table S1, indicates overall number of expressed and unexpressed transcripts for all genotypes and replicates analysed in the present study.

Analysis of variance, comparison between genotype pairs and classification of expressed genes

To evaluate intragenerational variations and consider biological replicates, we performed primary ANOVA using the R software with the normalized intensity values as explained in Notes S1 and Fig. S1, where the intragenerational effect (R_j) was not significant. We considered for further statistical comparisons the two sister plants of a same generation as two biological replicates representing the generation.

After this primary analysis of variance and biological repeat consideration, we conducted further overall comparison between genotype pairs and classified differentially expressed genes using the VarMixt model (Delmar *et al.*, 2005). Instead of the too-stringent homoscedastic assumption of a common variance, leading to an overestimation of differentially expressed genes, or the overparameterized assumption of a specific variance for each gene (per gene variance), leading to an underestimate of differentially expressed genes, the VarMixt model relies on identifying groups of genes having homogeneous variance (Delmar *et al.*, 2005). The variance of each group of genes is then estimated and used, instead of a common or a per gene variance, and a statistical test is applied to identify differentially expressed genes (Delmar *et al.*, 2005). The raw P-values obtained were adjusted for multiple testing effects by the method proposed by Benjamini & Yekutieli (2001) which controls the false discovery rate (FDR). A gene was declared differentially expressed between two conditions if the adjusted P-value is < 5%. To illustrate, Table S2 showed that the assumption of a common variance (homoscedastic) was rejected for several of the pairs of compared genotypes, highlighting its inadequacy. Only the VarMixt model was used for different comparisons in the present study.

Results

Mid-parent value estimations and considerations

In our wheat allohexaploid model, there are theoretically two genomes contributed by the AB genome progenitor (*T. turgidum*) and only one genome for the D genome progenitor (*A. tauschii*). Determination of the ratio of AB to D genomes for MPV estimation is a challenge, because of the unbalanced genome composition. Nevertheless, genome-wide comparisons of the progenitor transcriptomes showed that expression level of the majority of the transcripts (*c.* 83%) was similar in the AB and the D genome progenitor (P-values > 0.05) (Fig. S2). For the remaining *c.* 17%, there are roughly equal numbers of transcripts that were more or less expressed in each of the progenitors when compared with the other (Fig. S2). These a priori considerations showed no apparent expression bias towards any of the progenitor and favoured AB to D genome ratio as 1 : 1 for MPV determination.

In our study, MPVs were measured by hybridizing on the microarray a mixture of RNAs composed of equal amounts from each of the progenitors, as described by Wang *et al.* (2006) and Gaeta *et al.* (2009). In other studies, MPVs were not directly measured on microarray but rather *in silico* calculated by averaging expression values observed in progenitors (Pumphrey *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009). To compare both methods and choose the most appropriate one, we modelled the measured MPV as:

$$\mathrm{MPV}_{kj_{\mathrm{AB}}j_{\mathrm{D}}} = \mu + \frac{1}{2}(\mathrm{AB}_{kj_{\mathrm{AB}}} + \mathrm{D}_{kj_{\mathrm{D}}}) + (\mathrm{AB} \times \mathrm{D})_{kj_{\mathrm{AB}}j_{\mathrm{D}}} + \varepsilon_{kj_{\mathrm{AB}}j_{\mathrm{D}}}$$

where $\mathrm{MPV}_{kj_{AB}j_{D}}$ represents the MPV measured by hybridization of mixture of progenitor RNA; μ is the overall mean

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

effect; $AB_{kj_{AB}}$ is the normalized hybridization intensity for the AB genome progenitor in repetition j_{AB} for probeset k; D_{kj_D} is the normalized hybridization intensity for the D genome progenitor in repetition j_D for probeset k; $\frac{1}{2}(AB_{kj_{AB}} + D_{kj_D})$ is the *in silico* calculated MPV; $(AB \times D)_{kj_{AB}j_D}$ is the interaction between the AB and D genomes homoeoalleles, for the probeset k; $\varepsilon_{kj_{AB}j_D}$ is the error term.

Thus, in case of no probeset effect or no interaction between progenitor homoeoalleles, the measured MPV might be equal to the *in silico* value, corresponding to the average of progenitor expression $\frac{1}{2}(AB_{kj_{AB}} + D_{kj_D})$, meaning that there is no technical bias. According to the analysis, the *in silico* calculated MPV $\frac{1}{2}(AB_{kj_{AB}} + D_{kj_D})$ accounted for 89.67% and 91.57%, of total measured MPV variance of JOY54 and JOY36, respectively ($P < 2.2 \times 10^{-16}$); while the bias due to interaction between the AB and D genome homoeoalleles, $(AB \times D)_{kj_{AB}j_D}$, accounted for 10.25% and 8.33% of total variance ($P < 2.2e^{-16}$). This bias cannot be neglected and we thus used the MPV that had been measured by hybridization of mixture of progenitor RNAs as a more appropriate control for the additivity hypothesis.

Analysis of S_0 generation of the synthetic allohexaploid JOY54 revealed a majority of additively expressed genes

Transcripts differentially expressed between AB and D genome progenitors of JOY54 represent 16.9% (5084) of the total expressed 30 011 transcripts (Table 1). Among these, 57% were more expressed in the AB genome progenitor and 43% in the D one (Table 1).

Transcript expression in the S_0 generation of the synthetic allohexaploid JOY54 (JOY54_S_0) were first classified as additive ($P > 5\%$) or nonadditive ($P \leq 5\%$), depending on statistical comparison with MPV (Table 1). Nonadditively expressed transcripts were further considered as either 'over-expressed' if their expression in the synthetic allohexaploid was higher than MPV (> MPV, P-values ≤ 5%); or 'under-expressed' if the expression was lower than MPV (< MPV, P-values ≤ 5%). Cross-comparison with classification based on differential expression, or not, between AB and D genome progenitors led to nine major expression categories (Table 1, designated a–i).

Additively expressed transcripts

Additive expression in JOY54_S_0 occurred for 93.4% of transcripts (28 034 out of 30 011) (Table 1, expression categories a, b and c).

The majority of the 24 927 transcripts that were equally expressed in progenitors were also additively expressed in the S_0 generation (23 792, corresponding to 95.5%) (Table 1, expression category a).

Similarly, 4242 transcripts out of those 5084 that were differentially expressed between progenitors of JOY54 were also additively expressed in JOY54_S_0 (Table 1, expression categories b and c). This represents an overall proportion of 83.4%, which is a slightly lower value than that of 95.5% found for expression category a ($P < 2.2 \times 10^{-16}$).

Nonadditively expressed transcripts

JOY54_S_0 exhibited 1977 nonadditively expressed transcripts, whose expression values were significantly different ($P < 5\%$) from the MPV (Table 1, expression categories d–i). These transcripts correspond to 6.6% of the 30 011 total detected transcripts.

A total of 1135 transcripts, representing 57.2%, of nonadditively expressed transcripts in the S_0 generation, were equally expressed in AB and D genome progenitors (Table 1, expression categories d and g). There was a higher proportion of under-expressed transcripts (S_0 < MPVs) than over-expressed transcripts (S_0 > MPVs, 677/458) (Table 1, expression categories: d vs g).

Table 1 Differences in gene expression between progenitors: additive and nonadditive expression observed in the generation S_0 of the wheat synthetic allohexaploid JOY54, having the *Triticum turgidum* spp. *durum* cv Joyau as AB genome progenitor and the *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) as D genome progenitor

		Relationship between progenitors		
Comparison of synthetic allohexaploids to MPV	Total[a]	AB = AttD54	AB > AttD54	AB < AttD54
Comparison between progenitors	30 011	24 927	2883	2201
Expression in JOY54, generation S_0				
Additively expressed transcripts (S_0 = MPV) ($P > 5\%$)	28 034	23 792 (a)[b]	2447 (b)	1795 (c)
Nonadditively expressed transcripts ($P \leq 5\%$)				
Upregulated (S_0 > MPV)	795	458 (d)	120 (e)	217 (f)
Downregulated (S_0 < MPV)	1182	677 (g)	316 (h)	189 (i)

[a]Data set composed of transcripts detected in at least one of the AB genome progenitor, D genome progenitor, S_0 generation and/or S_1 generation.
[b]Letters (a–i) designate expression categories.
MPV, mid-parent value.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

The remaining 42.8% (846) of nonadditively expressed transcripts were also differentially expressed between the two progenitors (Table 1, expression categories e, f, h and i). Of these, the 436 transcripts that were expressed more in the AB genome progenitor than in the D progenitor, showed in JOY54_S_0 a higher proportion of under-expression (S_0 < MPV) (Table 1, expression category e: 316 transcripts) than over-expression (S_0 > MPV) (Table 1, expression category h: 120). By contrast, the remaining 405 transcripts, that were less expressed in the AB genome progenitor than in the D one progenitor, showed nearly similar proportions of under-expressed transcripts in JOY54_S_0 (Table 1, expression category f: 189) and over-expressed transcripts (Table 1, expression category i: 217).

Comparison of gene expression levels between the S_0 generation of JOY54 and its progenitors

We further compared expression levels between JOY54_S_0 and its progenitors. As statistical comparisons were done between pairs of genotypes (see Materials and Methods), we selected 19 expression patterns that could be predicted from all three ways of paired comparison (i.e. the AB genome progenitor vs the D progenitor; and each progenitor compared with JOY54_S_0). Comparisons, based on statistical confidence intervals (Fig. 1A), revealed seven major expression patterns (Fig. 1A, I–VII) for expression categories a, d and g (Fig. 1B), where expression was equal in both progenitors (AB = D); six patterns (Fig. 1A, VIII–XIII) for expression categories c, e and h (Fig. 1B), where expression in the AB genome progenitor was higher than that of D progenitor (AB > D); and finally, six other patterns (Fig. 1A, XIV–XIX) for the reverse situation (AB < D) of expression categories c, f and i (Fig. 1B).

All genes from the nine expression categories (Fig. 1B, expression categories a–i) were thus dissected according to the 19 expression patterns, revealed from comparison of expression levels between JOY54_S_0 and those of its progenitors (Fig. 1A). The main observations and trends are:

- Expression levels of only a few genes, 10 nonadditively and under-expressed transcripts (S_0 < MPV), were lower than those of both progenitors (Fig. 1Bg, pattern II, Fig. 1Bh, pattern X). Similarly, expression levels of a few other transcripts, 84 nonadditively and over-expressed transcripts (S_0 > MPV), were higher than those of both progenitors (Fig. 1Bd, pattern I, 1Be, pattern IX, 1Bf, pattern XV).
- Expression levels of the majority of transcripts in the S_0 generation of JOY54 were equal to those of both progenitors (Fig. 1B, patterns VII, XI, XVII) or those of one of them (Fig. 1B, patterns III, IV, V, VI, XII, XIII, XVIII, XIX), irrespective of whether genes are additively or nonadditively expressed in comparison with MPV.
- For transcripts that were expressed in the AB genome progenitor than in the D progenitor and additively expressed in JOY54_S_0 (Fig. 1Bb) a biased detection towards the AB genome progenitor was revealed. There were 22 times more transcripts (1386) for which expression values in JOY54_S_0 were equal to those of the AB genome progenitor and higher than those of the D progenitor (Fig. 1Bb, pattern XII) than the reverse expression pattern (Fig. 1Bb, pattern XIII, only 64 transcripts). Conversely, for transcripts that were expressed in the AB genome progenitor than in the D progenitor and additively expressed in JOY54_S_0 (Fig. 1Bc), a nearly similar number of transcripts showed expression values that were equal to those of AB genome progenitor and lower than those of the D genome progenitor (Fig. 1Bc, pattern XIX: 378) or the reverse expression pattern (Fig. 1Bc, pattern XVIII: 356).

In order to allow careful comparisons and interpretation of the observed biased detection, we plotted all expression values, measured in JOY54_S_0, the MPV and the two progenitors, for all genes from expression patterns XII, XIII, XVIII and XIX (Fig. 2). These four patterns correspond to all cases where expression levels were different between the progenitors whereas in JOY54_S_0 they were equal to those of one progenitor and different from the other (Fig. 2A). We noted that when expression is additive in JOY54_S_0 (=MPV), biased detection towards one of the progenitors was also observed for the MPV (Fig. 2Bb, Bc, patterns XII, XIII, XVIII and XIX). This is particularly the case for all 1386 transcripts that showed 22 times more biased detection of expression toward the AB genome progenitor (Fig. 2Bb, Pattern XII) than towards the D progenitor (Fig. 2Bb, pattern XIII, 64 genes only). Conversely, the majority of genes that were nonadditively expressed in JOY54_S_0 (> or < MPV) showed for their MPV intermediate hybridization values whereas those of other few ones were biased towards one of the progenitors (Fig. 2Be, Bf, Bh, Bi, patterns XII, XIII, XVIII and XIX).

Comparison with S_1 generation reveals a high intergenerational stability of gene expression

Direct comparison showed no significant differences in gene expression between S_0 and S_1 generations of the synthetic allohexaploid JOY54 (P > 5%), indicating a high conservation of gene expression across the two generations.

The high intergenerational stability was also confirmed when we compared sets of additively and nonadditively expressed transcripts revealed from separate comparisons of S_0 and S_1 generations to MPV (Fig. 3).

A large proportion of additively expressed transcripts were common to both generations (Fig. 3). This includes 22 550 transcripts (representing 95.9%) that were equally expressed and 3769 ones (representing 91%) that were differentially expressed between progenitors (Fig. 3).

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

New Phytologist

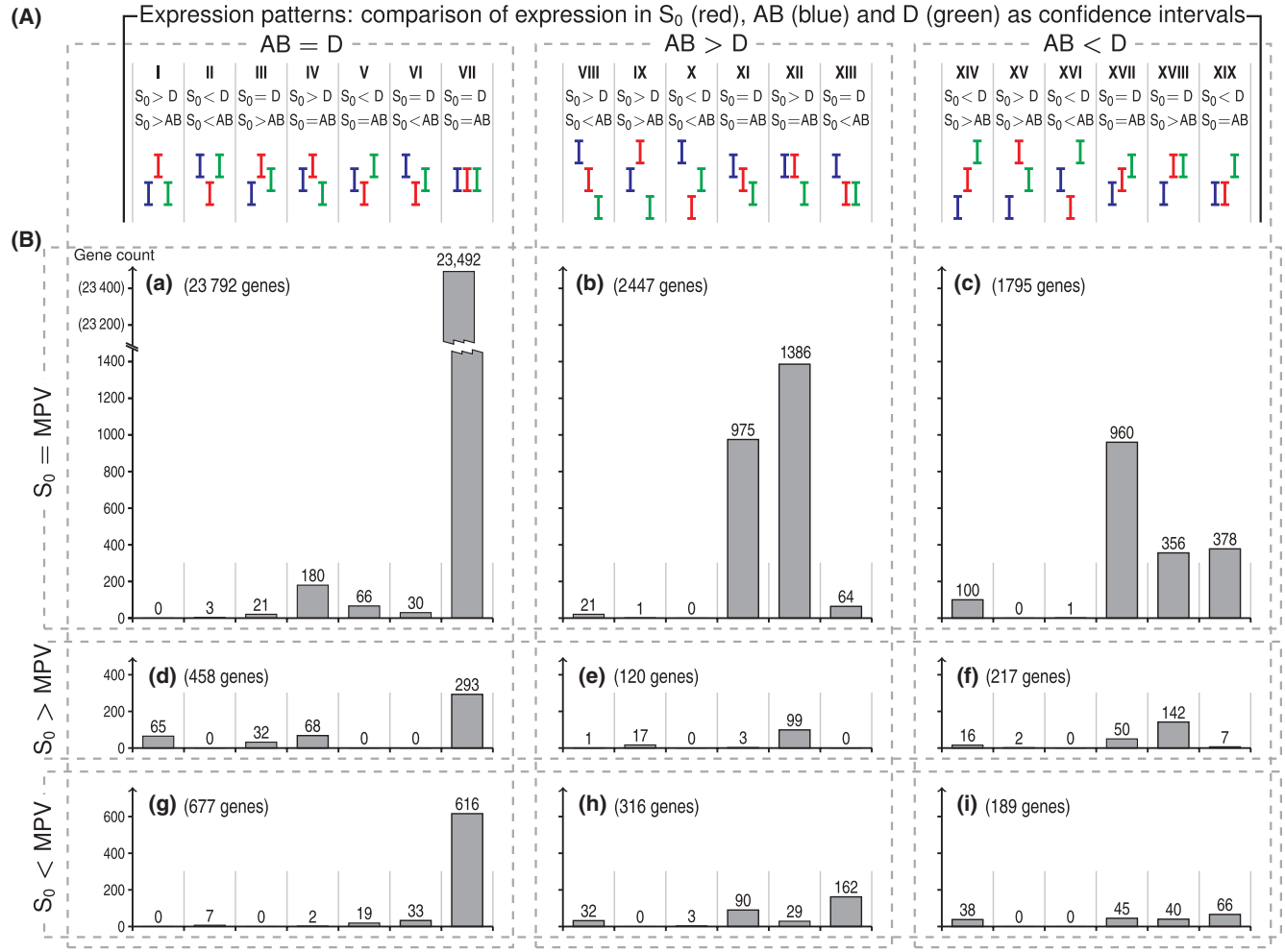

Fig. 1 Expression patterns revealed when comparing the S_0 generation of the synthetic allopolyploid JOY54 and its progenitors and dissection of the nine expression categories (see Table 1) accordingly. (A) Schematic presentation of comparisons between the three genotypes, leading to 19 possible expression patterns (I–XIX). Blue bars depict the confidence intervals of the expression level observed in the AB genome progenitor (*Triticum turgidum* spp. *durum* cv Joyau), green bars depict those of the D genome progenitor (*Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54) and red bars depict those of the S_0 generation (JOY54_S_0). Expression is differential between two genotypes when their confidence intervals (bars) do not overlap whereas it is equal when they do overlap. (B) Dissection of nine expression categories (a–i) of S_0 generation of JOY54, revealed by comparison with mid-parent values (MPV) as well as between both progenitors (see Table 1), into the 19 expression categories depicted in (A). The *y* axis represents gene count. The *x* axis represents expression patterns depicted in (A): seven patterns (I–VII) for expression categories, a, d and g, the gene expression of all of which was equivalent in both progenitors (AB = D), six patterns (VIII–XIII) for expression categories b, e and h, where gene expression in the AB genome progenitor was higher than that of D progenitor (AB > D) and six others (XIV–XIX) for the reverse (AB < D) of expression categories c, f and i. The number of genes for each expression pattern in each of the expression categories is indicated to help comparisons.

However, 269 and 640 nonadditively expressed transcripts were similarly over-expressed and under-expressed (compared with MPV) in both generations (Fig. 3). These 909 transcripts correspond to 46.1% and 34.5% of the total nonadditively detected probes in the S_0 and S_1 generations, respectively (Fig. 3). About half of them (474, i.e. 50.3%) were differentially expressed between the two progenitors (Fig. 3).

Because the comparison with MPV was done separately for each of the generations, 1083 (representing 53.9%) and 1720 (representing 65.5%) nonadditively expressed transcripts were specific to the S_0 and S_1 generations, respectively (Fig. 3). Importantly, none of these transcripts, except five and one, was over-expressed (> MPV) in one generation and under-expressed (< MPV) in the other (Fig. 3). Typically, transcripts showed intermediate expression levels that were not statistically different from MPVs or from the other generation (data not shown).

Comparison of gene expression changes between JOY54 and JOY36 synthetic allohexaploids

We analysed transcriptome changes in the S_0 generation of the synthetic allohexaploid JOY36 (JOY36_S_0) and compared them with those revealed in the allohexaploid JOY54 (already described). Both synthetic allohexaploids share the same tetraploid AB genome progenitor (*T. turgidum* spp.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

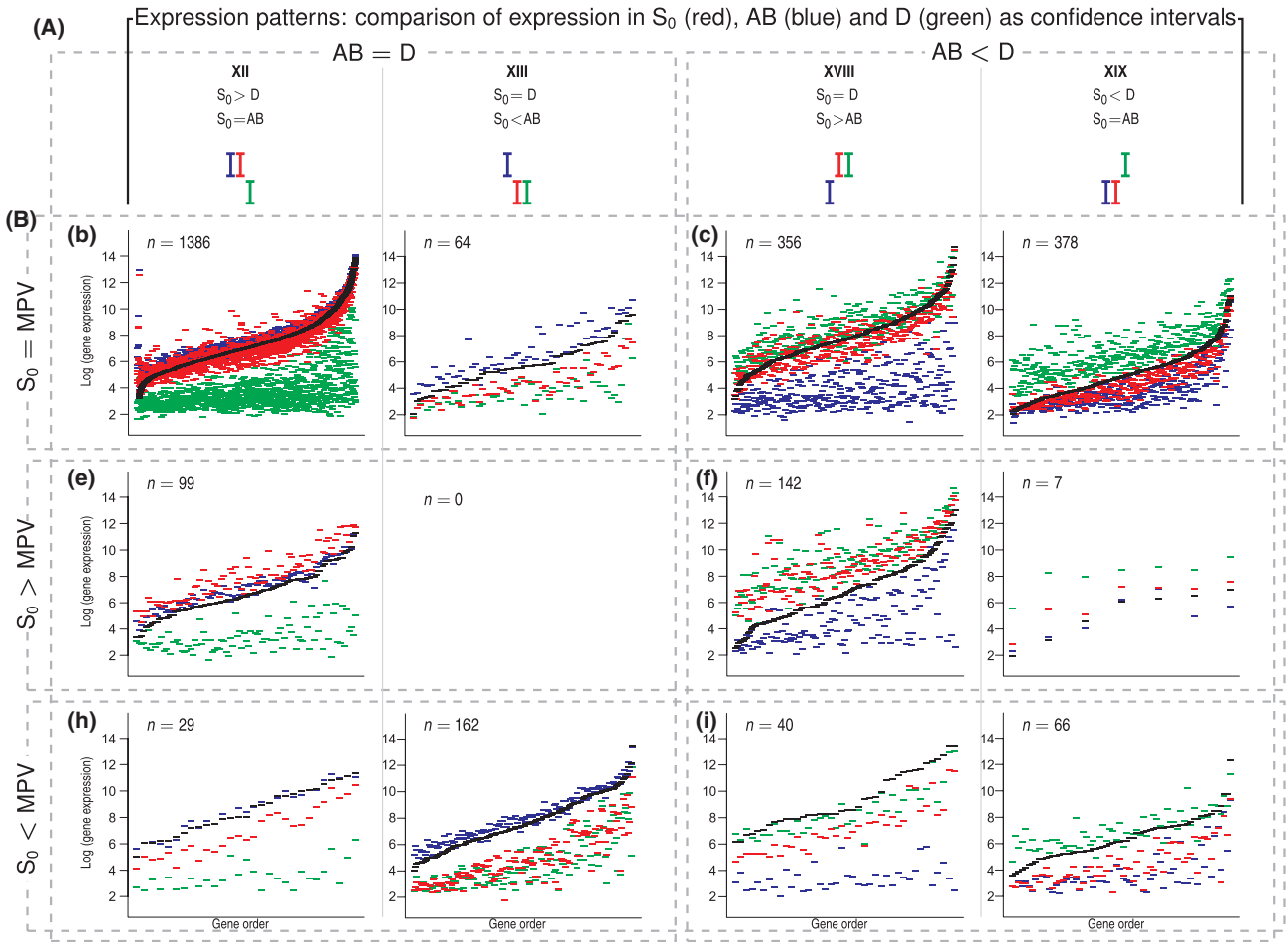

Fig. 2 Comparison of hybridization intensity values, obtained for each transcript of four selected expression patterns (A), between the S_0 generation, the mid-parent values (MPV) and that of two progenitors of the synthetic allohexaploid JOY54 (B). (A) Schematic presentation of the four expression patterns, corresponding to cases where expression levels were different between the progenitors whereas they were equal in the S_0 generation of JOY54 to those of one progenitor and different from the other one (same schematic representation and legend as in Fig. 1A). AB genome progenitor: *Triticum turgidum* spp. *durum* cv Joyau; D genome progenitor: *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54. (B) Hybridization intensity values, presented as log-ratio of normalized data, (*y* axis), observed for each transcript of the four expression patterns and the different expression categories (same expression category designation and legend as in Fig. 1B) in the S_0 generation of JOY54, MPV AB and D genome progenitors. Blue, AB genome progenitor; green, D genome progenitor; red, JOY54_S_0; black, MPV. Transcripts were orders on the *x*-axis according to increasing hybridization intensities of their MPV.

durum cv Joyau) but another genotype (accession) of *A. tauschii* (AtsD36) is the D genome progenitor of JOY36.

Gene expression changes in the S_0 generation of JOY36

Transcripts differentially expressed between AB and D genome progenitors of the allohexaploid JOY36 represent 17.3% (5194) of the 29 923 transcripts expressed in at least one of the progenitors or the S_0 generation (Table 2).

Additive expression was also the dominant gene expression pattern observed in JOY36_S_0 (93%) (Table 2). JOY36_S_0 displayed 2104 nonadditively expressed transcripts, which correspond to 7% of the 29 923 transcripts detected (Table 2). Among these, a total of 1202 nonadditively expressed transcripts (57%), were equally expressed in AB and D genome progenitors, whereas the remaining were differentially expressed (Table 2). For nonadditively expressed transcripts, there were similar proportions of under-expression or over-expression, but a tendency for under-expression was observed for those transcripts which were expressed more in the D genome progenitor (Table 2).

Direct comparison of gene expression between both allohexaploids and their respective progenitors

Comparison revealed that 3647 transcripts, differentially expressed between progenitors of JOY36 and JOY54, were shared and exhibited similar patterns of differential expression in both couples of AB and D genome progenitors (Table 2, 71%). This left 1547 and 1437 transcripts that were

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

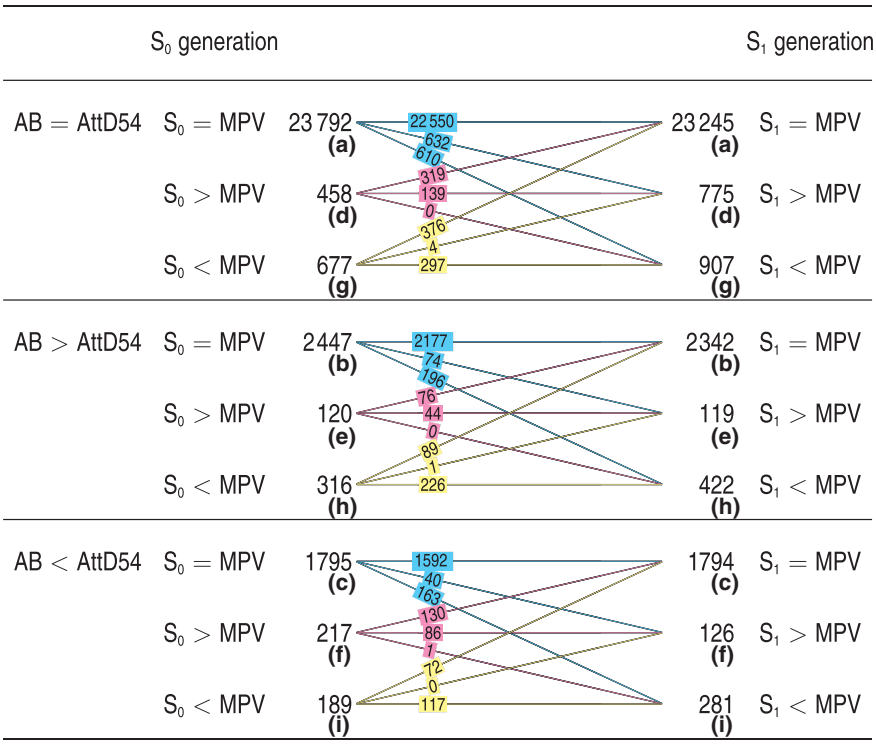

Fig. 3 Comparison of sets of additively and nonadditively expressed transcripts revealed in the S_0 and S_1 generations of the synthetic allohexaploid JOY54. Results are also detailed according to comparison of expression levels between the AB and D genome progenitors as well as with mid-parent values (MPV). The nine expressional categories (a–i) are also indicated (as in Tables 1 and 2, Fig. 1). Numbers of genes shared by the different expression categories of the S_0 and S_1 generations are indicated on the cross-lines. AB genome progenitor, *Triticum turgidum* cv Joyau; D genome progenitor, *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54).

Table 2 Comparison of gene expression between progenitors of the synthetic allohexaploids JOY54 and JOY36 having the *Triticum turgidum* spp. *durum* cv Joyau as AB genome progenitor for both and as D genome progenitors, *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) and *A. tauschii* spp. *strangulata* accession 36 (AtsD36), respectively

		Relationship between progenitors		
Condition	Total[a]	AB = D	AB > D	AB < D
Gene expression in S_0 generation of JOY36 (JOY36_S_0)				
Additively expressed transcripts (JOY36_S_0 = MPV) (P > 5%)	27 819	23 527 (a)[b]	2463 (b)	1829 (c)
Non-additively expressed transcripts (P-value ≤ 5%)				
Upregulated (JOY36_S_0 > MPV)	1188	832 (d)	298 (e)	58 (f)
Downregulated (JOY36_S_0 < MPV)	916	370 (g)	251 (h)	295 (i)
Total JOY36 (AB vs AtsD36)	29 923	24 729	3012	2182
Intersection of (AB vs Att54) and (AB vs Ats36)	*28 613*	*22 272*	*2266*	*1381*
JOY54 (AB vs AttD54)	30 011	24 927	2883	2201

[a]Data set composed of transcripts detected in at least one of the AB genome progenitor, D genome progenitor (AttD54), S_0 generation and/or S_1 generation for JOY54.
[b]Expression categories designation (a–i). Numbers in italics correspond to genes that are common to JOY36 and JOY54 transcript sets.
MPV, mid-parent value.

specifically differentially expressed between progenitors of JOY36 and JOY54, respectively. These cover a large proportion of those 395 transcripts that were differentially expressed between both D genome progenitors (Table 3). The remainder includes those transcripts differentially expressed in one of the progenitors, but expression in the second D genome progenitor was intermediate (data not shown).

Direct comparisons between synthetic allohexaploids showed that 138 and 180 transcripts were expressed more in JOY36_S_0 than in the S_0 and S_1 generations of JOY54, respectively; 74 transcripts had similar expression in both (Table 3). Only 18 and 20 transcripts were expressed less in JOY36_S_0 than in the S_0 and S_1 generations of JOY54, respectively; of these 12 had similar expression in both (Table 3).

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Table 3 Direct paired comparisons of gene expression between the S_0 generation of the synthetic allohexaploid JOY36 (JOY36_S_0) and the S_0 and S_1 generations of JOY54 (JOY54_S_0 and JOY54_S_1)

			Comparison between D genome progenitors		
JOY36_S_0 vs JOY54_S_0	JOY36_S_0 vs JOY54_S_1	Total	AttD36 = AtsD54	AttD36 < AtsD54	AttD36 > AtsD54
JOY36_S_0 = JOY54_S_0		**30 656**	**30 316**	**156**	**184**
	JOY36_S_0 = JOY54_S_1	30 541	30 226	151	164
	JOY36_S_0 > JOY54_S_1	107	84	3	20
	JOY36_S_0 < JOY54_S_1	8	6	2	0
JOY36_S_0 > JOY54_S_0		**138**	**97**	**9**	**32**
	JOY36_S_0 = JOY54_S_1	65	56	5	4
	JOY36_S_0 > JOY54_S_1	73	41	4	28
	JOY36_S_0 < JOY54_S_1	0	0	0	0
JOY36_S_0 < JOY54_S_0		**18**	**4**	**14**	**0**
	JOY36_S_0 = JOY54_S_1	6	3	3	0
	JOY36_S_0 > JOY54_S_1	0	0	0	0
	JOY36_S_0 < JOY54_S_1	12	1	11	110
Total[a]		**30 812**	**30 417**	**179**	**216**

Both allohexaploids have the same AB genome progenitor (*Triticum turgidum* cv Joyau) but the D genome progenitor of JOY54 is *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) and that of JOY36 is *A. tauschii* spp. *strangulata* accession 36 (AtsD36). Transcripts are also separated according to their expression between the D genome progenitors.

[a]The reference set for this analysis consists of all transcripts expressed ($I > 3$) in at least one of the genotypes analysed (*T. turgidum* cv Joyau, AttD54, AtsD36, JOY36_S_0, JOY54_S_0 and JOY54_S_1). Each bold value corresponds the total of non-bold numbers that follow of precede.

Approx. 85% of the 395 genes that were differentially expressed between both D genome progenitors were equally expressed when comparing derived synthetic allohexaploids (Table 3). For the remaining transcripts, 32 and 14 transcripts were respectively more and less expressed in JOY36_S_0 than in the S_0 generation of JOY54, and followed the same trend when comparing their respective D genome progenitors (Table 3).

Comparison of sets of additively and nonadditively expressed transcript

We compared sets of additively and nonadditively expressed transcripts revealed in the S_0 generation of JOY36 with those of JOY54.

Approx. 86.4% (24 028) of the 27 819 transcripts that were additively expressed in the allohexaploid JOY36 were also additively expressed in JOY54 (Fig. 4).

However, we found 936 nonadditively expressed transcripts that were shared by generation S_0 of JOY36 and at least one of the two generations of JOY54 (Fig. 4). These can be divided into 535 over-expressed transcripts and 401 under-expressed ones and represented 45% of all nonadditively expressed transcripts in the S_0 generation of the allohexaploid JOY36. Only 12 nonadditively expressed transcripts would have been expected as common if the nonadditive expression was random and independent in both allohexaploids ($P < 2.2 \times 10^{-16}$).

Finally, it is important to note that the majority of the nonadditively expressed transcripts specific to one of the allohexaploids were additively expressed in the other one (Fig. 4). When compared with MPVs, only 11 and 48 nonadditively expressed transcripts were, respectively, under-expressed and over-expressed in the S_0 generation of JOY36 whereas they showed opposite expression patterns in JOY54 (Fig. 4).

Comparison of gene expression between synthetic and natural wheat allohexaploids

Direct AB and D genome progenitors of the natural allohexaploid wheat *T. aestivum* are no longer available, as the natural allopolyploidization event was estimated to occur between 7000 and 12 000 yr ago (Feldman *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002).

Comparisons showed that the majority of transcripts were equally expressed in the natural allohexaploid *T. aestivum* cv Courtot, S_0 (31 182, representing 99.2%) and S_1 generations of JOY54 (30 933, representing 98.4%) as well as the S_0 generation of JOY36 (30 996, representing 98.6%) (Table 4). Only 183, 303 and 229 genes were expressed more and 78, 207 and 218 genes were less expressed in Courtot than in S_0 and S_1 generations of JOY54 and S_0 generation of JOY36, respectively (Table 4). In comparison, more transcripts (1334, 2486 and 2475) were either over-expressed or under-expressed when comparing *T. aestivum* cv Courtot with *T. turgidum* cv Joyau and the two D genome progenitors of JOY54 and JOY36, respectively (Table 4). This comparison indicates that the natural wheat allohexaploid *T. aestivum cv* Courtot shows an important proportion of transcripts that are differentially expressed when comparing natural wheat allohexaploid *T. aestivum* cv Courtot with the AB and/or D genome progenitors, whereas they are equally expressed

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

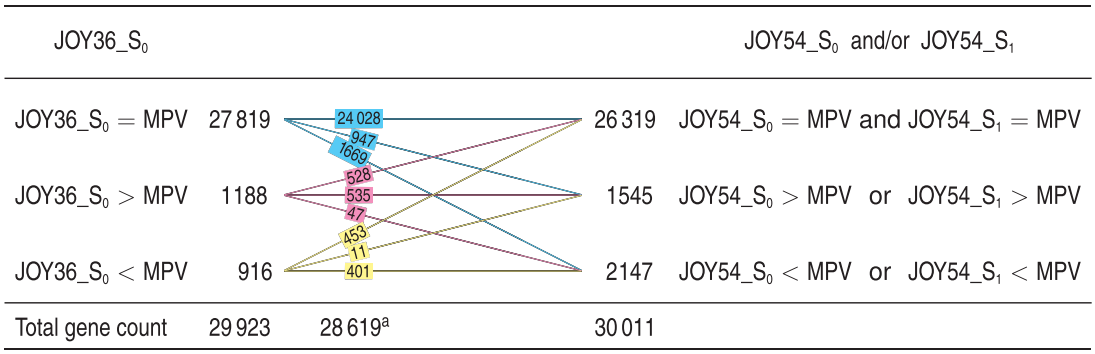

Fig. 4 Comparison of additively and nonadditively expressed transcript sets revealed in the S_0 generation of the synthetic allohexaploid JOY36 (JOY36_S_0) with those in the S_0 and/or S_1 generations of the synthetic allohexaploid JOY54 (JOY54_S_0 and JOY54_S_1). Both allohexaploids have the same AB genome progenitor (*Triticum turgidum* cv Joyau) whereas the D genome progenitor of JOY54 is *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) and that of JOY36 is *A. tauschii* spp. *strangulata* accession 36 (AtsD36). Numbers of genes shared by the different expression categories of JOY36 and JOY34 are indicated on the cross-lines.
[a]Total number of shared transcripts which were analysed in both JOY36 and JOY54 wheat allohexaploids; MPV, mid-parent values.

when compared with the derived synthetic allohexaploids (Table 4).

By contrast, the majority of transcripts that were non-additively expressed in S_0 and S_1 generations of JOY54 and S_0 generation of JOY36 (98.3%, 93.0% and 92.0% respectively) were equally expressed when compared with the natural allohexaploid *T. aestivum* cv Courtot (Table 4). Only a few remaining transcripts nonadditively expressed in the synthetic allohexaploids were either over-expressed or under-expressed in the natural allohexaploid *T. aestivum* cv Courtot (Table 4).

Discussion

Our study presents a comprehensive analysis of genome-wide gene expression changes in genetically stable wheat synthetic allohexaploids and compares, for the first time, the effect of variability of D genome progenitor, the

Table 4 Comparison of gene expression between the natural allohexaploid *Triticum aestivum* cv Courtot, the S_0 and S_1 generations of JOY54 (JOY54_S_0 and JOY54_S_1), the S_0 generation of JOY36 (JOY36_S_0) and the progenitors of these synthetic allohexaploids

	Genotypes compared with natural allohexaploid Courtot						
	Synthetic allohexaploids				Progenitors of JOY54 and JOY36		
T. aestivum cv Courtot vs other genotypes	Regulation according to MPV	JOY54_S_0	JOY54_S_1	JOY36_S_0	AB	AttD54	AtsD36
Over-expressed (Courtot >)		**183**	**303**	**229**	**1081**	**1921**	**1932**
	> MPV	4	4	1			
	= MPV	168	248	207			
	< MPV	11	51	21			
Equally expressed (Courtot =)		**31 182**	**30 933**	**30 996**	**30 010**	**28 957**	**28 978**
	> MPV	763	878	1045			
	= MPV	29 238	28 497	29 062			
	< MPV	1180	1558	889			
Under-expressed (Courtot <)		**78**	**207**	**218**	**352**	**565**	**533**
	> MPV	20	123	129			
	= MPV	55	79	83			
	< MPV	3	5	6			
Total[a]		**31 443**	**31 443**	**31 443**	**31 443**	**31 443**	**31 443**

Both allohexaploids have the same AB genome progenitor (*Triticum turgidum* spp. *durum* cv Joyau) but the D genome progenitor of JOY54 is *Aegilops tauschii* spp. *tauschii* accession 54 (AttD54) for JOY54 and that of JOY36 and is *A. tauschii* spp. *strangulata* accession 36 (AtsD36). Transcripts were classified as equally expressed ($P > 5\%$) or differentially expressed ($P \leq 5\%$) between *T. aestivum* cv Courtot and each of the compared genotypes. Expression in the synthetic allohexaploids is detailed according to additive (= MPV, mid-parent values) and nonadditive (< MPV or > MPV) regulation.
[a]Reference set for this table contains the 31 443 transcripts, considered as expressed ($I > 3$) in at least one of the genotypes analysed (*T. turgidum* cv Joyau, AtsD54, AttD36, JOY36_S_0, JOY54_S_0 and JOY54_S_1).

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

intrageneration and intergeneration variation and stability as well as comparison with naturally occurring and domesticated wheat allohexaploids. A total of 5084 and 5194 transcripts were differentially expressed between progenitors of the two wheat allohexaploids studied, representing *c.* 17% of the transcripts (see the Results section), which is similar to the proportion of 15%, observed in another study between diploid relatives *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis arenosa* species (Wang *et al.*, 2006). Of these transcripts, 42% and 53% were classified as differentially expressed between two pairs of cotton (*Gossypium*) species (Rapp *et al.*, 2009) and, more surprisingly, 78% of 825 transcripts were classified as differentially expressed between progenitors of another synthetic wheat allohexaploid, which is similar to the material used in our study (Pumphrey *et al.*, 2009). It was suggested that the high number of differentially expressed genes observed in the two studies mentioned can be attributed to ploidy level difference (for wheat progenitor comparison) and evolutionary histories of gene expression regulation, as the cogenic or closely-related species compared have important conservation in their gene sequences (Pumphrey *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009). It is important to note that it was not explained by Pumphrey *et al.* (2009) how the 825 transcripts were selected among the 17k transcripts spotted on their 70-mer oligo-probes feature microarray (Qiagen: http://www.microarrays.com). We believe that some of the discrepancies between studies could be explained by technical as well as statistical considerations and interpretations, as found in our study (Table S2) and in another study (Wang *et al.*, 2006).

Mid-parent value is used as a control, where in the case of no effect of polyploidy, the expression of a given gene in the polyploid might be equal to the value averaged from those of its parents (Wang *et al.*, 2006). By contrast, a gene is nonadditively expressed if its expression value is different from MPV. While in our study MPVs were measured by hybridization of mixtures of equal amounts of RNA from each of the progenitors, as described by Wang *et al.* (2006) and later by Gaeta *et al.* (2009), in other studies MPVs were calculated *in silico* by averaging expression values observed in progenitors (Pumphrey *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009). We compared both types of MPV estimations and showed that the *in silico* MPV explained only 89.67–91.57% of total variance of the *in vitro* estimation (see the Results section). The remaining variance results from technical bias and homoeoallele interactions that cannot be neglected just by using the *in silico* MPV. We suggest that such bias, leading to interpretation errors, must be evaluated for each specific gene expression microarray technology, especially in those studies that relied on the *in silico* MPV in their data analysis (Pumphrey *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009).

Additive expression was the dominant gene expression in the synthetic allohexaploids (93%), whereas nonadditively expressed transcripts represented *c.* 7% only. Similarly, nonadditive gene expression affected 5.2% and 5.6% of genes in *Arabidopsis* synthetic allotetraploids (Wang *et al.*, 2006), 1–6.1% in cotton (Adams *et al.*, 2004; Rapp *et al.*, 2009) and *c.* 5% in *Senecio* (Hegarty *et al.*, 2005). Pumphrey *et al.* (2009) showed that expression of *c.* 15% of genes was nonadditive in another synthetic wheat allohexaploid. This higher proportion of nonadditively expressed genes can be explained by the fact that 78% of the 825 genes, on which Pumphrey *et al.* (2009) based their analysis, were differentially expressed between progenitors, whereas this category represented only *c.* 17% of the genome-wide transcript array used in our study. When considering separately transcripts that were differentially expressed between progenitors of each of the two allohexaploids analysed in our study, the proportion of nonadditively expressed genes obtained (*c.* 17%) is comparable to that obtained by Pumphrey *et al.* (2009).

Finally, as also observed by Wang *et al.* (2006), it is also important to note that the microarray technology used does not ensure separate detection of each of the progenitor's gene copies (homoeoalleles) and their respective contribution to the overall gene expression. Therefore, comparison with MPV would underestimate the level of gene expression changes, especially for those cases where a gene from one progenitor is over-expressed, whereas its homoeolog is under-expressed.

Genomic expression bias and progenitor dominance

In Arabidopsis allopolyploids, Wang *et al.* (2006) observed, for the 65% of nonadditively and under-expressed (< MPV) genes, a biased repression of those that were expressed more in the *A. thaliana* than in *A. arenosa* than the reverse. Comparatively, a biased repression of genes that were expressed more in the AB genome progenitor was observed in JOY54 whereas this was the case for those that were expressed more in the D genome progenitor in the case of JOY36.

In a recent study with cotton allopolyploids an important proportion of genes were expressed at the same level of a specific progenitor than the other one (Rapp *et al.*, 2009). Moreover, this 'genomic expression dominance' was reversed in another cotton allopolyploid (the same parental genome became expression recessive) (Rapp *et al.*, 2009). It is important to note that Rapp *et al.* (2009) detailed their analysis irrespective of comparison with MPV and thus without separating gene expression into additive and nonadditive as done by Wang *et al.* (2006) or in our study (Figs 1 and 2). We believe, however, that their comparison implicated an important proportion of genes that were additively expressed in cotton allopolyploids; as predicted from comparison of proportions of their nonadditively expressed genes (1% and 6.1%) and those differentially expressed between their diploid progenitors (42% and 53%) (Rapp *et al.*, 2009). Biased detection was observed in

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

our study, especially for additively expressed transcripts that were expressed more in the AB than the D genome progenitors (Figs 1 and 2). However, we cannot draw a definitive conclusion on genomic expression dominance towards the AB genome progenitor for this category of additively expressed transcripts, as biased detection was also the case for the MPV, for which values were not statistically different from those observed for the allohexaploid (Fig. 2). [Correction added after online publication 9 July 2010: in the first line of the preceding sentence, the text 'However, we draw a definitive conclusion' was corrected to 'However, we cannot draw a definitive conclusion'.] Thus, our analysis suggests that technical reasons such as homoeoallele interactions and differential affinity to probesets, rather than polyploidy-related regulation mechanisms, are responsible of the observed detection bias in wheat allohexaploids. We suggest that cross-comparisons to progenitors and MPV measured by hybridizing mixture of progenitor RNA, as presented in our study for wheat, are needed as a real control of the additivity hypothesis in order to reveal and determine the significance of 'genomic expression dominance' phenomenon in allopolyploids.

Gene expression changes are not caused by apparent gene loss or other DNA rearrangements

Semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) validation shows that, out of 74 transcripts tested, expression of four nonadditively and over-expressed (> MPV) transcripts, 49 nonadditively and under-expressed (< MPV) transcripts (among which 47 could be considered as silenced – not detectable in allopolyploids), and eight additively and equally expressed ones was consistent with micro-arrays data (Notes S2). Semiquantitative RT-PCR amplifications of the 13 remaining transcripts (two over-expressed and 11 under-expressed) were already at saturation limits in our experimental conditions. We also analysed the 47 silenced transcripts at the DNA level in the allohexaploids JOY54 and/or JOY36 but did not find any evidence for their deletion or rearrangements (data not shown), confirming previous findings in these allohexaploids (Mestiri *et al.*, 2010) as well as other synthetic or natural wheat allohexaploids, none of which show DNA rearrangements or eliminations (He *et al.*, 2003; Bottley *et al.*, 2006).

Gene expression regulation is established in early generations of wheat allohexaploids and highly conserved during their evolution

Direct paired comparison between S_0 and S_1 generations of the allohexaploid JOY54 as well as with JOY36_S_0 indicated a high conservation and a high reproducibility between allopolyploidization events, independently of the variability of the D genome progenitor. This was also confirmed by the high conservation of sets of additively (93%) and nonadditively expressed (34.5–47%) genes, which were separately revealed in S_0 and S_1 generations of the allohexaploid JOY54 and the S_0 generation of JOY36 (see the Results section and Fig. 3). Similarly, *c.* 41% of nonadditively expressed genes were shown to be shared between two Arabidopsis resynthesized allotetraploids derived from hybridization between same lines of two Arabidopsis species progenitors and characterized as genetically stable (Wang *et al.*, 2006). Gaeta *et al.* (2009) found much less conservation of nonadditively expressed transcripts when they compared three *Brassica napus* resynthesized allopolyploids that were derived from hybridization between same progenitor lines of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* but characterized as showing different levels of genetic rearrangements. Approx. 10% of their nonadditively expressed genes were shared by all three allopolyploid lines in $S_{0:1}$ generation and only 3% in the advanced $S_{5:6}$ generation (Gaeta *et al.*, 2009).

By contrast, our comparisons in our study show that an important proportion of transcripts that were differentially expressed when comparing the natural wheat allohexaploid *T. aestivum* cv Courtot with the progenitor species of AB and D genomes (*c.* 5% and *c.* 8% of total transcripts, respectively), became equally expressed ($P > 0.05$) in derived synthetic allohexaploids (Table 4). Expression of only *c.* 0.8–1.6% of transcripts remained divergent between these two types of allohexaploids, the majority of which (59.6–89.3%) were genes that were revealed as additive in the synthetic allohexaploids (Table 4). Together with similar studies with natural and synthetic cotton allopolyploids (Hovav *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2009), our study confirms that allopolyploidization *per se* has had the greater impact on gene expression regulation in allopolyploid species. Thus, gene expression regulation in wheat allohexaploids are established upon allohexaploidization, the majority of which is maintained over 7000–12 000 yr, as estimated from the date of formation of the natural allohexaploid (Feldman *et al.*, 1995; Blake *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002).

Following polyploidization, various mechanisms, other than gene deletion, may affect gene expression regulation and the fate of homoeologous genes (Soltis *et al.*, 2004; Comai, 2005; Chen & Ni, 2006). These include altered and incompatible regulatory interactions, epigenetic modifications, gene dosage changes, partitioning and compensation as well as subfunctionalization (Comai *et al.*, 2000; Birchler *et al.*, 2003; Osborn *et al.*, 2003; Riddle & Birchler, 2003; Adams & Wendel, 2005b; Hovav *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2009). Moreover, Kashkush *et al.* (2003) have shown that transcriptional activation of retrotransposons in other synthetic wheat allopolyploids can alter the expression of adjacent genes. The present study provides an important number of gene candidates (Table S3) for which it would be interesting to further characterize the mechanisms of regulation of their expression.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Although the present investigation was not conducted to identify specific genes or biological processes affected by allopolyploidization, for all nonadditively expressed genes, revealed in both or at least one of the allohexaploids expression patterns as well as best BLASTX matches with UniProt and associated gene ontology (GO) terms (biological process, cellular component and molecular function) are provided (Table S3), as performed according to Pavlidis *et al.* (2004). Primary comparison of frequencies of occurrence of biological process GO terms between additively and non-additively expressed genes showed that those implicated in photosynthesis pathways, transcription and response to stimuli are more enriched (Table S4). These constitute the starting material for further analysis and identification of specific pathways of gene expression regulation in the wheat allohexaploids.

Acknowledgements

This project was supported by the ANR (Agence Nationale pour la Recherche)-Biodiversité project (ANR-05-BDIV-015). I.M. was funded by a fellowship of the French Research Ministry (MENRT). V.C. was funded by an Évry-Genopole postdoctoral fellowship. We sincerely thank Prof. J. Wendel (Iowa State University, USA) and Prof. A. Leitch (QMUL, UK) for valuable discussions.

References

Adams KL, Percifield R, Wendel JF. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* **168**: 2217–2226.

Adams KL, Wendel JF. 2005a. Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 135–141.

Adams KL, Wendel JF. 2005b. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* **21**: 539–543.

Barrett T, Suzek TO, Troup DB, Wilhite SE, Ngau WC, Ledoux P, Rudnev D, Lash AE, Fujibuchi W, Edgar R. 2005. NCBI GEO: mining millions of expression profiles – database and tools. *Nucleic Acids Research* **33**: D562–D566.

Benjamini Y, Yekutieli D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* **29**: 1165–1188.

Birchler JA, Auger DL, Riddle NC. 2003. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* **15**: 2236–2239.

Blake NK, Lehfeldt BR, Lavin M, Talbert LE. 1999. Phylogenetic reconstruction based on low copy DNA sequence data in an allopolyploid: the B genome of wheat. *Genome* **42**: 351–360.

Bottley AM, Xia G, Koebner RMD. 2006. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat. *Plant Journal* **47**: 897–906.

Chaudhary B, Flagel L, Stupar RM, Udall JA, Verma N, Springer NM, Wendel JF. 2009. Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*). *Genetics* **182**: 503–517.

Chen ZJ. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 377–406.

Chen ZJ, Ni Z. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* **28**: 240–252.

Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**: 836–846.

Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* **12**: 1551–1568.

Delmar P, Robin S, Daudin JJ. 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* **21**: 502–508.

Feldman M, Lupton F, Miller T. 1995. *Wheats*. London, UK: Longman Scientific.

Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J. 2008. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* **6**: 16.

Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* **19**: 3403–3417.

Gaeta RT, Yoo SY, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC. 2009. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using Arabidopsis 70mer oligo microarrays. *PLoS ONE* **4**: e4760. doi:10.1371/journal.pone.0004760.

Griffiths S, Sharp R, Foote TN, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, Moore G. 2006. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* **439**: 749–752.

Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, Carrington EJ, Chen X, Wang XJ, Chen ZF. 2009. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**: 17835–17840.

He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. 2003. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* **52**: 401–414.

Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA, Sanchez-Baracaldo P, Liu G, Buggs RJ, Abbott RJ, Edwards KJ *et al.* 2005. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Molecular Ecology* **14**: 2493–2510.

Hovav R, Udall JA, Chaudhary B, Rapp R, Flagel L, Wendel JF. 2008. Partitioned expression of duplicated genes during development and evolution of a single cell in a polyploid plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**: 6191–6195.

Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P. 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/ Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 8133–8138.

Irizarry R, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay Y, Antonellis K, Scherf U, Speed T. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249–264.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* **33**: 102–106.

Kihara H. 1944. Discovery of the DD analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agricultural Horticulture* **19**: 889–890.

Krugman T, Chagué V, Peleg Z, Balzergue S, Just J, Korol AB, Nev A, Saranga Y, Chalhoub B, Fahima T. 2010. Multilevel regulation and signalling processes associated with adaptation to terminal drought in wild emmer wheat. *Functional & Integrative Genomics*. doi: 10.1007/s10142-010-0166-3.

Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* **320**: 481–483.

McFadden ES, Sears ER. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* **37**: 81–89.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Mestiri I, Chagué V, Tanguy AM, Huneau C, Huteau V, Harry B, Coriton O, Chalhoub B, Jahier J. 2010. Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependant meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytologist* **186**: 86–101.

Nesbitt M, Samuel D. 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. In: Padulosi S, Hammer K, Heller J, eds. *First international workshop on hulled wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 4*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 41–100.

Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V *et al.* 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**: 141–147.

Ozkan H, Levy AA, Feldman M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops–Triticum*) group. *Plant Cell* **13**: 1735–1747.

Pang M, Woodward AW, Agarwal V, Guan X, Ha M, Ramachandran V, Chen X, Triplett BA, Stelly DM, Chen ZF. 2009. Genome-wide analysis reveals rapid and dynamic changes in miRNA and siRNA sequence and expression during ovule and fiber development in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genome Biology* **10**: R122.

Pavlidis P, Qin J, Arango V, Mann JJ, Sibille E. 2004. Using the gene ontology for microarray data mining: a comparison, of methods and application to age effects in human prefrontal cortex. *Neurochemical Research* **29**: 1213–1222.

Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS. 2009. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics* **181**: 1147–1157.

R Development Core Team. 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. See http://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html#Citing-R.

Rapp RA, Udall JA, Wendel JF. 2009. Genomic expression dominance in allopolyploids. *BMC Biology* **7**: 18.

Riddle NC, Birchler JA. 2003. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics* **19**: 597–600.

Rieseberg LH. 2001. Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions. *Current Biology* **11**: R925–R928.

Riley R, Chapman V. 1958. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* **182**: 713–715.

Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* **13**: 1749–1759.

Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, de Pamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.

Soltis DE, Albert VA, Savolainen V, Hilu K, Qiu YL, Chase MW, Farris JS, Stefanović S, Rice DW, Palmer JD *et al.* 2004. Genome-scale data, angiosperm relationships, and ''ending incongruence'': a cautionary tale in phylogenetics. *Trends in Plant Science* **9**: 477–483.

Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 7719–7723.

Tang H, Bowers JE, Wang X, Ming R, Alam M, Paterson AH. 2008. Synteny and collinearity in plant genomes. *Science* **320**: 486–488.

The UniProt Consortium. 2010. The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. Nucleic Acids Res. D142-D148. http://nar.oxfordjournals.org.gate1.inist.fr/cgi/content/abstract/38/suppl_1/D142.

Van de Peer Y, Maere S, Meyer A. 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics* **10**: 725–732.

Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L *et al.* 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* **172**: 507–517.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 *P*-values resulting from an analysis of variance (ANOVA) comparing the intragenerational, intergenerational and gene effects of the synthetic allohexaploid JOY54.

Fig. S2 Distribution of expressed transcripts according to expression levels in AB and D genome progenitors of JOY54 and JOY36 synthetic allohexaploids showing roughly equal number of expressed transcripts in both progenitors.

Notes S1 Intragenerational and intergenerational variation: considerations for biological replicates.

Notes S2 Semiquantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) validation of gene expression.

Table S1 Overall number of expressed transcripts and nonexpressed transcripts for all genotypes and replicates analysed in this study

Table S2 Differentially expressed transcripts for each pairwise comparison performed in this study

Table S3 Expression categories and patterns, putative functions according to best BLASTX matches with UniProt and associated gene ontology (GO) terms for all non-additively expressed genes revealed in both, or at least one, of the JOY54 and JOY36 synthetic allohexaploids as compared to mid-parent values (MPV)

Table S4 Comparison of frequencies of biological process gene ontology (GO) terms in sets of additively and non-additively expressed genes revealed in JOY36 and/or JOY54 wheat synthetic allohexaploids (according to analysis in Fig. 4)

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

© The Authors (2010)
Journal compilation © New Phytologist Trust (2010)

Résumé

La polyploïdie a joué un rôle essentiel dans l'évolution des eucaryotes, notamment chez les angiospermes dont la majorité ont connu au moins un évènement de polyploïdisation au cours de leur évolution.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilisation des espèces polyploïdes, j'ai caractérisé les changements génétiques et épigénétiques (méthylation de l'ADN) en lien avec l'appariement chromosomique en méiose chez les allopolyploïdes synthétiques de blé. Deux types d'allopolyploïdes ont été analysés en utilisant des méthodes moléculaires et cytogénétiques : (i) les allohexaploïdes possédant le locus *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) qui restreint l'appariement aux chromosomes homologues au cours de la méiose, (ii) les allotétraploïdes dépourvus de ce locus.

J'ai ainsi montré que la stabilité méiotique des allotétraploïdes et des allohexaploïdes de blé dépend des génotypes des espèces parentales. Comme attendu, l'appariement chromosomique en métaphase I de la méiose a lieu entre les chromosomes homologues chez les allohexaploïdes possédant le locus *Ph1*. Cependant, cet appariement homologue peut être incomplet (formation d'univalents) et mener à l'apparition d'aneuploïdes à la génération suivante. Plusieurs niveaux d'appariements homéologues ont été mis en évidence chez les allotétraploïdes synthétiques dépourvus du locus *Ph1* et sont à l'origine de certains réarrangements structuraux détectés chez ces allotétraploïdes. A l'opposé, aucun changement génétique n'a été observé en analysant des plantes euploïdes de ces allohexaploïdes contenant *Ph1*. L'aneuploïdie représente le principal changement structural observé chez ces allohexaploïdes.

De plus, des changements de la méthylation de l'ADN ont pu être mis en évidence chez les allohexaploïdes génétiquement stables. Ces changements concernent majoritairement des gènes et dans une moindre mesure les éléments transposables. De manière intéressante, j'ai pu montrer que certains changements de la méthylation de l'ADN étaient associés à des changements d'expression.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse se révèlent déterminants pour la compréhension des mécanismes menant à la stabilisation des espèces allopolyploïdes.

Abstract

Polyploidy or whole genome duplication is an important evolutionary process of eukaryotic evolution and is particularly widespread in flowering plants.

In order to understand key mechanisms leading to stable polyploid species, we characterized synthetic wheat allopolyploids for genetic and DNA methylation changes in relation to chromosome pairing at meiosis. Two main types of allopolyploids were analyzed using molecular and cytogenetic methods: (i) allohexaploids carrying the *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) locus that restrict pairing to homologous chromosomes during meiosis, (ii) allotetraploids that do not contain *the Ph1* locus.

Meiotic stability of wheat allotetraploids and allohexaploids was shown to depend on their genomic combination. As expected in the *Ph1* gene-carrying allohexaploids, chromosome pairing at metaphase I stage of meiosis essentially occurs between homologous chromosomes. However, the synthetic allohexaploids exhibited progenitor-dependent meiotic irregularities, such as incomplete homologous pairing, resulting in univalent formation and leading to aneuploidy in the subsequent generation. On the opposite, various levels of homoeologous pairing were evidenced in allotetraploids that do not contain the *Ph1* gene. While structural rearrangement triggered by homoeologous pairing were evidenced in some synthetic allotetraploids, no apparent genetic changes were observed when analyzing euploïd plants of the *Ph1* gene-carrying allohexaploids. Aneuploidy was shown to represent the major structural change in these allohexaploids.

Changes in DNA methylation were also evidenced in the genetically stable synthetic wheat allohexaploids and were more frequently observed in genes than in transposable elements. Interestingly, some of the changes were associated with genes expression changes.

Altogether, my PhD results allow a better understanding of some key mechanisms leading to stable wheat allopolyploids species.