Numéro National de Thèse : **2018LYSEN069**

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Science de la Vie
Discipline : Science de la Vie

Soutenue publiquement le 19/10/2018, par :
Laurine Gilles

Dissection moléculaire et cellulaire de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs

Molecular and cellular dissection of the maize *in vivo* gynogenesis

---

Devant le jury composé de :

BERGER Frédéric, Professeur, Gregor Mendel Institute, Rapporteur
PRAUD Sébastien, Cadre supérieur, Biogemma, Rapporteur
BARRET Pierre, Ingénieur de Recherche INRA, Examinateur
DELATTRE Marie, Directrice de Recherche CNRS, Examinatrice
MOREAU Laurence, Directrice de Recherche INRA, Examinatrice
WIDIEZ Thomas, Chargé de Recherche INRA, Directeur de thèse

Membres invités :
MARTINANT Jean-Pierre, Cadre supérieur Limagrain Europe
ROGOWSKY Peter, Directeur de Recherche INRA

Remerciements

Les remerciements, une minuscule partie dans le manuscrit mais pourtant une grande étape pour le thésard. C'est le moment de faire le bilan, de se poser et de se demander à qui nous devons tout ça ? Car une thèse ça ne se réalise pas seul, loin de là. Une thèse, c'est une aventure, un périple je dirais même, mais une thèse c'est surtout une occasion privilégiée de rencontrer des gens ; des gens qui pendant trois ans, nous aident, nous soutiennent et nous guident. Alors voilà, ces quelques lignes sont pour vous ; vous qui m'avez aidée de près ou de loin, vous qui m'avez faite avancer, vous qui m'avez faite grandir aussi bien scientifiquement qu'humainement et puis merci à vous aussi qui m'avez juste faite sourire, surtout les lundis matins. Je vais faire de mon mieux pour n'oublier personne, mais soyez indulgents car il est beaucoup trop tard, ou beaucoup trop tôt pour avoir les idées claires.

Dans un premier temps, je tiens à remercier les différents membres du jury, Frédéric Berger, Sébastien Praud, Marie Delattre, Laurence Moreau et Pierre Barret, pour avoir accepté de me consacrer de leur temps afin d'évaluer mon travail.

Puis, j'en viens à ma hiérarchie. Si certains thésards ont été en mal d'encadrement pendant leur thèse, je ne pourrais pas dire que j'ai eu ce problème car j'ai eu la chance incroyable d'avoir un encadrement à trois dimensions. Alors merci à Thomas Widiez, Jean-Pierre Martinant et Peter Rogowsky d'avoir été là pour m'aider et me guider pendant ces trois années.

Thomas, j'ai été ta première thésarde, certes, toi mon premier directeur de thèse. Tu seras bien évidemment mon dernier, mais je te souhaite d'encadrer plein d'autres thèses réussies. Tu t'en es très bien sorti ; j'ai adoré ces trois années, je n'ai pas passé un moment où je me suis ennuyée et c'est grandement grâce à toi. Alors merci pour m'avoir transmis ton projet (que je vais avoir du mal à te rendre), pour m'avoir beaucoup appris, pour m'avoir consacré de ton temps (beaucoup de temps) et surtout pour m'avoir faite grandir scientifiquement. J'ai beaucoup apprécié la manière que tu as eu de gérer mon encadrement en t'ajustant en permanence en fonction de mon évolution et surtout en restant toujours à l'écoute et très ouvert à la discussion. Et puis parce que si on fait le bilan, notre point majeur de mésentente, c'est l'étiquetage des plantes, alors oui ça s'est très bien passé.

Peter, tu as toujours été présent pour t'assurer que tout se passait bien, en nous laissant toute l'autonomie de faire nos propres choix. Merci pour ta disponibilité, pour avoir toujours pris le temps de m'écouter quand j'en avais besoin et de me conseiller. J'ai beaucoup appris à tes

côtés pendant ces trois années et j'ai vraiment apprécié ton avis franc, qui certes peut faire un peu peur au début, mais qui a toujours été très constructif et m'a faite avancer.

Jean-Pierre, tu m'as donné la chance de découvrir le monde de l'entreprise. Et cela n'est pas négligeable, puisque ça m'a permis me faire des choix et de savoir ce que je voulais faire de mon avenir professionnel. Merci de m'avoir intégrée dans ton équipe comme tu l'as fait, de m'avoir fait découvrir ta profession et ton univers et de m'avoir toujours donné tous les moyens pour accomplir mon projet de recherche. J'ai beaucoup apprécié ta disponibilité, ton écoute et ton avis scientifique qui m'a souvent faite réfléchir. Merci également d'avoir pris le temps de me guider sur mon avenir et de me conseiller dans ces moments de questionnements.

Travailler au RDP, c'est travailler en équipe. Ainsi, je tiens à remercier tous les membres d'hier et d'aujourd'hui de l'équipe SeedDev. Et puis, parce qu'à votre manière, vous m'avez tous apporté quelque chose, je vais prendre le temps et les lignes pour vous remercier. Alors déjà, il y a le côté « maïs » de cette équipe, mais qu'elle drôle d'idée de travailler sur cette espèce… Tout cela ne serait bien évidemment pas possible sans Gigi, qui nous nourris en transformants et en outils de travail et toujours avec le sourire ! Et puis parce qu'elle n'est pas seule, merci à Morgane, Edwige et Christelle que j'ai connu sur le tard et merci à Jérôme et Marie-France qui dans mes débuts au RDP m'ont beaucoup apporté par leur aide et leurs conseils. Nathalie, même si nous n'avons pas travaillé ensemble, j'ai toujours apprécié te croiser dans un coin de couloir, me plaindre un peu, glousser et repartir avec le sourire. Anne-Cha, tu es poule maintenant, voir plus loin. Nico, j'aurais largement pu t'inclure dans les remerciements du poulailler, car bon, tu es un peu devenue une poule aussi, ou plutôt un coq pour ne pas trop affecter ta virilité, mais je pense qu'une spéciale dédicace s'impose. On a commencé à peu près en même dans l'équipe et j'ai vraiment apprécié évoluer avec toi. Même s'il faut se faire une raison, Thomas n'est pas notre père, on est un peu frère et sœur de thèse et s'est beaucoup plus drôle que d'être enfant unique ! Si je passe du côté arabette … j'en viens évidemment à remercier Gwyneth Ingram de m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir conseillée pendant ces trois années. Je remercie également Sophie et Audrey pour leur bonne humeur, pour tous ces petits moments supers sympas en salle conviviale, et puis quand même vous m'avez faite beaucoup rire. Douglas, je t'ai connu sur le tard, mais j'ai apprécié te rencontrer, Steven, tu as su m'accueillir quand je suis arrivée dans l'équipe, alors merci, Jeanne, voir plus loin.

Et puis parce que j'ai eu la chance d'avoir deux équipes, deux univers, je remercie également l'équipe développement HD de Limagrain Europe. Merci à Régis Brassart, Clément Hannes, Guénaël Robic, Dominique Marc de m'avoir intégrée dans leur équipe, de m'avoir faite

découvrir leur métier, de m'avoir appris plein de nouvelles choses sur un domaine que je connaissais moins. J'ai vraiment appris beaucoup de nos échanges et j'en garde un très bon souvenir. Je remercie également, le personnel de Limagrain, qui m'a apporté son aide pendant ces trois années et notamment l'équipe de la plate-forme de génotypage avec Delphine Rogers ainsi que Aurélien Audes pour l'analyse de mes données de génotypage.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse qui ont pris du temps pour me guider chaque année. Ainsi, je remercie Nathalie Rivière, Yvon Jaillais, Daniel Grimanelli, et Raphael Mercier. Je tiens particulièrement à témoigner ma reconnaissance à Nathalie et Yvon qui respectivement côté Limagrain et côté RDP m'ont beaucoup apporté.

Nathalie, j'ai vraiment apprécié de t'avoir dans mon environnement professionnel. Tu as toujours su trouver les mots pour me guider scientifiquement et humainement et tes conseils ont toujours été très perspicaces. Merci également pour ta bonne humeur et ton investissement dans mon projet de thèse quand j'en ai eu besoin.

Yvon, il est clair que si tu n'avais pas été là, la partie biocell de mon projet aurait très certainement pris une tournure différente et n'aurait pas fini sa jolie histoire. Je te remercie pour ta vision extérieure et pour tes idées brillantes. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter et de me conseiller avec pédagogie. J'en profite pour remercier Matt qui m'a également beaucoup aidée et conseillée pendant ces trois années et surtout qui a été mon principal fournisseur de drogues. Merci également à Vincent pour son aide avec la microscopie.

Et puis, il y a ceux qui dans la vie de tous les jours au labo m'ont aidée et m'ont apporté plein de belles choses tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Alors ainsi, je remercie Joseph pour m'avoir plus qu'épaulée sur toute la partie biochimie. Je t'ai intercepté dès ton arrivée au RDP et tu as fait preuve d'une grande patience et toujours avec humour. Merci également à Judit et Virginie qui gèrent avec bienveillance cet espace et qui sont toujours présentes en cas de questions. Si je vais faire un tour du côté biomol, il est évident que je dois remercier Pierre pour les conseils de tous les jours, qui font que ça marche ou que ça ne marche pas. Et puis, je vous remercie vous tous qui m'avez donné des petits coups de main et des conseils au coin de couloir. Je serais tentée d'aller dans les détails, mais je risque d'oublier des noms, alors merci à vous.

Et puis parce que de manière générale, travailler au RDP, c'est travailler dans un univers formidable, je vous remercie tous d'avoir égaillé mes journées pendant ces trois années. Je vous remercie également pour tous ces petits moments de vie à côté du labo, certes généralement pas très loin (foyer), qui font que je repars avec plein de beaux souvenirs.

Quand j'ai poussé la porte du bureau des thésards il y a trois ans, qui s'est peu à peu transformé en poulailler, j'ai rencontré des collègues de travail, mais je me rends compte que quand je vais la refermer, je vais y laisser des amies à qui je dois beaucoup. Alors merci à Garance, Hinda, Jeanne, Léa et Lise (j'ai choisi l'ordre alphabétique, car vu ma capacité décisionnelle et le peu de temps qu'il me reste, ça aurait pu prendre un moment de choisir un ordre pour vous remercier). Et puis, parce que le poulailler, c'est avant tout un concept avant d'être un lieu, bien évidemment merci à Mathilde et à Anne-Cha. Vous avez égaillé mes journées pendant ces trois années, vous m'avez faite rire (beaucoup rire), même dans les moments un peu plus difficiles, vous avez écouté mes complaintes et pas des moindres et tout simplement vous avez été là. Et puis parce qu'il y a eu des soirées filles, des rires, des sourires, des potins, des potins (non non je ne l'ai pas mis deux fois par erreur), des moments, des lundis, pas comme les autres, merci les poules !

Après ce long périple (oui je parle périple sans aucune exagération, je n'ai pas encore retrouvé mes esprits après la rédaction), je tiens à remercier ma famille qui a toujours été là pour moi et qui durant ces trois années m'a permis de m'évader de mon quotidien au labo et de me ressourcer. Vous avez été mon petit bol d'air, indispensable à mon équilibre. Je remercie également mes amies « d'avant la thèse » qui ne m'ont pas oubliée, même si j'ai complétement disparu pendant ces trois années.

Pour finir, je tiens à remercier Léo, l'homme qui partage ma vie et qui a fait preuve d'un grand courage pour me supporter durant l'ensemble de ma thèse et particulièrement pendant la période difficile de la rédaction, où mon côté obscur est entièrement ressorti. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi ; pour m'avoir épaulée et soutenue dans mes moments de névrose, pour m'avoir nourrie, pour m'avoir parfois aidée dans la rédaction et surtout pour continuer à m'aimer après tout ça. Sans toi, je serais sûrement restée terrée dans mon lit jusqu'à mourir de faim et n'aurais probablement jamais fini ce manuscrit alors merci de m'avoir donné ce courage d'aller jusqu'au bout. Je te promets des jours plus paisibles et je saurai te rendre tout ce que tu as fait pour moi.

Des fois dans la vie, il fait chaud
et des fois il fait pas chaud
Mado

Résumé

Chez le maïs, la création de nouvelles variétés repose largement sur la technologie des plantes Haploïdes Doublées. Celle-ci s'appuie sur l'utilisation du pollen de lignées particulières, dites «inductrices d'haploïdes», qui déclenchent un processus de gynogenèse *in vivo*. Ce mécanisme permet la production d'embryons haploïdes contenant uniquement les informations génétiques maternelles. Après doublement des stocks chromosomiques des plantules haploïdes générées, il est possible d'obtenir des lignées fixées en seulement quelques générations, réduisant ainsi considérablement les schémas de sélection.

Bien que les déterminismes génétiques à l'origine de la gynogenèse *in vivo* soient restés énigmatiques pendant près de soixante ans, nos travaux ont permis le clonage positionnel et l'identification du gène majeur causal de l'induction d'haploïdes. Ce gène, exprimé spécifiquement dans les grains de pollen, code pour une phospholipase A2, nommée NOT LIKE DAD (NLD). Il s'avère que chez l'ensemble des lignées inductrices le gène *NLD* présente une insertion de quatre paires de bases, conduisant à la formation d'une protéine tronquée responsable de la gynogenèse *in vivo*. Cette mutation n'entraine pas un défaut spatial ou temporel de l'expression du gène mais une délocalisation de la protéine. La protéine sauvage localise au niveau de l'unité mâle germinative, sur la membrane d'origine végétative entourant les deux cellules spermatiques, alors que la protéine tronquée perd cette localisation. Des approches pharmacologiques et de mutagenèses dirigées ont permis de révéler un adressage de NLD à la membrane grâce à des ancrages lipidiques et des interactions électrostatiques entre la membrane et la protéine. En parallèle, il a pu être observé que la troncation de NLD, en plus de conduire à la formation d'haploïdes maternels, entraînait de nombreux phénotypes de grains anormaux. Le génotypage des produits de fécondations (albumens et embryons) résultant de croisements avec des lignées inductrices ont permis de mettre en évidence l'existence d'anomalies chromosomiques paternelles, pouvant expliquer ces différents phénotypes de grains anormaux. L'ensemble de ces résultats indiquent que la phospholipase NLD intacte est nécessaire pour le bon déroulement de la reproduction sexuée.

Mots clés : Gynogenèse *in vivo*, maïs, lignées inductrices, haploïdes, fécondation, pollen, unité mâle germinative.

Abstract

In maize, plant breeding mainly relies on double haploid technology. The main principle of this technology is the use of special lines called “inducer lines”, which induce *in vivo* gynogenesis. This mechanism allows haploid embryos production which only contain maternal genetics information. After chromosome doubling of the haploid seedlings, it is possible to obtain fixed lines in only few generations, thus considerably reducing breeding cycles.

Although genetic determinants behind *in vivo* gynogenesis remained enigmatic for nearly sixty years, our work allowed the positional cloning and the identification of the major gene controlling haploid induction. This gene, specifically expressed in pollen grain, encodes for a phospholipase A2 called NOT LIKE DAD (NLD). It turns out that in all the inducer lines the *NLD* gene has a 4-bp insertion, leading to the formation of a truncated protein responsible for gynogenesis *in vivo*. This mutation did not result in a spatial or temporal defect in the expression of the gene but in the delocalization of the protein. The wild type protein localizes at the male germ unit on the vegetative membrane surrounding the two sperm cells, while the truncated protein loses this location. Pharmacological and mutagenic approaches revealed that NLD is targeted to the membrane through lipid anchoring and electrostatic interactions between membrane and protein. In parallel, it has been observed that the truncation of NLD; in addition to leading to the formation of maternal haploids; led to many pleiotropic phenotypes of abnormal kernels. The genotyping of fertilization products (endosperms and embryos), shows the existence of paternal chromosomal anomalies, which can explain these different phenotypes of abnormal kernels. All these results indicate that the intact NLD phospholipase is therefore necessary for the proper course of sexual reproduction.

Keys words: *In vivo* gynogenesis, maize, inducer lines, haploids, fertilization, pollen, male germ unit.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AJ: Acide Jasmonique
AIR : Aborted Induction Rate
ARN: Acide RiboNucléique
A.t: A.thaliana
BC: BackCross
BCS: BackCross Self
BR : Brassinostéroïdes
CENH3: Centromeric Histone 3
CG : Cellule Générative
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CS : Cellule Spermatique
C-ter : Carboxy-terminale
CV : Cellule Végétative
CDK : Cyclin Dependant Kinase
CRP : Cystein Rich Peptide
CYC : Cycline
DAP : Days After Pollination
ECM: Extra Cellular Matrix
GGI1 : Gynonegenis inducer 1
GFP : Green Fluorescent Protein
GUS : β-GLUCURONIDASE
H3 : Histone 3
HAP : Hours After Pollination
HD : Haploïde Doublé
HIR : Haploid Induction Rate
IFMP : Intensité de Fluorescence à la Membrane Plasmique
IFC : Intensité de Fluorescence au Cytoplasme
IG1 : Indeterminate Gametophyte 1
IP : Immunoprécipitation
JAP : Jours Après Pollinisation
L1, L2, L3 : Layer 1, Layer 2, Layer 3
LB : Left Border
LOB: Lateral Organ Bondarie
MGU: Male Germ Unit
MIV: Membrane Interne Végétative
MMC: Megaspore Mother Cell
MTL: MATRILINEAL
NCRP : No Cystein Rich Peptide
NLD : NOT LIKE DAD
NG: Noyau Génératif
N-ter: NH_2-terminale
NV: Noyau Végétatif
OE : Over Expression
PCA: Pollen Competition Assay
PCD: Programed Cell death
PCR: Polymerase Chain Reaction
PMC: Pollen Mother Cell
PMI: Pollen Mitosis I
PMII: Pollen Mitosis II
PLA: Phospholipase A
QHIR1: Quantitative Haploïd Induction Rate
QTL: Quantitative Trait Locus
RB: Right Border
RE: Reticulum endoplasmique
RNAi; RNA interferent
R1-nj: Red colour1-navajo
RT: Reverse Transcriptase
RT : Room Temperature
SDD: Single Seed Descent
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TE: Transposable Element
TUBα: Tubulineα
UB10: Ubiquitine 10
YFP: Yellow Fluorescent Protein
ZmPLA1: Zea mays PHOSPHOLIPASE A1

Sommaire

PARTIE I : Introduction 1

I.1 - Les enjeux de l'innovation variétale chez le maïs 2

I.1.1 - L'importance de l'amélioration génétique des plantes 2

I.1.2 - Le maïs, une culture à fort intérêt agronomique 3

I.1.3 - L'amélioration variétale du maïs : hybrides et technologie des haploïdes doublés 7

I.1.3.1 - Effet d'hétérosis et lignées hybrides 7

I.1.3.2 - La technologie des plantes haploïdes doublées (HD), un outil de choix dans la création de nouvelles variétés de maïs 11

I.2 - La reproduction sexuée chez les angiospermes 13

I.2.1 - Les divisions cellulaires, des étapes-clés dans la mise en place des lignées germinales mâles et femelles 15

I.2.1.1 - Le cycle cellulaire 15

I.2.1.2 - Les divisions mitotiques 17

I.2.1.3 - Les divisions méiotiques 19

I.2.2 - Mise en place de la lignée germinale mâle 21

I.2.2.1 - Développement des anthères : la phase pré-méiotique 21

I.2.2.2 - La microsporogenèse : formation des microspores 23

I.2.2.3 - Maturation des microspores en grains de pollen matures : la microgamétogenèse 25

I.2.2.3a - La première mitose du pollen : formation des cellules végétative et générative 25

I.2.2.3b - La seconde mitose du pollen : formation des deux cellules spermatiques 29

I.2.2.3c - Contrôle du cycle cellulaire durant la macrosporogenèse 31

I.2.3 - Le concept de la Male Germ Unit (MGU) 35

I.2.3.1 - Structure de la MGU et connections cellulaires entre ces composantes 36

I.2.3.2 - Fonction de la MGU dans le grain de pollen 39

I.2.4 - Mise en place de la lignée germinale femelle 41

I.2.4.1 - Développement de l'ovule et formation de la MMC 41

I.2.4.2 - La macrosporogenèse 43

I.2.4.3 – Formation du sac embryonnaire : la macrogamétogenèse 45

I.2.4 - Mécanismes de la double fécondation 46

I.2.4.1 - Germination du grain de pollen et croissance du tube pollinique 46

I.2.4.1.a - Adhésion, hydratation du grain de pollen et germination 47

I.2.4.1b - Développement et croissance du tube pollinique 47

I.2.4.1c - Guidage du tube pollinique dans les tissus sporophytiques femelles 50

I.2.4.2 - Réception du tube pollinique et libération des gamètes mâles 51

I.2.4.3 - Adhésion, fusion et activation des gamètes 55

I.2.5 - Les produits de la double fécondation : l'embryon et l'albumen 59
I.3 - Exploitation des déviations de la reproduction sexuée pour la création de lignées haploïdes doublées 61
I.3.1 - Obtention d'haploïdes d'origine paternelle 63
I.3.1.1 - Haploïdisation *via* l'androgenèse *in vitro* : cultures d'anthères ou de microspores 63
I.3.1.2 - Haploïdisation *in vivo via* le système *ig1* chez le maïs 65
I.3.1.3 - Haploïdisation *via* la manipulation des centromères 66
I.3.2 - Obtention d'haploïdes d'origine maternelle 67
I.3.2.1 - Haploïdisation *via* la gynogenèse *in vitro* à partir de culture d'ovules 67
I.3.2.2 - Haploïdisation *in vivo via* l'utilisation de grains de pollen traités 68
I.3.2.3 - Haploïdisation *via* des hybridations interspécifiques : une élimination uniparentale des chromosomes 69
I.3.2.4 - Haploïdisation *via* des croisements intraspécifiques : la gynogenèse *in vivo* 73
I.3.3 - Le doublement des stocks chromosomiques des individus haploïdes 74
I.3.3.1 - Doublement artificiel des stocks chromosomiques 74
I.3.4.2 - Doublement spontané des stocks chromosomiques 76
I.4 - La gynogenèse *in vivo* chez le maïs et les lignées inductrices d'haploïdes 78
I.4.1 - Historique des lignées inductrices d'haploïdes chez le maïs 78
I.4.2 - Identification des individus haploïdes suite à l'utilisation des lignées inductrices 79
I.4.2.1 - Utilisation de marqueurs génétiques dominants 79
I.4.2.2 - Utilisation de marqueurs génétiques récessifs et lignées « testeurs » 82
I.4.5 - Déterminismes génétiques de la gynogenèse *in vivo* 82
I.4.3 - Phénotypes associés aux lignées inductrices d'haploïdes 85
I.4.3.1 - Le pollen inducteur est moins compétitif que le pollen non-inducteur 85
I.4.3.2 - Les grains de pollen des lignées inductrices ne présentent pas de défauts phénotypiques majeurs 87
I.4.3.3 - L'induction d'haploïdes est corrélée avec l'hétérofécondation 87
I.4.3.4 - Les lignées inductrices d'haploïdes induisent des grains anormaux 89
I.4.4 - Mécanismes sous-jacents à l'induction d'haploïdes *in vivo* chez le maïs 89
I.4 - Rôles des phospholipases A chez les plantes 96
I.4.1 – Généralités sur les phospholipases 96
I.4.2 - Fonctions des PLAs chez les plantes 97

PARTIE II : Contexte et objectifs de la thèse 101
II.1 - Contexte et résultats préliminaires 103
II.2 - Objectifs de la thèse 104
II.3 - Valorisation des travaux de thèse 105

PARTIE III : Résultats **107**

III.1 - Validation fonctionnelle du gène candidat *NOT LIKE DAD* (*NLD*) comme causal de l'induction d'haploïdes 109

III.1.1 - *NLD* est le gène candidat unique lié à l'induction d'haploïdes 109

III.1.2 - Création des lignées isogéniques A188$^{NLD\text{-}PK6}$ et PK6$^{NLD\text{-}A188}$ 113

III.1.2.1 - Introgression de l'allèle *NLD-PK6* dans le fonds génétique non-inducteur d'haploïde, A188 113

III.1.2.2 - Introgression de l'allèle *NLD-A188* dans le fonds génétique inducteur PK6 116

III.1.3 - La présence d'un allèle *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes. 117

III.1.4 - Influence de la dérégulation de l'expression de *NLD* et de sa perte de fonction dans un fonds génétique sauvage sur l'induction d'haploïdes 121

III.1.5 - Conclusion sur la validation fonctionnelle de NLD 128

III.2 - Caractérisation moléculaire et cellulaire de *NLD* 131

III.2.1 - Profil d'expression de *NLD* 131

III.2.1.1 - *NLD* est spécifiquement exprimé dans la cellule végétative des grains de pollen mature 131

III.2.1.2 - L'activité du promoteur *pNLD* débute dans les étapes proches en amont ou en aval de la seconde mitose pollinique 135

III.2.1.3 - L'activité du promoteur *pNLD* s'arrête après la double fécondation 137

III.2.1.4 - Conclusion sur l'activité du promoteur du gène *NLD* 139

III.2.2 - Etude de la localisation subcellulaire et de l'adressage de NLD 139

III.2.2.1 - NLD localise au niveau de l'unité mâle germinative du grain de pollen de maïs, probablement dans la membrane interne d'origine végétative (MIV) 139

III.2.2.2 - Conservation de la localisation subcellulaire de NLD dans le système hétérologue, *A.thaliana* 144

III.2.2.3 - Localisation subcellulaire de NLD dans les cellules racinaires d'*A.thalianai*: la troncation de NLD est corrélée avec une perte de l'adressage à la membrane plasmique 145

III.2.2.4 - Mécanistique d'adressage de NLD à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV dans le système *A.thaliana* 149

III.2.2.4a - Analyse in silico de la protéine NLD 149

III.2.2.4b - La partie C-terminale de NLD sauvage n'est pas suffisante individuellement pour permettre un adressage à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV des cellules végétatives 151

III.2.2.4c - NLD est adressée à la membrane plasmique via des ancres lipidiques 153

III.2.2.4d - Importance des interactions électrostatiques entre NLD et les membranes dans l'adressage de NLD 157

III.2.2.4e – Conclusion sur la mécanistique de la localisation subcellulaire de NLD 159

III.2.2.5 - Relocalisation de NLD$_{PK6}$ à la membrane plasmique 161

III.2.2.6 - Conclusion sur la localisation subcellulaire et l'adressage de la protéine NLD 163

III.2.4 - Production *in vitro* des deux versions de la protéine NLD en vue d'une caractérisation de leurs activités enzymatiques 165
III.3 - Caractérisation des phénotypiques associés à la gynogenèse *in vivo* chez le maïs 169
III.3.1 - La gynogenèse *in vivo* est corrélée avec plusieurs anomalies de fécondation 169
III.3.2 - Devenir du génome paternel des grains provenant des croisements avec les inducteurs mâles 173
III.3.2.1 - Devenir du génome paternel dans les grains immatures 173
III.3.2.2 - Devenir du génome paternel dans les jeunes plantules 183
III.3.2.3 - Conclusion sur le devenir du génome paternel après la fécondation 185
III.3.3 - La mutation du gène *NLD* conduit à une augmentation de la sensibilité des cellules spermatiques aux stress osmotiques. 187
III.4 - Recherche des interactants protéiques de NLD 191
III-5 - Influence des soies femelles sur les taux d'induction d'haploïdes de la lignée inductrice RWS 197
Annexes résultats 201

PARTIE IV : Discussion 207
IV.1 - *NLD*, un gène-clé dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, mais pas le seul gène impliqué dans ce processus 209
IV.1.1 - La perte de fonction de NLD est causale à l'induction d'haploïdes 209
IV.1.2 - Le déterminisme génétique de la gynogenèse *in vivo* n'est pas monogénique 211
IV.1.3 - Vers une identification des gènes modulateurs de l'induction d'haploïdes chez le maïs 214
IV.2 - Défauts lors de la double fécondation ou élimination du génome paternel post-fécondation ?.. 216
IV.2.1 - La gynogenèse *in vivo*, des irrégularités lors de la double fécondation ? 216
IV.2.2 - La gynogenèse *in vivo*, une élimination du génome paternel post-fécondation ? 218
IV.2.3 - La gynogenèse *in vivo*, un cumul de plusieurs facteurs ? 221
IV.3 - Comment la mutation de *NLD* pourrait expliquer les gynogenèse *in vivo* ? 224
IV.4 - Model proposé pour expliquer la gynogenèse *in vivo* 229
IV.5 - La gynogenèse *in vivo* : les perspectives à long terme 231
IV.5.1 - Vers une amélioration de l'induction d'haploïdes chez le maïs 231
IV.5.2 - Transfert de la gynogenèse *in vivo* à d'autres espèces d'intérêt agronomique 232

PARTIE V : Matériels et Méthodes 235
V.1 - Conditions de culture 236
V.1.1 - Conduites de culture du maïs 236
V.1.1.1 - Cultures en plein champ 236
V.1.1.2 - Cultures en conditions contrôlées 236
V.1.2 - Conduites de culture de l'Arabette 237
V.1.2.1 - Culture *in vitro* en conditions contrôlées 237
V.1.2.1 - Culture sur substrat en conditions contrôlées 239

V.2 – Matériels végétals 239
V.2.1 - Lignées de maïs 239
V.2.2 - Lignées d'arabette 239
V.3 - Caractérisations phénotypiques des lignées de maïs 241
V.3.1 - Evaluation des taux d'induction d'haploïdes 241
V.3.1 - Evaluation des taux de grains avortés 242
V.4 - Génération des lignées transgéniques 242
V.4.1 - Clonages moléculaires 242
V.4.2 - Transformations génétiques des souches bactériennes *E.coli* 247
V.4.3 - Analyses et validation des clones recombinants 247
V.4.4 - Transformations génétiques des souches bactériennes *A.tumefaciens* 248
V.5 - Transformations génétiques des plantes 249
V5.1 - Transformations génétiques du maïs 249
V.5.2 - Transformations génétiques de l'Arabette 249
V.6 - Analyses des lignées générées 251
V.5.1 - Extraction des ADNs génomiques 251
V.6.2 - Evaluation du nombre de copies du transgène et génotypage des plantes *A.thaliana* 251
V.6.3 - Evaluation du nombre de copies des transgènes dans les plantes transformées de maïs 252
V.6.4 - Identification des plantes de maïs contenant l'insertion de 4-pb dans le gène *NLD* 253
V.7 - Analyse des accumulations relatives de transcrits dans les grains de pollen 253
V.7.1 - Extraction des ARNs totaux à partir de pollen 253
V.7.2 - Traitement des ARNs à la DNase 255
V.7.3 - Transcription inverse (RT) 255
V.7.4 - Analyse de l'expression relative 257
V.8 - Analyses biochimiques 257
V.8.1 - Réalisation des westerns blots 257
V.8.2 - Production de la protéine NLD *in vitro* dans le système *E.Coli* 258
V.8.2.1 - Clonages moléculaires et choix des vecteurs d'expression 258
V.8.2.2 - Induction à l'IPTG 259
V.8.2.3 - Extractions des protéines 260
V.7.3.3 - Vérification de la production 260
V.8.3 - Recherche des interactants protéiques de NLD 261
V.8.3.1 - Immunoprécipitation de la protéine 261
V.8.3.2 - Vérification des enrichissements 262
V.8.3.3 - Spectrométrie de masse en tandem 262
V.9 - Analyses Histochimiques 263
V.9.1 -Caractérisation de l'activité du promoteur de NLD 263

V.9.1.1 - Calibration de la taille des anthères de A188 en fonction du stade de développement des grains de pollen 263
V.9.1.2 - Evaluation du début de l'activité du promoteur *pNLD* lors du développement des grains de pollen 264
V.9.1.3 - Evaluation de l'activité du promoteur *pNLD* durant et après la fécondation 264
V.9.2 - Suivi du génome paternel dans la descendance des lignées inductrices 265
V.10 - Microscopie et analyses d'images 266
V.10.1 - Observations du pollen de maïs 266
V.10.1.1- Préparation du pollen pour les observations 266
V.10.1.2 - Germination des grains de pollen 266
V.10.1.2 - Isolement des cellules spermatiques 267
V.10.1.3a - Libération des cellules spermatiques par un choc osmotique 267
V.10.1.3b - Isolement des cellules spermatiques par flottaison 267
V.10.2 - Observations des plantes *A.thaliana* 268
V.10.2.1 - Observations des grains de pollen et des apex racinaires d'*A.thaliana* 268
V.10.2.2 - Traitement des plantules à la PAO et au 2-BP 269
V.10.2.3 - Microscopes utilisés 269
V.10.2.4 - Analyses d'images 270
V.11 - Analyses statistiques 270

Références Bibliographies 273
Annexe 1: Liste des publications 303

Liste des figures

Figure I-1 : Le maïs, une plante monoïque.
Figure I-2 : Représentations schématiques de la dépression de consanguinité et de l'effet d'hétérosis.
Figure I-3 : Comparaison schématique et simplifiée de deux stratégies de sélection permettant l'obtention de lignées fixées.
Figure I-4 : Comparaison d'un processus de double fécondation normale avec la gynogenèse *in vivo* chez le maïs.
Figure I-5 : Le cycle de vie haplo-diploïde des plantes : l'exemple du maïs.
Figure I-6 : Illustration schématique des différentes étapes du cycle cellulaire.
Figure I-7 : Illustrations schématiques du processus de division mitotique dans les cellules végétales.
Figure I-8 : Les anthères sont constituées de différents tissus sporophytes renfermant les PMCs.
Figure I-9 : Processus développemental du grain de pollen.
Figure I-10 : Plusieurs mutations chez *A.thaliana* conduisent à des anomalies dans le développement du grain de pollen.
Figure I-11 : L'unité mâle germinative, une structure tripartite complexe.
Figure I-12 : Phénotypes des mutants mum1 et gum1 affectés dans l'organisation de la MGU.
Figure I-13 : La dissociation de la MGU entraîne une désynchronisation dans le mouvement des cellules spermatiques.
Figure I-13 : Ovaires de maïs.
Figure I-14 : Processus développemental du sac embryonnaire chez le maïs.
Figure I-15 : Régulations structurelles du développement du tube pollinique.
Figure I-16 : La reproduction sexuée chez les plantes est caractérisée par une double fécondation
Figure I-17 : Le grain de maïs est composé de trois compartiments
Figure I-18 : Vue d'ensemble des principales stratégies utilisées pour produire des plantes Haploïdes Doublées (HD).
Figure I-19 : Modèle putatif afin d'expliquer l'haploïdisation *via* les croisements interspécifiques.
Figure I-20 : Identification des individus haploïdes par l'utilisation de marqueurs génétiques.

Figure I-21 : Le pollen inducteur est moins compétitif que le pollen non-inducteur.
Figure I-22 : L'utilisation du pollen des lignées inductrices entraîne dans la descendance des phénotypes de grains anormaux.
Figure I-23 : Deux hypothèses majeures peuvent expliquer l'origine de la gynogenèse *in vivo*.
Figure I-24 : Des simples fécondations se produisent lors des croisements avec les lignées mâles inductrices.
Figure I-25 : Présence d'anomalies chromosomiques dans la descendance des lignées inductrices.
Figure I-26 : Identification de fragmentations chromosomiques dans les cellules spermatiques des grains de pollen inducteurs.
Figure II : Cartographie fine et structure du locus *ggi1/qhir1*.
Figure III-1 : Réduction de l'intervalle génétique présent sur le QTL *ggi1/qhir1* à un gène candidat unique : *NLD*.
Figure III-2 : Création des lignées isogéniques $PK6^{-NLD\text{-}A188}$ et $A188^{-NLD\text{-}PK6}$.
Figure III-3 : La présence d'un allèle *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes.
Figure III-4 : Caractérisation des lignées transgéniques dérégulatrices de l'expression de *NLD*.
Figure III-5 : Caractérisation des lignées transgéniques CRISPR-NLD.
Figure III-6 : Expression relative de *NLD* dans les différents tissus du maïs, d'après les bases de données publiques de transcriptomique.
Figure III-7 : *NLD* est exprimé dans la cellule végétative des grains de pollen.
Figure III-8 : Calibration de la taille des anthères en fonction du stade de développement des grains de pollen chez la lignée A188.
Figure III-9 : L'activité du promoteur *pNLD* débute durant la maturation du grain de pollen, lors de la transition entre les stades bicellulaire et tricellulaire.
Figure III-10 : L'activité du promoteur *pNLD* n'est plus effective rapidement après la double fécondation.
Figure III-11 : Localisation de la protéine NLD au niveau l'unité mâle germinative (MGU) du grain de pollen de maïs.
Figure III-12 : NLD ne localise pas au niveau des cellules spermatiques mais en périphérie de la MGU.
Figure III-13 : La troncation de NLD entraîne une délocalisation de la protéine dans le système hétérologue *A.thaliana* (*A.t*).
Figure III-14 : Analyse *in silico* de la protéine NLD.

Figure III-15 : Ancrage de la fusion NLD:CITRINE à la membrane plasmique *via* des interactions avec des ancres lipidiques.
Figure III-16 : Adhésion de la fusion NLD:CITRINE à la membrane plasmique *via* des interactions électrostatiques.
Figure III-17 : Tests de relocalisation de la protéine NLD tronquée à la membrane plasmique dans les cellules racinaires et au niveau de la MGU dans les grains de pollen.
Figure III-18 : Production des deux versions de la protéine NLD ; NLD_{-HD99} (sauvage) et NLD_{-PK6} (mutante), dans deux systèmes d'expression différents.
Figure III-19 : Classification des différentes catégories de grains obtenus après un croisement avec la lignée inductrice RWS contenant le gène marqueur de coloration *R1-Navajo*.
Figure III-20 : Dénombrement des différentes catégories de grains observés après croisement de la lignée testeur « glossy » avec la lignée non-inductrice d'haploïdes, A188 et les lignées inductrices d'haploïdes, PK6 et RWS.
Figure III-21 : Classification des différentes catégories de grains obtenus après croisement avec les lignées rapportrices GUS inductrices et non-inductrices d'haploïdes
Figure III-22 : Illustration des quatre grandes classes de profils alléliques observables sur des embryons et des albumens obtenus après croisement avec les lignées « inductrices GUS ».
Figure III-23 : Deux profils alléliques atypiques obtenus dans la descendance issue de la lignée « inductrice GUS ».
Figure III-24 : Illustration des différences phénotypiques observables dans la descendance de la lignée inductrice d'haploïdes, PK6.
Figure III-25 : Les cellules spermatiques (CS) des lignées inductrices d'haploïdes présentent plus d'agrégats de la fusion protéique TUBULINE:YFP que celles des lignées non-inductrices.
Figure III-26 : Immunoprecipitations (IPs) des fusions protéiques NLD_{-HD99}:CITRINE et NLD_{-PK6}:CITRINE.
Figure III-27 : Evaluation de l'influence des soies femelles sur la gynogenèse *in vivo*.
Figure IV : Modèle proposé pour expliquer les gynogenèse *in vivo* chez le maïs.

Liste des tableaux

Tableau III-1 : Données détaillées des taux d'induction totaux d'haploïdes et de grains avortés des lignées présentées dans la figure III-1.

Tableau III-2 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) des différents rétrocroisements autofécondés présentés dans la figure III-2B.

Tableau III-3 : Données détaillées des taux d'induction de grains avortés (AIRs) des différents rétrocroisements autofécondés présentés dans la figure III-2C.

Tableau III-4 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) et de grains avortés (AIRs) des lignées présentées dans la figure III-3.

Tableau III-5 : La surexpression des allèles *NLD*, sauvage et mutant, dans un fonds génétique non-inducteur (A188) ne conduit pas à un phénotype d'induction d'haploïdes.

Tableau III-6 : La diminution de l'expression de *NLD* dans un fonds génétique non-inducteur (A188) ne conduit pas à un phénotype d'induction d'haploïdes.

Tableau III-7 : Evaluation de l'influence des mutations *crinld* sur l'induction d'haploïdes.

Tableau III-8 : Dénombrement des différents profils alléliques observables sur des individus obtenus après croisement avec les lignées inductrices PK6 et « inductrice GUS ».

Tableau III-9 : Identification des potentiels intéractants protéiques de NLD par immunoprécipitations des fusions NLD-HD99:CITRINE et NLD-PK6:CITRINE, suivies de spectrométrie de masse.

Tableau V-1 : Liste des lignées transgéniques de maïs utilisées pendant cette étude.

Tableau V-2 : Liste des lignées transgéniques d'A.thaliana utilisées pendant cette étude.

Tableau V-3 : Bilan des plasmides générés dans cette étude et stratégies de clonage adoptées.

Tableau V-4 : Liste des amorces utilisées pour la réalisation des analyses par PCR.

Tableau V-5 : Liste des amorces utilisées pour la réalisation des analyses par q-PCR.

Tableau V-6 : Liste des anticorps utilisés pour le réalisation des western blots.

Liste des Annexes

Annexe III-1 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) des différentes plantes-sœurs provenant des rétrocroisements présentés dans la figure III-2B et le tableau III-2.
Annexe III-2 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) relatifs à la stratégie de complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes N°1 présentée dans la figure III-3 et le tableau III-4.
Annexe III-3 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) relatifs à la stratégie de complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes N°2 présentée dans la figure III-3 et le tableau III-4.
Annexe III-4 : Séquences protéiques prédites à partir des séquences codantes des allèles *NLD*$_{WT}$ (sauvage), *crinld-1* et *crinld-2* et *crinld-3*.

Annexe 1 : Liste des publications

PARTIE I

Introduction

I.1 - Les enjeux de l'innovation variétale chez le maïs

I.1.1 - L'importance de l'amélioration génétique des plantes

Dans le but de subvenir à ces besoins alimentaires, *Homo sapiens* a associé à son mode de vie sédentaire, l'agriculture. De ce fait, par le contrôle du cycle de vie de certaines espèces végétales et animales ainsi que des écosystèmes y étant associés, il peut produire des ressources devenues indispensables à sa survie et à son évolution (Abbo *et al.,* 2014). Cette pratique, maintenant largement développée, est indissociable de la domestication de certaines espèces de plantes, qui consiste à isoler des individus d'une population sauvage afin de sélectionner des traits d'intérêt (Purugganan and Fuller, 2009). Les premières traces de domestication sont datées de la transition entre le Paléolithique et le Mésolithique, plus de 10 000 ans avant notre ère (D. Hayward *et al.,* 1993). Pendant des siècles la domestication a été perpétrée de manière empirique, puis certaines révolutions scientifiques, comme les travaux de Mendel, ont permis de concrétiser cette pratique et de poser les bases d'une nouvelle discipline ; la création variétale (Rao, 2004). Cette discipline consiste au développement de populations, appelées variétés, qui possèdent des caractères d'intérêt agronomique comme la productivité, la résistance aux stress biotiques et abiotiques, la valorisation de l'eau et de l'azote ou encore l'adaptation aux conditions de culture (Ceccarelli, 2015). La création variétale repose sur la recherche et le croisement entre elles de plantes aux traits phénotypiques différents et complémentaires, afin d'obtenir dans la descendance des individus contenant le maximum de gènes favorables pour les objectifs recherchés (Gallais and Bannerot, 1992). Cela est donc un concept faisant référence à une finalité qui est l'obtention, à partir de la diversité génétique existante, de nouvelles variétés aux caractéristiques agronomiques accrues. En revanche, si la finalité est la même, il existe plusieurs stratégies afin d'y parvenir. La sélection massale consiste à croiser de manière empirique entre elles les plantes ayant les caractères les plus intéressants, puis à sélectionner les meilleurs individus et ce sur plusieurs générations, permettant ainsi d'augmenter la valeur moyenne d'une population (Witcombe *et al.,* 1996). Cette méthode est la plus ancienne pratiquée et se trouve à l'origine de l'existence de nombreuses plantes cultivées aujourd'hui, dont le maïs (Wang *et al.,* 1999). En revanche, si elle est facile à mettre en place, elle n'est pas applicable avec des caractères ayant une faible héritabilité et ne permet pas l'obtention de variétés à proprement parler, de par la persistance d'une certaine variabilité entre les individus. Afin de remédier à cette limite et d'optimiser les processus de sélection, d'autres méthodes basées sur la réalisation de croisements contrôlés se sont développées, telles que les sélections récurrente et généalogique

conduisant toutes deux à l'obtention de lignées fixées, c'est-à-dire homozygotes pour l'ensemble des gènes (Allard and Allard, 1999). Ces dernières décennies, avec l'essor des outils modernes de sélection et les progrès de la génomique et de la biologie moléculaire, l'innovation variétale est devenue une toute nouvelle discipline contribuant largement à l'évolution perpétuelle des systèmes de production agricole (Schaart *et al.,* 2016).

Tandis qu'il a fallu près de 10 000 ans pour que la production céréalière mondiale atteigne un milliard de tonnes par an, seulement cinquante ans, entre 1950 et 2000, auront été nécessaires pour que celle-ci soit doublée (Evenson and Gollin, 2003; Khush, 2001). Cette augmentation impressionnante des rendements durant la « révolution verte » est due à de nombreux facteurs comme l'utilisation massive d'intrants, la mécanisation des pratiques agricoles et la sélection variétale (Duvick, 2005). En revanche, si elle a largement contribué à subvenir aux besoins alimentaires des populations durant la période de l'après-guerre, la révolution verte a également conduit à la pollution des sols et des aquifères, la diminution de la biodiversité, l'émission de gaz à effet de serre et l'épuisement des ressources naturelles (Tilman, 1998; Zeng *et al.,* 2014). Ainsi, dans le but de limiter les conséquences associées aux méthodes de production intensives, il apparaît que le modèle agricole doit être remis en question afin de répondre aux besoins alimentaires de manière durable, d'une population en constante augmentation (Alexander *et al.,* 2015; Alexandratos and Bruinsma, 2012; Floros *et al.,* 2010). En effet, la FAO (Food and Agriculture Organization) prévoit un passage de la population mondiale de 7,6 milliards en 2017 à 9,6 milliards en 2050, avec une augmentation de 50% des besoins alimentaires mondiaux. Il apparaît donc que les disciplines telles que l'amélioration génétique des plantes ont un rôle-clé à jouer dans la transition et la métamorphose des pratiques agricoles avec la mise sur le marché de nouvelles variétés plus adaptées à des pratiques culturales durables (Crossa *et al.,* 2017).

I.1.2 - Le maïs, une culture à fort intérêt agronomique

Le maïs (*Zea mays* L.), est une plante herbacée annuelle, diploïde (2n = 10), possédant un système photosynthétique de type C4, de la famille des Poacées. La plante est de taille variable selon les espèces, allant de quarante centimètres jusqu'à plusieurs mètres pour certaines espèces tropicales. La tige lignifiée est unique et constituée d'entrenœuds séparés par des nœuds repartis de manière alterne (Kiesselbach, 1949). A l'aisselle de chacun de ces nœuds vont se développer des feuilles typiques des Poacées, c'est-à-dire avec une gaine enserrant la tige et un limbe allongé contenant des nervures parallèles et à la base duquel se retrouvent des petites ligules (Sangoi, 2001). Le système racinaire est fasciculé avec un grand nombre de racines adventives qui

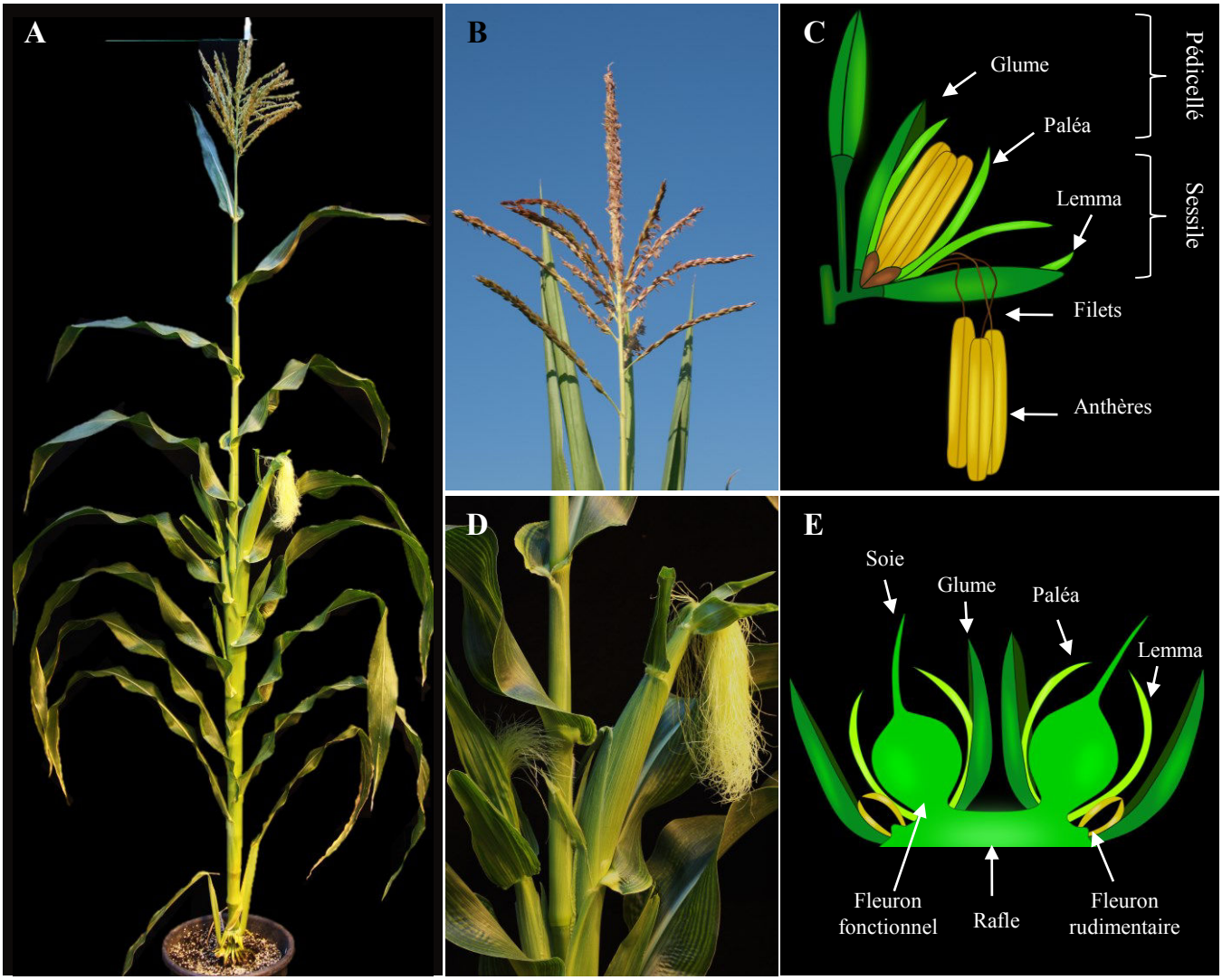


Figure I-1 : **Le maïs, une plante monoïque.**
Les inflorescences mâles et femelles chez le maïs sont contenues sur une même plante mais à des positionnements différents ; les inflorescences mâles sont regroupées dans une panicule terminale, située au sommet de l'axe principal de la tige de la plante et les inflorescences femelles sont situées dans des épis à la base latérale des feuilles médianes. Les inflorescences sont constituées des épillets contenant deux paires de fleurons, renfermant les organes reproducteurs.
A : Plante entière de maïs, **B** : Panicule de maïs produisant du pollen, **D** : Epi femelle de maïs après la sortie des soies, prêt pour la pollinisation. Photos de Jeanne Loue-Manifel, RDP, ENS.
C, E : Représentations schématiques **C** : d'un épillet mâle et **E** : de deux épillets femelles. Les épillets sont organisés par paires et sont constitués d'un fleuron supérieur et d'un fleuron inférieur. Concernant les paires d'épillets mâles, l'un sera pédicellé (inséré avec un pédoncule) et l'autre sessile. Dans les inflorescences femelles le fleuron inférieur va avorter. Les fleurons sont constitués de deux glumes de protection ainsi que de deux glumelles, le lemma et la paléa.
Schémas adaptés à partir de la base d'images du site internet : https://www.biologievegetale.be/.

s'initieront sur les nœuds situés à la base de la tige, formant des réseaux racinaires successifs (Hochholdinger *et al.,* 2018). Concernant le mode de reproduction, le maïs est une espèce majoritairement allogame et monoïque (Randolph, 1936). Les inflorescences mâles sont regroupées dans une panicule terminale située au sommet de l'axe principal de la plante et les inflorescences femelles sont situées dans des épis positionnés à la base latérale des feuilles médianes. Les inflorescences mâles et femelles sont constituées de multiples fleurons, des structures florales caractéristiques des Poacées (figure I-1) (Li and Liu, 2017) .

Le maïs s'intègre parmi les cultures exploitées pour leurs caractéristiques agronomiques les plus anciennes, puisque les premières traces de domestication au Mexique remontent à plus de 9000 ans (Wang *et al.,* 1999). De nombreuses études, basées sur des recherches de ressemblances génétiques consentent à dire que l'ancêtre du maïs est la téosinte, une plante proche génétiquement mais différente morphologique sur plusieurs aspects dont des épis de petite taille (Doebley and Stec, 1991; Doebley *et al.,* 1995; Wang *et al.,* 2015). L'apparition de mutations génétiques spontanées et la sélection massale pratiquée par les Amérindiens durant de nombreuses générations seraient à l'origine du maïs tel qu'il est connu aujourd'hui. Sa culture se serait alors progressivement rependue à l'ensemble du continent Américain pour atteindre l'Europe lors de l'empire colonial au XIVème siècle (Doebley, 2004; Stitzer and Ross-Ibarra, 2018). En raison d'un long processus de domestication et de nombreux travaux de sélection, la panoplie de variétés de maïs disponible de nos jours est très large (Lu *et al.,* 2009). Les variétés modernes résultent de la combinaison de groupes génétiques complémentaires connus (hétérotiques), incluant notamment les groupes « cornés » et « dentés », en référence à la forme du grain (M. Fan *et al.,* 2009). Ces variétés présentent des caractéristiques très variées, tant sur les rendements que sur la précocité de floraison ou les résistances à des stress biotiques et abiotiques, faisant de cette espèce un pilier de l'agriculture mondiale. Le maïs est principalement utilisé comme source d'alimentation animale et humaine, et par l'industrie afin de produire des bioplastiques, des biogaz ou encore des biocarburants (Sharma and Wardhan, 2017). Le maïs est, avec le riz (*Oryza sativa*) et le blé tendre (*Triticum aestivum*), l'une des trois céréales les plus cultivées à l'échelle mondiale. En 2016, la FAO estime que plus de 1,06 milliard de tonnes de maïs ont été produites à l'échelle mondiale contre 751 millions de tonnes en 2007. Cette production est répartie entre les cinq continents avec 52,9% en Amérique, 28,5% en Asie, 11,4% en Europe, 7,1% en Afrique et 0,1% en Océanie. Ces chiffres considérables illustrent l'importance économique et agronomique de cette culture et la demande toujours grandissante de l'optimisation des processus de production. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles

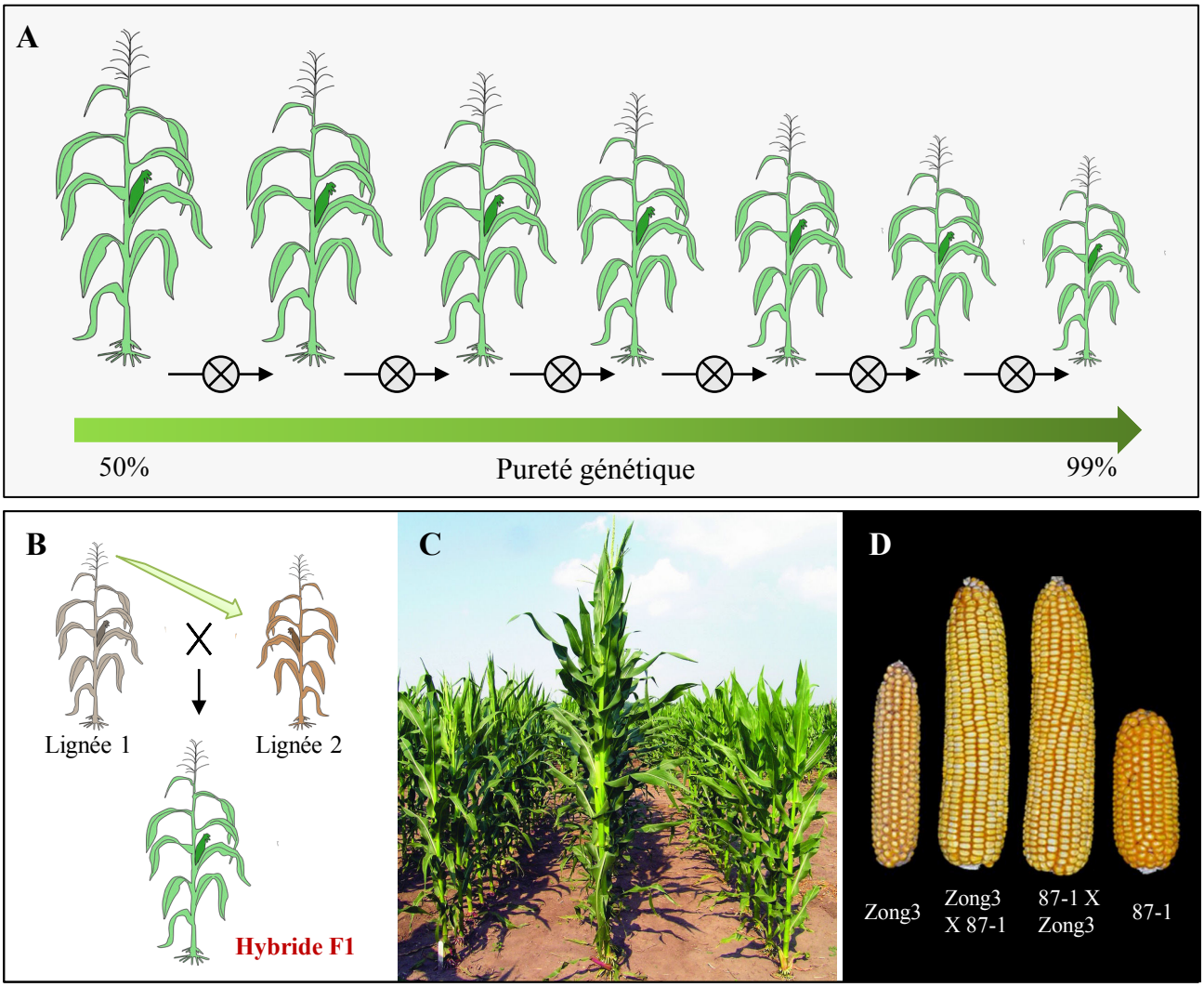


Figure I-2 : **Représentations schématiques de la dépression de consanguinité et de l'effet d'hétérosis.**
Chez le maïs, les successions d'autofécondations entraînent une dépression de consanguinité, c'est-à-dire une baisse des aptitudes agronomiques alors que l'effet d'hétérosis, obtenu par les croisements entre elles de lignées ou de population éloignées conduit à une augmentation de ces aptitudes.
A : Représentation schématique de l'effet de la consanguinité chez le maïs, la diminution des taux d'hétérozygoties entraîne des pertes des aptitudes agronomiques. Des autofécondations (symboles avec des croix noires) successives sont réalisées à partir d'une plante hydride hétérozygote. Adapté de Prasanna *et al.,* (2012).
B-D : Illustration de l'effet d'hétérosis chez le maïs, **B** : représentation schématique de l'effet d'hétérosis, le croisement entre elles de deux lignées fixées (plantes homozygotes) entraîne de meilleures aptitudes agronomiques dans la descendance hybride (hétérozygote), **C** : photo illustrant la vigueur hybride obtenue dans la descendance (au centre) après des croisements entre deux lignées fixées ; B73 (à gauche) et MO17 (à droite). La photo provient du site internet : http://nativetraits.blogspot.com/, **D** : Epis provenant de croisements réciproques entre deux lignées fixées, Zong3 et 87-1 ; les épis obtenus dans la descendance ont des meilleurs rendements en grains et des grains plus gros en comparaison aux lignées parentales (Xing *et al.,* 2015).

variétés de maïs constitue une discipline majeure dans une filière en essor continu (Sharma and Wardhan, 2017).

I.1.3 - L'amélioration variétale du maïs : hybrides et technologie des haploïdes doublés

I.1.3.1 - Effet d'hétérosis et lignées hybrides

Le maïs est une espèce majoritairement allogame, c'est-à-dire que la fécondation croisée entre différentes plantes est largement privilégiée aux autofécondations de mêmes plantes (Kiesselbach, 1949). Cette allogamie empêche les populations de se maintenir génétiquement à l'identique au cours des générations qui se succèdent et favorise ainsi des taux d'hétérozygotie élevés (Souza Jr, 2011). Deux caractéristiques seront associées à ce mode de reproduction ; la dépression de consanguinité et l'effet d'hétérosis (vigueur hybride), qui influenceront considérablement le choix des méthodes de sélection appliquées (Gallais, 1988; Lariepe *et al.,* 2012) (figure I-2). Ainsi, au début du XXème siècle, Shull (1908) et East (1908), constatèrent de manière indépendante que la consanguinité chez le maïs, résultant de la succession de plusieurs cycles d'autofécondations, entraînait une baisse des aptitudes agronomiques dans la descendance ; c'est la dépression de consanguinité (East, 1908; Shull, 1908). Parallèlement, les auteurs ont également observé que les croisements entre différentes populations éloignées entraînaient un accroissement des performances agronomiques dans la descendance, provenant d'un effet génétique qui sera plus tard nommé, l'effet d'hétérosis (Shull, 1914). Shull, (1908) suggéra que les meilleurs individus d'une population devaient très certainement correspondre à des génotypes fortement hétérozygotes, donnant une explication à l'impossibilité de fixer par des successions d'autofécondations la vigueur des plantes les plus intéressantes dans une population (figure I-2A). En revanche, il remarqua également qu'il était possible de reproduire de façon stable les lignées obtenues par autofécondations et ensuite de croiser les différentes lignées entre elles afin de reproduire à grande échelle des individus hétérozygotes vigoureux qui existaient au départ dans la population, posant ainsi les bases de la notion de lignées hybrides (figure I-2B) (Crow, 1998). Plus tard, il fut défini que l'hétérosis était un effet de stimulation dû à l'association d'éléments gamétiques différents (Shull, 1948). La culture du maïs repose massivement sur la production d'hybrides (Crow, 1998; Lee and Tracy, 2009; Xing *et al.,* 2016), puisque ceux-ci possèdent des avantages considérables en comparaison aux lignées et aux variétés populations, tels que des traits agronomiques accrus par rapport aux lignées parentales, une homogénéité des individus et la possibilité de regrouper dans un génotype plusieurs

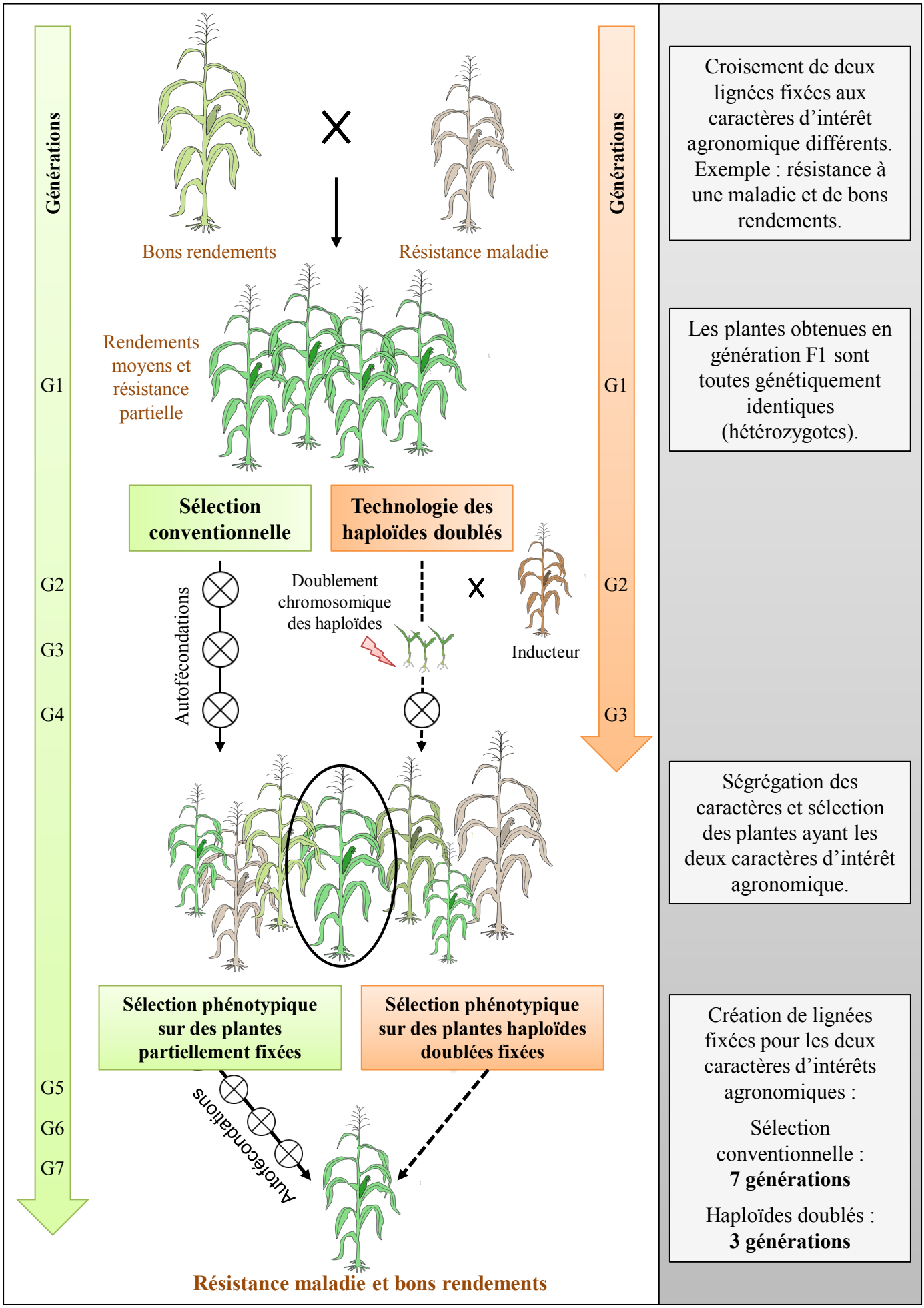


Figure I-3 : **Comparaison schématique et simplifiée de deux stratégies de sélection permettant l'obtention de lignées fixées.** En vert : exemple d'un schéma de sélection conventionnelle (Single Seed Descent, SSD), en orange : technologie des plantes haploïdes doublées *via* l'utilisation des lignées inductrices d'haploïdes. Illustration de la plante de maïs : Nicolas Doll, RDP, ENS.

caractères parentaux d'intérêt (Fujimoto *et al.,* 2018; Gallais, 1988; Lariège *et al.,* 2012). La création d'une variété hybride se déroule en trois étapes majeures qui sont ; l'obtention des lignées fixées parentales, l'évaluation de l'aptitude à la combinaison entre ces lignées, c'est-à-dire la recherche en prenant en compte l'additivité et l'épistasie qui représentent les effets d'interaction entre les allèles déterminants le caractère, des meilleures combinaisons de croisements possibles et pour finir l'évaluation agronomique des hybrides générés (Lariège *et al.,* 2017; Sprague and Tatum, 1942). L'une des grandes difficultés, économique et temporelle, de ce processus de sélection réside dans l'obtention des lignées parentales fixées, donc stables et homogènes au fil des générations (Forster *et al.,* 2007). Chez le maïs, les programmes conventionnels de sélection sont généralement réalisés à partir de populations en ségrégation de seconde génération provenant du croisement de deux plantes d'intérêt, de rétrocroisements ou de populations synthétiques issues de croisements plus ou moins complexes entre des lignées élites. La base génétique du matériel de départ peut varier d'une population composée de deux parents à une population composée d'un grand nombre de parents (Gallais and Bannerot, 1992). Le choix des schémas de sélection et les stratégies mises en place seront largement optimisés par la réalisation d'une estimation de la valeur variétale d'un croisement de départ et la connaissance de la structure génétique d'une population (Kadam *et al.,* 2016). Pour les caractères à hérédité quantitative, une population peut être caractérisée par sa moyenne et sa variance dont l'étude de leurs variations apportera des informations sur l'origine des effets génétiques contrôlant les caractères d'intérêt (Gallais, 1988).

Quels que soient les schémas de sélection mis en place, des cycles d'autofécondations successifs, qui demandent généralement six à huit générations, seront nécessaires afin d'atteindre la fixation quasi complète du génome, conduisant à l'obtention de lignées fixées dites « lignées pures ». Par exemple, une stratégie courante afin d'obtenir des lignées fixées réside en la réalisation d'autofécondations en filiation monograine (SDD ; Single Seed Descent), c'est-à-dire en la production de plusieurs lignées représentatives d'une population dans le but de sélectionner les traits d'intérêt sur des lignées partiellement fixées (figure I-3) (Bordes *et al.,* 2007). En revanche, comme la majorité des stratégies de sélection conventionnelles, cette méthode nécessite des temps de génération longs avant son aboutissement (Chang and Coe, 2009).

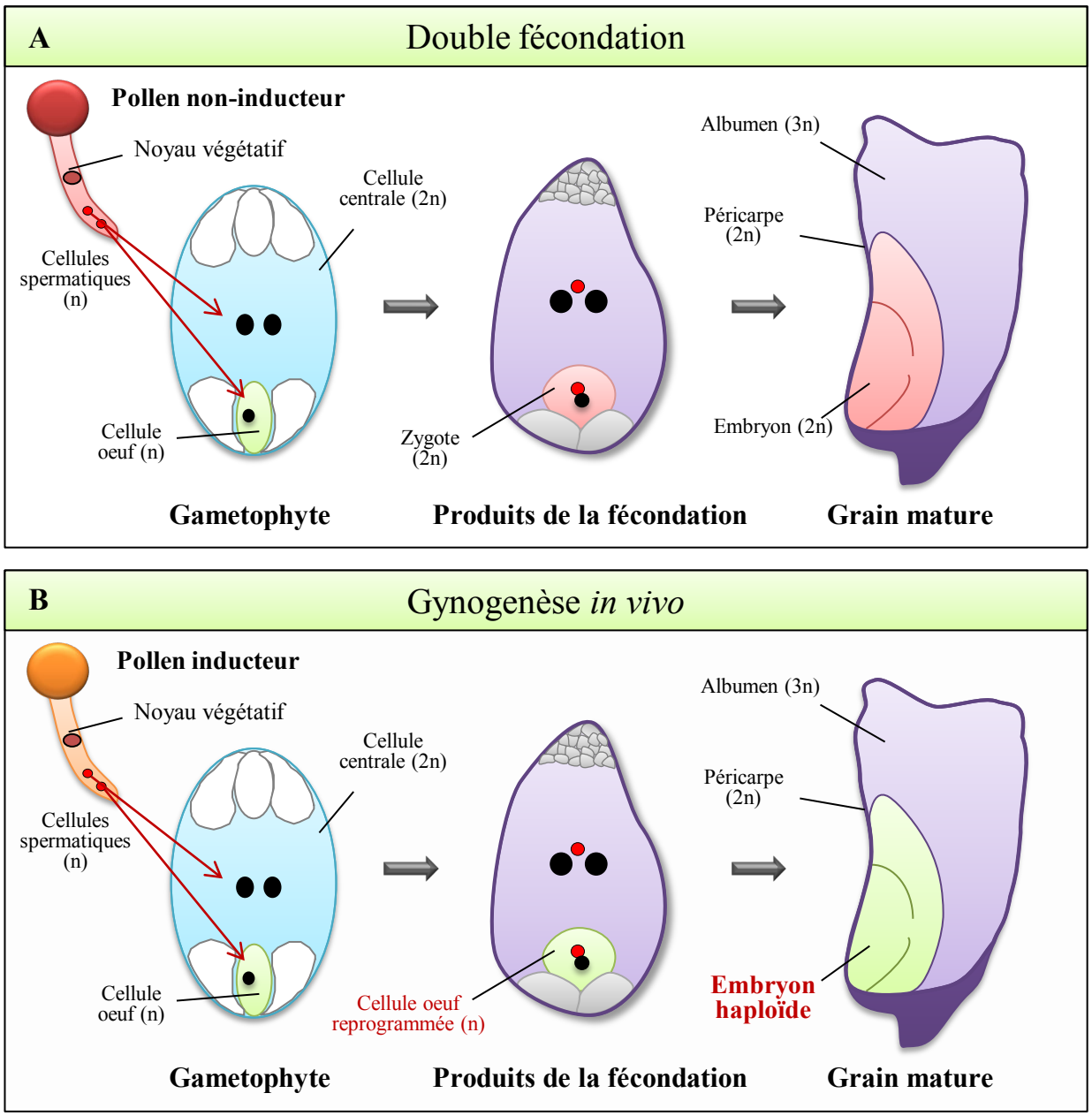


Figure I-4 : **Comparaison d'un processus de double fécondation normale avec la gynogenèse *in vivo* chez le maïs.**
A : Chez les plantes à fleurs, la reproduction sexuée est caractérisée par un processus de double fécondation avec deux évènements de fusion différents entre les gamètes mâles et femelles ; une cellule spermatique haploïde (n), dans cet exemple provenant du pollen d'une lignée non-inductrice d'haploïdes, va fusionner avec la cellule œuf haploïde afin de former l'embryon diploïde (2n) et l'autre cellule spermatique va fusionner avec la cellule centrale diploïde pour donner l'albumen triploïde (3n). **B** : Dans le cas d'une pollinisation avec du pollen provenant d'une lignée inductrice d'haploïdes, il y a un problème lors de la fécondation de la cellule œuf, conduisant au déclenchement de la gynogenèse *in vivo* dont résultera un embryon haploïde, contenant uniquement les stocks chromosomiques maternels. Adapté de Gilles et al., (2017)b.

I.1.3.2 - La technologie des plantes haploïdes doublées (HD), un outil de choix dans la création de nouvelles variétés de maïs

Une autre méthode de sélection, basée sur une technologie appelée plantes « Haploïdes Doublées » (HD), utilise des déviations de la reproduction sexuée des plantes afin d'éviter le brassage génétique entre les génomes maternel et paternel survenant lors de la fécondation (Geiger and Gordillo, 2009). Cette technologie permet de réduire considérablement les schémas de sélection par l'obtention de lignées fixées en seulement trois générations (figure I-3). Celle-ci repose sur l'obtention de plantes haploïdes, c'est-à-dire qui ne possèdent qu'un seul exemplaire de chaque chromosome, provenant de l'un des deux parents (maternel ou paternel), dans un processus nommé l'haploïdisation (Chang and Coe, 2009). Par la suite, les individus haploïdes pourront subir un doublement du stock chromosomique, basé sur une altération de la division cellulaire mitotique (spontanée ou artificielle), dans un processus nommé la diploïdisation (Antoine-Michard and Beckert, 1997). L'association de l'haploïdisation et de la diploïdisation, pouvant être nommée l'haplodiploïdisation, conduit donc à l'obtention de plantes « Haploïdes Doublées » (HD) (Prasanna *et al.,* 2012), qui seront abordées plus en détails dans la partie I-3. Deux techniques, dérivant de la reproduction sexuée des plantes, sont actuellement utilisées dans les schémas de sélection chez le maïs afin d'obtenir des individus haploïdes ; l'androgenèse et la gynogenèse. L'androgenèse permet le développement *in vitro* des microspores haploïdes contenues dans le pollen immature en plantules haploïdes, alors que la gynogenèse *in vivo* provoque celui de la cellule œuf maternelle en embryon haploïde. La gynogenèse *in vivo* est la stratégie privilégiée dans la filière maïs. Celle-ci s'appuie largement sur l'utilisation de lignées particulières dites « inductrices d'haploïdes » qui lorsqu'elles sont utilisées en parents mâles déclenchent chez la femelle le développement, à partir des cellules œufs, d'une certaine proportion d'embryons haploïdes ne contenant que les chromosomes maternels (figure I-4). Ce processus se déroulant entièrement *in vivo,* possède de nombreux avantages par rapport aux méthodes *in vitro*, incluant des coûts de production plus faibles, une facilité de géstion du matériel biologique et surtout une application sur des fonds génétiques récalcitrants à la régénération *in vitro*. Les lignées inductrices d'haploïdes sont maintenant largement développées dans les programmes de sélections à travers le monde et constituent un pilier de la filière de l'innovation variétale du maïs (Chang and Coe, 2009; Liu *et al.,* 2016; Prasanna *et al.,* 2012). En revanche, le processus à l'origine d'une déviation de la reproduction sexuée conduisant au déclenchement de la reprogrammation de la cellule œuf en embryon haploïde reste encore très énigmatique et sera au centre de ce projet de recherche.

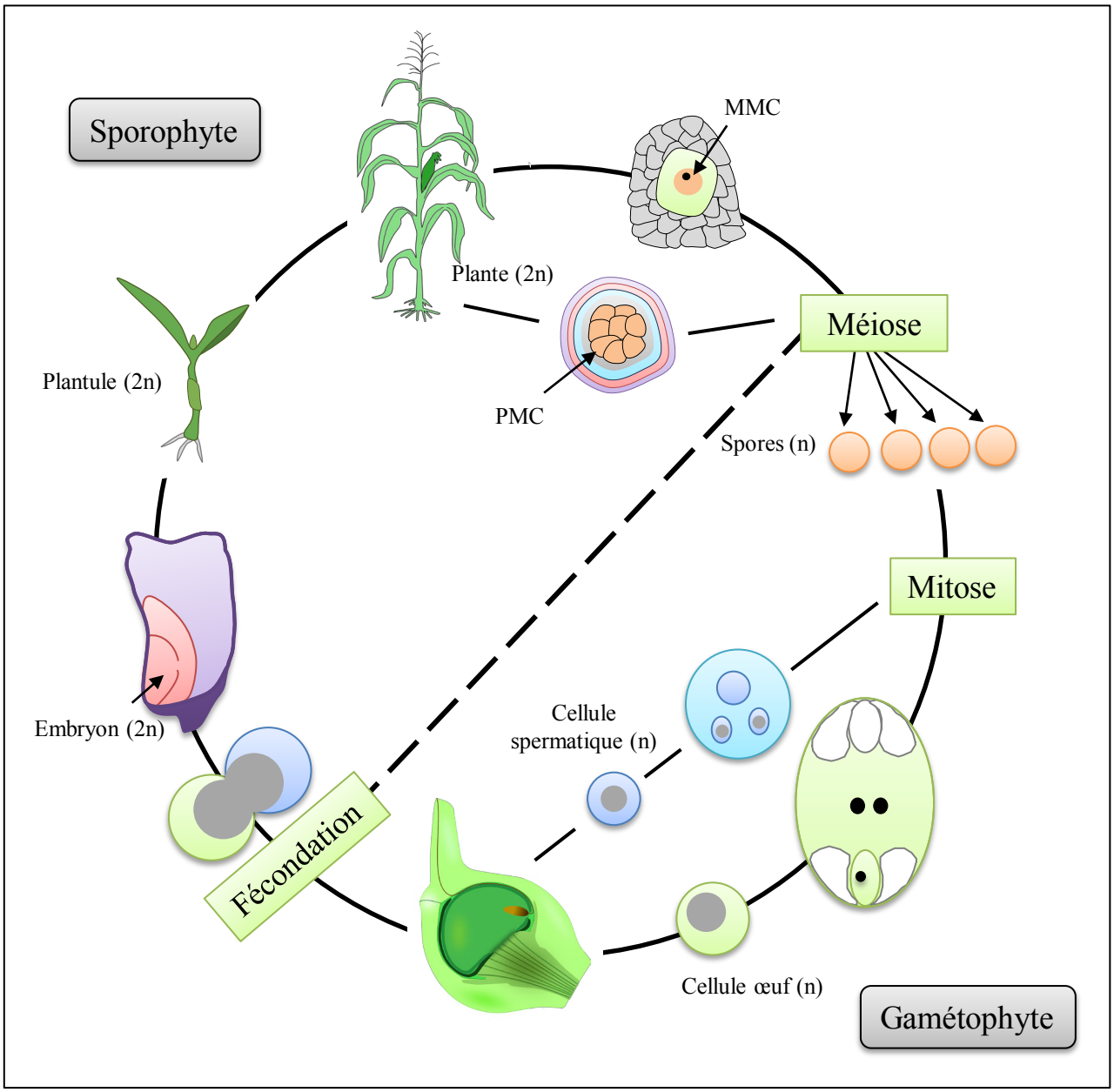


Figure I-5 : **Le cycle de vie haplo-diploïde des plantes : l'exemple du maïs.**
Le cycle de vie des plantes est basé sur une succession de phases haploïdes et diploïdes, conduisant respectivement à la formation des gamétophytes et des sporophytes. La phase sporophytique comprend deux sous-phases ; la phase végétative avec la production d'organes végétatifs et la phase reproductive avec la formation des organes reproducteurs. Dans les primordia des organes floraux mâles et femelles, vont respectivement se différencier les cellules-mères des pollens (PMCs) et la cellule mère des macrospores (MMC), qui vont subir deux cycles de méioses successifs afin de donner des spores haploïdes (n). Ces spores vont alors subir des divisions mitotiques pour former les gamétophytes qui contiendront les gamètes haploïdes. Lors de la fécondation les gamètes mâles et femelles vont fusionner pour donner l'embryon diploïde (2n). Adapté de Berger and Twell, (2011).

I.2 - La reproduction sexuée chez les angiospermes

Le cycle de vie des plantes est basé sur une succession de phases haploïdes et diploïdes, conduisant respectivement à la formation des gamétophytes et des sporophytes. La vie post-germination du sporophyte peut être divisée en deux sous-phases de développement ; la phase végétative, se caractérisant par la production d'organes végétatifs, essentiels à un mode de vie sessile et la phase reproductive, définie par la production des organes sexuels (figure I-5) (Berger and Twell, 2011). Chez les animaux, les gamètes sont les produits directs de la méiose conduisant à la formation de la cellule œuf et des spermatozoïdes qui vont fusionner afin de donner le zygote. En revanche, chez les angiospermes, les gamètes dérivent d'une méiose suivie d'une succession de divisions cellulaires mitotiques supplémentaires (Zhou *et al.,* 2017). Ces différentes divisions aboutissent à la formation d'un gamétophyte, dont les noyaux des cellules qu'il contient sont haploïdes, c'est-à-dire avec un nombre de chromosomes égal à la moitié de celui de l'espèce considérée. Certaines cellules des gamétophytes constitueront les gamètes : les deux cellules spermatiques côté mâle et les cellules œuf et centrale côté femelle. Les premières étapes de la mise en place des lignées germinales mâle et femelle vont présenter des grandes similitudes. Les cellules hypodermiques dans les primordia floraux mâles et femelles vont générer des cellules archesporiales, qui seront des précurseurs respectivement de la cellule mère des pollens (PMC, Pollen Mother Cell) et de la cellule mère des macrospores (MMC, Megaspore Mother Cell) (Berger and Twell, 2011). Ces cellules subiront alors des divisions cellulaires qui conduiront à la formation des gamétophytes et des gamètes matures (figure I-5). La formation des lignées germinales sera régulée différentiellement aux niveaux spatial et temporel et sera fortement dépendante de la synchronisation développementale s'opérant entre les tissus sporophytiques et gamétophytiques (Ma and Sundaresan, 2010).

La reproduction sexuée est décrite comme la fusion des deux gamètes haploïdes (n) afin d'initier le développement d'un nouvel organisme diploïde (2n). Le mixage s'opérant entre les génomes mâle et femelle lors de cette étape cruciale, constitue un élément-clé dans le succès de l'évolution des organismes. La reproduction sexuée chez les angiospermes est caractérisée par un processus unique de double fécondation, qui consiste en deux événements de fusion indépendants entre les gamètes mâles et femelles, aboutissant à la formation des deux principaux composants du grain : un embryon diploïde et un albumen triploïde (figure I-4). Le grain de pollen va produire un tube pollinique permettant l'acheminement des gamètes mâles haploïdes jusqu'au sac embryonnaire femelle (Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013). La fusion d'une cellule spermatique avec la cellule œuf haploïde va conduire à la formation de l'embryon alors

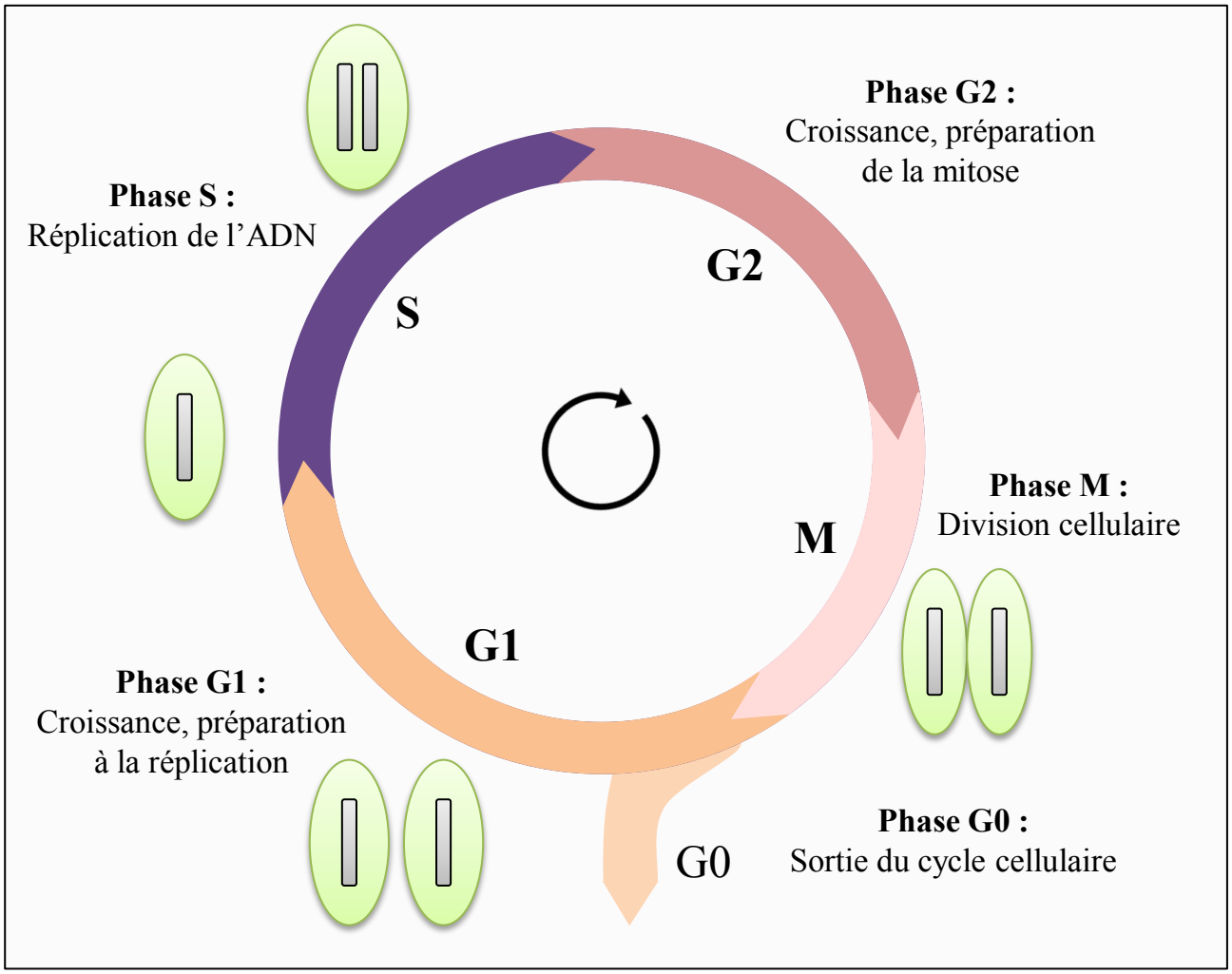


Figure I-6 : **Illustration schématique des différentes étapes du cycle cellulaire.**
Le cycle cellulaire est composé de trois phases majeures ; une phase de croissance de la cellule (G1), une phase de réplication de l'ADN (S), une phase de croissance et de préparation à la mitose (G2) et la division de la cellule, la mitose (M). La cellule pourra lors de la spéciation cellulaire sortir du cycle cellulaire (G0). Lors des transitions entre les différentes phases du cycle, il existe des points de contrôle où la cellule s'assure que tout est parfaitement mis en place pour que la réplication de l'ADN et la mitose se déroulent normalement. La transition entre les différentes phases est assurée par la régulation des complexes CDK-CYC.
Adapté du site internet : https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction, avec des informations provenant de Gutierrez, (2009) et Van Leene *et al.,* (2010).

que la fusion de la seconde cellule spermatique avec la cellule centrale diploïde entraînera le développement de l'albumen (Dresselhaus *et al.,* 2016). Dans cette partie, les mécanismes de la double fécondation chez les angiospermes, dont fait partie le maïs, de la formation des gamètes jusqu'à leur fusion, seront abordés afin de mieux appréhender les dérives s'opérant lors de l'induction d'haploïdes et plus particulièrement lors de la gynogenèse *in vivo*.

I.2.1 - Les divisions cellulaires, des étapes-clés dans la mise en place des lignées germinales mâles et femelles

Comme le sera abordé dans les prochains paragraphes, la mise en place des lignées germinales sera fortement dépendante de plusieurs divisions cellulaires, mitotiques et méiotiques, qui contribueront en association avec des mécanismes de spéciation cellulaire, à la formation des organes reproducteurs et des gamètes fonctionnels (figure I-5). La compréhension du processus de division cellulaire chez les plantes constituera donc un élément important afin de mieux appréhender les étapes en amont de la double fécondation (Ma and Sundaresan, 2010).

I.2.1.1 - Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire à l'origine de la coordination des divisions cellulaires, comporte deux phases fondamentales ; la mitose, qui est la division d'une cellule mère en deux cellules filles et l'interphase, correspondant à la période entre deux mitoses (Komaki and Sugimoto, 2012). Durant l'interphase la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN s'effectuent de manière coordonnée en vue de la division cellulaire s'effectuant lors de la mitose (phase M). Trois phases distinctes se succèderont pendant l'interphase : une phase de croissance de la cellule (phase G1), une phase de réplication de l'ADN (phase S) ainsi qu'une phase de croissance et de préparation à la mitose (phase G2) (figure I-6). En fin de phases G1 et G2, il existe des points de contrôle où la cellule s'assure que tout est parfaitement mis en place pour que la réplication de l'ADN et la mitose se déroulent normalement (Gutierrez, 2009). La transition entre les différentes phases est contrôlée par une famille de sérine/thréonine kinases : les CDKs (Cyclin Dependant Kinases), considérées comme des moteurs de la progression du cycle cellulaire. L'association des CDKs avec des protéines cyclines (CYCs) détermine leur activité kinase et donc la transition entre les phases du cycle (Churchman *et al.,* 2006). De nombreux complexes CDK-CYC différents peuvent être formés durant la progression du cycle cellulaire (Van Leene *et al.,* 2010). L'activité de ces complexes est contrôlée négativement par une famille de protéines connue sous les noms de CKIs (Cyclin Kinase Inhibitors) ou KRPs (Kip-Related Proteins) chez les plantes, qui par

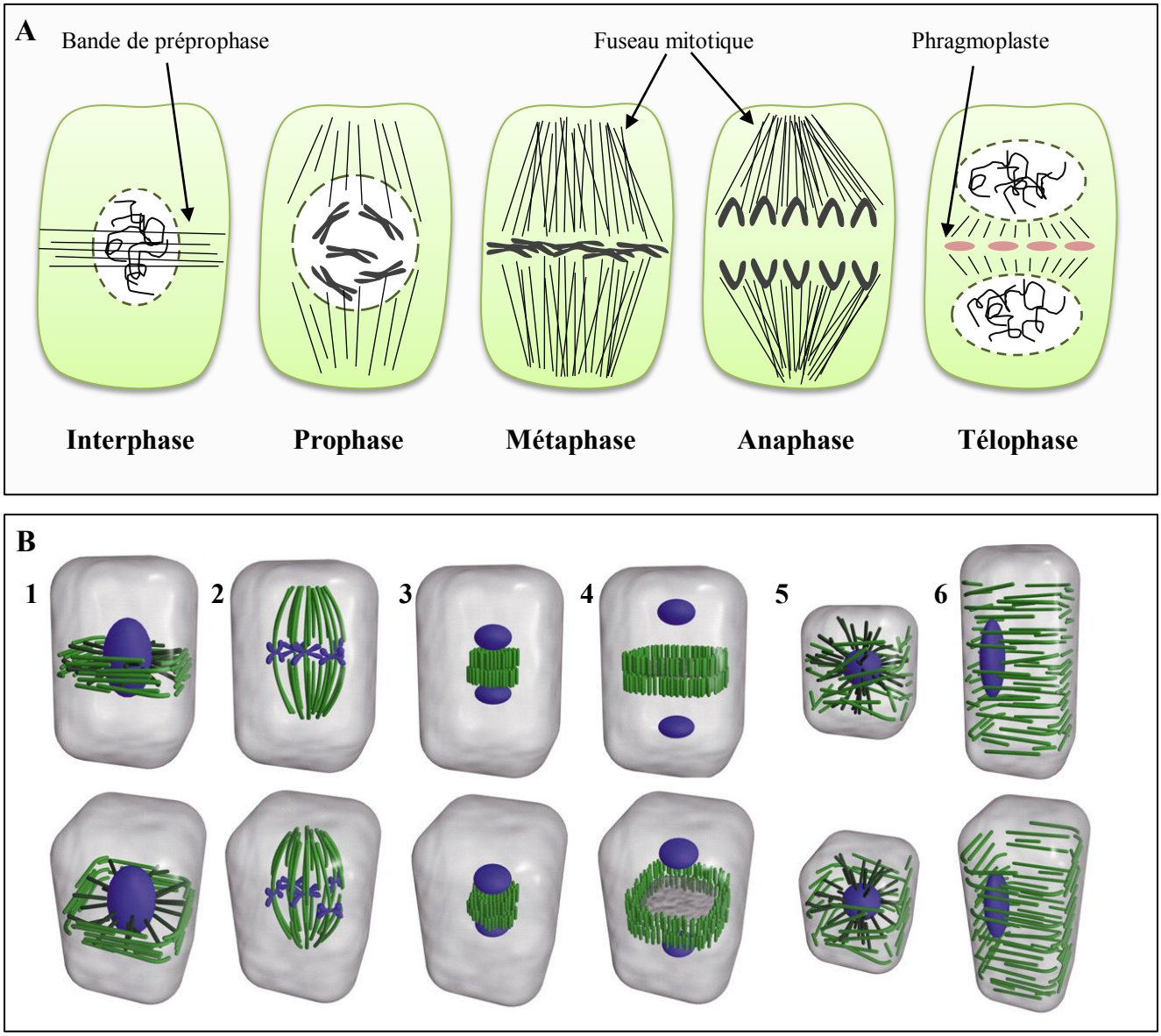


Figure I-7 : **Illustrations schématiques du processus de division mitotique dans les cellules végétales.**
A : La mitose se déroule en quatre étapes principales ; la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. A l'interphase les chromosomes sont décondensés. Dans les étapes en amont de la prophase, la bande de préprophase va se mettre en place autour du noyau. Lors de la prophase, les chromosomes se condensent, le fuseau mitotique commence à se mettre en place et l'enveloppe nucléaire se disloque progressivement. Pendant la métaphase, les chromosomes s'alignent perpendiculairement au plan métaphasique et à l'anaphase les deux chromatides-sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule grâce à l'action du fuseau mitotique composé de microtubules. Pour finir, lors de la télophase, un phragmoplaste va se mettre en place et délimitera le futur plan de division des cellules, les chromosomes se décondensent, l'enveloppe nucléaire se reforme et les membranes se mettent progressivement en place. Les microtubules sont représentés par des traits noirs.
B : Illustrations schématiques en trois dimensions montrant l'organisation des réseaux de microtubules à travers les différentes étapes de la mitose : (1) la bande de préprophase, liée au noyau par des microtubules marque le futur site de division, (2) le fuseau mitotique en métaphase avec une région polaire dispersée, (3) lors de la télophase, le phragmoplaste forme un cylindre concentré de microtubules entre les noyaux filles, (4) le phragmoplaste se dilate de manière centrifuge, entraînant la plaque cellulaire vers les sites de fixation précédemment établis par la bande de préprophase, (5) après la cytokinèse, les microtubules s'étendent du noyau vers le cortex cellulaire et des microtubules associés à la membrane plasmique apparaissent, (6) cellules végétales en interphase. Pendant l'élongation cellulaire, les microtubules corticaux sont généralement disposés en réseaux parallèles dont l'orientation prédominante est perpendiculaire à l'axe d'expansion. Les microtubules sont représentés en vert et l'ADN en violet. Illustrations provenant de Wasteneys *et al.,* (2002).

liaison au complexe CDK-CYC, inhibent son activité (Sherr and Roberts, 1999). De plus, des processus de phosphorylation/déphosphorylation médiés par des protéines kinases/phosphatases apportent un contrôle additionnel sur l'activité de ces complexes, avec une activation ou une inhibition des CDKs. De ce fait, c'est donc la formation, l'activation et la dégradation des complexes CDK-CYC qui permettent la régulation et la progression du cycle cellulaire à travers les différents points de contrôle (Gutierrez, 2009; Inzé and De Veylder, 2006).

I.2.1.2 - Les divisions mitotiques

Les divisions mitotiques sont essentielles aux développements des organismes multicellulaires. Bien que la mitose soit un processus biologique continu, elle peut être décrite en quatre étapes fondamentales ; la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase, durant lesquelles l'organisation chromosomique diffère largement (Tiang *et al.,* 2012) (figure I-7). Lors de l'interphase, les chromosomes sont décondensés et ne sont pas répartis de manière aléatoire dans la cellule mais généralement dans des territoires chromosomiques (Lysak *et al.,* 2001; Tiang *et al.,* 2012). Ainsi, chez la plupart des espèces possédant un génome de taille importante, dont fait partie le maïs, les chromosomes s'organisent selon une configuration particulière appelée « configuration de Rabl » dans laquelle les télomères et les centromères se disposent sur des côtés opposés de la cellule (Cowan *et al.,* 2001). En revanche chez *A.thaliana*, les chromosomes ne se disposent pas selon cette configuration mais s'organisent autour du noyau (Fransz *et al.,* 2002; Pawlowski, 2010). Durant la mitose, les chromosomes vont se condenser et se déplacer dans la cellule, puis les chromatides-sœurs résultant de la réplication de l'ADN vont ségréger de part et d'autre de la cellule. Ces mouvements sont contrôlés par les centromères, des régions spécifiques des chromosomes. Ces centromères possèdent des nucléosomes particuliers dans lesquels les histones H3 sont remplacées par des variants centromériques, CENH3 (Fang and Spector, 2005), très conservés chez les plantes (Zhong *et al.,* 2002).

Lors de la prophase, les chromosomes se condensent notamment *via* la phosphorylation des histones H3 (Wei *et al.,* 1999). A l'initiation de cette étape, survenant juste après la phase de réplication de l'ADN, les chromosomes sont constitués de deux chromatides-sœurs liées entre elles de manière cohésive au niveau de leurs régions centromériques. Cette connexion, essentielle dans les premières étapes de la mitose, est assurée par un complexe protéique nommé, cohésine, qui interviendra également lors de la ségrégation des chromosomes (Tanaka *et al.,* 2000). Ce complexe, très conservé entre les espèces, est composé de quatre sous-unités : deux protéines de maintien nommées STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 1, 3

(SMC1, 3) (Lam, 2005), une protéine de type α-kléisine qui assurera la liaison entre SMC1 et SMC3 et une protéine qui sera recrutée par le complexe ; SISTER CHROMATID COHESION3 (SCC3) (Nasmyth and Haering, 2005; Onn *et al.,* 2008; Schubert, 2009). Lors de la prophase, le fuseau mitotique, constitué de microtubules va se mettre en place suite à une réorganisation du cytosquelette (Pawlowski, 2010). Ce fuseau sera positionné de manière dépendante d'un anneau transitoire, composé de microtubules corticaux et de filaments d'actine, spécifique du plan de division cellulaire, nommé la bande de préprophase (figure I-7) (Pickett-Heaps and Northcote, 1966). La bande de préprophase, existant chez l'ensemble des végétaux, se forme en fin de phase G2 et persistera jusqu'à la rupture de l'enveloppe nucléaire en fin de prophase (Jürgens, 2005; Li *et al.,* 2015b). Celle-ci délimitera le plan de la division cellulaire et définira les sites d'insertion des nouvelles plaques cellulaires en fin de mitose (Rasmussen and Bellinger, 2018). De plus, le fuseau mitotique sera maintenu par une structure en forme de « cage » composée de filaments d'actine interconnectés avec les microtubules corticaux. Lors de la transition entre la prophase et la métaphase, l'enveloppe nucléaire se disloque, les chromosomes condensés se localisent au centre de la cellule et leurs centromères s'orientent perpendiculairement au plan de métaphase (Fang and Spector, 2005). Ce mouvement est permis grâce aux kinétochores, des complexes protéiques se formant au niveau des centromères et qui sont liés au cytosquelette microtubulaire. Au cours de la métaphase, les chromosomes se positionnent à l'équateur de la cellule pour former la plaque métaphasique (Foley and Kapoor, 2013; Yu *et al.,* 2000). La transition métaphase/anaphase nécessite la dégradation des cohésines, qui sera effectuée par le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome complex) (Inzé and De Veylder, 2006). Une fois les cohésines dégradées, les chromatides-sœurs peuvent commencer leur migration vers les pôles opposés de la cellule (Fang and Spector, 2005). Durant l'anaphase, celles-ci vont se séparer sous l'action des fuseaux mitotiques qui vont les tirer vers les pôles opposés la cellule, grâce à l'action des microtubules kinétochoriens. Au niveau des kinétochores, se trouvent des protéines motrices, incluant des myosines et des kinésines, utilisant des molécles d'ATP (adénosine-triphophate) afin de tracter les chromatides le long des microtubules qui eux, restent fixes (Lee and Liu, 2004). Enfin, lors de la télophase, les kinétochores et les microtubules liés se désagrègent et l'enveloppe nucléaire se reforme. Lors de cette étape, se produira la cytokinèse, qui correspond à la formation d'une nouvelle paroi cellulaire. Cette paroi se forme à partir d'un phragmoplaste initié par une fusion de vésicules golgiennes s'accumulant du centre de la cellule vers la périphérie (Wasteneys, 2002). Ce rassemblement sera médié par l'action des microtubules, qui définiront la position du phragmoplaste. Le phragmoplaste se raccordera à la paroi primaire de la cellule mère, provoquant ainsi sa division en deux cellules filles. La paroi

cellulaire et la membrane plasmique (formée à partir des membranes des vésicules golgiennes) des cellules filles se reformeront au niveau de cette séparation et le phragmoplaste se différenciera en paroi primitive (figure I-7B) (Li *et al.,* 2015b). Suite à leur décondensation les chromosomes présentent la configuration qu'ils avaient à l'interphase (Tiang *et al.,* 2012).

I.2.1.3 - Les divisions méiotiques

La méiose est une étape indispensable à la reproduction sexuée puisqu'elle permet l'obtention à partir d'une cellule diploïde (2n), la formation de quatre cellules haploïdes, c'est-à-dire ne contenant qu'une paire de chaque chromosome (n), qui seront à l'origine des gamètes mâles et femelles (Mercier *et al.,* 2015). La méiose se déroule selon une chronologie précise ; les chromosomes homologues vont s'associer en bivalents puis ségréger lors de la méiose I, dite réductionnelle, tandis que les chromatides-sœurs se sépareront lors de la méiose II, dite équationnelle (Mercier *et al.,* 2015). L'organisation spécifique des chromosomes, couplée à la cohésion puis à la séparation des chromatides, conditionnera leur répartition au cours des divisions méiotiques (Mainiero and Pawlowski, 2014). La liaison entre les chromatides-sœurs devra être maintenue durant l'ensemble de la méiose I et sera assurée par un complexe cohésine méiotique spécifique (Nasmyth and Haering, 2005; Onn *et al.,* 2008; Schubert, 2009).

La méiose réductionnelle, se déroule en quatre étapes majeures ; la prophase I, la métaphase I, l'anaphase I et la télophase I. La prophase I est l'étape la plus marquante de ce processus puisque c'est à ce moment-là que va se produire l'appariement des chromosomes et le déclenchement de recombinaisons homologues, à l'origine du brassage génétique. Cette étape est sous-divisée en cinq étapes dites ; leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacenèse (Hamant *et al.,* 2006). Lors du leptotène, les chromosomes vont s'individualiser, puis les télomères vont commencer à s'attacher à l'intérieur de la membrane nucléaire et se regrouper pour former des clusters (Harper *et al.,* 2004). De même, le complexe synaptonémal (CS), un complexe protéique essentiel à l'appariement des chromosomes homologues, va progressivement être mis en place (Zickler, 2006). Durant la transition leptotène-zygotène, un remodelage transitoire de la chromatine va s'opérer afin de faciliter les appariements homologues (Yang *et al.,* 2011). Les cassures double-brins de l'ADN qui initieront les recombinaisons se produiront également lors de cette transition. Après celle-ci, le zygotène va être initié durant lequel les chromosomes vont se condenser et les homologues vont s'apparier selon un processus appelé synapsis (Ronceret *et al.,* 2007). Lors de cette étape, les recombinaisons concrétiseraient les interactions entre les homologues en stabilisant les bivalents. En effet, il est très probable que les mécanismes de cassures double-brins, suivis de la recherche

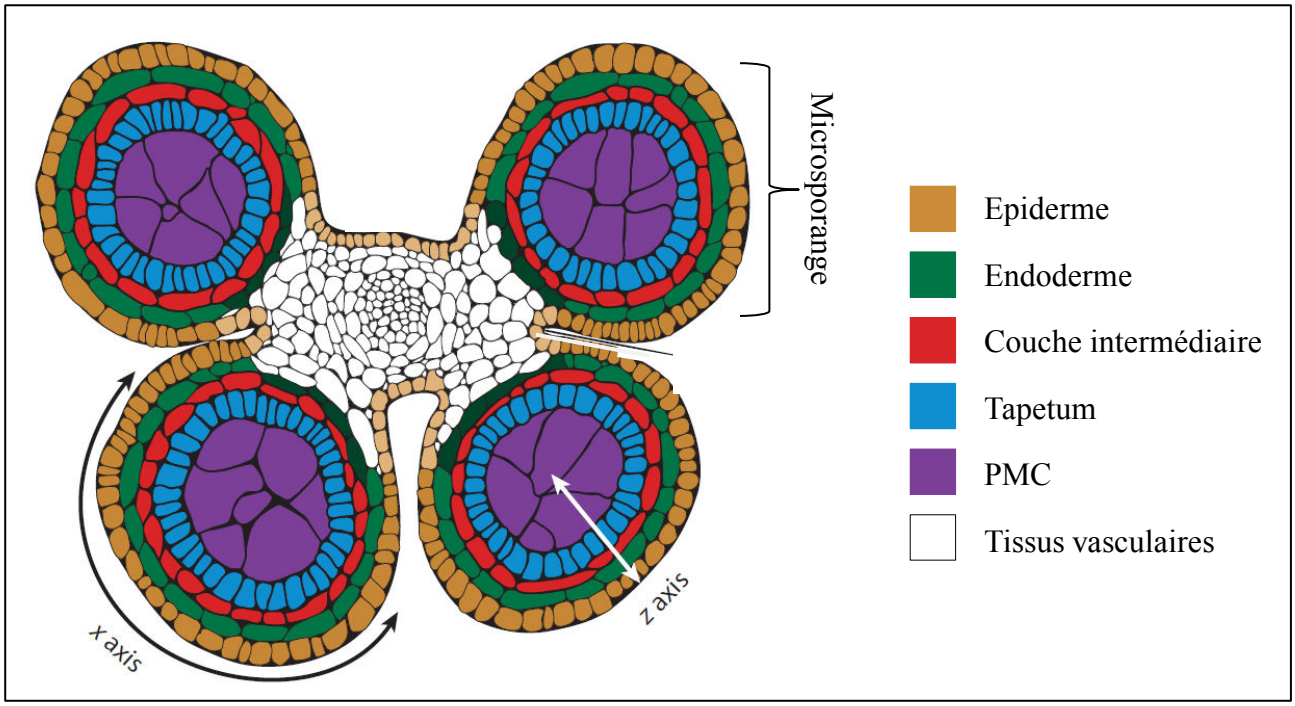


Figure I-8 : **Les anthères sont constituées de différents tissus sporophytes renfermant les PMCs.** Représentation schématique d'une coupe transversale d'anthère. Les anthères vont subir un processus de maturation qui conduira à la formation de quatre microsporanges qui constitueront les futurs sacs polliniques. Dans ces microsporanges, différents tissus, essentiels au développement des grains de pollen, vont se mettre en place par des successions de divisions cellulaires mitotiques, incluant de l'extérieur vers l'intérieur ; l'épiderme, la couche cellulaire intermédiaire, l'endothécium et le tapetum. Au centre, dans les locules, se trouvent les cellules-mères des pollens (PMC, Pollen Mother Cell), qui seront à l'origine des grains de pollen. Illustration provenant de Walbot and Egger (2016).

d'homologie et de recombinaisons réparatrices soient à l'origine de l'appariement entre les chromosomes homologues (Szostak *et al.,* 1983). La prophase I atteindra le stade pachytène lorsque les processus de synapsis seront achevés (Hamant *et al.,* 2006). Après le pachytène, le diplotène va être initié durant lequel le complexe synaptonémal va se dépolymériser, libérant ainsi les chromosomes. Dans la dernière étape, la diacynèse, les chromosomes associés en bivalents vont continuer leur condensation et l'enveloppe nucléaire va progressivement disparaitre (Mercier and Grelon, 2008). Les méiocytes vont alors entrer en métaphase I afin de continuer le cycle méiotique. Les étapes suivantes seront sensiblement similaires à celles observées lors d'une division mitotique, hormis le fait que les chromosomes homologues vont se séparer et non les chromatides-sœurs (Zamariola *et al.,* 2014). Après la première division méiotique, il y a aura une courte interphase sans réplication de l'ADN, puis la méiose équationnelle va être initiée. Cette méiose est très semblable à une division mitotique, puisque la cohésion est libérée au niveau des centromères permettant ainsi aux chromatides-sœurs de se déplacer (Pawlowski, 2010). Au final, quatre cellules filles haploïdes contenant une chromatide résulteront de l'ensemble de ce processus.

I.2.2 - Mise en place de la lignée germinale mâle

La formation de la lignée germinale mâle sera dépendante de la synchronisation qui s'opérera entre la mise en place des différents tissus de l'anthère lors des étapes pré-méiotiques et la formation des gamètes mâles (Kelliher *et al.,* 2014). La mise en place de ces tissus, incluant le tissu sporogénique à l'origine des PMCs et les tissus sporophytiques, se fera par des successions de divisions mitotiques suivies de spéciation cellulaire. A partir des PMCs obtenues, la formation des grains de pollen sera initiée. Celle-ci peut être dissociée en deux étapes majeures ; la microsporogenèse comprenant les étapes de maturation des PMCs en microspores et la microgamétogenèse correspondant à la phase de maturation des microspores en grains de pollen matures (Chang and Neuffer, 1989; Twell, 2011).

I.2.2.1 - Développement des anthères : la phase pré-méiotique

Les étamines proviennent de la différenciation d'un primordium à la surface du méristème floral (Bortiri and Hake, 2007). La partie supérieure de ce primordium va former l'anthère alors que la partie inférieure va donner le filet, une structure qui raccordera l'anthère au fleuron et permettra ainsi les échanges avec la plante mère (Li and Liu, 2017). Lors de la formation des anthères, quatre lobes vont se différencier et constitueront les microsporanges qui

contiendront les grains de pollen. Les étapes allant de la différenciation des tissus sporophytiques jusqu'à la formation des PMCs sont considérées comme des étapes pré-méiotiques (Kelliher *et al.,* 2014). Lors des premières étapes de maturation des anthères, trois couches cellulaires distinctes sont présentes dans le primordium de l'anthère, nommées de l'extérieur vers l'intérieur ; L1, L2 et L3 (Layer). Elles subiront une succession de divisions cellulaires mitotiques qui seront à l'origine de la formation des différents tissus (Feng and Dickinson, 2007). Une rangée de cellules spécifiques, nommées les cellules archesporiales vont se différencier dans la couche L2 sous-épidermique qui est entourée par la couche externe L1. Plus tard, la couche L1 formera l'épiderme et la couche L2 génèrera le tissu sporogénique (interne) et la couche cellulaire pariétale primaire (externe) (Kelliher *et al.,* 2014; Walbot and Egger, 2016). Les cellules du tissu sporogénique vont se diviser afin de donner naissance à de nombreuses PMCs. La couche pariétale primaire va quant à elle former l'endothécium, qui permettra le stockage de l'amidon dans les étapes pré-méiotiques et aura un rôle de soutien dans les étapes post-méiotiques, et la couche cellulaire pariétale secondaire (Kelliher and Walbot, 2011). Les cellules de cette dernière vont de nouveau se diviser afin de former une couche cellulaire intermédiaire et le tapetum, essentiel pour le développement de la lignée germinale (Zhang and Yang, 2014). Le tapetum chez le maïs est de type sécrétoire ; il sécrétera durant l'ensemble du processus de développement du pollen différents composés nourriciers et pariétaux (Li *et al.,* 2012). Pour résumer, les anthères vont subir un processus de maturation qui conduira à la formation de quatre microsporanges constitués de quatre couches cellulaires renfermant les PMCs, incluant de l'intérieur vers l'extérieur ; le tapetum, la couche cellulaire intermédiaire, l'endothécium et l'épiderme (figure I-8) (Walbot and Egger, 2016). Ces couches cellulaires constitueront des tissus essentiels au développement des gamétophytes mâles (Feng and Dickinson, 2010; Scott *et al.,* 2004; Zhang *et al.,* 2014).

Bien que l'ensemble des voies moléculaires sous-jacentes à la formation des différentes couches cellulaires de l'anthère n'ait pas encore été élucidé chez le maïs, certains gènes ont été identifiés comme étant majeurs. Ainsi, le gène *MALE STERILE CONVERTED ANTHER1* (*MSCA1*), codant pour une glutarédoxine (une oxydoréductase), a été identifié comme étant impliqué dans la maturation des tissus de l'anthère (Chaubal *et al.,* 2003). Les mutants *msca1* présentent des anthères déficientes en grains de pollen, en raison d'un défaut de différenciation des cellules hypodermiques en cellules archesporiales. Il est intéressant de noter que le phénotype du mutant *msca1* peut être restauré par une diminution de la quantité d'oxygène. De plus, une oxydation du milieu environnant entraîne une inhibition de la spécification cellulaire chez les plantes sauvages (Kelliher and Walbot, 2012). Ces travaux indiquent donc que

l'environnement cellulaire joue un rôle dans la spécification cellulaire et que les réactions d'oxydoréduction semblent être essentielles. De même, le gène *MULTIPLE ARCHESPORIAL CELL1* (*MAC1*) est un autre régulateur clé de la formation des cellules archesporiales. La mutation *mac1* entraîne une différenciation surnuméraire de cellules archesporiales au détriment des cellules somatiques et notamment des cellules du tapetum, conduisant ainsi à de sévères anomalies dans le développement des PMCs. Il semblerait que *MAC1* code pour une petite protéine qui serait sécrétée par les premières cellules archesporiales formées afin de contrôler la différenciation des suivantes et donc la prolifération cellulaire (Sheridan *et al.,* 1996, 1999; Wang *et al.,* 2012a). Le gène *OUTER CELL LAYER 4* (*OCL4*), codant pour un facteur de transcription exprimé dans l'épiderme, est quant à lui impliqué dans la différenciation cellulaire de l'endothecium. Le mutant *ocl4* présente une stérilité mâle due, entre autres, à une faible accumulation d'amidon dans les grains de pollen. Une analyse plus approfondie a montré que l'endothecium présentait une couche cellulaire supplémentaire, résultant d'une division anormale, lorsque la protéine OCL4 était absente des cellules épidermiques avoisinantes (Vernoud *et al.,* 2009), appuyant ainsi l'importance du devenir cellulaire et de l'interconnexion entre les différentes couches cellulaires de l'anthère. De manière plus globale, divers mutants affectés dans la mise en place de ces couches cellulaires ont été identifiés chez le maïs et présentent des anomalies lors de la formation des PMCs (Chaubal *et al.,* 2000; Moon *et al.,* 2013; Timofejeva *et al.,* 2013; Zhou *et al.,* 2017). L'ensemble de ces travaux illustrent l'importance de la coordination développementale et de la communication cellulaire s'opérant entre les différents tissus de l'anthère afin d'assurer la formation des PMCs fonctionnelles.

I.2.2.2 - La microsporogenèse : formation des microspores

Lors de la microsporogenèse, les PMCs diploïdes vont s'élargir et secrèter des matériaux pariétaux qui permettront la mise en place d'une paroi cellulaire cellulosique primaire (Bedinger, 1992; Hafidh *et al.,* 2016). Lors de la méiose deux divisions cellulaires successives se dérouleront conduisant ainsi à la formation de quatre microspores haploïdes organisées en tétrade (figure I-9) (Zhou *et al.,* 2017). Initialement, les PMCs sont reliées par des ponts cytoplasmiques, qui joueraient un rôle dans la synchronisation de la méiose. Durant la méiose, ces ponts vont se refermer en concomitance avec un remplacement de la paroi cellulaire primaire par une paroi cellulaire composée de callose (Chen and Kim, 2009; De Storme and Geelen, 2013; Lu *et al.,* 2014). La maturation des microspores sera fortement dépendante du tapetum, puisque les cellules tapétales, hautement actives sur le plan métabolique, sécrèteront des protéines, des lipides, des

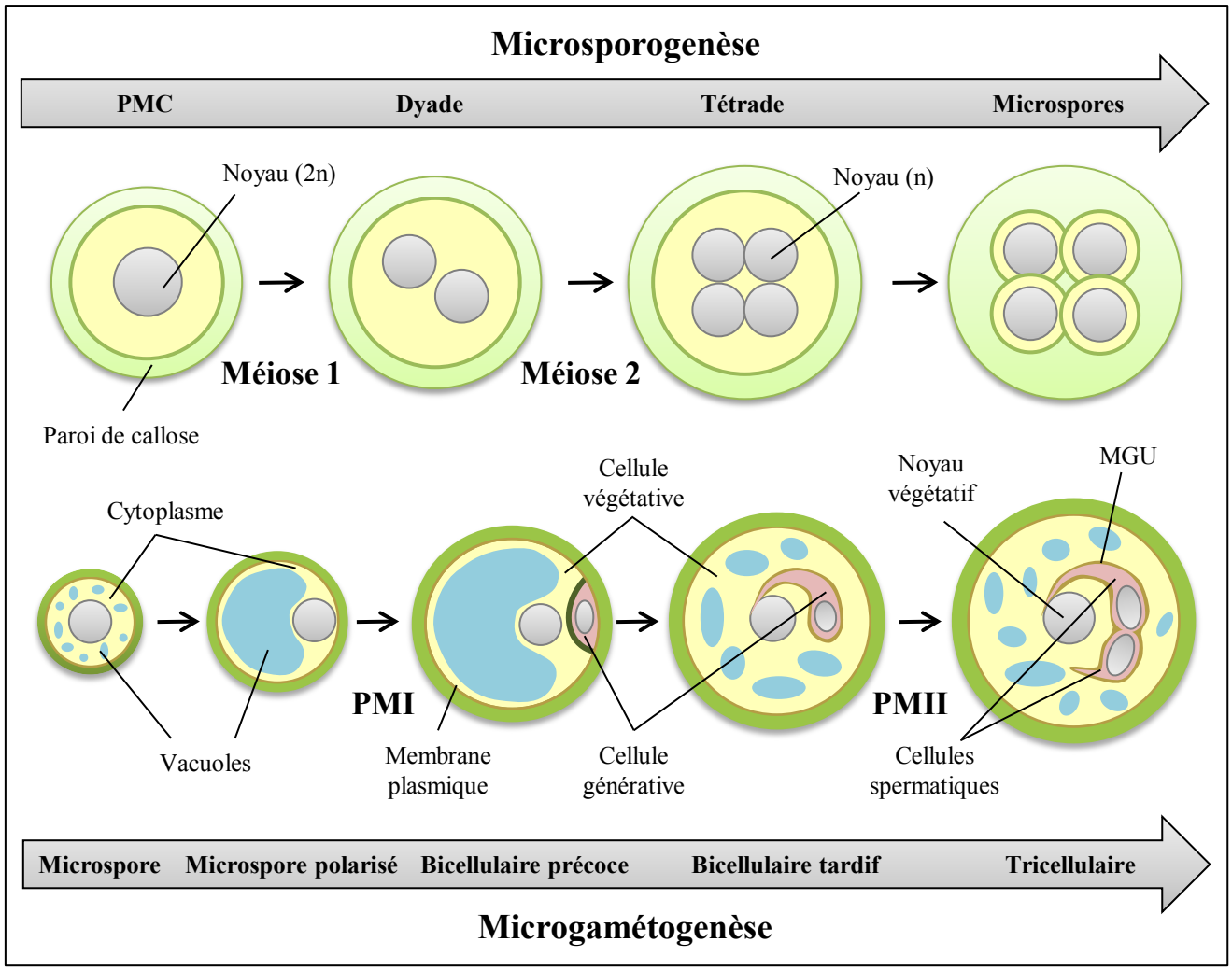


Figure I-9 : **Processus développemental du grain de pollen.**
Le développement du grain de pollen est caractérisé par deux étapes majeures ; la microsporogenèse et la microgamétogenèse. Durant la microsporogenèse, la cellule-mère des pollens (PMC) va subir deux méioses successives qui conduiront à l'obtention de quatre microspores haploïdes (n). Ensuite, lors de la microgamétogenèse, les microspores vont subir des modifications développementales qui conduiront à l'obtention du grain de pollen mature. La formation du grain de pollen est basée sur deux divisons cellulaires mitotiques. La première mitose (Pollen Mitosis I, PMI), asymétrique donnera deux cellules filles très différentes ; la cellule générative et la cellule végétative. La cellule végétative va sortir du cycle cellulaire et la cellule générative va subir une deuxième mitose (PMII) symétrique dont résulteront les deux cellules spermatiques. Il est à noter qu'après la PMI, la cellule générative est englobée dans la cellule végétative, ce qui conduit à avoir une cellule à l'intérieur d'une autre cellule. De ce processus découlera une association physique entre les deux cellules spermatiques qui seront contenues dans une endomembrane d'origine végétative. De plus, l'une des deux cellules sera liée au noyau végétatif. L'ensemble formé des deux cellules spermatiques ainsi que du noyau végétatif forme une structure tripartite, appelée l'unité mâle germinative (Male Germ Unit, MGU). Adapté de Honys and Twell (2006), et Twell, (2011) avec des informations de McCue *et al.,* (2011).

hydrates de carbone et des métabolites secondaires, utilisés lors de la maturation des microspores afin de synthétiser des membranes et comme source d'énergie (Hafidh *et al.,* 2016; Hesse *et al.,* 2012; Russell and Jones, 2015). Après la méiose, les microspores subissent un développement rapide qui sera accompagné de la synthèse d'une paroi cellulaire constituée de précurseurs de l'intine et de l'exine. Après l'émergence de l'exine partiellement formée, les microspores composées d'un noyau central seront libérées des tétrades de manière synchronisée. Ce processus sera médié par le tapetum, dont les cellules sécréteront de la callase qui dégradera la paroi cellulaire de callose des tétrades (Preuss *et al.,* 1994; Stieglitz, 1977; Worrall *et al.,* 1992).

I.2.2.3 - Maturation des microspores en grains de pollen matures : la microgamétogenèse

Rapidement après leur libération, les microspores vont commencer à s'élargir de manière corrélée avec l'activation de cycles de biogenèse de nombreuses petites vacuoles et la microgamétogenèse va être initiée. Durant cette phase, deux divisions cellulaires mitotiques successives vont s'opérer afin de former les grains de pollen tricellulaires fonctionnels (figure I-9). L'ensemble de ce processus dépendra d'une régulation génétique et épigénétique complexe afin de favoriser le bon déroulement des cycles de divisions et des différenciations cellulaires (Berger and Twell, 2011; Borg *et al.,* 2009; Hafidh *et al.,* 2016; Ma and Sundaresan, 2010; Twell, 2011).

I.2.2.3a - La première mitose du pollen : formation des cellules végétative et générative

Lors de la transition entre la microsporogenèse et la microgamétogenèse, alors que l'expansion des microspores est en pleine progression, les petites vacuoles vont se regrouper afin de former une grande vacuole (Owen and Makaroff, 1995; Yamamoto *et al.,* 2003). Cette vacuolisation s'accompagnera de la migration du noyau initialement positionné au centre de la microspore vers la paroi cellulaire opposée à l'aperture en développement. La nouvelle position du noyau définira le futur emplacement de la cellule générative et sera caractéristique du stade de développement « microspore polarisée » (figure I-9) (Hafidh *et al.,* 2016; Twell, 2011; Twell *et al.,* 1998). Rapidement après cette polarisation, en association avec la formation de cytoplasme au détriment de la large vacuole, la première mitose du pollen (PMI, Pollen Mitosis I) va être initiée. Celle-ci est caractérisée par une division asymétrique, qui aboutira à la formation de deux cellules filles aux destins cellulaires très distincts qui seront toutes deux contenues dans l'espace délimité par la paroi cellulaire de la microspore ; la cellule végétative (CV) et la cellule

générative (CG) (figure I-9) (Twell *et al.,* 1998). La PMI sera différente des divisions cellulaires s'opérant dans les cellules somatiques, puisque aucune bande de préprophase ne sera formée et n'interviendra dans ce processus. En revanche, la séparation des noyaux sera orientée sur des sites excentriques le long d'un axe de division prédéterminé suggérant la mise en place d'une stratégie alternative afin d'aboutir à la séparation des chromosomes. Ce processus est basé, entre autres, sur la formation de structures de microtubules pré-mitotiques afin de déterminer l'orientation du plan de division nécessaire à l'accomplissement de la division cellulaire asymétrique (Brown and Lemmon, 1991, 1992; Hause *et al.,* 1992; Twell, 2011; Zonia *et al.,* 1999). Bien que le mécanisme exact par lequel les produits de la PMI acquièrent des destins cellulaires différents ne soit pas encore élucidé, la polarisation des noyaux a été proposée comme un signal d'entrée dans la division cellulaire ainsi que dans l'orientation des plans de division et des fuseaux mitotiques suivis d'une cytokinèse inégale (Berger and Twell, 2011; Twell, 2011). De manière globale, la perturbation des microtubules lors de la PMI, par des approches pharmacologiques, physiques ou génétiques provoque des divisions symétriques, conduisant à l'obtention de deux cellules filles semblables à des cellules végétatives et une perte du destin cellulaire de la cellule générative (Eady *et al.,* 1995; Oh *et al.,* 2010; Palevitz and Cresti, 1989; Tanaka and Ito, 1980, 1981; Terasaka and Niitsu, 1987; Zaki and Dickinson, 1991). Chez *A.thaliana* et chez le maïs, la présence de réseaux de microtubules uniques dans des microspores polarisées a pu être mise en évidence. Ces réseaux comprennent un agencement de microtubules corticaux, en forme de panier, associé au noyau au niveau du pôle de la future CG. Cet agencement relie l'enveloppe nucléaire et le cortex cellulaire et pourrait donc jouer un rôle dans la génération de l'asymétrie corticale ainsi que dans le maintien de la position nucléaire avant la division (Gallagher and Smith, 1997; Kliwer and Dresselhaus, 2010). Après la séparation des noyaux filles, le noyau génératif qui se retrouve accolé contre la paroi cellulaire du pollen, va progressivement se cellulariser par la mise en place d'un phragmoplaste inhabituel de forme hémisphérique et plus tard d'une paroi cellulaire contenant de la callose. Puisque le noyau génératif est accolé à la paroi cellulaire, la répartition du cytoplasme se réalisera de manière inégale lors de la cytokinèse (Lee *et al.,* 2007; McCormick, 2004; Oh *et al.,* 2005; Twell *et al.,* 2002). La CG ainsi obtenue va alors migrer, suite à une dégradation partielle de sa paroi de callose, vers le centre de la CV, dans le cytoplasme de laquelle elle sera entièrement englobée, telle "une cellule dans une cellule" (figure I-9) (Russell and Jones, 2015; Russell *et al.,* 1996). La dégradation de cette paroi de callose séparant la CV de la CG implique vraisemblablement une sécrétion ciblée de β(1-3)-glucanases (Honys *et al.,* 2006). Il est à noter que les cellules filles résultant de la PMI seront immédiatement différentes en termes de taille, de structure de la

chromatine et d'activité transcriptionnelle. La grande CV contiendra un noyau large, transcriptionnellement actif en raison d'une chromatine fortement décondensée. De plus, son cytoplasme occupera la majorité de l'espace dans le grain de pollen et contiendra un nombre important d'organites et de métabolites, essentielles à la vie cellulaire. En revanche, la petite CG aura un noyau faiblement actif transcriptionnellement avec une chromatine condensée et contiendra peu d'organites et de métabolites (Berger and Twell, 2011; Eady *et al.,* 1995; Gallagher and Smith, 1997; Russell and Jones, 2015; Twell, 2011). La PMI représente un moment critique dans le développement du grain de pollen puisqu'elle assure la fixation du programme gamétophytique mâle en cours. Par conséquent, l'inversion de celui-ci en un programme de développement sporophytique ne sera plus possible à ce stade (Bokvaj *et al.,* 2015; Honys and Twell, 2004; Wei *et al.,* 2010).

Chez les angiospermes, des études ont permis l'identification de plusieurs acteurs moléculaires centraux contrôlant les trois étapes consécutives de la PMI ; la polarisation des microspores, la division nucléaire orientée et la cytokinèse asymétrique (figure I-10). La première étape de polarisation sera considérée comme cruciale dans le déroulement de la PMI. Elle n'est pas seulement un événement passif causé par la croissance des vacuoles mais un processus dynamique nécessitant la participation active des microtubules (Berger and Twell, 2011; Twell, 2011). Par exemple, le mutant *A.thaliana, gemini pollen1* (*gem1*) présente une migration nucléaire et une asymétrie de division perturbées conduisant à la formation de deux cellules filles identiques, de type CV qui n'initieront pas de division supplémentaire. L'analyse du devenir cellulaire dans *gem1* suggère une implication de la taille des cellules et/ou du rapport volume nucléaire sur volume cytoplasmique dans la détermination du destin cellulaire. Les mutants *gem1* présentent une perte de fonction du gène *GEM1*, également connu sous le nom de *MICROTUBULE ORGANIZATION1* (*MOR1)*, codant pour une protéine de la famille des MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN215 (MAP215) qui stimule la croissance des microtubules fusiformes (Park *et al.,* 1998; Twell *et al.,* 2002). Plus récemment, le mutant *gem3,* présentant des anomalies typiques de *gem1,* a été identifié. *GEM3* s'est révélé être un allèle de la sous-unité *AUGMIN 6* (*AUG6-1*), conservée entre les espèces. La diminution de *GEM3/AUG6* provoque des anomalies dans l'organisation des microtubules mitotiques au cours du développement du grain de pollen, suggérant l'implication de ce gène dans la nucléation des microtubules (Oh *et al.,* 2016). De même, l'altération du gène *Tabacco MAP215/DIS1-FAMILY PROTEIN200* (*TMBP200*), un homologue chez le tabac de *GEM1/MOR1,* induit des défauts similaires à ceux observés chez les mutants *gem1*. Cette étude conclut que la migration nucléaire et la détermination de l'axe du fuseau mitotique sont des événements successifs, tous deux

dépendants de l'activité des microtubules et de leur stabilité, médiées par *TMBP200* (Oh *et al.,* 2010). L'analyse des gènes *GEM1/MOR1* et *TMBP200* ont donc clairement pu démontrer l'importance des microtubules dans l'établissement de la polarité cellulaire précédant la PMI, dont l'asymétrie est le facteur clé dans l'initiation de la lignée germinale mâle (Berger and Twell, 2011; Twell, 2011). Chez le maïs, même si l'implication des microtubules durant l'ensemble du processus de la PMI semble également importante (Kliwer and Dresselhaus, 2010), la caractérisation des acteurs moléculaires sous-jacents reste moins avancée. Chez les mutants *gametophyte male sterile1, 2* (*gams1, 2*), la plupart des grains de pollen sont bloqués après la PMI qui produit deux cellules similaires, indiquant l'implication des gènes correspondants dans une progression normale de la PMI (Sari-Gorla *et al.,* 1997). De même, le gène *MATH-BTB1* (*MAB1*), codant pour protéine contenant un domaine MATH-BTB (Meprin And TRAF Homology-Bric-A-Brac, Tramtrack, Broad Complex), un composant de la Culllin-E3-ligase, a été identifié comme impliqué dans la division asymétrique. Les mutants *mab1* présentent un défaut dans la division cellulaire conduisant à un phénotype de type *gem1*. En revanche, le mécanisme par lequel *MAB1* intervient dans la PMI reste inconnu, même si ces données suggèrent un mécanisme similaire à celui observé chez *A.thaliana* (Juranic *et al.,* 2012).

Rapidement après la polarisation des microspores, une mitose orientée sera initiée et constituera également une étape essentielle pour l'obtention des CV et CG distinctes. Chez *A.thaliana,* les microspores mutantes *sidecar pollen1* (*scp-1*) présentent une migration nucléaire normale mais une anomalie entraîne un retard de la PMI et une modification de l'orientation du fuseau mitotique, conduisant à l'obtention de grains de pollen à quatre cellules, dont une CV supplémentaire. Le gène *SCP* est exprimé transitoirement avant la migration nucléaire et code pour un facteur de transcription nucléaire proposé pour contrôler l'expression de gènes ayant des fonctions dans la division cellulaire et l'orientation mitotique. Ces résultats suggèrent qu'un réseau de régulation spécialisé fonctionne afin de coordonner le moment de la division et l'orientation du plan de division lors de la PMI (Chen and McCormick, 1996; Honys *et al.,* 2006).

La dernière étape de la PMI, essentielle dans l'attribution du destin cellulaire, réside dans la séparation des cellules filles ; la cytokinèse (Twell, 2011). Chez *A.thaliana*, les mutants *two in one* (*tio*) complètent la division nucléaire, mais n'achèvent pas la cytokinèse correctement, ce qui conduit à la formation de grains de pollen binucléés contenant les noyaux végétatif et génératif dans un cytoplasme commun. Le gène *TIO* code pour une protéine de type kinase qui se localise sur la ligne médiane du phragmoplaste où elle joue un rôle essentiel dans l'expansion des plaques cellulaires (Oh *et al.,* 2005). Deux kinésines spécifiques des microtubules ; KINESIN12A et KINESIN12B, qui ont des fonctions redondantes, localisent également sur cette

ligne médiane. Les doubles mutants présentent un défaut dans la mise en place d'un réseau de microtubules organisé entre les noyaux (Lee *et al.,* 2007). Il a ainsi été proposé que TIO aurait un rôle de signalisation dans la cytokinèse *via* son interaction avec KINESIN12A,12B au niveau du phragmoplaste ou *via* l'activation de Mitogen-Activated Protein kinases (MAP kinases) au niveau de la plaque cellulaire (Oh *et al.,* 2008; Tanaka *et al.,* 2004). D'autres protéines ayant des rôles dans la division asymétrique ont également des fonctions liées aux microtubules, incluant deux γ-TUBULINES (TUBG1 et TUBG2), et Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 1 (NEDD1), une protéine interagissant avec le complexe γ-TUBULINE. Les microspores déficientes en ces protéines produisent des cellules filles identiques en raison d'un fuseau mitotique désorganisé (Pastuglia *et al.,* 2006). Ces résultats soulignent l'importance des microtubules dans la cytokinèse et appuient le rôle potentiel de cette dernière étape dans le devenir cellulaire.

Pour conclure, il est évident que les protéines associées aux microtubules et leurs régulations sont importantes afin d'établir et de maintenir la polarité cellulaire requise pour la division asymétrique et le destin cellulaire de la CG. Cependant, la manière dont les signaux intrinsèques ou extracellulaires organisent les réseaux de microtubules polaires, associés au positionnement nucléaire et au contrôle du plan de division, reste peu caractérisée. Il est peu probable que la polarité soit déterminée par un signal externe directionnel car les microspores sont orientées de manière aléatoire. Par conséquent, il a été proposé que des facteurs intrinsèques, localisés au pôle de la future CG, puissent agir comme des déterminants de polarité. Ces déterminants pourraient alors être activés par un signal externe non directionnel provenant de l'anthère qui serait à l'origine du déclenchement d'une cascade de signalisations menant à l'assemblage des microtubules et à la migration nucléaire (Berger and Twell, 2011; Twell, 2011).

I.2.2.3b - La seconde mitose du pollen : formation des deux cellules spermatiques

Dans un second temps, la CV va sortir du cycle cellulaire et acquérir son destin cellulaire final alors que la CG va initier une division mitotique symétrique appelée seconde mitose pollinique (PMII). Cette PMII conduit à l'obtention du pollen mature contenant deux cellules spermatiques (Hafidh *et al.,* 2016). La PMII a lieu dans un compartiment délimité par une endomembrane spéciale d'origine végétative à l'intérieur du cytoplasme de la CV (figure I-9). Cette membrane conduira à une association physique entre les gamètes et le noyau végétatif connue sous le nom de l'unité mâle germinative ou MGU pour « Male Germ Unit » (voir partie I.2.3) (Dumas *et al.,* 1985; McCue *et al.,* 2011). Comme pour la PMI, la PMII sera différente

d'une mitose dans les cellules somatiques, puisqu'elle ne s'organise pas autour d'une bande de préprophase, en revanche l'implication des microtubules est une fois de plus essentielle (Hafidh *et al.,* 2016). Il semblerait que la CG, de forme fusiforme avant la PMII, contienne son propre cytosquelette contenant un réseau de microtubules spécifiques qui formera une structure stable qui sera essentielle lors de la séparation nucléaire (Bedinger, 1992; Borg *et al.,* 2009). Par exemple, dans le pollen de maïs, un gène codant pour une TUBULINEα (TUBα) (*GRMZM2G153292*) s'est avéré être spécifiquement exprimé dans la CG puis dans les deux cellules spermatiques et non dans la CV. Ainsi, la lignée rapportrice *pTUBα::TUBα:YFP* présente un signal fluorescent dès le stade bicellulaire et dans les deux cellules spermatiques (Kliwer and Dresselhaus, 2010). Au stade bicellulaire tardif, les microtubules vont modifier leur organisation afin de former une structure en panier autour du noyau de la CG qui se prolongera dans une longue extension aux deux pôles opposés de la cellule, impliquée dans la séparation des noyaux spermatiques. L'existence de cette TUBα spécifique de la lignée générative donne des indications sur la spécification de la PMII (Kliwer and Dresselhaus, 2010). La division de la cellule générative et la spéciation des cellules spermatiques seront dépendantes d'acteurs moléculaires clés majoritairement liés à la coordination du cycle cellulaire, qui seront abordés dans la partie suivante ainsi que de régulations épigénétiques (Berger and Twell, 2011).

Chez le maïs, les cellules spermatiques résultant de la PMII sont relativement similaires et ont toutes deux la capacité de féconder les cellules œuf et central femelles (Faure *et al.,* 2003). En revanche, chez certaines lignées une non-disjonction de chromosomes particuliers appelés « B » en opposition aux chromosomes normaux dits « A », est observable. Ces chromosomes ne contiennent pas d'information génétique essentielle pour la survie de l'organisme et seront donc dispensables. Lors de la PMII, les chromosomes B ne parviennent pas à se disjoindre correctement, conduisant à une répartition inégale dans les cellules spermatiques ; l'une d'entre elles ne contiendra pas de chromosome B alors que l'autre en aura de multiples copies (Carlson, 1978; Ward, 1973). De façon surprenante, des études ont mis en évidence que la cellule spermatique contenant les chromosomes B féconde préférentiellement la cellule œuf plutôt que la cellule centrale, probablement afin d'assurer la transmission à la descendance (González-Sánchez *et al.,* 2003; Han *et al.,* 2007; Rusche *et al.,* 1997). La non-disjonction des chromosomes B serait en partie explicable par la présence de deux régions chromosomiques particulières ; une pointe très distale et un site dans l'euchromatine proximale (Alfenito and Birchler, 1993; Stark *et al.,* 1996).

Dans les dernières étapes de la maturation des grains de pollen, la cellule végétative va accumuler des réserves de glucides et de lipides qui seront nécessaires à la conservation du grain,

à sa germination et à la croissance du tube pollinique (Datta *et al.,* 2002). De même, un certain nombre de carbohydrates, d'ARNs et de protéines seront accumulés en prévision de la formation du tube pollinique (Bedinger, 1992). Durant l'ensemble du processus de maturation du grain, différentes structures vont être mises en place afin de contribuer à sa protection et à son bon fonctionnement. La mise en place de ces structures sera dépendante de l'intervention du tapetum (Carrizo García *et al.,* 2017; Li *et al.,* 2012; Russell and Jones, 2015). Les grains de pollen de maïs seront entourés d'une double paroi cellulaire composée de l'intine (interne), riche en pecto-cellulose et de l'exine (externe), plus rigide (Ariizumi and Toriyama, 2011; Chen *et al.,* 2017b). L'aperture, qui constitue l'unique pore dans le grain de pollen de maïs sera formé au niveau de la paroi cellulaire externe. Il permettra la sortie du tube pollinique et les échanges avec l'extérieur (Furness and Rudall, 2004). Le pollen de maïs contient une couche de protection supplémentaire, le manteau pollinique (Suen *et al.,* 2003). La mise en place de celui-ci sera corrélée avec la déshydratation du grain qui sera alors prêt pour la pollinisation (Fonseca and Westgate, 2005).

I.2.2.3c - Contrôle du cycle cellulaire durant la macrosporogenèse

D'une manière logique, les mitoses polliniques sont fortement dépendantes de la régulation du cycle cellulaire. Des acteurs moléculaires régulateurs sont communs aux deux mitoses alors que certains sont plus spécifiques (Berger and Twell, 2011). Pour rappel, le cycle cellulaire dépend de l'activité des complexes CDK-CYC, qui sont régulés par des inhibiteurs des CDKs. Pour permettre au cycle de progresser, ces inhibiteurs doivent être éliminés à des moments spécifiques (Inzé and De Veylder, 2006). Lors de la transition G1/S, différents acteurs moléculaires ont été identifiés chez *A.thaliana* dans la régulation des CDKs lors des mitoses polliniques. Ainsi, les gènes *RING H2group F1a, F1b* (*RHF1*a et *RHF1b*), codant pour des protéines de la famille des RING-finger E3 liguases, ont été identifiés dans la régulation des CDKs lors des deux mitoses. Les mutants *rhf* présentent des grains de pollen unicellulaires ou bicellulaires, reflétant des défauts lors de la PMI et/ou lors de la PMII. Ces protéines ont été proposées pour favoriser la dégradation de la protéine KIP-RELATED PROTEINS6 (KRP6), un inhibiteur des CDKs, empêchant ainsi l'inhibition de l'activité CDK dans le pollen en maturation (Liu *et al.,* 2008). De manière plus spécifique lors de la PMII, la mutation de *CDKA1* entraîne un retard de la phase S, conduisant dans certains cas à la formation de grains de pollen bicellulaires ou à un retard de la PMII qui se réalisera lors de la germination du tube pollinique. Le gène *CDKA1* est donc proposé pour réguler spécifiquement la transition G1/S relative à la PMII (Aw *et al.,* 2010; Iwakawa *et al.,* 2006; Nowack *et al.,* 2006). De même, la mutation du

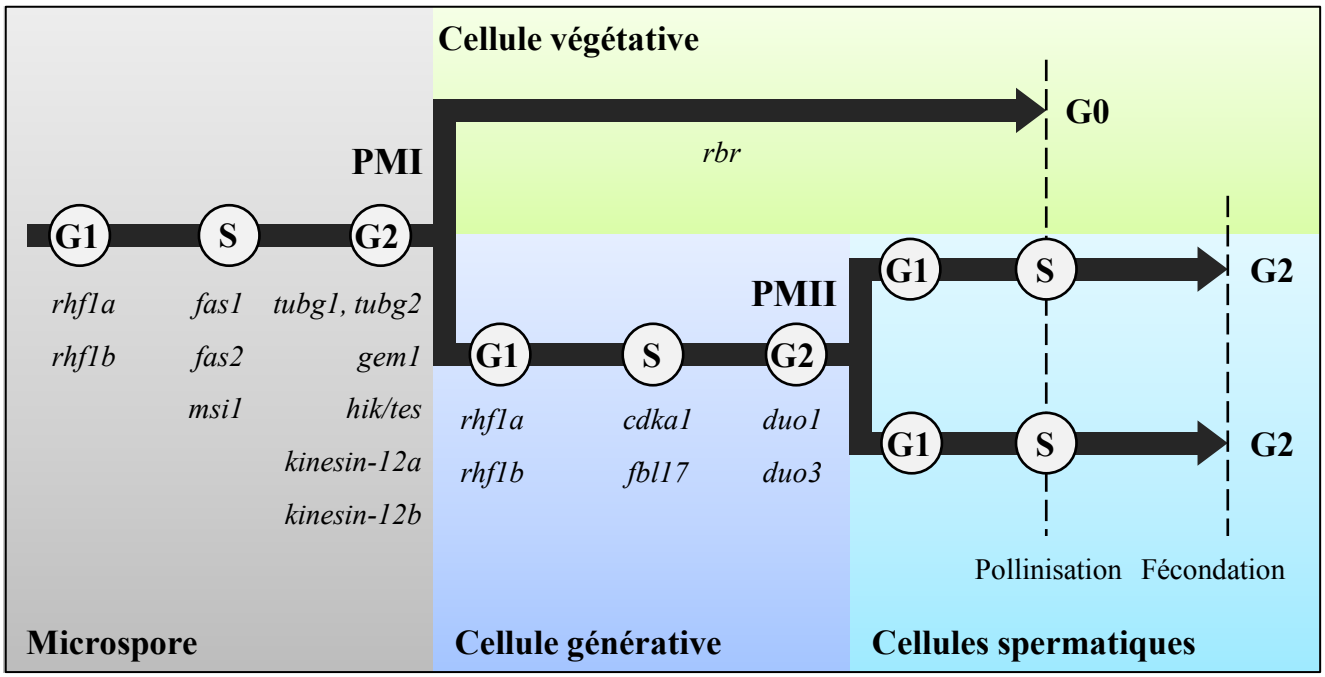
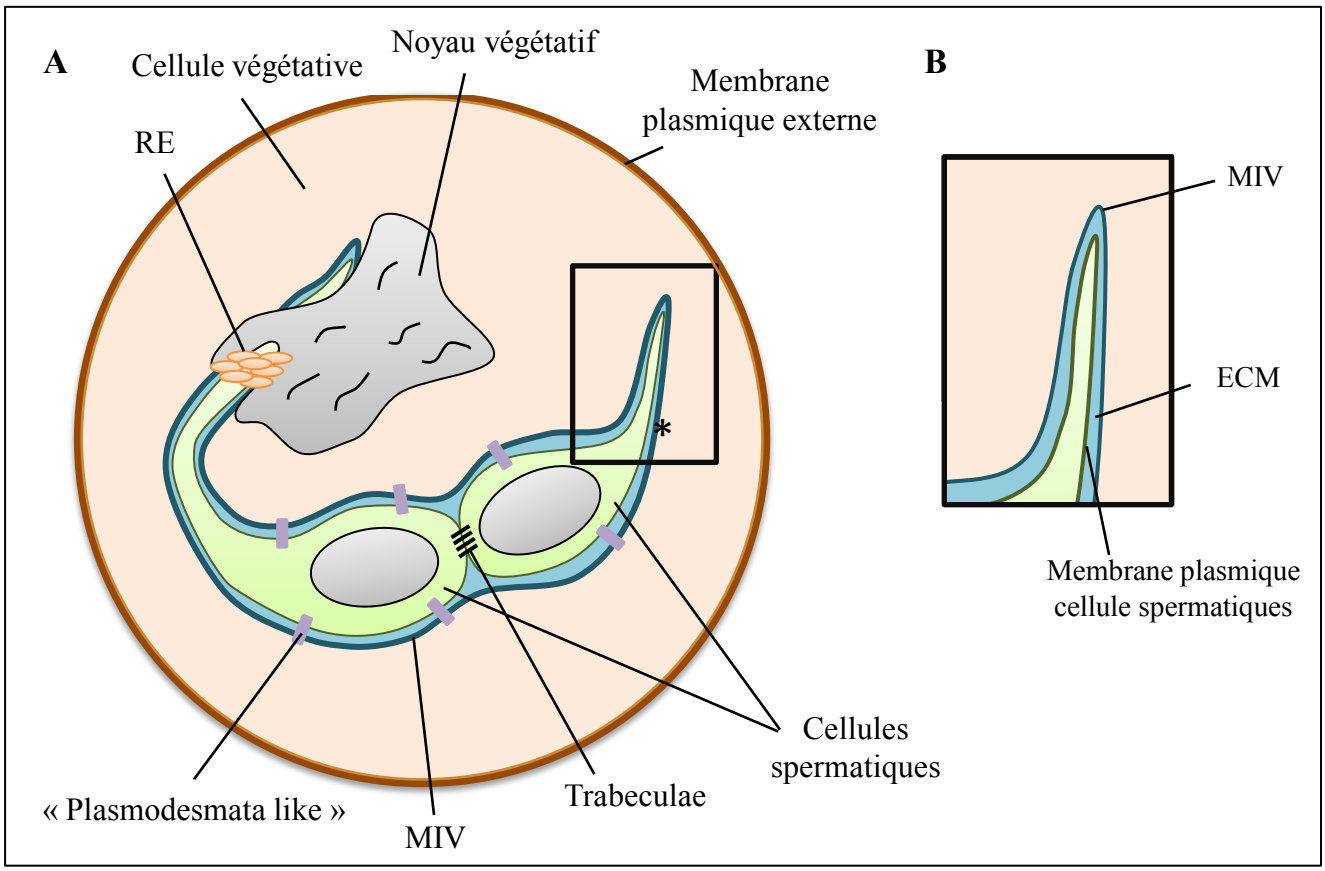


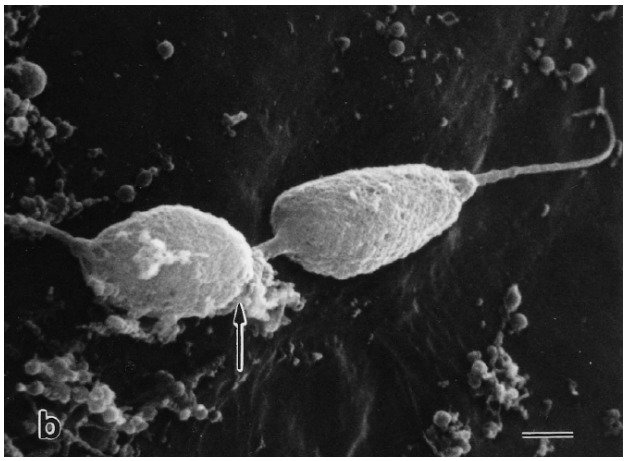
Figure I-10 : Plusieurs mutations chez *A.thaliana* conduisent à des anomalies dans le développement du grain de pollen.
Illustration schématique de la progression du cycle cellulaire lors du développement du grain de pollen, mise en regard des différentes mutations gamétophytiques mâles identifiées chez *A.thaliana*. Ces mutations affectent différentes étapes essentielles de la microgamétogenèse ; la division asymétrique lors de la première division mitotique (PMI), la progression du cycle cellulaire durant les différentes phases et la spéciation cellulaire, indispensable pour avoir des gamètes mâles fonctionnels. Les caractéristiques associées aux différentes mutations sont présentées dans la partie I.2.2.3.
Adapté de Twell, (2011)

gène *F-BOX-LIKE17* (*FBL17*), exprimé de manière transitoire dans la CG, conduit à une perturbation de la PMII, conduisant à la formation de grains de pollen bicellulaires. La protéine FBL17 cible les inhibiteurs des CDKs ; KRP6,7 permettant ainsi à la CG de progresser à travers la phase S. Inversement, la persistance de KRP6,7 dans la CV est proposée pour maintenir l'inhibition de l'activité CDKA et donc la progression du cycle cellulaire (Gusti *et al.,* 2009; Kim *et al.,* 2008). L'expression spécifique de *FBL17* dans le pollen en formation permet ainsi un contrôle différentiel du cycle cellulaire dans la CG et la CV. La mutation *retinoblastoma-related* (*rbr*), entraîne, quant à elle, une division mitotique supplémentaire de la CV. Il a donc été proposé que RBR aurait un rôle répresseur de l'initiation de la phase S, qui serait en aval de la voie de répression des CDKA1s par les KRPs, de sorte à ce que les deux mécanismes puissent coopérer afin d'imposer la sortie du cycle cellulaire de la CV. En revanche, dans la CG, l'activité transitoire de *FBL17* permet la prolifération des CDKA1s *via* l'inhibition des RBRs, favorisant ainsi la progression du cycle (figure I-10) (Chen *et al.,* 2009).

Lors de la réplication de l'ADN durant la phase S, l'assemblage de la chromatine joue un rôle clé. Le manque d'incorporation d'histone H3 en l'absence du complexe protéique CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR1 (CAF1), composé chez les plantes des protéines FASCIATA1, 2 (FAS1, 2) et MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), interfère dans la PMII (Chen *et al.,* 2007). CAF1 cible les histones H3 acétylées à l'ADN nouvellement synthétisé, permettant ainsi l'assemblage des nucléosomes. Son altération provoque un arrêt du cycle cellulaire, entraînant la production de grains de pollen avec une CG non divisée mais capable de se différencier correctement en cellule spermatique et de féconder soit l'ovule, soit la cellule centrale (figure I-10) (Chen *et al.,* 2007). Ces observations mettent en avant le rôle du réassemblage des nucléosomes dans la progression de la PMII, en indiquant qu'il n'est pas essentiel pour la différenciation cellulaire.

Dans les dernières étapes de la progression du cycle cellulaire, les gènes *DUO POLLEN 1*, *3* (*DUO1, 3*) jouent un rôle essentiel. Les mutants *duo1* présentent un certain pourcentage de grains de pollen qui n'achèvent pas normalement la PMII, conduisant à la formation d'une CV et d'une CG non différenciées, donc inaptes à la fécondation (figure I-10). Le gène *DUO1* code pour un facteur de transcription qui est spécifiquement présent dans la lignée germinale mâle. L'échec de l'entrée en mitose de la GC chez les mutants *duo1* résulte, en partie, de l'absence d'expression du gène *CYCB1*, un régulateur clé de la transition G2/M. Il est proposé que *DUO* puisse réguler l'expression de *CYCB1* afin d'initier l'entrée en mitose *via* une voie dépendante de *CDKA1* (Borg *et al.,* 2011; Durbarry *et al.,* 2005; Kim *et al.,* 2008; Rotman *et al.,* 2005). L'altération de *DUO1* conduit également à une inhibition de plusieurs gènes spécifiques des





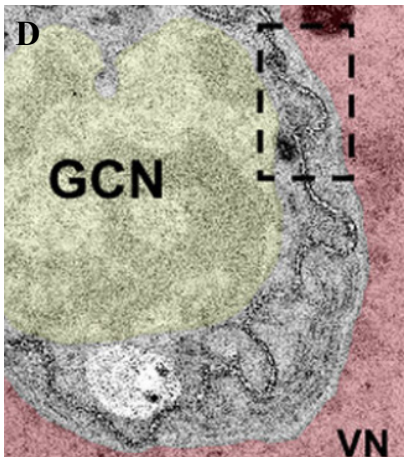




Figure I-11 : L'unité mâle germinative, une structure tripartite complexe.
A : Représentation schématique de l'unité mâle germinative (MGU). Cette structure est composée des deux cellules spermatiques contenues dans une membrane d'origine végétative, la MIV (Membrane Interne d'origine Végétative) et du noyau végétatif auquel est reliée l'une des deux cellules spermatiques par une projection cytoplasmique, probablement à travers des zones denses en réticulum endoplasmique (RE). **B** : Les cellules spermatiques sont englobées dans le cytoplasme de la cellule végétative, chacune d'entre elles possède sa propre membrane plasmique. Les deux cellules spermatiques sont entourées par une mince matrice extracellulaire polysaccharidique (ECM, Extra Cellular Matrix), elle-même entourée par la MIV. **C** : MGU isolée provenant du pollen de tabac, imagée par microscopie électronique à balayage, barre d'échelle = 10 µm (Tian *et al.,* 1998). **D, E** : Observation en microscopie électronique en transmission de grains de pollen de *Papaver rhoeas* (McCue, (2011). Barre d'échelle = 1 µm. **D** : la cellule végétative et la cellule générative sont observables, le noyau végétatif (VN) est coloré en rouge et le noyau de la cellule générative (GCN) en vert. **E** : Une double membrane est visible entre les deux cellules (flèches noires), il s'agit de la membrane de la cellule générative et de la MIV séparées par l'ECM.

cellules spermatiques, tel que *GENERATIVE CELL SPECIFIC1/HAPLESS2* (*GCS1/HAP2*), essentiel à la double fécondation (Mori *et al.,* 2006), indiquant que *DUO1* semble intervenir dans la différenciation cellulaire. Similairement à *DUO1*, *DUO3* est également impliqué dans la transition G2/M et dans la différenciation cellulaire, bien qu'il semblerait qu'il n'intervienne pas *via* la régulation de CYCB1 mais par une voie différente encore non caractérisée (Brownfield *et al.,* 2009a).

Pour conclure, l'obtention d'un grain de pollen tricellulaire à partir d'une microspore, fait intervenir différents acteurs moléculaires afin d'assurer la progression du cycle cellulaire qui sera décisive dans la fonctionnalité de la CG et de la CV (figure I-10).

I.2.3 - Le concept de la Male Germ Unit (MGU)

Chez les angiospermes, les cellules spermatiques ne sont ni libres, ni flagellées et dépendent donc de la structure unique du grain de pollen et du développement du tube pollinique afin d'assurer la fécondation. Les cellules spermatiques (CSs) seront transportées dans le tube pollinique de manière coordonnée, favorisant ainsi une bonne synchronisation de la double fécondation (Hafidh *et al.,* 2016). De manière intéressante, lors de la division asymétrique du pollen, la cellule générative se retrouve englobée entièrement dans le cytoplasme de la cellule végétative et est ainsi délimitée par une membrane plasmique d'origine végétative (figure I-9) (Russell and Jones, 2015; Russell *et al.,* 1996). Plus tard, après la PMII cette membrane sera conservée autour des cellules spermatiques nouvellement formées, assurant ainsi leur connexion dans un complexe nommé l'unité mâle germinative ou « Male Germ Unit » (MGU) (Dumas *et al.,* 1985). Ainsi, les deux CSs vont rester liées jusqu'à la double fécondation (Charzynska *et al.,* 1989). La MGU se caractérise également par l'association de l'une des deux cellules spermatiques, *via* une projection cytoplasmique, au noyau végétatif (NV) conduisant ainsi à une structure unique tripartite (figure I-11A, C) (McCue *et al.,* 2011). La connexion physique entre l'une des deux SCs et le NV a été observée pour la première fois par Jensen et Fisher chez le coton (1970), mais a été réellement décrite par Russell et Cass (1981), chez *Plumbago zeylanica,* pour avoir une signification fonctionnelle lors de la fécondation (Jensen and Fisher, 1970; Russell, 1984; Russell and Cass, 1981). Quelques années plus tard, la notion de MGU sera établie par Dumas, (1984), afin de décrire cette structure unique, en regard des résultats obtenus chez *P.zeylanica*. Même si cette notion fut longtemps controversée, la MGU a par la suite été décrite chez de nombreuses espèces d'angiospermes (pour revue McCue *et al.,* 2011), incluant le maïs

(Kliwer and Dresselhaus, 2010; Matthys-Rochon *et al.,* 1987; McConchie *et al.,* 1987) et *A.thaliana* (Lalanne, 2002).

I.2.3.1 - Structure de la MGU et connections cellulaires entre ces composantes

La MGU est donc un complexe formé des deux cellules spermatiques et du noyau végétatif qui se met progressivement en place après la PMI, suite à l'invagination de la cellule générative dans la cellule végétative. Cette invagination a pour conséquence que la CG puis les SCs seront entourées d'une seconde membrane ayant pour origine la membrane plasmique de la CV (figure I-11D, E). Cet agencement est très particulier puisqu'il conduit à l'obtention des deux cellules spermatiques contenues à l'intérieur de la cellule végétative. (Mogensen, 1992; Yu *et al.,* 1989). Selon la description donnée par Dumas, (1984), la membrane de la MGU entourant les CSs est caractérisée de membrane plasmique « interne » en opposition à la membrane plasmique de la cellule végétative dite « externe » (Dumas *et al.,* 1984). Cependant, les cellules spermatiques possèdent également leurs propres membranes plasmiques qui peuvent être caractérisées de membrane « interne » en regard de la MGU. Ainsi, afin de faciliter la nomenclature de cette structure qui sera largement abordée dans la suite de ce manuscrit, la membrane plasmique de la MGU d'origine végétative, donc « interne » selon Dumas, (1984), sera renommée la « MIV » pour « Membrane Interne Végétative » (figure I-11A, B). Les composants de la MGU ne sont pas uniquement associés physiquement mais établissent une véritable communication cellulaire qui est très certainement à l'origine de la coordination de cette structure. Ainsi, des connexions sont observables entre les deux CSs, entre les CSs et le cytoplasme de la CV et entre une CS et le NV (figure I-11A) (McCue *et al.,* 2011).

Il a été observé chez *Brassica napus* et *P.zeylanica* qu'un espace était présent entre les membranes plasmiques des CSs et la MIV ainsi qu'entre les deux CSs, dû à la présence de matériel cellulaire provenant probablement des plaques cellulaires formées lors de la cytokinèse (Charzynska *et al.,* 1989; Russell, 1984). Cet espace serait composé d'une mince matrice extracellulaire polysaccharidique (ECM, Extra Cellular Matrix) (McCue *et al.,* 2011). Ainsi, les deux SCs ne possèderaient pas une paroi cellulaire pecto-cellulosique classiquement observée chez les cellules végétales mais une ECM commune. Cette mince ECM sera enveloppée par la MIV, excepté au niveau du point de jonction des deux CSs (Figure I-11A). Cette région entre les SCs contient des structures particulièrement denses nommées par Dumas *et al.,* (1985) les « trabeculae », qui relient les membranes plasmiques des deux SCs ainsi que leur cytoplasme et qui pourraient être impliquées dans des échanges entre les deux cellules (figure I-10A). Chez

A.thaliana, deux protéines transmembranaires, TETRASPANINS11, 12 (TET11, 12), localisent dans le micro-domaine membranaire à l'interface entre les deux SCs. Les auteurs proposent que TET11 et TET12 pourraient être impliquées dans l'adhésion et/ou dans la communication entre les SCs, participant ainsi à la stabilité physique de la MGU (Boavida *et al.,* 2013).

De plus, des connexions putatives entre la CG, puis entre les CSs et le cytoplasme de la CV ont été décrites comme des structures semblables à des plasmodesmes (canaux traversant les parois cellulaires des plantes) (figure I-11A) (Cresti *et al.,* 1987). Il a été avancé que la viabilité de la CG et plus tard des CSs pourrait dépendre de la présence de ces connexions avec la CV afin d'apporter des éléments nutritifs, essentiels à la vie cellulaire, aux CSs qui possèdent peu de plastes et de cytoplasme (Boavida *et al.,* 2005). Cependant, cette hypothèse est controversée en raison du fait que l'apparition de ces canaux n'est que transitoire ; ceux-ci étant perdus lors de la germination du grain de pollen (Cresti *et al.,* 1987). De plus, il a été montré que les CSs isolées *in vitro* restaient viables et fonctionnelles pour la fécondation (Faure *et al.,* 1994), de même que la CG dans une CV sénescente depuis plusieurs jours (Twell, 1995), indiquant un processus de viabilité cellulaire autonome des cellules spermatiques.

La dernière catégorie de connexions observées entre les composantes de la MGU réside en des connexions physiques visibles entre l'une des CSs (nommée CS1 en opposition à la CS2) et le noyau de la CV (figure I-11A, C). Bien que chez certaines espèces les deux CSs diffèrent morphologiquement (Russell, 1984; Russell *et al.,* 1996), chez le maïs elles sont sensiblement similaires (Matthys-Rochon *et al.,* 1987; McConchie *et al.,* 1987). La CS1 est connectée au NV *via* un allongement de sa morphologie, donc de son cytoplasme, nommé « projection cytoplasmique » qui coexiste avec le NV sur une grande surface et est partiellement entouré par des lobes de celui-ci (Mogensen, 1992; Russell and Cass, 1981; Tian *et al.,* 1998; Yu *et al.,* 1989). La formation de la projection cytoplasmique se réalise conjointement avec la mise en place de la MGU lors de l'invagination de la CG. L'extension de la CG polarisée devient associée à une rainure préformée à la surface du NV (Russell *et al.,* 1996). L'expansion de la projection cytoplasmique est accompagnée par l'allongement des microtubules et la formation de vésicules à son extrémité (Yu *et al.,* 1992). Il convient de noter que la CS2 présente également une projection cytoplasmique mais qui sera plus petite et ne s'étendra pas vers le NV (McCue *et al.,* 2011) (figure I-11A). Bien que le mécanisme d'ancrage de la CS1 au NV reste encore énigmatique, différentes études ont caractérisé ce processus, apportant ainsi des premières indications. Au moment de la formation de la projection cytoplasmique, la surface du NV est fortement lobée avec de nombreux pores nucléaires et indentations (Russell and Cass, 1981). La projection cytoplasmique de la CS1 s'attache au NV au niveau de ces sites d'indentations, appelés

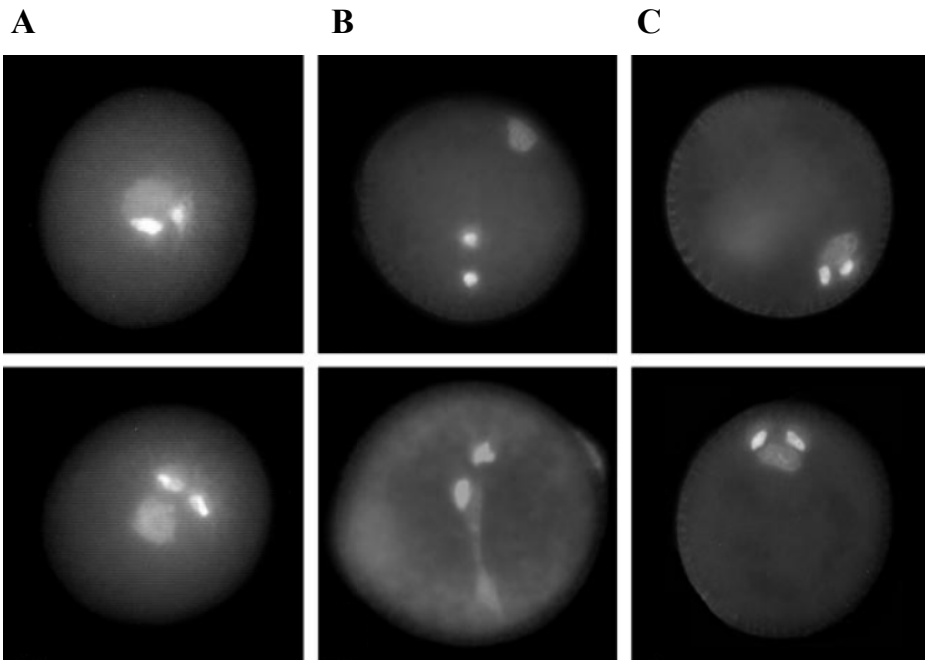


Figure I-12 : Phénotypes des mutants *mum1* et *gum1* affectés dans l'organisation de la MGU.
Grains de pollen observés en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI, provenant des lignées ; **A** : sauvage, **B** : mutant *gum1*, le noyau végétatif est accolé à la paroi cellulaire du grain de pollen, individuellement des cellules spermatiques, entraînant une perturbation de la compaction de la MGU, et **C** : mutant *mud1*, la MGU est entièrement accolée à la paroi cellulaire et anormalement compactée. Lalanne and Twell, (2002).

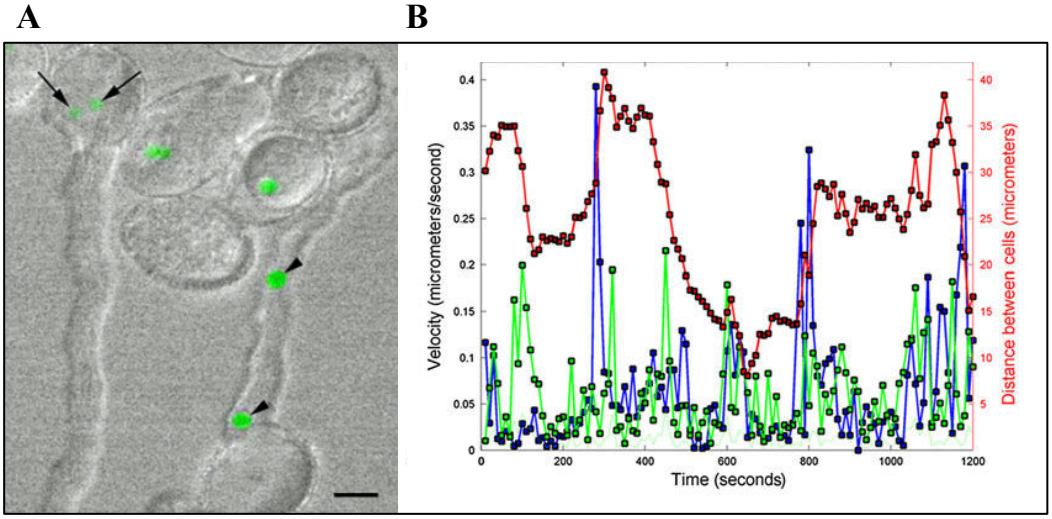


Figure I-13 : La dissociation de la MGU entraîne une désynchronisation dans le mouvement des cellules spermatiques.
Observation de grains de pollen d'*A.thaliana* contenant une fusion protéique GFP, après un traitement à la chaleur, dont résulte une dissociation de la MGU. **A** : Grains de pollen avec des tubes polliniques présentant une entrée tardive ou l'absente des cellules spermatiques dans le tube (flèches noires) et des cellules spermatiques dissociées après avoir pénétré dans le tube pollinique (triangles noirs). B : Mesure de la vélocité des deux cellules spermatiques d'un grain de pollen, la courbe bleue représente la vélocité d'une cellule et la courbe verte celle de l'autre. Les courbes sont très différentes, indiquant un déplacement indépendant des deux cellules spermatiques. Ces observations indiquent que le déplacement synchronisé des cellules spermatiques dans le tube pollinique est perturbé lorsque la MGU est dissociée. Ge *et al.,* (2011).

« clasping grooves » par Russell, (1984), en concomitance avec son enroulement autour du NV à travers un passage convoluté (KAUL *et al.,* 1987; McConchie *et al.,* 1985; Russell, 1984). De manière intéressante, dans les « clasping grooves » du NV, le réticulum endoplasmique (RE) rugueux forme des réseaux de membranes alors que des REs laminaires et lisses sont enrichis sur la membrane nucléaire adjacente aux CSs et au niveau de l'extrémité de la projection cytoplasmique, indiquant que la connexion entre le NV et le CS1 se fait à travers les structures denses en REs qui entoure le VN (Cresti *et al.,* 1987; Dumas *et al.,* 1985; Yu *et al.,* 1989). De plus, le maintien de la structure de la projection cytoplasmique semble fortement dépendant de l'organisation du cytosquelette de microtubules dans les CSs (Kliwer and Dresselhaus, 2010; Oh *et al.,* 2010). Cette organisation sera fondamentalement différente de celle observée dans les cellules somatiques des plantes, car les réseaux de microtubules n'émanent pas de l'enveloppe nucléaire (McCue *et al.,* 2011). Ces réseaux s'organisent dans les CSs similairement à une cage à l'intérieur des cytoplasmes qui pourrait avoir un rôle dans le maintien de la structure des SCs et/ou de la MGU et dans l'ancrage de la projection cytoplasmique au niveau du NV (McConchie *et al.,* 1987; Palevitz and Cresti, 1989).

I.2.3.2 - Fonction de la MGU dans le grain de pollen

Bien que les rôles exacts de l'organisation s'opérant entre les CSs et le NV dans le grain de pollen restent encore peu caractérisés, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

L'une des premières hypothèses avancée, serait que la MGU permettrait une libération coordonnée des CSs lors de la double fécondation, incluant leur transport synchronisé dans le tube pollinique, sans exclure le fait que cela empêcherait physiquement les deux CSs de fusionner ensemble dans l'espace réduit du cytoplasme végétatif durant la croissance du tube (Mogensen, 1992). En effet, lors de la germination du grain de pollen et de la croissance du tube pollinique la MGU sera maintenue intacte, bien que sa structure change considérablement durant ces processus. La projection cytoplasmique apparaît souvent courte dans le grain de pollen non germé et allongée dans le tube pollinique, bien qu'une certaine variation soit observable entre les espèces (Kliwer and Dresselhaus, 2010; Yu *et al.,* 1992). Généralement, le noyau végétatif précède les cellules spermatiques lors du déplacement dans le tube pollinique, laissant envisager un processus de traction de celui-ci de l'ensemble de la structure. La projection cytoplasmique se réduira progressivement vers la fin de la croissance du tube pollinique et la MGU sera dissociée après le déchargement du contenu du tube pollinique dans les synergides et la libération des cellules spermatiques, bien que la synchronisation exacte de sa déstructuration soit encore

incertaine (Mogensen, 1992; Russell, 1984). Twell *et al.,* (2002) ont identifié deux types de mutations affectant l'intégrité et/ou le positionnement cellulaire de la MGU chez *A.thaliana* ; *mgu displaced1* (*mud1*) et *germ unit malformed1* (*gum1*). Dans les mutants *mud1*, après la PMII, le NV migre au niveau de la paroi cellulaire du grain de pollen, individuellement des CSs perturbant ainsi la compaction de la MGU, alors que dans les mutants *gum1*, la MGU est intègre mais entièrement accolée à la paroi cellulaire (figure I-12). Dans les deux cas de figure les allèles mutants seront peu transmis à la descendance, indiquant le rôle d'une MGU intègre et normalement positionnée dans le grain de pollen afin d'assurer la fécondation (Lalanne, 2002). Par une approche différente, Ge *et al.,* (2011) ont également mis en lumière l'importance de la MGU dans le mouvement des CSs dans le tube pollinique et donc putativement dans la réussite de la double fécondation (figure I-13). Les auteurs ont réalisé un traitement à la chaleur sur du pollen, conduisant à une dissociation de la MGU et donc à la libération prématurée des CSs. Le mouvement des CSs se retrouve ainsi entièrement désynchronisé dans le tube pollinique, indiquant le rôle de leur association dans la MGU afin de coordonner leur déplacement jusqu'au sac embryonnaire (Ge *et al.,* 2011). En revanche, le mécanisme à l'origine du mouvement global de la MGU reste encore énigmatique. Celle-ci semble se déplacer indépendamment des cycles organellaires et cytoplasmiques survenant dans le tube pollinique en croissance (Cai and Cresti, 2009), bien que le NV semble dépendant du cytosquelette du tube composé de microfilaments d'actine tractés par des protéines motrices, telles que des myosines (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1989). A ce propos, la protéine MYOSINI a été identifiée pour être présente à la surface du NV et de la CG, indiquant un rôle potentiel de celle-ci dans le déplacement de la MGU (Heslop-Harrison *et al.,* 1986; Miller *et al.,* 1995). En plus des filaments d'actine, des microtubules longitudinaux se forment lors de la germination du grain de pollen, créant ainsi un réseau autour du VN et des CSs dont le mouvement ainsi que le positionnement de la MGU semblent fortement dépendants (Kliwer and Dresselhaus, 2010). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs des microtubules entraîne des défauts dans le mouvement de la MGU dans le tube pollinique, sans affecter celui des organites (Åström *et al.,* 1995; Heslop-Harrison *et al.,* 1988).

En plus de la fonction structurale de la MGU, il a été proposé que celle-ci ait également un rôle dans les échanges entre la CV et les CSs, avec un transfert possible de matériaux et de signaux de la CV vers les CSs (Mogensen, 1992). Slotkin *et al.,* (2009) ont mis en évidence chez *A.thaliana*, que parmi ces échanges certains pouvaient conduire à des modifications épigénétiques des CSs *via* l'intervention de la CV. Les auteurs ont montré que des éléments transposables (TEs) sont activés dans la CV mais pas dans les CSs et que ce processus pourrait être dû à l'activité de petits ARNs, produits par la CV puis transportés dans les CSs afin d'inhiber

l'activation des TEs. Les auteurs ont pu appuyer cette hypothèse *via* l'utilisation d'un rapporteur fluorescent et d'un micro-ARN artificiel capable de réprimer l'expression de ce rapporteur. Ainsi, le micro-ARN exprimé spécifiquement dans le NV entraîne la répression de l'expression du marqueur fluorescent dans les CSs (Slotkin *et al.,* 2009). Plus récemment, des résultats similaires ont été obtenus par Grant-Downton *et al.,* (2013) et Martinez *et al.,* (2016) qui ont également mis en évidence chez *A.thaliana* une répression des TEs dans les CSs *via* des petits ARNs produits par la CV, probablement afin d'éviter la transmission de ces TEs à la descendance et/ou d'entraîner des défauts dans les gamètes mâles (Grant-Downton *et al.,* 2013; Martínez *et al.,* 2016). De plus, des études ont montré qu'il existe, au niveau du noyau végétatif, une polarisation des pores nucléaires, qui sont plus denses en direction de la connexion cytoplasmique, laissant envisager un processus de communication entre les deux entités (Shi *et al.,* 2005). Ces résultats montrent qu'il y a vraisemblablement un transfert de matériel de la CV vers les CVs, donnant foi à la fonction de communication proposée par Mogensen., (1992).

I.2.4 - Mise en place de la lignée germinale femelle

Lors d'une étape préméiotique, l'archesporium femelle unique va être mis en place et contrairement aux lignées germinales mâles, il ne subira pas de divisions mitotiques avant sa spéciation (Berger and Twell, 2011). Celui-ci va se différencier en MMC, qui sera la première cellule du sac embryonnaire immature. Sa maturation se déroulera en deux étapes majeures ; la macrosporogenèse incluant la maturation de la MMC en mégaspore et la macrogamétogenèse allant de la division de la mégaspore jusqu'à la maturation du sac embryonnaire. Le développement du sac embryonnaire chez le maïs, comme chez la majorité des angiospermes, suit un schéma de type Polygonum (Sprunck and Grob-Hardt, 2011; Zhou *et al.,* 2017).

I.2.4.1 - Développement de l'ovule et formation de la MMC

Les gamètes femelles sont localisés dans le sac embryonnaire qui est lui-même englobé dans l'ovule, contenu dans l'ovaire (figure I-14A, B, C) (Skinner *et al.,* 2004; Yadegari, 2004). L'ovaire chez le maïs est composé de trois carpelles unifiés dont un rudimentaire (Randolph, 1936). La partie de l'ovaire inférieure va se différencier en ovule composé d'un tissu spécifique, le nucelle et de deux téguments. Les carpelles vont se développer vers la partie supérieure de l'ovaire jusqu'à se rencontrer au niveau du canal stylaire, afin d'englober l'ovule (Kiesselbach, 1949). Les téguments et le nucelle sont unifiés au niveau de la zone d'insertion de l'ovule qui sera également coextensive avec la chalaze, constituée de faisceaux vasculaires impliqués dans

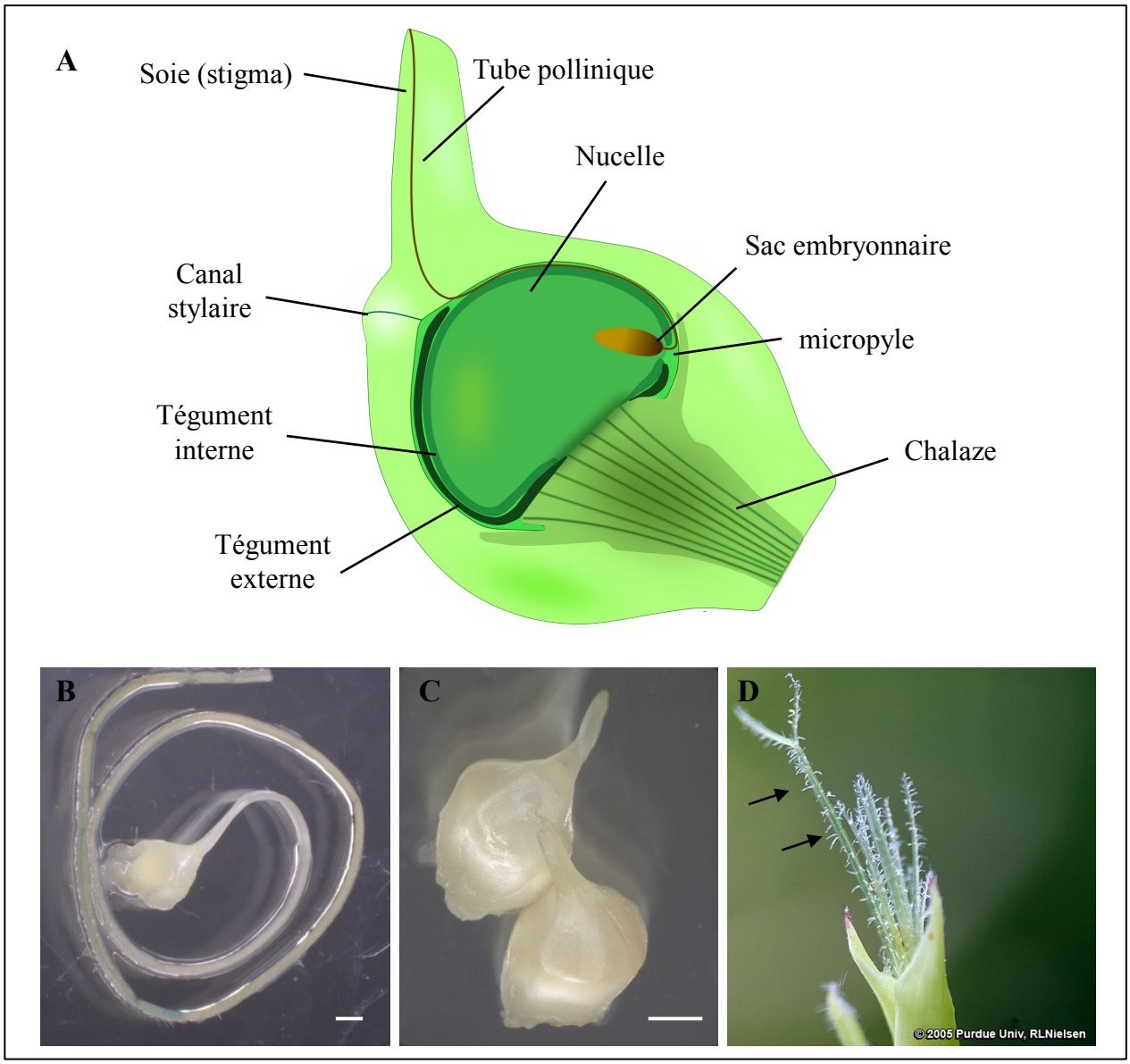


Figure I-14 : Ovaires de maïs.
A : Représentation schématique d'un ovaire de maïs. Le sac embryonnaire est contenu dans l'ovule qui est lui-même englobé dans l'ovaire. L'ovule est composé du nucelle et deux téguments ; le tégument interne entoure complètement le nucelle excepté au niveau de l'orifice du micropyle qui permettra lors de la fécondation l'entrée du tube pollinique et le tégument externe qui n'entoure qu'une partie du nucelle, sur la face extérieure de l'ovaire : du micropyle jusqu'à une zone située légèrement après le canal stylaire. Adapté de Kiesselbach, (1949).
B, C : Observation à la loupe binoculaire d'ovaires de maïs après la sortie des soies, barres d'échelle = 1 mm, **D** : Soies émergentes dans les dernières étapes de la maturation des organes reproducteurs femelles, les papilles stigmatiques sont visibles (flèches noires).

l'apport en nutriments de l'ovule depuis la plante mère (Kiesselbach, 1949; Randolph, 1936). Dans un stade de maturation terminal du pistil, les carpelles entourant l'ovule vont se développer afin de former le style (soie). Un vaisseau vasculaire va passer de chaque carpelle dans la soie et des tissus vont se différencier afin de former des canaux de transmission dans lesquelles les tubes polliniques pourront se déplacer jusqu'à l'ovule. Au niveau des stigmates des soies, des cellules épidermiques vont se différencier en papilles stigmatiques, qui permettront l'interception des grains de pollen (figure I-14D) (Dumas and Mogensen, 1993). Lors du développement du nucelle, une cellule sous-épidermique va se diviser afin de former des nouvelles cellules dans son environnement proche jusqu'à se différencier en archesporium, qui par la suite va se différencier en mégasporocyte ou MMC, qui sera à l'origine du sac embryonnaire (Ma and Sundaresan, 2010; Reiser and Fischer, 1993; Tekleyohans *et al.,* 2017).

I.2.4.2 - La macrosporogenèse

Durant la macrosporogenèse, la MMC (2n) va subir deux méioses successives afin de former quatre mégaspores haploïdes (n) (figure I-15) (Berger and Twell, 2011; Chevalier *et al.,* 2011). Lors de la première méiose, le fuseau méiotique sera orienté parallèlement à l'axe du micropyle. Une paroi cellulaire va alors se former perpendiculairement à cet axe, conduisant à la formation d'un couple de mégaspores (Yadegari, 2004). Après la seconde méiose, de nouvelles parois cellulaires transversales vont être mises en place afin de former la tétrade de mégaspores, organisée de manière linéaire (Reiser and Fischer, 1993). Rapidement, les trois mégaspores les plus proches du micropyle vont dégénérer, suite à la mise en place d'un programme de mort cellulaire programmé (PCD), pour permettre l'expansion de la mégaspore supérieure qui sera fonctionnelle et constituera la première cellule du sac embryonnaire (Christensen *et al.,* 1997; Skinner *et al.,* 2004). Il semblerait que les mégaspores réagissent en fonction de leur position dans l'ovule. En effet, dans les étapes précoces de développement, la MMC affiche déjà des signes de polarité, notamment au niveau du positionnement des organites, des dépôts de callose et de la disposition du cytosquelette (Chevalier *et al.,* 2011; Drews *et al.,* 1998; Huang and Sheridan, 1994). Les dépôts de callose au niveau des mégaspores sont probablement à l'origine de leur dégénérescence, puisque ceux-ci limiteraient la réception de nutriments depuis le nucelle (Rodkiewicz, 1970). Bien que la voie moléculaire sous-jacente à la mise en place du programme de PCD dans les mégaspores soit encore inconnue, il est suggéré qu'une communication cellulaire impliquée dans la polarisation ait lieu entre la lignée germinale et les cellules sporophytiques voisines (Chevalier *et al.,* 2011).

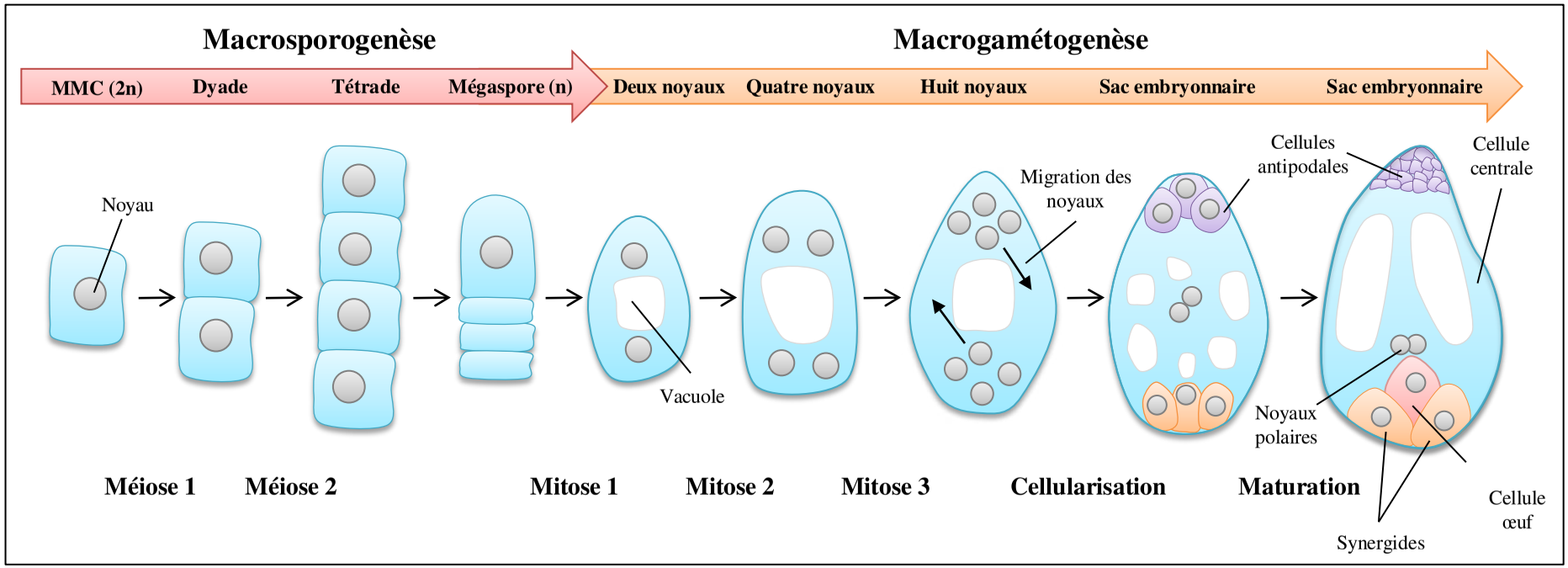


Figure I-15 : Processus développemental du sac embryonnaire chez le maïs.
La formation du sac embryonnaire se déroule en deux étapes majeurs, la macrosporogenèse et la macrogamétogenèse. Durant la macrosporogenèse, la cellule mère des macrospores (MMC, Megaspore Mother Cell) diploïde va subir deux méioses successives pour aboutir à la formation d'un tétrade de mégaspores haploïdes. Parmi les quatre mégaspores, trois vont dégénérer et une seule restera fonctionnelle, c'est la première cellule du sac embryonnaire. Cette mégaspore va subir trois cycles de divisions mitotiques conduisant à la formation d'un syncytium à huit noyaux avec quatre noyaux disposés de part et d'autre. Un noyau de chaque groupe va alors migrer vers le centre. La cellularisation des noyaux va s'opérer, conduisant à la formation du sac embryonnaire fonctionnel composé de six cellules haploïdes et d'une cellule centrale binucléée. Les cellules les plus éloignées du micropyle sont les cellules antipodales qui vont se diviser afin de former un ensemble de 20 à 40 cellules chez le maïs. Parmi les trois cellules présentes au niveau du micropyle, l'une d'entre elles va se différencier afin de former la cellule œuf alors que les deux autres, positionnées de part et d'autre de celle-ci vont se différencier en synergides. Schéma réalisé avec des informations provenant de Chevalier *et al.,* (2011), Ma and Sundaresan (2010) et Kiesselbach, (1949).

I.2.4.3 – Formation du sac embryonnaire : la macrogamétogenèse

Après la formation de la mégaspore, la macrogamétogenèse va être enclenchée. La mégaspore va alors subir une première mitose conduisant à la formation de deux noyaux. En quasi-concomitance, une grande vacuole va se former entre ces noyaux les contraignant à se positionner aux niveaux opposés de la cellule, le long de l'axe micropyle-chalaze (Berger and Twell, 2011; Chevalier *et al.,* 2011). Ces noyaux vont par la suite subir deux autres mitoses conduisant à la formation de quatre noyaux dans les coins opposés du syncytium (figure I-15) (Tekleyohans *et al.,* 2017). Un noyau de chaque groupe va alors migrer vers le centre jusqu'à se rencontrer et rester en contact mais sans pour autant fusionner chez le maïs, contrairement à ce qui peut être observé chez d'autres espèces, dont *A.thaliana* (Diboll, 1968; Huang and Sheridan, 1994; Liu *et al.,* 2010). La cellularisation des noyaux va alors s'opérer conduisant à la formation du sac embryonnaire fonctionnel composé de six cellules haploïdes et d'une cellule centrale binucléée (Yadegari, 2004). Les cellules les plus éloignées du micropyle seront les cellules antipodales qui vont se diviser afin de former un ensemble de 20 à 40 cellules (Huang and Sheridan, 1994; Vollbrecht and Hake, 1995). Cette étape supplémentaire reste très spécifique aux Poacées et ne s'opère pas, par exemple, chez *A.thaliana* qui gardera trois cellules antipodales (Christensen *et al.,* 1997). Pour finir, parmi les trois cellules présentes au niveau du micropyle, l'une d'entre elles va se différencier afin de former la cellule œuf alors que les deux autres, positionnées de part et d'autre de celle-ci vont se différencier en synergides qui permettront la réception du tube pollinique (figure I-15) (Yang *et al.,* 2010).

Durant l'ensemble de ce processus, le positionnement spatial des noyaux le long de l'axe micropyle-chalaze influencera la spécification cellulaire et jouera donc un rôle crucial dans l'obtention d'un sac embryonnaire fonctionnel (Skinner and Sundaresan, 2018; Sprunck and Grob-Hardt, 2011; Tekleyohans *et al.,* 2017). Par exemple, chez le maïs, de par ces applications pour la création de lignées haploïdes doublées, le gène *INDETERMINATE GAMETOPHYTE1* (*IG1*) est à ce jour celui qui a été le plus étudié parmi les gènes impliqués dans le développement du sac embryonnaire (Evans, 2007). Le gène *IG1* code pour un facteur de transcription de type LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) et est exprimé de manière asymétrique dans le sac embryonnaire, avec une forte expression au niveau de l'extrémité chalazaire. La mutation d'*IG1* affecte le nombre de noyaux et leur positionnement dans le sac embryonnaire, résultant d'une désorganisation du réseau de microtubules entraînant une désynchronisation des mouvements des noyaux et de leurs divisions. Chez les mutants *ig1*, des divisions supplémentaires entraînent la formation de cellules surnuméraires, dont le devenir dépendra de leur position (Evans, 2007;

Huang and Sheridan, 1996; Kermicle, 1969). De manière plus spécifique, le gène *Zea mays EA1-LIKE 1 (ZmEAL1*) a été identifié pour être impliqué dans le contrôle du devenir cellulaire des cellules antipodales. *ZmEAL1* code pour un peptide de la famille des EA1-box (EGG APPATURE1-box), qui sera sécrété par la cellule œuf lors des étapes développementales précoces afin d'inhiber la différenciation des cellules antipodales en cellules centrales (Krohn *et al.,* 2012; Uebler *et al.,* 2015). Ces observations mettent ainsi en lumière l'existence d'une communication cellulaire entre les différentes cellules du sac embryonnaire. Il est intéressant de noter que l'activité de *ZmEAL1* est nécessaire afin de réguler l'expression d'*IG1*, indiquant que les deux gènes sont dans la même voie moléculaire et que *ZmEAL1* agirait en amont d'*IG1* (Krohn *et al.,* 2012). Ces travaux, bien que la liste soit non exhaustive, montrent l'importance du positionnement des différents noyaux dans le sac embryonnaire dans le devenir cellulaire. Cette spécification du destin cellulaire et l'organisation des différentes cellules seront cruciales afin de faciliter la réception du tube pollinique (Chevalier *et al.,* 2011; Huang and Sheridan, 1994).

I.2.4 - Mécanismes de la double fécondation

Afin de remédier à l'immobilité des gametes mâles, les plantes à fleurs ont mis en place une stratégie basée sur le développement d'un tube pollinique qui permettra de guider les cellules spermatiques jusqu'au sac embryonaire. Ce mécanisme unique constitue un élément crucial afin d'assurer le processus de double fécondation. Le développement du tube pollinique, sa guidance jusqu'au sac embryonnaire femelle ainsi que la libération des gamètes mâles seront dépendants d'une véritable communication cellulaire qui s'operera entre les tissus mâles et femelles.

I.2.4.1 - Germination du grain de pollen et croissance du tube pollinique

L'adhésion du grain de pollen sur les papilles stigmatiques, la croissance du tube pollinique dans les soies et sa guidance jusqu'au sac embryonnaire seront dépendantes d'un processus complexe impliquant de nombreuses interactions cellulaires et moléculaires entre le gamétophyte mâle et les tissus sporophytiques et gamétophytiques femelles. Durant l'ensemble du parcours du tube pollinique de nombreux éléments dits attractants, pouvant être d'origines très variées, vont être sécrétés par les tissus femelles afin de l'orienter et de favoriser son développement. Parmi ces attractants, encore peu décrits chez le maïs, de nombreux peptides ont été identifiés chez *A.thaliana* et ont été classifiés en deux grandes catégories : les CRPs (Cystein Rich Peptides) et les NCRPs (non CRPs). De son côté, le mâle possède des récepteurs

membranaires afin de percevoir les signaux sécrétés par la femelle, bien que peu de couples ligand/récepteur aient encore été caractérisés (Berger *et al.,* 2008; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Dresselhaus *et al.,* 2016; Kessler and Grossniklaus, 2011; Lausser *et al.,* 2010).

I.2.4.1.a - Adhésion, hydratation du grain de pollen et germination

Après que les grains de pollen aient été libérés des anthères lors de la déhiscence (Bedinger and Fowler, 2009), ils vont être interceptés par les papilles stigmatiques (Edlund *et al.,* 2004). Chez le maïs, les papilles sont dites « sèches » en opposition aux papilles « humides » qui sécréteront des exsudats particuliers. Ces papilles seront caractérisées par une surface lisse, recouverte de matériel pariétal (Zhou *et al.,* 2017). En tant que tissu réceptif sporophytique, les papilles stigmatiques sont responsables de la conservation des grains de pollen et de la promotion de leur germination. Bien que la structure des grains de pollen et la surface du stigmate soient bien décrites, peu de connaissances sont encore disponibles quant aux mécanismes à l'origine de l'adhésion du grain pollen de maïs sur les soies. Des études ont mis en lumières l'implication de protéines sécrétées à la surface des papilles stigmatiques, seulement leur origine et leur composition restent encore inconnues (Heslop- Harrison and Heslop- Harrison, 1981). Chez certaines espèces, lors de l'interaction entre le stigma et les grains de pollen, vont s'initier des mécanismes d'auto-incompatibilité qui inhiberont la germination, ayant pour conséquence un meilleur brassage génétique (Doucet *et al.,* 2016). Concernant le maïs, l'adhésion et la germination du grain de pollen sur les papilles restent aspécifiques (Lausser *et al.,* 2010). Après leur capture, les grains de pollen vont progressivement se réhydrater et absorber différents nutriments présents à la surface des papilles, ce qui déclenchera l'apparition du tube pollinique avec le développement de la cellule végétative à partir de l'aperture (Zhou *et al.,* 2017).

I.2.4.1b - Développement et croissance du tube pollinique

Le tube pollinique va se développer selon une dynamique précise qui impliquera la mise en place de nombreux mécanismes de régulation. Il va croitre dans sa partie apicale par oscillations avec des phases régulières de croissances rapides et lentes qui seront associées avec une réorganisation de sa structure et de son métabolisme (Guan *et al.,* 2013). Pendant cette croissance, la paroi cellulaire maintiendra l'intégrité cellulaire, tout en promouvant une certaine plasticité dans la région apicale afin de permettre l'expansion cellulaire (Guan *et al.,* 2013). Le cytoplasme de la cellule végétative va se déplacer conjointement avec la croissance du tube pollinique. Il sera polarisé et divisé en deux zones structurales très distinctes ; une zone de

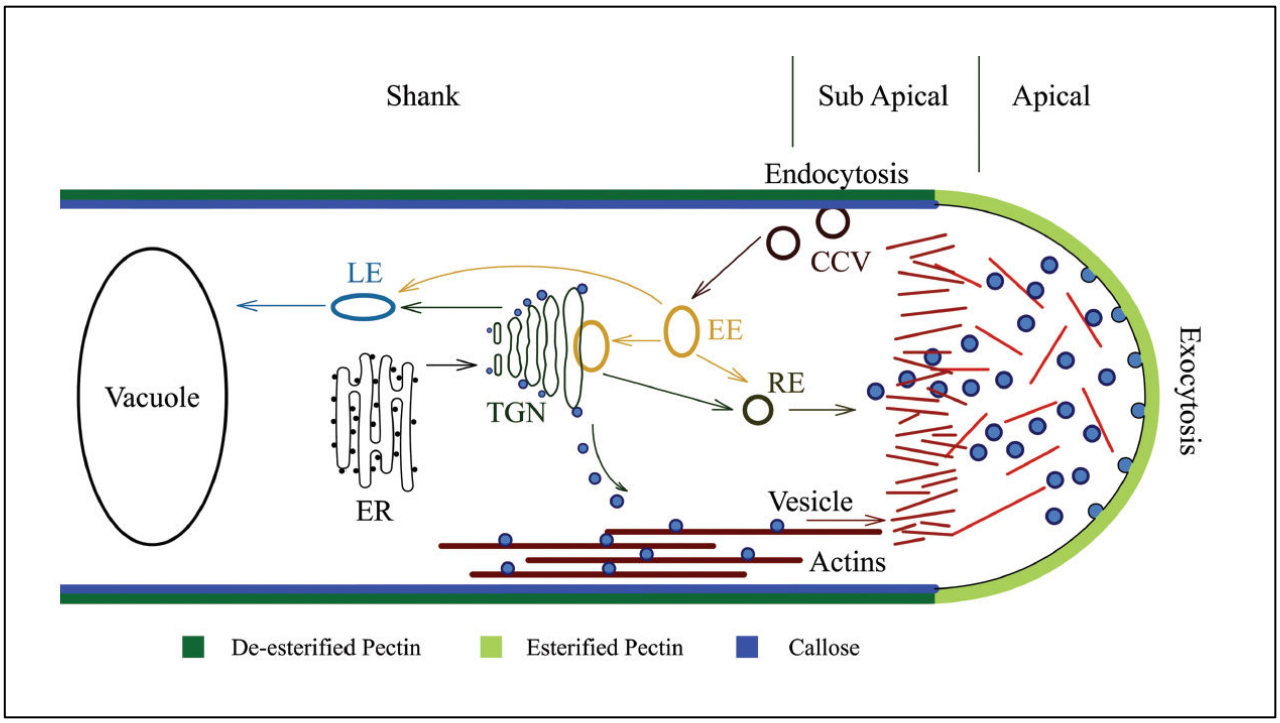


Figure I-16 : Régulations structurelles du développement du tube pollinique.
Le cytoplasme du tube pollinique est divisé en trois zones principales, le dôme apical (Apical), exempte d'organite et rempli de vésicules exocytaires (ronds bleus), la partie subapicale riche en organites et la partie du « tube » (shank). La croissance du tube pollinique est fortement dépendante de l'organisation des faisceaux d'actine (traits rouges) et des mécanismes d'exocytoses et d'endocytoses. EE : early endosome, LE : late endosome, RE : recycling endosome, CCV : clathrin-coated vesicule.
Schéma provenant de Guan *et al.,* (2013).

croissance et une zone fortement vacuolisée (Cameron and Geitmann, 2018). La zone de croissance, qui évoluera avec la croissance du tube, sera séparée de la zone vacuolisée par des dépôts de callose qui permettront de refermer les parties du tube pollinique déjà parcourues. Cette zone peut elle-même être subdivisée en trois régions ; le dôme apical exempt d'organite et rempli de vésicules exocytaires, la partie subapicale riche en organites et la partie du « tube » à proprement parler dans laquelle se trouve la MGU qui se déplacera en concomitance avec le cytoplasme (figure I-16) (Hafidh *et al.,* 2016; Honys *et al.,* 2006). Une partie supplémentaire pauvre en amyloplastes, dite « zone claire », a également été décrite. Cette zone débute de l'extrémité apicale et forme un cône inversé allant vers la partie subapicale. Elle ne contient pas de vacuole mais est riche en organelles et constituera une zone d'entrée d'eau nécessaire à la croissance du tube pollinique (Hepler and Winship, 2015). De manière globale, l'organisation cytoplasmique polarisée fournit une base structurelle afin de promouvoir la croissance du tube. Il est à noter l'existence d'un mécanisme de diffusion cytoplasmique en « fontaine inversée » qui sera notamment responsable du transport intracellulaire entre les différentes régions du tube (Cameron and Geitmann, 2018). Cette diffusion ainsi que l'organisation du cytoplasme dépendent de la dynamique du cytosquelette, majoritairement composé de faisceaux de microfilaments d'actine et de protéines motrices ; les myosines, qui seront essentielles à la régulation du trafic vésiculaire de la membrane plasmique vers le territoire apical (Bedinger and Fowler, 2009). Bien que moins décrit, les microtubules s'avèrent également impliqués dans le trafic vésiculaire et dans l'organisation du tube pollinique (Cai *et al.,* 2015; Fu, 2015). Le trafic vésiculaire sera fortement dépendant des mécanismes d'exocytose et d'endocytose. L'exocytose permettra la relocalisation à la membrane plasmique de transporteurs et de récepteurs, mais aussi la sécrétion de signaux de communication et de composés pariétaux. Les molécules internalisées seront alors acceptées par un endosome précoce, où elles seront triées et conduites vers différentes destinations intracellulaires (figure I-16) (Cai *et al.,* 2015; Guan *et al.,* 2013; Zonia and Munnik, 2008).

La mise en place du cytosquelette et la régulation du trafic intracellulaire afin de promouvoir la croissance du tube pollinique seront finement régulées par différents mécanismes moléculaires interconnectés (Cameron and Geitmann, 2018). Dans ce processus de régulation, l'implication de nombreux ions et notamment des ions calciums (Ca^{2+}) seront centraux. Le Ca^{2+} cytosolique, qui forme un gradient positif de la base du tube pollinique à son apex, constituera un messager secondaire important dans les réseaux de signalisation régulant l'élongation du tube pollinique. L'augmentation de Ca^{2+} à l'extrémité du tube pollinique provoque le désassemblage des filaments d'actine, favorisant ainsi l'exocytose et inversement lorsque la concentration

diminue (Steinhorst and Kudla, 2013). De même, le rôle des enzymes de type ROP (Rho Of Plant) GTPases est central, puisque celles-ci activent plusieurs voies de signalisation afin de déterminer les sites et la dynamique de l'exocytose, ce qui conduit à une croissance polarisée (Gu *et al.,* 2003; Kost, 2008). Un rétrocontrôle sera notamment observé avec les ions Ca^{2+} afin d'activer ou non des voies de signalisation impactant, en autres, les réseaux d'actine (Li *et al.,* 1999). Pour finir sur cette liste non exhaustive, certains phospholipides sont également impliqués dans de multiples processus, y compris dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans l'activation des canaux ioniques (Heilmann and Ischebeck, 2016; Zhang and McCormick, 2010).

Pour conclure, la croissance du tube pollinique nécessite une exocytose intensive dans la zone apicale, qui sera soutenue par une dynamique de cytosquelette et un trafic vésiculaire important. Ces mécanismes seront eux-mêmes dépendants de voies de signalisation complexes et inter-régulées entre elles.

I.2.4.1c - Guidage du tube pollinique dans les tissus sporophytiques femelles

Après la germination, le tube pollinique va progressivement se développer et s'introduire à travers un espace intercellulaire au niveau des papilles stigmatiques afin d'atteindre les tissus des soies (Zhou *et al.,* 2017). Lors de cette étape, des mécanismes d'hétéro-incompatibilité pourront être observés entre certains génotypes (Lausser *et al.,* 2010). Dans les cas d'incompatibilité, les tubes polliniques initieront normalement leur entrée dans les soies, mais ne parviendront pas à s'orienter à travers les tissus femelles qui, d'autant plus, n'apporteront pas d'élément nutritif (Dresselhaus *et al.,* 2011). En revanche, les tubes polliniques compatibles vont croitre à travers les canaux de transmission, jusqu'à atteindre la base de la soie où ils passeront la cavité de l'ovaire. Le développement du tube pollinique dans les canaux de transmission et de manière plus globale dans les styles des plantes est un processus complexe qui implique des interactions entre le gamétophyte mâle et les tissus sporophytiques femelles. Lors de cette étape des signaux moléculaires vont être émis par la femelle et le mâle afin de favoriser et de maintenir la croissance polarisée du tube pollinique ainsi que la dynamique du cytosquelette et du trafic vésiculaire (Berger *et al.,* 2008; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Lausser *et al.,* 2010). Chez le maïs, *POLLEN EXTENSIN-LIKE1* (*PEX1*), exprimé dans le pollen, est un gène majeur identifié pour jouer un rôle dans le déplacement du tube pollinique à l'intérieur des soies. Le gène *PEX1* code pour une extensine localisée dans la paroi du tube pollinique qui contribue au maintien de son intégrité lors de la croissance (Rubinstein *et al.,* 1995). En parallèle, des gènes codant, en autres, pour des expansines, dont *EXPB1,* sont impliqués dans l'altération des parois

cellulaires des tissus maternels afin de faciliter la progression du tube (Marowa *et al.,* 2016; Valdivia *et al.,* 2009).

Après un long parcours dans les canaux de transmission, le tube pollinique va atteindre la cavité de l'ovaire dans laquelle il sera mécaniquement guidé en suivant l'interstice à la surface du tégument externe jusqu'à la région micropylaire (Lausser *et al.,* 2010). Une fois dans l'ovaire, la guidance du tube pollinique sera majoritairement sous contrôle sporophytique des tissus de l'ovule, qui produiront des attractants chimiques pouvant être de natures très variées (Berger *et al.,* 2008; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Dresselhaus *et al.,* 2016; Lausser *et al.,* 2010). A l'approche de la zone micropylaire, des signaux attractants sécrétés cette fois par le gamétophyte femelle, seront nécessaires afin de guider le tube pollinique dans les différents tissus du nucelle jusqu'à atteindre le sac embryonnaire (Kessler and Grossniklaus, 2011). Chez le maïs, le gène *Zea Mays EGG APPARATUS1* (*ZmEA1*) a pu être identifié pour contribuer à l'attraction micropylaire du tube pollinique. *ZmEA1* est exprimé dans la cellule œuf ainsi que dans les synergides et code pour un peptide de type NCRP qui sera sécrété dans la zone microphylaire. Chez les plantes transgéniques sous-exprimant *ZmEA1*, les tubes polliniques arrivent jusqu'à l'ovule mais ne parviennent pas à atteindre le micropyle, indiquant l'importance de ce gène dans les dernières étapes du parcours du tube pollinique (Márton *et al.,* 2005).

Pour conclure, la guidance du tube pollinique jusqu'à l'ovule sera majoritairement sous contrôle des tissus sporophytiques femelles qui sécréteront de nombreux composés visant à favoriser la croissance du tube pollinique. Lorsque celui-ci se rapprochera de la zone micropylaire, l'intervention d'attractants d'origine gamétophytique sera essentielle afin de favoriser le passage du tube pollinique à travers les différents tissus de l'ovule jusqu'au micropyle.

I.2.4.2 - Réception du tube pollinique et libération des gamètes mâles

Dans les dernières étapes du parcours du tube pollinique, celui-ci va s'immiscer dans l'une des deux synergides puis éclater afin de libérer les cellules spermatiques dans le sac embryonnaire (figure I-17). Rapidement après cet éclatement, la synergide de réception va dégénérer alors que la deuxième continuera à produire des attractants favorisant la progression du tube (Dresselhaus and Márton, 2009; Kessler and Grossniklaus, 2011; Sandaklie-Nikolova *et al.,* 2007). De manière intéressante, lors de la réception du tube pollinique dans l'une des deux synergides, la deuxième toujours fonctionnelle continuera à attirer d'autres tubes polliniques, qui pourront éventuellement arriver à destination dans le cas d'un défaut de fécondation avec les

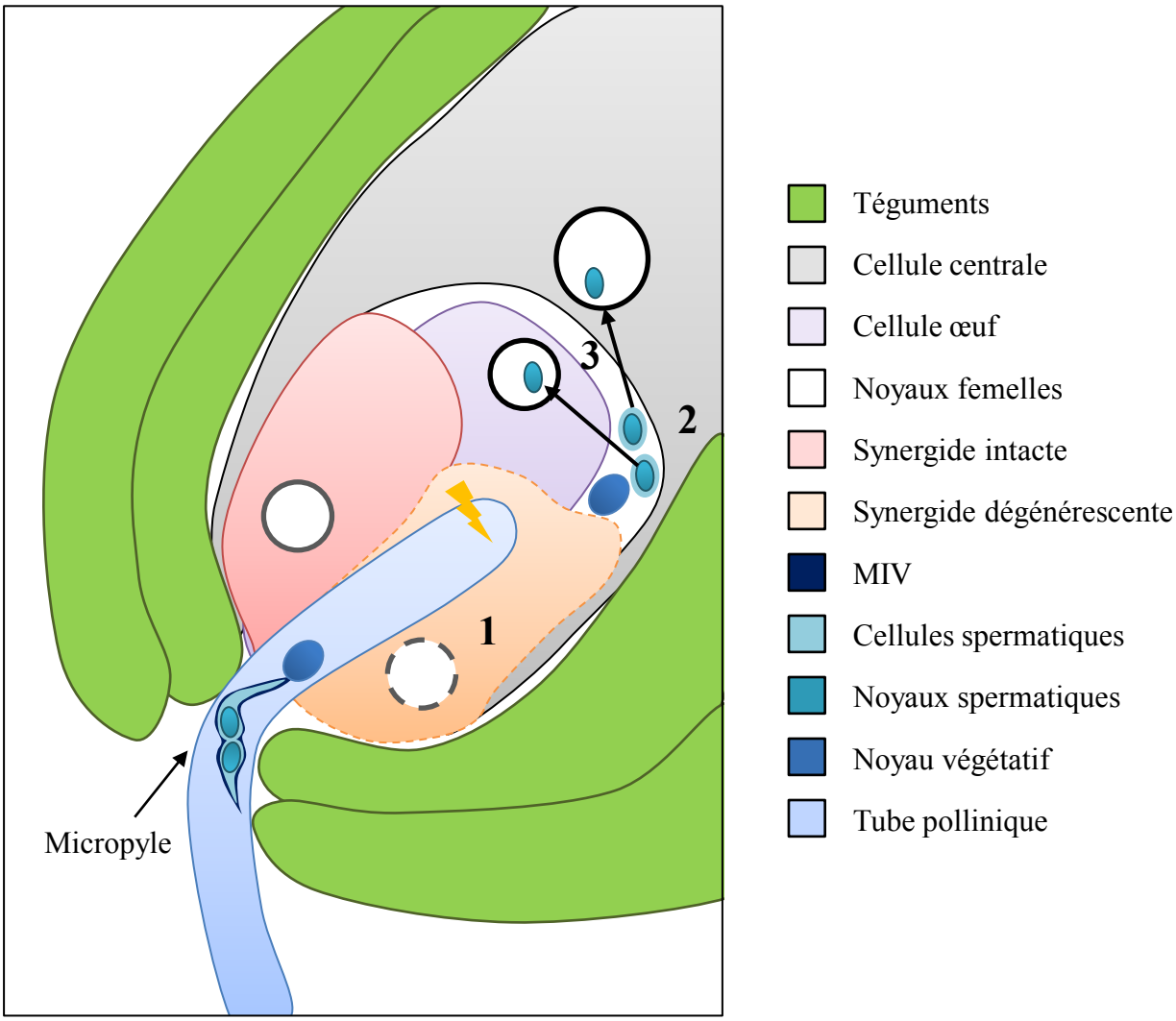


Figure I-17 : La reproduction sexuée chez les plantes est caractérisée par une double fécondation.
Représentation schématique du comportement des cellules spermatiques lors de la double fécondation chez les plantes. (**1**) Lors de la première étape, le tube pollinique arrive au niveau du sac embryonnaire en passant par le micropyle, il s'introduit dans l'une des deux synergides, éclate et libère son contenu, dont les deux cellules spermatiques. (**2**) Les cellules spermatiques restent un moment dans un espace situé entre la cellule œuf et la cellule végétative, durant lequel une communication mâle-femelle s'opère. (**3**) Dans les dernières étapes, les gamètes mâles et femelles vont fusionner ; une cellule spermatique haploïde va féconder la cellule œuf haploïde et l'autre la cellule centrale diploïde.
Adapté de Hamamura *et al.,* (2012).

gamètes mâles apportés par le premier tube pollinique, ce qui conduira à un processus d'hétérofécondation, c'est-à-dire à une fusion des cellules femelles œuf et centrale avec des cellules spermatiques provenant de deux grains de pollen différents (Gao *et al.,* 2011; Kasahara *et al.,* 2012; Maruyama *et al.,* 2013). Ces dernières étapes du parcours du tube pollinique seront fortement dépendantes de la communication mâle-femelle qui sera finement régulée par des signaux moléculaires envoyés par les gamètes. Chez *A.thaliana*, ces étapes ont bien été caractérisées, contrairement au maïs pour lequel peu d'informations sont encore disponibles.

Chez *A.thaliana*, les mutants *feronia* (*fer*) et *sirene* (*srn*) présentent un défaut lors de la réception du tube pollinique conduisant à une absence de fécondation. Lorsqu'un tube pollinique sauvage pénètre dans un ovule mutant, il ne va pas éclater dans l'une des synergides, mais va continuer à croitre en formant des spires extensives dans le gamétophyte femelle (Huck *et al.,* 2003; Rotman *et al.,* 2003). Il s'avère que les deux mutants *fer* et *srn* sont tous deux affectés au niveau du gène *FERONIA* (*FER*). Ce gène code pour un récepteur de type kinase s'accumulant au niveau de la membrane plasmique des cellules des synergides situées au niveau de l'aperture (Escobar-Restrepo *et al.,* 2007). Ce récepteur possède un domaine extracellulaire de type carbohydrate suggérant l'existence d'un ligand putatif encore non identifié. Il est cependant fortement envisageable que ce ligand soit un peptide produit par le tube pollinique afin de signaler sa présence. L'altération des gènes *TURAN* (*TUN*) et *EVAN* (*EVN*), codant pour des protéines impliquées dans la N-glycosylation au niveau du réticulum endoplasmique, affectent également la réception du tube pollinique. Les mutants *tun* et *evn* présentent des phénotypes semblables aux mutants *fer/srn* suggérant l'importance de putatives glycosylations du domaine extracellulaire de *FER* dans la réception du tube pollinique (Lindner *et al.,* 2015). De manière intéressante, des gènes paralogues de *FER* ont pu être identifiés dans le pollen, incluant *ANXUR1*, *2* (*ANX1, 2*). Les tubes polliniques des mutants *anx1* et *anx2* cessent de croître et éclatent avant d'arriver au niveau du gamétophyte femelle, mettant ainsi en avant l'implication mâle dans la communication cellulaire (Boisson-Dernier *et al.,* 2009; Miyazaki *et al.,* 2009). Le gène *LORELEI* (*LRE*) a également été mis en lumière pour son implication dans la réception du tube pollinique et dans la dégénérescence des synergides. Ce gène code pour une protéine d'ancrage de type glycosylphosphatidylinositol (GPI) s'accumulant majoritairement dans les synergides (Capron *et al.,* 2008; Tsukamoto *et al.,* 2010). LRE interagit avec FER et semble jouer un rôle afin de favoriser l'adressage de FER à la membrane plasmique des cellules ou/et de stabiliser le complexe récepteur à la surface des cellules. Il a été montré que le complexe FER-LRE était impliqué dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), en particulier lors de l'arrivée du tube pollinique (Li *et al.,* 2015a). Ces ROSs semblent avoir un rôle dans

l'induction de l'éclatement du tube pollinique qui sera dépendant du calcium, impliquant donc l'activation des canaux calciques. En effet, lors de sa croissance dans la synergide réceptrice, l'apex du tube pollinique induit une oscillation de Ca^{2+} cytosolique, qui aboutira à la mort des deux partenaires (Denninger *et al.,* 2014; Leshem *et al.,* 2013). La voie de signalisation de *FER* est nécessaire pour l'induction et la maintenance des réponses au Ca^{2+} et un mécanisme de signalisation, basé sur des RHO GTPase, agit probablement en aval de l'activation du complexe FER-LRE. Des travaux ont également été réalisés afin de comprendre la voie de signalisation intracellulaire dépendante de *FER* dans les cellules des synergides. Ainsi, le gène *NORTIA* (*NTA*) semble être impliqué dans ce processus et est requis pour l'éclatement du tube pollinique. La protéine NTA est redistribuée de façon FER-dépendante des compartiments endosomaux vers les membranes plasmiques des cellules des synergides lors de l'arrivée du tube pollinique (Kessler *et al.,* 2010).

Chez le maïs, l'étude du gène *Zea mays EMBRYO SAC 4* (*ZmES4*) suggère que des mécanismes moléculaires à l'origine de la machinerie de réception soient conservés. En effet, la dérégulation de l'expression de *ZmES4* entraîne un défaut dans la réception du tube pollinique ; celui-ci va être capable de pénétrer dans les couches cellulaires du nucelle mais son éclatement ne se produira pas. *ZmES4* code pour un peptide de type CRP qui s'accumule au niveau des cellules des synergides situées à l'aperture. L'expression de *ZmES4* ne sera plus effective rapidement après la dégénérescence des synergides indiquant une fonction spécifique lors de la réception du tube pollinique. Plus spécifiquement, *ZmES4* semble impliqué dans l'éclatement du tube pollinique notamment *via* l'activation de canaux potassiques. L'activation de ces canaux entraînerait une dépolarisation de la membrane plasmique et des flux d'ions qui auront pour conséquence une augmentation de la pression osmotique dans la cellule végétative, jusqu'à son éclatement (Amien *et al.,* 2010; Cordts *et al.,* 2001). De manière différente, *Zea mays PECTIN METHYTRANSFERASE1* (*ZmPEM1*) semble également impliqué dans l'éclatement du tube pollinique. *ZmPEM1* code pour une méthyltransférase spécifique des pectines, sécrétée par le sac embryonnaire afin de déstabiliser la membrane de l'apex du tube pollinique après sa pénétration dans la synergide et ainsi de favoriser son éclatement (Woriedh *et al.,* 2013).

Pour conclure, lors des dernières étapes de la progression du tube pollinique, une communication mâle-femelle va s'établir afin de favoriser son éclatement et donc la libération des gamètes mâles. Différents acteurs moléculaires ont été identifiés comme centraux dans le contrôle de la voie de signalisation sous-jacente à ce processus. En revanche, bien que l'existence de ligands mobiles, impliqués dans la signalisation de l'arrêt et de l'éclatement du tube pollinique,

soit fortement envisageable, peu d'informations sont disponibles quant à leurs natures (Berger *et al.,* 2008; Denninger *et al.,* 2014; Dresselhaus *et al.,* 2016; Kessler and Grossniklaus, 2011).

I.2.4.3 - Adhésion, fusion et activation des gamètes

Une fois libérées, les cellules spermatiques (CSs) vont atteindre le pôle chalazaire de la synergide dégradée, à la frontière avec les gamètes femelles (figure I-17). Un dialogue moléculaire va alors se mettre en place entre les gamètes, qui sera suivi d'un processus impliquant la reconnaissance et l'activation des cellules spermatiques ainsi que l'adhésion des membranes plasmiques. Dans les dernières étapes, les gamètes vont fusionner (plasmogamie), libérant ainsi le contenu des CSs dans les gamètes femelles (figure I-17). Puis, lors de l'étape de caryogamie, les noyaux des CSs vont fusionner avec les noyaux des cellules œuf haploïde et centrale diploïde afin de donner respectivement l'embryon et l'albumen (Dresselhaus *et al.,* 2016). Chez le maïs les processus de plasmogamie et de caryogamie seront associés avec un blocage de la polyspermie, empêchant la fusion de plusieurs cellules spermatiques (Zhou *et al.,* 2017). Bien que récemment, une étude a montré que quelques cas de polyspermies soient possibles, avec une fréquence plus importante pour la cellule centrale que pour la cellule œuf (Dresselhaus and Johnson, 2018; Grossniklaus, 2017).

Relativement peu de données sont encore disponibles sur les mécanismes de fusion des gamètes chez les plantes, bien que chez *A.thaliana* différents gènes ont déjà été identifiés durant l'ensemble de ce processus. Dans un premier temps, il va y avoir une étape de reconnaissance des cellules spermatiques par les gamètes femelles qui sera suivie par un attachement et une activation des gamètes. Il est intéressant de noter que durant l'ensemble du processus, les gamètes mâles restent positionnés dans un espace à l'interface entre la synergide dégradée et les gamètes femelles (Hamamura *et al.,* 2012). La présence de protéines spécifiques à la surface de la membrane plasmique des CSs pourrait jouer un rôle crucial dans cette reconnaissance et dans l'attachement qui en découle. Ainsi, le gène *GAMETE EXPRESSED 2* (*GEX2*) a pu être identifié pour être impliqué dans l'attachement des CSs. *GEX2* code pour une protéine localisée à la surface de la membrane plasmique des CSs, qui contient un domaine transmembranaire dans sa région C-terminale et un domaine extracellulaire similaire aux domaines de type immunoglobuline impliqués dans l'interaction des gamètes chez les mammifères (Mori *et al.,* 2014). Rapidement après l'attachement des gamètes mâles aux gamètes femelles, va s'ensuivre un processus d'activation des gamètes mâles dans lequel le gène *EGG CELL1* (*EC1*) s'avère jouer un rôle majeur. *EC1* code pour un peptide de type CRP qui s'accumule dans les vésicules

de stockage de la cellule œuf avant la fécondation puis qui sera exocyté lors de l'arrivée des cellules spermatiques dans la zone de reconnaissance. Il a été montré que l'apport exogène d'EC1 entraîne une activation du système endomembranaire des cellules spermatiques conduisant, entre autres, à une relocalisation de certaines protéines essentielles à la plasmogamie au niveau des membranes plasmiques (Rademacher and Sprunck, 2013; Sprunck *et al.,* 2012). D'une vision globale, il semblerait que la cellule œuf soit dans un premier temps activée, pendant ou immédiatement après la libération des cellules spermatiques, activant à son tour les cellules spermatiques, leur permettant ainsi de fusionner rapidement lors de la phase de plasmogamie (Hamamura *et al.,* 2012; Kranz *et al.,* 1995). En revanche, l'implication de la cellule centrale dans l'activation des gamètes reste encore peu caractérisée. Il semblerait cependant que l'activation d'une voie de signalisation *via* l'apparition de vagues de calcium soit impliquée dans ce processus. En effet, lors de l'éclatement du tube pollinique et du déchargement de son contenu, les gamètes femelles vont produire un pic transitoire de calcium juste avant la fusion des gamètes (Denninger *et al.,* 2014). Il est alors possible qu'un premier niveau d'activation des gamètes femelles soit déclenché par le contenu du tube pollinique. De même, l'éclatement du tube pollinique provoque une déformation des gamètes femelles, ce qui pourrait stimuler mécaniquement les canaux calciques (Dresselhaus *et al.,* 2016). Il semblerait que la fécondation unique de la cellule œuf soit suffisante afin de déclencher les premières étapes de divisions cellulaires de la cellule centrale sans fusion des noyaux mâle et femelle. Nowack *et al.,* (2006) ont mis en évidence ce processus par l'étude du mutant *cdka1* affecté dans la seconde mitose pollinique conduisant à la production de grains de pollen bicellulaires. Des expérimentations réalisées *in vivo* ont montré que les grains de pollen ne contenant qu'une cellule spermatique conduisaient à une fécondation de la cellule œuf et non de la cellule centrale. En revanche, même en l'absence de fécondation, la cellule centrale va initier des premières divisions mitotiques suggérant l'implication d'une voie de signalisation indépendante de la fusion des gamètes, probablement due à la perception de molécules provenant de la cellule œuf fécondée (Nowack *et al.,* 2006). Ces résultats ont pu être confirmés par Aw *et al.,* (2010) à la différence près que des fusions avec la cellule œuf ou avec la cellule centrale ont pu être observées dans des proportions similaires avec les grains de pollen bicellulaires. De plus, des grains de pollen *cdka1* tricellulaires ont également été identifiés. Dans ce dernier cas, les deux noyaux spermatiques vont fusionner avec les deux noyaux femelles, ce qui sera à l'origine d'une initiation de l'embryogenèse. Seulement, la fusion avec le noyau central va échouer, bloquant le passage du génome paternel et conduisant ainsi à un avortement prématuré des graines (Aw *et al.,* 2010). Ces résultats confirment donc l'importance de la présence du génome paternel dans les étapes

de développement précoces des graines. En revanche, l'entrée des cellules spermatiques semble être suffisante afin de déclencher les premières divisions mitotiques des cellules centrales, conduisant à la formation de couches cellulaires rudimentaires. Plus récemment, Kasahara *et al.,* (2016) ont montré, par le croisement de plantes sauvages avec du pollen mutant *gcs1/hap2* contenant des cellules spermatiques inaptes à la fécondation, que le déchargement du contenu du tube pollinique pouvait déclencher les premières étapes de l'embryogenèse. Résultant de ce phénomène un élargissement de l'ovule dû à des divisions et différenciations cellulaires ainsi qu'à un développement des téguments en l'absence de fécondation (Kasahara *et al.,* 2016).

Dans les dernières étapes de la fécondation, les membranes plasmiques des gamètes mâles et femelles vont fusionner, puis des composés internes des cellules spermatiques vont s'immiscer dans le cytoplasme des gamètes femelles et au final la plasmogamie sera initiée avec la fusion des cytoplasmes. Il semblerait que la fusion d'une cellule spermatique avec la cellule œuf soit nécessaire afin de promouvoir la fusion de la cellule centrale puisque celle-ci se réalise plusieurs minutes après la première fusion. Chez *A.thaliana*, le gène *GCS1/HAP2* est essentiel au bon déroulement de la plasmogamie. Les cellules spermatiques provenant des plantes mutantes *gcs1/hap2* vont être correctement libérées, mais ne fusionneront pas avec les gamètes femelles, entraînant une absence de fécondation (Besser *et al.,* 2006; Mori *et al.,* 2006). Le gène *GCS1/HAP2* code pour une protéine qui sera adressée à la surface de la membrane plasmique des cellules spermatiques juste avant la fusion des gamètes. Cet adressage sera très fortement dépendant de l'action d'*EC1* qui activera le système endomembranaire des cellules spermatiques (Sprunck *et al.,* 2012). La protéine *GCS1/HAP2* contient dans sa partie N-terminale un domaine extracellulaire très conservé entre les espèces, laissant envisager l'existence d'un gène homologue chez le maïs. Ce domaine, essentiel à la fonction de la protéine, a été proposé pour interagir avec des protéines présentes à la surface des gamètes femelles (Wong and Johnson, 2010; Wong *et al.,* 2010). Après la mise en place de la plasmogamie, la caryogamie va pouvoir être initiée. Les deux noyaux spermatiques vont alors migrer respectivement vers les noyaux de la cellule œuf et de la cellule centrale afin de fusionner et de finaliser le processus de double fécondation (Dresselhaus *et al.,* 2016). Chez les plantes, il a été montré que contrairement à la caryogamie animale, les microtubules sont dispensables pour la migration et la fusion des noyaux. En revanche, la présence de filaments d'actine sera nécessaire. En effet, après la plasmogamie, les noyaux spermatiques sont entourés d'une structure faite d'actine qui suivra leur migration. Progressivement, des faisceaux de microfilaments vont se former de manière dépendante des Rho-GTPases, qui permettront la migration des noyaux spermatiques jusqu'aux noyaux femelles. Les cytoplasmes des cellules femelles seront également enrichis en

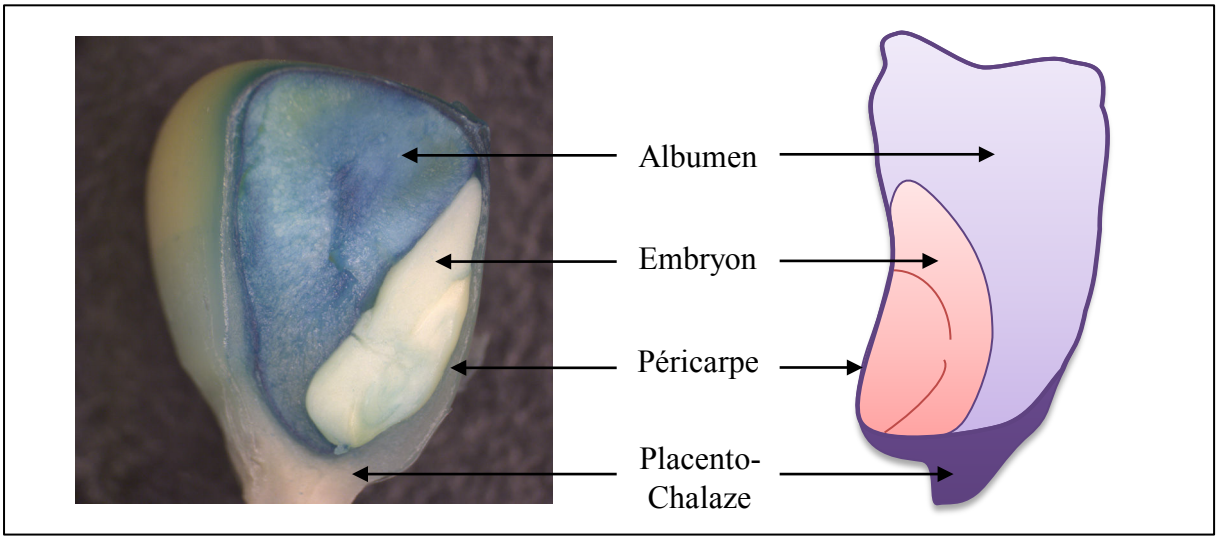


Figure I-18 : Le grain de maïs est composé de trois compartiments.
Illustration de l'organisation du grain de maïs après la double fécondation. Les grains de maïs sont composés de trois compartiments principaux : l'albumen triploïde et l'embryon diploïde provenant de la double fécondation ainsi que le péricarpe diploïde maternel. **A** : Photo d'un grain de maïs de 20 jours après la pollinisation, en bleu l'albumen (coloration histochimique GUS) et en blanc l'embryon, **B** : Représentation schématique d'un grain mature de maïs.

microfilaments qui contribueront à guider et à incorporer les noyaux (Kawashima and Berger, 2015; Kawashima *et al.,* 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires régissant la fusion des noyaux restent encore peu caractérisés chez les plantes, même si la protéine membranaire GEX1, s'avère être un candidat intéressant. Le gène *GEX1* qui est exprimé à la fois dans les cellules spermatiques et dans l'ovule, code pour une protéine prédite pour avoir trois domaines transmembranaires et un domaine extracellulaire (Alandete-Saez *et al.,* 2011). Son orthologue chez *Chlamydomonas*, *CrGEX1*, a un rôle dans la caryogamie similaire à *KARYOGAMY5* (*KAR5*), essentiel à la fusion nucléaire chez la levure (Dresselhaus *et al.,* 2016; Ning *et al.,* 2013).

Pour conclure, la double fécondation chez les plantes est un processus complexe et finement régulé, faisant intervenir une véritable communication cellulaire mâle-femelle. Tout au long du processus ; de la phase progamique à la fusion des gamètes, de nombreuses voies de signalisation seront activées afin de guider les noyaux spermatiques jusqu'aux noyaux femelles. De cette machinerie complexe découlera l'initiation de l'embryogénèse.

I.2.5 - Les produits de la double fécondation : l'embryon et l'albumen

La double fécondation conduira à la formation du grain chez le maïs (ou caryopse) composé de deux types tissus principaux ; l'embryon diploïde et l'albumen triploïde, résultant respectivement de la fusion des cellules spermatiques avec la cellule œuf et la cellule centrale. L'embryon sera englobé dans les tissus de l'albumen qui sera lui-même recouvert par le testa et le péricarpe maternels (2n) qui proviennent de la différenciation de tissus de l'ovaire et qui constituent une enveloppe de protection autour du grain (figure I-18). L'embryon donnera la future plantule alors que l'albumen servira de tissu nourricier, de la maturation du grain à sa germination. Celui-ci sera essentiel afin d'assurer un développement normal du grain (maïs) et plus globalement de la graine (plantes), puisqu'une altération de l'albumen conduira à des défauts dans le développement de l'embryon. L'une des causes d'avortement précoce de la graine réside dans un processus nommé « imbalance » de l'albumen. En effet, il a été mis en avant que le ratio entre le génome maternel et le génome paternel de 2:1, c'est à dire avec deux fois plus de génome maternel que de génome paternel, est essentiel afin d'avoir un bon développement de l'albumen (Carputo *et al.,* 1999; Lu *et al.,* 2012). La récente découverte de petits ANRs apportés par les cellules spermatiques paternelles pourrait fournir une explication moléculaire au mécanisme de dosage des génomes dans l'albumen. Ces petits ARNs paternels seront essentiels pour la stabilité du génome et la viabilité de la future graine (Borges *et al.,* 2018; Martinez *et al.,* 2018).

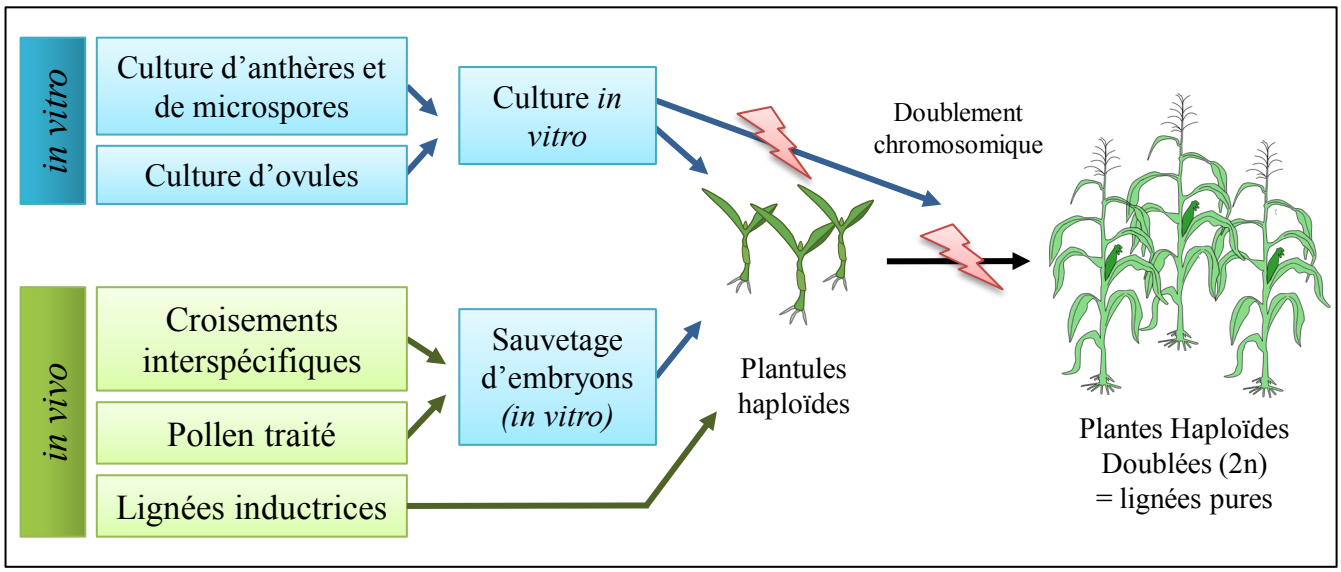
Le développement du grain est divisé en trois principales phases distinctes : le développement précoce, le remplissage et la déshydratation. Durant la phase précoce l'embryon et l'albumen vont respectivement se développer, suite à des divisions et des différenciations cellulaires successives à partir d'une cellule initiale, en des tissus multicellulaires distincts très différenciés (Vernoud *et al.,* 2005). Pendant le stade de remplissage, à la fois l'embryon et l'albumen accumulent des substances de réserve (acides gras et protéines chez l'embryon et amidon chez l'albumen). Enfin, la dernière étape se caractérise par la déshydratation et l'entrée en dormance de l'embryon avant la germination du grain en conditions favorables. Durant ces trois étapes, les différents compartiments du grain subiront d'importants changements développementaux parallèles qui seront finement coordonnés (Berger *et al.,* 2006; Doll *et al.,* 2017; Lafon-Placette and Köhler, 2014; Vernoud *et al.,* 2005; Widiez *et al.,* 2017).

I.3 - Exploitation des déviations de la reproduction sexuée pour la création de lignées haploïdes doublées

Le mixage s'opérant entre les génomes mâle et femelle lors de la reproduction sexuée des plantes présente des avantages indéniables d'un point de vue évolutif de par la création de nouvelles combinaisons génétiques et du réassortiment des caractères. Si la nouvelle diversité génétique générée peut être exploitée en amélioration des plantes, il y aura des situations où il sera plus avantageux d'éviter le brassage génétique s'opérant lors de la méiose et/ou lors de la fécondation, comme par exemple pour l'obtention de lignées fixées contenant les caractères parentaux à l'identique (Hand *et al.,* 2016). Le mode de reproduction végétatif des plantes peut contribuer à répondre à ces attentes mais celui-ci n'est pas applicable à toutes les espèces et notamment au maïs (Kiesselbach, 1949). De même, l'apomixie est un processus de reproduction asexuée s'opérant chez certaines espèces, conduisant à une déviation du programme gamétophytique femelle à l'origine de la formation de graines diploïdes maternelles. Ce processus permet de reproduire des plantes diploïdes génétiquement identiques à la lignée maternelle, incluant les hybrides F1, de manière simple et efficiente et peut constituer un atout majeur en agronomie (Barcaccia and Albertini, 2013; Grimanelli *et al.,* 2001; Hand and Koltunow, 2014; Ronceret and Vielle-Calzada, 2015; Sailer *et al.,* 2016). En revanche, ce processus n'est applicable qu'à un nombre restreint d'espèces, n'incluant pas le maïs, bien que celui-ci soit possible chez la téosinte, une espèce génétiquement proche (Grimanelli *et al.,* 1998).

Dans ce contexte, la technologie des plantes haploïdes doublées (HD) s'avère être la seule stratégie applicable chez le maïs afin de réaliser un équivalent de reproduction clonale par l'initiation d'une embryogenèse, c'est-à-dire du développement d'un embryon à partir d'une cellule initiale. Cette technologie repose sur deux étapes centrales et indispensables ; l'haploïdisation caractérisant le processus d'obtention d'individus haploïdes et la diploïdisation, correspondant au processus de doublement du stock chromosomique de ces individus afin d'obtenir des plantes HD homozygotes et fertiles. L'haploïdisation se base sur des déviations naturelles ou induites de certaines étapes de la reproduction sexuée et notamment de la formation des gamètes mâles et femelles. Ainsi, différentes stratégies d'haploïdisation, conduisant à l'obtention d'individus haploïdes paternels (androgenèse) ou maternels (gynogenèse), seront exploitables en amélioration des plantes et devront être adaptées en fonction des espèces et des fonds génétiques considérés (figure I-19) (Chang and Coe, 2009; Prasanna *et al.,* 2012).

A



B

Plantes concernées	Méthodes pour produire des haploïdes
Asperge	Cultures de microspores
Orge	Cultures d'anthères ou de microspores
Betterave	Cultures d'ovules
Choux fleur / Choux / Brocoli	Cultures d'anthères ou de microspores
Concombre	Gynogenèse *in vivo* par pollen irradié ou culture d'ovules
Aubergine	Cultures d'anthères
Lin	Cultures d'anthères
Maïs	Gynogenèse *in vivo* par croisements avec les lignées inductrices d'haploïdes
Melon	Gynogenèse *in vivo* par pollen irradié
Oignon	Cultures d'ovules
Piment	Cultures d'anthères
Colza	Cultures de microspores
Riz	Cultures d'anthères
Blé	Gynogenèse *in vivo* par croisements interspécifiques ou cultures d'anthères
Soja	Pas de méthode applicable
Tournesol	Pas de méthode applicable
Tomate	Pas de méthode applicable

Figure I-19 : **Vue d'ensemble des principales stratégies utilisées pour produire des plantes Haploïdes Doublées (HD).**
A : Plusieurs méthodes sont possibles afin d'obtenir des individus haploïdes (haploïdisation), soit en cultivant *in vitro* des gamétophytes mâles ou femelles, soit en induisant des haploïdes *in vivo*. Les individus haploïdes subiront ensuite un processus de doublement des stocks chromosomiques (diploïdisation) afin d'obtenir des plantes diploïdes. L'ensemble de ce processus conduira à l'obtention de plantes Haploïdes Doublées (HD).
B : Exemples de plantes d'intérêt agronomique où la technologie des HDs est utilisée dans les schémas de sélection actuels.

I.3.1 - Obtention d'haploïdes d'origine paternelle

Chez les plantes, les programmes développementaux gamétophytiques mâles peuvent être, dans certaines conditions, déviés vers des programmes développementaux somatiques, conduisant à une embryogenèse et donc à la formation d'individus haploïdes paternels. Cette reprogrammation, nommée l'androgenèse, fortement dépendante de la totipotence des cellules végétales, peut être induite *in vitro via* la mise en culture de microspores (Guha and Maheshwari, 1964), *in vivo via* l'exploitation d'une mutation chez le maïs ; *indeterminate gametophyte 1* (*ig1*) (Evans, 2007) ou par la manipulation des centromères (Ravi and Chan, 2010).

I.3.1.1 - Haploïdisation *via* l'androgenèse *in vitro* : cultures d'anthères ou de microspores

Dans les années 1960, une avancée considérable a été réalisée dans le domaine de l'amélioration des plantes par la découverte chez une Solanacée, *Datura innoxia*, de la faculté des microspores à se reprogrammer en structures semblables à des embryons haploïdes si les anthères étaient cultivées *in vitro* dans des conditions spécifiques (Guha and Maheshwari, 1964). Cette découverte majeure a par la suite été étendue à d'autres espèces d'intérêt agronomique, principalement de la famille des Solanacées, des Brassicacées et des Poacées (Dunwell, 2010; Dunwell and Sunderland, 1973; Gaillard *et al.,* 1991; Germanà, 2011; Lantos *et al.,* 2018; Lichter, 1982; Petolino and Thompson, 1987). Suivant les espèces considérées, il est possible de régénérer des embryons par la mise en culture des anthères ou des microspores isolées, en passant par un stade de callogenèse ou par une initiation de l'embryogenèse directe (Forster *et al.,* 2007; Germanà, 2011; Maraschin *et al.,* 2005; Seguí-Simarro and Nuez, 2008). La présence de tissus somatiques provenant des anthères en culture fournit un environnement moins artificiel et donc plus favorable pour les microspores (Maheshwari *et al.,* 1980). Cependant, chez les espèces où les protocoles expérimentaux ont été optimisés, l'isolement des microspores est la méthode de choix, car elle permet des rendements plus élevés en embryons et une limitation de la régénération des tissus somatiques maternels (Ferrie and Caswell, 2011). L'androgenèse est caractérisée en trois phases, incluant ; l'acquisition du potentiel embryogénique, l'initiation des divisions cellulaires et la différenciation cellulaire (Dunwell, 2010; Dwivedi *et al.,* 2015; Maraschin *et al.,* 2005). L'un des éléments majeurs dans la réussite de ce processus réside dans le stade de développement des grains de pollen immatures au moment de la mise en culture. Diverses études ont montré que le stade optimal se situait dans les étapes proches de la première mitose pollinique (PMI), avant la fixation du programme de développement gamétophytique

mâle en cours (Dunwell, 2010; Dwivedi *et al.,* 2015; Gaillard *et al.,* 1991). Les différents facteurs développementaux, physiologiques et environnementaux qui influencent le détournement du schéma normal de développement gamétophytique vers un développement sporophytique ont fait l'objet de nombreuses études (Javed *et al.,* 2012). La théorie a été proposée par Dunwell et Sunderland (1976) que la formation incomplète de la paroi cellulaire générative était une condition préalable aux divisions embryogéniques ultérieures. Les auteurs ont constaté chez *D.innoxia* que l'orientation mitotique lors de la PMI conduisait à une défaillance de la formation de la paroi cellulaire (Dunwell, 1976). L'application de stress lors de cette défaillance, induit des modifications développementales et un blocage du programme gamétophytique en cours au profil d'une mitose symétrique (Zonia and Tupý, 1995). L'application d'un stress ; physique ou chimique, sera donc un deuxième facteur clé dans l'initiation de l'androgenèse. Plusieurs sources de stress sont utilisables, dont les plus conventionnelles sont les stress osmotiques et thermiques (Dwivedi *et al.,* 2015; Prem *et al.,* 2012), comme cela est généralement le cas chez le maïs (Gaillard *et al.,* 1991; Uváčková *et al.,* 2012). L'application d'un stress sur les microspores, entraîne des modifications physiologiques et transcriptomiques à l'origine de leurs reprogrammations (Bárány *et al.,* 2005). Ainsi, les microspores vont s'agrandir de manière significative, le cytoplasme va subir un remodelage intensif avec la perte de nombreuses organelles, le cytosquelette va se réorganiser conduisant à une migration du noyau au centre de la cellule et la grande vacuole va se fragmenter (Bárány *et al.,* 2010; Seguí-Simarro and Nuez, 2008). Il a été montré chez le tabac que les microspores en transition embryogénique, perdaient des quantités considérables de protéines et d'ARNs, témoignant d'une inhibition du processus biosynthétique (BHOJWANI *et al.,* 1973). Le remodelage, c'est-à-dire la dédifférenciation du cytoplasme, est à l'origine du processus de reprogrammation, bien que dans de nombreux cas cela déclenche un programme de mort cellulaire des microspores (Bárány *et al.,* 2018). Il existe deux voies connues chez les eucaryotes qui conduisent au remodelage cytoplasmique : le système protéasomal ubiquitine-26S, qui est la principale voie cellulaire de dégradation des molécules (Vierstra, 2009) et l'autophagie, impliquée dans la dégradation et le recyclage des organites *via* les lysosomes (Masclaux-Daubresse *et al.,* 2017). Bien que ces voies soient régulées par le développement, elles sont également activées dans des conditions de stress. Par ailleurs, le cytoplasme va s'alcaliniser contrairement à une acidification normale lors du développement gamétophytique (Pauls *et al.,* 2006). Cette alcalinisation coïncide avec la régulation à la hausse de gènes codant pour des sous-unités vacuolaires de l'ATPase et est également proposée comme étant à l'origine des réarrangements cytosquelettiques et/ou des cascades de phosphorylations des protéines (Chan and Peter Pauls, 2007). Le réarrangement du cytosquelette a été proposé

pour jouer un rôle crucial lors de la reprogrammation, initiant, entre autres, la division mitotique symétrique en raison de la perte de la polarité du noyau, impliquée dans la division asymétrique (Twell *et al.,* 1998). Sur la base de ces observations, il a été proposé que le stress entraînait la dédifférenciation des microspores par la répression du programme gamétophytique (Rodríguez-Sanz *et al.,* 2015). En ce qui concerne le déterminisme génétique à l'origine de l'androgénèse, des études ont mis en évidence une expression différentielle de nombreux gènes qui peuvent être classés en trois groupes, respectivement impliqués dans la réponse aux stress, la suppression du programme gamétophytique et la mise en place du programme embryogénique (Boutilier *et al.,* 2002; Lotan *et al.,* 1998; Srinivasan *et al.,* 2007) (pour revue Seguí-Simarro and Nuez, 2008).

Pour conclure, l'androgenèse *in vitro* entraîne la modification du programme gamétophytique mâle en cours en programme embryogénique en raison d'une reprogrammation des microspores. Cette méthode est applicable à un grand nombre d'espèces mais présente l'inconvénient d'être dépendante d'un laboratoire de culture *in vitro*, conduisant à des coûts de production élevés. De plus, chez le maïs certains génotypes s'avèrent récalcitrants à la régénération *in vitro* ne rendant pas possible son application systématique (Prasanna *et al.,* 2012).

I.3.1.2 - Haploïdisation *in vivo via* le système *ig1* chez le maïs

Bien que moins prépondérant dans les stratégies de génération d'haploïdes *in vivo* adoptées aujourd'hui dans la filière HD maïs, il existe un système permettant l'obtention *in vivo* d'individus haploïdes paternels. Celui-ci se base sur l'utilisation de la mutation *ig1* (voir partie I.2.4.3), apparue spontanément dans la lignée Wisconsin-23 (W23) (Kermicle, 1969). Chez les mutants homozygotes *ig1*, les sacs embryonnaires ne se développent pas normalement en raison d'un défaut dans le nombre de noyaux et dans leurs positionnements (Evans, 2007). Il est à noter que lorsque les plantes *ig1* sont utilisées comme femelles et que les fusions des cellules spermatiques et des cellules œufs se produisent, il est possible d'obtenir un pourcentage de cellules œufs reprogrammées contenant le cytoplasme maternel mais les chromosomes paternels (entre 1% et 2%) (Kindiger and Hamann, 1993). Cette méthode peut ainsi être utilisée afin d'obtenir des haploïdes paternels et de réaliser des transferts de cytoplasmes d'intérêts (stérilité mâle cytoplasmique par exemple) (Schneerman *et al.,* 2000). Bien que le gène *IG1* ait été cloné, le mécanisme sous-jacent à l'induction d'haploïdes reste encore inconnu (Evans, 2007).

I.3.1.3 - Haploïdisation *via* la manipulation des centromères

Récemment, Ravi et Chan (2010) ont montré que la manipulation de l'histone 3 centromérique (CENH3), un variant de l'histone 3 (H3), chez *A.thaliana* conférait la capacité d'induction d'haploïdes *via* l'élimination du génome parental transgénique (Ravi and Chan, 2010). Ces travaux s'inscrivent parmi les découvertes majeures relatives à la technologie des HDs, puisque cette méthode pourrait être applicable à un large panel d'espèces *à priori* récalcitrantes aux méthodes conventionnelles, puisque l'ensemble des plantes possèdent des protéines CENH3 (Britt and Kuppu, 2016; Ishii *et al.,* 2010). Le variant CENH3 est constitué d'une queue N-terminale qui est très variable entre les espèces et d'un domaine C-terminal de repliement des histones (Histone Fold Domain, HFD), très conservé (Britt and Kuppu, 2016). Ravi et Chan (2010) ont généré une protéine histone H3.3/CENH3 chimérique en substituant la queue N-terminale de CENH3 par une fusion de la queue N-terminale d'une histone H3.3 avec la GFP. Chez *A.thaliana*, cette fusion complémente le phénotype embryon létale du mutant *cenh3-1*. Néanmoins, ces plantes, nommées « GFP-Tailswap », présentent une stérilité mâle prédominante, bien que la production de quelques grains de pollen fertiles soit possible. Dans le cas des fécondations croisées, les chromosomes des plantes GFP-Tailswap sont souvent partiellement ou totalement éliminés après la fécondation, entraînant respectivement la formation d'individus aneuploïdes (c'est à dire avec un nombre anormal de chromosomes) ou haploïdes, en plus des cas de grains normaux hybrides, donc diploïdes. Cette élimination est probablement générée de manière similaire à celle observée lors des croisements interspécifiques instables (voir partie I.3.2.3). Lorsque des plantes femelles GFP-Tailswap sont croisées avec du pollen sauvage, la descendance résultante sera à environ 30% haploïdes paternels, 30% aneuploïdes, 30% diploïdes et les pourcentages restants ne seront pas viables. Les haploïdes paternels ressortant de ces croisements contiennent les chromosomes du parent mâle de type sauvage et le cytoplasme maternel. Du fait de la stérilité mâle, le croisement réciproque est plus difficile et conduit à l'obtention de seulement 4% à 5% d'haploïdes maternels et 4% à 11% d'aneuploïdes (Ravi and Chan, 2010). De façon intéressante, une forte proportion de graines avortées est observable lors du croisement d'une plante GFP-Tailswap avec du pollen sauvage. Ces graines sont interprétées comme le résultat d'aneuploïdie marquée dans l'embryon et/ou dans l'albumen qui serait responsable de l'avortement. Bien que les deux cas de figure soient possibles, cette méthode est plutôt considérée comme une stratégie visant à obtenir des haploïdes paternels. Les auteurs ont proposé que la fonction des centromères modifiés soit normale, excepté dans le cas où ils se trouveraient en concurrence avec des centromères de type sauvage.

Plus récemment, le transfert de cette technologie tailswap-CENH3 a été réalisé chez le maïs, mais les taux d'induction d'haploïdes observés restent faibles (inférieurs à 4%) (Kelliher *et al.,* 2016). Par ailleurs, il a été montré que la génération de mutations ponctuelles dans le domaine conservé de CENH3 chez l'arabette, l'orge et la betterave à sucre entraînait une baisse de l'enrichissement en CENH3 au niveau des centromères. Environ 4 à 5% d'haploïdes paternels ont par la suite pu être obtenus en utilisant ces mutations ponctuelles dans *CENH3* chez *A.thaliana*, *via* l'utilisation de ces plantes mutantes en parents femelles uniquement et non en parents mâles, appuyant ainsi le rôle d'une protéine intègre dans un brassage normal des chromosomes mâles et femelles (Karimi-Ashtiyani *et al.,* 2015). De part les résultats concluants obtenus chez *A.thaliana* et nuancés chez le maïs, ces travaux permettent d'envisager de transférer cette méthode d'induction d'haploïdes à d'autres espèces d'intérêt, ouvrant potentiellement de nouvelles possibilités dans la filière HD (Britt and Kuppu, 2016; Ravi *et al.,* 2014).

I.3.2 - Obtention d'haploïdes d'origine maternelle

La régénération d'individus haploïdes possédant un génome d'origine maternelle *via* l'utilisation des gamétophytes femelles représente une stratégie alternative afin de produire des haploïdes, dans les situations où les méthodes d'haploïdisation décrites dans la partie précédente (I.3.1) ne sont pas applicables ou suffisamment efficientes. De manière globale, la reprogrammation des gamétophytes femelles en embryons haploïdes est généralement décrite par le terme de gynogenèse ou de parthénogenèse. Le terme de gynogenèse est réservé à l'embryogenèse haploïde induite par la fécondation alors que la parthénogenèse décrit le développement d'un gamétophyte femelle en embryon en l'absence de fécondation.

I.3.2.1 - Haploïdisation *via* la gynogenèse *in vitro* à partir de culture d'ovules

La gynogenèse *in vitro* consiste en la régénération d'embryons haploïdes à partir des gamétophytes femelles non pollinisés. Ce processus peut être initié avec la mise en culture *in vitro* de diverses parties des fleurs, incluant les ovules, les ovaires ou les boutons floraux (Forster *et al.,* 2007). La formation d'embryons haploïdes spontanés d'origine maternelle a été reportée pour la première fois chez l'espèce *Datura stramonium* (Blakeslee *et al.,* 1922) et les premières plantes haploïdes régénérées *in vitro* à partir d'ovaires non pollinisés ont été obtenues chez l'orge (*Hordeum vulgare*) (San Noeum, 1976). La gynogenèse *in vitro* fonctionne chez plusieurs espèces incluant notamment l'oignon (Bohanec *et al.,* 1995), la betterave à sucre (Gürel *et al.,* 2000), le riz (Chang and Hong-Yuan, 1981), le blé (Sibi *et al.,* 2001), l'orge (San Noeum, 1976)

mais son application en amélioration des plantes se limite principalement à l'oignon et à la betterave à sucre (figure I-19B) (Bohanec, 2009; Chen *et al.,* 2011). Le succès de la méthode sera grandement influencé par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Le génotype des plantes donneuses, associé aux conditions de croissance de la plante mère sont les facteurs cruciaux dans la reprogrammation de la voie gamétophytique femelle vers la voie sporophytique. Le stade de développement des gamètes, le prétraitement des boutons floraux avant l'induction, les milieux de culture et les conditions de culture sont d'autres facteurs influant la réponse embryogénique (Chen *et al.,* 2011). Le gamétophyte femelle est généralement immature lors de son prélèvement et contrairement à l'androgénèse, son développement se poursuivra pendant la culture *in vitro*, conduisant à un sac embryonnaire mature contenant plusieurs cellules haploïdes théoriquement capables de former des embryons haploïdes (Musial *et al.,* 2005). Dans des conditions optimales, les ovules de la plupart des espèces sensibles à la gynogenèse connaissent un développement sporophytique s'apparentant fortement au processus de parthénogenèse, en évitant le risque de variations gamétoclonales (Bohanec, 2012). Bien que les haploïdes gynogénétiques présentent une stabilité génétique plus élevée par rapport aux plantes androgénétiques, la gynogenèse est principalement utilisée chez les plantes où d'autres techniques d'induction d'haploïdes ne sont pas exploitables. De plus, sa réussite est fortement dépendante du génotype et n'est applicable qu'à un nombre restreint d'espèces, n'incluant pas le maïs (Prasanna *et al.,* 2012).

I.3.2.2 - Haploïdisation *in vivo via* l'utilisation de grains de pollen traités

De nombreuses études ont été conduites afin d'induire des haploïdes ou d'augmenter la fréquence des haploïdes en traitant le pollen avant la pollinisation avec divers agents chimiques ou physiques. Les traitements chimiques, tels que par exemple, la colchicine, des herbicides ou des hormones, n'ont généralement pas de donné de résultat concluant, entres autres, de par un faible taux de survie des grains de pollen (Al Yasiri and Rogers, 1971; Chang and Coe, 2009; Chase, 1969; Hu *et al.,* 1991; Zuoyu and Mingguang, 1988). Pour cette raison, les méthodes physiques sont largement plus développées et notamment celles basées sur l'utilisation de traitements à la chaleur et aux radiations (généralement les rayons gammas du cobalt 60) (Dunwell, 2010). Ces traitements, entraînent des réarrangements et des fragmentations chromosomiques dans les cellules spermatiques qui perdent leur fonctionnalité pour la fécondation conduisant à une inhibition de la transmission des gènes paternels (Borrino *et al.,* 1985; Chat *et al.,* 2003; Snape *et al.,* 1983; Werner *et al.,* 1984). En revanche, la transmission des génomes chloroplastiques se déroulera normalement, indiquant qu'il y a bien eu un

déchargement du tube pollinique. Les mécanismes sous-jacents à l'embryogenèse résultant de la pollinisation avec du pollen défectueux restent énigmatiques, même s'il a été proposé qu'ils s'apparenteraient à ceux observés lors de la parthénogenèse (Dunwell, 2010). Cette méthode est largement utilisée chez le melon et présente des taux d'efficacité intéressant mais nécessite tout de même le recourt à un sauvetage d'embryons en raison de l'absence de développement de l'albumen (Dong *et al.,* 2016). Chez le maïs quelques études reportent des pollinisations avec du pollen traité (Mathur *et al.,* 1980; Morgan, 1976), mais cette méthode ne présente pas une efficacité suffisante afin d'être utilisée à grande échelle, notamment en raison de la nécessité du sauvetage des embryons et surtout en regard de l'efficacité des croisements intraspécifiques (Ren *et al.,* 2017a).

I.3.2.3 - Haploïdisation *via* des hybridations interspécifiques : une élimination uniparentale des chromosomes

Chez diverses espèces, l'apport de pollen provenant d'une autre espèce peut conduire au déclenchement de l'embryogenèse gamétophytique femelle, avec le développement d'embryons haploïdes (Forster *et al.,* 2007; Ishii *et al.,* 2016; Ren *et al.,* 2017a). L'haploïdisation *in vivo* initiée par un croisement interspécifique a pour la première fois été identifiée chez l'orge *via* son croisement avec une espèce relativement proche génétiquement ; *Hordeum bulbosum* (Kasha and Kao, 1970). Des hybrides contenant les deux génomes parentaux peuvent être obtenus après pollinisation (Humphreys, 1978), mais s'ensuivra une perte sélective des chromosomes de *H.bulbosum*, dans un processus nommé l'hybridation instable (Davies, 1974; Thomas and Pickering, 1983). En revanche, cette stratégie n'initiera pas la reprogrammation de l'albumen qui avortera rapidement après la fécondation de par un niveau de ploïdie anormal, nécessitant le recourt à un sauvetage de l'embryon *in vitro* (Ishii *et al.,* 2016). L'hybridation instable, associée aux sauvetages d'embryons, s'est par la suite vue standardisée et nommée la méthode « *bulbossum* » (Devaux, 2003). Celle-ci a rapidement été optimisée et son application s'est repandue à de nombreuses autres espèces (Ishii *et al.,* 2016). Elle est notamment largement utilisée dans la filière du blé tendre, par la pollinisation de celui-ci avec du pollen de maïs (Laurie and Bennett, 1986). Le maïs est d'ailleurs l'espèce la plus utilisée comme donneuse pour l'induction chez d'autres céréales incluant notamment, le triticale (Wędzony, 2003), le seigle (Immonen and Tenhola-Roininen, 2003) et l'avoine (Davies and Sidhu, 2017; Rines, 2003). Il est à noter que les conditions génétiques et environnementales, telles que la température et l'intensité lumineuse, peuvent affecter la fréquence d'obtention d'haploïdes (Bitsch *et al.,* 1998;

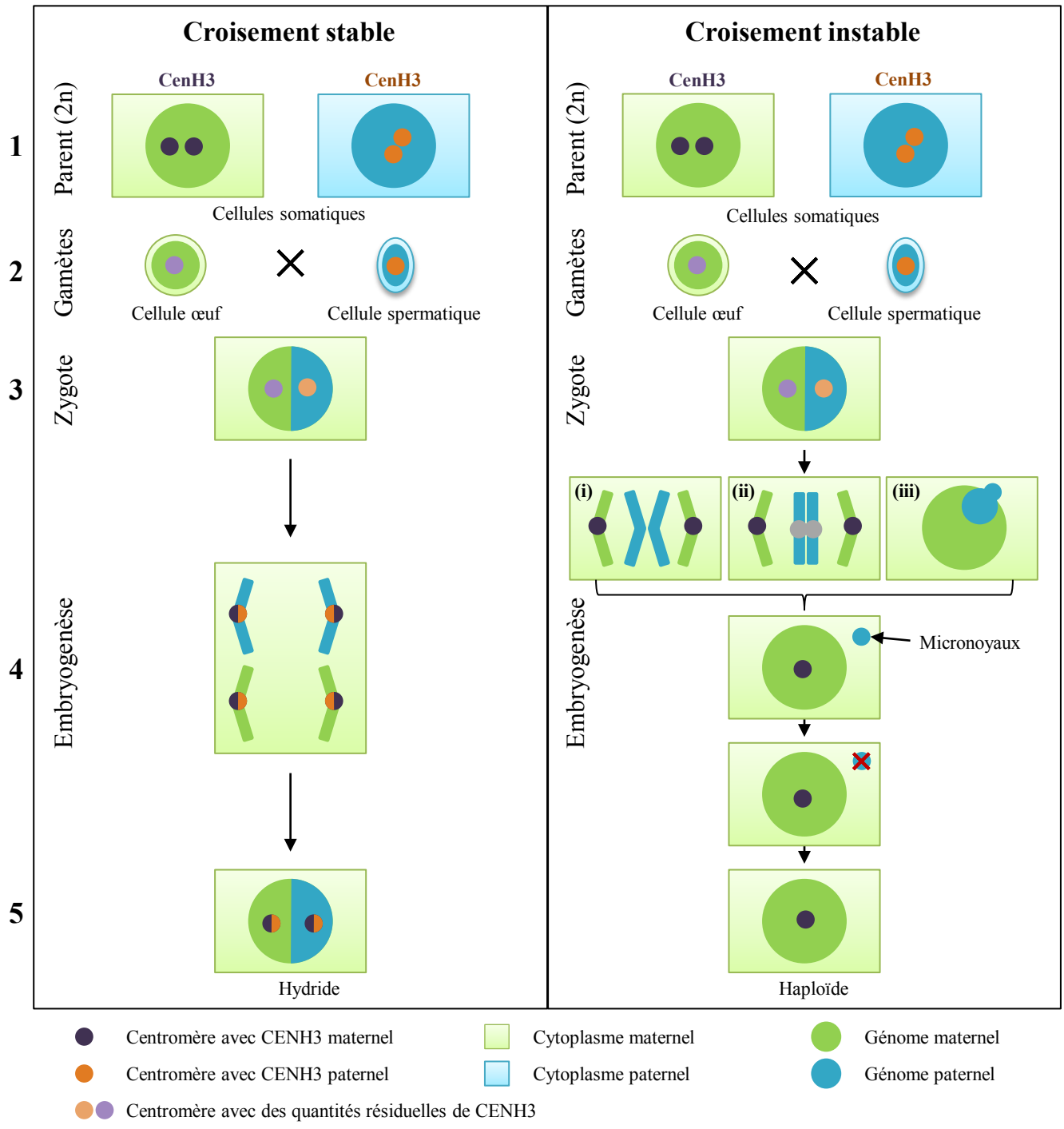


Figure I-20 : **Modèle putatif afin d'expliquer l'haploïdisation *via* les croisements interspécifiques.** Représentation schématique du processus putatif de l'élimination d'un génome uniparentale lors des croisements intraspécifiques, conduisant à des hybridations instables (à droite) en comparaison à une situation d'hybridation stable (à gauche). (**1**) Le processus commence avec un couple de parents diploïdes, codant chacun pour une protéine CENH3 différente. (**2**) La cellule spermatique mâle va fusionner avec la cellule œuf femelle pour (**3**) former un zygote hybride. (**4**) Dans les croisements hybrides stables, il n'y a pas d'élimination des chromosomes. Le comportement des CENH3 parentaux lors de l'embryogenèse précoce reste inconnu ; les centromères peuvent accepter les deux formes ou seulement une forme parmi les deux du variant. Dans les croisements instables, l'élimination des chromosomes de l'un des deux parents entraîne la formation d'embryons haploïdes. Ce processus peut être dû à une anomalie lors de la mitose avec (i) une inactivité des centromères de l'un des parents ou (ii) une libération prématurée des chromatiques-sœurs. La désynchronisation du cycle cellulaire (causée par exemple par des différences génétiques) peut, chez un hybride instable, interférer avec le chargement rapide de CENH3 sur les nucléosomes paternels. L'élimination peut également résulter (iii) d'un mécanisme indépendant de la mitose, avec la formation de bourgeons de chromatide parentale pendant l'interphase. De ces trois hypothèses, vont résulter des micronoyaux aux centromères inactifs qui vont dégénérer et être éliminés, (5) entraînant ainsi la formation d'embryons haploïdes. Adapté de Ishii *et al.,* (2016).

Campbell *et al.,* 2001; Pickering, 1985). En ce qui concerne le maïs comme plante receveuse, bien que quelques haploïdes aient été identifiés après des croisements avec le sorgho et la téosinte, cette méthode n'a pas donné de résultats concluants en regard de ceux obtenus avec les croisements intraspécifiques, basés sur l'utilisation des lignées inductrices d'haploïdes (Chang and Coe, 2009). En revanche, il est tout de même intéressant d'étudier la mécanistique sous-jacente à ce processus afin de la confronter à celle s'opérant lors des croisements intraspécifiques. De nombreuses études se sont accordées sur le fait que l'haploïdisation induite par les croisements interspécifiques était due à une élimination progressive de l'un des deux génomes parentaux après la fusion des gamètes, lors des étapes précoces de l'embryogenèse (Gernand *et al.,* 2005; Ho and Kasha, 1975; Kasha and Kao, 1970; Lange and Jochemsen, 1976). Ainsi, dans le croisement *H.vulgare* X *H.bulbosum,* les chromosomes de *H.bulbosum* sont entièrement éliminés plusieurs jours après pollinisation, indépendamment du sens du croisement, conduisant donc à la formation d'haploïdes maternels ou paternels (Humphreys, 1978). En revanche, étant donné que le sens de croisement est généralement appliqué de manière à obtenir des haploïdes maternels, le terme de gynogenèse *in vivo* peut être appliquée à l'haploïdisation *via* des croisements interspécifiques, même s'il convient de noter que l'obtention d'haploïdes paternels est possible. Des études cytologiques du processus d'élimination ont révélé que celui-ci est associé à la formation de micronoyaux lors des premières mitoses de l'embryon hybride (Gernand *et al.,* 2005; Lange and Jochemsen, 1976; Laurie and Bennett, 1989). Les chromosomes destinés à être éliminés ne se rassemblent pas correctement en métaphase entraînant leur retard à l'anaphase (Laurie and Bennett, 1989). Les fragments chromosomiques en retard lors de la reconstitution de la membrane nucléaire après la télophase formeront les micronoyaux (Mochida *et al.,* 2004; Tan *et al.,* 2015). En plus d'une élimination chromosomique lors de la mitose, des éliminations ont également été reportées pendant l'interphase, puisque des structures ressemblant à des micronoyaux ont été observées, attachées aux noyaux interphasiques (Gernand *et al.,* 2005, 2006). La majorité des micronoyaux ne comporteront qu'un nombre réduit de chromosomes, bien que de gros micronoyaux aient parfois été observés. Les analyses de l'ultrastructure des micronoyaux ont montré qu'ils étaient entourés d'une double membrane contenant des pores nucléaires, reflétant une structure normale. En revanche, leur chromatine diffère des noyaux normaux de par un nombre réduit de signaux anti-ARN polymérase II, un taux élevé d'hétérochromatine et de l'ADN fragmenté, indiquant un niveau réduit de l'activité transcriptionnelle (Sanei *et al.,* 2011). Les centromères des chromosomes micronucléés sont inactifs rendant impossible leur ségrégation. Par ailleurs, l'élimination des micronoyaux semble résulter de la topologie de leur chromatine distincte qui provoque une fragmentation due à

l'activité de l'endonucléase (Gernand *et al.,* 2005). En ce qui concerne le processus à l'origine de l'élimination sélective de l'un des génomes parentaux, plusieurs hypothèses encore controversées sont présentes dans la littérature. Il a ainsi été proposé que cette élimination serait due à ; un défaut dans la synchronisation de la mitose résultant d'une désynchronisation du cycle cellulaire (Laurie and Bennett, 1989), une désynchronisation de la synthèse des nucléoprotéines (Bennett *et al.,* 1976; Laurie and Bennett, 1989), la formation de fuseaux mitotiques multipolaires, une différence de ratios entre les génomes (Subrahmanyam and Kasha, 1973), une séparation spatiale entre les génomes à l'interphase et/ou à la métaphase (Schwarzacher-Robinson *et al.,* 1987), l'inactivation sélective des centromères de l'un des deux parents (Finch, 1983; Mochida *et al.,* 2004) et une dégradation des chromosomes par une activité nucléase (Davies, 1974). Plus récemment, Sanei et al. (2011) ont fait une découverte majeure *via* l'étude des étapes développementales précoces d'embryons provenant du croisement *H.vulgare* X *H.bulbosum*. Les auteurs ont constaté que le variant centromérique de l'histone H3, CENH3, était impliqué dans l'inactivation des centromères uniparentaux entraînant ainsi l'élimination des chromosomes (Sanei *et al.,* 2011). Conventionnellement, le variant CENH3 remplace l'histone H3 dans les nucléosomes centromériques afin de déterminer la position des centromères jouant ainsi un rôle majeur lors de la ségrégation des chromosomes (Allshire and Karpen, 2008; Britt and Kuppu, 2016; Ravi and Chan, 2010). Dans les hybrides instables, les centromères actifs sont marqués positivement par CENH3, alors que les centromères inactifs des chromosomes de *H.bulbosum* attirent peu ou pas de CENH3 (figure I-20). Les centromères de *H.bulbosum* sont donc inactifs pendant l'anaphase, entraînant ainsi l'élimination des chromosomes et le développement d'embryons haploïdes d'origine *H.vulgare* (Sanei *et al.,* 2011). Le variant CENH3 incorporé aux centromères provenant des cellules spermatiques fournit probablement une fonction résiduelle concernant l'assemblage des kinétochores pour les chromosomes de *H.bulbosum*, mais lorsque sa quantité se retrouve en dessous d'un seuil critique, la ségrégation chromosomique échoue et les chromosomes sont éliminés (Maheshwari *et al.,* 2015; Topp *et al.,* 2009; Watts *et al.,* 2016). Si les protéines CENH3 préexistantes sont partagées équitablement entre les centromères homologues dupliqués et qu'aucune incorporation *de novo* de CENH3 dans les centromères de *H. bulbosum* ne se produit, sa quantité devrait être réduite de moitié environ à chaque division cellulaire (Karimi-Ashtiyani *et al.,* 2015). Chez les hybrides instables, il a été montré que l'inactivation du centromère ne résulte pas d'un défaut de la transcription uniparentale de *CENH3* mais probablement d'un défaut d'incorporation du variant dans les centromères (Sanei *et al.,* 2011). La régulation de l'assemblage et de l'incorporation de CENH3 est assurée par de multiples protéines dont le dysfonctionnement peut produire un centromère

non fonctionnel (Watts *et al.,* 2016). Des protéines végétales impliquées dans l'établissement et le maintien de CENH3 ont été identifiées chez *A.thaliana* incluant Mis12 (Sato *et al.,* 2005), KINETOCHORE NULL2 (KNL2) (Lermontova *et al.,* 2011) et γ-Tubulin Complex Protein 3-Interacting Proteins (GIPs) (Batzenschlager *et al.,* 2015). Etant donné que la synchronisation correcte du dépôt de CENH3 semble être essentielle afin d'assurer une division cellulaire normale, une désynchronisation du cycle cellulaire, par exemple, entre les espèces parentales pourrait compromettre l'incorporation de CENH3 sur les nucléosomes de l'un des parents, bien qu'il soit possible que d'autres facteurs soient responsables de l'échec de l'assemblage (figure I-20) (Ishii *et al.,* 2016). Chez des hybrides interspécifiques autres que l'orge (blé, triticale, seigle, avoine et millet perlé), le processus d'élimination des chromosomes uniparentaux a été attribué à une libération inefficace des chromatides-sœurs, mais le fait que ce processus agisse ou non conjointement avec l'inactivité du centromère reste incertain (Ishii *et al.,* 2010).

I.3.2.4 - Haploïdisation *via* des croisements intraspécifiques : la gynogenèse *in vivo*

Chez le maïs la technologie des HDs repose massivement sur l'utilisation de lignées spécifiques dites « inductrices d'haploïdes », qui lorsqu'elles sont utilisées en parents mâles déclenchent la gynogenèse *in vivo* d'un certain pourcentage de cellules œufs. Ce processus unique existe chez seulement deux espèces ; la pomme de terre (Hermsen and Verdenius, 1973) et le maïs (Geiger and Gordillo, 2009) et présente de nombreux avantages en comparaison aux méthodes *in vitro*. En effet, cette méthode est simple d'utilisation puisque le processus se déroule entièrement *in vivo* et elle est applicable à l'ensemble des lignées femelles, permettant donc de passer outre la limite apportée par certains fonds génétiques récalcitrants à la régénération *in vitro*. Chez le maïs, les croisements intraspécifiques sont privilégiés aux croisements interspécifiques de par l'existence des lignées inductrices d'haploïdes qui possèdent un taux d'induction d'haploïdes entre 5% et 15%, permettant ainsi la mise en place industrielle de la production d'haploïdes et donc de la technologie HD (Chang and Coe, 2009; Geiger and Gordillo, 2009; Liu *et al.,* 2016; Prasanna *et al.,* 2012). La thématique de ce projet de thèse étant centrée sur la gynogenèse *in vivo via* l'utilisation de ces lignées inductrices d'haploïdes, celle-ci sera abordée plus en détails dans la partie I.4, qui donnera un éclairage sur l'origine de ces lignées, leurs utilisations et les connaissances actuelles sur leur mode de fonctionnement.

I.3.3 - Le doublement des stocks chromosomiques des individus haploïdes

Les plantes haploïdes ressortant de l'haploïdisation ne seront pas capables de produire des organes reproducteurs fonctionnels conduisant ainsi à une stérilité (Chase, 1949; Coe, 1959). En effet, celles-ci ne contiendront qu'un nombre réduit de chromosomes, provenant des gamétophytes desquels elles dérivent, qui ne permettra pas le déroulement normal des méioses, de par l'absence de formation des paires de chromosomes homologues et d'une impossibilité d'un appariement entre des chromosomes hétérologues. Cela conduira à un arrêt prématuré de la méiose et donc de la formation des gamètes qui auraient dû en résulter dans une situation chromosomique stable (Mercier *et al.,* 2015). Face à cette stérilité problématique pour l'obtention de grains et donc pour la création de lignées HDs, il est nécessaire, afin de retrouver une fertilité, de restaurer l'état diploïde des lignées cellulaires haploïdes mâles ou femelles (Geiger and Gordillo, 2009). Cette étape, nommée la diploïdisation est le deuxième axe majeur d'un point de vu temporel et économique, après la production d'haploïdes, dans le processus de création des lignées HDs (Melchinger *et al.,* 2016a). Chez le maïs, de faibles proportions de plantules haploïdes vont parvenir à doubler leurs stocks chromosomiques de manière spontanée et ainsi restaurer d'elles mêmes leurs fertilités. En revanche, chez la majorité des lignées utilisées conventionnellement, les taux de doublement chromosomique spontané sont généralement trop faibles, en moyenne inférieurs à 2% (Kleiber *et al.,* 2012), afin de s'intégrer dans les processus de production des lignées HDs (Antoine-Michard and Beckert, 1997). Ainsi, diverses stratégies de doublement du génome de manière artificielle, généralement basées sur l'utilisation d'agents chimiques, ont émergé ces dernières décennies afin de rendre possible la production de lignées HDs à grande échelle (Geiger and Gordillo, 2009; Kleiber *et al.,* 2012; Weber, 2014).

I.3.3.1 - Doublement artificiel des stocks chromosomiques

Le doublement artificiel des stocks chromosomiques est réalisé au cours des divisions cellulaires, généralement à l'aide d'agents chimiques appelés inhibiteurs mitotiques. Ces inhibiteurs interfèrent avant la séparation des chromosomes au cours de la mitose, conduisant ainsi à la formation d'une cellule unique contenant les deux lots de chromosomes. La méthode conventionnellement utilisée dans le cas d'haploïdes générés *in vivo* repose sur le traitement de jeunes plantules ou de grains germés avec de la colchicine, un alcaloïde hydrosoluble (Geiger and Gordillo, 2009; Weber, 2014). En ce qui concerne les processus *in vitro*, le traitement se réalise au moment de la seconde mitose du grain de pollen pour l'androgenèse et des jeunes embryons pour la gynogenèse (Kasha, 2005). En présence de colchicine, la réplication des

chromosomes se produit normalement lors de l'interphase, en revanche au cours de la métaphase, celle-ci va se lier aux tubulines afin d'inhiber la polymérisation des microtubules fusiformes et donc la formation des fuseaux mitotiques (Levan, 1983). Au cours de l'anaphase, les deux chromatides-sœurs dans un chromosome répliqué vont se séparer mais ne parviendront pas à se déplacer vers les pôles opposés de la cellule et resteront donc au centre de celle-ci. Pour finir, en télophase, une membrane nucléaire va se former autour des chromosomes non séparés, conduisant ainsi à l'obtention d'une cellule avec le double du nombre de chromosomes relatif à l'espèce (Molenaar *et al.,* 2018; Ren *et al.,* 2017a; Wan *et al.,* 1989). L'efficacité de cette méthode est mesurée par la proportion de plantes haploïdes générant des grains après doublement, communément appelée le taux de réussite global, qui varie chez le maïs entre 5% et 30% selon le germplasme et les conditions environnementales (Eder and Chalyk, 2002). En revanche, en dépit de son efficacité, l'utilisation de la colchicine présente de nombreux inconvénients en raison de sa forte toxicité pour l'homme et pour l'environnement (Häntzschel and Weber, 2010; Melchinger *et al.,* 2016a). Dans ce contexte, ces dernières années de nombreux travaux de recherche ont été initiés afin de trouver des alternatives. Ainsi, les effets d'autres agents chimiques se sont avérés moins toxiques y compris pour les plantules, favorisant ainsi les taux de survie après repiquage. Par exemple, l'amiprophos-méthyl (APM), l'oryzaline, la pronamide et la trifluraline, qui sont tous des herbicides inhibant la mitose, ont été rapportés. Pour illustrer, chez le maïs, l'utilisation de l'APM combinée à un dosage optimal avec de la pronamide conduit à des taux de doublement similaires à ceux observés avec la colchicine (Melchinger *et al.,* 2016a). De plus, divers gaz, tels que l'azote, l'oxyde nitreux (N_2O) ou le propane, ont également montré des effets sur le doublement des chromosomes (Kato and Geiger, 2002; Molenaar *et al.,* 2018). Bien que les informations sur le mode d'action de ces gaz soient rares, le N_2O inhiberait la polymérisation des microtubules (Kitamura *et al.,* 2009). Son utilisation est actuellement la stratégie dans cette catégorie la plus développée chez le maïs et conduit à l'obtention de bon taux de réussite globale. Par exemple, Kato et Geiger (2002) ont mis au point une procédure efficace de doublement en utilisant un traitement au N_2O au stade six feuilles. De même, plus récemment Molenaar et al. (2018) ont optimisé la méthode et sont parvenus à atteindre des taux de réussite globale entre 6,4% et 33%, similairement à ceux observés avec l'utilisation de la colchicine. L'ensemble de ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives dans l'optimisation du processus de production des lignées HDs, en limitant le recours à des produits hautement toxiques telle que la colchicine encore largement utilisée.

I.3.4.2 - Doublement spontané des stocks chromosomiques

Bien que les ressources génétiques et les méthodes actuelles ne rendent pas encore possible l'utilisation du doublement des stocks chromosomiques spontané à grande échelle (Melchinger *et al.,* 2016a), l'optimisation de ce système pourrait largement contribuer à améliorer l'efficience du processus de production des lignées HDs, en limitant le recours à des agents de doublement artificiels et les coûts de production. Chez le maïs, le processus de doublement spontané du génome a été reporté, que ce soit avec les systèmes de génération *in vitro* ou *in vivo* (Coe, 1959; Ren *et al.,* 2017b; Wu *et al.,* 2017). Le doublement spontané chez le maïs sera associé à une restauration de la fertilité, qui pourra soit être complète, soit spécifique des organes reproducteurs mâles ou femelles. Dans ces derniers cas, le doublement des stocks chromosomiques n'est très certainement que partiel dans certaines cellules somatiques et conduit donc à l'obtention de plantes chimériques (Kasha, 2005). De manière étonnante, le taux de doublement spontané dans les organes reproducteurs femelles est nettement supérieur à celui se produisant dans les organes reproducteurs mâles (Chang and Coe, 2009). Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence que les inflorescences femelles des plantes haploïdes, lorsqu'elles étaient pollinisées avec du pollen provenant de lignées diploïdes, entraînaient dans la majorité des cas la production de grains (Chalyk, 1994; Geiger *et al.,* 2009). En revanche, les résultats obtenus sur les inflorescences mâles sont nettement plus nuancés et difficilement exploitables chez certaines variétés de par des taux de restauration de la fertilité souvent inférieurs à 10% (Chang and Coe, 2009). Ces taux pourront largement varier en fonction des génotypes et des conditions environnementales, entraînant ainsi une grande instabilité de la méthode pour une application systématique (Kleiber *et al.,* 2012; Ma *et al.,* 2018; Wu *et al.,* 2017). Par exemple, Kleiber et al. (2012) ont mis en évidence des différences considérables entre les taux de fertilité mâle des haploïdes provenant de divers germplasmes de maïs, qui vont de 0% à 20% pour des conduites de culture en pleins champs et de 0% à 70% pour des conduites en serre. De même, Wu *et al.,* (2016) ont rapporté des taux de fertilité allant de 9,8% à 89,8% selon les fonds génétiques considérés et Ma *et al.,* (2018) ont observé sur deux fonds génétiques conduits dans deux conditions environnementales différentes des taux variant de 0% à 60%. Les déterminismes génétiques à l'origine de la restauration de la fertilité spontanée restent encore peu caractérisés, bien que des premiers éléments de réponse commencent à émerger. En effet, Ren *et al.,* (2017) ont détecté, par l'étude des biais de ségrégation dans deux populations d'haploïdes, quatre QTLs nommés ; *quantitative haploid mâle fertility 1, 4* (*qhmf1, 4)*, contrôlant la restauration spontanée de la fertilité mâle chez le maïs. Les auteurs ont défini *qhmf4,* présent sur le chromosome n°6,

comme ayant une implication prépondérante, de par la réalisation d'une cartographie fine (Ren *et al.,* 2017b). Selon les auteurs, le gène candidat présent dans l'intervalle génétique *qhmf4* pourrait être *ABSENCE OF FIRST DIVISION 1* (*AFD1*) qui code pour une protéine du complexe cohésine impliqué dans la méiose réductionnelle (Golubovskaya, 2006). En parallèle à ces travaux, Wu *et al.,* (2017) ont défini, par l'étude de plusieurs populations variées, que la restauration de la fertilité mâle était contrôlée par au moins deux gènes, montrant ainsi une action génique additive. Concernant les mécanismes biologiques liés au processus de doublement spontané, peu d'informations sont encore disponibles, bien que plusieurs hypothèses aient été proposées, notamment afin d'expliquer le doublement lors de l'androgenèse *in vitro* (Kasha, 2005). Ainsi, ce processus pourrait être expliqué par une déviation du cycle cellulaire dont pourrait résulter une endoréplication en l'absence de mitose (Shim *et al.,* 2006), une fusion de noyaux de coalescence dans un grand noyau entraînant un mélange des contenus d'ADN (Griggs and Zheng, 2016; Testillano *et al.,* 2004) ou encore une endomitose, c'est-à-dire une mitose en l'absence de fuseaux mitotiques et de rupture de l'enveloppe nucléaire (Weingartner, 2004).

I.4 - La gynogenèse *in vivo* chez le maïs et les lignées inductrices d'haploïdes

I.4.1 - Historique des lignées inductrices d'haploïdes chez le maïs

Les premiers maïs haploïdes ont été identifiés par Stadler et Randolph (1929) (résultats non publiés, cités par Randolph, (1932)) et décrits par Randolph, (1932). Plus tard, Chase, (1949) identifiera des haploïdes générés *in vivo* de manière spontanée dans divers fonds génétiques avec une fréquence d'environ 0,1%. Rapidement, l'auteur verra en ce processus un grand potentiel pour l'amélioration du maïs, posant ainsi les bases d'un procédé qui sera par la suite largement utilisé (Chase, 1949). Cette faible induction spontanée dans les germplasmes de maïs fut confirmée par Lashermes et Beckert (1988), qui reporteront une fréquence moyenne sur 29 lignées différentes de 0,07%, avec une variabilité identifiable selon les fonds génétiques considérés (Lashermes and Beckert, 1988). Dix ans après les travaux de Chase, (1949), Coe, (1959) identifiera la première lignée inductrice d'haploïdes, nommée Stock6, une variété mexicaine tardive qui présente des taux d'induction d'haploïdes entre 1% à 2%, largement supérieurs aux taux d'induction spontanés, rendant ainsi envisageable l'utilisation de ce processus à grande échelle (Coe, 1959). Cette découverte s'inscrit parmi les plus marquantes de l'histoire des HDs chez le maïs, puisque Stock6 servira de base à l'ensemble des travaux de sélection visant à créer des lignées inductrices plus performantes. Ainsi, aujourd'hui toutes les lignées inductrices disponibles dérivent de Stock6 (Chang and Coe, 2009; Hu *et al.,* 2016; Liu *et al.,* 2016). Les travaux de sélection des soixante dernières années ont permis de considérablement augmenter les taux d'induction d'haploïdes qui vont maintenant de 5% à 15% selon les lignées considérées. Il existe actuellement sur le marché de deux types de lignées inductrices d'haploïdes principaux ; adaptées aux climats tempérés et adaptées aux climats tropicaux (Prigge *et al.,* 2011). La lignée PK6 qui sera largement abordée dans ce manuscrit a été sélectionnée en France (Barret *et al.,* 2008). Initialement, la lignée WS14 dérivant de croisements entre les lignées W23ig (possédant la mutation *ig1*) et Stock6 a été développée afin d'améliorer les taux d'induction d'haploïdes (Lashermes and Beckert, 1988). Celle-ci présentait des taux d'induction largement supérieurs à ceux de la lignée Stock6 (3-5%), mais avait l'inconvénient d'être peu productive en pollen et d'avoir une protandrie marquée (maturation des organes reproducteurs mâles avant celle des organes reproducteurs femelles) (Bordes, 2006). Afin de remédier à ce problème, la lignée FIGH1 (France Inducteur Gynogénétique d'Haploïdes 1) présentant de meilleures caractéristiques agronomiques mais des taux d'induction plus faibles

(1%) a été développée à partir du même croisement initial ; W23ig X Stock6 (Bordes *et al.,* 1997). Par la suite, FIHG1 a été croisée avec la lignée non-inductrice MS1334, puis la lignée PK6 a été sélectionnée dans la descendance résultante. Celle-ci présente des taux d'induction d'haploïdes variant approximativement entre 5% et 7% (Barret *et al.,* 2008).

I.4.2 - Identification des individus haploïdes suite à l'utilisation des lignées inductrices

L'un des points-clés dans l'efficience de la production d'HDs réside dans la faculté à identifier et sélectionner les individus haploïdes. Les plantes haploïdes présentent des spécificités morphologiques très marquées par rapport aux plantes diploïdes, incluant des retards de croissance, une faible vigueur, des organes de petite taille en partie dû à une réduction des volumes cellulaires et généralement une stérilité avec la production d'organes floraux rudimentaires non fonctionnels (Chang and Coe, 2009; Coe, 1959). Bien que des signes morphologiques soient identifiables dès les premiers stades de développements des plantules, comme la taille du coléoptile et des racines, la longueur des premières feuilles ou encore la dimension des cellules de gardes, il s'avère compliqué d'utiliser une stratégie uniquement basée sur ces critères afin d'identifier les individus haploïdes, entre autres, de par de grandes variabilités environnementale et génétique. Afin de remédier à cette limite et d'identifier efficassement les individus haploïdes, des stratégies basées sur l'utilisation de marqueurs génétiques ont été mises en place. Les marqueurs génétiques utilisables sont de deux types ; dominants lorsqu'ils sont introgressés dans des fonds génétiques inducteurs et récessifs lorsqu'ils sont introgressés dans des lignées femelles dites « testeurs » qui seront utilisées dans des croisements de contrôle afin d'évaluer les taux d'induction d'haploïdes de lignées mâles d'intérêt (Weber, 2014).

I.4.2.1 - Utilisation de marqueurs génétiques dominants

Les marqueurs génétiques dominants consistent en l'exploitation de caractères, entraînant des phénotypes facilement identifiables, qui sont sous contrôle d'un allèle dominant. Ainsi, après un croisement entre une lignée femelle et une lignée inductrice mâle contenant l'allèle dominant, dans la descendance, les individus diploïdes, présenteront le caractère puisqu'ils seront hétérozygotes, contrairement aux individus haploïdes qui ne contiendront pas les informations génétiques paternelles (Vanous *et al.,* 2017). Ces marqueurs sont utilisés de manière privilégiée dans la filière HD puisqu'ils peuvent être introduits dans les lignées inductrices mâles, ne

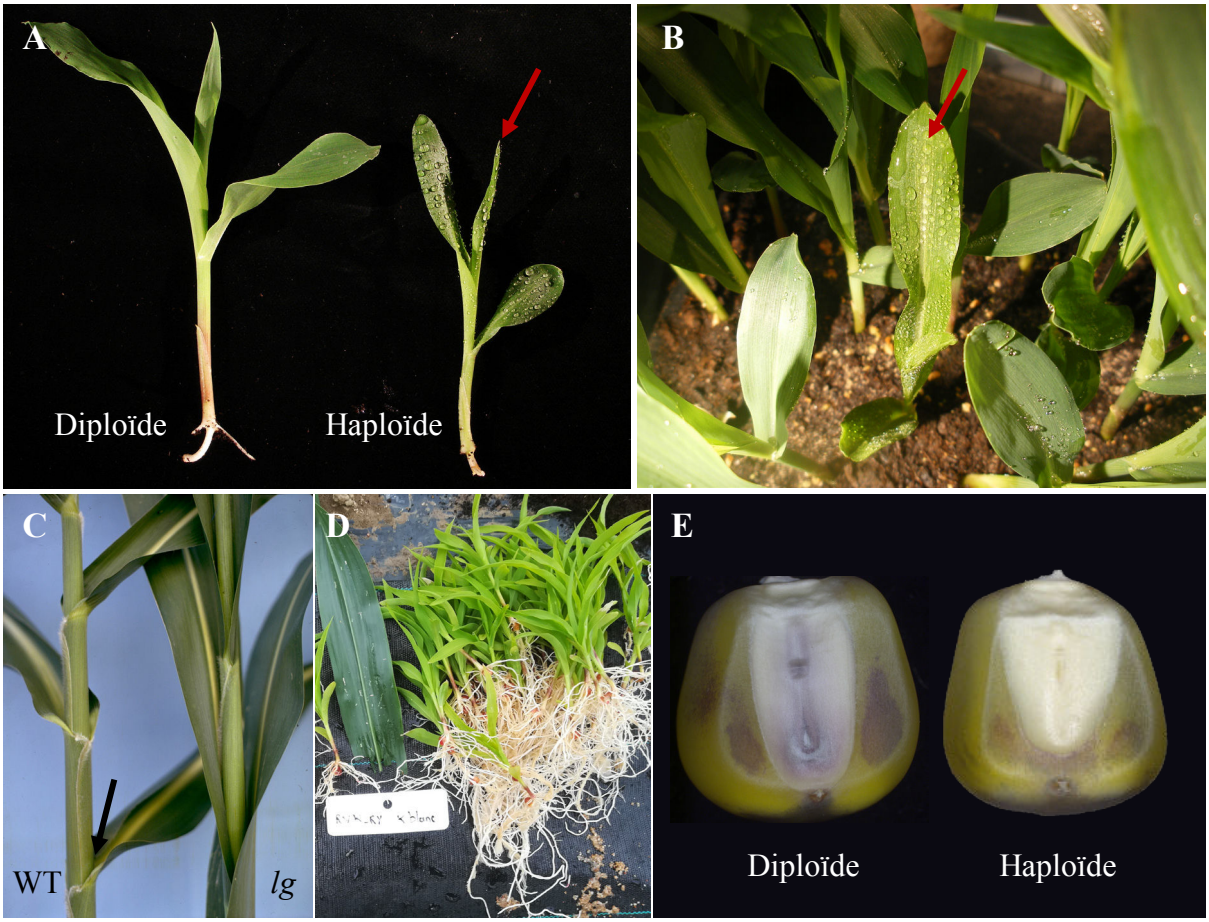


Figure I-21 : **Identification des individus haploïdes par l'utilisation de marqueurs génétiques.**
A-C : Exemples de marqueurs génétiques récessifs utilisables pour évaluer les capacités d'induction d'haploïdes des lignées inductrices ; **A, B** : Plantules résultant du croisement entre une lignée testeur femelle (HD7 X F564), contenant la mutation récessive *glossy* (altération des cires épicuticulaires) et la lignée inductrice d'haploïdes PK6. Les plantules haploïdes (flèches rouges) présentent un phénotype *glossy* ; après pulvérisation avec de l'eau, les gouttelettes sont retenues par les feuilles. **C** : Comparaison d'une plante sauvage (à gauche) avec une plante contenant la mutation *liguleless* (à droite). La mutation *ligueless* entraîne la mise en place d'un port érigé des feuilles, en raison de l'absence de ligule, normalement présente au niveau de l'insertion des limbes (flèche noire). Photo provenant de la photothèque de MaizeGDB (https://www.maizegdb.org/).
D, E : Exemples de marqueurs génétiques dominants introduits dans les lignées inductrices d'haploïdes afin d'identifier les individus haploïdes chez les plantes femelles d'intérêt ; **D** : Plantules haploïdes provenant d'un croisement avec une lignée inductrice contenant la mutation dominante *yellow green* (à droite). La feuille mature (à gauche) provient d'une plante ne contenant pas la mutation et est montrée à titre comparatif. Photo prise par Guénaël Robic, Limagrain Europe, **E** : Grains provenant d'un croisement avec la lignée inductrice d'haploïdes RWS, contenant le gène dominant de coloration *R1-Navajo* ; à gauche un grain diploïde avec une coloration violette de l'albumen et de l'embryon et à droite un grain haploïde, avec une absence de coloration dans l'embryon en raison de l'absence du gène de coloration paternel.

nécessitant donc pas d'adaptation des fonds génétiques femelles d'intérêt (Liu *et al.,* 2016). Actuellement, le marqueur de coloration *R1-nj* (*RED COLOR1-navajo*), lié à la biosynthèse des anthocyanes, est largement utilisé dans la filière HD puisque la majorité des inducteurs modernes possèdent la constitution génétique nécessaire à son expression (Chaikam *et al.,* 2016). Chez le maïs, au moins 14 gènes distincts affectent la biosynthèse et la distribution des anthocyanes, dont des gènes de structure : *C2, A1, A2, Bz1* et *Bz2*, codant pour des enzymes spécifiques impliquées dans la pigmentation. Si un ou plusieurs des trois premiers gènes sont altérés, les pigments ne seront pas normalement produits (Holton and Cornish, 1995). Ces gènes sont eux-mêmes régulés par d'autres gènes, incluant *C1* et *R1* qui agissent conjointement. Lorsque *R1-nj* est présent avec les gènes *C2, A1, A2* et *C1* dans un fonds génétique cela conduit à une pigmentation pourpre/violette de la partie supérieure de l'albumen et du scutellum de l'embryon. Dans le cas d'un croisement avec une lignée inductrice contenant ce marqueur, les embryons haploïdes ne présenteront pas de pigmentation de par l'absence des informations génétiques paternelles (figure I-21E) (Nanda and Chase, 1966). Bien que le marqueur de coloration *R1-nj* soit largement utilisé, il présente tout de même des limites non négligeables, notamment en ce qui concerne les variétés fortement anthocyanées, possédant donc déjà une coloration. De plus, il est fréquent d'observer lors de certains croisements une inhibition de la coloration dans les grains, probablement en raison de la présence de gènes d'inhibition de la voie de biosynthèse des anthocyanes, rendant donc difficile l'identification des haploïdes (Chaikam *et al.,* 2015; Rotarenco *et al.,* 2010). Afin de remédier à cette limite, il est envisageable de combiner le marqueur *R1-nj* avec d'autres gènes dominants impliqués dans la voie de biosynthèse des anthocyanes. Par exemple, l'utilisation d'inducteurs contenant les gènes *B1* (*BOOSTER1*) et *Pl1* (*PURPLE1*), entraînant une pigmentation indépendante du rayonnement solaire dans les tissus végétatifs (coléoptiles et/ou racines), s'est avérée être un outil intéressant. Dans ce cas, la pigmentation des tissus aux stades de développement précoces indique un état diploïde, tandis que les plantules haploïdes ne seront pas pigmentées (Chaikam *et al.,* 2016). De même, afin de passer outre les limites des marqueurs liés aux anthocyanes, d'autres catégories de marqueurs ont été développés. Par exemple, la mutation dominante *yellow-green* qui conduit à des phénotypes de feuilles plus jaunes en regard des feuilles sauvages (figure I-21D), probablement en raison d'un défaut dans la synthèse de la chlorophylle (Weber, 2014). De même, il est possible d'avoir recours à des inducteurs qui contiennent une forte teneur en huile dans les grains et dont la descendance pourra être criblée de manière industrielle par spectrométrie à résonance magnétique (Melchinger *et al.,* 2013, 2015). Récemment un système basé sur l'utilisation de deux protéines fluorescentes différentes, l'une spécifique de l'albumen et l'autre de l'embryon

permet également de trier facilement les grains possédant un embryon haploïde de ceux contenant un embryon diploïde (Dong *et al.,* 2018). Néanmoins, cette stratégie entraîne la fabrication d'un inducteur transgénique.

I.4.2.2 - Utilisation de marqueurs génétiques récessifs et lignées « testeurs »

Le recours aux marqueurs récessifs s'applique généralement dans les situations où la lignée inductrice utilisée ne possède pas de marqueur génétique dominant (Prigge *et al.,* 2011). Ces marqueurs consistent en l'exploitation des mutations récessives de certains gènes qui conduisent à des traits phénotypiques facilement identifiables (Lashermes and Beckert, 1988). Les lignées « testeurs » utilisées en parent femelle qui possèderont les allèles mutants pour ces gènes à l'état homozygote seront croisées avec les lignées inductrices mâles d'intérêt afin d'évaluer leur taux d'induction d'haploïdes. Ainsi, puisque la mutation est récessive, dans la descendance, seuls les individus haploïdes présenteront un phénotype mutant. Parmi ces marqueurs, les plus utilisés sont les phénotypes « *liguleless* » et « *glossy* » (Melchinger *et al.,* 2016b). La mutation *liguleless* (*lg*) est corrélée avec une absence de ligule au niveau de l'insertion des limbes, conduisant à un port érigé des feuilles (figure I-21C) (Becraft *et al.,* 1990; Sylvester *et al.,* 1990). La mutation *glossy (gl*), quant à elle, entraîne une altération au niveau de la cuticule des feuilles, due à une modification des cires épicuticulaires (Sturaro *et al.,* 2005). Lorsqu'un ou plusieurs gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des cires foliaires sont altérés, les plantes concernées exprimeront le caractère *glossy*. Chez le maïs, au moins vingt locus pouvant affecter la quantité et la qualité des cires épicuticulaires des feuilles ont été identifiés (Sturaro *et al.,* 2005). Ainsi, les feuilles des plantes contenant la mutation *glossy* homozygote présenteront un phénotype particulier avec un aspect brillant et de couleur plus foncée que des feuilles sauvages, d'où le terme « glossy ». De plus, lorsqu'une pulvérisation d'eau est réalisée sur ces plantes, les feuilles vont retenir les gouttelettes de manière très caractéristique permettant ainsi de cribler facilement les plantules haploïdes, qui puisqu'elles n'ont pas l'information génétique mâle, expriment la mutation récessive (figure I-21A, B) (Bordes *et al.,* 1997).

I.4.5 - Déterminismes génétiques de la gynogenèse *in vivo*

Depuis la découverte de la première lignée inductrice, Stock6, dans les années soixante, de nombreuses avancées ont été réalisées concernant la caractérisation du déterminisme génétique à l'origine de l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Les premières données

concernant le contrôle génétique de ce processus remontent aux travaux de Lashermes et Beckert (1988), qui par l'étude de la descendance du croisement W23ig X Stock6 ont mis en évidence que l'induction d'haploïdes maternels était un trait fortement héréditaire (Lashermes and Beckert, 1988). Plus tard, à partir d'une population en ségrégation provenant de ce même croisement, Deimling *et al.,* (1997) identifieront deux QTLs, sur les chromosomes n°1 et n°2, qui expliqueront de manière cumulée 17,9% de la variance phénotypique dans les fonds génétiques considérés. Barret *et al.,* (2008) ont par la suite, mis en évidence, par l'étude d'une population en ségrégation provenant du croisement entre la lignée non-inductrice HD99 et la lignée inductrice PK6, un QTL majeur positionné sur le chromosome n°1 ; *gynogenesis inducer1* (*ggi1*). Ce QTL fut confirmé par Prigge *et al.,* (2012) par l'étude de quatre populations en ségrégation impliquant trois lignées non-inductrices (une tempérée et deux tropicales) et deux lignées inductrices tempérées, UH400 et CAUHOI, induisant respectivement beaucoup (8%) et peu (2%) d'haploïdes. Ce QTL, renommé *quantitative haploid induction rate 1* (*qhir1*), explique 66% de la variance phénotypique de l'induction d'haploïdes (Prigge *et al.,* 2012). Par cette approche et dans ces fonds génétiques, Prigge *et al.,* (2012) ont également identifié sept autres QTLs (*qhir2-8*) impliqués dans le déterminisme génétique de la gynogenèse *in vivo*, dont *qhir8*, positionné sur le chromosome n°9 et qui explique 20% de la variance phénotypique. Par la suite, les cartographies fines des deux QTLs majeurs *ggi1/qhir1* et *qhir8* ont respectivement été réalisées par Dong *et al.,* (2013) et Liu *et al.,* (2015). Ainsi, Dong *et al.,* (2013) par l'étude d'une population en ségrégation provenant du croisement avec une lignée non-inductrice et la lignée inductrice UH400 ont restreint l'intervalle génétique de *ggi1/qhir1* impliqué dans l'induction d'haploïdes à 243-Kpb. En parallèle, Liu *et al.,* (2017) par l'étude d'une population de cartographie provenant du croisement entre les deux lignées inductrices UH400 et CAUHOI, donc identiques pour le QTL majeur *ggi1/qhir1,* ont restreint l'intervalle génétique de *qhir8* à 789-Kbp (contenant 35 gènes d'après la séquence du génome de référence B73).

De manière complémentaire, il s'est avéré que les fonds génétiques utilisés en tant que femelles lors des croisements avec des lignées inductrices avaient également une influence sur l'induction d'haploïdes (Chase, 1969; Coe, 1959; De La Fuente *et al.,* 2018; Liu and Song, 2000; Prigge *et al.,* 2011, 2012). Wu *et al.,* (2014) ont étudié ce caractère par la réalisation d'une recherche de QTLs *via* l'analyse de populations de cartographie résultant des croisements entre deux lignées non-inductrices et la lignée inductrice CAU5. Les auteurs ont ainsi pu identifier deux QTLs, nommés *qtl maternal haploid induction rate 1, 2* (*qmhir1, 2*), positionnés sur les chromosomes n°1 et n°3 et expliquant respectivement 14,70% et 8,42% de la variance phénotypique (Wu *et al.,* 2014).

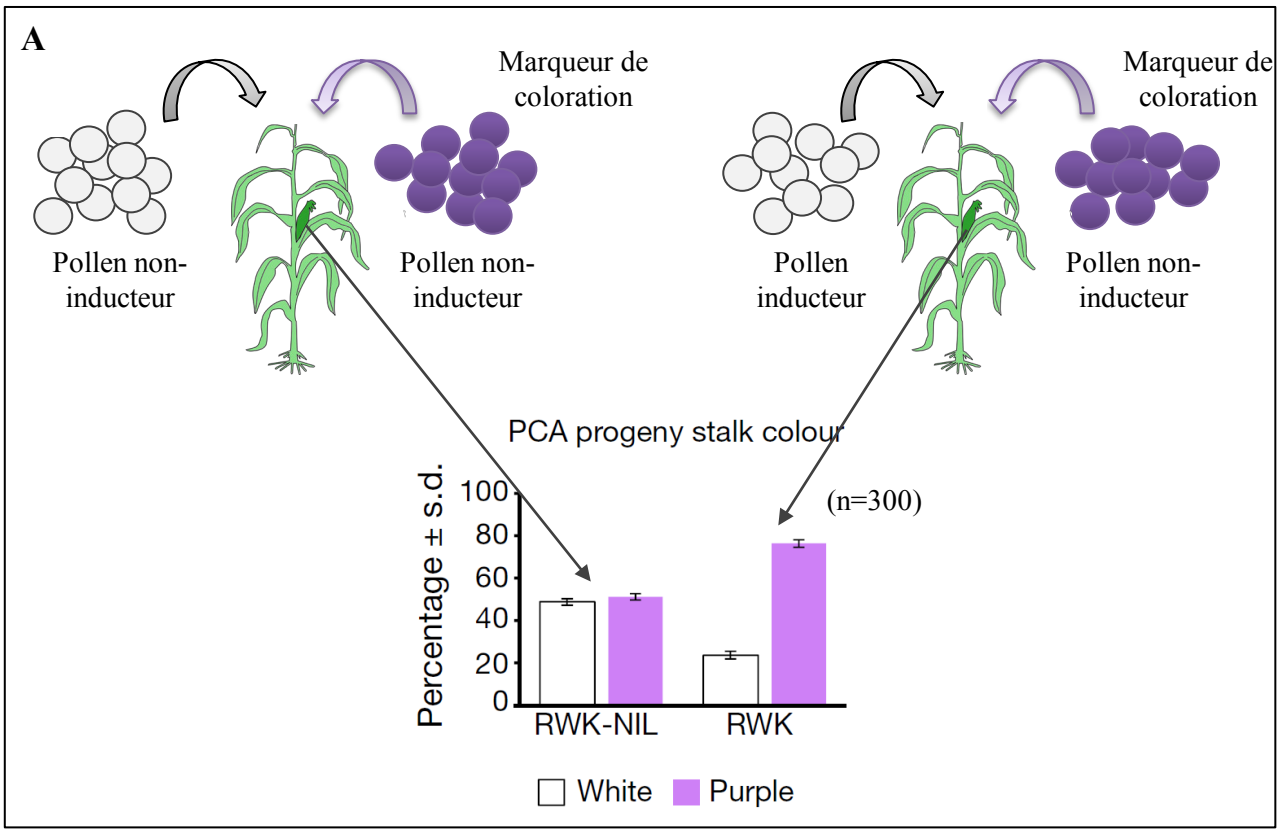




Figure I-22 : **Le pollen inducteur est moins compétitif que le pollen non-inducteur.**
A : PCA (Pollen Competition Assay) entre du pollen inducteur et du pollen non-inducteur. Un mélange de pollens provenant de deux plantes différentes a été utilisé sur des soies femelles et les épis en ressortant ont été analysés. A gauche, deux lignées non-inductrices sont utilisées pour le test ; une lignée contenant un gène marqueur dominant qui conduit à une coloration des tiges (*ZAN21PR*) et la lignée isogénique RWL-NIL ne contenant pas ce gène de coloration. Il y a dans la descendance autant de plantules avec une coloration et une absence de coloration des tiges, témoignant que le pollen provenant des deux lignées utilisées en parents mâles ont la même compétitivité. A droite, une lignée non-inductrice contenant le gène *ZAN21PR* et une lignée inductrice (RWK) ne le contenant pas sont utilisées pour le test. Il y a plus de plantules avec des tiges colorées que des plantules avec des tiges non colorées dans la descendance, indiquant que le pollen inducteur est moins compétitif. Kelliher *et al.,* (2017).
B : PCA sur du matériel biologique différent. Mise en compétition du pollen provenant de la lignée inductrice UH400 contenant le marqueur de coloration *R1-nj* conduisant à la coloration des grains d'une lignée non-inductrice. Pollinisation des soies femelles (1) avec le pollen de la lignée non-inductrice et une heure après avec du pollen de la lignée UH400, (2) avec un mélange des pollens inducteurs et non-inducteurs, (3) (4) avec du pollen de UH400 et (3) une heure et (4) après avec du pollen de la lignée non-inductrice. Xu *et al.,* (2013).

I.4.3 - Phénotypes associés aux lignées inductrices d'haploïdes

L'ensemble des études s'intéressant à la gynogenèse *in vivo* s'accordent sur le fait que l'utilisation des lignées inductrices entraîne dans la descendance, en plus de l'obtention d'embryons haploïdes, d'autres phénotypes spécifiques, incluant des grains anormaux et une hétérofécondation. De plus, le pollen des lignées inductrices présente une faible compétitivité à la fécondation en comparaison au pollen des lignées non-inductrices, bien que celui-ci ne semble pas présenter de défauts majeurs concernant le nombre de noyaux et la capacité de germination.

I.4.3.1 - Le pollen inducteur est moins compétitif que le pollen non-inducteur

Lors des différentes études visant à identifier les composantes génétiques liées à l'induction de la gynogenèse *in vivo*, il a été mis en avant que le locus *ggi1/qhir1* était sujet à un fort biais de ségrégation des allèles paternels dans la descendance, c'est-à-dire à une distribution des allèles s'écartant des lois de Mendel. Ainsi, Barret *et al.,* (2008), par la réalisation de croisements réciproques entre HD99 et PK6, associés aux suivis de deux marqueurs moléculaires positionnés sur *ggi1/qhir1*, ont montré que l'allèle de l'inducteur était moins transmis à la descendance en regard des ségrégations attendues, lorsque la lignée PK6 était utilisée en parent mâle (les deux marqueurs caractérisant l'allèle provenant de PK6 étaient présents à 30% dans la descendance). En revanche, lorsque la lignée PK6 est utilisée en parent femelle ce biais n'est plus observable, indiquant donc que cette déficience est d'origine paternelle. Les auteurs ont également mis en avant, par la réalisation de croisements avec différentes lignées femelles, que ce biais de ségrégation était plus ou moins marqué selon le fonds génétique considéré, indiquant ainsi une influence maternelle. De manière similaire, Prigge *et al.,* (2012) ont également reporté une plus faible transmission, dans la descendance de trois populations analysées, de l'allèle au locus *ggi1/qhir1* provenant de l'inducteur UH400. Les auteurs ont suggéré que les défauts de transmission des gamètes inducteurs étaient corrélés avec la capacité d'induction d'haploïdes. Plus tard, Xu *et al.,* (2013) se sont intéressés plus spécifiquement à ces défauts de transmission à la descendance par la réalisation d'une cartographie fine de *ggi1/qhir1*, *via* l'évaluation des biais de ségrégation dans des populations en ségrégation provenant de différents croisements avec des lignées inductrices (quatre) et non-inductrices (sept) en prenant également en compte les autofécondations. La sous-région de *ggi1/qhir1* impliquée dans ce biais de ségrégation a ainsi pu être restreinte à 450-Kpb et nommée *segregation distortion 1* (*sed1*). Les auteurs ont également réalisé un test de compétition entre du pollen inducteur et du pollen sauvage, *via* des pollinisations différées et le suivi des tubes polliniques dans les soies femelles. Ils ont ainsi pu

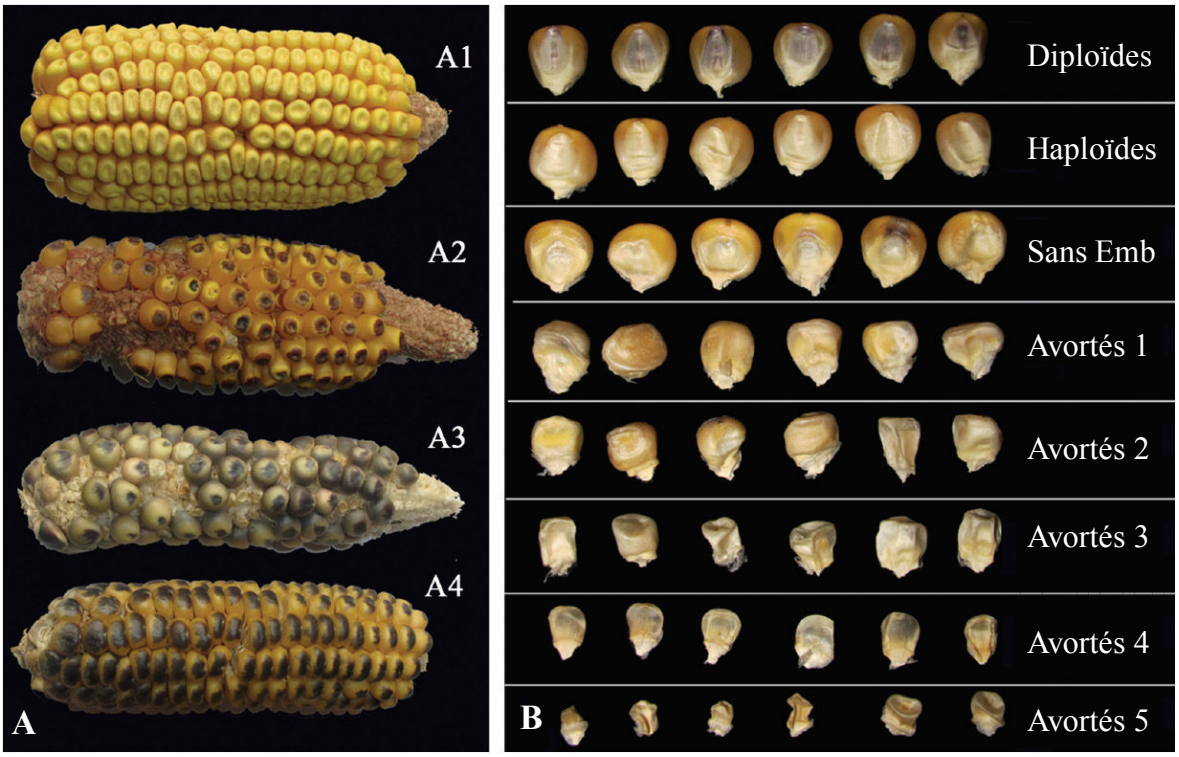


Figure I-23 : **L'utilisation du pollen des lignées inductrices entraîne dans la descendance des phénotypes de grains anormaux.**
A : Phénotypes des épis provenant de différents croisements ; A1 : B73 (non-inducteur) autofécondé, A2 : UH400 (inducteur avec le marqueur de coloration *R1-nj*) autofécondé, A3 : B73 utilisé en femelle et UH400 en mâle, A4 : UH400 utilisé en femelle et B73 en mâle. Les épis provenant des croisements avec la lignée UH400 utilisée en parent mâle présentent plus de grains anormaux, dont des grains avortés, que les épis provenant des croisements avec B73 en parent mâle.
B : Différents phénotypes de grains anormaux résultent de l'utilisation d'une lignée inductrice en parent mâle, incluant des grains haploïdes (absence de coloration dans l'embryon témoignant d'une absence du gène marqueur de coloration paternel), des grains où l'embryon ne s'est pas développé (Sans Emb) et des grains avortés de différentes catégories avec des phénotypes plus ou moins accentués (Avortés 1 à 5). Xu *et al.,* (2013).

mettre en évidence que les tubes polliniques inducteurs mettaient plus de temps à atteindre les sacs embryonnaires que les tubes polliniques non-inducteurs et que le pollen inducteur avait des taux de fécondation moins importants que le pollen sauvage (Xu *et al.,* 2013). Plus récemment, Kelliher *et al.,* (2017) ont confirmé la faible compétitivité pour la fécondation du pollen inducteur par un autre test de compétition ; *via* l'étude d'un marqueur de coloration dans la descendance. L'ensemble de ces travaux révèle la faible compétitivité pour la fécondation du pollen inducteur en regard du pollen non-inducteur et donc d'un biais de ségrégation lorsque le pollen inducteur se retrouve en compétition avec du pollen sauvage (figure I-22).

I.4.3.2 - Les grains de pollen des lignées inductrices ne présentent pas de défauts phénotypiques majeurs

Bien que Xu *et al.,* (2013) aient mis en avant un retard dans la croissance des tubes polliniques de la lignée inductrice UH400 par rapport à une lignée non-inductrice, plusieurs autres études s'accordent sur le fait que le pollen inducteur ne présente pas d'anomalie phénotypique particulière. Ainsi, les grains de pollen inducteurs, bien qu'une certaine variabilité soit observable selon les lignées, ne semblent pas être amoindris dans leur viabilité en regard des grains de pollen des lignées non-inductrices (Li *et al.,* 2017; Tian *et al.,* 2018), ne présentent pas de défaut de germination et de développement du tube pollinique (Kelliher *et al.,* 2017; Tian *et al.,* 2018) et leur morphologie globale est normale ; grains tricellulaires avec une unique aperture (Mahendru and Sarkar, 2000).

I.4.3.3 - L'induction d'haploïdes est corrélée avec l'hétérofécondation

Trois études majeures ont mis en évidence que le processus d'hétérofécondation était beaucoup plus marqué chez les lignées inductrices que chez les lignées non-inductrices d'haploïdes (Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Tian *et al.,* 2018). Kraptchev *et al.,* (2003) et Liu *et al.,* (2017) ont observé par l'étude de lignées inductrices et de lignées non-inductrices, que les taux d'hétérofécondation étaient proportionnels avec l'induction d'haploïdes, c'est-à-dire plus importants chez les lignées avec des taux d'induction d'haploïdes élevés et inversement. Ces résultats ont pu être confirmés par Tian *et al.,* (2018) *via* des expérimentations de compétition de pollen. Les auteurs ont pu observer que lorsqu'une femelle était d'abord pollinisée par une lignée inductrice, puis quatre heures après par une lignée non-inductrice, les taux d'hétérofécondation étaient plus élevés que dans le cas de deux pollinisations avec des lignées non-inductrices, supportant ainsi l'hypothèse d'une simple fécondation.

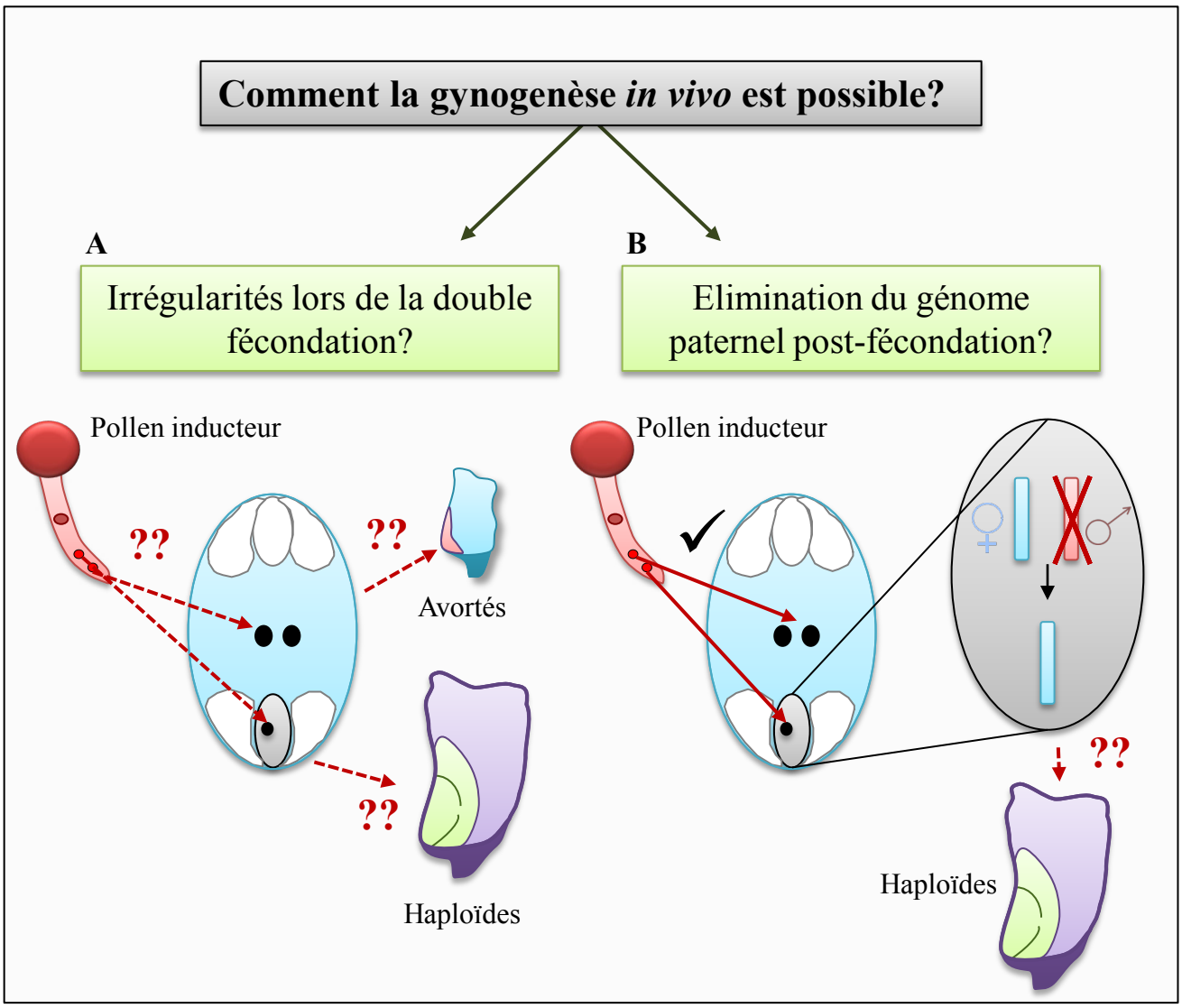


Figure I-24 : **Deux hypothèses majeures peuvent expliquer l'origine de la gynogenèse *in vivo*.**
Deux grandes hypothèses sont présentes dans la bibliographie afin d'expliquer la gynogenèse *in vivo* chez le maïs ; **A** : une irrégularité durant la formation des cellules spermatiques et/ou lors de la double fécondation, avec par exemple une fécondation unique de la cellule œuf ou/et de la cellule centrale, conduisant respectivement à la formation de grains haploïdes ou de grains avortés et **B** : une élimination du génome paternel après une fusion normale des deux cellules spermatiques avec les gamètes femelles.

I.4.3.4 - Les lignées inductrices d'haploïdes induisent des grains anormaux

Plusieurs études s'intéressant à l'induction de la gynogenèse *in vivo via* l'utilisation d'une lignée inductrice ont conduit à l'identification de phénotypes de grains anormaux, autres que des grains avec un embryon haploïde et notamment des grains avortés. De manière intéressante, il a été observé à plusieurs reprises que les taux de grains avortés étaient proportionnels avec les taux d'induction d'haploïdes, laissant entrevoir une corrélation entre ces deux phénotypes (Liu *et al.,* 2017b; Tian *et al.,* 2018; Xu *et al.,* 2013). Xu *et al.,* (2013) ont proposé une classification afin de mieux caractériser les différents types de grains anormaux résultant du croisement avec les lignées inductrices, incluant divers types de grains avortés présentant des défauts phénotypiques plus ou moins accentués, ainsi que des grains contenant un albumen normalement développé mais pas d'embryon (figure I-23). Bien que le mécanisme à l'origine des grains avortés n'ait pas encore été élucidé, trois hypothèses peuvent être émises afin de l'expliquer. Ainsi, ces grains peuvent résulter d'une absence ou d'un défaut de fécondation au niveau de l'albumen, conduisant à un avortement de l'albumen diploïde (Tian *et al.,* 2018; Xu *et al.,* 2013), un avortement de grains haploïdes dont la reprogrammation aurait échoué (Tian *et al.,* 2018), une aneuploïdie et/ou des défauts chromosomiques (Li *et al.,* 2017; Qiu *et al.,* 2014; Zhao *et al.,* 2013).

I.4.4 - Mécanismes sous-jacents à l'induction d'haploïdes *in vivo* chez le maïs

Actuellement deux grandes hypothèses encore très controversées sont présentes dans la bibliographie afin d'expliquer le processus de gynogenèse *in vivo* chez le maïs. La première hypothèse soutient que celui-ci pourrait être dû à une irrégularité lors de la formation des cellules spermatiques et/ou lors de la double fécondation. Par exemple, il est envisageable qu'un certain pourcentage de grains de pollen présente des altérations au niveau de l'une des cellules spermatiques la rendant inapte à la fécondation et entraînant donc le développement de la cellule œuf sans fusion des gamètes (Bylich and Chalyk, 1996; Chalyk *et al.,* 2003; Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Swapna and Sarkar, 2012; Tian *et al.,* 2018). En revanche, la seconde hypothèse supporte une fusion normale des gamètes mâle et femelle qui sera suivie d'une élimination sélective du génome paternel (Li *et al.,* 2009; Zhang *et al.,* 2008; Zhao *et al.,* 2013) (figure I-24).

Concernant la première hypothèse, plusieurs études ont identifié des irrégularités lors de la double fécondation. Ainsi, Bylich et Chalyk (1996) ont remarqué qu'environ 6,3% des grains de pollen de la lignée inductrice ZMS, contenaient des noyaux spermatiques de morphologie différente. Les auteurs ont proposé que ce dimorphisme puisse résulter d'une vitesse de

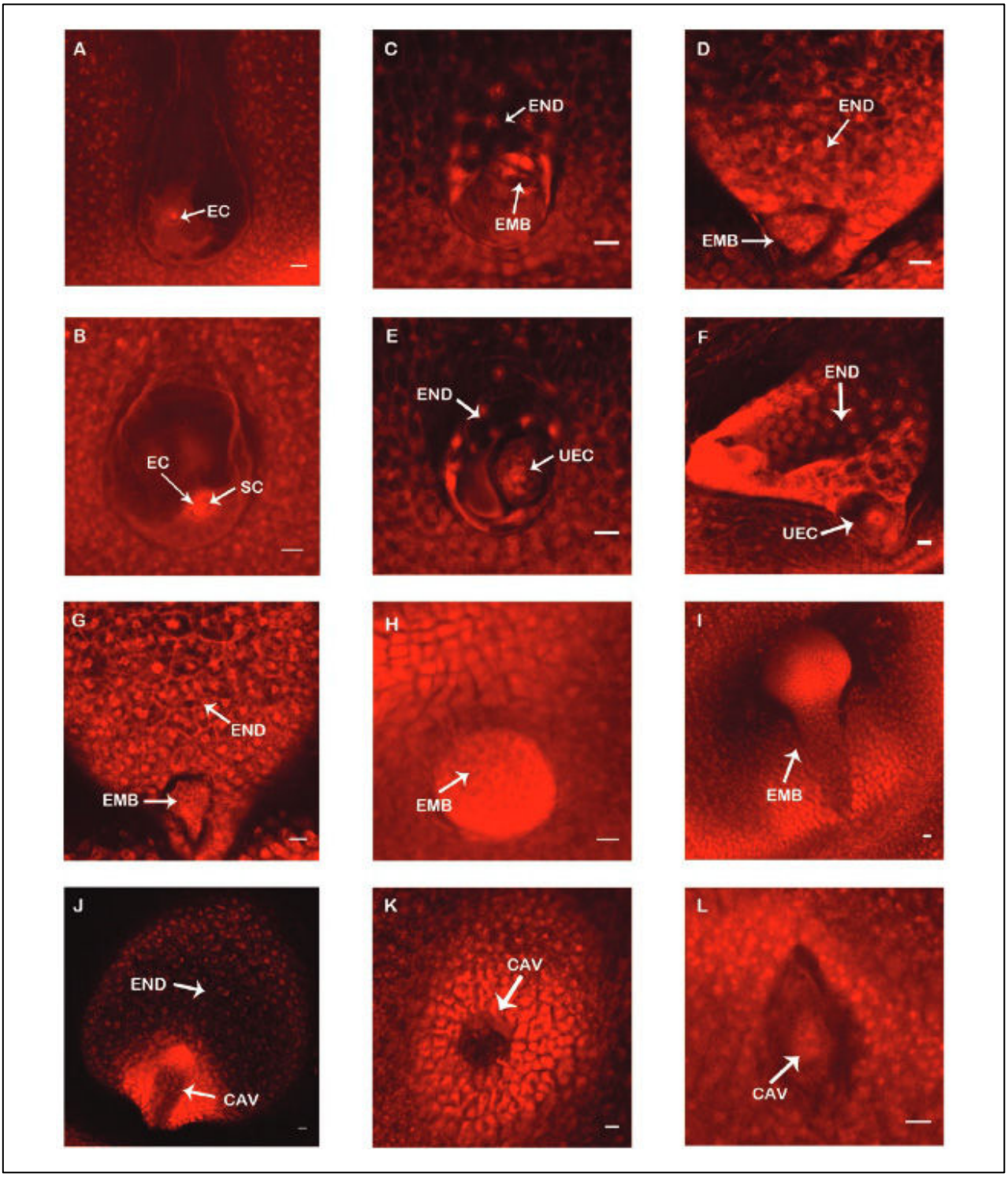


Figure I-25 : **Des simples fécondations se produisent lors des croisements avec les lignées mâles inductrices.**
A-L : Comparaison du processus d'embryogenèse durant les six premiers jours après la pollinisation (DAP, Day After Pollinisation) avec une lignée inductrice, entre un ovule avec une fécondation unique de la cellule centrale et un ovule normalement fécondé (double fécondation). **A** : Ovule avant la fécondation. **B, C, D, G, H, I** : Ovule doublement fécondé (situation normale) ; **B** : à 1 DAP, la fusion normale des gamètes commence, **C** : à 2 DAP, les premières divisions cellulaires commencent, **D** : à 3 DAP, le jeune embryon s'est formé, **G-I** : les processus développementaux normaux de l'embryon et de l'albumen se poursuivent entre 4 et 6 DAP. **E, F, J, K, L** : Ovule simplement fécondé, **E** : à 2 DAP, certains ovules contiennent une cellule œuf non fécondée (UEC) et une cellule centrale fécondée, **F** : à 3 DAP, la cellule œuf n'a pas fusionné avec la cellule spermatique, **J-L** : l'ovule se développe anormalement entre 4 et 6 DAP. SC : sperm cell, EC : egg cell, END: endosperm, EMB : embryo, UEC : unfertilized egg cell, CAV : cavity. Barres d'échelles = 20 µm. Tian *et al.,* (2018).

développement différente des deux cellules spermatiques, conduisant putativement à l'obtention d'une cellule spermatique mature pour la fécondation avant l'autre. Une autre anomalie des lignées inductrices a été décrite par Chalyk et al. (2003) qui ont constaté que la fréquence des microsporocytes aneuploïdes, c'est-à-dire avec un nombre anormal de chromosomes/fragments chromosomiques, était beaucoup plus élevée chez la lignée inductrice MHI (15%) que chez deux lignées non-inductrices (1%). Les auteurs ont ainsi conclu que ces anomalies dans la microsporogenèse pouvaient être l'une des raisons de l'induction d'haploïdes. Swapna et Sarkar (2012) ont quant à eux remarqué des défauts durant la double fécondation *via* une analyse cytologique de coupes de sacs embryonnaires fécondés, isolés après croisement avec trois lignées inductrices. Les auteurs ont proposé que les embryons haploïdes résulteraient d'une défaillance de la fusion des noyaux, après une libération normale des noyaux spermatiques dans la synergide, induisant ainsi un processus de parthénogenèse (Swapna and Sarkar, 2012). Plus tard, des études ont mis en évidence des processus d'hétérofécondation (fécondation des cellules œuf et centrale avec des cellules spermatiques provenant de grains de pollen différents (Gao *et al.,* 2011)), se produisaient de manière prépondérante lors des croisements avec des lignées inductrices, pouvant ainsi témoigner d'anomalies de fusions des gamètes lors de la double fécondation (Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Tian *et al.,* 2018). Tian *et al.,* (2018), en plus d'étudier l'hétérofécondation, ont examiné l'embryogenèse résultant des croisements de B73 avec l'inducteur CAU5, par l'observation en microscopie confocale de sacs embryonnaires entre un et six jours après pollinisation (figure I-25). Les auteurs ont ainsi pu mettre en avant la présence d'une minorité d'ovules non fécondés pouvant putativement expliquer une unique fécondation à l'origine de la parthénogenèse et de l'augmentation de l'hétérofécondation.

Les études soutenant la deuxième hypothèse, prônant une fusion des gamètes normale suivie d'une élimination du génome de l'inducteur, se basent sur l'observation d'aneuploïdes, de micronoyaux et l'identification de fragments chromosomiques paternels chez les individus classés comme haploïdes, résultant d'un croisement avec une lignée inductrice (figure I-26). Les premiers résultats supportant une élimination du génome paternel comme origine de la gynogenèse *in vivo* remontent aux travaux de Zhang *et al.,* (2008), bien que Wedzony *et al.,* (2002) aient déjà évoqué cette hypothèse lors d'un congrès international. Zhang *et al.,* (2008) ont étudié la descendance provenant des croisements de quatre lignées non-inductrices avec la lignée inductrice HZI1 contenant le marqueur de coloration *R1-nj*. Par la réalisation de caryotypes sur des radicelles provenant de grains germés, les auteurs ont pu mettre en évidence la présence de nombreux individus aneuploïdes (2n = 9-21) à la fois parmi les grains avec des embryons colorés (putatifs diploïdes) avec un taux de 62,5% et parmi les grains non colorés

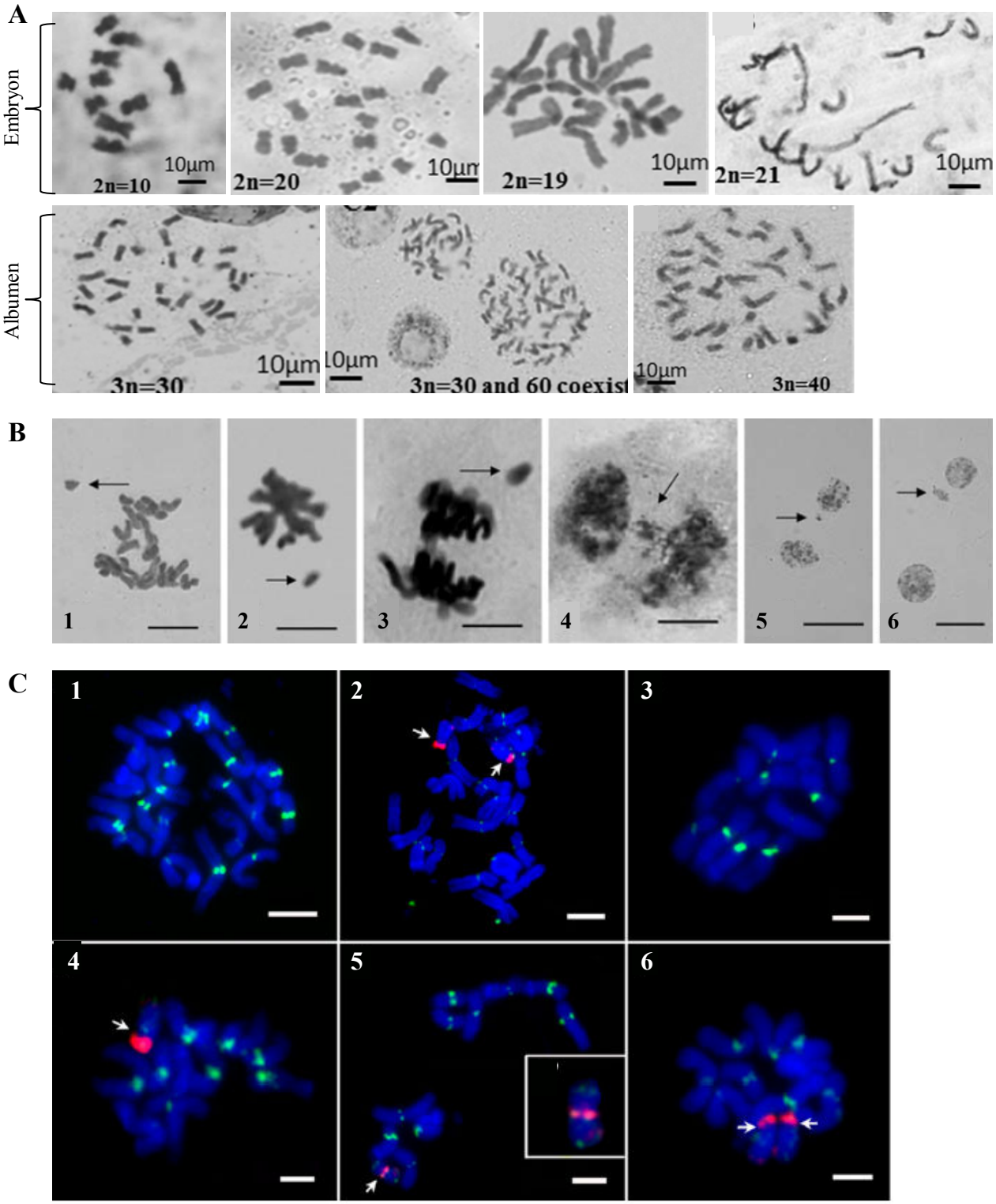


Figure I-26 : **Présence d'anomalies chromosomiques dans la descendance des lignées inductrices.**
A : Analyse cytologique de cellules somatiques de grains immatures, provenant des croisements avec une lignée inductrice utilisée en parent mâle, douze jours après la pollinisation (JAP). Des individus avec des nombres anormaux de chromosomes (aneuploïdes) ont été identifiés. Qiu *et al.,* (2014). **B** : Analyse cytologique de cellules somatiques (1) d'apex racinaires de grains germés provenant du croisement avec une lignée inductrice, utilisée en parent mâle ; un chromosome retardataire est visible à la métaphase et (2) à (6) d'ovules fécondés par une lignée inductrice. Des chromosomes retardataires sont visibles aux différentes étapes de la mitose ; (2) métaphase, (3) anaphase, (4) télophase et (5), (6) des micronoyaux à la télophase. Zhang *et al.,* (2008). **C** : Caryotypes de cellules somatiques d'embryons de 7 JAP provenant du croisement d'une lignée non-inductrice ne contenant pas de chromosome B avec une lignée inductrice contenant un chromosome B (parent mâle). Marquages par FISH des centromères (en vert) et des chromosomes B (en rouge). (1) Diploïde et (3) haploïde sans chromosome B, (2) diploïde et (6) haploïde avec deux chromosomes B, (4) haploïde avec un chromosome B, (5) haploïde avec un chromosome B anormal. Zhao *et al.,* (2013).

(putatifs haploïdes) avec un taux de 56,4%. Parmi les individus haploïdes étudiés, il s'est avéré, par une analyse du polymorphisme avec des marqueurs moléculaires, que deux individus (sur 253) présentaient des profils se détournant du profil maternel attendu, avec la présence de génome paternel. De plus, les auteurs ont identifié, par une analyse cytologique, la présence de micronoyaux dans les cellules des ovules fécondés et les radicelles des grains provenant du croisement avec HZI1 (figure I-26B). Des résultats similaires ont été obtenus par Li *et al.,* (2009) qui ont étudié la descendance de l'inducteur CAUHOI par des marqueurs microsatellites et qui ont identifié la présence de fragments chromosomiques paternels dans près de la moitié des plantules haploïdes analysées, indiquant que la fusion des gamètes mâles et femelles a bien eu lieu dans certains cas. Plus tard, Zhao *et al.,* (2013) ont également apporté des indications quant aux mécanismes à l'origine de la gynogenèse *in vivo* et soutiennent l'hypothèse d'une élimination séléctive du génome paternel. Les auteurs ont généré deux lignées inductrices rapportrices ; une contenant une fusion de CENH3 à la protéine fluorescente YFP (Yellow Fluorescente Protein) afin de marquer les centromères et une contenant un chromosome B spécifique de certains fonds génétiques. Les auteurs ont étudié des grains matures et immatures provenant de croisements entre une lignée non-inductrice et ces deux nouveaux inducteurs. Dans un premier temps, des chromosomes B spécifiquement paternels ont pu être détectés, par marquage avec la méthode FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) dans les haploïdes avec une faible fréquence (4/148), apportant ainsi des preuves d'une fécondation dans certains cas (figure I-26C). De même, similairement aux études de Zhang *et al.,* (2008) et Li *et al.,* (2009), les auteurs ont identifié la présence d'un fragment de 44-Mbp de génome paternel dans un grain haploïde (sur 42 analysés), par génotypage avec des puces à ADN. Ils ont constaté que la plupart des chromosomes inducteurs étaient éliminés lors de la première semaine après la fécondation, de par la présence de 1% de cellules diploïdes dans un embryon haploïde et du faible taux d'haploïdes dans les dernières étapes de développement des grains en regard de ceux obtenus avec l'analyse des grains immatures. L'élimination progressive des chromosomes a également été détectée dans les albumens des grains avortés, même si elle s'est produite dans certains cas, jusqu'à quinze jours après la pollinisation (dans les premières étapes le marquage CENH3-YFP spécifiquement paternel est encore visible). Ces différentes études apportent des indications non négligeables quant à une élimination du génome paternel dans certains individus résultant des croisements avec une lignée inductrice après une fusion normale des gamètes mâles et femelles, à l'image du mécanisme s'opérant lors des croisements interspécifiques (Sanei *et al.,* 2011).

A l'interface entre les deux hypothèses, deux équipes ont identifié des anomalies à la fois dans les grains de pollen des inducteurs et dans la descendance (Li *et al.,* 2017; Qiu *et al.,* 2014).

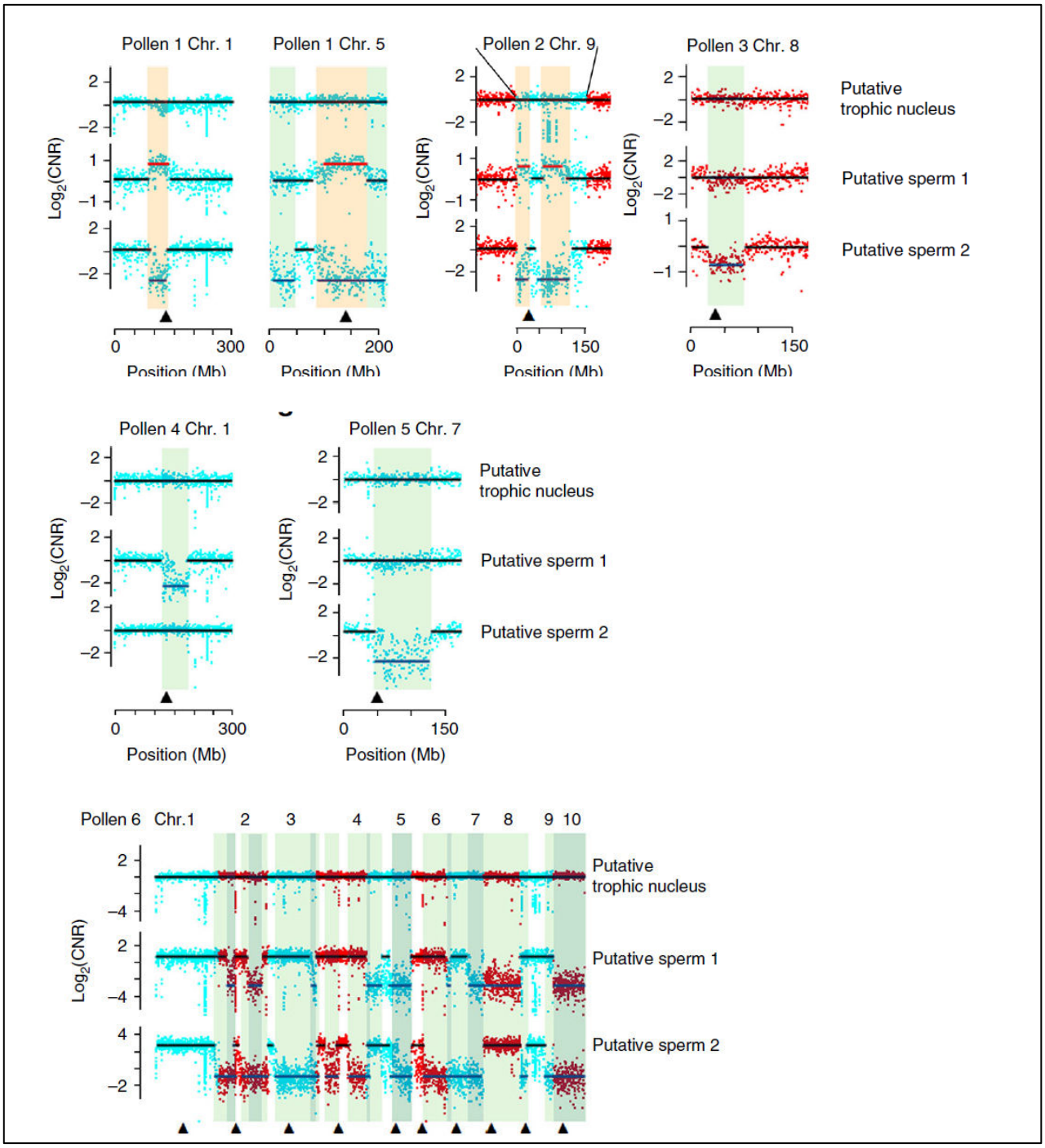


Figure I-27 : **Identification de fragmentations chromosomiques dans les cellules spermatiques des grains de pollen inducteurs.**
Séquençage sur le génome entier des noyaux (deux noyaux spermatiques et un noyau végétatif) provenant de grains de pollen de la lignée inductrice CAU5. Six grains de pollen ont été identifiés pour avoir des anomalies chromosomiques au niveau des putatives cellules spermatiques sur les 22 grains analysés. Aucune anomalie n'a été identifiée dans les putatifs noyaux végétatifs. Les grains de pollen n°1 à 5 présentent des cellules spermatiques avec des fragmentations sur un ou deux chromosomes et le grain de pollen n°6 contient deux cellules spermatiques avec de nombreuses anomalies sur la majorité des chromosomes. Le fond vert plus foncé indique les délétions chromosomiques dans les deux cellules spermatiques putatives. Les points bleus et rouges représentent respectivement les CNVs (Copy Number Variations) dans les chromosomes pairs et impairs. Les lignes représentent les résultats obtenus sur les putatifs noyaux végétatifs et spermatiques (1 et 2). Du haut vers le bas ; les lignes noires, bleues et rouges indiquent respectivement une haploïdie normale, une délétion et une diploïdie. Les triangles noirs indiquent les centromères. Liu *et al.,* (2016).

Ainsi, Qiu *et al.,* (2014) ont dans un premier temps identifié, par une étude cytologique, la présence de PMCs avec des nombres anormaux de chromosomes chez la lignée inductrice HZI1 (17,7%) en comparaison à une lignée sauvage (1,6%). De plus, il a été observé lors de la méiose, que la formation de micronoyaux et l'apparition de chromosomes anormaux étaient plus importantes chez la lignée inductrice que chez la lignée non-inductrice, appuyant ainsi l'hypothèse d'un défaut des gamètes mâles. En revanche, des anomalies ont également été observées dans la descendance issue du croisement avec la lignée inductrice HZI1, avec l'obtention à douze jours après pollinisation d'embryons et d'albums aneuploïdes et d'embryons haploïdes (figure I-26A), dont certains contenaient des fragments chromosomiques paternels, soutenant l'hypothèse d'une élimination du génome paternel après fécondation. Plus récemment, Li *et al.,* (2017) ont fait une étude novatrice apportant des informations sur la mécanistique à l'origine de la gynogenèse *in vivo*. Les auteurs ont réalisé le séquençage de noyaux spermatiques et végétatifs isolés provenant du pollen de deux lignées non-inductrices et deux lignées inductrices. Ils ont ainsi pu mettre en évidence dans le pollen d'une lignée inductrice la présence de cellules spermatiques arborant des fragmentations chromosomiques, alors qu'aucun défaut majeur n'a été mis en évidence au niveau des noyaux végétatifs (6 grains de pollen sur 22 séquencés) (figure I-27). Ce type d'anomalies n'a pas été observé dans le pollen d'une lignée sauvage. Par la suite, les auteurs ont étudié la descendance provenant de croisements avec les lignées inductrices et ont mis en évidence la présence de fragments de génome paternel dans huit embryons sur 81, soutenant l'hypothèse d'une élimination du génome paternel, bien que l'origine du processus semble venir d'un défaut des cellules spermatiques (Li *et al.,* 2017). En revanche, bien que Xu *et al.,* (2013) en aient émis l'hypothèse, cette élimination des chromosomes ne résulterait probablement pas d'un processus lié à des défauts d'incorporation de CENH3, puisque aucune anomalie n'a été noté à ce niveau chez les lignées inductrices (Li *et al.,* 2017).

Pour conclure, bien que des avancées considérables aient été réalisées ces dernières années, le mécanisme à l'origine de la probable élimination du génome paternel et donc de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs reste encore énigmatique.

I.4 - Rôles des phospholipases A chez les plantes

Dans ce projet de thèse, nous avons réalisé la cartographie fine du QTL majeur lié à l'induction d'haploïdes *ggi1/qhir1* et identifié un gène majeur codant pour une phospholipase prédite de la famille des PLA_2. Ainsi, afin de mieux appréhender la suite de ce manuscrit, une présentation rapide de la nature ainsi que du rôle des phospholipases A chez plantes sera réalisée dans la partie qui va suivre.

I.4.1 – Généralités sur les phospholipases

Les phospholipides, constituants essentiels des membranes (bicouches lipidiques), n'ont pas seulement un rôle de barrière physique entre les différents compartiments cellulaires, mais leur clivage *via* des enzymes spécifiques est également impliqué dans des voies de signalisation contrôlant de nombreux processus biologiques (Barman *et al.,* 2018). Les phospholipases (PLs) sont une superfamille d'enzymes capables d'hydrolyser ces phospholipides. Ces enzymes ont des rôles larges et variés puisqu'elles ont des fonctions à la fois structurelles et de signalisations ; elles participent au métabolisme lipidique et au remodelage membranaire mais génèrent également des messagers dérivés des lipides impliqués dans les voies de signalisation lipidiques. Il existe quatre classes de phospholipases (A à D) qui sont toutes impliquées dans le clivage des phospholipides sur les chaines acyles ou sur les fonctions esters de ces derniers, en fonction de la classe à laquelle elles appartiennent (Aloulou *et al.,* 2012; Dennis *et al.,* 2011). Ainsi, les PLAs et les PLBs éliminent les queues d'acides gras hydrophobes des glycérols alors que les PLCs et les PLDs éliminent la tête du phosphate hydrophile ou les chaînes latérales qui y sont attachées.

Les PLAs sont subdivisées en deux sous-familles, les PLA_1s et PLA_2s. Ces enzymes clivent les chaines acyles des glycophospholipides conduisant à l'estérification de la fonction alcool primaire *sn-1* (PLA_1) ou secondaire *sn-2* (PLA_2) du résidu glycérol, conduisant ainsi à la formation d'un lysophospholipide et à la libération d'un acide gras (Ryu, 2004; Scherer *et al.,* 2010). Originellement décrites chez les animaux (Burke and Dennis, 2008), la famille des PLAs incluent les PLAs dépendantes du calcium (Dessen, 2000) et indépendantes (Balsinde and Balboa, 2005), ainsi que les PLAs sécrétées (Six and Dennis, 2000). Chez *A.thaliana*, dix gènes ont été identifiés pour coder des PLAs (pPLA, pour plant-PLAs) (Holk, 2002), subdivisés en trois classes ; I, II et III (Scherer *et al.,* 2010). Bien que l'activité enzymatique n'ait pas été testée pour chacune de ces protéines, il a été montré parmi celles testées qu'elles avaient une faible affinité pour les phospholipides mais que leur capacité à hydrolyser les galactolipides semble

constituer une singularité des PLAs des plantes (pPLAs) (La Camera *et al.,* 2005; Matos *et al.,* 2001; Reina-Pinto *et al.,* 2009). Il est à noter que bien que les pPLAs aient une affinité moins forte que celles des animaux pour la fonction alcool secondaire (*sn-2*), elles ont tout de mla capacité de cliver cette fonction et peuvent de ce fait appartenir à la famille des $pPLA_2$ (Holk and Scherer, 1998; Narváez-Vásquez *et al.,* 1999). Par ailleurs, au sein de la famille des PLs, celles de type Patatin constituent un groupe de protéines qui partagent une grande similarité avec le domaine catalytique de la PATATINE, une protéine identifiée et fortement présente dans le tubercule de la pomme de terre. Les PLAs de type Patatin hydrolysent préférentiellement les acides gras en position *sn-2* (Mignery *et al.,* 1988; Scherer *et al.,* 2010).

I.4.2 - Fonctions des PLAs chez les plantes

De manière générale, certaines pPLAs sont impliquées dans des processus physiologiques et moléculaires impactant la croissance des plantes. Il a notamment été montré que des $pPLA_2$s étaient activées par la présence d'auxine et contrôlaient en autres, l'élongation cellulaire *via* cette voie (Scherer, 2002). Il a été proposé qu'elles acidifieraient la paroi cellulaire conduisant à son élongation chez *A.thaliana* (Lee *et al.,* 2003) et dans des hypocotyles de maïs (Yi *et al.,* 1996). De même, bien que les mécanismes moléculaires conduisant aux singularités développementales ne soient pas encore élucidés, les plantes mutées pour le gène *pPLA-IIIδ* présentent des défauts de croissance importants (Dong *et al.,* 2001), ainsi qu'un défaut dans l'ouverture stomatique induite par la lumière et le gravitropisme (Lee *et al.,* 2003; Seo *et al.,* 2008). Par ailleurs, il apparaît que les pPLAs sont impliquées dans la réponse au statut minéral du sol. En effet, chez *A.thaliana*, les plantes mutantes pour le gène *pPLA-IIγ* ne présentent pas de réponse racinaire-auxine dépendante, normalement observée lorsque le sol présente une carence en phosphate (Rietz *et al.,* 2010). Plus spécifiquement, Lee *et al.,* (2010) ont démontré que $pPLA_2\alpha$ modulait la mobilisation des protéines PIN-FORMED vers la membrane plasmique des cellules racinaires d'*A.thaliana*, révélant ainsi le rôle des $pPLA_2$s dans le trafic intracellulaire (Lee *et al.,* 2010). Par ailleurs, Gardiner et al. (2008) ont signalé l'implication de $pPLA_2$s dans le déclenchement d'une voie de signalisation, dérivant de clivages de certains phospholipides, qui serait impliquée dans l'organisation des microtubules. En effet, chez *A.thaliana*, les auteurs ont observé que les extrémités des racines traitées avec des inhibiteurs des $pPLA_2$s présentaient une croissance anisotrope et une désorganisation des réseaux de microtubules (Gardiner *et al.,* 2008).

Une cellule possède de nombreux systèmes membranaires incurvés, tels que le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi, l'endosome et les corps multivésiculaires. La

déformation membranaire est impliquée, entre autres, dans le trafic vésiculaire et est régulée par l'interaction entre les lipides qui constituent la membrane et les protéines. Dans ce contexte, une modification de la composition lipidique des membranes, notamment des phospholipides, peut avoir un rôle dans la déformation de celles-ci (McMahon and Gallop, 2005). Brown *et al.,* (2003) ont proposé que des pPLA$_2$s hydrolyseraient les phospholipides d'un côté de la membrane, créant ainsi une concentration localisée de lysophospholipides coniques inversés qui à leurs tours entraîneraint la formation d'une courbure membranaire positive, un processus qui est considéré comme la première étape de la formation des vésicules membranaires (Brown *et al.,* 2003). Plus récemment, il a été démontré que les lysophospholipides étaient impliqués dans la formation de certaines vésicules, appuyant ainsi les observations de Brown *et al.,* (2003).

En plus des fonctions développementales primaires, les pPLAs sont impliquées dans de nombreux processus métaboliques, cellulaires et physiologiques, notamment activés en réponse aux stress biotiques et abiotiques, de par des modifications transcriptionnelles de gènes codants pour des pPLAs, induites par ces processus (Dhondt *et al.,* 2002; La Camera *et al.,* 2005; Scherer *et al.,* 2010). Par exemple, chez *A.thaliana*, il a été montré que les plantes altérées dans la biosynthèse des pPLA$_1$s produisaient moins d'acide jasmonique (AJ) et présentaient des dommages plus marqués en réponse à un pathogène ou à une blessure (Yang *et al.,* 2007). En revanche, la production d'AJ en présence de stress reste similaire à celle des plantes sauvages, indiquant que les pPLA$_1$s jouent un rôle dans le contrôle de la production de l'AJ basale mais non induite. Par ailleurs, il apparaît que les pPLA-IIα sont impliquées dans la mobilisation d'acides gras indispensables à la biosynthèse d'oxylipines (précurseur de l'AJ) bien que l'impact sur l'accumulation d'AJ soit limité (Camera *et al.,* 2009). De manière plus générale, il a été montré que les pPLAs étaient impliquées dans la synthèse de l'AJ (Ryu, 2004). Par exemple, le gène *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* (*DAD1*), codant pour une pPLA$_1$, est impliqué dans la libération d'acide linoélique, un précurseur de l'AJ, essentiel dans la maturation du pollen et dans la déhiscence des anthères chez *A.thaliana* (Ishiguro *et al.,* 2001). Concernant le rôle des pPLA$_2$ dans les processus développementaux relatifs au pollen, si plusieurs études ont mis en évidence que des phospholipases (C, D) étaient essentielles à la croissance du tube pollinique chez plusieurs espèces, moins d'informations sont disponibles quant aux pPLAs. Par exemple, il a été montré qu'une pPLC nommée Pet-PLC1 était indispensable pour la croissance du tube pollinique chez le pétunia et que sa mutation conduisait à une désorganisation du cytosquelette d'actine (Dowd, 2006). De même, chez le tabac, le produit de dégradation d'une pPLD a été montré pour être essentiel dans la croissance du tube pollinique et dans l'organisation de l'actine lors de ce processus (Potocký *et al.,* 2003). Chez *A.thaliana*, une étude a caractérisé trois

isoformes de *pPLA-II* et a montré : (i) qu'ils étaient exprimés au cours du développement du pollen, (ii) que les protéines étaient localisées dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi et (iii) qu'elles avaient un rôle critique dans la germination du tube pollinique et dans le développement du grain de pollen. De plus, les auteurs ont montré que la sous-expression de ces trois isoformes conduisait à la mort du grain de pollen et que l'inhibition de sa germination par des inhibiteurs des pPLA-II pouvait être contrecarrée par un apport exogène de lysophosphatidyl-ethanolamine (un produit de réaction des pPLA-II) (Kim *et al.,* 2011).

Pour conclure, l'activité enzymatique des phospholipases A chez les plantes semble être impliquée dans de nombreux processus biologiques, tant par le déclenchement de voies de signalisation aux fonctions diverses que dans les remodelages membranaires, essentiels au trafic intracellulaire.

PARTIE II
Contexte et objectifs

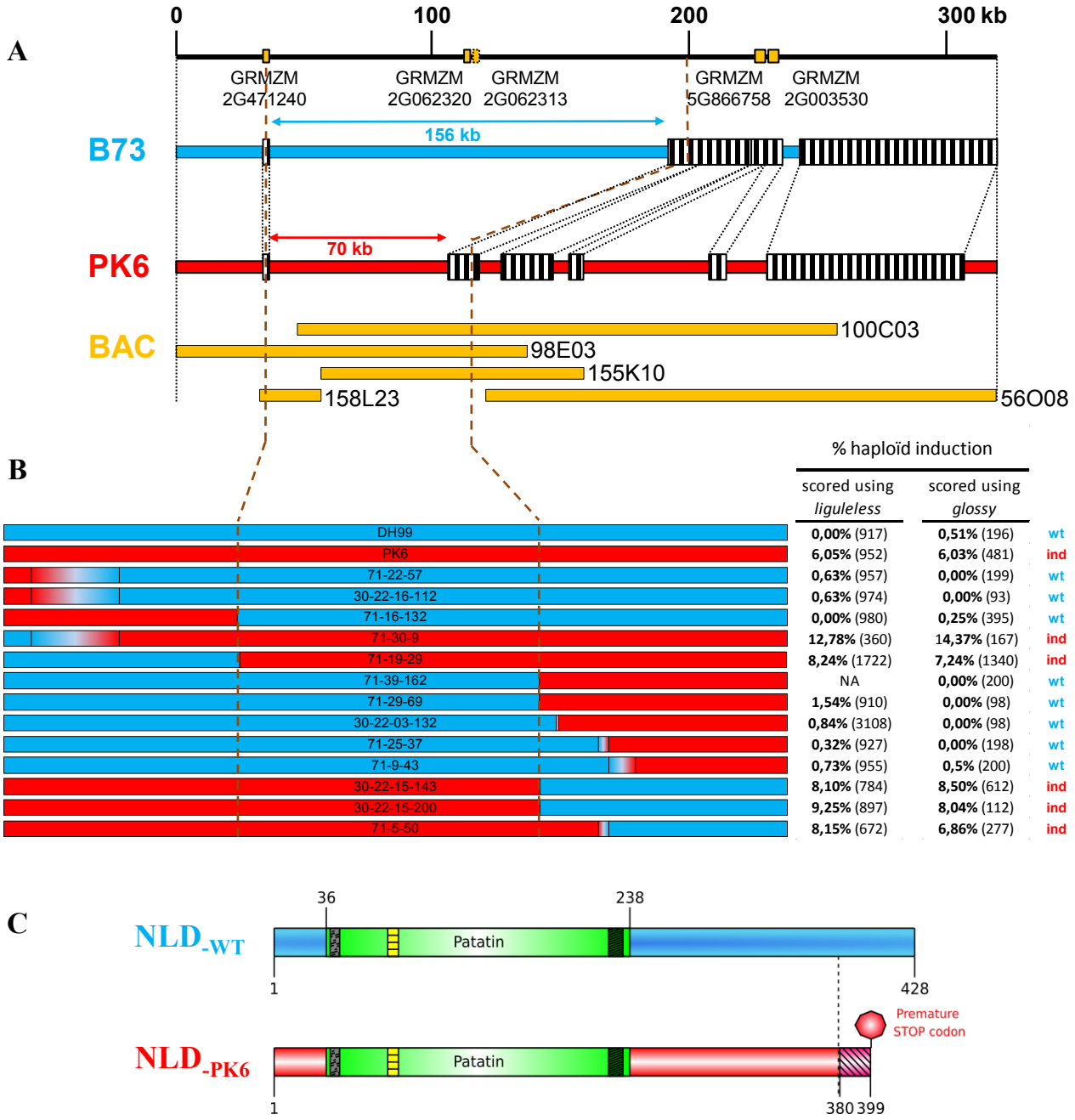


Figure II : Cartographie fine et structure du locus *ggi1/qhir1*.

A : Analyse GEvo (https://genomevolution.org/coge/GEvo.pl) des séquences de B73 (génome de référence du maïs) et de PK6. Les régions avec plus de 95% de similarité sont marquées par des cases hachurées et reliées par des lignes pointillées. Les gènes prédits dans la séquence de B73 sont nommés par leurs identifiants GRMZM. Les lignes pointillées marrons délimitent une région de 156-Kpb de B73 remplacée dans le génome de PK6 par une région de 70-Kpb non apparentée. Les clones BACs utilisés pour établir la séquence de PK6 sont représentés par des rectangles jaunes sous la séquence de PK6. **B** : Représentation schématique des recombinants-clés utilisés pour générer la cartographie fine, en utilisant la séquence du génome de B73 comme référence. Les régions génomiques issues de PK6 et de HD99 sont respectivement colorées en rouge et en bleu. Les transitions de couleur représentent les distances entre les marqueurs discriminants supérieures à 1-Kpb. Les taux d'induction correspondant aux différents recombinants ont été obtenus par des croisements avec des lignées testeurs femelles. Ils sont indiqués en pourcentages (%) (du nombre de plantules criblées) et classés comme inducteurs (ind) ou non-inducteurs (wt). **C** : Structure des deux versions prédites de la protéine candidate NLD ; sauvage (NLD_{-WT}) et mutante (NLD_{-PK6}). Les deux versions contiennent un domaine patatine/phospholipase représenté en vert. Les cases grises, jaunes hachurées et vertes foncées représentent, respectivement, des éléments de liaison phosphate/anion, une boite estérase et un motif contenant une dyade catalytique. La mutation de *NLD* entraîne un décalage du cadre de lecture, responsable de la formation d'une protéine NLD_{-PK6} tronquée. Cette protéine possède 49 acides aminés en moins en partie C-terminale, en comparaison à la protéine de type sauvage, qui sont remplacés par 20 acides aminés différents (positions 380 à 399), se terminant par un codon STOP prématuré.

II.1 - Contexte et résultats préliminaires

Comme illustré dans la partie introductive, l'utilisation des lignées inductrices d'haploïdes, capables de déclencher la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, représente un outil de choix afin de créer de manière efficiente des nouvelles variétés. Associée à la diploïdisation dans la technologie des plantes Haploïdes Doublés (HDs), l'utilisation de ces lignées permet d'augmenter considérablement l'efficacité des programmes de sélection. Cependant, les taux d'induction d'haploïdes de ces lignées restent encore faibles (entre 5% à 15%) et leur utilisation est restreinte au maïs. Une meilleure compréhension du processus de gynogenèse *in vivo* pourrait contribuer à contourner les limites associées à cette technologie. Par ailleurs, du point de vue de la recherche fondamentale, les lignées inductrices d'haploïdes apportent un outil unique afin d'étudier la reproduction sexuée chez les plantes.

Le projet de recherche dans lequel s'inscrit ma thèse vise donc à identifier le(s) déterminisme(s) génétique(s) ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents au processus d'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, un acteur central de la filière HD, qui reste un mystère depuis la découverte de la première lignée inductrice par Edouard Coe en 1959 (Coe, 1959). Ce projet a été initié à la suite des travaux de thèse de Pierre Barret, réalisés à l'INRA de Clermont-Ferrand. Pour rappel, ces travaux ont permis l'identification d'un QTL majeur *ggi1* présent sur le chromosome n°1 du génome du maïs, expliquant 66% de la variance phénotype associée à la gynogenèse *in vivo*. Cette étude quantitative a été réalisée *via* l'analyse d'une population en ségrégation résultant du croisement initial entre la lignée non-inductrice d'haploïde, HD99 et la lignée inductrice d'haploïdes, PK6 (Barret *et al.,* 2008). A partir de ces résultats, la cartographie fine de *ggi1* a été initiée au sein de mon équipe d'accueil « Seed Development ». Le matériel biologique ayant servi pour la réalisation de cette cartographie, ressortant des travaux de Barret *et al.,* (2008), a été donné par Pierre Barret à Peter Rogowsky qui a réalisé une population de recombinants (>10 000 plantes) dans le but d'entreprendre le clonage positionnel de *ggi1*. En concomitance avec l'arrivée de Thomas Widiez dans l'équipe, une collaboration a été engagée avec Jean-Pierre Martinant de l'entreprise semencière Limagrain Europe. Résultant de cette collaboration, 531 recombinants ont pu être identifiés et ont servi de point de départ à la réalisation de la cartographie fine. L'analyse de ces recombinants a permis de restreindre l'intervalle génétique lié à l'induction d'haploïdes à 166-Kpb (Kilo paire de bases) par comparaison au génome de référence B73. Sur ce génome de référence, seuls trois gènes se retrouvent présents dans cet intervalle génétique : *GRMZM2G471240, GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* (figure II). Afin de connaitre la séquence génomique de la lignée inductrice

utilisée dans cette cartographie (PK6), une banque de clones BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) été réalisée, puis séquencée (figure II). Dans l'intervalle génétique d'intérêt, il s'avère que la séquence génomique de la lignée inductrice d'haploïdes PK6 est très différente de celle de la lignée non-inductrice d'haploïde B73 ; avec seulement 10-Kpb en commun et un remplacement d'un intervalle de 156-Kpb par un intervalle différent de 70-Kpb (figure II). De plus, il a pu être mis en évidence chez la lignée PK6 la présence d'éléments transposables et l'absence des gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* (figure II). Ainsi, le seul gène codant présent dans l'intervalle génétique d'intérêt au locus PK6 est le gène *GRMZM2G471240*. De manière intéressante, un polymorphisme existe entre l'allèle sauvage non-inducteur (B73 ou HD99) et l'allèle inducteur (PK6), se caractérisant par la présence d'une insertion de 4-pb dans le dernier exon du gène, qui conduit à un décalage du cadre de lecture et donc à l'apparition d'un codon STOP prématuré, entraînant la traduction d'une protéine prédite tronquée (figure II-2). Ce polymorphisme dans cet unique gène, associé au fait que celui-ci est exprimé fortement et spécifiquement dans les organes reproducteurs mâles (panicules) (Downs *et al.,* 2013; Sekhon *et al.,* 2011), ont constitué des indications non négligeables afin de le favoriser comme le gène candidat causal de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Ce gène candidat, codant pour une phospholipase prédite A_2, de type Patatin, a été nommé « *NOT LIKE DAD* » (*NLD*), puisque l'information génétique paternelle ne se retrouve pas dans les embryons haploïdes résultant de la gynogenèse *in vivo*.

II.2 - Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse s'inscrit à la suite de la cartographie fine réalisée au sein de l'équipe, ayant permis l'identification du gène candidat *NLD* comme causal de l'induction d'haploïdes.

Le premier objectif de ma thèse a été de confirmer la causalité du gène *NLD* dans la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, c'est-à-dire (1) de finaliser la cartographie fine du QTL *ggi1/qhir1* et (2) de valider fonctionnellement l'implication de *NLD* et du polymorphisme de 4-pb présent sur les allèles *NLD* des lignées inductrices, dans l'induction d'haploïdes. Pour parvenir à cet objectif, plusieurs approches différentes et complémentaires ont été entreprises, incluant la complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes par l'apport d'un allèle *NLD* sauvage dans des fonds génétiques inducteurs d'haploïdes et l'étude de la dérégulation et de la perte de fonction du gène *NLD* dans des fonds génétiques non-inducteurs.

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'action du gène *NLD*, afin de comprendre le processus par lequel la mutation de *NLD* chez les lignées

inductrices mâles conduit au déclenchement de la gynogenèse *in vivo*. Pour cela, une caractérisation moléculaire et cellulaire des deux versions de *NLD*, avec et sans le polymorphisme de 4-pb, a été entreprise, incluant des études du territoire d'expression du gène et de la protéine et la dynamique d'adressage subcellulaire de NLD. En parallèle, par une analyse plus globale, les phénotypes associés à la gynogenèse *in vivo* ont été caractérisés afin de mieux appréhender le processus de déclenchement du développement d'embryons haploïdes contenant uniquement le génome maternel *via* l'utilisation d'une lignée inductrice en parent mâle.

Un troisième objectif, qui a été seulement été initié durant cette thèse, mais qui ouvre des perspectives pour la suite du projet, est d'intégrer l'ensemble des connaissances acquises sur *NLD* afin d'optimiser l'efficience du processus d'induction d'haploïdes chez le maïs ou/et de transférer cette technologie chez d'autres espèces d'intérêt agronomique.

II.3 - Valorisation des travaux de thèse

La découverte du gène *NLD* et les premières caractérisations associées ont conduit à une publication dans la revue EMBO journal (Gilles *et al.,* 2017) ainsi qu'à une courte revue dans le journal Current Biology (Gilles *et al.,* 2017b) et à un article de vulgarisation scientifique sur le site internet « planète-vie » de l'ENS (Gilles *et al.,* 2017c). Il est à noter qu'en parallèle de nos travaux, deux autres équipes ont également identifié, de façon indépendante, le même gène comme causal de l'induction d'haploïdes maternels, qu'elles ont respectivement nommé *MATRILINEAL* (*MTL*) (Kelliher *et al.,* 2017) et *Zea mays PHOSPHOLIPASE A1* (*ZmPLA1*) (Liu *et al.,* 2017). L'étude de la dynamique et de l'adressage de NLD fait l'objet d'un manuscrit en préparation. Par ailleurs, les travaux sur l'édition du gène *NLD* sont intégrés dans une publication portant sur la description du système CRISPR/cas9 généré par l'équipe et sur son utilisation pour la réalisation de mutants pertes de fonction chez le maïs (Doll *et al.,* soumis) (annexes 1, 2).

PARTIE III

Résultats

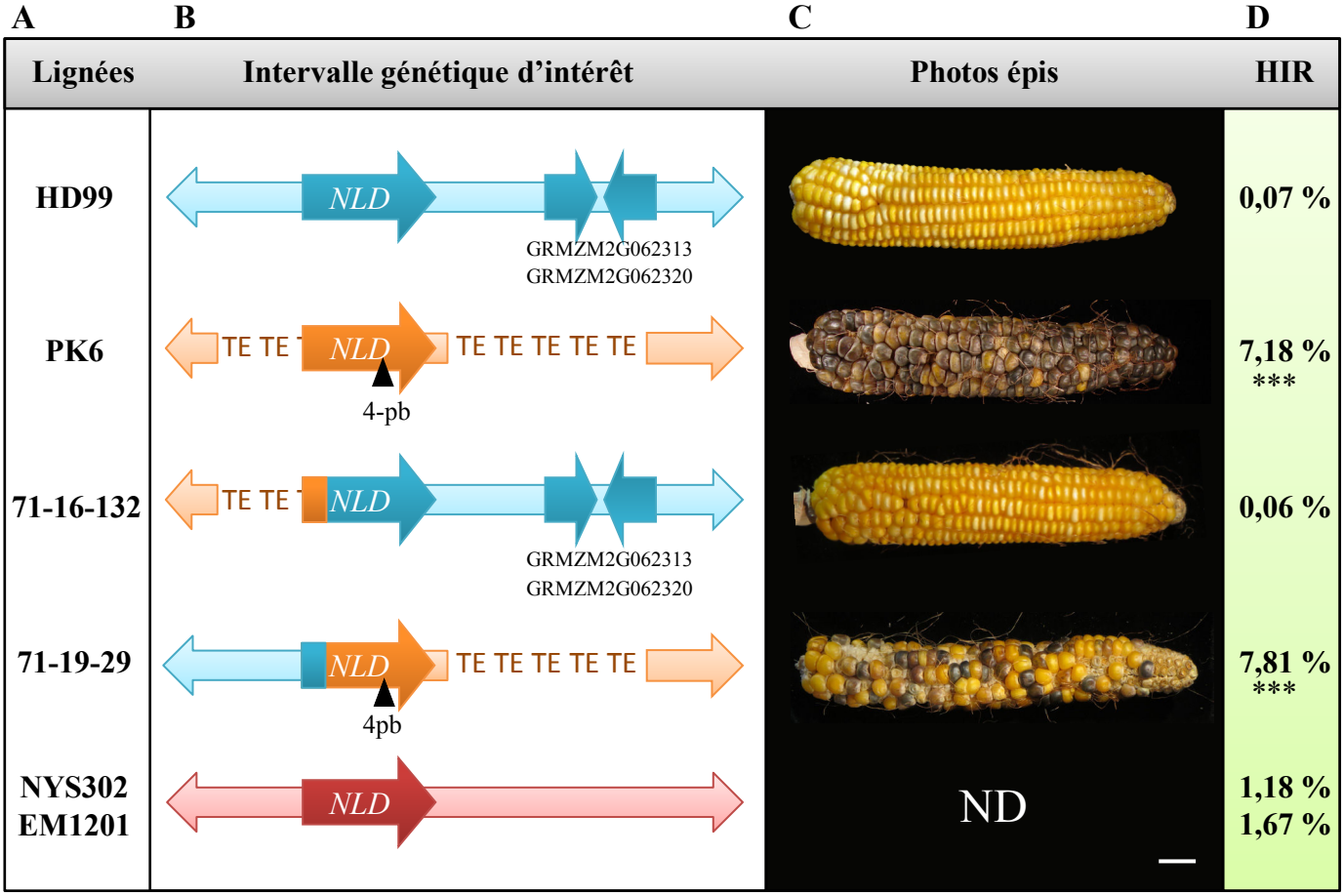


Figure III-1 : Réduction de l'intervalle génétique présent sur le QTL *ggi1/qhir1* à un gène candidat unique : *NLD*. A : Lignées ayant permis la réduction de l'intervalle génétique d'intérêt ; PK6 et HD99 sont les lignées parentales utilisées pour la cartographie fine, 71-16-132 et 71-19-29 sont des recombinants dans le gène *NLD*, NYS302 et EM1201 sont des lignées ayant un haplotype au locus d'intérêt particulier : avec l'allèle *NLD* similaire à celui de PK6 mais sans l'insertion de 4-pb dans le dernier exon de *NLD*. **B** : Représentations schématiques des haplotypes dans l'intervalle génétique d'intérêt. Les flèches doubles représentent les haplotypes ; le bleu correspond à la séquence de HD99, le orange à celle de PK6 et le rouge à celles de NYS302 et EM1201, les flèches à sens unique représentent les gènes et les triangles noirs l'insertion de 4-pb, provenant de l'allèle NLD_{-PK6}, TE = éléments transposables. **C** : Photos des épis provenant des croisements avec la lignée testeur « glossy ». Barre d'échelle = 2 cm. **D** : Taux d'induction d'haploïdes totaux (HIR) des différentes lignées. Les HIRs présentés correspondent aux cumuls des données obtenues par analyses avec les marqueurs « glossy » et « liguleless » présentées dans le tableau III-1. Les lignées avec des astérisques (***) induisent significativement plus d'haploïdes que HD99 (p-value < 0,001; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc).

Lignée	Marqueur "glossy"				Marqueur "liguleless"				Grains avortés			
	Epis	Grains	Haploïdes	HIR (%)	Epis	Grains	Haploïdes	HIR (%)	Epis	Grains	Avortés	AIR (%)
HD99	3	510	1	0,20	ND	917	0	0,00	2	1170	24	2,05
PK6	11	1696	132	7,78 ***	ND	952	58	6,09 ***	10	2328	499	21,44 ***
71-16-132	3	602	1	0,17	ND	980	0	0,00	2	920	21	2,33
71-19-29	10	1340	97	7,24 ***	ND	1722	142	8,25 ***	9	2230	380	16,31 ***
NYS302	1	98	0	0,00	ND	1000	13	1,30	ND	ND	ND	ND
EM201	1	196	0	0,00	ND	1000	20	2,00	ND	ND	ND	ND

Tableau III-1 : Données détaillées des taux d'induction totaux d'haploïdes et de grains avortés des lignées présentées dans la figure III-1. HIR = « Haploid Induction Rate », AIR = « Aborted Induction Rate ». Epis : nombre d'épis analysés provenant des croisements avec les lignées « testeurs », Grains : nombre total de grains criblés, Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées, Avortés : nombre de grains avortés identifiés. ND = Non Disponible. Les lignées avec des astérisques (***) induisent significativement plus d'haploïdes que HD99 (p-value < 0,001; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc).

III.1 Validation fonctionnelle du gène candidat *NOT LIKE DAD* (*NLD*) comme causal de l'induction d'haploïdes

Comme présenté dans la partie II, ce projet de thèse découle de la cartographie fine du QTL majeur lié à l'induction d'haploïdes chez le maïs ; *ggi1/qhir1*. Cette cartographie fine, associée à la comparaison de l'intervalle génétique identifié avec le génome de référence de la lignée B73, a permis la mise en évidence de trois gènes candidats se situant dans l'intervalle ; *GRMZM2G471240 (NLD), GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* (figure II). La présence (1) d'un polymorphisme au niveau du gène *NLD* entre les lignées B73 (non-inductrice) et PK6 (inductrice), (2) d'un biais de ségrégation dans la transmission de l'allèle mutant à la descendance et (3) d'une expression spécifique dans tissus reproducteurs mâles (panicules et anthères) ont constitué une indication majeure afin de favoriser *NLD* comme le gène candidat impliqué dans l'induction d'haploïdes (Partie II, figure II). Cependant, à ce stade de l'analyse, il n'était pas encore possible d'exclure une implication des deux autres gènes présents dans l'intervalle d'intérêt, ou d'autres éléments de régulation tels que des éléments transposables, des petits ARNs, des éléments cis-régulateurs, etc. Une première étape importante du projet de recherche a donc été de démontrer la causalité du gène candidat *NOT LIKE DAD* dans le phénotype d'induction d'haploïdes maternels (gynogenèse *in vivo*) chez le maïs.

III.1.1 - *NLD* est le gène candidat unique lié à l'induction d'haploïdes

Dans un premier temps, la borne gauche de l'intervalle génétique a été réduite au niveau de la région 5' du gène *NLD*. Cette étape a été rendue possible grâce à l'analyse de deux recombinants dans le gène, générés précédemment au sein de l'équipe d'accueil et nommés 71-16-132 et 71-19-29 (figure III-1-B). Ces deux recombinants sont particulièrement intéressants pour la finalisation de la cartographie fine puisqu'ils présentent une recombinaison au même endroit, mais avec une configuration opposée. Le recombinant 71-16-132, contient la séquence promotrice et la région 5' de *NLD* d'origine PK6 (inducteur) avec le reste de la séquence génomique dans l'intervalle d'origine HD99 (non-inducteur) (figure III-1). Au contraire, le recombinant 71-19-29 contient la séquence promotrice et la région 5' de *NLD* d'origine HD99 avec le reste de la séquence dans l'intervalle d'origine PK6, c'est-à-dire avec l'insertion de 4-pb dans le dernier exon de *NLD* mais sans les deux gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313*. L'analyse des taux d'induction d'haploïdes (HIRs, Haploid Induction Rates) totaux, c'est-à-dire évalués sur l'ensemble des grains observés, de ces deux recombinants a été réalisée *via*

l'observation d'épis provenant de croisements avec des lignées testeurs contenant une mutation récessive *glossy* (analyses faire au sein du laboratoire d'accueil) et *liguleless* (analyses faites par le laboratoire Limagrain Europe) (voir partie I.4.2.2 pour la description de ces lignées testeurs).

Ainsi, le recombinant 71-19-29 révèle une capacité significative à induire des haploïdes de 7,81% (n=3062), contrairement au recombinant 71-16-132 dont le HIR quasi nul est de 0,07% (n=1582) (figure III-1-D, tableau III-1). A titre de référence, la lignée inductrice PK6 a un HIR élevé de 7,74% (n=2648), alors que la lignée non-inductrice HD99 a un HIR faible de 0,06% (n=1427) (figure III-1, tableau III-1). L'ensemble de ces observations permet donc clairement de délimiter la borne gauche de l'intervalle génétique du QTL lié à l'induction d'haploïdes, à la région 5' du gène *NLD,* réfutant ainsi l'implication de la séquence située en amont de cette zone de recombinaison et donc, entre autres, de la région promotrice de l'allèle *NLD* mutant. Par conséquent, à ce stade de l'étude, trois éléments géniques peuvent encore expliquer la capacité d'induction d'haploïdes de la lignée inductrice PK6 ; l'insertion de 4-pb présente dans le dernier exon de *NLD*, l'absence de l'un ou des deux gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G0623130*, ou une combinaison de ces deux cas de figure.

Par conséquent, afin de réfuter l'implication des gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* dans l'induction d'haploïdes, deux lignées de maïs spécifiques ont été analysées ; EM1201 et NYS302. Ces lignées, sélectionnées par le génotypage d'un panel de diversité au niveau de l'intervalle génétique d'intérêt, présentent un haplotype particulièrement intéressant puisqu'il est fortement similaire à celui de la lignée PK6 excepté au niveau de *NLD* où le polymorphisme de 4-pb est absent. Pour synthétiser, dans le génome de ces deux lignées ; le gène *NLD* n'arbore pas de mutation et les deux gènes *GRMZM2G062320* et G*RMZM2G0623130* sont absents (figure III-1B). Ainsi, l'analyse des épis provenant des croisements des lignées testeurs avec les lignées EM1201 et NYS302 révèle des taux d'induction d'haploïdes totaux faibles, respectivement de 1,67% (n=1196) et 1,18% (n=1098) (figure III-1, tableau III-1). En revanche, il est à noter que ces HIRs sont relativement élevés pour des lignées non-inductrices. Il est envisageable que leurs similitudes avec la séquence génomique de la lignée inductrice PK6 dans l'intervalle génétique d'intérêt leur confèrent un fonds génétique plus favorable à l'induction que celui de la lignée HD99. Cependant, il semblerait que l'absence du polymorphisme de 4-pb au niveau du gène *NLD* entraîne une baisse significative de la capacité d'induction d'haploïdes, suggérant ainsi une implication majeure de celui-ci dans la gynogenèse *in vivo*. En effet, bien que non nuls, ces taux d'induction d'haploïdes totaux ne sont pas significativement différents de celui de la lignée contrôle non-inductrice HD99 (figure III-1D) (bien que la comparaison soit faite sur des fonds génétiques différents). Ce résultat permet donc

a priori d'écarter une implication majeure des deux gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* dans la gynogenèse *in vivo*, favorisant ainsi l'hypothèse d'une influence du polymorphisme de 4-pb présent au niveau du gène *NLD*.

L'analyse des taux d'induction de grains avortés (AIRs, Aborted Induction Rates) totaux, sur les mêmes épis que ceux ayant servi à l'évaluation des HIRs, révèle une corrélation évidente entre les HIRs et les AIRs pour l'ensemble des recombinants/lignées observés (figure, III-1C, tableau III-1). Effectivement, plus les taux d'induction d'haploïdes sont élevés et plus les taux d'induction de grains avortés le sont également. Par exemple, la lignée PK6 inductrice a un AIR de 21,44% (n=2328), contrairement à la lignée HD99 non-inductrice qui a un AIR très significativement inférieur, de 2,05% (n=1170). De même, le recombinant 71-19-29, inducteur d'haploïdes, a un AIR de 16,31% (n=2230), en regard du recombinant non-inducteur 71-16-132 qui a un AIR significativement inférieur, de seulement 2,33% (n=920), confirmant donc les tendances observées avec l'analyse des HIRs (tableau III-1).

L'ensemble de ces données viennent soutenir celles obtenues au sein de l'équipe avant le début de ce projet de thèse, présentées dans la partie II (figure II). Ces résultats permettent ainsi de conclure que *NLD* semble être l'unique gène candidat lié à l'induction de la gynogenèse *in vivo* présent dans l'intervalle génétique identifié sur le chromosome n°1 du maïs. De même, il a pu être identifié que le polymorphisme de 4-pb présent, au niveau du gène *NLD*, entre la lignée inductrice PK6 et la lignée non-inductrice HD99 est très certainement un élément-clé dans le contrôle de ce processus. Afin de renforcer ces résultats, le génotypage d'un panel de diversité génétique au niveau de cet intervalle a permis d'identifier une forte corrélation entre la capacité d'induction d'haploïdes et ce polymorphisme de 4-bp qui est présent au niveau du locus *NLD* chez l'ensemble des lignées inductrices testées (12), alors qu'il est absent chez les lignées non-inductrices (92) (Gilles *et al.,* 2017). Pour résumer, cette cartographie fine du locus *ggi1/qhir1* permet d'isoler un unique gène candidat, *NLD*, dont les allèles présents chez les lignées inductrices contiennent une insertion de 4-pb dans le dernier exon du gène, conduisant à la formation d'un codon STOP prématuré et donc d'une protéine prédite tronquée (figure II). Une approche de validation fonctionnelle a donc été entreprise afin de confirmer biologiquement que *NLD* est le gène causal dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs.

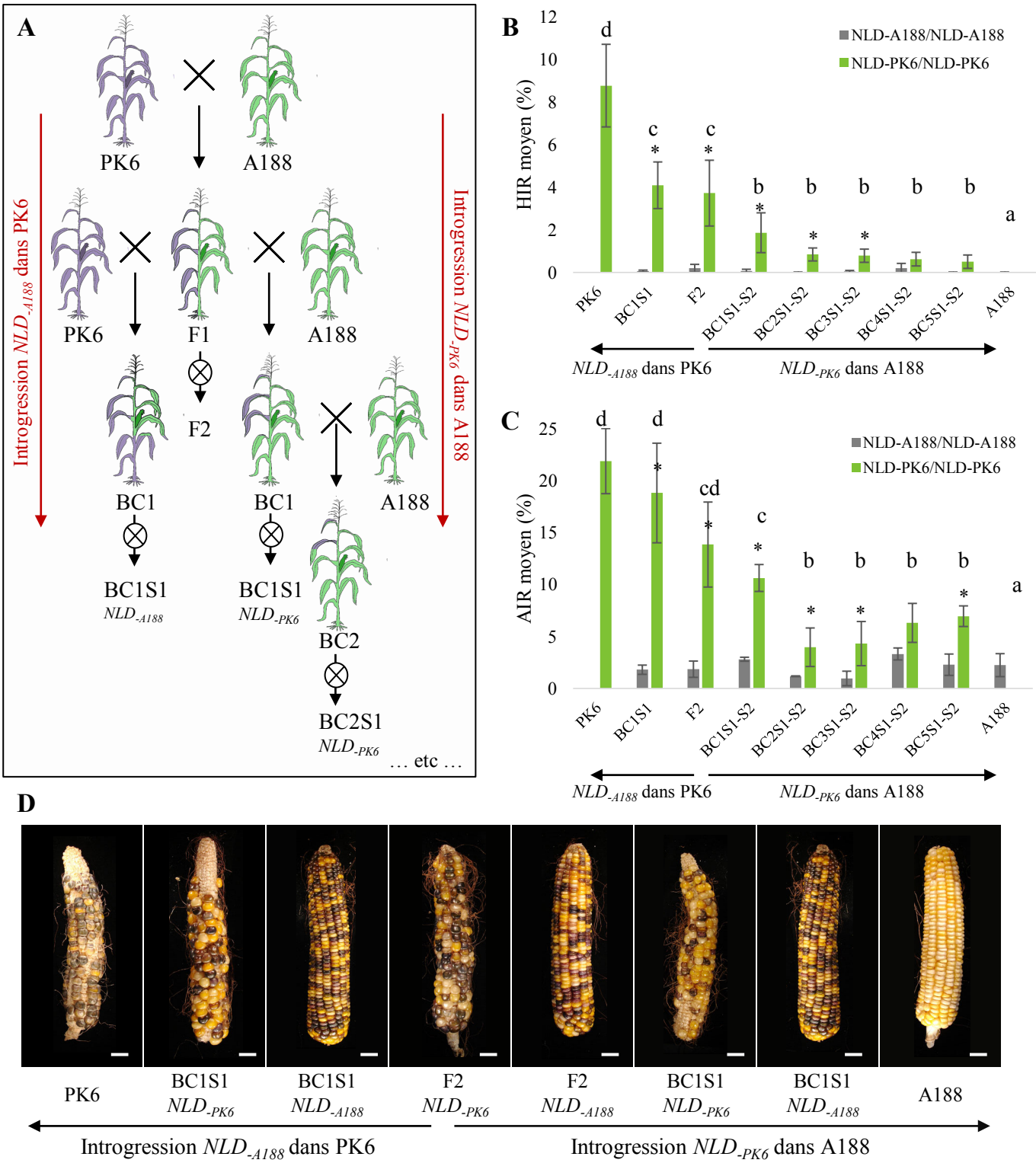


Figure III-2 : Création des lignées isogéniques PK6$^{-NLD-A188}$ et A188$^{-NLD-PK6}$. A : Schéma représentatif des introgressions de l'allèle *NLD*$_{-PK6}$ dans le fonds génétique A188 jusqu'au rétrocroisement (Backcross, BC) BC2S1 et de l'allèle *NLD*$_{-A188}$ dans le fonds génétique PK6 jusqu'au BC1S1. **B, C** : Analyses des épis provenant des croisements de la lignée testeur « glossy » avec les différentes lignées. Les données présentées proviennent de l'analyse des BC1S1 et S2. S1 = 1ère génération d'autofécondation, S2 = deuxième génération d'autofécondations. Des épis provenant des croisements avec PK6 et A188 sont montrés comme contrôles. Les données détaillées ayant permis la réalisation des histogrammes sont présentées dans les tableaux III-2 et III-3. Les histogrammes représentent les taux d'induction **B** : d'haploïdes moyens (HIRs moyens) et **C** : de grains avortés moyens (AIRs moyens). Les lettres indiquent des différences significatives entre les lignées, les astérisques (*) des différences significatives entre les ségrégants d'un même rétrocroisement ; arborant l'allèle *NLD*$_{-PK6}$ ou l'allèle *NLD*$_{-A188}$, (p-value <0,05; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc). **D** : Photos d'épis provenant des croisements avec la lignée testeur et ayant servi à l'évaluation des HIRs et des AIRs. Barre d'échelle = 2cm. **B-D** : Les flèches allant vers la droite représentent l'introgression de l'allèle *NLD*$_{-PK6}$ dans le fonds génétique A188 et celles allant vers la gauche l'introgression de l'allèle *NLD*$_{-A188}$ dans le fonds PK6.

III.1.2 - Création des lignées isogéniques A188$^{NLD\text{-}PK6}$ et PK6$^{NLD\text{-}A188}$

III.1.2.1 - Introgression de l'allèle *NLD*$_{\text{-}PK6}$ dans le fonds génétique non-inducteur d'haploïde, A188

Afin d'être en mesure d'évaluer l'influence de la région génomique des lignées inductrices contenant l'allèle *NLD* mutant dans un fonds génétique non-inducteur et également de créer du matériel génétique comparable inducteur *versus* non-inducteur, la création d'une lignée isogénique a été entreprise. Pour cela, la région génomique provenant de PK6 contenant l'allèle *NLD* mutant, nommé *NLD*$_{\text{-}PK6}$, a été introgressée dans le fonds génétique non-inducteur d'haploïde, A188, par l'intermédiaire de différents rétrocroisements entre les lignée PK6 et la lignée A188, utilisée comme parent récurrent (figure III-2A). Les plantes provenant des différentes générations de rétrocroisements (backcross, BC) avec la lignée A188 (BC-A188), ont par la suite été autofécondées (S1, pour la 1ère génération d'autofécondations) afin de sélectionner les plantes homozygotes et ainsi d'évaluer les taux d'induction d'haploïdes à chaque génération (figure III-2A). Les ségrégants positifs et négatifs arborant respectivement à l'état homozygote l'allèle *NLD*$_{\text{-}PK6}$ (*NLD*$_{\text{-}PK6}$ / *NLD*$_{\text{-}PK6}$) et l'allèle *NLD* qui provient de la lignée A188, nommé *NLD*$_{\text{-}A188}$ (*NLD*$_{\text{-}A188}$ / *NLD*$_{\text{-}A188}$), ressortant de chaque rétrocroisement autofécondé ont été sélectionnés *via* l'utilisation d'un marqueur moléculaire permettant de discriminer les deux allèles au locus *NLD* (voir partie V.6.4).

Avant d'analyser spécifiquement ces lignées d'introgression, il est intéressant de noter que la lignée A188, utilisée comme parent récurrent, n'entraîne pas de taux d'induction résiduel, alors que la plupart des lignées de maïs dites « non-inductrices » sont connues pour avoir des taux d'induction d'haploïdes spontanés proches de 1/1000 (Chase, 1949; Lashermes and Beckert, 1988). Ainsi, sur 4487 plantules analysées, provenant de treize croisements différents de la lignée testeur « glossy » pollinisée par des plantes A188, aucun haploïde n'a été identifié (figure III-2B, tableau III-2). Ces résultats suggèrent donc que la lignée A188 est un fonds génétique plutôt défavorable à l'induction de la gynogenèse *in vivo*. De même, le taux d'induction de grains avortés total de la lignée A188, de 2,76% (n=1266), reste très faible en comparaison à la lignée inductrice PK6 qui a un AIR de 21,44% (n=2328) (tableaux III-1,3, figures III-1C, III-2C, D). Ces informations constituent un point essentiel qui sera à considérer durant l'ensemble de ce projet, puisque la lignée A188, répondant favorablement au processus de transformation génétique, servira de lignée de référence non-inductrice durant l'ensemble de cette partie visant à réaliser la validation fonctionnelle du gène candidat.

	Lignées	Locus *NLD*	Plantes	Grains	Haploïdes	HIR total (%)	HIR moyen (%)
NLD_{-A188} dans PK6	**PK6**	PK6/PK6	11	1696	132	7,78	8,77 ± 3,88
	BC1S1	A188/A188	6	2731	2	0,06	0,06 ± 0,09
		PK6/PK6	10	3038	135	4,44	4,09 ± 2,19
	F2	A188/A188	7	2160	4	0,19	0,19 ± 0,37
		PK6/PK6	36	7647	274	3,58	3,72 ± 2,95
NLD_{-PK6} dans A188	**BC1S1-S2**	A188/A188	5	1439	1	0,07	0,07 ± 0,15
		PK6/PK6	7	1664	31	1,86	1,86 ± 1,87
	BC2S1-S2	A188/A188	2	813	0	0,00	0,00 ± 0,00
		PK6/PK6	11	3375	34	1,01	0,84 ± 0,61
	BC3S1-S2	A188/A188	6	2132	1	0,05	0,04 ± 0,10
		PK6/PK6	6	2673	16	0,60	0,78 ± 0,62
	BC4S1-S2	A188/A188	5	943	1	0,11	0,20 ± 0,44
		PK6/PK6	9	1707	10	0,59	0,62 ± 0,64
	BC5S1-S2	A188/A188	1	738	0	0,00	0,00 ± 0,00
		PK6/PK6	5	1080	8	0,74	0,50 ± 0,63
	A188	A188/A188	13	4487	0	0	0,00 ± 0,00

Tableau III-2 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) des différents rétrocroisements autofécondés présentés dans la figure III-2B. La flèche allant vers le haut représente l'introgression de l'allèle NLD_{-A188} dans le fonds génétique PK6 et celle allant vers le bas l'introgression de l'allèle NLD_{-PK6} dans le fonds génétique A188. Plantes : nombre de plantes-sœurs dont le HIR a été testé pour chaque génotype, Grains : nombre de grains criblés provenant des croisements avec la lignée testeur « glossy », Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées lors des cribles. HIRs totaux : taux calculés sur l'ensemble des grains observés. HIRs moyens : moyenne des HIRs de plusieures plantes-sœurs pour un génotype donné : moyenne ± écart type. Pour avoir des informations complémentaires sur les HIRs des différentes plantes-sœurs de chaque génotype, voir l'annexe III-1.

	Lignées	Locus *NLD*	Plantes	Grains	Avortés	AIR total (%)	AIR moyen (%)
NLD_{-A188} dans PK6	**PK6**	PK6/PK6	10	2328	499	21,44	21,87 ± 6,27
	BC1S1	A188/A188	6	2815	47	1,67	1,80 ± 0,89
		PK6/PK6	9	3678	518	14,08	18,80 ± 9,58
	F2	A188/A188	21	10117	166	1,64	1,85 ± 1,57
		PK6/PK6	27	13969	1790	12,81	13,84 ± 8,18
NLD_{-PK6} dans A188	**BC1S1-S2**	A188/A188	3	1150	29	2,52	2,80 ± 0,39
		PK6/PK6	3	1134	119	10,49	10,62 ± 2,59
	BC2S1-S2	A188/A188	2	1109	13	1,17	1,17 ± 0,07
		PK6/PK6	7	3422	95	2,78	3,96 ± 3,70
	BC3S1-S2	A188/A188	6	2797	32	1,14	0,96 ± 1,39
		PK6/PK6	4	3426	99	2,89	4,31 ± 4,24
	BC4S1-S2	A188/A188	3	731	17	2,33	2,62 ± 1,74
		PK6/PK6	6	2203	111	5,04	6,30 ± 3,75
	BC5S1-S2	A188/A188	2	1582	31	1,96	2,28 ± 2,05
		PK6/PK6	3	905	57	6,30	6,95 ± 1,98
	A188	A188/A188	7	1266	35	2,76	2,24 ± 2,21

Tableau III-3 : Données détaillées des taux d'induction de grains avortés (AIRs) des différents rétrocroisements autofécondés présentés dans la figure III-2C. La flèche allant vers le haut représente l'introgression de l'allèle NLD_{-A188} dans le fonds génétique PK6 et celle allant vers le bas l'introgression de l'allèle NLD_{-PK6} dans le fonds génétique A188. Plantes : nombre de plantes-sœurs dont le AIR a été testé pour chaque génotype, Grains : nombre total de grains criblés provenant des croisements avec la lignée testeur « glossy », Avortés : nombre de grains avortés identifiés lors des cribles. AIRs totaux : taux calculés sur l'ensemble des grains observés. AIRs moyens : moyenne des AIRs de plusieurs plantes-sœurs pour un génotype donné : moyenne ± écart type.

Dans un premier temps, l'analyse des taux d'induction d'haploïdes moyens, correspondant à la moyenne des taux d'induction de plusieurs plantes-sœurs (HIRs moyens) des ségrégants négatifs (*NLD-A188* / *NLD-A188*) et des ségrégants positifs (*NLD-PK6* / *NLD-PK6*) de chaque génération d'introgression, confirme l'implication majeure de la région génomique contenant le locus *NLD* dans le processus de gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Effectivement, les ségrégants négatifs présentent des HIRs moyens très faibles et inférieurs à ceux des ségrégants positifs (figure III-2B, tableau III-2). Par exemple, les plantes BC1S1-A188$^{NLD\text{-}A188}$ (*NLD-A188* / *NLD-A188*) ont un HIR de 0,07 ± 0,15% (n=1439), significativement inférieur à celui des plantes BC1S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ (*NLD-PK6* / *NLD-PK6*) qui est de 1,86 ± 1,87% (n=1664). En revanche, il est intéressant de noter que contrairement à la lignée A188, certaines plantes n'arborant pas la région génomique avec l'allèle *NLD-PK6* présentent tout de même des taux d'induction d'haploïdes résiduels. Pour illustrer, les plantes F2 et BC1S1-A188 arborant l'allèle *NLD-A188* ont des HIRs moyens respectivement de 0,19 ± 0,37% (n=2160) et de 0,07 ± 0,15% (n=1439) (figure III-2B, tableau III-2). Il est alors envisageable que des composantes génétiques provenant de la lignée PK6, favorables à l'induction d'haploïdes soient toujours présentes dans ces lignées. De plus, l'analyse des lignées issues des générations d'introgression suivantes met en évidence une diminution progressive et significative des taux d'induction d'haploïdes au cours des générations, c'est-à-dire en fonction de l'importance de la proportion du génome de A188 dans ces lignées (figure III-2B, tableau III-2). Pour commencer, le HIR moyen des hybrides entre A188 et PK6, autofécondés (F2), contenant l'allèle *NLD-PK6* à l'état homozygote est de seulement 3,64 ± 2,95% (n=7647), contrairement à l'inducteur PK6 qui induit 8,77 ± 3,88% d'haploïdes (n=1696) (figures III-1, III-2B, tableaux III-1,2). Cette tendance à la baisse est largement confirmée par l'analyse des différentes lignées d'introgression contenant l'allèle homozygote *NLD-PK6*. En effet, les plantes BC1S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ induisent 1,86 ± 1,87% d'haploïdes (n=1664) contre seulement 0,84 ± 0,61% (n=3375) pour les plantes BC2S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ et 0,5 ± 0,63% (n=1080) pour les plantes BC5S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$, issues de la dernière génération de rétrocroisements analysée dans cette étude (figure III-2B, tableau III-2). Ces valeurs d'induction d'haploïdes restent cependant significativement plus importantes que le taux d'induction nul de la lignée A188 (figure III.2B, tableau III-2). L'ensemble de ces résultats suggère donc une influence non négligeable du fonds génétique dans l'induction d'haploïdes chez le maïs. Ainsi, en prenant en considération ces observations, il est fortement probable que l'intervalle génétique contenant l'allèle *NLD-PK6* soit nécessaire à la gynogenèse *in vivo* mais ne soit pas suffisant afin d'obtenir des taux d'induction d'haploïdes élevés, suggérant ainsi l'implication d'autres composantes génétiques additionnelles au gène majeur *NLD*, dites modulatrices de l'induction

d'haploïdes. Il est alors envisageable que celles-ci aient été éliminées au cours des différents rétrocroisements dans le fonds génétique A188, défavorable à l'induction. Cette hypothèse peut être confortée par l'observation plus approfondie des taux d'induction d'haploïdes des lignées $F2^{NLD\text{-}PK6}$ et $BC1S1^{NLD\text{-}PK6}$, qui montrent une variabilité importante entre les différentes plantes-sœurs provenant d'un même croisement initial (annexe III-1). Par exemple, plusieurs plantes $F2^{NLD\text{-}PK6}$ ont des HIRs de 0% (W103-2, X1025-59, X1025-93) alors que d'autres ont des HIRs élevés ; entre 8% et 12% (X1024-47, X1024-42, X1024-34, X1025-58), suggérant ainsi que dans une même génération, certaines plantes-soeurs ont des composantes génétiques plus favorables à la gynogenèse *in vivo* que d'autres (annexe III-1). Il serait donc intéressant de sélectionner les plantes ayant les meilleurs HIRs à chaque génération de rétrocroisements afin de conserver les composantes génétiques modulatrices de l'induction et ainsi de créer une lignée isogénique dans le fonds génétique A188, ayant une bonne capacité d'induction d'haploïdes. D'un point de vue validation fonctionnelle, la diminution drastique de l'induction d'haploïdes a constitué une limite dans la comparaison des lignées isogéniques BC5S1, entre les plantes arborant l'allèle $NLD\text{-}_{A188}$ et celles arborant l'allèle $NLD\text{-}_{PK6}$ de par des différences non significatives d'induction d'haploïdes entre les deux catégories (figure III-2B, tableau III-2).

Pour finir sur cette analyse, comme constaté précédemment, les taux d'induction de grains avortés des différentes lignées d'introgression sont proportionnels aux taux d'induction d'haploïdes. En effet, plus les plantes induisent des haploïdes, plus les taux de grains avortés sont élevés (figure III-2C, D, tableau III-3), confirmant ainsi que les deux phénotypes sont très liés et proviennent probablement d'un dysfonctionnement commun lors de la double fécondation.

III.1.2.2 - Introgression de l'allèle $NLD\text{-}_{A188}$ dans le fonds génétique inducteur PK6

Dans le but de contourner la limite apportée par la récalcitrance du fonds génétique A188 à l'induction d'haploïdes et ainsi de conforter l'importance de l'intervalle génomique contenant l'allèle muté $NLD\text{-}_{PK6}$ dans l'induction d'haploïdes, l'introgression de l'allèle *NLD* sauvage, provenant de A188 a été réalisée dans le fonds génétique inducteur PK6. Des rétrocroisements ont donc été réalisés à partir du croisement initial entre les lignées A188 et PK6, présenté dans la partie précédente, mais cette fois-ci avec la lignée PK6 utilisée comme parent récurrent (BC-PK6) (figure III-2A). Ainsi, des différences significatives ont pu être observées entre les taux d'induction moyens (HIRs moyens) des plantes $BC1S1\text{-}PK6^{NLD\text{-}PK6}$ et ceux des plantes $BC1S1\text{-}PK6^{NLD\text{-}A188}$, respectivement de 4,09 ± 2,19% (n=3038) et de 0,06 ± 0,09% (n=2731) (figure III-

2B, tableau III-2). De même, il a été observé des taux de grains avortés moyens (AIRs moyens) de 18,8 ± 9,58% (n=3678) pour les plantes BC1S1-PK6$^{NLD\text{-}PK6}$ contre seulement 1,80 ± 0,89% (n=2815) pour les plantes BC1S1-PK6$^{NLD\text{-}A188}$ (figure III-2C, D, tableau III-3). Ces résultats confortent donc l'implication de la région génomique introgressée contenant l'allèle *NLD-PK6* dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* mais restent à être confirmés par l'analyse des HIRs et des AIRs des générations d'introgression suivantes puisque les lignées BC1S1-PK6$^{NLD\text{-}PK6}$ contiennent encore une part importante du génome de A188. En revanche, il est à considérer que des taux d'induction d'haploïdes résiduels de 0,19 ± 0,37% (n=2160) et de 0,06 ± 0,09% (n=2731) sont observables respectivement avec les plantes F2 et BC1S1-PK6 arborant la région génétique contenant l'allèle *NLD-A188*, indiquant ainsi que la lignée PK6 reste un fonds génétique favorable à l'induction, même en l'absence de la mutation sur le gène *NLD* (figure III-2B, tableau III-2). Il est également intéressant de noter que le HIR moyen des plantes BC1S1-PK6$^{NLD\text{-}PK6}$ n'est pas significativement différent de celui des plantes F2$^{NLD\text{-}PK6}$, suggérant donc la présence de composantes génétiques modulatrices de l'induction d'haploïdes similaires dans ces deux lignées (figure III-2B, tableau III-2). En revanche, des différences significatives sont observables entre les différentes plantes-sœurs BC1S1-PK6$^{NLD\text{-}PK6}$, appuyant ainsi l'influence du fonds génétique dans les populations encore non fixées (annexe III-1). Par conséquent, il est fortement envisageable que des taux d'induction d'haploïdes équivalents à ceux observés chez la lignée inductrice PK6, soient restaurés lors des prochaines générations d'introgression dans le fonds génétique PK6, de par l'apport de composantes génétiques modulatrices de l'induction d'haploïdes complémentaires qui sont initialement absentes dans le fonds génétique A188.

III.1.3 - La présence d'un allèle *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes.

Afin de conclure sur la causalité du gène candidat *NLD* dans l'induction d'haploïdes, deux stratégies de complémentation du phénotype d'induction ont été entreprises. Celles-ci ont consisté à introduire un allèle *NLD* sauvage dans deux fonds génétiques inducteurs différents, arborant l'allèle *NLD-PK6* à l'état homozygote. L'objectif de ces expérimentations était de vérifier que la présence d'un allèle *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur entraînait bien une complémentation du phénotype inducteur lié à la mutation du gène *NLD* et donc une abolition de la capacité d'induction d'haploïdes.

Dans un premier temps, la lignée BC2S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$, issue de l'introgression de l'allèle *NLD-PK6* dans le fonds génétique A188, a été croisée avec la lignée transgénique nommée

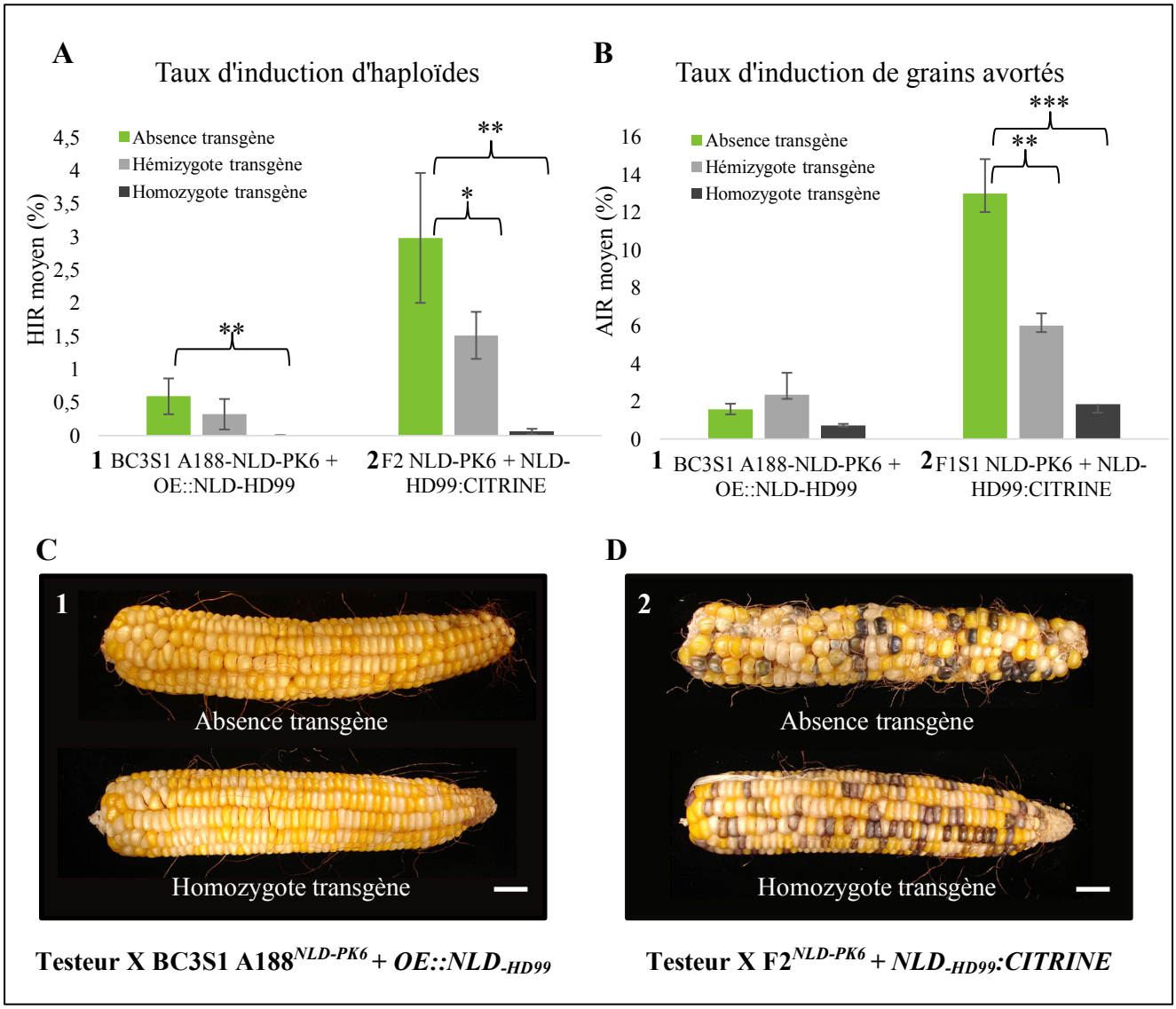


Figure III-3 : La présence d'un allèle *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes. A, B : Les complémentations des phénotypes d'induction d'haploïdes et de grains avortés ont été réalisée dans deux fonds génétiques différents possédant l'allèle NLD_{-PK6} à l'état homozygote : (1) BC3S1 A188$^{NLD-PK6}$ et (2) F2$^{NLD-PK6}$. De plus, deux transgènes possédant l'allèle *NLD* sauvage d'origine HD99 *(*NLD_{-HD99}*)* ont été utilisés : (1) le transgène « *OE::*NLD_{-HD99} » (*pACTIN::*NLD_{-HD99}) et (2) le transgène «NLD_{-HD99}*:CITRINE*» (*pNLD::*NLD_{-HD99}*:CITRINE*). Les histogrammes représentant les taux d'induction moyens **A** : de plantules haploïdes (HIRs moyens) et **B** : de grains avortés (AIRs moyens) identifiés après croisement avec la lignée testeur « glossy ». Barres d'erreur = écarts types. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre deux modalités (*** = p-value <0,001, ** = p-value < 0,01, * = p-value < 0,05; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc). Les données complètes sont représentées dans le tableau III-4. **C, D** : Photos d'épis issus des croisements de la lignée testeur avec des plantes provenant des différentes lignées analysées. Barres d'échelle = 2 cm.

« *OE::NLD-HD99* », exprimant de manière constitutive l'allèle *NLD* sauvage provenant de la lignée HD99 ; *NLD-HD99*, sous contrôle du promoteur issu du gène *ACTIN,* dans le fonds génétique A188. Le BC3-A188 ainsi obtenu a été autofécondé afin de sélectionner dans la descendance des plantes-sœurs BC3S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ (*NLD-PK6 / NLD-PK6*) contenant le transgène à l'état homozygote (ségrégants positifs) et d'autres ne le contenant pas (ségrégants négatifs). Les différentes plantes-sœurs obtenues présenteront relativement peu de variabilité génétique entre elles, justifiant ainsi le choix du fonds génétique BC2S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ dans l'initiation de cette expérimentation. Il est important de mentionner qu'une analyse par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) de l'expression relative de *NLD* dans du pollen mature provenant de la lignée « *OE::NLD-HD99* » a pu confirmer la surexpression de *NLD* en comparaison à la lignée non transformée A188 (figure III-4B).

Les mesures des HIRs et des AIRs moyens des différents ségrégants positifs et négatifs mettent en évidence que la surexpression du gène *NLD* sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes et de grains avortés (figure III-3, tableau III-4). En effet, le HIR moyen des plantes BC3S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ contenant le transgène *OE::NLD-HD99* à l'état homozygote est de 0% (n=2275), ce qui est significativement moins élevé que celui des ségrégants négatifs, ne contenant pas le transgène, de 0,59 ± 0,54% (n=4810), montrant ainsi l'implication de l'allèle *NLD-PK6* dans l'induction d'haploïdes (figure III-3A, tableau III-4). Il est également intéressant de noter que la présence du transgène *OE::NLD-HD99* à l'état hémizygote semble complémenter partiellement le phénotype d'induction d'haploïdes, avec un HIR de 0,32 ± 0,46% (n=3270) chez les plantes concernées, bien que cette valeur ne soit pas significativement différente de celle des ségrégants négatifs (figure III-3A, tableau III-4). Des résultats similaires à ceux observés avec l'analyse des taux d'induction d'haploïdes, ont pu être mis en évidence avec l'analyse des AIRs moyens (figure III-3B, C, tableau III-4). En effet, les plantes BC3S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ ayant le transgène *OE::NLD-HD99* à l'état homozygote induisent significativement moins de grains avortés en comparaison à celles de le contenant pas (figure III-3B, C, tableau III-4). L'ensemble de ces données apporte donc des indications non négligeables quant à l'implication de la mutation du gène *NLD* dans l'induction d'haploïdes. En revanche, de par la forte diminution de la capacité d'induction lors de l'introgression de l'allèle *NLD-PK6* dans le fonds génétique A188 et donc des faibles taux d'induction d'haploïdes de la lignée BC3S1-A188$^{NLD\text{-}PK6}$, les différences entre les HIRs des ségrégants positifs et négatifs sont faibles, bien que significatives.

Afin de contourner cette limite, une seconde expérimentation de complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes a été réalisée en croisant des plantes de la lignée inductrice

Lignées	Locus *NLD*	Plantes	Grains	Haploïdes	HIR total (%)	HIR moyen (%)	Avortés	AIR total (%)	AIR moyen (%)
BC3S1 A188$^{NLD\text{-}PK6}$ + *OE::NLD$_{\text{-}HD99}$* -/-	PK6/PK6	14	4810	23	0,48	0,59 ± 0,54	78	1,62	1,58 ± 0,59
BC3S1 A188$^{NLD\text{-}PK6}$ + *OE::NLD$_{\text{-}HD99}$* +/-	PK6/PK6 + *OE::NLD$_{\text{-}HD99}$* +/-	10	3270	10	0,31	0,32 ± 0,46	48	1,47	2,36 ± 2,30
BC3S1 A188$^{NLD\text{-}PK6}$ + *OE::NLD$_{\text{-}HD99}$* +/+	PK6/PK6 + *OE::NLD$_{\text{-}HD99}$* +/+	5	2275	0	0,00	0,00 ± 0,00	16	0,70	0,73 ± 0,15
F2$^{NLD\text{-}PK6}$ + *NLD$_{\text{-}HD99}$::CITRINE* -/-	PK6/PK6	10	2161	59	2,73	2,98 ± 1,96	269	12,83	13,00 ± 3,64
F2$^{NLD\text{-}PK6}$ + *NLD$_{\text{-}HD99}$::CITRINE* +/-	PK6/PK6 + *NLD$_{\text{-}HD99}$::CITRINE* +/-	4	1482	21	1,42	1,51 ± 0,71	82	6,02	5,67 ± 1,27
F2$^{NLD\text{-}PK6}$ + *NLD$_{\text{-}HD99}$::CITRINE* +/+	PK6/PK6 + NLD$_{\text{-}HD99}$::*CITRINE* +/+	6	4013	4	0,10	0,06 ± 0,08	74	1,84	1,85 ± 0,91

Tableau III-4 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) et de grains avortés (AIRs) des lignées présentées dans la figure III-3. Lignées : BC3S1 A188$^{NLD\text{-}PK6}$ et F2$^{NLD\text{-}PK6}$ contenant le transgène « *NLD$_{\text{-}HD99}$* » à l'état homozygote (+/+), hémizygote (+/-) ou absent (-/-), Plantes : nombre de plantes-sœurs analysées pour chaque génotype, Grains : nombre total de grains criblés provenant des croisements avec la lignée testeur, Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées, Avortés : nombre de grains avortés observés sur les épis criblés. HIRs et AIRs totaux : taux calculés sur l'ensemble des grains observés. HIRs et AIRs moyens : moyenne des taux de plusieurs plantes-sœurs pour un génotype donné : moyenne ± écart type. Pour avoir des informations complémentaires sur les HIRs des différentes plantes-sœurs de chaque lignée, voir l'annexe III-2.

PK6 avec des plantes des lignées translationnelles exprimant le gène *NLD* fusionné au gène rapporteur *CITRINE,* sous contrôle du promoteur endogène de *NLD* (*pNLD::NLD-$_{HD99}$:CITRINE*) dans le fonds génétique A188. L'analyse des HIRs moyens des plantes F2, arborant l'allèle *NLD-$_{PK6}$* à l'état homozygote avec ou non la présence du transgène « *NLD-$_{HD99}$:CITRINE* » a été réalisée. Il a ainsi pu être observé que les plantes F2$^{NLD\text{-}PK6}$ contenant le transgène *NLD-$_{HD99}$:CITRINE* à l'état homozygote induisent seulement 0,06 ± 0,08% d'haploïdes (n=4013), significativement moins que les plantes définies comme ségrégants négatifs, c'est-à-dire sans le trangène, qui induisent 2,98 ± 1,96% d'haploïdes (n=2161) (figure III-3A, D, tableau III-4). Des observations similaires ont pu être réalisées concernant les taux d'induction de grains avortés, puisque les plantes F2$^{NLD\text{-}PK6}$ contenant le transgène à l'état homozygote ont un AIR moyen de 1,85 ± 0,91%, significativement inférieur à celui des plantes sans le transgène, de 13,43 ± 3,64% (figure III-3B, D, tableau III-4).

L'ensemble de ces résultats montre que la présence d'une version sauvage du gène *NLD* dans un fonds génétique inducteur entraîne bien une complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes et de grains avortés. Ils démontrent ainsi que ces deux phénotypes, associés aux lignées dites inductrices d'haploïdes, peuvent s'expliquer par un défaut dans le gène *NLD*, confortant ainsi l'importance de l'allèle *NLD-$_{PK6}$* dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Par ailleurs, ces résultats mettent également en lumière la fonctionnalité de la fusion traductionnelle *pNLD::NLD:CITRINE*, qui constituera un outil de biologie cellulaire majeur dans la suite de ce projet (voir partie III-2.2).

III.1.4 - Influence de la dérégulation de l'expression de *NLD* et de sa perte de fonction dans un fonds génétique sauvage sur l'induction d'haploïdes

Afin d'étudier, par des approches complémentaires, l'implication du gène *NLD* dans le processus d'induction de la gynogenèse *in vivo,* une étude de l'influence de la dérégulation de l'expression de celui-ci ainsi que de sa perte de fonction a été conduite dans un fonds génétique sauvage. L'ensemble des stratégies mises en œuvre ont nécessité des transformations génétiques qui ont été réalisées dans le fonds génétique non-inducteur d'haploïde A188, répondant favorablement au processus de transformation.

Un premier objectif a été de tester l'hypothèse que l'insertion de 4-pb présente dans le dernier exon de *NLD* pourrait conduire à un gain de fonction de la protéine, pouvant potentiellement expliquer le phénotype d'induction d'haploïdes. Au vu des résultats de complémentation décrits dans le paragraphe précédent, il est d'ores et déjà possible de conclure

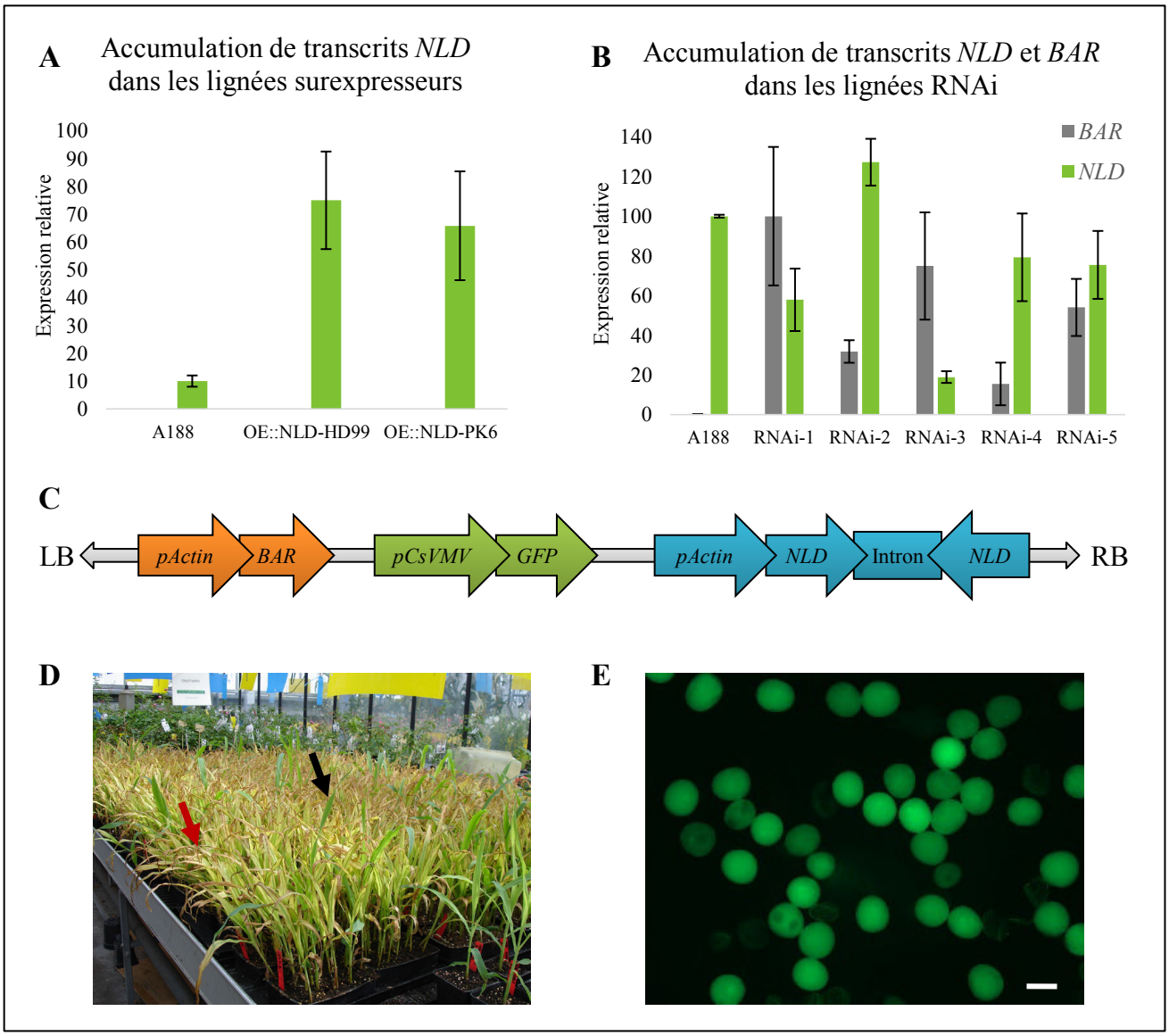


Figure III-4 : Caractérisation des lignées transgéniques dérégulatrices de l'expression de *NLD*.
A, B : Analyse par qRT-PCR du niveau d'accumulation relatif de transcrits *NLD* ; en comparaison au pollen de la lignée non transformée A188, dans du pollen provenant des lignées ; **A**: *OE::NLD*$_{-HD99}$ *(pACTIN::NLD-*$_{HD99}$*)* et *OE::NLD*$_{-PK6}$ *(pACTIN::NLD*$_{-PK6}$*)* sur-exprimant respectivement les allèles *NLD*$_{-HD99}$ (sauvage) et *NLD*$_{-PK6}$ (mutant). **B** : RNAi, ciblant spécifiquement *NLD*. Le niveau relatif d'accumulation de transcrits de *BAR*, le gène de sélection utilisé pour les transformations des plantes, est également présenté dans cet histogramme. Normalisation des données par rapport au gène *ACTIN*. Analyses réalisées sur au moins trois réplicats biologiques de pollen, soit trois événements de transformation différents (*OE::NLD*$_{-HD99}$ et *OE::NLD*$_{-PK6}$) ou trois plantes différentes (A188, RNAi). Barres d'erreur = écart type.
C : Représentation schématique de la cassette utilisée pour la génération des lignées RNAi. La cassette contient le gène *BAR*, de résistance au BASTA sous contrôle du promoteur constitutif *pACTIN* (en orange), le gène *GFP* sous contrôle du promoteur constitutif *pCsVMV* (en vert) et la cassette RNAi-NLD sous contrôle du promoteur *pACTIN* (en bleu). LB = « Left Border », RB = « Right Border ».
D : Photo de plantules provenant de croisements entre la lignée testeur « glossy » et la lignée RNAi-4 homozygote (T2), cinq jours après traitement au BASTA, la majorité des plantules sont sensibles. Flèche noire : exemple de plantule résistante, flèche rouge : exemple de plantule sensible.
E : Photo de grains de pollen provenant de la lignée RNAi-4, homozygote (T3) : 100% des grains est fluorescent. Barre d'échelle = 100 µm.

que la mutation de *NLD* n'induit pas de gain de fonction, mais les deux expérimentations complémentaires ont été conduites en parallèle. Ainsi, une approche de surexpression du gène *NLD* a été entreprise. La lignée A188 a été transformée avec les versions génomiques des allèles provenant de la lignée non-inductrice d'haploïdes HD99 ; *NLD-HD99* (sauvage) et de la lignée inductrice PK6 ; *NLD-PK6* (mutant) sous contrôle du promoteur constitutif fort *ACTIN*. Les lignées sur-exprimant les allèles *NLD-HD99* et *NLD-PK6* ont ainsi été obtenues et nommées respectivement *OE::NLD-HD99* et *OE::NLD-PK6*. L'analyse par qRT-PCR de l'expression relative du gène *NLD* dans du pollen mature provenant de ces lignées (analyse de plusieurs évènements de transformation différents) montre une augmentation significative de l'accumulation relative de transcrits *NLD* en comparaison à la lignée non transformée A188 (figure III-4A). En effet, le niveau de transcrits est sept fois plus élevé chez les lignées *OE::NLD-HD99* et six fois plus chez les lignées *OE::NLD-PK6*, confirmant ainsi la surexpression des deux versions de *NLD* (figure III-4A). La réalisation de croisements de contrôles de la lignée testeur « glossy » avec des plantes issues des générations de transformation T0, contenant les transgènes à l'état hémizygote a permis d'évaluer l'influence des surexpressions de *NLD* sur le caractère d'induction d'haploïdes. Ainsi, sur respectivement les huit et sept événements de transformations analysés pour les lignées *OE::NLD-HD99* et *OE::NLD-PK6*, aucun haploïde n'a pu être identifié, remettant donc fortement en question le caractère de dominance de l'allèle *NLD-PK6* (tableau III-5). Ces résultats ont pu être confirmés par l'analyse de plantes issues des générations T2, contenant les transgènes à l'état homozygote. En effet, il s'avère que les différents événements de transformation obtenus, provenant des deux lignées, n'induisent pas d'haploïde (tableau III-5). Ces résultats laissent envisager que l'insertion de 4-pb présente sur l'allèle *NLD* provenant de PK6 n'est pas suffisante en présence du gène *NLD* sauvage endogène dans A188 afin de conduire à un phénotype d'induction d'haploïdes. L'hypothèse d'un gain de fonction de la putative protéine tronquée peut donc *a priori* être écartée, laissant ainsi envisager une perte de fonction de celle-ci.

En réponse à cette observation, un second objectif a été de diminuer l'accumulation des transcrits *NLD* chez une lignée non-inductrice, en utilisant une approche d'interférence à l'ARN (RNAi). Des constructions ciblant spécifiquement le gène *NLD* ont donc été introduites chez la lignée A188 (figure III-5B, C, tableau III-6), permettant ainsi l'obtention de cinq évènements de transformation différents (RNAi-1 à RNAi-5). L'analyse des HIRs totaux des lignées ainsi générées a révélé qu'aucune d'entre elles n'induisait significativement plus d'haploïdes que la lignée non transformée A188 (tableaux III-2, III-6). Cependant, la lignée RNAi-4 a été analysée plus en détails puisque, initialement, celle-ci semblait présenter un fort biais de ségrégation du transgène (figure III-4D, tableau III-6). Effectivement, le pollen inducteur d'haploïdes étant

Lignées	Générations T0 (hémizygotes)				Génération T2 (homozygotes)			
	Events	Grains	Haploïdes	HIR	Events	Grains	Haploïdes	HIR
OE::NLD$_{-HD99}$	8	904	0	0,00	2	615	0	0,00
OE::NLD$_{-PK6}$	7	1258	0	0,00	3	761	0	0,00

Tableau III-5 : La surexpression des allèles *NLD*, sauvage et mutant, dans un fonds génétique non-inducteur (A188) ne conduit pas à un phénotype d'induction d'haploïdes.
Evaluation des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) de deux lignées transgéniques, *OE::NLD$_{-HD99}$ (pACTIN::NLD-$_{HD99}$)* et *OE::NLD$_{-PK6}$ (pACTIN::NLD$_{-PK6}$)* sur-exprimant respectivement les allèles *NLD$_{-HD99}$* (sauvage) et *NLD$_{-PK6}$* (mutant). Les HIRs présentés sont des taux totaux, calculés sur l'ensemble des grains analysés provenant des croisements de la lignée testeur « glossy » avec des plantes issues des générations de transformation T0 et T2. Events : nombre d'événements de transformation analysés, Grains : nombre total de grains criblés, Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées lors du crible.

Event	Génération T1 (hémizygotes)						Générations T2-T3 (homozygotes)						
	Induction d'haploïdes				BASTA		Induction d'haploïdes				BASTA		pollen GFP
	Epis	Grains	Haplo	HIR	R (%)	S (%)	Epis	Grains	Haplo	HIR	R (%)	S (%)	(%)
RNAi-1	5	510	0	0	53	47	6	875	0	0	100	0	100
RNAi-2	2	203	0	0	52	48	3	681	0	0	100	0	100
RNAi-3	2	201	0	0	51	49	2	392	0	0	100	0	100
RNAi-4	4	1215	1	0,08	4	96	29	6051	1	0,02	3,57	96,43	100
RNAi-5	2	206	0	0	51	49	4	979	1	0,10	100	0	100

Tableau III-6 : La diminution de l'expression de *NLD* dans un fonds génétique non-inducteur (A188) ne conduit pas à un phénotype d'induction d'haploïdes.
Evaluation des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) des différentes lignées RNAi ciblant spécifiquement *NLD*, lors des générations T1 (provenant du croisement des évènements de transformation T0 avec la lignée sauvage A188) (plantes hémizygotes) et T2-T3 (plantes homozygotes). Les HIRs présentés sont des taux totaux, calculés sur l'ensemble des grains, provenant des croisements avec la lignée testeur « glossy ». Les ségrégations du transgène lors des croisements des lignées transgéniques avec la lignée sauvage testeur sont présentées par le pourcentage de plantes résistantes (R) et sensibles (S) au BASTA, les données présentées correspondent aux plantules résultant des croisements « testeurs X RNAi ». Events : nombre d'événements de transformation analysés, Grains : nombre total de grains criblés, Haplo : nombre de plantules haploïdes identifiées lors du crible. Pollen GFP : pourcentage de grains de pollen fluorescents GFP observé chez les plantes RNAi utilisées pour faire les croisements de contrôle. Comparaison des HIRs des différentes lignées avec celui de la lignée non transformée A188 (tableau III-2) : aucune différence significative identifiée (p-value < 0,05; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc).

connu pour être moins compétitif lors de la double fécondation que le pollen non-inducteur, l'étude des biais de ségrégation dans la descendance pouvait donc *a priori* constituer une indication non négligeable quant à la fonctionnalité des lignées RNAi générées (voir partie I.4.3.1). La cassette RNAi utilisée pour les transformations génétiques contient le gène de résistance à l'herbicide BASTA, *BAR*, permettant l'évaluation du biais de ségrégation par l'analyse des taux de résistance des plantules après un traitement au BASTA (figure III-4C, D). De ce fait, l'analyse de la descendance provenant des croisements de la lignée testeur « glossy » avec des plantes de la lignée RNAi-4, contenant le transgène à l'état hémizygote (résultats basés sur une estimation par Q-PCR du nombre de copies du transgène), a été réalisée. Il a ainsi pu être observé parmi les plantules résultant des croisements entre la lignée testeur « glossy » et les plantes RNAi-4 hémizygotes pour le transgène, un pourcentage de résistance au BASTA de seulement 4% à la place des 50% théoriquement attendus dans ce cas de figure et observés pour les autres lignées RNAi (tableau III-6). Ces observations laissaient à suggérer que la lignée RNAi-4 présentait un biais de ségrégation du transgène, pouvant être la conséquence d'une forte répression du gène *NLD*. Néanmoins, l'analyse de la descendance provenant de nouveaux croisements de la lignée testeur avec des plantes RNAi-4, prédites pour être homozygotes pour le transgène, révèle un taux de résistance au BASTA de seulement 3,57% au lieu des 100% théoriquement attendus. Le pollen transgénique n'étant plus en compétition avec du pollen sauvage dans le cas de plantes homozygotes pour le transgène, ces observations laissent à suggérer un problème avec le gène de résistance *BAR* et non un biais de ségrégation relatif à la sous-expression de *NLD*, comme initialement envisagé. Cette hypothèse a pu être confirmée par une analyse par qRT-PCR de l'expression relative des gènes *NLD* et *BAR* dans des plantes RNAi-4 mettant en évidence une sous-expression du gène *BAR*. En effet, le niveau d'accumulation relative de transcrits *BAR* dans cette lignée est entre deux et cinq fois moins important en comparaison aux quatre autres lignées RNAi (figure III-4B). En réponse à cette observation et du fait que la cassette RNAi possède également le gène rapporteur *GFP* (*GREEN FLUORESCENT PROTEIN*), exprimé de manière constitutive et forte grâce au promoteur du gène *Cassava Vein Mosaic Virus* (*pCsVMV*) (figure III-4C), le pourcentage de grains de pollen fluorescents GFP a été évalué dans l'ensemble des lignées RNAi (figure III-4E). Pour la lignée RNAi-4, bien que présentant une sensibilité importante au BASTA, l'ensemble des grains de pollen observés se sont avérés être fluorescents GFP, écartant ainsi les doutes ressortant des études de la résistance au BASTA réalisées en premier lieu, dans la sélection des plantes homozygotes pour le transgène (figure III-4E, tableau III-6). Concernant le niveau d'expression relative du gène endogène *NLD*, les lignées RNAi-1 et RNAi-3 présentent une diminution

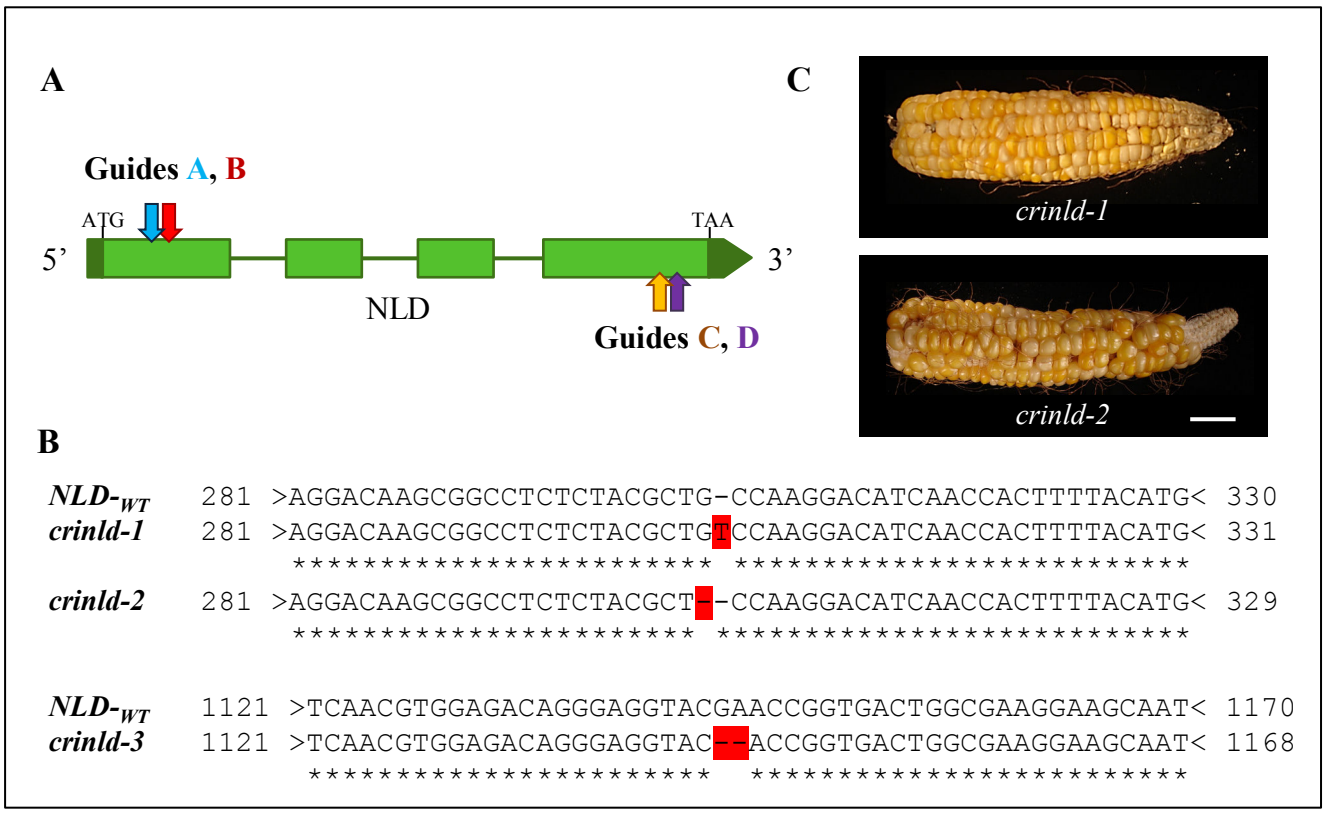


Figure III-5 : Caractérisation des lignées transgéniques CRISPR-NLD.
A : Représentation schématique du positionnement des quatre guides présents dans le construit CRISPR qui ciblent le gène *NLD*. Les rectangles verts représentent les exons et les flèches colorées représentent la position des guides. **B** : Alignements des séquences codantes des différents allèles *NLD* mutants générés par CRISPR : *crinld-1*, *crinld-2* et *crinld-3* avec celle de l'allèle sauvage, au niveau des guides B (en haut) et C (en bas) ; l'allèle *crinld-1* contient une insertion d'une thymine (T) et l'allèle *crinld-2* une délétion d'une guanine (G), respectivement en position 305 et 304, l'allèle *crinld-3* contient les délétions d'une guanine (G) suivie d'une adénine (A) en position 1144 et 1145. **C** : Photos des épis provenant des croisements de la lignée testeur « glossy » avec les lignées *crinld-1* et *crinld-2*.

Lignées	Nb Plantes	Induction haploïdes (HIR)				Induction grains avortés (AIR)			
		Grains	Haploïdes	HIR total	HIR moyen	Grains	Avortés	AIR total	AIR moyen
crinld-1	3	296	5	1,69	1,72 ± 0,61	451	52	11,53	11,53 ± 2,07
crinld-2	4	398	4	1,01	1,28 ± 0,98	546	80	14,65	12,58 ± 3,68
crinld-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau III-7 : Evaluation de l'influence des mutations *crinld* sur l'induction d'haploïdes.
Evaluation des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) et de grains avortés (AIRs) des différentes lignées *crinld* générées contenant les mutations *crinld* à l'état homozygote. Analyse des épis provenant des croisements avec la lignée testeur « glossy ».
HIRs et AIRs totaux : taux calculés sur l'ensemble des grains observés. HIRs et AIRs moyens : moyenne des taux de plusieurs plantes sœurs pour un génotype donné : moyenne ± écart type.
Plantes : nombre de plantes analysées par type de mutation, Grains : nombre total de grains criblés, Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées lors du crible (sur le critère « glossy », la vérification des plantules par génotypage reste à faire), Avortés : nombre de grains avortés observés. ND = Non Disponible. Les deux lignées CRISPR ; *crinld-1* et *crinld-2* induisent significativement plus d'haploïdes que la lignée non transformée, non-inductrices d'haploïdes A188 et significativement moins que la lignée inductrice PK6 (p-value < 0,01 ; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc) (valeurs des HIRs de A188 et de PK6 dans le tableau III-3).

importante de l'accumulation de transcrits *NLD* par rapport à la lignée A188, non transformée (figure III-4B). Seulement, il s'est avéré que ces lignées n'induisaient pas d'haploïde (tableau III-6), probablement parce que la sous-expression de *NLD* est insuffisante afin d'entraîner un phénotype d'induction d'haploïdes.

En vue de contourner ce problème, le troisième objectif de cette étude a été de générer des allèles *NLD* non fonctionnels *via* l'utilisation de la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) - Cas9 (CRISPR associated protein 9). Une cassette, contenant quatre guides différents, ciblant spécifiquement deux régions de la séquence codante de *NLD*, a été introduite chez la lignée A188. Les deux premiers guides ciblent le premier exon du gène dans le but de générer des allèles non fonctionnels (figure III-5A). En revanche, les deux autres guides ciblent le dernier exon de *NLD*, dans la région génomique proche de la zone où la mutation de 4-pb a été découverte chez les lignées inductrices, en vue de mimer cette mutation (figure III-5A). L'analyse des plantes transgéniques T1 obtenues a conduit à l'identification de deux types de mutations homozygotes différentes en région 5' du gène *NLD* (liées à l'activité du guide B) : une insertion d'une thymine (T) et une délétion d'une guanine (G) respectivement en position 305 et 304 de la séquence codante de *NLD*, nommées *crinld-1* et *crinld-2* (figure III-5A, B). Ces deux mutations entraînent l'apparition de codons STOPS en début de séquence du gène qui conduisent à des protéines crinld-1 et crinld-2 prédites tronquées prématurément, ne contenant respectivement que 144 et 130 acides aminés alors que la protéine NLD sauvage contient 429 acides aminés (Annexe III-4). Pour la région 3' du gène *NLD*, une seule mutation a été trouvée et uniquement à l'état hétérozygote (liée à l'activité du guide C) ; *crinld-3*, entraînant une délétion d'une adénine (A) et d'une guanine (G) au niveau des positions 1144 et 1145 de la séquence codante de *NLD* (figure III-5A, B). Cette mutation entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré conduisant à la formation d'une protéine prédite tronquée en partie C-terminale de 398 acides aminés (figure III-5A, B, annexe III-4).

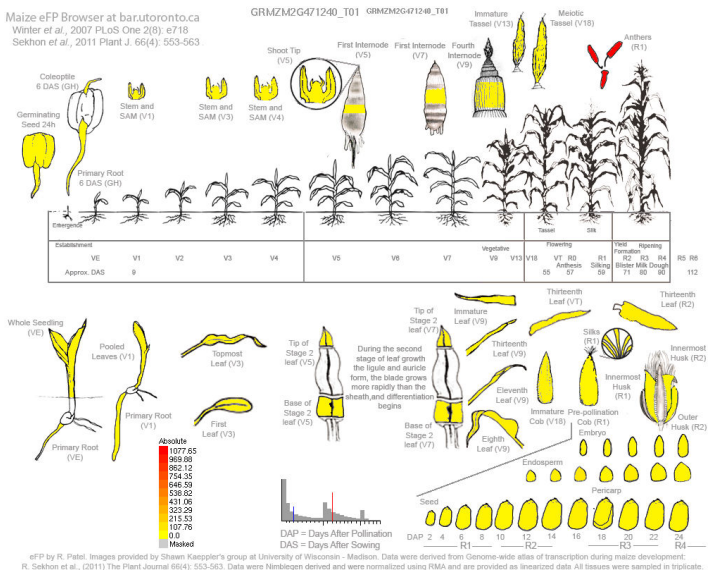
A ce stade du projet, uniquement les analyses des deux lignées homozygotes mutantes pour le gène *NLD*, contenant les allèles *crinld-1* et *crinld-2*, ont été réalisées. La caractérisation de la lignée *crinld-3* est actuellement en cours (génération des plantes homozygotes pour la mutation). Les premiers croisements de contrôle préliminaires réalisés avec la lignée testeur « glossy » utilisée en parent femelle, révèlent que les lignées *crinld-1* et *crinld-2* ont des HIRs moyens putatifs respectivement de 1,72 ± 0,61% (n=296) et de 1,28 ± 0,98% (n=398) (taux basés sur le dénombrement des plantules « glossy ») (tableau III-7), significativement plus que le HIR de 0% (n=4487) de la lignée non transformée A188 (tableau III-3). Bien que des analyses complémentaires restent à faire (vérification des plantules « glossy » par génotypage et cribles

d'effectifs supplémentaires), ces résultats montrent que la non-fonctionnalité de *NLD* entraîne l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Il est cependant intéressant de noter que ces taux d'induction d'haploïdes sont significativement plus faibles en comparaison à la lignée inductrice PK6 (tableau III-3), confortant ainsi l'hypothèse d'une influence non négligeable du fonds génétique dans l'induction d'haploïdes. Il est donc fortement probable que la mutation du gène *NLD* soit nécessaire à la gynogenèse *in vivo* mais ne soit pas suffisante afin d'obtenir des taux d'induction d'haploïdes élevés, suggérant dès lors l'implication d'autres composantes génétiques modulatrices de l'induction. Cependant, le fait d'avoir obtenu avec ces lignées CRIPSR une induction d'haploïdes significative dans le fonds génétique A188, peu favorable à l'induction, constitue une preuve supplémentaire dans la démonstration de l'implication de la mutation de *NLD* dans la gynogenèse *in vivo*.

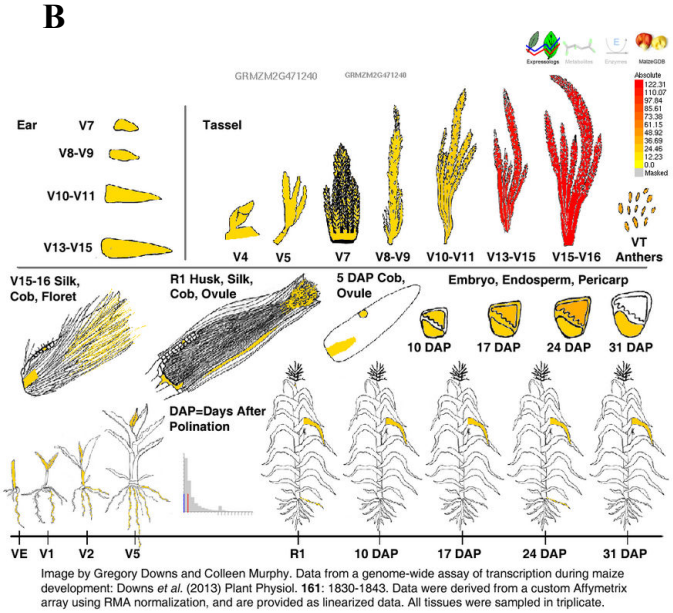
III.1.5 - Conclusion sur la validation fonctionnelle de NLD

Pour conclure sur cette partie validation fonctionnelle, l'implication de l'unique gène candidat *NLD* identifié par la cartographie fine du QTL majeur *ggi1/qhir1* a pu être confirmée et démontrée par différentes approches qui convergent toutes vers la même conclusion. En effet, la complémentation de l'allèle $NLD_{\text{-}PK6}$ avec un allèle *NLD* sauvage entraîne une abolition de la capacité d'induction d'haploïdes chez les lignées inductrices. En parallèle, la mutation de *NLD*, par la technologie CRISPR-Cas9, confère le caractère inducteur d'haploïdes à la lignée non-inductrice, A188. L'ensemble de ces résultats indiquent donc que *NLD* est l'acteur majeur présent sur le QTL *ggi1/qhir1* dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Il est cependant intéressant de noter que le fonds génétique joue également un rôle crucial dans l'induction, comme a pu le montrer l'introgression de l'allèle $NLD_{\text{-}PK6}$ dans le fonds génétique A188, suggérant la présence d'autres composantes génétiques modulatrices de la gynogenèse *in vivo*.

A



B



C

Gènes	Identifiant V3	Expression relative cellules spermatiques
NLD	*GRMZM2G471240*	**0,059**
TUBULIN α	*GRMZM2G153292*	**571,276**

Figure III-6 : Expression relative de *NLD* dans les différents tissus du maïs, d'après les bases de données publiques de transcriptomique.

A, B : Expression relative de *NLD* dans les principaux tissus du maïs. Ces résultats sont extraits des données de transcriptomique avec le navigateur eFP maïs (http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi). Les données proviennent des études de Sekhon *et al.,* (2011) et Downs *et al.,* (2013). D'après ces deux jeux de données, l'expression relative de *NLD* est spécifique des organes reproducteurs mâles (panicules et anthères). **C** : Expression relative des gènes *NLD* et *TUBα* dans les cellules spermatiques. Les gènes sont considérés comme exprimés si l'expression relative est supérieure à 1. Le gène *NLD* n'est donc pas exprimé dans les cellules spermatiques des grains de pollen contrairement au gène *TUBα*. Les données proviennent de l'étude de Chen *et al.,* (2017).

III.2 - Caractérisation moléculaire et cellulaire de *NLD*

III.2.1 - Profil d'expression de *NLD*

La connaissance du profil d'expression d'un gène, dans l'espace et dans le temps, constitue un élément important afin de contribuer à la compréhension de son mode d'action. Une caractérisation du profil d'expression de *NLD* a donc été entreprise en vue de mieux comprendre son rôle dans la double fécondation et dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. Dans un premier temps une étude spatiale de son expression à l'échelle de la plante entière a été réalisée, suivie d'une étude spatiale et temporelle plus détaillée au cours du développement du grain de pollen et durant le processus de double fécondation.

III.2.1.1 - *NLD* est spécifiquement exprimé dans la cellule végétative des grains de pollen mature

L'analyse des bases de données publiques de transcriptomique (Downs *et al.,* 2013; Sekhon *et al.,* 2011) met en évidence une expression de *NLD* spécifiquement dans les organes reproducteurs mâles : les panicules et les anthères (figure III-6A, B). Cette expression semble plus précisément débuter lors des étapes tardives de la maturation de la panicule (figure III-6B). Ces résultats ont pu être confirmés au sein de l'équipe d'accueil par Thomas Widiez, par des analyses qRT-PCR des niveaux d'expression relative de *NLD* (figure III-7). Ces qRT-PCR ont été réalisées à partir d'ARNs provenant de différents tissus de la lignée non-inductrice A188, incluant les organes reproducteurs mâles (panicules) et femelles (épis), les jeunes plantules, les feuilles, les grains et les tiges (figure III-7A). L'expression de *NLD* a ainsi clairement pu être spécifiée à la panicule mature avec un niveau d'accumulation de transcrits *NLD* nettement plus important en comparaison aux autres tissus analysés, apportant ainsi des indications quant au rôle de celui-ci dans la reproduction sexuée du maïs.

Afin de mettre en évidence une éventuelle différence d'expression de *NLD* entre les lignées inductrices et non-inductrices d'haploïdes, une étude comparative a été réalisée par Thomas Widiez du niveau d'accumulation relative de transcrits *NLD* dans les panicules matures provenant des différentes lignées présentées dans la partie III-1, ainsi que de la lignée inductrice Stock6 (à l'origine de l'ensemble des lignées inductrices, voir partie I.4.1). Il a ainsi pu être montré une expression relative de *NLD* d'environ 20% à 30% plus élevée chez les lignées PK6, Stock6, EM1201 et NYS302 en comparaison à la lignée HD99 (figure III-7B). Il est intéressant

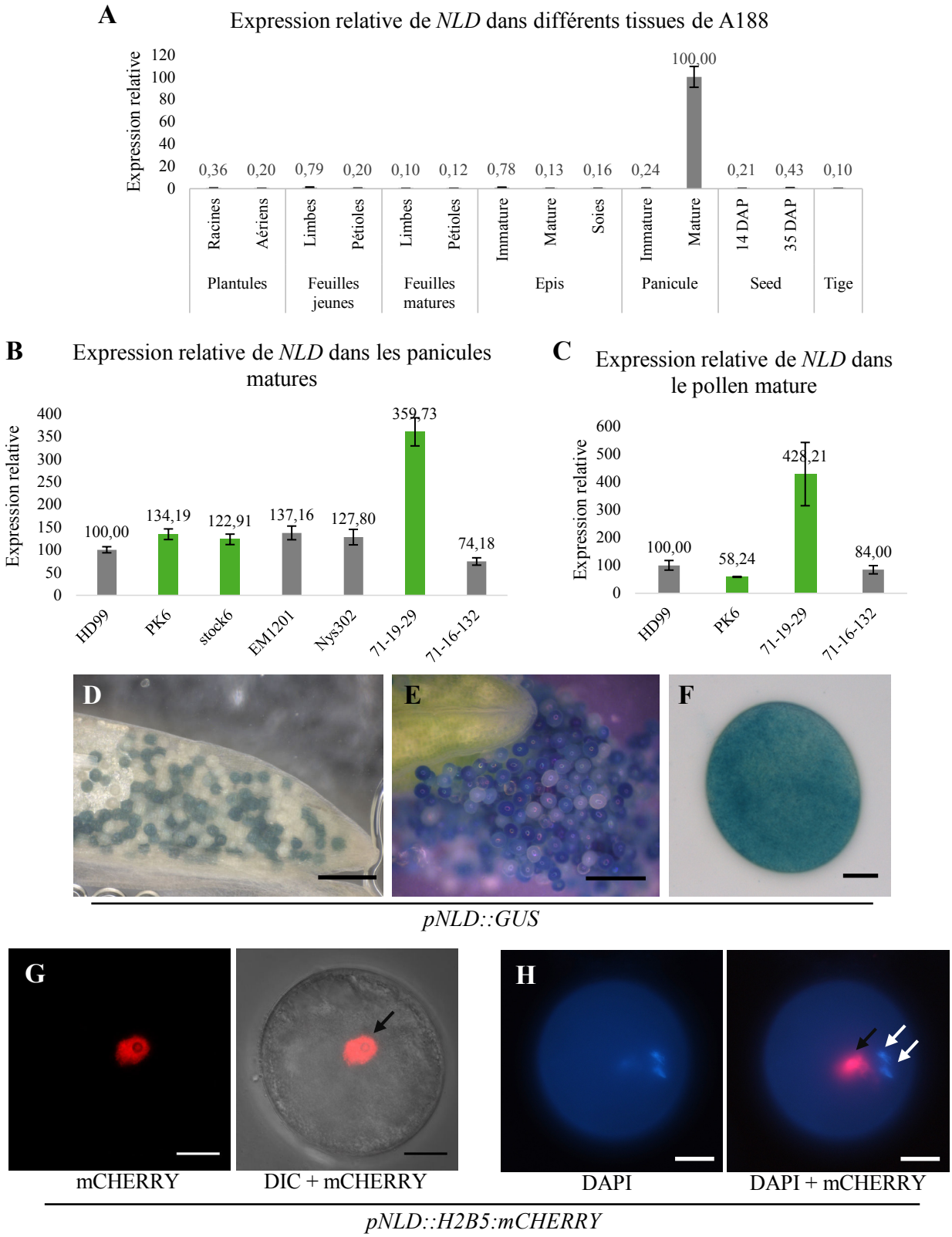


Figure III-7 : *NLD* est exprimé dans la cellule végétative des grains de pollen. A-C : Analyses par qRT-PCR des niveaux d'accumulation relative de transcrits de *NLD* dans **A** : les principaux tissus du maïs (A188), **B** : les panicules matures et **C**: du pollen mature de différentes lignées. Les données sont normalisées par rapport au gène constitutif *ACTIN*. Les valeurs sont des moyennes d'au moins 3 répétitions biologiques, barres d'erreur = écarts types. Les barres des histogrammes en vert correspondent aux valeurs des lignées inductrices d'haploïdes et en gris des lignées non-inductrices. **D-F** : L'analyse histochimique GUS des anthères matures de la lignée *pNLD::GUS* montre une activité du promoteur *pNLD* spécifiquement dans les grains de pollen et non dans les tissus sporophytiques. Observations réalisées avec **D, E** : une loupe binoculaire, barres d'échelle = 500 µm et **F** : un microscope à épifluorescence, barres d'échelle = 20 µm. **G, H** : L'analyse en microscopie **G** : confocale et **H** : à épifluorescence, des grains de pollen matures de la lignée *pNLD::H2B5:mCHERRY* montre une expression du promoteur *pNLD* spécifiquement dans la cellule végétative. Les flèches noires indiquent la position des noyaux végétatifs et les flèches blanches celle des noyaux spermatiques.

de noter la présence d'une expression relative quatre fois plus élevée dans les panicules provenant du recombinant 12-19-29 en comparaison au recombinant 12-16-132 (figure III-7B). Une diminution de 25% de l'accumulation de transcrits *NLD* est également observable chez le recombinant 12-16-132 par rapport à la lignée HD99 (figure III-7B). Pour rappel, le recombinant 12-19-29 contient le début de la séquence de *NLD* provenant de HD99 et le reste de la séquence de PK6, avec l'insertion de 4-pb et sans les gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* alors que le recombinant 12-16-132 contient le début de la séquence de *NLD* d'origine PK6 et reste de la séquence de HD99, sans l'insertion de 4-pb et avec la présence des gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* (figure III-1B). Ces résultats suggèrent donc que des éléments cis-régulateurs importants doivent probablement être présents dans la séquence promotrice de l'allèle $NLD_{\text{-}HD99}$ qui se retrouve absente chez le recombinant 12-19-29. Il est également envisageable que les gènes *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313* aient une implication dans le contrôle de l'expression de *NLD* en association avec la séquence promotrice sauvage, $NLD_{\text{-}HD99}$. L'analyse par qRT-PCR, réalisée durant ce projet de thèse, des accumulations relatives des transcrits *NLD* dans du pollen mature a permis de confirmer les analyses réalisées sur les panicules matures pour les deux recombinants, avec un niveau d'expression relative de *NLD* nettement supérieur chez le recombinant 12-16-29 par rapport au recombinant 12-16-132 (figure III-7C). En revanche, des résultats différents ont été obtenus pour les lignées HD99 et PK6. En effet, contrairement aux résultats observés avec les panicules matures, le niveau d'expression relative de *NLD* est inférieur dans le pollen mature de la lignée PK6 en comparaison à celui de la lignée HD99 (figure III-7B). Ces résultats pourraient être, en partie, expliqués par une différence de maturité du pollen entre les échantillons, puisqu'une expression forte a été mise en évidence à un stade très spécifique du développement des grains de pollen (voir partie III.2.1.2). D'un point de vue global, de par des résultats variés selon les expérimentations, il semble difficile de conclure quant à une différence significative d'expression entre le pollen mature provenant de la lignée inductrice PK6 et celui de la lignée non-inductrice HD99. Cependant, il est intéressant de noter que des travaux réalisés en parallèle à notre étude par l'équipe de Kelliher *et al.,* (2017) sur du pollen mature ont mis en évidence une expression relative significative plus importante chez les lignées inductrices par rapport aux lignées non-inductrices (Kelliher *et al.,* 2017).

Dans le but d'affiner la résolution spatiale de l'expression de *NLD* et ainsi de différencier une expression sporophytique (tissus de l'anthère), d'une expression gamétophytique (grains de pollen, gamètes), des analyses de l'activité de la région promotrice de *NLD* ont été conduites. Pour cela, des lignées transcriptionnelles contenant le gène rapporteur *β-GLUCURONIDASE*

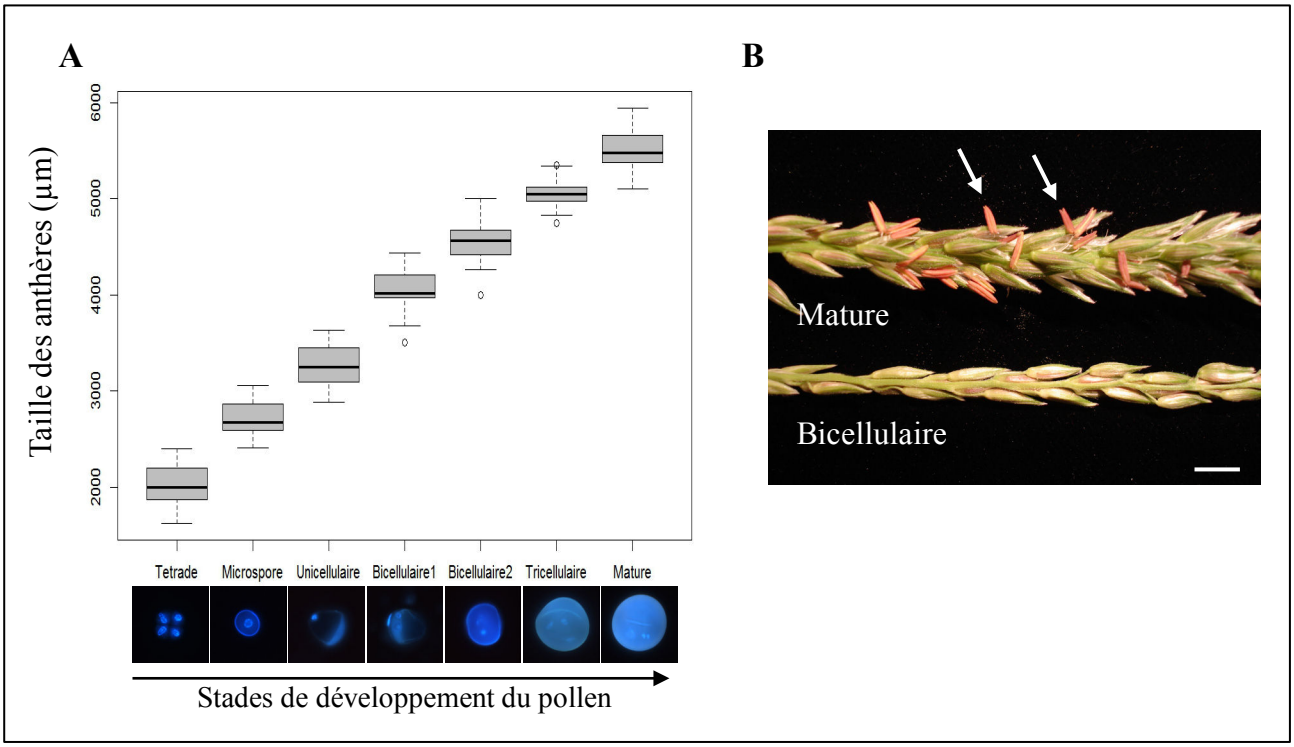


Figure III-8 : Calibration de la taille des anthères en fonction du stade de développement des grains de pollen chez la lignée A188.

A : Calibration de la taille des anthères en fonction des stades de développement du pollen de la lignée A188. Evaluation du stade de développement des grains de pollen par visualisation des noyaux avec une solution DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Les anthères ont été imagées avec une loupe binoculaire et mesurées avec le logiciel ImageJ®. Un stade de développement du pollen est attribué, pour une taille d'anthère donnée, lorsque plus de 80% des grains de pollen contenus dans l'anthère sont à ce stade.
Bicellulaire 1 : stade bicellulaire précoce, bicellulaire 2 : stade bicellulaire tardif (voir partie I-2)

B : Photos de branches secondaires provenant des panicules de la lignée A188, aux stades de développement du pollen bicellulaire (en bas) et mature (en haut), avant et après la déhiscence des anthères (flèches blanches). Barre d'échelle = 500 µm.

(*GUS*), sous contrôle des régions promotrices des gènes *NLD* issus de la lignée B73 (non-inductrice) et de la lignée PK6 (inductrice), ont été générées. Les séquences génomiques de 2,6-Kpb en amont des codons d'initiation de la traduction de *NLD-B73* et de *NLD-PK6*, ont été utilisées comme régions promotrices. L'analyse histochimique de l'expression du gène rapporteur *GUS*, dans les organes reproducteurs mâles a permis de montrer une activité identique des deux promoteurs, provenant de *NLD-B73* et de *NLD-PK6*, spécifiquement dans les grains de pollen matures et non dans les tissus des anthères (figure III-7D-F). Du fait de la diffusion du substrat de la protéine GUS au sein des tissus, l'analyse de ces lignées n'a cependant pas pu permettre de déterminer spécifiquement une expression provenant de la cellule végétative ou des cellules spermatiques dans le grain de pollen tricellulaire. Afin de contourner cette difficulté, des lignées transcriptionnelles contenant le gène rapporteur *mCHERRY* fusionnée à l'histone *H2B5* adressant la protéine aux noyaux, sous contrôle du promoteur *pNLD-B73* ont été analysées (*pNLD::H2B5:mCHERRY*). Il a ainsi pu être montré que le promoteur de *NLD* était spécifiquement actif dans la cellule végétative du grain de pollen et non dans les deux cellules spermatiques (figure III-7G, H). Ces résultats sont en adéquation avec des données publiques de transcriptomique, obtenues sur des gamètes isolés de maïs, qui mettent en évidence une absence de transcrit *NLD* dans les cellules spermatiques (Chen *et al.,* 2017a) (figure III-6C).

III.2.1.2 - L'activité du promoteur *pNLD* débute dans les étapes proches en amont ou en aval de la seconde mitose pollinique

Une étude temporelle de l'activité des régions promotrices des gènes *NLD* sauvage et muté a été réalisée durant l'ensemble du processus de développement du grain de pollen. Pour cela, des anthères provenant des lignées transcriptionnelles *pNLD-B73::GUS* et *pNLD-PK6::GUS* ont été prélevées à différents stades de développement de la panicule et classifiées en fonction de leurs tailles, allant de 2 mm à 6 mm (figure III-8A). Effectivement, la taille des anthères peut être corrélée avec des stades de développement du grain de pollen très précis (Begcy and Dresselhaus, 2017). Cependant, de par une variation importante de celle-ci suivant les lignées de maïs analysées, une caractérisation a dû préalablement être réalisée chez la lignée A188, utilisée pour les transformations génétiques (figure III-8). Les stades de développement des grains de pollen ont été définis grâce à l'utilisation de la coloration DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente capable de se lier aux bases azotées adénines (A) et thymines (T) de l'ADN, permettant ainsi les marquages des noyaux (Schnedl *et al.,* 1977). La caractérisation de l'activité du promoteur *pNLD* a, dans un premier temps, été réalisée aux stades de développement

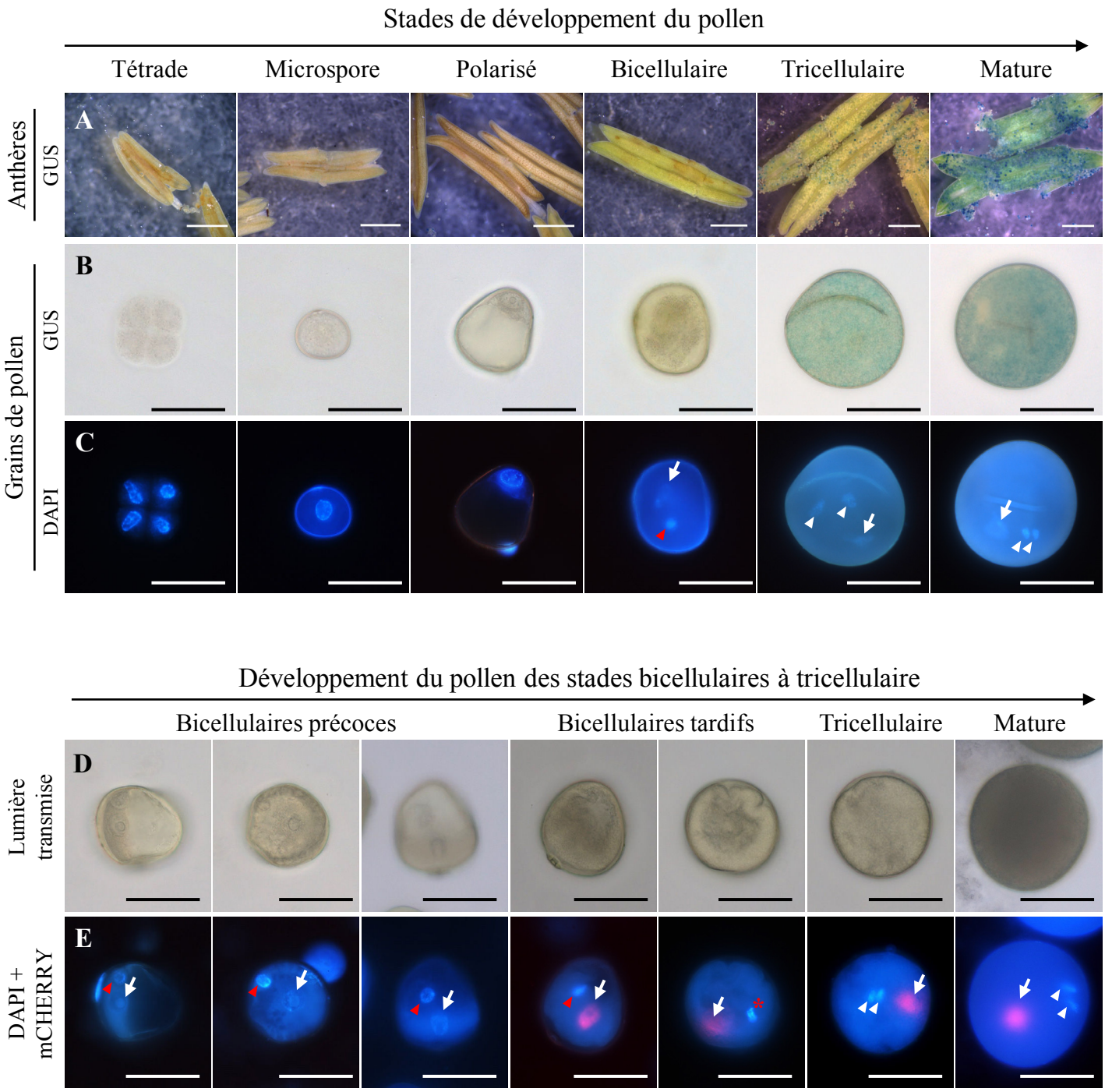


Figure III-9 : L'activité du promoteur *pNLD* débute durant la maturation du grain de pollen, lors de la transition entre les stades bicellulaire et tricellulaire.
Les analyses histochimiques GUS **A** : des anthères, barre d'échelle = 100 µm et **B, C** : des grains de pollen, provenant de la lignée *pNLD::GUS* montre une activité du promoteur *pNLD* qui débute entre les stades de développement bicellulaires et tricellulaires précoces. Ces résultats ont été observés pour les lignées *pNLD*$_{HD99}$*::GUS* et *pNLD*$_{PK6}$*::GUS*. Cette activité a pu être affinée par **D, E** : l'analyse du pollen provenant de la lignée *pNLD::H2B:mCHERRY*, à un instant se situant entre les stades bicellulaire tardif et tricellulaire, probablement lors d'étapes proches (en amont ou en aval) ou durant la seconde mitose des grains de pollen. La détermination des stades de développement du pollen a été réalisée par l'observation avec un microscope à épifluorescence de la fluorescence dans les noyaux colorés avec une solution DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Les flèches blanches indiquent la position des noyaux végétatifs et les rouges celle des noyaux génératifs, les triangles blancs indiquent la position des noyaux spermatiques, l'astérisque (*) rouge indique le putatif déroulement d'une mitose 2. Barres d'échelle = 50 µm.

du pollen « tétrade » (anthères de 2 mm) à « mature » (anthères de 5,5 mm) (figure III-9A-C). Il a ainsi pu être montré que les activités des deux promoteurs ; *pNLD-B73* et *pNLD-PK6* débutaient spécifiquement entre les stades « bicellulaire tardif » et « tricellulaire précoce » (figure III-9B, C ; les données obtenues avec la lignée *pNLD-PK6::GUS* ne sont pas présentées puisqu'elle sont identiques à celles observées avec la lignée *pNLD-B73 ::GUS*) correspondant respectivement à des tailles d'anthères de 4,5 mm et 5 mm (figure III-9A). En revanche, la technique de coloration histochimique GUS, de par la senescence relativement longue du substrat de la protéine GUS (Jefferson *et al.,* 1987), rend difficile la définition précise du stade de commencement de l'activité du promoteur *pNLD*. Dans le but de contourner cette limite, une cinétique de l'activité du promoteur *pNLD* a été entreprise sur des grains de pollen provenant de la lignée *pNLD::H2B5:mCHERRY*. En effet, la protéine fluorescente mCHERRY possède un temps de maturation de seulement 20 à 30 minutes et est facilement traçable par microscopie confocale (Subach *et al.,* 2009). Des grains de pollen ont donc été prélevés à différents stades de développement compris entre les stades « bicellulaire précoce » et « mature » puis ont été observés avec un microscope confocal. Une activité du promoteur *pNLD* a ainsi pu être observée dès le stade bicellulaire tardif, juste avant la séparation des deux cellules spermatiques nouvellement formées, alors qu'aucune fluorescence n'a pu être observée lors des stades bicellulaires précoces (figure III-9D, E). Ces résultats ont permis d'affiner le début de l'activité du promoteur *pNLD* à un stade de développement du pollen coïncidant probablement avec le début ou les étapes proches en amont ou en aval de la seconde mitose pollinique, permettant division de la cellule générative et la différenciation des deux cellules spermatiques matures (figure I-9).

III.2.1.3 - L'activité du promoteur *pNLD* s'arrête après la double fécondation

Dans le but de déterminer temporellement la fin de l'activité du prometteur *pNLD*, des cinétiques de l'activité des promoteurs *pNLD-B73* et *pNLD-PK6* ont été réalisées durant les processus de pollinisation et de double fécondation (figure III-10). Pour cela, des plantes sauvages A188 ont été croisées avec du pollen provenant des lignées transcriptionnelles *pNLD-B73::GUS* et *pNLD-PK6::GUS*. Des tissus femelles sauvages (soies, ovaires, ovules) ont été prélevés à différents temps après pollinisation afin d'évaluer l'activité des promoteurs *pNLD* par une analyse histochimique GUS. Il est à noter que des résultats d'activité similaires ont pu être observés avec les deux promoteurs, *pNLD-B73* et *pNLD-PK6.* Dans un premier temps, il a été constaté que les tubes polliniques atteignaient les sacs embryonnaires entre 15 et 20 heures après

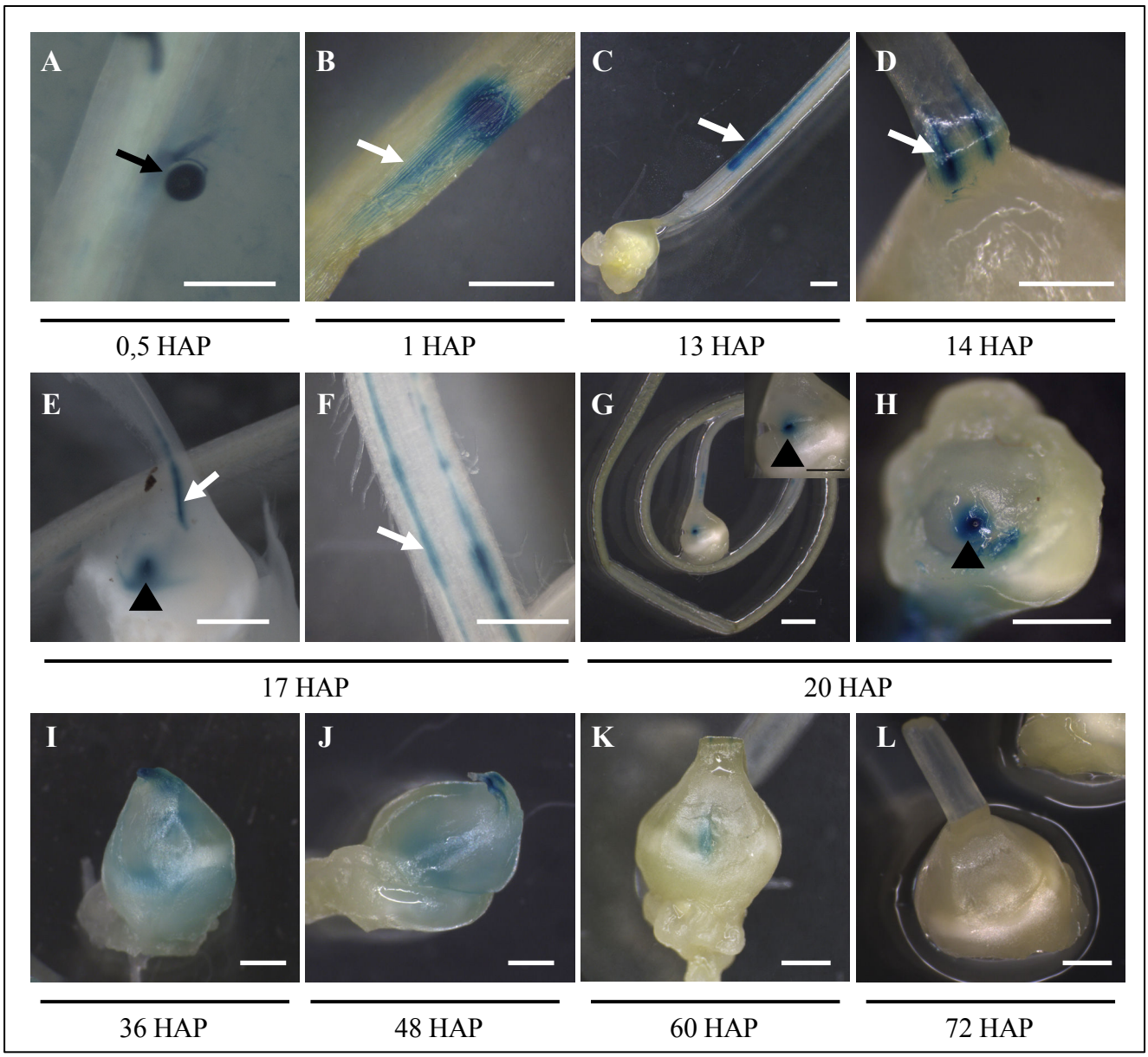


Figure III-10 : L'activité du promoteur *pNLD* n'est plus effective rapidement après la double fécondation.
Analyse histochimique GUS de tissus (soies, ovaires, ovules) provenant d'une femelle A188 à différentes heures après pollinisation (HAP) avec la lignée rapportrice *pNLD::GUS*. Le promoteur *pNLD* est actif de : **A-D** : la germination du grain de pollen (flèche noire) au développement du tube pollinique (flèches blanches) jusqu'à : **E-H** : l'arrivée du tube pollinique dans le sac embryonnaire (triangles noirs) entre 17 HAP et 20 HAP et dans les ovules fécondés jusqu'à : **I-K** : 48 HAP et légèrement 60 HAP. **L** : La coloration GUS n'est plus visible 72 HAP. Ces résultats ont été observés pour les lignées *pNLD*$_{HD99}$*::GUS* et *pNLD*$_{PK6}$*::GUS*. Barres d'échelle = 100 µm.

pollinisation (HAP), avec une observation de la coloration GUS au sein des soies ; dans les voies de transmission à l'interphase entre les soies et l'ovule (figure III-10A-H). Par la suite, cette coloration GUS sera observable au niveau du sac embryonnaire sur une période allant de 20 HAP à 48 HAP, avec encore une légère coloration à 60 HAP, laissant ainsi envisager que le promoteur *pNLD* est actif durant le processus de double fécondation (figure III-10I-K). En revanche, la coloration GUS n'est plus visible 72 HAP (figure III-10L), suggérant que le promoteur *pNLD* n'est plus actif après la double fécondation. Il est cependant important de noter qu'il est impossible de conclure sur le stade précis de la fin de cette activité, de par la sénescence importante du substrat de la protéine GUS qui est supérieure à un jour (Jefferson et al.).

III.2.1.4 - Conclusion sur l'activité du promoteur du gène *NLD*

Pour conclure, cette étude temporelle et spatiale de l'activité des promoteurs des allèles *NLD-$_{B73}$* (version sauvage) et *NLD-$_{PK6}$* (version mutée), a permis d'écarter l'hypothèse d'une différence majeure, entre les lignées inductrices et non-inductrices, au niveau de l'activité des promoteurs. L'induction d'haploïdes ne semble donc pas corrélée avec une différence temporelle et spatiale de l'expression entre les allèles *NLD* sauvage et mutant. En effet, les deux promoteurs ont une activité qui débute spécifiquement lors de la maturation du grain de pollen et qui n'est plus effective rapidement après la double fécondation. Cette plage temporelle d'activité forte et restreinte suggère donc que le gène *NLD* a un rôle très spécifique, lors la maturation et du développement du grain de pollen ou/et lors des étapes en amont de la double fécondation. Cependant, le fait d'avoir une activité du promoteur *pNLD* spécifiquement dans la cellule végétative (figure III-7G, H) favorise l'hypothèse d'un effet sur le développement du grain de pollen et/ou sur sa maturation.

III.2.2 - Etude de la localisation subcellulaire et de l'adressage de NLD

III.2.2.1 - NLD localise au niveau de l'unité mâle germinative du grain de pollen de maïs, probablement dans la membrane interne d'origine végétative (MIV)

Afin d'avoir des informations supplémentaires sur le rôle de *NLD* dans le fonctionnement du grain de pollen, une caractérisation de la localisation subcellulaire de la protéine NLD a été entreprise chez le maïs. Pour cela, des lignées contenant des fusions traductionnelles des gènes provenant de la lignée non-inductrice HD99 (*NLD-$_{HD99}$*) et de la lignée inductrice PK6 (*NLD-$_{PK6}$*) avec le gène rapporteur *CITRINE* et exprimés sous contrôle du promoteur endogène de *NLD*, ont

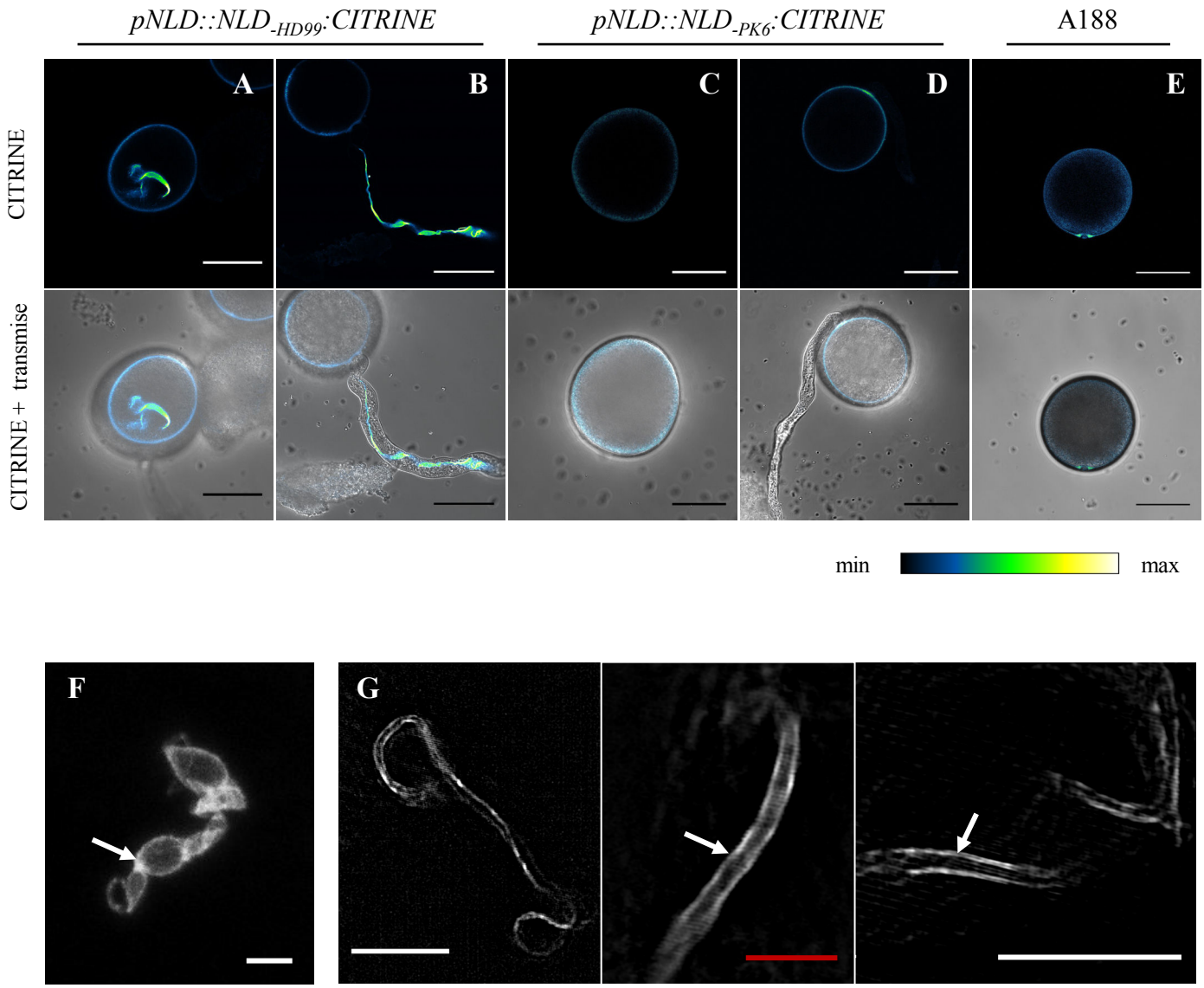


Figure III-11 : Localisation de la protéine NLD au niveau de l'unité mâle germinative (MGU) du grain de pollen de maïs.

A-E : L'Observation au microscope confocal de grains de pollen non germés et germés montre : **A, B** : un signal fluorescent fort au niveau de la MGU dans la lignée *pNLD::NLD*$_{-HD99}$*:CITRINE*, **C, D** : une absence de signal CITRINE et une autofluorescence dans les lignées *pNLD::NLD*$_{-PK6}$*:CITRINE* et **E** : une forte autofluorescence dans le pollen de la lignée non transformée A188, indiquant ainsi que la fluorescence observée avec la protéine tronquée ne correspond probablement pas à du signal spécifique de la CITRINE. Le code couleur indique l'intensité des niveaux de gris des pixels. Conversion des images avec le logiciel ImageJ® en utilisant la LUT (Look-up table) «Green fire blue ». Barres d'échelle = 50 µm.

F, G : MGU de la lignée *pNLD::NLD*$_{-HD99}$*:CITRINE* observée en microscopie **F** : confocale (projection Z), le grain de pollen est éclaté suite à un choc osmotique, **G** : à haute résolution (SIM, Structured Illuminated Microscopy) (projection Z). Un signal fluorescent est observable au niveau périphérique de la MGU (flèches blanches). Barres d'échelle : blanches = 10 µm, rouges = 5 µm.

été générées et nommées respectivement ; *pNLD::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* et *pNLD::NLD-$_{PK6}$:CITRINE*. De manière surprenante, en regard de l'activité du promoteur *pNLD* dans la cellule végétative, l'observation au microscope confocal de grains de pollen, matures et germés, provenant de la lignée *pNLD::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* a montré une accumulation de la protéine NLD sauvage au niveau de l'unité mâle germinative (Male Germ Unit, MGU) (figure III-11A, B, F). Pour rappel, la MGU est une structure complexe du grain de pollen, composée des deux cellules spermatiques englobées dans une membrane plasmique particulière d'origine végétative, la MIV (Membrane Interne Végétative) et reliées au noyau végétatif (voir partie I.2.3.1). En revanche, aucun signal fluorescent au niveau de la MGU, mais uniquement le signal correspondant à l'autofluorescence des grains de pollen, n'a pu être observé avec l'analyse de la lignée *pNLD::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* (figure III-11C, D). Il est à noter que le pollen de maïs provenant de la lignée non transformée A188 présente également de la fluorescence au niveau de la paroi du pollen (figure III-11E), indiquant que celle observée dans le pollen des lignées *pNLD::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* correspond bien à un signal d'autofluorescence. Par conséquent, il est fortement envisageable que la protéine NLD-$_{PK6}$ soit devenue instable de par la troncation de sa partie C-terminale, conduisant ainsi à sa dégradation rapide. Cette hypothèse peut être appuyée par les résultats obtenus lors de l'analyse biochimique du pollen mature provenant de la lignée *pNLD::NLD-$_{PK6}$:CITRINE*. Ces résultats seront présentés plus en détails dans la partie III-4 « Recherche des interactants protéiques de NLD ». En effet, après la réalisation d'une immunoprécipitation (IP) de la protéine fusionnée NLD:CITRINE *via* l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GFP, une protéine ayant une séquence protéique proche de celle de la CITRINE, une accumulation de la protéine tronquée NLD-$_{PK6}$ a pu être identifiée par la réalisation d'un western blot avec un autre anticorps anti-GFP, confirmant ainsi sa présence dans les grains de pollen (figure III-27B). En revanche, son accumulation semble insuffisante pour permettre son observation en microscopie confocale.

De par un fort ratio du volume nucléaire sur le volume cytoplasmique dans les cellules spermatiques, une caractérisation précise de la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MGU n'a pas pu être possible par microscopie confocale conventionnelle. Afin de contourner cette limite, des grains de pollen provenant de la lignée *pNLD::NLD:CITRINE* ont été observés avec un microscope à haute résolution en utilisant la technologie SIM (Structured Illumination Microscopy). Il a ainsi pu être observé une accumulation de la protéine NLD à la périphérie de la MGU, probablement au niveau de la MIV et non à l'intérieur du cytoplasme des cellules spermatiques (figure III-11G). Il est intéressant de rappeler que les cellules spermatiques sont des cellules à part entière avec leur propre membrane plasmique, le tout enveloppé d'une autre

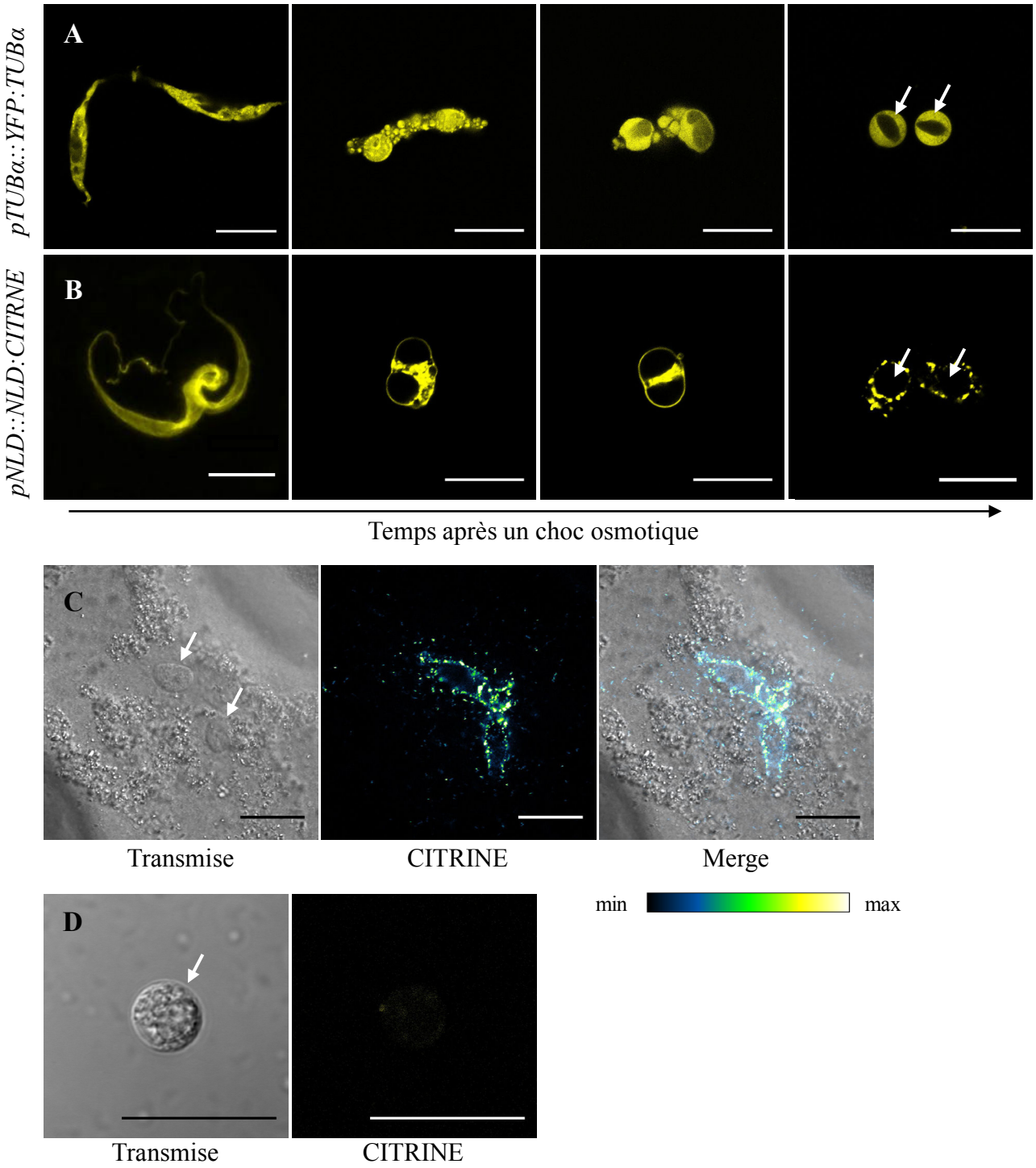


Figure III-12 : NLD ne localise pas au niveau des cellules spermatiques mais en périphérie de la MGU. A-C : La réalisation d'un choc osmotique sur du pollen mature permet de mettre en évidence : **A** : une conservation du signal fluorescent dans les cellules spermatiques avec la lignée *pTUBα::YFP:TUBα*, dont l'expression est caractérisée comme spécifique des cellules spermatiques dans le grain de pollen (Kliwer et Dresselhaus, 2010), **B** : Une perte progressive de la fluorescence, corrélée avec la dissociation de la MGU est observable avec la lignée *pNLD::NLD:CITRINE*. Aucun signal fluorescent n'est observable dans le cytoplasme des cellules spermatiques. La 4ème image du panel en partant de la gauche est un montage de deux photos de cellules spermatiques provenant de la même MGU. **C, D** : Observation de la lignée *pNLD::NLD:CITRINE*. **C** : MGU isolé après un choc osmotique sur du pollen, en cours de dissociation. Conversion des images avec le logiciel ImageJ ® en utilisant la LUT (Look-up table) «Green fire blue ». **D** : Cellule spermatique après isolement avec un gradient de Percoll, aucun signal fluorescent CITRINE n'est observable. Les flèches blanches indiquent le positionnement des cellules spermatiques isolées. Barres d'échelle = 20 µm.

membrane particulière, la MIV qui est quant à elle d'origine végétative (figure I-11). L'ensemble nommé la MGU est donc composé de deux membranes très proches physiquement mais qui sont de deux origines différentes ; spermatique et végétative. L'analyse de grains de pollen par microscopie, même à haute résolution, ne rend pas possible la différenciation de la localisation subcellulaire de NLD dans l'une ou dans l'autre de ces membranes. Cependant, le fait d'avoir observé la production de transcrits *NLD* dans la cellule végétative (voir partie III.2.1.1, figure III-7G, H), laisse à supposer une localisation de la protéine au niveau de la MIV, d'origine végétative. Dans le but de répondre à cette question, un protocole d'isolement des cellules spermatiques, basé sur l'utilisation d'un choc osmotique déstructurant la MGU a été développé. Une lignée translationnelle exprimant le gène *TUBULIN ALPHA* (*TUBα)* fusionné au gène rapporteur *YFP* (*pTUBα::YFP:TUBα)* spécifiquement dans les cellules spermatiques et non dans la cellule végétative au sein du grain de pollen, a été utilisée en tant que contrôle de cette expérimentation (Kliwer and Dresselhaus, 2010). Les cellules spermatiques provenant de ces lignées présentent, après leur isolement, un signal fluorescent dans le cytosol (figure III-10A). En revanche, l'application de ce même choc osmotique sur du pollen provenant des lignées *pNLD::NLD:CITRINE* entraîne une perte progressive du signal fluorescent, qui va se retrouver dans un premier temps à l'extérieur des cellules spermatiques, corrélée avec la dissociation du complexe MGU (figure III-12B, C). Bien qu'une démonstration concrète reste à faire, il est fort probable que NLD soit adressée à la MIV et que la dégradation de cette membrane lors du choc osmotique entraîne la perte de fluorescence. Après leur libération, les deux cellules spermatiques ne présentent donc pas de signal fluorescent dans leur cytoplasme (figure III-12B, C). Ces observations ont pu être confirmées par une approche différente et complémentaire d'isolement des cellules spermatiques, basée sur l'utilisation de gradients de Percoll (Dupuis *et al.,* 1987). Cette méthode permet une augmentation de la pureté des isolements et de la densité en cellules spermatiques obtenues. Il a ainsi pu être mis en évidence une absence totale de signal fluorescent au niveau des cellules spermatiques isolées provenant de la lignée *pNLD::NLD:CITRINE* (figure III-12D), confirmant donc que le signal fluorescent observé dans la MGU ne provient pas des cellules spermatiques. L'ensemble de ces observations concordent avec une localisation subcellulaire de la protéine NLD au niveau de la membrane extérieure de la MGU et intérieur à la cellule végétative ; la MIV, d'origine végétative, et non au niveau de la membrane plasmique des cellules spermatiques. Une expérimentation d'immunomarquage avec des billes d'or couplées à un anticorps dirigé contre la GFP est également en cours de réalisation afin de conclure définitivement sur la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MGU (MIV ou membrane plasmique des cellules spermatiques). En revanche, de par l'ensemble des données

déjà recueillies allant dans le sens de l'hypothèse d'une localisation subcellulaire au niveau de la MIV, celle-ci sera considérée comme l'hypothèse de référence dans la suite de cette partie III.

L'ensemble de ces résultats sont particulièrement intéressants compte tenu du fait que le gène *NLD* est exprimé dans la cellule végétative (figure III-7G, H) et qu'aucun signal fluorescent n'a pu être observé au niveau de la membrane plasmique de la cellule végétative des grains de pollen (figure III-11A, B). Ces observations mettent en évidence un adressage particulier de NLD au niveau de la MIV, qui semble avoir une signature membranaire spécifique et différente de celle de la membrane plasmique de la cellule végétative, favorisant probablement une affinité avec la protéine NLD.

III.2.2.2 - Conservation de la localisation subcellulaire de NLD dans le système hétérologue, *A.thaliana*

Dans le but de vérifier si la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MGU était conservée entre deux espèces, les deux versions de la protéine ; de type sauvage provenant de HD99 et de type mutante provenant de PK6, respectivement notées NLD-$_{HD99}$ et NLD-$_{PK6}$, ont été étudiés dans un système hétérologue ; l'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) (figure III-13). Cette espèce modèle permet, en comparaison au maïs, une caractérisation plus approfondie de la localisation subcellulaire de par une réduction significative des temps de génération des lignées transgéniques et une facilité d'obtention et de gestion du matériel biologique. Des fusions translationnelles des deux versions du gène *NLD* ; *NLD-$_{HD99}$* et *NLD-$_{PK6}$*, fusionnées en 5' au gène rapporteur *CITRINE*, ont donc été exprimées sous contrôle du promoteur ubiquitaire, *UBIQUITIN10 (pUB10),* dans l'écotype sauvage Columbia-0 (Col-0) afin de générer les lignées *pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* et *pUB10::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* (figure III-13).

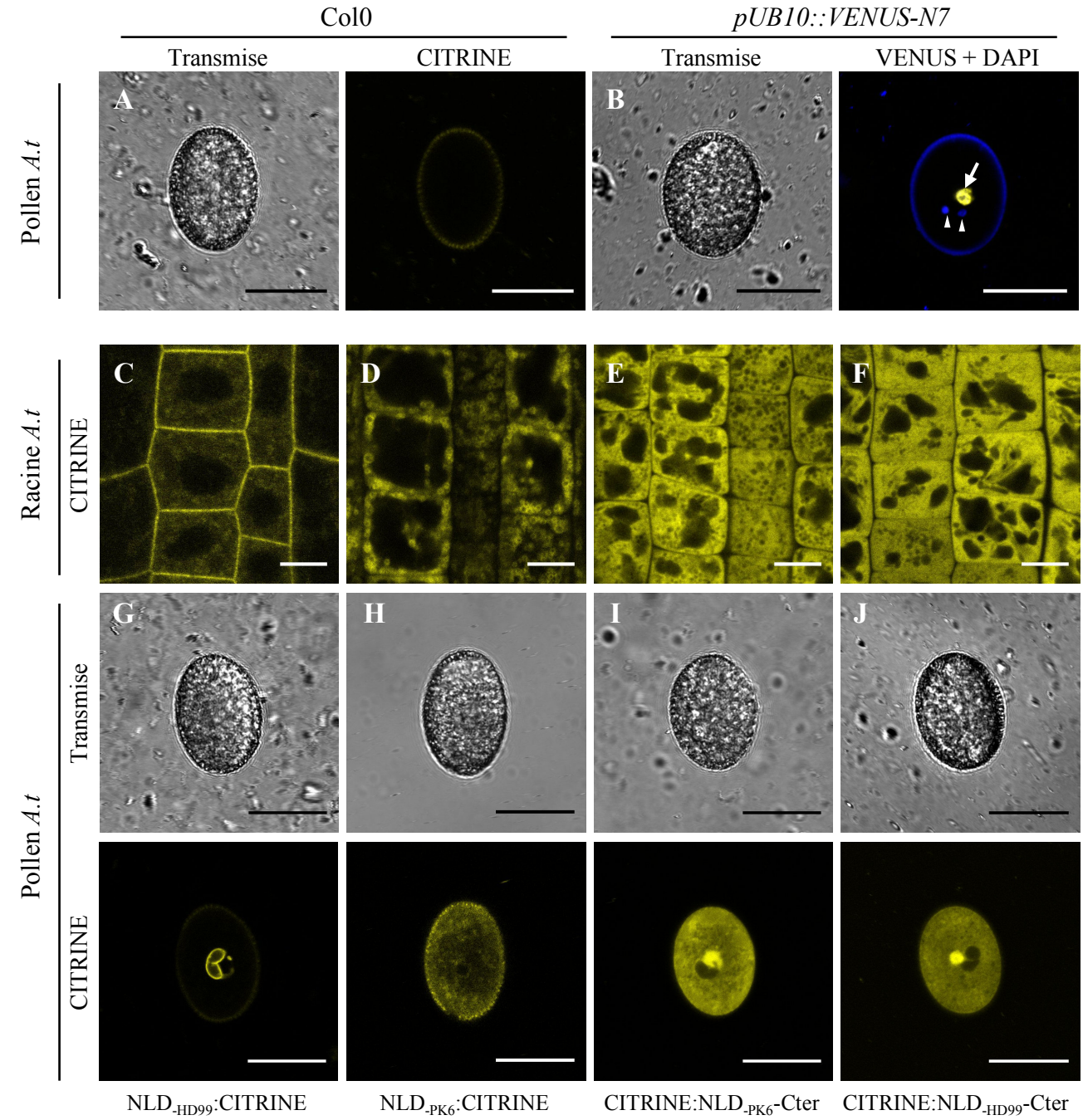
Avant l'étude approfondie de ces lignées, la caractérisation du territoire d'activité du promoteur *pUB10* dans le grain de pollen, a été réalisée afin de s'assurer que celui-ci était bien actif spécifiquement dans la cellule végétative et non dans les cellules spermatiques. En effet, il est plus intéressant de travailler avec un promoteur ayant un profil d'activité se rapprochant de celui du promoteur *pNLD* dans le pollen de maïs (figure III-7G, H). Une activité du promoteur *pUB10* dans les cellules spermatiques limiterait les conclusions possibles quant à l'hypothèse de la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MIV dans le modèle *A.thaliana*, puisque celle-ci pourrait également se situer au niveau de la membrane plasmique des cellules spermatiques. Pour cela, des lignées transcriptionnelles *pUB10::VENUS-N7* (données par Géraldine BRUNOUD en interne) contenant le gène rapporteur *VENUS*, fusionné au domaine

A.thaliana. La membrane externe de la MGU, la MIV doit très certainement avoir une signature spécifique et différente de celle de la membrane plasmique de la cellule végétative, en dépit du fait qu'elles possèdent toutes deux la même origine végétative. L'affinité de NLD avec la MIV doit donc être supérieure à celle qu'elle a avec la membrane plasmique de la cellule végétative.

III.2.2.3 - Localisation subcellulaire de NLD dans les cellules racinaires d'*A.thaliana* : la troncation de NLD est corrélée avec une perte de l'adressage à la membrane plasmique

Les apex racinaires constituent des modèles biologiques intéressants et simples d'observation de par la présence d'une zone de différenciation cellulaire majeure permettant ainsi l'observation de jeunes cellules avec un rapport vacuole sur cytoplasme faible. De plus, en comparaison au pollen, l'observation d'apex racinaires permet de travailler sur des jeunes plantules, sans attendre la maturation des plantes, rendant temporellement ce système intéressant. Ainsi, dans le but de caractériser l'influence de la troncation de la protéine NLD sur sa localisation subcellulaire et son adressage, des observations au microscope confocal d'apex racinaires provenant des plantules *pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* et *pUB10::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* ont été réalisées (figure III-13A, B). Ces observations sont rendues possibles en raison de l'activité du promoteur *pUB10* dans les cellules racinaires (Simon *et al.,* 2016).

Les observations d'apex racinaires ont ainsi permis de mettre en évidence une localisation subcellulaire de la protéine sauvage très marquée au niveau de la membrane plasmique des cellules et dans la moindre mesure au niveau de compartiments endomembranaires et dans le cytoplasme (figure III-13A). En revanche, un signal fluorescent a été uniquement observé dans les compartiments endomembranaires et dans le cytoplasme avec la protéine mutante (figure III-13B), suggérant ainsi que la troncation de NLD conduit à une délocalisation partielle de la protéine de la membrane plasmique vers le cytoplasme. Ces résultats ont été confirmés par des quantifications de l'intensité du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique des cellules racinaires des deux lignées traductionnelles (figure III-13J). En effet, le ratio IFMP/IFC de l'intensité du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique (IFMP) sur l'intensité du signal fluorescent au niveau du cytoplasme (IFC) est de 2,71 (n=340) pour les lignées *pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE*, alors qu'il n'est que de 0,71 (n=303) pour les lignées *pUB10::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* (figure III-13J). Il est à noter qu'un ratio de 1 indique une intensité de fluorescence à la membrane plasmique équivalente à une intensité de fluorescence dans le



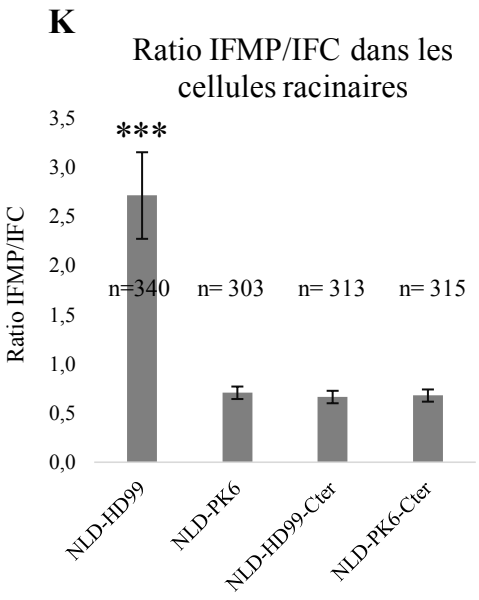


Figure III-13 : La troncation de NLD entraîne une délocalisation de la protéine dans le système hétérologue *A.thaliana* (*A.t*). Observations au microscope confocal du pollen des lignées **A** : non transformée columbia0 (col0), **B** : *pUB10::VENUS-N7* afin de caractériser le profil d'expression du promoteur *pUB10*. Le marquage des noyaux des cellules spermatiques a été réalisé par traitement du pollen avec une solution DAPI. Un signal fluorescent VENUS est spécifiquement observé dans le noyau végétatif (flèche blanche) et non dans les noyaux spermatiques (triangles blancs). **C-J** : Analyse des lignées *pUB10::NLD:CITRINE* par des observations au microscope confocal **C-F** : d'apex racinaires et **G-J** : de grains de pollen. **K** : Ratio IFPM/IFC dans les cellules racinaires : intensité de la fluorescence à la membrane plasmique (IFMP) / intensité de la fluorescence dans le cytoplasme (IFC). Evaluation de l'intensité par l'analyse des niveaux de gris moyens avec le logiciel imageJ ®. Les résultats proviennent de l'analyse de 5 lignées indépendantes par construction, n = nombre de cellules quantifiées. Les astérisques (***) montrent une différence significative (p-value < 0,001 ; Test de Wilcoxon). Barres d'échelle : racines = 10 µm, pollens = 20 µm.

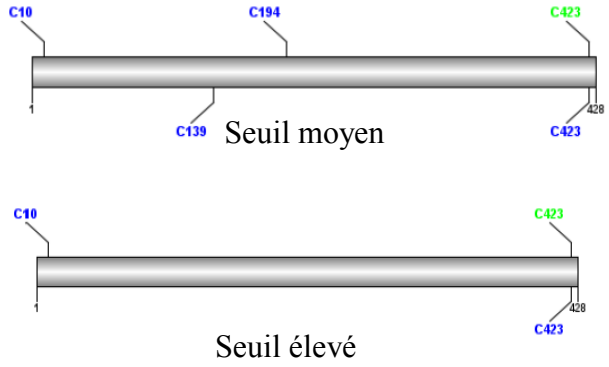
N7 permettant un adressage spécifique aux noyaux, sous contrôle du promoteur *pUB10*, ont été analysées. Un signal fluorescent VENUS a ainsi pu être observé strictement au niveau du noyau végétatif (figure III-13B), permettant ainsi de réfuter l'activité du promoteur *pUB10* dans les cellules spermatiques. Ainsi, le promoteur *pUB10* est un outil de choix pour l'analyse de la localisation subcellulaire de NLD dans le système hétérologue *A.thaliana*, puisqu'il est spécifique de la cellule végétative (dans le contexte grain de pollen), à l'image de l'activité du promoteur *pNLD* dans les grains de pollen de maïs (figure III-7G, H).

Après s'être assuré que le promoteur *pUB10* était bien actif spécifiquement dans la cellule végétative, des grains de pollen provenant des lignées translationnelles *pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* et *pUB10::NLD-$_{PK6}$:CITRINE* ont été observés avec un microscope confocal afin de caractériser les localisations subcellulaires des protéines NLD, entière et tronquée, dans le système hétérologue *A.thaliana*. Dans un premier temps, il est intéressant de remarquer qu'un signal fluorescent correspondant à de l'autofluorescence de la paroi du grain de pollen est observable dans le pollen de la lignée non transformée Col-0 (figure III-13A). Ce type de signal, très caractéristique, sera souvent observable dans la suite de cette analyse dans les grains de pollen des différentes lignées étudiées et ne sera donc pas pris en considération.

Les résultats ainsi obtenus sont en parfaite adéquation avec ceux observés chez le modèle maïs puisque la protéine NLD sauvage est spécifiquement localisée au niveau de la MGU et non dans d'autres compartiments cellulaires des grains de pollen (figure III-13G). En revanche, similairement aux observations chez le maïs, uniquement un faible signal fluorescent (de par la nécessité d'augmenter les paramètres d'acquisition d'image, incluant la puissance du laser et le gain optique) est observable dans le cytoplasme de la cellule végétative avec la protéine tronquée (figure III-13H), probablement en raison d'une dégradation de celle-ci, due à son instabilité au sein de la cellule. La protéine NLD entière est très certainement, comme chez le maïs, adressée au niveau de la MIV puisque le promoteur *pUB10* n'est pas actif dans les cellules spermatiques, même s'il est difficile de conclure avec la microscopie confocale conventionnelle, de par la complexité structurale de la MGU. Il serait donc intéressant de mettre en place en protocole d'isolement des cellules spermatiques chez *A.thaliana* afin de confirmer la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MIV, d'origine végétative. Une expérimentation d'immunomarquage, similaire à celle mise en place chez les lignées de maïs *pNLD::NLD-$_{HD99}$:CITRINE,* est également en cours de réalisation afin de conclure sur la localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MIV dans le système hétérologue *A.thaliana*.

Pour conclure, l'ensemble de ces observations indiquent que la localisation subcellulaire de la protéine NLD au niveau de la MGU est très conservée entre les deux espèces *Z.mays* et

A



B

>NLD: GRMZM2G471240
MA**SYSSRRPCNTCSTK**AMAGSVVGEPVVLGQRVTVLTV
DGGGVRGLIPGTILAFLEARLQELDGPEARLADYFDYI
AGTSTGGLITAMLTAPGKDKRPLYAAKDINHFYMQNCP
RIFPQKSRLAAAMSALR**KPKYNGKCMRSLIR**SILGETR
VSETLTNVIIPAFDIRLLQPIIFSTYDAKSTPLK**NALL**
SDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTEDANGKEREYNLIDGGV
AANNPTMVAMTQITKKMLASKDKAEELYPVKPSNCRRF
LVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWLRNNGMAPI
IDIFMAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLR
GAAATVDAATPENMRTLVGIGERMLAQRVSRVNVETGR
YEPVTGEGSNADALGGLARQLSEERRTRLARRVSA**INP**
RGSRCASYDI

C

Position	Peptide	Score	Cutoff	Prédiction
10	SYSSRRPCNTCSTKA	3.817	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
139	KPKYNGKCMRSLIRS	1.318	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A
194	NALLSDVCIGTSAAP	2.524	2.293	S-Palmitoylation: Cluster B
423	INPRGSRCASYDI**	5.806	1.079	S-Palmitoylation: Cluster A
423	INPRGSRCASYDI**	12.801	3.71	S-Farnesylation: Non-consensus

D

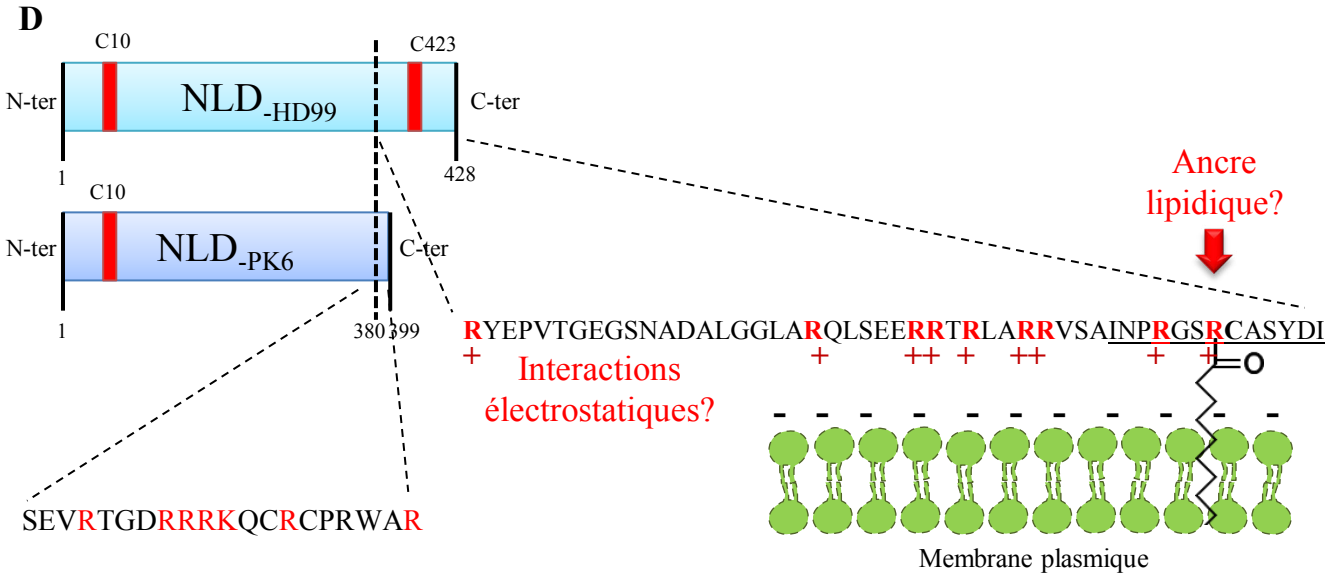


Figure III-14 : Analyse *in silico* de la protéine NLD.
Mise en évidence, dans la séquence protéique de NLD_{-HD99}, de deux sites d'ancrage d'ancres lipidiques prédits en position C10 et C423 et de 9 arginies (R), des acides aminés chargés positivement. Le site C423 et les 9R sont absents dans la séquence protéine de NLD_{-PK6} tronquée.
A-C : Prédiction des sites d'ancrages putatifs d'ancres lipidiques sur la protéine NLD sauvage (http://lipid.biocuckoo.org/webserver.php). **A** : Représentation schématique du positionnement des sites prédits sur la séquence protéique de NLD, en haut en utilisant un seuil de prédiction « moyen » et en bas un seuil de prédiction « élevé ». **B** : Position des sites d'ancrage prédits sur la séquence protéique de NLD. **C** : tableau bilan des scores de prédiction obtenus pour les différents sites d'ancrage prédits et les réactions enzymatiques associées.
D : Représentations schématiques des protéines NLD, entière (NLD_{-HD99}) et tronquée (NLD_{-PK6}). Présentation des deux hypothèses de travail quant aux mécanismes d'adressage de NLD à la membrane plasmique : NLD pourrait être adressée à la membrane plasmique *via* la présence d'un site d'ancrage d'une ancre lipidique et/ou *via* des interactions électrostatiques entre les acides aminés chargés positivement en partie C-terminale de NLD et les lipides anioniques présents à la surface de la membrane plasmique.

cytoplasme, un ratio supérieur à 1 met donc en évidence une localisation membranaire et inversement lorsqu'il est inférieur à 1.

Pour conclure, ces observations associées à celles réalisées sur le pollen de maïs et de l'Arabette des dames permettent de conclure que la troncation de NLD entraîne une perte de son adressage et illustre donc l'importance de la partie C-terminale de la protéine (C-ter) dans sa localisation subcellulaire. Il est donc fortement envisageable que la mutation du gène *NLD* chez les lignées inductrices entraîne une perte de fonction de la protéine avec une perte partielle de sa localisation subcellulaire. L'hypothèse peut donc être faite que la protéine tronquée NLD dans les lignées inductrices ne serait plus présente au niveau de la MGU du fait de son instabilité et ne pourrait donc plus assurer sa fonction, avec pour conséquence une induction d'haploïdes. Par ailleurs, la différence de localisation subcellulaire de la fusion protéique NLD:CITRINE entre les cellules racinaires et la cellule végétative du grain de pollen laisse à penser que la membrane plasmique des cellules racinaires et la MIV de la cellule végétative ont des propriétés et des structures différentes.

III.2.2.4 - Mécanistique d'adressage de NLD à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV dans le système *A.thaliana*

III.2.2.4a - Analyse in silico de la protéine NLD

La délocalisation et/ou la déstabilisation de la protéine NLD tronquée (provenant de la lignée inductrice PK6) par rapport à la protéine sauvage (provenant de la lignée non-inductrice HD99) constitue l'une des observations importantes mises évidence au cours de ce projet de thèse. Il s'avère donc que cette localisation subcellulaire constitue probablement un élément-clé dans le processus de double fécondation et de gynogenèse *in vivo* chez le maïs, qu'il est intéressant d'étudier. Par ce fait, afin de mieux comprendre le mécanisme à l'origine de l'adressage de NLD à la membrane plasmique dans le système racinaire et à la MIV dans le système grain de pollen, des analyses *in silico* de la séquence protéique de NLD sauvage et plus spécifiquement de sa partie C-terminale, qui est absente chez la protéine NLD tronquée, ont été réalisées (figure III-14). Tout d'abord, il faut souligner qu'aucuns domaines transmembranaires, ou autres peptides signals, ne sont prédits sur la séquence protéique de NLD (figure II). Par ailleurs, deux éléments connus pour être impliqués dans l'adressage des protéines aux membranes ont pu être identifiés (figure III-14). Dans un premier temps ; une analyse *in silico* de NLD réalisée avec l'outil de prédiction "GPS-lipid" (Xie *et al.,* 2016) prédit la présence de

sites de S-palmitoylation putatifs en partie C-terminale de NLD, au niveau du résidu cystéine 423 (C423) et en partie N-terminale (N-ter) au niveau du résidu cystéine 10 (C10) (figure III-14). Ces sites de S-palmitoylation peuvent recevoir une modification post-traductionnelle réversible consistant en l'ajout d'un acide gras à 16 carbones, l'acide palmitique, qui pourra servir d'ancrage dans une bicouche lipidique (membrane), d'où leur nom d'ancres lipidiques (Daniotti *et al.,* 2017). Il est intéressant de noter que contrairement au résidu C423, le résidu C10 est également présent dans la séquence protéique de la protéine NLD tronquée (figure III-14D). De plus, une analyse *in silico* moins sélective de la séquence protéique permet d'identifier deux autres sites d'ancrage putatifs au niveau des résidus cystéines 139 et 194 (figure III-14A-C). Ces deux derniers sites étant moins probables, ils ne seront pas étudiés dans la suite de cette analyse, mais devront tout de même être envisagés dans une vision plus globale.

Dans un second temps, l'analyse de la séquence protéique de NLD en partie C-ter a permis de mettre en évidence la présence de neuf acides aminés cationiques (résidus d'arginines, R), chargés positivement et pouvant donc contribuer aux interactions électrostatiques avec des membranes, notamment avec la membrane plasmique (figure III-14D). Effectivement, la membrane plasmique est connue pour être la bicouche lipidique la plus électronégative de la cellule (au moins dans le cas des cellules des racines, des feuilles, du SAM (Shoot Apical Meristem), des hypocotyles et des cotylédons *d'A.thaliana* (Simon *et al.,* 2016)) de par sa composition majoritaire en lipides anioniques, donc chargés négativement, notamment les phosphatidylinositols phosphates (PIP) (Simon *et al.,* 2016) (figure III-14D). Les protéines, contenant un ou plusieurs sites d'ancrage d'une ancre lipidique, électropositives seront donc préférentiellement attirées par cette membrane plasmique au détriment des autres compartiments subcellulaires.

L'hypothèse de travail a donc été émise que la protéine NLD localiserait au niveau de la membrane plasmique dans les cellules racinaires et au niveau de la MIV dans la cellule végétative *via* la présence d'un ou plusieurs site(s) d'ancrage d'ancres lipidiques favorisant d'une part, le positionnement d'une ou plusieurs ancre(s) lipidique(s) et d'autre part, l'interaction avec la membrane *via* des interactions électrostatiques entre la surface des membranes chargées négativement et le domaine C-ter de NLD chargé positivement. Afin de vérifier cette hypothèse, deux approches ont été entreprises, une approche pharmacologique basée sur l'utilisation de deux inhibiteurs qui seront décrits dans les parties suivantes (PAO et 2-BP) et une approche moléculaire s'appuyant sur la mutagenèse dirigée des sites d'intérêt présents dans la séquence protéique de NLD.

III.2.2.4b - La partie C-terminale de NLD sauvage n'est pas suffisante individuellement pour permettre un adressage à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV des cellules végétatives

La troncation de la partie C-ter de la protéine NLD conduisant à une délocalisation subcellulaire de la protéine, il est fortement envisageable que des éléments importants pour l'adressage aux membranes (la membrane plasmique des cellules racinaires et la MIV de la cellule végétative) soient présents dans cette partie C-ter. Parmi ces éléments, il y a notamment le site putatif C423 d'ancrage d'une S-palmitoylation et les neuf arginines chargées positivement présentés dans la partie précédente. Ainsi, dans le but d'évaluer si la partie C-ter de NLD était capable à elle seule de conférer une localisation subcellulaire au niveau de la membrane plasmique et donc indirectement de conforter l'hypothèse que l'absence du site C423 et des acides aminés anioniques chez la protéine tronquée était liée à une modification de l'adressage de la protéine, cette partie C-ter a été étudiée indépendamment du reste de la protéine (figure III-14). Pour cela, les parties C-ter des protéines NLD$_{\text{-HD99}}$ et NLD$_{\text{-PK6}}$ ont été fusionnées à la protéine fluorescente CITRINE, le tout sous contrôle du promoteur *pUB10* (figure III-13). Les observations au microscope confocal d'apex racinaires de ces deux lignées ont permis de mettre en évidence que les deux translations étaient entièrement solubles au sein des cellules (figure III-13E, F). Ces résultats ont été confortés par des quantifications de l'intensité du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique dans des cellules racinaires des deux lignées (figure III-13K). En effet, les ratios IFMP/IFC sont pour les fusions translationnelles NLD$_{\text{-HD99-Cter}}$:CITRINE et NLD$_{\text{-PK6-Cter}}$:CITRINE respectivement de 0,66 (n=313) et de 0,68 (n=315), significativement inférieurs à celui de la protéine NLD entière, de 2,71 (n=340) (figure III-13K). Des résultats similaires ont pu être mis en évidence par l'observation de grains de pollen matures provenant de ces lignées, qui présentent un signal fluorescent, au niveau du noyau végétatif et du cytoplasme, caractéristique des protéines solubles (figure III-13I, J).

L'ensemble de ces observations suggèrent donc que la partie C-ter de NLD n'est pas suffisante, individuellement, afin d'adresser la protéine fluorescente CITRINE à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV des cellules végétatives. Contrairement à l'hypothèse initiale qui suggérait une implication seule des charges et de l'ancrage lipidique dans la partie C-ter de NLD, d'autres régions de la protéine NLD doivent très certainement être impliquées dans l'adressage. Tenant compte de cela, la suite de la dissection de la mécanistique d'adressage de NLD a été réalisée sur les protéines entières.

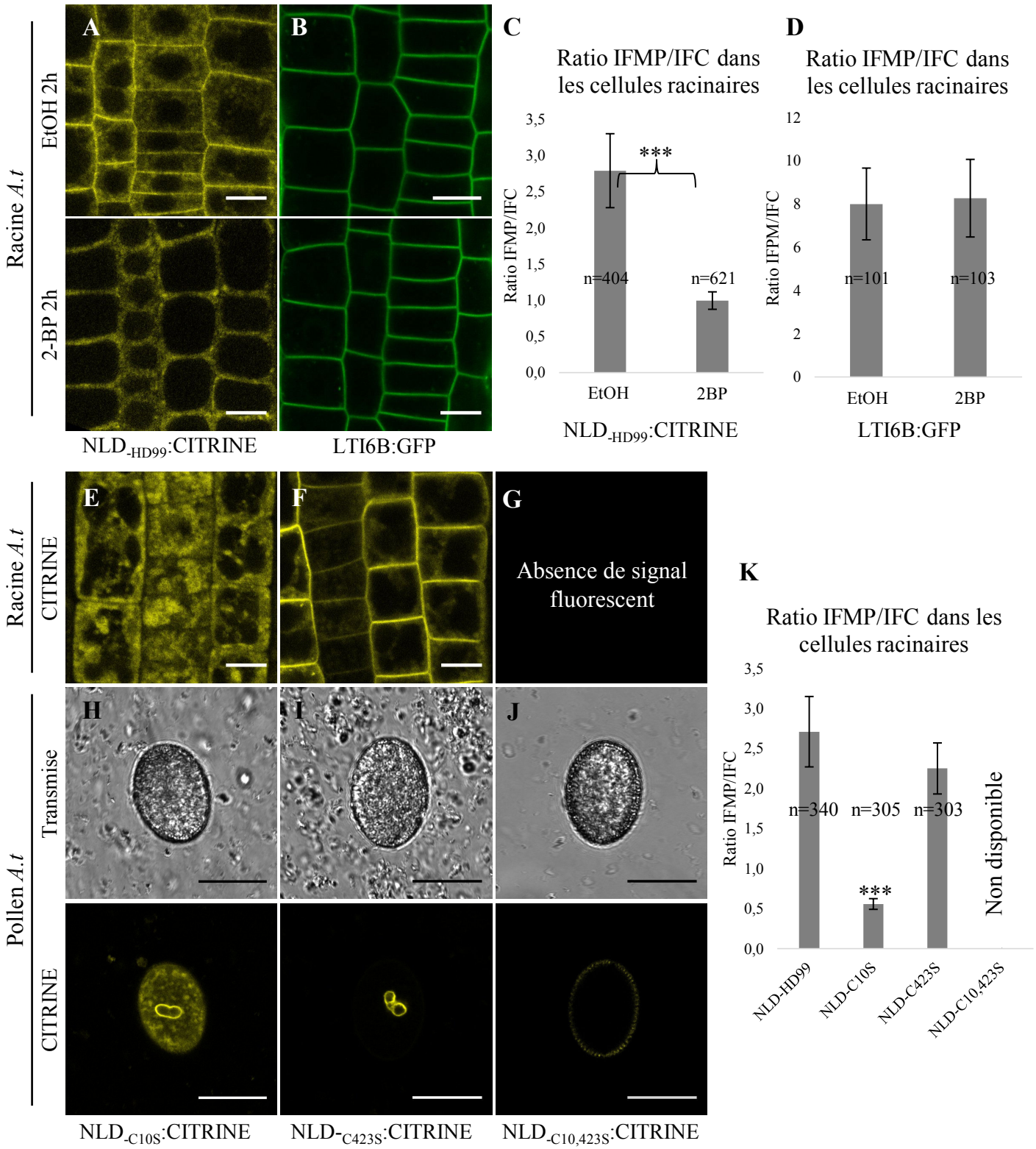


Figure III-15 : Ancrage de la fusion NLD:CITRINE à la membrane plasmique *via* des interactions avec des ancres lipidiques. A-B : Démonstration de l'implication d'ancres lipidiques par une approche pharmacologique. Observations au microscope confocal d'apex racinaires des lignées contenant les fusions **A** : NLD:CITRINE et **B** : LTI6B:GFP (contenant un domaine transmembranaire) après traitements avec du 2-BP (2-bromopalmitate), un inhibiteur des palmitoylations ou avec le contrôle, EtOH. **C, D** : Ratio IFMP/IFC dans les cellules racinaires : intensité de la fluorescence de la membrane plasmique (IFMP) / intensité de la fluorescence du cytoplasme (IFC). Evaluation de l'intensité par l'analyse des niveaux de gris moyens avec le logiciel imageJ®. Les résultats proviennent de l'analyse de 3 expérimentations indépendantes. **E-K** : Implication des sites prédits d'ancrage d'ancres lipidiques C10 et C423 dans la localisation de NLD. Observations au microscope confocal **E,G** : d'apex racinaires et **H,J** : de grains de pollen, des fusions protéiques obtenues par mutagenèse dirigée ; NLD_{-C10S}:CITRINE (C10 muté), NLD_{-C423S}:CITRINE (C423 muté) et $NLD_{-C10,423S}$:CITRINE (C10 et C423 mutés). **K** : Ratio IFMP/IFC dans les cellules racinaires. Les résultats proviennent de l'analyse de 5 lignées indépendantes par construction. Les astérisques (***) montrent des différences significatives (p-value < 0,001; Test de Wilcoxon). n = nombre de cellules. Barres d'erreur = écarts types. Barres d'échelle : racines = 10 µm, pollens = 20 µm.

III.2.2.4c - NLD est adressée à la membrane plasmique via des ancres lipidiques

Les résultats précédents ayant mis en évidence que la partie C-ter de NLD, contenant le site d'ancrage C423, couplé aux acides aminés cationiques, seule n'était pas suffisante afin de permettre l'adressage à la membrane plasmique, l'hypothèse de l'implication simultanée des deux sites d'ancrage C10 et C423 dans la mécanistique d'adressage s'est donc avérée plausible.

Dans un premier temps, afin de confirmer l'hypothèse de l'implication de l'un ou des deux sites d'ancrage d'ancres lipidiques prédits dans l'adressage de NLD à la membrane plasmique (dans le contexte racinaire), des jeunes plantules d'*A.thaliana* contenant la fusion translationnelle NLD$_{-HD99}$::CITRINE ont été traitées avec du 2-bromopalmitate (2-BP), un inhibiteur de la S-Acyl transférase, l'enzyme catalysant les réactions de S-palmitoylation (figure III-15A, C). Afin de prévenir la synthèse de nouvelles protéines dans l'intervalle de temps entre les traitements et les observations et donc le putatif retour de la fusion NLD$_{-HD99}$::CITRINE à la membrane plasmique, les plantules ont préalablement été traitées avec de la cyclohexamine, un inhibiteur protéique. Les observations en microscopie confocale d'apex racinaires révèlent qu'après deux heures de traitement avec du 2-BP à 50 µM, la fusion protéique NLD$_{-HD99}$::CITRINE délocalise partiellement de la membrane plasmique vers le cytoplasme (figure III-15A). En revanche, aucun effet n'a été observé sur les plantules traitées en parallèle avec de l'éthanol (dilué au 1/1000), utilisé comme contrôle négatif (figure III-15A). Ces résultats ont été appuyés par des quantifications de l'intensité de fluorescence au niveau de la membrane plasmique. En effet, les plantules traitées au 2-BP présentent un ratio IFMP/IFC de 0,99 (n=621), contrairement aux plantules traitées à l'éthanol qui ont un ratio significativement plus élevé, de 2,78 (n=404) (figure III-15C). Il est cependant intéressant de noter que la protéine reste tout de même partiellement localisée à la membrane plasmique puisque le ratio IFMP/IFC des racines traitées au 2-BP, de 0,99, reste supérieur à celui des protéines entièrement solubles, CITRINE:NLD$_{-HD99-Cter}$ et CITRINE:NLD$_{-PK6-Cter}$, respectivement de 0,66 (n=313) et de 0,68 (n=315) (figures III-13K, III-15C). En parallèle, afin de s'assurer que le traitement au 2-BP n'avait pas d'effet indirect sur l'organisation et l'intégrité des membranes plasmiques, des plantules contenant une fusion traductionnelle (LOW TEMPERATURE INDUCIBLE PROTEIN6b (LTI6B):GFP) connue pour localiser au niveau de la membrane plasmique grâce à un domaine transmembranaire (Jaillais *et al.,* 2008) ont également été traitées avec du 2-BP (figure III-15B, D). Il a ainsi pu être observé que le traitement au 2-BP n'impactait pas l'adressage à la membrane plasmique de la protéine LTI6B, confirmant ainsi que la drogue ne désorganise et ne déstructure pas les membranes plasmiques (figure III-15B, D). Il aurait été intéressant de pouvoir tester cette

approche pharmacologique sur le pollen, seulement la mise au point d'un protocole n'a pas pu être réalisée de par la difficulté d'appliquer les traitements sur les grains de pollen (mauvaise pénétration de la drogue et détérioration des grains) (résultats non montrés). Pour conclure, l'ensemble de ces résultats suggèrent donc que NLD subit des cycles de S-palmitoylation et que des ancres lipidiques sont requises afin de promouvoir sa localisation à la membrane plasmique dans les cellules racinaires.

Du fait de l'implication de réactions de S-palmitoylaytions dans d'adressage de NLD à la membrane plasmique, il s'est avéré intéressant de confirmer l'implication des sites d'ancrage C10 et C423, individuellement et simultanément. Pour cela, une stratégie de mutagénèse dirigée a été entreprise. A partir des constructions contenant la fusion translationnelle NLD-$_{HD99}$:CITRINE, les résidus C10 et C423 individuellement ainsi que les deux simultanément ont été substitués par des résidus sérines (S) (figure III-15E-K). Les fusions translationnelles ainsi générées sont notées respectivement ; NLD-$_{C10S}$:CITRINE, NLD-$_{C423S}$:CITRINE et NLD-$_{C10S/C423S}$: CITRINE. L'observation par microscopie confocale d'apex racinaires met en évidence une délocalisation de la protéine NLD-$_{C10S}$:CITRINE de la membrane plasmique vers le cytoplasme et des compartiments endomembranaires (figure III-15E) avec un ratio IFMP/IFC de 0,56 (n=305) (figure III-15K). En revanche, étonnamment, la protéine NLD-$_{C423S}$:CITRINE reste localisée à la membrane plasmique (figure III-15F) avec un ratio IFMP/IFC de 2,25 (n=340), non significativement différent de celui de la protéine NLD sauvage de 2,71 (n=340) (figures III-13K, III-15K). De façon intéressante, la mutation des deux sites, C10S et C423S, simultanément entraîne une absence de signal fluorescent (figure III-15G). Le séquençage de la cassette *pUB10::NLD-$_{C10S/423S}$:CITRINE* dans les plantes transgéniques a permis de s'assurer que cette absence de signal fluorescent n'était pas due à un défaut de l'intégrité du construit moléculaire, indiquant ainsi un impact considérable de la mutation des sites C10 et C423 sur la stabilité de la protéine NLD. L'ensemble de ces résultats obtenus sur la racine d'*A.thaliana* mettent donc en lumière l'importance des deux résidus C10 et C423, prédits pour être palmytoylés, dans l'adressage de NLD. En effet, la mutation des deux sites simultanément entraîne probablement une trop grande instabilité de la protéine putativement responsable de sa dégradation. Contrairement à l'hypothèse initiale qui postulait uniquement l'implication du site C423, présent dans la partie C-ter de la protéine NLD sauvage et absent chez la protéine NLD tronquée, dans l'adressage à la membrane plasmique, ces résultats suggèrent également un rôle majeur du résidu C10 présent en partie N-ter des deux protéines.

Les observations des MGU dans les grains de pollen provenant de ces mêmes lignées *pUB10::NLD-$_{C10S}$:CITRINE*, *pUB10::NLD-$_{C423S}$:CITRINE* et *pUB10::NLD-$_{C10S/C423S}$:CITRINE*

conduisent globalement aux mêmes conclusions que celles ressortant de l'analyse des apex racinaires, mais concernant une localisation subcellulaire à la MIV (figure III-15H-K). Il a ainsi pu être observé que la mutation du résidu C423 seule ne modifiait pas la localisation subcellulaire de NLD, qui reste spécifiquement localisée au niveau de la MGU (figure III-15I), probablement au niveau de la MIV comme cela est le cas avec la construction *pUB10::NLD:CITRINE*, alors que la mutation des deux résidus C10 et C423 simultanément entraîne une perte du signal fluorescent (figure III-15J). En revanche, contrairement au système racinaire, la mutation du résidu C10 conduit à une délocalisation seulement partielle de la protéine, de la MGU vers le cytoplasme de la cellule végétative. En effet, même si un signal fluorescent fort est présent dans le cytoplasme et dans des compartiments endomembranaires de la cellule végétative du grain de pollen, un signal est toujours observable au niveau de la MGU (figure III-15H). Ce fait suggère que la composition membranaire dans la cellule végétative est probablement différente de celle des cellules racinaires. Il est alors envisageable que le site C423 puisse avoir une implication partielle dans la localisation subcellulaire ainsi qu'une implication majeure dans la stabilité de la protéine au niveau de la MGU. Cependant, celui-ci ne s'avère pas indispensable dans la localisation subcellulaire de par la présence du site C10, majoritairement impliqué dans l'adressage à la MIV dans le contexte grain de pollen. Il est également envisageable que le site C423 contribue à la structure tridimensionnelle de la protéine NLD, *via* la mise en place, par exemple, de ponts disulfures, favorisant certaines interactions entre différents domaines de la protéine essentiels à son maintien et sa stabilité.

Pour conclure sur cette étude, les résultats obtenus par des approches pharmacologiques et de mutagénèses dirigées ont permis de mettre en évidence l'implication de modifications post-traductionnelles de types S-palmitoylation dans l'adressage de NLD à la membrane plasmique des cellules racinaires et à la MIV de la MGU. Contrairement à l'hypothèse initiale, qui prédisait uniquement le site C423, présent en partie C-ter de la protéine sauvage et absent chez la protéine tronquée, comme principal acteur de ce processus, il a été démontré que les deux sites d'ancrage C10 et C423 étaient importants dans l'accueil de potentielles ancres lipidiques et/ou dans la stabilité de la protéine. Ainsi, la localisation subcellulaire et l'adressage de NLD à la membrane plasmique dans les cellules racinaires et au niveau de la MIV dans les cellules végétatives semblent fortement dépendantes de l'implication d'ancres lipidiques.

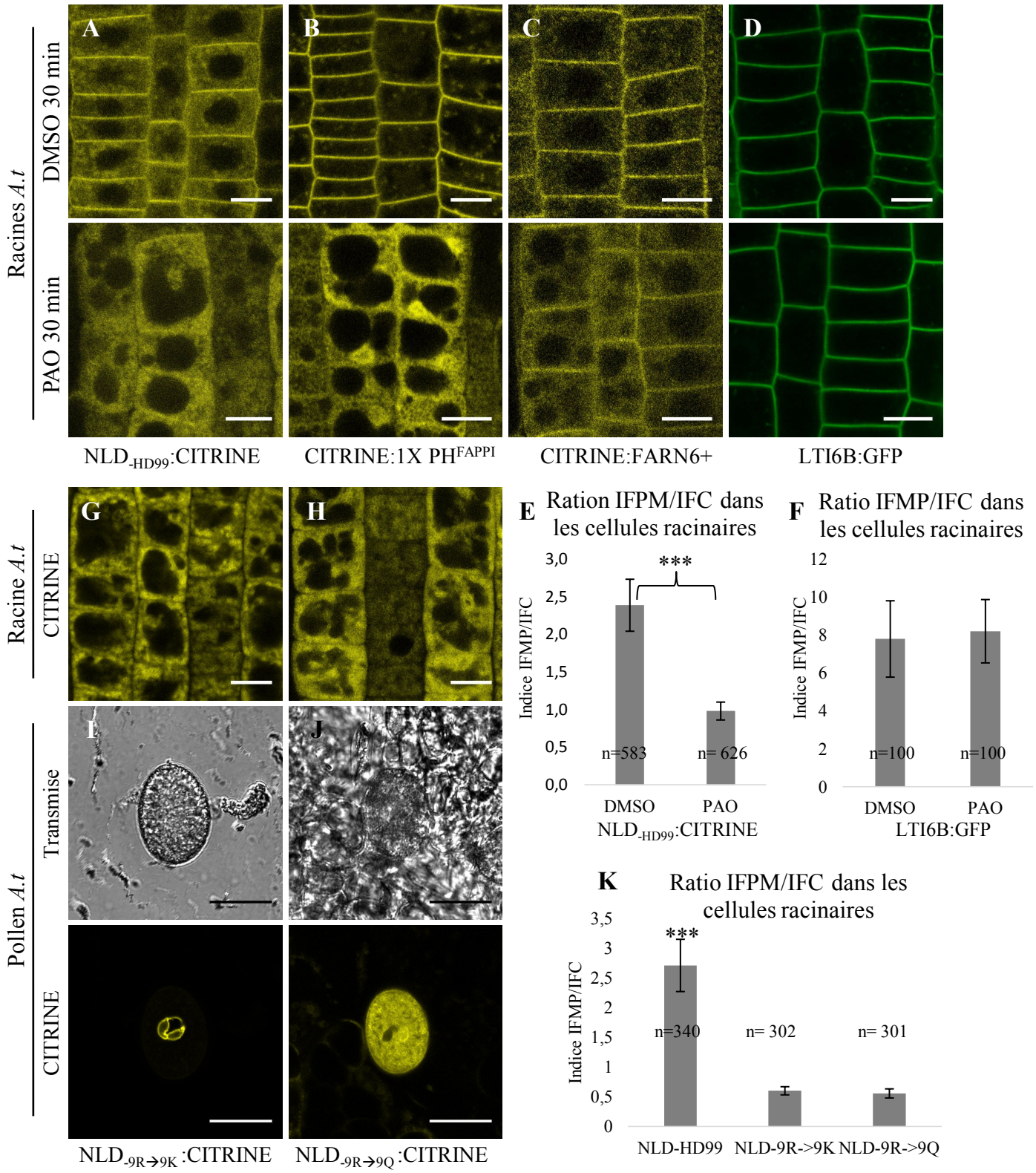


Figure III-16 : Adhésion de la fusion NLD:CITRINE à la membrane plasmique *via* des interactions électrostatiques. **A-F** : Démonstration de l'implication des interactions électrostatiques par une approche pharmacologique. **A-D** : Observations au microscope confocal d'apex racinaires des lignées contenant les fusions **A** : NLD:CITRINE, **B** : CITRINE:1X PH^{FAPPI} (senseur des PI4Ps), **C** : CITRINE:$FARN_{6+}$ (senseur des charges) et **D** : LIT6B:GFP (avec un domaine transmembranaire) après traitement avec de la PAO (oxyde de phénylarsine), un inhibiteur des PI4-Kinases, ou avec le contrôle, DMSO. **E-F** : Ratio IFPM/IFC dans les cellules racinaires : intensité de la fluorescence de la membrane plasmique (IFMP) / intensité de la fluorescence du cytoplasme (IFC). Evaluation de l'intensité par l'analyse des niveaux de gris moyens avec le logiciel imageJ®. Les résultats proviennent de l'analyse de 3 expérimentations indépendantes. **G-K** : Rôle des acides aminés cationiques présents en partie C-ter de NLD dans sa localisation. Observations au microscope confocal **G-H** : des apex racinaires, **I-J** : de grains de pollen, des lignées issues de la mutagenèse dirigée ; $NLD_{-9R\rightarrow 9K}$:CITRINE (arginines (R) mutées en lysines (K)) et $NLD_{-9R\rightarrow 9Q}$:CITRINE (arginines (R) mutées en glutamines (Q)). **K** : Ratio IFPM/IFC dans les cellules racinaires. Les résultats proviennent de l'analyse de 5 lignées indépendantes par construction. Les astérisques (***) montrent des différences significatives (p-value < 0,001 ; Test de Wilcoxon). n = nombre de cellules. Barres d'erreur = écarts types. Barres d'échelle : racines = 10 µm, pollen = 20 µm.

III.2.2.4d - Importance des interactions électrostatiques entre NLD et les membranes dans l'adressage de NLD

Il a été montré dans la partie précédente que NLD localisait aux membranes *via* des ancres lipidiques de type S-palmitoylation. En revanche, si ces ancres lipidiques sont essentielles pour un ancrage dans une bicouche lipidique (membrane), la spécificité d'adressage à une membrane donnée peut se faire grâce à des interactions électrostatiques (Simon *et al.,* 2016). L'analyse *in silico* de la protéine NLD sauvage a permis de mettre en évidence la présence de neuf acides aminés cationiques (résidus d'arginines, R) dans sa partie C-ter (figure III-14D), contribuant potentiellement dans les interactions électrostatiques de la protéine avec la membrane plasmique et jouant donc un rôle dans l'adressage de NLD. L'objectif de l'étude qui va être présentée dans cette partie est donc d'évaluer l'importance des propriétés électrostatiques entre NLD et les membranes plasmiques (ou la MIV dans le cas des grains de pollen). Pour cela, deux stratégies différentes ont été utilisées : une approche pharmacologique et une approche de mutagenèse dirigée sur NLD.

L'approche pharmacologique a consisté à diminuer indirectement l'électronégativité de la surface de la membrane plasmique des cellules racinaires *d'A.thaliana* par un traitement à l'oxyde de phénylarsine (PAO) (figure III-16A-F). La PAO est un inhibiteur des PI4-kinases (PI4Ks), impliquées dans la biosynthèse de deux phospholipides hautement électronégatifs ; les PI4Ps et les PI(4,5)P2s, qui sont majoritairement présents à la surface de la membrane plasmique (Simon *et al.,* 2016). Ainsi, un traitement à la PAO, en diminuant la quantité de PI4Ps et de PI(4,5)P2s à la surface de la membrane plasmique, diminue indirectement son électronégativité. Dans un premier temps, l'efficacité du traitement à la PAO a été évaluée par le traitement de plantules transgéniques contenant des fusions traductionnelles de la CITRINE fusionnée : soit à un « biosenseur des PI4Ps » comportant un domaine lipidique de type PH^{FAPPI} (Pleckstrin $Homology^{Four\text{-}Phosphate\text{-}Adaptor\ Protein}$) interagissant avec les PI4Ps (CITRINE:1xPH^{FAPP1}), soit à un « biosenseur des charges », comportant une fusion traductionnelle d'un site d'ancrage d'une ancre lipidique, de type Farnelysation, couplé à six acides aminés cationiques (CITRINE:$FARN_{6+}$) (Simon *et al.,* 2014, 2016). Après 30 minutes de traitement de ces lignées avec de la PAO à 60 µM, une délocalisation totale du biosenseur des PI4Ps (figure III-16B) et partielle du biosenseur des charges (figure III-16C), de la membrane plasmique vers le cytoplasme ont pu être observée, confirmant ainsi l'efficacité du traitement sur l'électronégativité de membrane plasmique. Des traitements à la PAO ont également été réalisés sur des plantules contenant la fusion GFP:LIT6B et ne conduisent pas à une modification du

comportement de la protéine GFP:LIT6B qui reste localisée à la membranaire plasmique des cellules racinaires (figure III-16D). Ce contrôle confirme donc l'absence d'effet du traitement à la PAO sur l'intégrité de la membrane plasmique.

Après la validation du processus expérimental, les plantules *pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE* ont été analysées. Dans un premier temps, aucun effet notable sur la localisation subcellulaire n'a pu être observé après le traitement contrôle des plantules avec du DMSO (dilué au 1/1000) (figure III-16A). En revanche, après le traitement des plantules, 30 minutes avec de la PAO à 60 µM, une délocalisation de NLD de la membrane plasmique vers le cytoplasme et des compartiments endomembranaires a pu être observée (figure III-16A). En effet, les plantules traitées avec de la PAO présentent un ratio IFMP/IFC de 0,98 (n=626), significativement inférieur à celui des plantes traitées avec du DMSO qui est de 2,39 (n=583) (figure III-16E). Cette diminution de la localisation subcellulaire de NLD à la membrane plasmique n'est que partielle, puisque le ratio IFMP/IFC reste supérieur à ceux observés avec les protéines entièrement solubles CITRINE:NLD-$_{HD99\text{-}Cter}$ et CITRINE:NLD-$_{PK6\text{-}Cter}$, respectivement de 0,66 (n=313) et de 0,68 (n=315) (figures III-13J, III-16E) et qu'une légère localisation à la membrane plasmique peut encore être observée (figure III-16A). Cette localisation résiduelle peut s'expliquer du fait que la membrane plasmique n'est pas uniquement constituée des PI4Ps et des PI(4,5)P2s, mais également d'autres phospholipides anioniques minoritaires. Il est alors possible que la délocalisation de NLD, tout comme celle du biosenseur des charges (CITRINE:FARN$_{6+}$), ne soit que partielle en raison de la présence d'autres phospholipides anioniques à la surface de la membrane plasmique, lui assurant ainsi une électronégativité résiduelle. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les propriétés électrostatiques entre la membrane plasmique et la protéine NLD jouent un rôle crucial dans la localisation subcellulaire de celle-ci dans les cellules racinaires.

Afin de mettre en relation les résultats obtenus par cette approche pharmacologique avec l'effet de la troncation de NLD dans les lignées inductrices d'haploïdes sur la localisation subcellulaire de la protéine, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur les acides aminés cationiques présents en partie C-ter de la protéine sauvage (figure III-16G, I, K). Neuf arginines (R) ont ainsi été substituées par des glutamines (Q), des acides aminés neutres, dans les lignées *pUB10::NLD-$_{9R\rightarrow 9Q}$:CITRINE*. En parallèle, afin de valider l'importance des charges positives dans la localisation subcellulaire et non celle d'une putative perturbation de la conformation et/ou stabilité de la protéine de par la mutation de plusieurs acides aminés, les neuf arginines ont également été remplacées par des lysines (K), d'autres acides aminés cationiques, dans les lignées *pUB10::NLD-$_{9R\rightarrow 9K}$:CITRINE* (figure III-16H, J, K). L'observation au microscope

confocal d'apex racinaires provenant de ces lignées montre que les deux nouvelles versions de la protéine NLD ; NLD$_{-9R\rightarrow 9Q}$ et NLD$_{-9R\rightarrow 9K}$, ne sont pas localisées à la membrane plasmique mais dans cytoplasme et dans des compartiments endomembranaires dans les cellules racinaires (figure III-14G, H), avec des ratios IFMP/IFC respectivement de 0,56 (n=302) et de 0,60 (n=301), significativement inférieurs à celui de la protéine sauvage, de 2,71 (n=340) (figures III-13K, III-16K). Ces résultats suggèrent donc que les acides aminés mutés en partie C-ter de la protéine jouent un rôle essentiel dans l'adressage de NLD à la membrane plasmique dans les cellules racinaires. En revanche, il est impossible de conclure quant à l'implication des propriétés électropositives des acides aminés présents en partie C-ter de NLD, car leur remplacement par d'autres acides aminés cationiques ne conduit pas à un adressage à la membrane plasmique (figure III-16G, H). Il est envisageable que la mutation de ces acides aminés entraîne à une modification de la conformation de la protéine NLD, impactant ainsi sa localisation dans les cellules racinaires. En revanche, l'observation au microscope confocal de grains de pollen provenant de ces lignées a conduit à l'obtention de résultats divergents de ceux obtenus dans le contexte racinaire (figure III-16I, J). En effet, la protéine NLD$_{-9R\rightarrow 9Q}$:CITRINE est, comme attendu, entièrement soluble dans le cytoplasme de la cellule végétative du grain de pollen (figure III-16J). En revanche, la protéine NLD$_{-9R\rightarrow 9K}$:CITRINE est spécifiquement localisée au niveau de la MGU, à l'identique de la protéine sauvage (figures III-13E, III-16I). Ces observations dans le pollen sont en adéquation avec l'hypothèse initiale de cette étude, impliquant les acides aminés cationiques présents en partie C-ter de NLD dans l'adressage de la protéine à la MIV dans la cellule végétative. La divergence observée dans les racines et dans les grains de pollen suggère donc des compositions membranaires différentes entre les deux tissus, pouvant putativement influencer la localisation subcellulaire de la protéine NLD. Chez le maïs, le gène *NLD* étant spécifiquement exprimé dans la cellule végétative du grain de pollen (figure III-7H, I), ces résultats obtenus dans un contexte « grain de pollen », dans le système hétérologue *A.thaliana*, sont très encourageants pour la suite du projet.

III.2.2.4e – Conclusion sur la mécanistique de la localisation subcellulaire de NLD

Pour conclure sur cette étude, il a pu être mis en évidence par une approche pharmacologique sur les cellules racinaires d'*A.thaliana*, une implication des propriétés électrostatiques entre NLD et la surface de la membrane plasmique afin d'assurer la localisation subcellulaire de la protéine. Dans un second temps, une approche de mutagenèse dirigée a permis de spécifiquement cibler l'implication des acides aminés cationiques présents en partie C-ter de

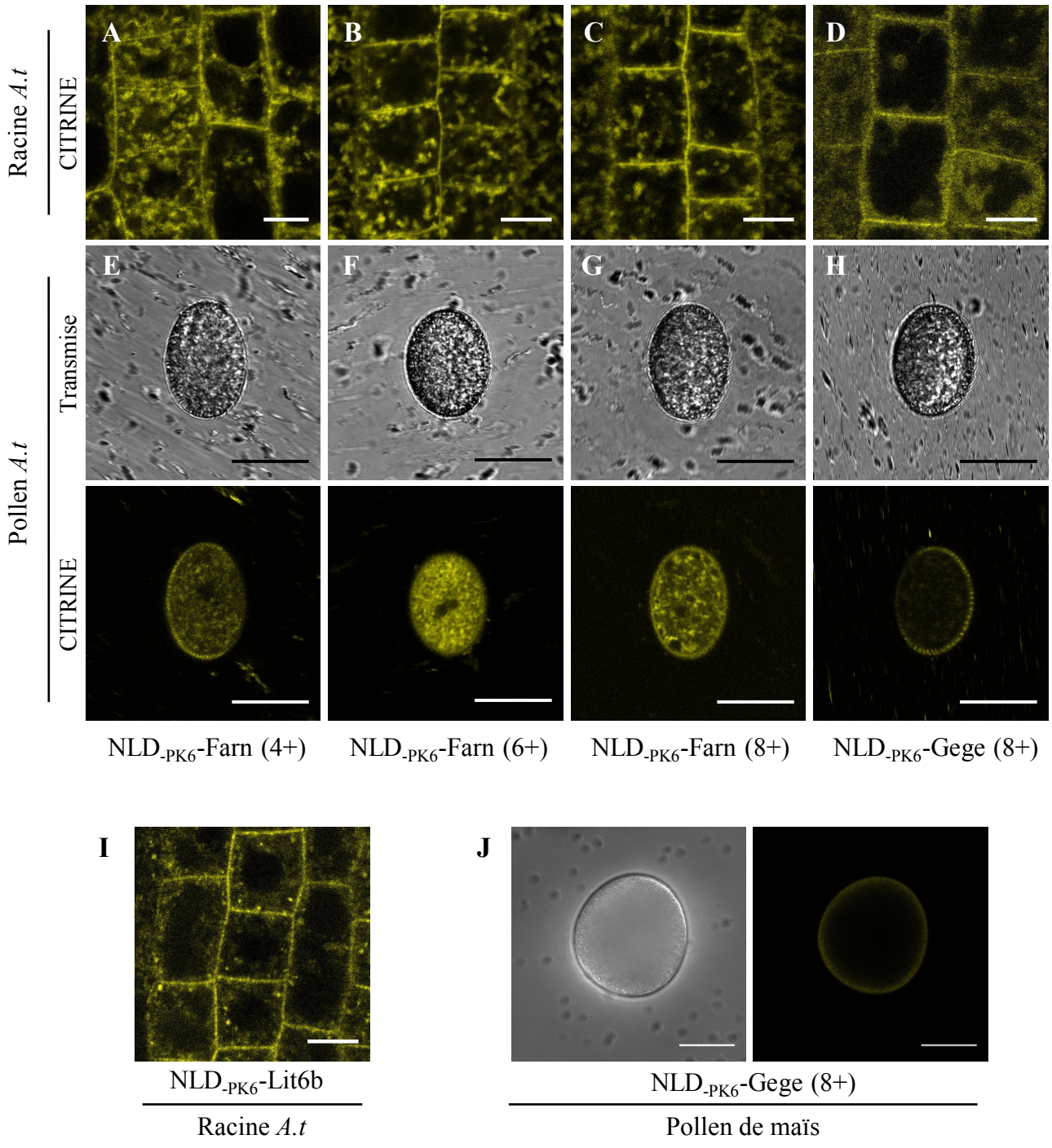


Figure III-17 : Tests de la relocalisation de la protéine NLD tronquée à la membrane plasmique dans les cellules racinaires et au niveau de la MGU dans les grains de pollen.

A-H : Analyse de lignées *A.thaliana* (*A.t*) contenant des fusions translationnelles de la protéine NLD tronquée, fusionnée avec la CITRINE associées à des sites d'ancrage d'ancres lipidiques couplés à des acides aminés chargés positivement. Les (4+), (6+) et (8+) correspondent au nombre d'acides aminés chargés positivement couplés aux sites d'ancrage d'ancres lipidiques (Farn = Farnesylation, Gege = Geranylgeranylation) ajoutés en partie C-terminale de NLD_{-PK6}. Observations **A-D** : d'apex racinaires et **E-H** : de grains de pollen. **I** : Observations d'apex racinaires d'une lignée *A.thaliana* contenant une fusion translationnelles de la protéine NLD tronquée à la protéine transmembranaire LTI6B et à la CITRINE. Barres d'échelle : racines = 10 µm, pollens = 20 µm.

J : Grain de pollen de la lignée de maïs contenant la fusion protéique $NLD_{-PK6\text{-}GEGE(8+)}$:CITRINE. Aucun signal fluorescent CITRINE n'est observable, uniquement un signal d'autofluorescence du grain de pollen. Barres d'échelle = 50 µm.

L'ensemble des observations ont été réalisées avec un microscope confocal.

la protéine NLD sauvage. En effet, le remplacement de ces acides aminés par des acides aminés anioniques conduit à une délocalisation complète de la protéine de la MIV du MGU vers le cytoplasme de la cellule végétative alors que leur remplacement par d'autres acides aminés cationiques ne modifie pas la localisation dans le contexte du grain de pollen. Ces résultats permettent donc de conclure que les acides aminés chargés positivement présents dans la partie C-ter de NLD ont un rôle-clé dans sa localisation subcellulaire. De plus, ils démontrent l'importance de la partie C-ter de NLD, qui contient un site pouvant accueillir une ancre lipidique sur le résidu C423 et des acides aminés cationiques. En association avec le site C10 présent en partie N-ter, ces éléments sont importants afin d'assurer à la protéine NLD une stabilité et une localisation à la membrane plasmique dans le contexte racinaire et à la MIV dans le contexte « grain de pollen ».

III.2.2.5 - Relocalisation de NLD$_{-PK6}$ à la membrane plasmique

La troncation de NLD entraîne, comme cela a pu être démontré avec les résultats précédents, une perte de l'adressage de la protéine à la membrane plasmide dans les cellules racinaires d'*A.thaliana* et à la MIV de la MGU dans la cellule végétative (figure III-13A, B), bien que cette protéine tronquée contienne toujours les sites enzymatiques actifs (figure II). Il est donc fortement envisageable qu'une délocalisation ou une déstabilisation de la protéine troquée au niveau de la MIV de la MGU soit à l'origine du phénotype d'induction d'haploïdes chez le maïs plutôt qu'une perte de fonctionnalité enzymatique. Partant de cette hypothèse, il s'est avéré intéressant de mettre en place une stratégie afin de re-adresser la protéine tronquée NLD$_{-PK6}$ au niveau de la MGU. Ceci a pour objectif à plus long terme, d'évaluer si la protéine NLD tronquée relocalisée à la MGU est fonctionnelle et est capable de complémenter le phénotype d'induction d'haploïdes. Dans un premier temps, la stratégie de re-adressage de NLD$_{-PK6}$ a été conduite dans le système hétérologue *A.thaliana*. Le mécanisme natif d'adressage de NLD aux membranes (plasmiques et MIV) étant basé sur la présence de sites d'ancrages d'ancres lipidiques et d'interaction électrostatiques entre la protéine et les bicouches lipidiques, un système artificiel s'inspirant de ce mécanisme a donc été testé. Pour cela, des fusions translationnelles, contenant le gène *NLD$_{-PK6}$* fusionné au gène rapporteur *CITRINE*, dans lesquelles ont été ajoutés des domaines contenant un site d'ancrage pour une ancre lipidique, associé à des acides aminés chargés positivement, ont été générées. Les différentes fusions couplant la CITRINE à une ancre lipidique et des acides aminés chargés positivement ont été fournies et testées préalablement par l'équipe d'Yvon Jaillais en interne au laboratoire (Simon *et al.,* 2016). Quatre fusions

traductionnelles différentes ont été réalisées et évaluées, incluant des fusions comportant un site d'ancrage de type Farnelysation couplé à 4, 6 ou 8 acides aminés chargés positivement, notées respectivement NLD$_{\text{-PK6-Farn4+}}$:CITRINE, NLD$_{\text{-PK6-Farn6+}}$:CITRINE et NLD$_{\text{-PK6-Farn8+}}$:CITRINE et une fusion contenant un site d'ancrage de type Geranylgeranylation couplé à 8 acides aminés chargés positivement, notée NLD$_{\text{-PK6-Gege8+}}$:CITRINE (figure III-17A-H). Les observations au microscope confocal d'apex racinaires provenant de ces quatre lignées mettent en évidence une faible relocalisation de la protéine tronquée à la membrane plasmique et une forte localisation dans des compartiments endomembranaires (figure III-17A-D). Concernant les grains de pollen, l'ensemble des fusions ne sont pas localisées au niveau de la MIV mais uniquement dans le cytoplasme et dans des compartiments endomembranaires (figure III17E-H), indiquant que la cellule végétative semble se comporter différemment des cellules racinaires. La stratégie mise en place ne semble donc pas adaptée afin de re-adresser la protéine NLD tronquée à la MGU. En parallèle de l'étude réalisée sur le système hétérologue *A.thaliana*, une fusion traductionnelle contenant la construction *pNLD::NLD$_{\text{-PK6-Gege8+}}$:CITRINE* a été introduite chez le maïs. L'analyse au microscope confocal des grains de pollen provenant de cette lignée a mis en évidence une absence totale de fluorescence, comme cela a pu être observé chez la lignée *pNLD::NLD$_{\text{-PK6}}$:CITRINE* (figures III-11C, D, III-17J). Cette absence de re-ancrage de la protéine tronquée à la MIV de la MGU conduit probablement à une instabilité de celle-ci et donc à sa dégradation. Ces résultats suggèrent que la protéine tronquée NLD$_{\text{-PK6}}$ est difficilement relocalisable à la MIV avec les stratégies d'ancrage initiées.

Ainsi, une stratégie alternative consistant à relocaliser la protéine NLD$_{\text{-PK6}}$ *via* un domaine transmembranaire, a été entreprise. Pour cela une fusion translationnelle de NLD$_{\text{-PK6}}$ avec la protéine transmembranaire LTI6B et la CITRINE a été introduite chez *A.thaliana*. Il a ainsi pu être observé, dans les cellules racinaires, que la fusion d'une protéine transmembranaire en partie C-ter de la protéine NLD$_{\text{-PK6}}$ conduisait à la une relocalisation de la protéine à la membrane plasmique (figure III-17I). En revanche, cette localisation subcellulaire n'est que partiellement à la membrane plasmique contrairement à celle de la protéine LIT6B seule qui est entièrement membranaire (figures III-15B, III-16D). Ces résultats sont encourageants mais des analyses complémentaires de ces lignées restent à faire afin d'évaluer la localisation subcellulaire de cette fusion dans les grains de pollen d'*A.thaliana*. Dans le cas de résultats concluants, cette fusion sera introduite chez le maïs dans l'objectif d'évaluer si cela entraîne une complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes chez les lignées inductrices.

III.2.2.6 - Conclusion sur la localisation subcellulaire et l'adressage de la protéine NLD

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence une localisation subcellulaire particulière de la protéine NLD sauvage au niveau de l'unité mâle germinative (MGU) dans les grains de pollen de *Z.mays* (figures III-11, III-12) et également du système hétérologue, *A.thaliana* (figure III-13C). En revanche, la troncation de NLD, observée chez les lignées inductrices, conduit à une perte de l'adressage de la protéine au niveau de la MGU conduisant à sa putative instabilité et donc dégradation (figures III-11C, D).

Plus spécifiquement, il est fortement envisageable que NLD localise au niveau de la membrane plasmique « interne » de la cellule végétative, la MIV et non dans les membranes plasmiques des cellules spermatiques puisque (1) chez le maïs, des isolements de cellules spermatiques contenant la fusion protéique NLD:CITRINE conduisent à une perte du signal fluorescent, suggérant que NLD ne localise pas au niveau des cellules spermatiques (figure III-12) et (2) que ce soit chez le maïs avec le promoteur *pNLD* ou chez l'Arabette avec le promoteur *pUB10,* les promoteurs utilisés afin d'étudier la localisation subcellulaire de la protéine sont actifs spécifiquement dans la cellule végétative et non dans les cellules spermatiques (figures III-7G, H et III-13B). En revanche, NLD ne semble pas localiser à la membrane plasmique « externe » de la cellule végétative, laissant penser à un adressage très spécifique de la protéine vers la MIV. Ces observations sont particulièrement intéressantes, compte tenu du fait que la membrane plasmique « externe » et la MIV de la cellule végétative ont toutes deux la même origine. Effectivement, la MIV s'est mise en place à partir de la membrane plasmique de la cellule végétative lors de l'invagination de la cellule générative après la deuxième mitose du pollen (voir partie I.2.2.3b). Il est donc envisageable que, par la suite, ces deux membranes se soient différenciées et aient acquis des signatures membranaires différentes (structure, composition, etc) pouvant expliquer une affinité privilégiée de NLD avec la MIV.

La dissection du mécanisme d'adressage et de la localisation subcellulaire de NLD, dans le système hétérologue *A.thaliana*, par des approches pharmacologiques et de mutagénèses dirigées, a permis de mettre en évidence l'implication de deux éléments majeurs : des sites d'ancrage d'ancres lipidiques de type S-palmitoylaytion au niveau des résidus C10 et C423 (figure III-15) et des interactions électrostatiques entre les acides aminés cationiques présents en partie C-ter de NLD et la surface des membranes électronégative (figure III-16). Ces résultats permettent d'émettre une explication probable quant à la délocalisation (en systèmes racinaire et pollinique chez *A.thaliana*) et à la déstabilisation (en système pollinique chez le maïs) de la

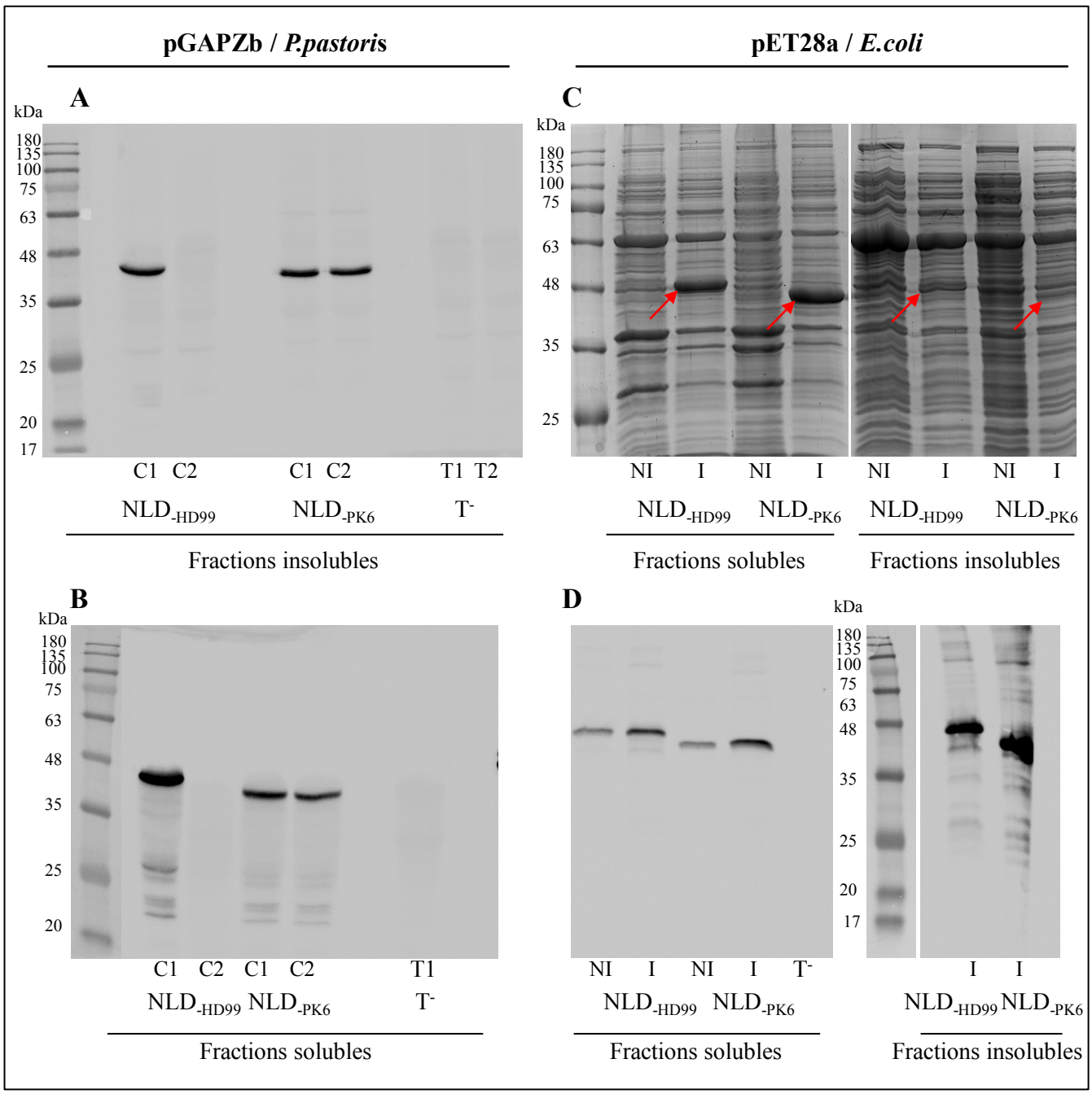


Figure III-18 : Production des deux versions de la protéine NLD ; NLD_{-HD99} (sauvage) et NLD_{-PK6} (mutante), dans deux systèmes d'expression différents.

Les deux protéines recombinantes contiennent en partie N-terminale un tag poly-histidine (6XHis). Tailles théoriques attendues : NLD_{-HD99} : 46,6 kDa et NLD_{-PK6} : 43,75 kDa.

A, B : Surexpression de *NLD* dans le système hétérologue *P.pastoris* avec le vecteur d'expression pGAPZb. Des westerns blots avec un anticorps dirigé contre le tag poly-histidine ont été réalisés sur les extraits protéiques de levures ; **A** : fractions insolubles, **B** : fractions solubles. T^- : levures non transformées. C1 et C2 : clone 1 et clone 2, T1 et T2 : témoin 1 et témoin 2.

C, D : Surexpression de *NLD* dans le système hétérologue *E.coli* (souche bactérienne Artic Express, Agilant Technologie®) avec le vecteur d'expression pET28a. **C** : Migration sur un gel SDS-PAGE des extraits protéiques réalisés sur les cultures bactériennes après induction à l'IPTG la nuit à 18°C (I, induit) et sans induction (NI, non induit), suivi d'une coloration des protéines au bleu de Coomassie. Dépôt dans des puits séparés des fractions solubles et insolubles obtenues après la lyse des bactéries. Les flèches rouges indiquent la position des protéines recombinantes. **D** : Vérification de la présence des protéines NLD dans les fractions solubles par des western blots avec un anticorps dirigé contre la poly-histidines. T^- : bactéries non transformées.

protéine tronquée NLD-PK6. L'absence de la partie C-ter de NLD enlèverait des éléments-clés (sites d'ancrage d'ancres lipidiques et charges positives) dans l'adressage de NLD aux membranes (membranes plasmiques et MIV). Il est fortement envisageable que la perte de l'adressage de NLD à la MIV ait un impact négatif sur l'intégrité de la MGU, une structure essentielle dans la coordination de la double fécondation chez les plantes.

III.2.4 - Production *in vitro* des deux versions de la protéine NLD en vue d'une caractérisation de leurs activités enzymatiques

L'identification de la protéine NLD en tant que phospholipase prédite de la famille des PLA_2 indique fortement que les substrats de NLD sont des phospholipides et soulève donc la question de leur identité. La connaissance de ces substrats ainsi que des produits résultant de l'activité enzymatique de NLD (lysophospholipides) pourrait largement contribuer à mieux comprendre sa fonction biologique et notamment au niveau de la MIV de la MGU. De même, une comparaison des activités enzymatiques entre les protéines NLD-HD99 (sauvage) et NLD-PK6 (tronquée) pourrait donner des indications supplémentaires sur l'impact de la mutation du gène *NLD* sur la protéine et les conséquences en résultant au niveau de sa fonction. Ainsi, dans le but de réaliser la caractérisation de l'activité enzymatique de NLD tout en comparant les protéines sauvage et tronquée, une collaboration a été entreprise avec l'institut de chimie et biochimie moléculaire et supramoléculaire (ICBMS) situé à l'Université Claude Bernard Lyon 1 à Lyon, sous la direction d'Alexandre Noiriel et d'Abdelkarim Abousalham.

La première étape dans la réalisation de cette caractérisation était de produire les protéines NLD-HD99 et NLD-PK6 *in vitro* afin d'avoir le matériel biologique nécessaire à la réalisation des différents tests enzymatiques. Idéalement, il est plus aisé de travailler avec des protéines qui sont produites dans le cytoplasme des cellules de l'hôte et qui se retrouveront donc dans la fraction soluble après extraction protéique et non dans la fraction insoluble, nommée le « culot ». Cependant, la conformation, les modifications post-traductionnelles et la localisation subcellulaire native des protéines peuvent interférer avec la solubilisation de celles-ci dans le cas d'un système d'expression qui ne serait pas adapté. De même, pour remplir leur fonction, les protéines doivent adopter une conformation tridimensionnelle précise, l'état natif, acquise au cours du repliement cellulaire. Cependant, dans les systèmes hétérologues, de nombreuses protéines ne vont pas être produites dans leur état natif, les conduisant à s'agréger dans un état souvent biologiquement inactif, appelé corps d'inclusion (Yang *et al.,* 2011b). Ainsi, la

production de protéines solubles dans un système hétérologue nécessite une optimisation dans le choix du système d'expression et du protocole de production.

Afin d'optimiser les chances de réussite, les deux versions du gène *NLD* ont donc été clonés chez deux systèmes d'expression de protéines recombinantes différents ; dans le vecteur pGAPZB introduit chez la levure *Pichia pastoris* et dans le vecteur pET28a introduit chez la bactérie *Escherichia coli*. Le premier système permet de produire la protéine recombinante de manière constitutive dans le cytoplasme des cellules de levures grâce au promoteur constitutif *pGAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). En revanche, le système bactérien, qui est utilisé comme alternative à une putative toxicité de l'expression constitutive de *NLD* chez la levure, permet la production de la protéine recombinante de manière transitoire grâce au promoteur T7 inductible à l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Dans les deux stratégies de surexpression initiées, un tag poly-histidines, composé de six histidines (6XHis) a été rajouté en partie N-terminale des protéines NLD en prévision des purifications à venir. Des expérimentations préliminaires ont ainsi été réalisées simultanément sur les deux systèmes d'expression, avec l'évaluation de deux paramètres : (1) la production de la protéine recombinante et (2) sa présence dans la fraction soluble après extraction protéique. Afin de répondre à ces deux premiers objectifs, l'ensemble des clonages, la production dans la bactérie et les analyses par western blots ont été réalisés au laboratoire, en revanche la production de NLD dans la levure a été réalisée par Alexandre Noiriel à l'ICBMS.

Ainsi, le système d'expression *P.pastoris* a permis la production des protéines NLD_{-HD99} et NLD_{-PK6} dans les fractions insolubles (figure III-18A) et dans les fractions solubles dans une moindre mesure (figure III-18B). Afin de vérifier cela, des analyses par western blots avec un anticorps dirigé contre le tag poly-histidines ont été initiées sur les extraits protéiques obtenus à partir des cultures de levures ayant servi à la surexpression de NLD. Il a ainsi pu être mis en évidence la présence de bandes aux tailles attendues pour un clone sur deux avec la protéine NLD_{-HD99} (46,6 kDa) et deux clones sur deux avec la protéine NLD_{-PK6} (43,75 kDa) (figure III-18A, B). En revanche, aucune bande n'a pu être identifiée avec les extraits protéiques des deux contrôles issus de culture de levures n'étant pas transformées avec le vecteur d'expression (figure III-18A, B), confirmant ainsi la spécificité des protéines identifiées avec les clones transformés. Ces analyses indiquent donc que les deux versions de la protéine NLD sont bien surexprimées dans le système hétérologue *P.pastoris* et qu'elles sont présentes dans la fraction soluble.

En ce qui concerne les tests de surexpression de la protéine NLD dans le système bactérien *E.coli*, l'évaluation de plusieurs paramètres expérimentaux (temps et température d'induction, souches bactériennes, concentration en IPTG) a dû être nécessaire avant d'arriver à

produire les protéines recombinantes. En revanche, si l'optimisation des conditions d'induction a permis la production des protéines de manière efficace, la solubilisation majoritaire de la protéine n'a pas pu être établie. En effet, après réalisation de l'extraction protéique à partir des cultures bactériennes contenant le vecteur d'expression et de leur migration sur un gel SDG-PAGE suivi d'une coloration des protéines avec du bleu de Coomassie, il s'est avéré que les protéines NLD_{-PK6} et NLD_{-HD99} étaient principalement identifiables dans les fractions insolubles avec putativement une légère production visible dans les fractions solubles (figure III-18C). Afin de vérifier la présence, même en faibles quantités, des protéines dans les fractions solubles, des analyses par western blots avec un anticorps dirigé contre le tag poly-histidines ont été réalisées. Il a ainsi pu être confirmé que malgré une production majoritairement insoluble des deux versions de NLD, une production dans la fraction soluble était tout de même effective, de par l'identification de bandes spécifiques de NLD (figure III-18D). Il est cependant à noter que ces bandes sont également observables dans les extraits protéiques provenant des cultures bactériennes non induites à l'IPTG (figure III-18D). L'optimisation du protocole de production ayant conduit à l'utilisation de souches bactériennes ne contenant pas le vecteur additionnel pLysS. Ce vecteur conduit à l'expression du lysozyme T7, qui supprime l'expression basale de l'ARN polymérase T7 avant l'induction. Ainsi, il est envisageable que les bandes observées par western blots correspondent à une expression basale de *NLD* dans les bactéries, conduisant ainsi à une production de la protéine avant l'induction. De manière intéressante, cette production basale ne semble pas avoir d'effet négatif sur les cultures bactériennes qui se sont bien développées durant l'expérimentation. En revanche, aucune bande n'a pu être identifiée avec les extraits protéiques provenant des bactéries non transformées (figure III-18D), confirmant ainsi la spécificité des bandes observées à la présence de la protéine NLD. Il sera maintenant intéressant de vérifier si cette production dans la fraction soluble est suffisante en vue de réaliser une purification de la protéine, essentielle aux analyses complémentaires.

Pour conclure, les deux versions de la protéine NLD ont pu être produites par les deux systèmes d'expression évalués au cours de ce projet. Même, si la solubilisation de celle-ci s'avère compliquée avec le système bactérien, la présence de la protéine dans la fraction soluble, même en faibles quantités devrait permettre la réalisation de la suite du projet. Dans les prochaines étapes de cette analyse, les protéines devront être purifiées. Puis, les caractérisations de l'activité phospholipase (pH optimal, tampon optimal) et de la spécificité des substrats seront réalisées par Alexandre Noiriel, avec l'aide d'une bibliothèque de substrats radioactifs. Les inhibiteurs connus des PLA_2 seront également testés dans ce test *in vitro* (Dennis *et al.,* 2011; Garcia-Garcia et Serruys, 2009), ainsi que l'effet de mutations ciblées sur les trois sites enzymatiques prédits.

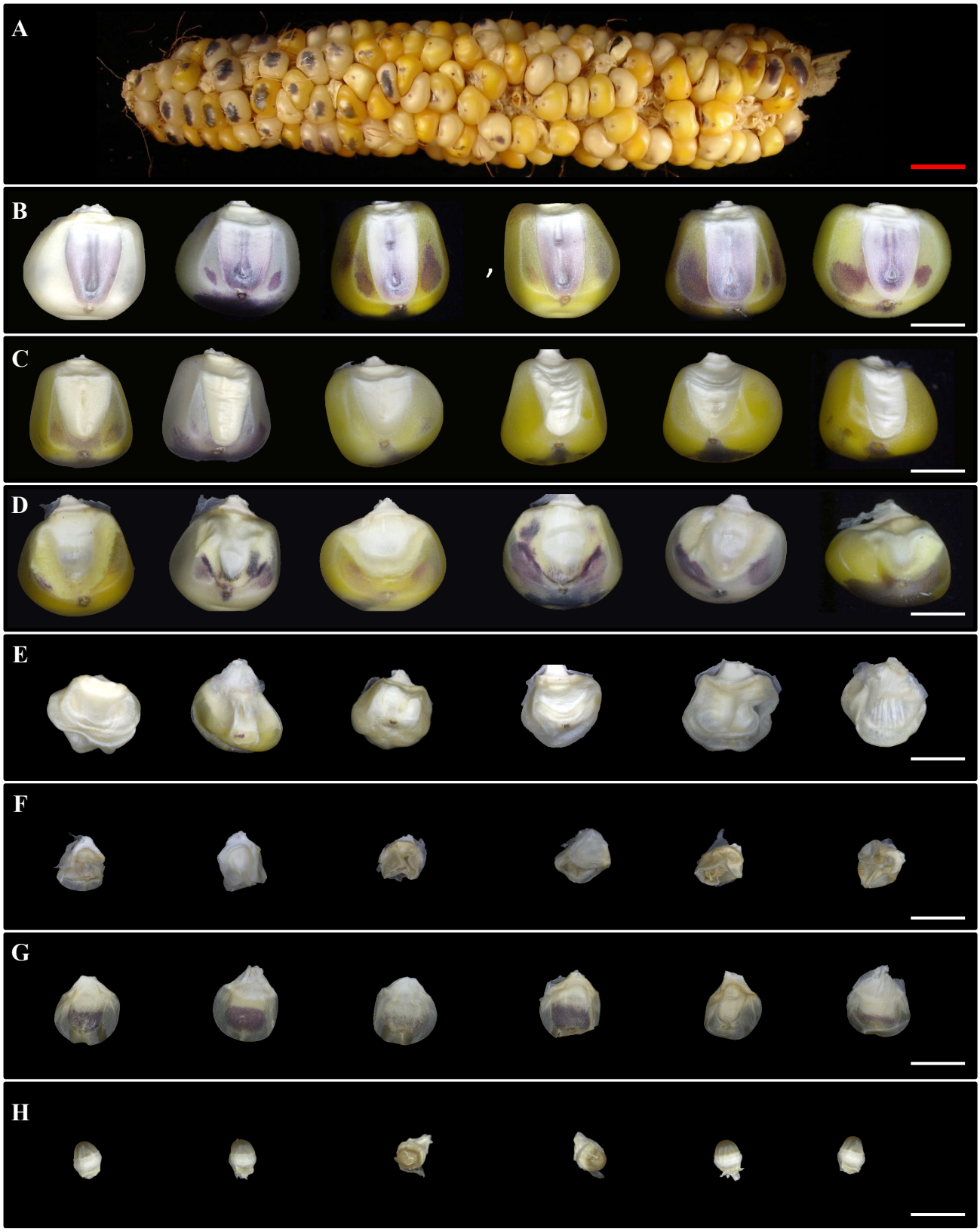


Figure III-19 : Classification des différentes catégories de grains obtenus après un croisement avec la lignée inductrice RWS contenant le gène marqueur de coloration *R1-Navajo*.
A : Epis provenant d'un croisement entre la lignée testeur « glossy » et la lignée inductrice RWS.
B-H : Classification des différents grains obtenus à partir de ce croisement. **B** : Grains prédits diploïdes avec une coloration violette au niveau de l'albumen et de l'embryon. **C** : Grains prédits haploïdes avec une absence de coloration au niveau de l'embryon mais une coloration de l'albumen. **D** : grains avec un défaut de développement de l'embryon et un développement normal de l'albumen. **E** : « Gros » grains avortés, de catégorie 1, avec un stade de développement avancé, **F** : « petit » grains avortés, de catégorie 2, avortés à un stade précoce après la fécondation, **G** : grains avortés de catégorie 3, entièrement « plats », **H** : grains « non développés ». Barres d'échelle : rouges = 2 cm, blanches = 5000 µm.

III.3 - Caractérisation des phénotypiques associés à la gynogenèse *in vivo* chez le maïs

Afin de mieux comprendre le mécanisme biologique sous-jacent à la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, plusieurs caractérisations ont été entreprises à différents niveaux incluant (i) la description de plusieurs phénotypes de grains liés à l'utilisation des inducteurs d'haploïdes, (ii) une étude du devenir du génome paternel après la fécondation avec un inducteur et (iii) une caractérisation phénotypique de l'organisation des microtubules dans les cellules spermatiques des grains de pollen inducteurs *versus* non-inducteurs.

III.3.1 - La gynogenèse *in vivo* est corrélée avec plusieurs anomalies de fécondation

D'un point de vue agronomique, l'intérêt de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs réside essentiellement dans la production de plantules haploïdes afin de réaliser les doublements des stocks chromosomiques de celles-ci et donc d'obtenir rapidement les lignées HDs fixées. Cependant, il est intéressant de noter que ce processus d'induction d'haploïdes est fortement corrélé avec l'apparition d'autres anomalies du développement des grains, incluant notamment des grains avortés plus ou moins prématurément (figure III-19E, F, G) et des grains sans développement de l'embryon malgré un développement normal de l'albumen (figure III-19D). De plus, il a été observé que les épis provenant des croisements avec les lignées inductrices présentent des taux non négligeables de grains non développés qui ressemblent fortement à des ovules non fécondés (figure III-19H). En revanche, il est difficile de savoir si les cellules œufs provenant de ces ovules ont été fécondées par une cellule spermatique, suivi d'un avortement prématuré des grains après fécondation ou si la fécondation n'a pas eu lieu. Bien que ne pouvant pas trancher entre ces deux hypothèses, afin de simplifier la description de ce phénotype, ces cas de figure seront nommés « non développés ».

Bien qu'une corrélation évidente soit observable entre la présence de grains avortés et le taux d'induction d'haploïdes (tableaux III-1, III-3, III-4), la question reste en suspens de savoir si l'ensemble des phénotypes de grains anormaux observés sont liés à la mutation du gène *NLD* ou à d'autres facteurs inconnus présents chez les lignées inductrices. Si le premier cas est avéré, l'analyse des traits phénotypiques associés à la mutation du gène *NLD,* en plus de l'induction d'haploïdes, pourrait contribuer à une meilleure compréhension du mode d'action de NLD.

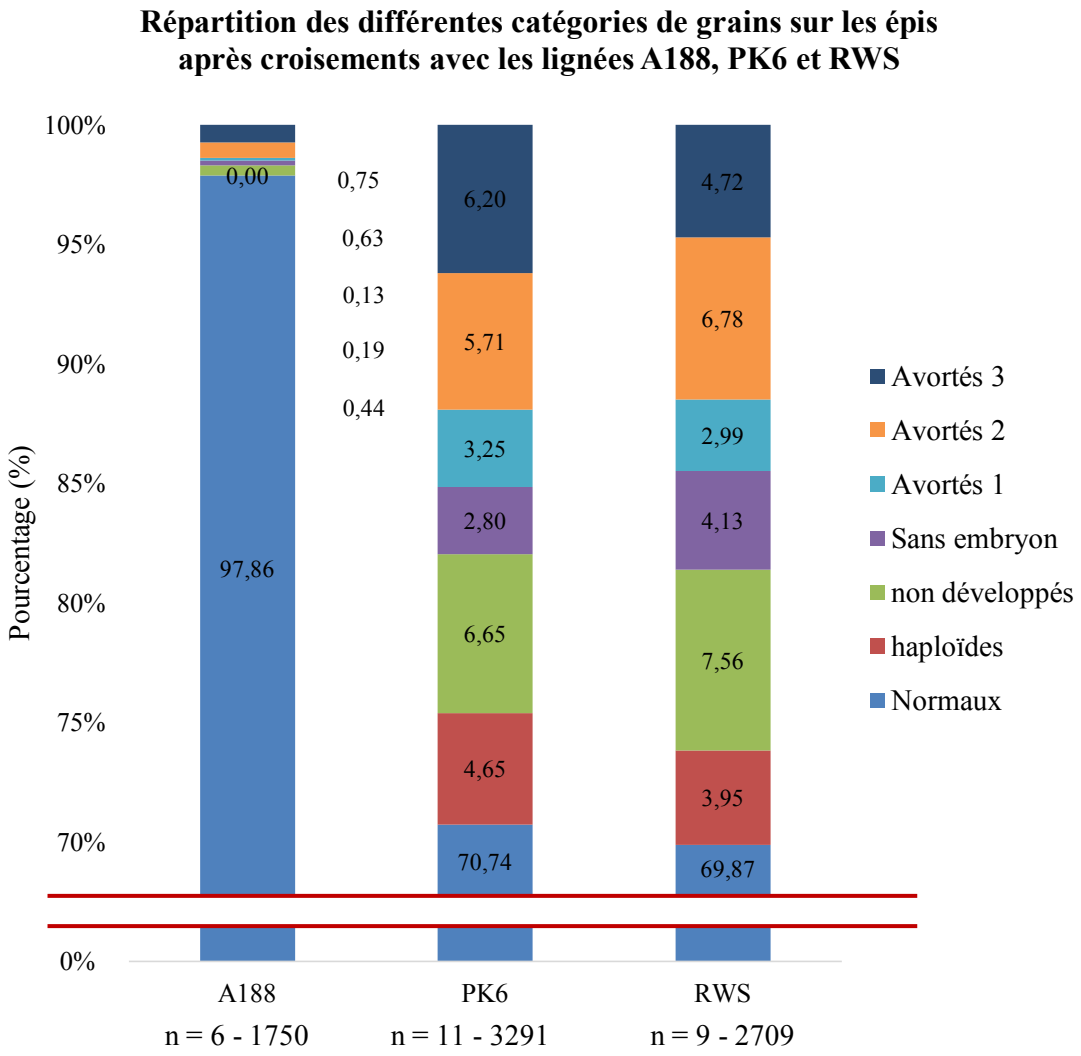


Figure III-20 : Dénombrement des différentes catégories de grains observés après croisement de la lignée testeur « glossy » avec la lignée non-inductrice d'haploïdes, A188 et les lignées inductrices d'haploïdes, PK6 et RWS.

Normaux : grains sans anomalie visible, prédits diploïdes, Haploïdes : grains prédits haploïdes. Le dénombrement des grains haploïdes et diploïdes a été réalisé par l'analyse du marqueur « glossy » pour les lignées A188 et PK6 et par analyse du marqueur *R1-nj* pour la lignée RWS. Non développés : grains « non développés » (arrêt précoce du développement ou absence de fécondation). Sans embryon : grains avec un défaut de développement de l'embryon et un développement normal de l'albumen. Avortés 1, 2 et 3 : Grains avortés des catégories ; 1 (« gros » grains avortés), 2 (« petits » grains avortés) et 3 (grains avortés « plats »). n = nombre de plantes observées - nombre de grains observés. Les barres des histogrammes ont été centrées sur les valeurs comprises entre 70% et 100% afin de faciliter la lisibilité du graphique, la séparation des barres est représentée par les deux traits rouges.

Afin de mieux appréhender les traits phénotypiques associés aux lignées inductrices, une caractérisation précise des différents types d'anomalies obtenues après les croisements avec une lignée inductrice en parent mâle a été initiée. L'ensemble de cette caractérisation s'inspire, en partie, de la classification proposée par Xu et al., (2013) et réalisée sur des épis provenant des croisements avec la lignée inductrice UH400 (Xu *et al.,* 2013). Il a ainsi été dénombré pour des épis provenant de croisements de la lignée testeur « glossy » avec deux lignées inductrices, PK6 et RWS, et une lignée non-inductrice, A188, les grains normaux (diploïdes), prédits haploïdes, avortés, sans embryon et « non développés » (figure III-19). Pour rappel, la lignée RWS contient le gène dominant marqueur de coloration *R1-Navajo* qui conduit à une coloration rouge des grains lorsque le matériel génétique provenant du père est transmis (figure III-19A, B). Les grains haploïdes provenant des croisements avec cette lignée arborent donc des embryons non colorés, puisque le génome du père est absent (figure III-19C). Les grains avortés ont été classifiés en trois catégories ; (1) : les « gros » grains avortés, résultant probablement d'un avortement/arrêt de la croissance à un stade de développement tardif (figure III-19E), (2) : les « petits » grains avortés, résultant probablement d'un avortement/arrêt de la croissance à un stade de développement précoce (figure III-19F) et (3) : les grains avortés « plats », résultant probablement d'un avortement/arrêt de la croissance à un stade de développement précoce et qui ont été comprimés par les grains adjacents (figure III-19G). Ainsi, le dénombrement des différentes catégories de grains permet de mettre en avant une corrélation évidente entre les taux d'induction d'haploïdes et les taux de grains anormaux (figure III-20). En effet, les croisements avec la lignée non-inductrice A188 produisent des épis avec des taux très faibles de grains avortés et sans embryon ainsi que de grains non développés, contrairement aux croisements avec les lignées inductrices PK6 et RWS qui produisent des épis contenant beaucoup de grains anormaux (figure III-20). Par exemple, les taux de grains avortés, toutes catégories confondues, sont pour les épis résultant des croisements avec les lignées PK6 (n=3291) et RWS (n=2709) respectivement de 15,16% et de 14,00%, nettement supérieurs aux taux d'induction d'haploïdes qui sont de 4,65% et de 3,95% (figure III-20). Il est important de noter que les taux d'individus haploïdes putatifs observés pour les croisements avec ces lignées, sont inférieurs à ceux évalués lors des différentes expérimentations réalisées dans ce projet (figures III-1, III-20, tableau III-1) et présents dans la bibliographie (Barret *et al.,* 2008). Cela peut être expliqué par le fait que ces taux d'induction ont été calculés sur l'ensemble des grains présents sur les épis provenant des croisements avec la lignée testeur, grains anormaux compris, alors qu'usuellement les HIRs sont calculés sur le total des grains normaux (diploïdes) additionnés aux grains haploïdes, sans prendre en compte les autres grains anormaux. Afin d'illustrer cela, les HIRs calculés en ne

prenant en compte que les grains haploïdes et les grains normaux issus des croisements avec les lignées PK6 et RWS sont respectivement de 6,57% (153 haploïdes sur 2481 grains au total) et 5,65% (107 haploïdes sur 2002 grains au total).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats suggère que les grains haploïdes ne représentent qu'une sous-partie seulement des phénotypes de grains associés à l'utilisation des lignées inductrices d'haploïdes. Il serait maintenant intéressant d'évaluer si ces phénotypes de grains sont liés à la mutation du gène *NLD*. Pour cela, une étude similaire à celle réalisée avec les lignées A188, PK6 et RWS pourrait être envisagée avec les lignées isogéniques, contenant des allèles *NLD* mutés, avec la technologie CRISPR-Cas9. Des premiers éléments de réponse ont déjà été apportés par l'analyse de ces lignées, puisqu'il a pu être démontré que la mutation du gène *NLD* était responsable de la production de grains avortés (quantification globale de toutes les catégories de grains avortés). En effet, il a pu être mis en évidence la présence de nombreux grains de ce type sur les épis provenant des croisements avec les lignées *crinld*, mutantes pour *NLD*, utilisées en parent mâle (tableau III-7). De même, des études préliminaires réalisées avec l'évaluation des taux d'induction de grains avortés des lignées d'introgression de l'allèle $NLD\text{-}_{PK6}$ (mutant) dans le fonds génétique non-inducteur d'haploïdes A188 et de l'allèle $NLD\text{-}_{A188}$ (sauvage) dans le fonds génétique inducteur d'haploïdes PK6 soutiennent les résultats obtenus avec les lignées *crinld* (partie I.1.2, figure III-2, tableau III-3). En effet, pour chaque rétrocroisement réalisé, les plantes-sœurs arborant l'allèle $NLD\text{-}_{PK6}$ ont des taux d'induction de grains avortés nettement supérieurs à ceux des plantes-sœurs arborant l'allèle $NLD\text{-}_{A188}$ (tableau III-3). Cela signifie que les phénotypes causés par la mutation du gène *NLD* chez les lignées inductrices ne se limitent pas aux 5-15% de grains ayant des embryons haploïdes, usuellement considérés, mais s'entendent aux autres cas observés, incluant de manière certaine les grains avortés. De même, il est envisageable que parmi les différentes catégories de grains anormaux (grains avortés, grains sans embryon, grains « non développés »), certains aient également des embryons haploïdes qui auraient avorté précocement. Dans ce cas, une estimation à la hausse des taux d'induction d'haploïdes pourrait alors être envisagée. L'ensemble de ces résultats permettent d'appréhender l'implication de la mutation du gène *NLD* au-delà de la gynogenèse *in vivo* et donc d'entrevoir son implication à plusieurs niveaux dans les processus de reproduction et de double fécondation chez le maïs.

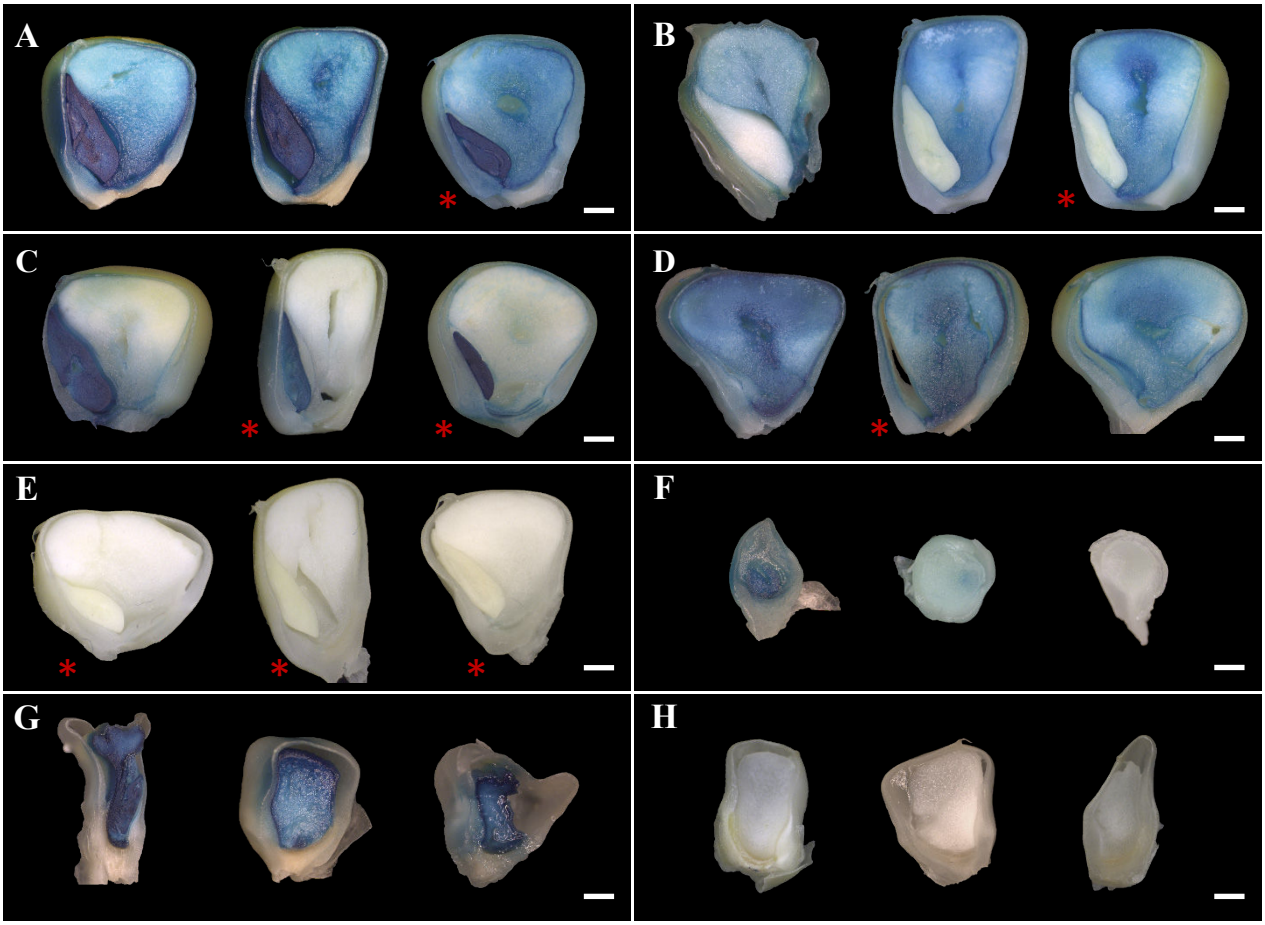
III.3.2 - Devenir du génome paternel des grains provenant des croisements avec les inducteurs mâles

En confrontant les résultats présentés dans la partie ci-dessus à la lumière de différentes études ayant mis en avant la présence de fragments chromosomiques paternels, provenant des inducteurs, dans certaines cellules des embryons et des albumens (Li *et al.,* 2017; Zhao *et al.,* 2013), la question peut être soumise du devenir du génome paternel lors du processus de gynogenèse *in vivo*. En effet, l'une des hypothèses évoquées dans la littérature pouvant expliquer la formation d'embryons haploïdes serait l'élimination progressive du génome paternel durant les mitoses embryogéniques, après une fécondation normale de la cellule œuf (voir partie I.4.4). Dans ce contexte, l'hypothèse peut être émise que la mutation *nld* pourrait aboutir à la formation d'embryons ou d'albumens aneuploïdes (dans cette étude ce terme désigne les individus avec des anomalies chromosomiques), conduisant à des phénotypes de grains anormaux plus ou moins marqués en fonction du degré d'aneuploïdie jusqu'à atteindre le stade « embryons haploïdes » lors d'une élimination complète. Afin de tester cette hypothèse, une étude a été réalisée dans le but de rechercher dans la descendance provenant d'un croisement avec une lignée inductrice ; d'une part, des traces du génome paternel parmi les individus *a priori* haploïdes et d'autre part, des aneuploïdes parmi les individus *a priori* normaux (diploïdes). Pour cela, deux approches différentes et complémentaires ont été entreprises ; l'une basée sur l'analyse de grains immatures (figures III-21-23, tableau III-8) et l'autre sur l'analyse de jeunes plantules provenant du croisement avec des lignées inductrices (figure III-24, tableau III-8).

III.3.2.1 - Devenir du génome paternel dans les grains immatures

L'analyse des grains immatures a été réalisée *via* l'utilisation d'une nouvelle lignée inductrice d'haploïdes, générée au sein du laboratoire, permettant de suivre plus facilement et visuellement le génome paternel inducteur. Cette lignée contient le gène rapporteur *GUS* sous contrôle du promoteur constitutif *pACTIN*. Elle provient du croisement de la lignée PK6 avec une lignée transgénique comprenant le gène *GUS* dans un fonds génétique non inducteur (lignée donnée par Thomas Dresselhaus). Les plantes utilisées pour les croisements proviennent des générations F4 ou F5, c'est la dire les 3ème ou 4ème générations d'autofécondations après la réalisation de l'hybride. Les génomes doivent donc être majoritairement fixés, bien qu'une certaine variabilité entre les différentes plantes-sœurs puisse encore exister.

Le taux d'induction d'haploïdes de cette nouvelle lignée a préalablement été vérifié par l'analyse d'épis provenant de croisements contrôles avec la lignée testeur « glossy » et est de



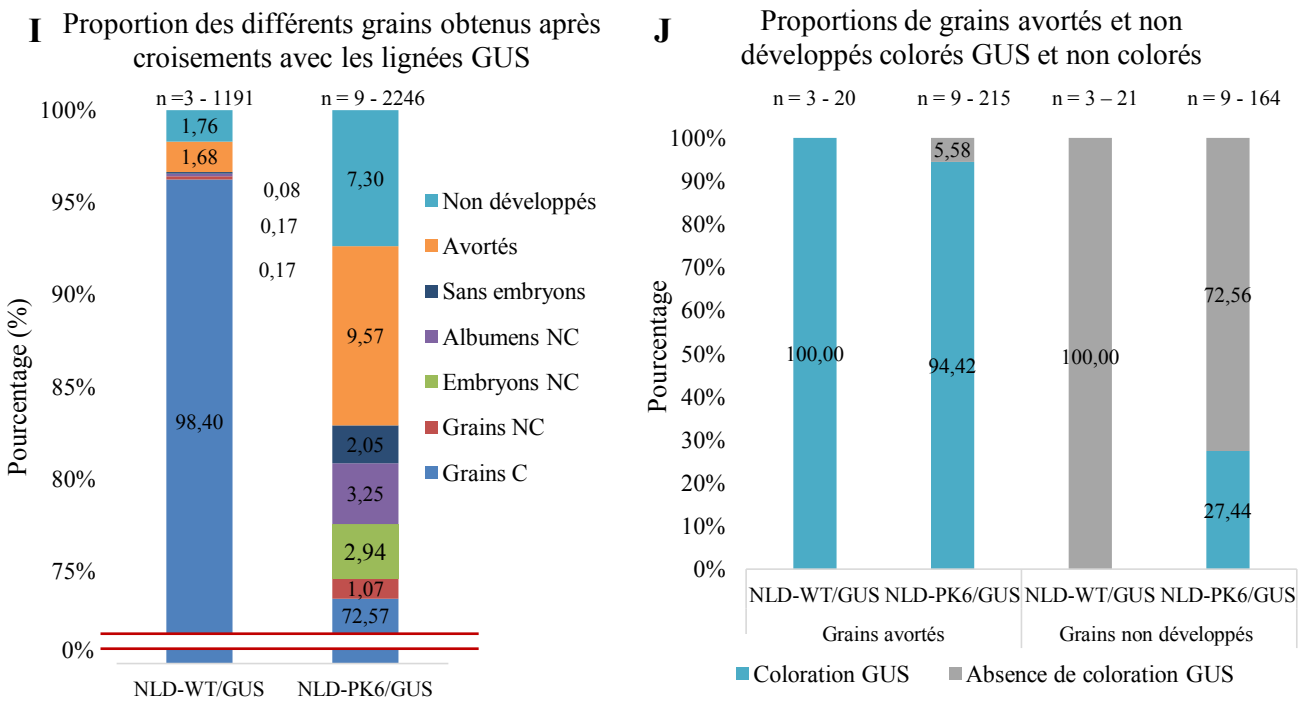


Figure III-21 : Classification des différentes catégories de grains obtenus après croisement avec les lignées rapportrices GUS inductrices et non-inductrices d'haploïdes. A-H : Observation des grains provenant du croisement de la lignée testeur « glossy » avec la lignée « GUS inductrice » après révélation histochimique GUS. Les astérisques (*) indiquent des grains de 16 jours après pollinisation (JAP), les autres sont de 20 JAP. Identification de grains **A** : normaux avec coloration de l'embryon et de l'albumen, **B** : putativement haploïdes avec absence de coloration de l'embryon et coloration de l'albumen, **C** : avec absence de coloration de l'albumen et coloration de l'embryon, **D** : sans embryon, avec coloration de l'albumen, **E** : non colorés, **F** : « non développés » dont certains sont colorés, **G** : avortés colorés, **H** : avortés non colorés. Barres d'échelle = 1mm. **I** : Proportions des différentes catégories de grains provenant des croisements avec les lignées « GUS inductrice » et « GUS non-inductrice ». C = coloré GUS, NC = non coloré. Les barres des histogrammes ont été centrées sur les valeurs entre 70% et 100% afin de faciliter la lisibilité, la séparation des barres est représentée par les deux traits rouges. **J** : Proportions de grains colorés GUS et non colorés parmi les grains avortés et non développés. n = nombre de plantes observées - nombre de grains observés.

2,17% (18 haploïdes identifiés sur 828 grains observés). Ce taux d'induction d'haploïdes est relativement faible en comparaison avec celui de PK6 (tableau III-1), surement en raison de l'influence du fonds génétique utilisé pour la génération des lignées, mais reste suffisant élevé pour la mise en place de l'expérimentation. Ainsi, après la validation de la capacité d'induction du nouvel « inducteur GUS » généré, des croisements ont été réalisés avec la lignée testeur « glossy » et des grains immatures ont été prélevés entre 16 et 20 jours après pollinisation (JAP), puis phénotypés *via* une analyse histochimique GUS. En parallèle, afin de s'assurer de la spécificité des phénotypes étudiés à la lignée inductrice, des croisements avec la lignée testeur ont également été réalisés avec une lignée « non-inductrice GUS » utilisée en parent mâle. Cette lignée possède le même fonds génétique que la lignée « inductrice GUS », à la différence près qu'elle contient l'allèle *NLD* sauvage et non l'allèle *NLD* mutant (plantes-sœurs). Dans le cas d'une double fécondation normale d'une femelle sauvage, l'embryon et l'albumen, après révélation histochimique GUS, seront normalement tous les deux colorés en bleu, de par la présence du gène *GUS* paternel. En revanche, pour les grains résultant de la gynogenèse *in vivo*, une absence de coloration GUS dans l'embryon est attendue, de par une absence du gène *GUS* paternel. L'analyse de grains immatures (n=2246) provenant des croisements de la lignée testeur avec la lignée « inductrice GUS » en mâle a permis de confirmer cette prédiction puisque 72,52% de grains entièrement colorés et 2,94% de grains avec des embryons blancs ont pu être dénombrés (figure III-21A, B, J). Comme précédemment observé avec les lignées inductrices RWS et PK6 (figures III-19, 20), différentes catégories de grains anomaux ont également pu être dénombrées, incluant : 2,05% de grains sans embryon, 7,30% de grains « non développés » et 9,57% de grains avortés (figure III-21D, F-I). Il est intéressant de noter que les grains sans embryon semblent tous *a priori* avoir des albumens normalement fécondés, de par la présence d'une coloration bleue (figure III-21D), caractéristique de l'expression du gène *GUS* provenant du père. En revanche pour les grains avortés et les grains non développés des résultats plus variés ont pu être observés (figure III-21F-J). En effet, les grains avortés présentent une coloration histochimique GUS dans 94,42% des cas analysés et sont non colorés dans 5,58% (n= 215) (figure III-21G, H, J), suggérant une fécondation de l'albumen dans la majorité des situations. Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils permettent de réfuter l'hypothèse que les grains avortés proviendraient, en opposition aux grains haploïdes, d'une absence de génome paternel dans l'albumen, conduisant à la formation d'albumens diploïdes non viables. En revanche, il est envisageable que ces grains résultent d'un défaut de fécondation, conduisant à des anomalies de ploïdie et donc à des phénotypes plus ou moins marqués selon le degré de l'anomalie. En ce qui concerne les 9,57% de grains « non développés » observés lors des

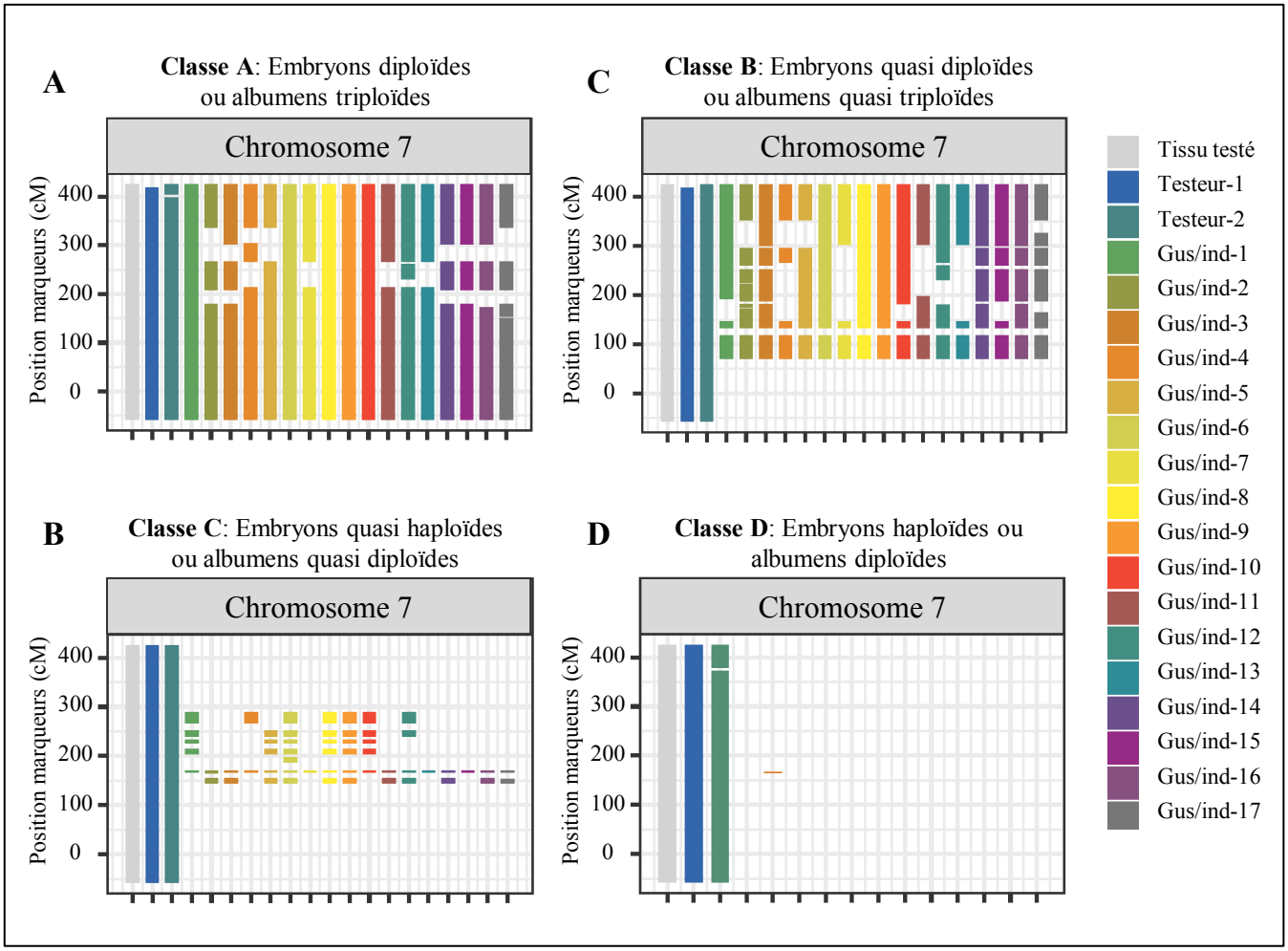


Figure III-22 : Illustration des quatre grandes classes de profils alléliques observables sur des embryons et des albumens obtenus après croisement avec les lignées « inductrices GUS ».
Suite aux croisements de la lignée testeur « glossy » avec des plantes inductrices contenant le gène *GUS* (« GUS/ind ») (utilisées comme parents mâles), différents tissus des grains issus de la descendance ont été génotypés : embryons, albumens, grains avortés entiers. Ces tissus correspondent à la catégorie « tissus testés » = histogrammes gris. Des génotypages à partir de prélèvements foliaires des plantes parentales (2 testeurs femelles et 17 inducteurs mâles) ont également été réalisés = histogrammes colorés. Les échantillons ont été génotypés à l'aide de puces à ADN contenant environ 20 000 marqueurs moléculaires et couvrant les 10 chromosomes (Affymetrix ®). Les axes des ordonnés correspondent à la répartition des marqueurs moléculaires sur les chromosomes représentés en centiMorgan (cM). Le chromosome n°7, pour plusieurs tissus indépendants, est montré à titre d'exemple afin d'illustrer les quatre grandes classes de profils alléliques identifiées. Lorsqu'une portion du chromosome est colorée cela signifie que les marqueurs moléculaires parentaux peuvent expliquer l'allèle du tissu testé (gris). En revanche, l'absence de coloration signifie que l'allèle parental ne peut pas expliquer l'allèle du tissu testé.
A : Individus de classe « A » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu diploïde (embryons) ou triploïde (albumens) et ne présentant pas d'anomalie identifiable, servant donc de références.
B : Individus de classe « B » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu quasi diploïde (embryons) ou quasi triploïde (albumens) avec quelques portions de génome non explicables par le génome paternel.
C : Individus de classe « C » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu quasi-haploïde (embryons) ou quasi diploïde (albumens). Les haplotypes ne sont majoritairement pas expliqués par le génome paternel.
D : Individus de classe « D » pour lesquels les marqueurs moléculaire révèlent un tissu haploïde (embryons) ou diploïde (albumens). Les haplotypes ne sont pas expliqués par le génome paternel.

croisements de la lignée testeur avec des « inducteurs GUS », il est intéressant de noter qu'un pourcentage important (27,44%, n=164) d'entre eux présentent une coloration GUS, contrairement aux grains « non développés » identifiés sur les épis provenant d'un croisement avec la lignée « GUS non-inductrice » contrôle qui ne présentent pas de coloration GUS (à noter cependant que les effectifs de grains « non développés » sur les épis provenant de ces croisements sont faibles (n=21)) (figure III-21F, J). Ces résultats suggèrent que ces grains colorés classés comme « non développés » ne proviennent pas dans tous les cas d'une absence de fécondation mais dans certains cas d'un avortement dans les étapes précoces de l'embryogenèse. De façon étonnante, l'utilisation de cette lignée « inductrice GUS » permet de mettre en évidence des cas de grains anormaux non répertoriés précédemment. En effet, 3,25% de grains avec des albumens non colorés mais avec un embryon coloré GUS et 1,07% de grains entièrement non colorés ont également été identifiés (figure III-21C, E, I). En revanche, aucun grain de ce type n'a pu être observé avec les épis provenant des croisements avec la lignée contrôle « GUS non-inductrice » (figure III-21I), suggérant une spécificité de ces phénotypes liée à l'utilisation des lignées inductrices. Il est envisageable que ces grains résultent d'une fécondation anormale, avec une putative absence/élimination du gène *GUS* paternel dans l'albumen dans le premier cas et dans l'albumen et dans l'embryon dans le second cas.

L'ensemble de ces observations consolident celles réalisées dans la partie précédente (figures III-19, III-21) en mettant en évidence un large panel de phénotypes spécifiquement trouvés lors de croisements réalisés avec des lignées inductrices. Afin d'aller plus loin dans cette analyse et d'éclaircir la nature de ces grains anormaux, une caractérisation et une quantification relative du génome paternel ont été entreprises (figures III-22, III-23, tableau III-8). Pour cela, des prélèvements de fragments d'embryons et d'albumens (lorsque cela était possible) ont été réalisés sur les différentes catégories de grains immatures afin de les génotyper avec des puces à ADN (Affymetrix ®), comprenant environ 20 000 marqueurs moléculaires (20K) repartis sur l'ensemble du génome du maïs (plate-forme de génotypage de Limagrain Europe). Il est à noter que les grains utilisés pour cette analyse sont les mêmes que ceux phénotypés précédemment (les autres moitiés des grains), ce qui permet de faire une corrélation entre les phénotypes et les génotypes obtenus. Les analyses des jeux de données ainsi générés ont été réalisées avec l'aide d'Aurélien Audes, biostatisticien chez Limagrain Europe (figures III-22, III-23, tableau III-8). La méthode bioinformatique mise en place vise à comparer les allèles présents dans les tissus analysés par rapport aux allèles parentaux, qui ont été générés à partir du génotypage d'ADN foliaires des parents ayant servi pour les croisements (la lignée testeur « glossy » utilisée en parent femelle et la lignée « inductrice GUS » utilisée en parent mâle). Cette méthode permettra

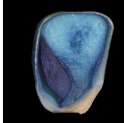
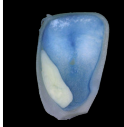
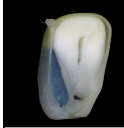
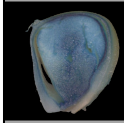
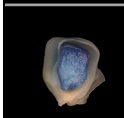
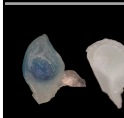
Phénotypes			Génotypes					
Profil	**Tissus**	**Révélation GUS**	**Classe A**	**Classe B**	**Classe C**	**Classe D**	**Total**	**ND**
	Embryon	positif	58	2	0	0	60	7
	Albumen	positif	48	17	1	0	66	1
	Embryon	négatif	7	3	2	38	50	1
	Albumen	positif	35	10	0	0	45	6
	Embryon	positif	55	2	0	0	57	0
	Albumen	négatif	23	32	0	0	55	2
	Embryon	négatif	12	0	0	1	13	0
	Albumen	négatif	5	6	0	0	11	2
	Albumen	positif	13	7	0	0	20	3
	Albumen	positif	2	8	27	0	37	2
	Grain entier	toutes catégories	0	0	0	10	10	3
Plantes « non glossy »	Feuille	X	155	0	0	0	155	4
Plantes «non glossy petit »	Feuille	X	18	0	0	0	18	1
Plantes « glossy »	Feuille	X	0	0	0	1	17	0

Tableau III-8 : Dénombrement des différents profils alléliques observables sur des individus obtenus après des croisements avec les lignées inductrices PK6 et « inductrice GUS ».
Les grains et les plantules proviennent de croisements entre la lignée testeur « glossy » et respectivement les lignées « inductrice GUS » et PK6. Les phénotypages des grains ayant servi pour cette analyse sont présentés dans les détails dans la figure III-22.
Les différents tissus prélevés (fragments d'embryons, d'albumens, de grains ou de feuilles) ont été génotypés avec des puces à ADN environ 20 000 marqueurs moléculaires répartis sur les 10 chromosomes (Affymetrix ®). Les données « révélation GUS » correspondent aux résultats de la coloration histochimique GUS sur les différents échantillons ; positif : présence d'une coloration histochimique GUS, négatif : absence de coloration.
Les classes « A » à « D » correspondent aux quatre groupes de profils alléliques observés chez les différents individus analysés, en fonction de la classification proposée dans la figure III-23.
ND: Non Disponible.

de vérifier que les allèles parentaux peuvent bien expliquer les allèles obtenus dans la descendance (grains) et de mettre en évidence les profils alléliques anormaux. Il est à noter que les grains analysés proviennent de différents croisements réalisés avec six plantes-sœurs « inductrices GUS » afin d'avoir les effectifs de grains à analyser souhaités. Ainsi, dans le but d'avoir une représentation de la quasi-exhaustivité des allèles paternels possibles, 17 plantes-sœurs différentes ont été génotypées, dont certaines n'ont pas servi pour les croisements. Une certaine variabilité génétique, bien que moindre, est observée entre ces différentes plantes-sœurs (figure III-22A). En ce qui concerne les parents femelles testeurs, issus d'une hybridation et donc tous identiques hétérozygotes, deux plantes différentes ont été génotypées (figure III-22A). La comparaison pour chaque individu avec les allèles paternels a été réalisée dans un premier temps d'un point de vue global avec toutes les plantes-sœurs, puis plus spécifiquement avec la plante utilisée comme parente mâle correspondante. Globalement, les résultats obtenus convergent vers les mêmes conclusions.

L'analyse des grains provenant des différentes catégories phénotypiques a ainsi permis de mettre en évidence plusieurs anomalies chromosomiques se caractérisant majoritairement par l'incapacité plus ou moins marquée des allèles paternels à expliquer les allèles des descendants. Ces anomalies ont été classées en différentes classes définies en fonction de la quantité relative de génome des descendants explicable par le génome paternel, c'est-à-dire en comparaison aux individus normaux de classe « A » pour lesquels l'ensemble des marqueurs moléculaires révèlent un tissu diploïde (embryons ou triploïde (albumen) (figure III-22A). Ainsi, il a pu être identifié des individus dit : de classe « B » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu quasi diploïde ou quasi triploïde avec quelques portions de génome non explicables par le génome paternel (figure III-22B), de classe « C » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu quasi haploïde (embryon) ou quasi diploïde (albumen), dont le génome n'est majoritairement pas explicable par le génome paternel (figure III-22C) et de classe « D » pour lesquels les marqueurs moléculaires révèlent un tissu haploïde (embryon) ou diploïde (albumen), ne contenant pas de génome paternel (figure III-22D). La classification des différents tissus analysés en fonction de ces classes fait ressortir plusieurs points intéressants (tableau III-8) :

(1) : Parmi les grains identifiés comme *a priori* normaux avec les tests histochimiques GUS, c'est-à-dire avec une coloration à la fois de l'albumen et de l'embryon (figure III-22A), la majorité sont normaux et ne présentent donc pas d'absence de génome paternel (classe A) (tableau III-8). En revanche, certains grains présentent des défauts alléliques avec des fractions génomiques non explicables par le génome paternel. En effet, sur les 66 grains analysés, 2 embryons se sont avérés avoir des anomalies de classe « B », 17 albumens des anomalies de

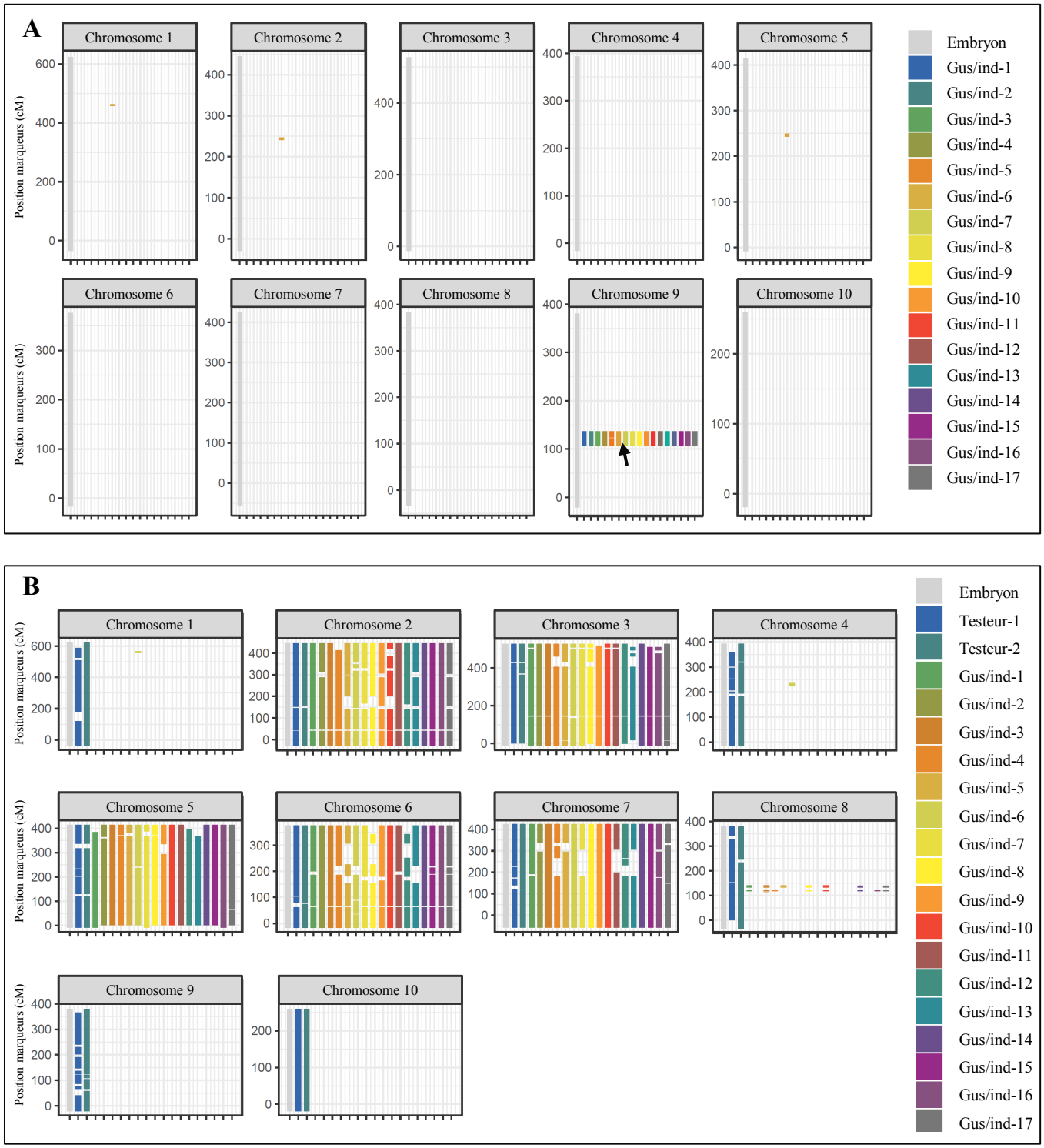


Figure III-23 : Deux profils alléliques atypiques obtenus dans la descendance issue de la lignée « inductrice GUS ». Les profils présentés proviennent du génotypage de fragments d'embryons issus du croisement entre la lignée testeur « glossy » et la lignée « inductrice GUS » et présentant, après révélation histochimique GUS, une absence de coloration de l'embryon et une coloration de l'albumen. Les embryons ont été génotypés à l'aide de puces à ADN contenant environ 20 000 marqueurs moléculaires et couvrant les 10 chromosomes (Affymetrix ®) = histogrammes gris. Deux plantes testeurs différentes et 17 plantes-sœurs « inductrices GUS » (Gus/ind) ont été génotypées à titre de référence = histogrammes colorés, mais les parents mâles utilisés pour le croisement sont les Gus/ind-3 (A) et Gus/ind-15 (B). Lorsqu'une portion du chromosome est colorée cela signifie que les marqueurs moléculaires parentaux peuvent expliquer l'allèle du tissus testés (gris). En revanche, l'absence de coloration signifie que l'allèle parental ne peut pas expliquer l'allèle du tissus testé. Les axes des ordonnés correspondent à la répartition des marqueurs moléculaires sur les chromosomes, représentés en centiMorgan (cM). **A** : Embryons de classe « C », quasi haploïde mais avec un fragment de chromosome paternel indiqué par la flèche noire. **B** : Embryon aneuploïde, avec une absence du génome paternel pour les chromosomes n°1, 4, 8, 9 et 10

classe « B » et 1 albumen une anomalie de classe « C » (tableau III-8). Ces résultats laissent envisager que quelques cas d'aneuploïdies se produisent lors des croisements avec les lignées inductrices, bien qu'avant de conclure cette analyse devra être conduite avec des lignées non-inductrices d'haploïdes afin de vérifier que ces cas d'aneuploïdes ne se produisent pas également.

(2) : La majorité des grains ne présentant pas de coloration GUS, dû à l'absence du gène *GUS* paternel, dans l'embryon mais une coloration dans l'albumen (figure III-22B) ne contiennent aucune trace de génome paternel dans l'embryon (38 grains sur 50), confirmant ainsi leurs statuts d'haploïdes (tableau III-8). En revanche, parmi ces embryons, 7 sur 50 se sont avérés avoir des profils alléliques de classe « A », c'est-à-dire identiques à un grain normalement fécondé (tableau III-8). Trois hypothèses sont alors envisageables afin d'expliquer cette absence de coloration dans ces embryons malgré un profil allélique conventionnel ; (1) une interprétation erronée du phénotype GUS de ces grains due, par exemple, à un défaut lors de la révélation histochimique (mauvaise imprégnation du substrat dans les tissus, coloration trop faible pour être visible, etc.), (2) un « silencing » du gène *GUS* dans ces tissus, (3) une élimination très ciblée du génome paternel, non détectable par les méthodes d'analyse et spécifiquement au niveau du gène *GUS* paternel. De plus, il est également intéressant de noter que parmi les 50 embryons de cette catégorie de grains génotypés, trois sont de classe « B » (quasi diploïde) et deux sont de classe « C » (quasi haploïde) (tableau III-8). Parmi eux, deux se sont révélés particulièrement intéressants en raison de profils alléliques atypiques (figure III-23). Le premier grain présente un fragment chromosomique sur le chromosome n°9, d'approximativement 40 cM, qui contient du génome paternel (figure III-23A). A titre d'indication, 24% de marqueurs moléculaires hétérozygotes et justifiables par l'allèle paternel ont été identifiés parmi les 515 présents dans cette région (résultats non montrés). Les 76% de marqueurs homozygotes sont également explicables par l'allèle paternel, confirmant que cette région contient bien du génome provenant du père. Ces résultats suggèrent donc que ce grain provient d'une fécondation avec la lignée « inductrice GUS » et non d'une absence de fécondation et qu'une probable élimination du génome paternel a par la suite été initiée. Le second grain atypique identifié contient uniquement la moitié de son nombre de chromosomes explicable par le génome paternel (Chr. 2, 3, 5, 6 et 7) alors que l'autre moitié est exclusivement maternelle (Chr. 1, 4, 8, 9, 10), le classant ainsi dans la catégorie des grains aneuploïdes et non des grains haploïdes (figure III-23B). Il est alors fortement envisageable que le gène *GUS* paternel, responsable de la coloration n'ait pas été transmis à ce grain, entraînant ainsi un phénotype d'absence de coloration GUS dans l'embryon. En ce qui concerne les albumens de ces grains, contenant des embryons non colorés GUS, la

majorité est de type « A » (sans anomalie) et 10 sur 44 ont une structure aneuploïde de classe « B », dans les mêmes proportions que celles observées avec les grains « normaux » (point (1)).

(3) : En ce qui concerne les grains ayant des phénotypes opposés à ceux des grains présentés dans le point (2), c'est-à-dire avec une absence de coloration de l'albumen et une coloration normale de l'embryon (figure III-21C), comme attendu la majorité des embryons contenant le gène *GUS* paternel présentent des profils de génotypage normaux de type « A » (55 embryons sur 57) (tableau III-8). En revanche, l'analyse des albumens de ces grains révèle majoritairement des défauts de classe « B » (32 grains sur 55), avec donc la présence de fragments génomiques non explicables par le génome paternel (tableau III-8). Ces résultats indiquent deux points importants ; (i) ces albumens non colorés ne résultent pas, en raison de la présence majoritaire du génome paternel, d'une absence de fécondation ou d'une élimination totale du génome paternel, comme cela peut l'être envisagé avec les embryons haploïdes et (ii) il est fortement envisageable que le locus du gène *GUS* paternel soit absent dans ces grains, justifiant ainsi l'absence de coloration. Concernant les 23 grains de classe « A » identifiés, les mêmes hypothèses que celles faites pour les embryons non colorés de classe « A » peuvent être émises, c'est-à-dire soit un défaut de phénotypage, soit un « silencing » du gène *GUS* ou soit une absence très ciblée de génome paternel, non détectable par génotypage.

(4) : Les grains entièrement non colorés (figure III-21E), qui auraient pu être considérés comme des grains résultant d'une fécondation avec un grain de pollen contaminant extérieur, s'avèrent être en réalité, pour la majorité, normalement fécondés au niveau de l'embryon avec 12 embryons sur 13 de classe « A » (tableau III-8). Le 13ème embryon s'est révélé être un grain de classe « D », donc haploïde, avec un défaut au niveau de l'albumen de classe « B », conduisant probablement à une absence du gène *GUS* paternel dans ce tissu. Si la majorité des embryons se sont avérés normaux, la moitié des albumens correspondants présentent des anomalies de classe « B » (tableau III-8), pouvant justifier l'absence de coloration dans ces albumens.

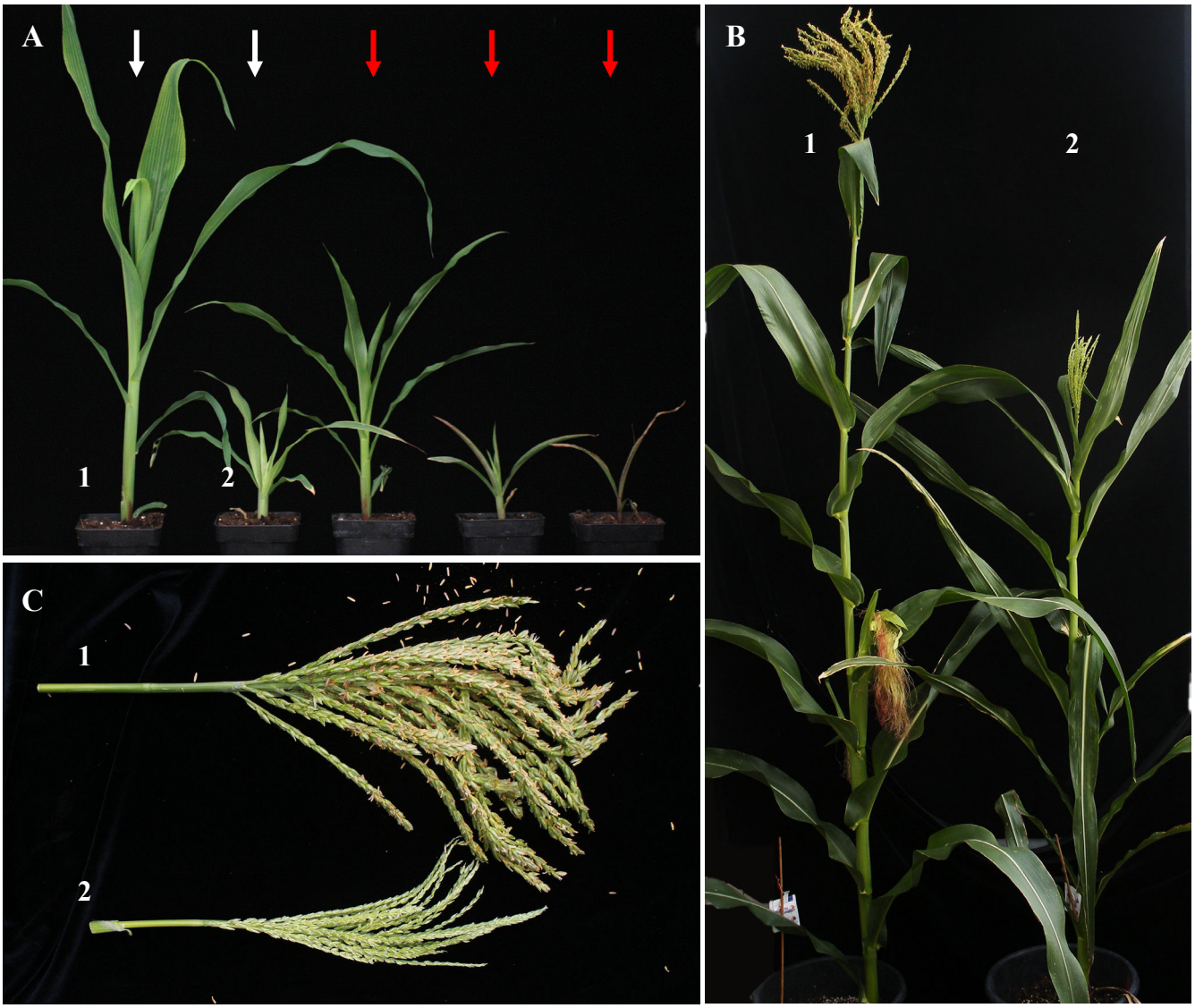
(5) : Les grains avec une absence de développement de l'embryon et un développement normal de l'albumen (figure III-21D) présentent pour la majorité d'entre eux des albumens normaux, de classe « A » (tableau III-8), indiquant que l'absence de l'embryon n'est pas corrélée avec une absence totale de fécondation à l'échelle du grain entier.

(6) : Pour finir, les grains avortés (figure III-21E-H) présentent des profils alléliques particulièrement intéressants, puisque 27 grains sur 37 sont de classe « C », c'est-à-dire avec un profil allélique paternel n'expliquant majoritairement pas les profils alléliques des descendants et 8 sont de classe « B », avec des anomalies mineures (tableau III-8). Il est envisageable que

l'absence importante du génome paternel dans les albumens de ces grains entraîne leurs avortements prématurés. En revanche, la présence d'une coloration GUS dans l'ensemble des grains génotypés indique qu'il y a bien eu fécondation et qu'une région du génome paternel doit donc être intégrée afin de permettre l'expression du gène *GUS*. En ce qui concerne les grains « non développés », les 10 grains analysés ne contiennent pas trace de génome paternel (tableau III-8). En revanche, de par les faibles effectifs il est difficile de faire une conclusion et de définir une tendance générale, d'autant plus en raison du pourcentage non négligeable (72,56%, n=164) de grains de ce type apparus positifs à la coloration GUS (figure III-21J).

III.3.2.2 - Devenir du génome paternel dans les jeunes plantules

Dans un second temps, une étude du devenir du génome paternel, similaire à celle réalisée avec les grains immatures, a été conduite sur des jeunes plantules provenant du croisement avec une lignée inductrice d'haploïdes. Cette étude pourra donner des indications sur le devenir du génome paternel lors de la croissance des plantes. Ainsi, une population de plantules provenant du croisement entre la lignée testeur « glossy » en femelle et la lignée inductrice PK6 en mâle a été étudiée sur au niveau phénotypique durant le premier mois de développement des plantes (figure III-24, tableau-8). Afin d'identifier les individus putativement haploïdes, une première analyse phénotypique sur le critère « glossy » a été réalisée (figure III-24D). En concomitance avec ces observations, des fragments foliaires ont été prélevés sur les 200 plantules étudiées en vue de les génotyper et d'éventuellement identifier des anomalies similaires à celles observées dans la partie précédente sur les grains immatures. Les plantules ont par la suite été conservées en culture jusqu'à atteindre un stade entre 5 à 6 feuilles (23 jours après le semi). Il est intéressant de noter que parmi les plantules identifiées comme « non glossy », donc putativement diploïdes, certaines d'entre elles se sont avérées avoir des retards de croissance par rapport à l'ensemble de la population (figure III-24A, D). Ces retards de croissance ont été confirmés par la mise en culture jusqu'à la floraison de certaines d'entre elles, avec notamment l'absence de développement des organes reproducteurs femelles et des retards dans le développement des organes reproducteurs mâles (figure III-24B, C). De même, parmi les plantules « glossy », donc putativement haploïdes, certaines semblent moins affectées dans leur développement que d'autres par rapport à l'ensemble de la population « glossy » (figure III-24B). Ces observations laissaient alors envisager la présence d'aneuploïdes dans les descendants des croisements avec l'inducteur PK6. L'analyse des données de génotypage, basée sur la même méthodologie que celle adoptée pour l'analyse des grains dans la partie précédente, a permis *a priori* de réfuter



D

Plantes	non glossy	non glossy petit	glossy	total
PK6-1	78	10	8	96
PK6-2	77	9	10	96

Figure III-24 : Illustration des différences phénotypiques observables dans la descendance de la lignée inductrice d'haploïdes, PK6.

A-C : Les plantes en photos proviennent d'un croisement entre la lignée testeur « glossy » et la lignée inductrice PK6. Les grains issus de ces épis ont été semés et des plantules présentant des phénotypes « glossy » et « non glossy » ont été repiquées dans le but de suivre leur croissance et leur développement. Les n°1 et n°2 ont été attribués à deux plantes « non glossy » observées jusqu'à la floraison. **A** : Plantes de 17 jours après le semis, les flèches blanches indiquent les plantules « non glossy » et les flèches rouges les plantules « glossy ». **B, C** : Plantes de 60 jours après le semis, juste après le développement des organes floraux, **B** : plantes entières et **C** : panicules de ces mêmes plantes. La plante n°2 présente de nombreux défauts morphologiques, dont un retard de croissance, l'absence de développement des organes reproducteurs femelles et un défaut dans la déhiscence des anthères.

D : Dénombrement des différents phénotypes observés sur les plantules provenant de deux croisements différents entre la lignée testeur « glossy » et la lignée PK6. Les phénotypages ont été réalisés sur des plantes de 23 jours et différentes annotations ont été attribuées ; « non glossy » : plantes ne présentant pas de phénotype foliaire « glossy », de taille et de développement normal par rapport à l'ensemble de la population, « non glossy petit » : plantes ne présentant pas de phénotype foliaire « glossy » mais affichant des retards de développement par rapport à l'ensemble de la population, « glossy » : plantes avec les feuilles « glossy », donc putativement haploïdes.

cette hypothèse puisque majoritairement aucune anomalie n'a pu être mise en évidence. En effet, les plantules « non glossy » s'avèrent bien être de classe « A » (diploïdes) et les plantules « glossy » de classe « D » (haploïdes) (tableau III-8). En revanche, parmi les individus « glossy », une plantule présente un profil allélique de classe « C », quasi haploïde, mais avec un fragment chromosomique d'origine paternelle à l'image de l'embryon observé dans la partie précédente (figure III-23A, tableau III-8). Cette plantule laisse donc supposer qu'il y a bien eu fécondation mais que le génome paternel semble avoir été éliminé. Le fait de ne pas avoir identifié de plantules avec des allèles anormaux dans le reste de la population laisse à penser que cette élimination s'est produite dans les étapes précoces de l'embryogenèse. La question reste cependant en suspens de comprendre l'origine des plantes montrant des défauts de développement. Il est toujours envisageable que ceux-ci proviennent d'une anomalie génomique indétectable par la méthode de génotypage appliquée.

III.3.2.3 - Conclusion sur le devenir du génome paternel après la fécondation

Pour conclure, les expérimentations réalisées sur les grains immatures ont permis de mettre en évidence la présence d'un large panel d'anomalies, tant sur le plan phénotypique que sur le plan génotypique, dans la descendance provenant des croisements avec les lignées inductrices et n'incluant pas uniquement les individus haploïdes. Le génotypage des différentes catégories de grains, normaux et anormaux (d'un point de vue phénotypique), résultant de ces croisements révèle l'existence d'individus comportant des régions chromosomiques, plus ou moins marqués, n'étant pas explicables par le génome paternel, autrement dit des individus aneuploïdes. Dans le cas des grains avortés l'intensité de ces anomalies est très marquée, laissant envisager qu'une trop forte absence du génome paternel conduit à une altération du développement et donc à un avortement prématuré du grain.

De manière plus globale, ces résultats suggèrent fortement que les grains haploïdes ne résultent pas d'une absence de fécondation, mais plutôt d'un défaut de génome paternel. Cela pouvant être conforté par l'identification de deux individus *a priori* haploïdes (grain et plantule) comportant un fragment chromosomique contenant du génome paternel (tableau III-8), indiquant ainsi que la fusion des gamètes s'est bien produite. En revanche, l'absence d'anomalie majeure dans la population de plantules, provenant du croisement avec un inducteur mâle, laisse envisager que l'élimination du génome paternel se produirait majoritairement dans les étapes précoces de l'embryogenèse.

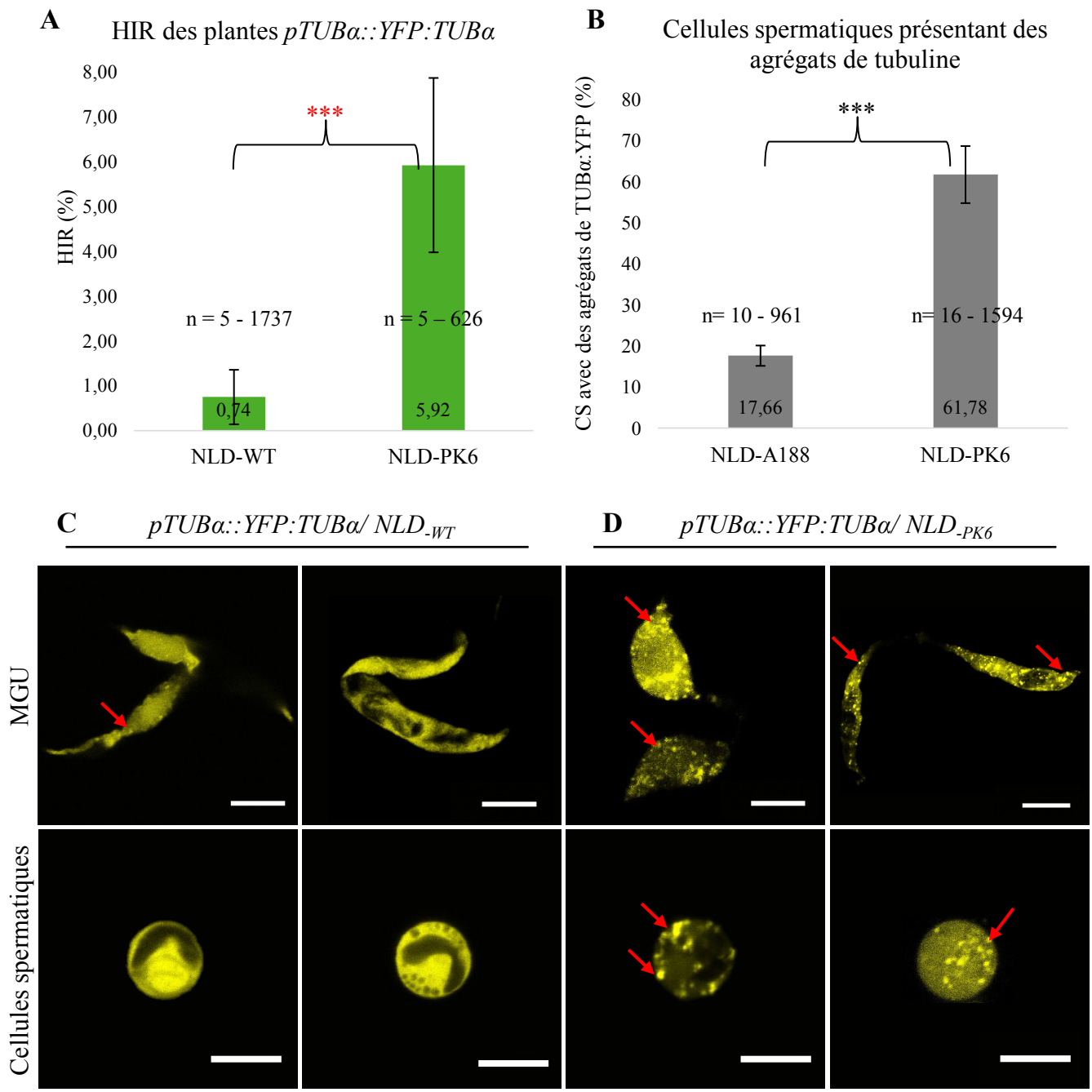


Figure III-25 : Les cellules spermatiques (CS) des lignées inductrices d'haploïdes présentent plus d'agrégats de la fusion protéique TUBULINE:YFP que celles des lignées non-inductrices.

A : Evaluation des taux d'induction d'haploïdes moyens (HIRs moyens) des lignées *pTUBα::YFP:TUBα/NLD*$_{-WT}$ (allèle *NLD* sauvage) et *pTUBα::YFP:TUBα/NLD*$_{-PK6}$ (allèle *NLD* mutant).

B : Dénombrement des cellules spermatiques contenant des agrégats de la fusion protéique TUBα:YFP dans le pollen des lignées inductrices et non-inductrices d'haploïdes. Observations réalisées avec un microscope à épifluorescence.

A, B : Les astérisques (***) indiquent des différences significatives entre les modalités (p-value <0,001, noires : test Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc, rouges : test de Wilcoxon). n = nombre de plantes observées - nombre de cellules spermatiques dénombrées.

C-D : Observation au microscope confocal de MGUs (panel en haut) et de cellules spermatiques (panel en bas) isolées après un choc osmotique sur du pollen mature provenant des lignées *pTUBα::YFP:TUBα* ; **C** : contenant l'allèle *NLD* sauvage *; NLD*$_{-WT}$ (*pTUBα::YFP:TUBα/NLD*$_{-WT}$) et **D** : contenant l'allèle *NLD* mutant ; *NLD*$_{-PK6}$ (*pTUBα::YFP:TUBα/NLD*$_{-PK6}$). Les flèches rouges indiquent la position d'agrégats de TUBα:YFP. Barres d'échelle = 10 µm.

III.3.3 - La mutation du gène *NLD* conduit à une augmentation de la sensibilité des cellules spermatiques aux stress osmotiques.

Dans le chapitre III.2.2.1, la lignée translationnelle rapportrice de la TUBULINE ALPHA ; *pTUBα::TUBα:YFP* (non-inductrice d'haploïdes), a été présentée comme spécifique des cellules spermatiques et non de la cellule végétative dans le grain de pollen de maïs (Kliwer and Dresselhaus, 2010). Ainsi, afin d'étudier le comportement des cellules spermatiques dans un fonds génétique inducteur d'haploïdes en comparaison à un fonds génétique non-inducteur, la lignée transgénique *pTUBα::TUBα:YFP* a été croisée avec la lignée inductrice PK6 (figure III-25). Les hybrides obtenus à partir de ce croisement ont été autofécondés afin de sélectionner des descendants homozygotes pour le transgène, contenant les allèles *NLD,* mutant *NLD-$_{PK6}$* (ségrégants positifs) et sauvage *NLD-$_{WT}$* (ségrégants négatifs) également à l'état homozygote. De plus, il a été montré chez plusieurs espèces, incluant le maïs que la projection cytoplasmique présente à l'intérieur des cellules spermatiques contenait des réseaux de microtubules, ayant probablement un rôle dans leur fonctionnement et dans leur organisation cellulaire (Kliwer and Dresselhaus, 2010; McCue *et al.,* 2011). Ainsi, l'analyse de la lignée *pTUBα::TUBα:YFP,* rapportrices de la TUBULINE ALPHA, un constituant des microtubules, contenant l'allèle *NLD-$_{PK6}$*, permettra également de caractériser l'influence éventuelle de la mutation du gène *NLD* sur les microtubules dans les cellules spermatiques.

Dans un premier temps, la fonctionnalité des lignées générées a été validée par l'évaluation de la capacité d'induction d'haploïdes des différents ségrégants pour la mutation du gène *NLD* (figure III-25A). Ainsi, il a pu être montré que les ségrégants positifs ont un HIR moyen de 5,27 ± 3,89% (n=626), significativement plus élevé que celui des ségrégant négatifs qui est de 0,35 ± 1,21% (n=1737) (figure III-25A). Ces résultats confirment donc le caractère inducteur des lignées rapportrices *pTUBα::TUBα:YFP* contenant l'allèle *NLD*-$_{PK6}$. Cette nouvelle lignée inductrice sera nommée « TUB*α*-inductrice » dans la suite de ce manuscrit.

Dans un second temps, une analyse de l'influence de la mutation présente sur l'allèle *NLD-$_{PK6}$* sur le phénotype des cellules spermatiques et sur l'organisation des microtubules dans le cytoplasme a été réalisée. Pour cela, des grains de pollen provenant des plantes rapportrices avec ou sans la mutation ont été observés avec un microscope confocal. En premier lieu, le comportement des cellules spermatiques a été étudié dans les grains de pollen entiers conservés dans du milieu de culture conventionnel, conçu afin de préserver l'intégrité des structures. Il a ainsi pu être observé que les cellules spermatiques provenant des lignées inductrices et non-inductrices conservaient leur intégrité et leur organisation au sein de la MGU, sans aucune

différence phénotypique identifiable dans le contexte grain de pollen entier (résultats non montrés). En revanche, l'application d'un choc osmotique sur les grains de pollen qui conduit à l'isolement de la MGU hors du grain, suivie de sa dissociation afin de donner des cellules spermatiques isolées (comme précédemment montré dans la partie III-2.2.1, figure III-10), entraîne l'apparition de zones d'agrégation de la fusion protéique TUBULINE ALPHA:YFP (TUB*α*:YFP) dans le cytoplasme des cellules spermatiques des lignées TUB*α*-inductrices (figure III-25D). Ces agrégats de TUB*α*:YFP apparaissent rapidement après l'application du choc osmotique sur les grains de pollen, directement après la libération de la MGU hors du grain et avant même sa dissociation (figure III-25D, panel en haut). Par contre, ces agrégats ne sont presque pas observables dans les cellules spermatiques provenant de la lignée non-inductrice, pour lesquelles le signal fluorescent reste majoritairement uniforme dans le cytoplasme (figure III-25C). Afin de s'assurer que le phénotype observé était bien spécifique du pollen des lignées inductrices, des quantifications du nombre de cellules spermatiques comportant des agrégats de TUB*α*:YFP ont été réalisées sur des grains de pollen provenant de différentes plantes-sœurs arborant (TUB*α*-inductrices) et n'arborant pas (TUB*α*-non-inductrices) la mutation de 4-pb sur le gène *NLD* (figure III-25B). Ainsi, cette quantification révèle que le pollen provenant des plantes TUB*α*-inductrices présente un taux de cellules spermatiques contenant des agrégats de TUB*α*:YFP de 61,78 ± 13,91% (n=1594), significativement supérieur à celui du pollen des plantes TUB*α*-non-inductrices, qui est de 17,66 ± 4,95% (n=961) (figure III-25C). Autrement dit, les pollens inducteurs contiennent près de quatre fois plus de cellules spermatiques présentant ces agrégats atypiques, confirmant ainsi la spécificité de ce phénotype aux lignées inductrices.

Pour conclure, cette étude met en évidence une différence phénotypique très marquée entre les cellules spermatiques des lignées inductrices et celles des lignées non-inductrices. Plus spécifiquement, ce phénotype d'agrégation de la TUB*α*:YFP dans le cytoplasme des cellules spermatiques semble être corrélé avec la mutation du gène *NLD*, puisque cette analyse a été réalisée avec des plantes-sœurs, ayant des fonds génétiques relativement comparables. Des analyses complémentaires restent cependant à faire avec du pollen provenant de lignées entièrement isogéniques pour le gène *NLD*, avec et sans la mutation de 4-pb, afin de consolider ces résultats (c'est-à-dire les générations d'autofécondations successives suivantes des plantes étudiées). Cette caractérisation à l'échelle des gamètes mâles constitue un élément nouveau dont il sera intéressant d'étudier les origines et la signification sur la double fécondation. Des pistes de recherches peuvent d'ores et déjà s'orienter sur l'intégrité cellulaire des cellules spermatiques dans les grains de pollen inducteurs. Ces agrégations de tubuline, laissant envisager une désorganisation des réseaux de microtubules, peuvent putativement être le reflet de cellules

spermatiques stressées. Il serait alors envisageable que l'absence ou la diminution de l'accumulation de la protéine NLD au niveau de la MIV de la MGU, dues à la mutation du gène *NLD*, conduise à une sensibilité accrue des cellules spermatiques aux stress et en l'occurrence aux stress osmotiques dans le cas de cette expérimentation. En revanche, les cellules spermatiques ne présentant pas de défaut d'accumulation de la protéine NLD semblent réagir de manière amoindrie aux stress osmotiques, laissant imaginer une meilleure condition cellulaire de celle-ci. Ces résultats sont cependant très préliminaires et des expérimentations complémentaires restent à faire afin de démontrer cette hypothèse. De manière globale, il est intéressant de noter que la mutation d'une protéine se trouvant localisée sur la MIV de la cellule végétative, entourant les cellules spermatiques, puisse induire des phénotypes au niveau des cellules voisines, les cellules spermatiques.

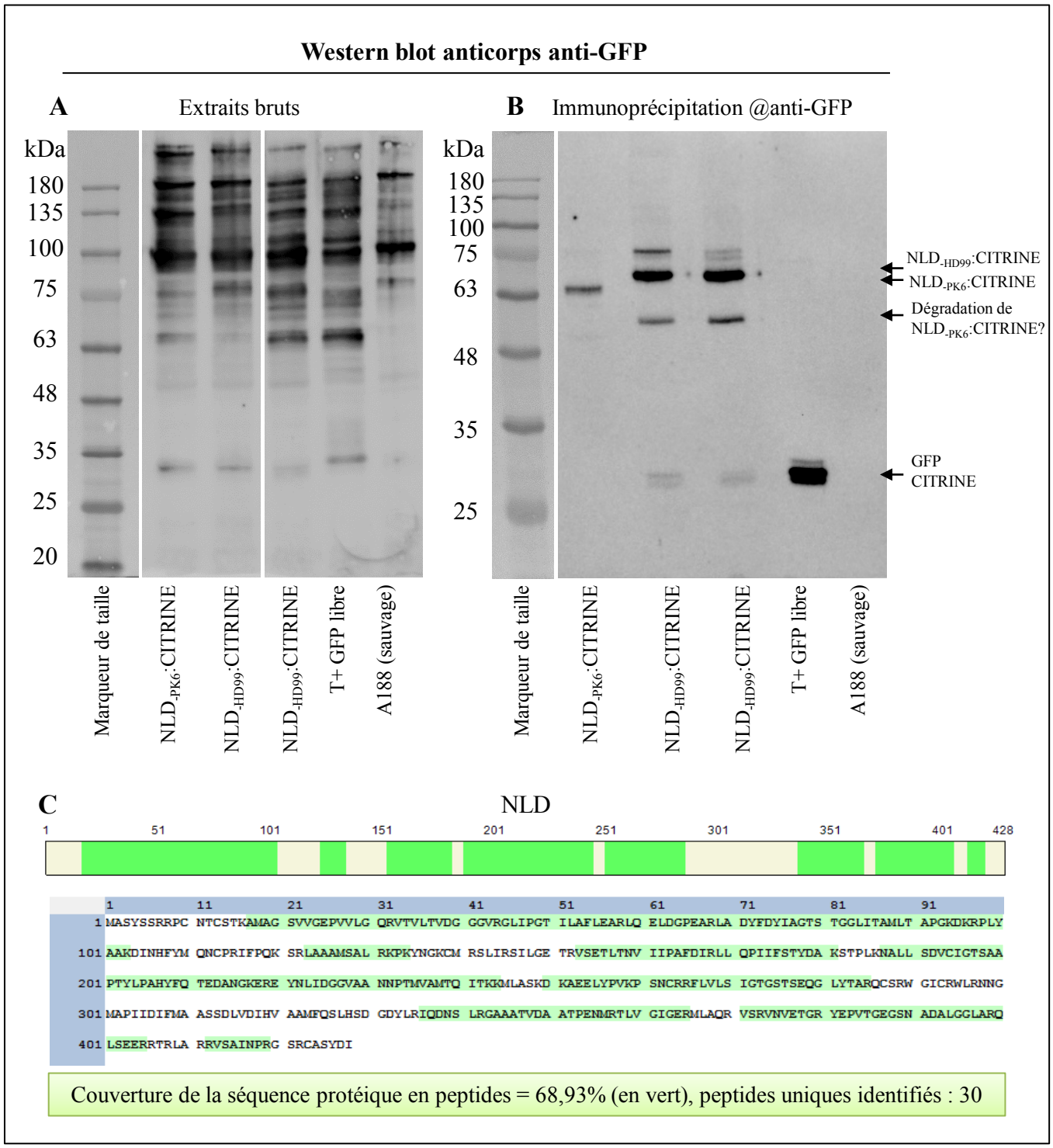


Figure III-26 : Immunoprecipitations (IPs) des fusions protéiques NLD$_{-HD99}$:CITRINE et NLD$_{-PK6}$:CITRINE.

Les IPs ont été réalisées sur des extraits protéiques totaux, obtenus à partir du pollen mature provenant des lignées : *pNLD::NLD$_{-HD99}$:CITRINE* (protéine sauvage), *pNLD::NLD$_{-PK6}$:CITRINE* (protéine tronquée), *pACTIN::NLD$_{-HD99}$* (contenant une GFP libre soluble dans la cellule végétative du grain de pollen) et A188 (témoin sauvage non transgénique). Ces extraits protéiques ont été incubés avec des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre la GFP (µMACS™ GFP Isolation Kit, Milteny Biotec GmbH).

Les enrichissements ont été vérifiés par la réalisation de western blots avec anticorps dirigé contre la GFP (@anti-GFP) sur : **A** : les extraits protéiques bruts avant IPs, **B** : les produits d'IP utilisés pour la spectrométrie de masse. Cette analyse confirme l'enrichissement des deux fusions protéiques NLD:CITRINE. **C** : Couverture de la séquence protéique de NLD en peptides identifiés après l'analyse des produits d'IP de la fusion protéique NLD$_{-HD99}$:CITRINE par spectrométrie de masse.

III.4 - Recherche des interactants protéiques de NLD

Comme montré précédemment, *NLD* est le gène majeur lié à l'induction de gynogenèse *in vivo* chez le maïs. En revanche, son mode de fonctionnement et la (les) voie(s) moléculaire(s) sous-jacente(s) à la gynogenèse *in vivo* restent encore énigmatiques. Pour des organismes non-végétaux, des protéines interagissant avec des phospholipases ont été identifiées et se sont avérées importantes pour l'activation et la régulation de l'activité enzymatique (Jang *et al.,* 2012; Kim *et al.,* 1998). Ainsi, afin de découvrir de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans l'induction d'haploïdes chez le maïs et de mieux caractériser les mécanismes moléculaires dans lesquels s'intègre *NLD*, la recherche des interactants protéiques directs de la protéine NLD a été initiée. Pour cela, un enrichissement de la protéine NLD a été réalisé en condition non dénaturante *via* une approche d'immunoprécipitation (IP) sur des extraits protéiques totaux de pollen, suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) afin d'identifier les protéines interagissant directement avec NLD (figure III-26, tableau III-9).

Dans un premier temps, des IPs basées sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine fluorescente GFP ont été réalisées à partir du pollen provenant de la lignée fonctionnelle, développée précédemment, exprimant la protéine NLD sauvage fusionnée à la protéine fluorescente CITRINE (*pNLD::NLD-$_{HD99}$:CITRINE*) et qui montre un signal fluorescent fort au niveau de la MGU dans le grain de pollen (voir parties III-3, III-2.2.1). En parallèle, une analyse a également été réalisée sur du pollen exprimant la version tronquée de NLD (*pNLD::NLD-PK6:CITRINE*) à titre de comparaison. Il est à noter que les protéines fluorescentes GFP et CITRINE (un variant de la YFP) possèdent des séquences protéiques très proches, permettant ainsi l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GFP afin de cibler la protéine CITRINE (Shaner *et al.,* 2005). Des pollens provenant des plantes transgéniques contenant le gène *GFP* sous contrôle du promoteur constitutif *p*CSVMV (*pCsVMV::GFP*) qui est actif dans cellule végétative (figure III-4) et de la lignée sauvage non transformée A188 ont été utilisés comme contrôles de cette expérimentation. Pour chaque modalité testée, quatre réplicats biologiques d'extraits protéiques de pollen ont été analysés. Avant d'initier l'analyse par spectrométrie de masse, les produits d'IP ainsi obtenus ont été vérifiés par analyse biochimique afin de s'assurer du bon déroulement des enrichissements en protéines NLD-$_{HD99}$:CITRINE et NLD-$_{PK6}$:CITRINE. Pour cela, des analyses par western blots ont été réalisées avec un autre anticorps dirigé contre la GFP sur des échantillons dénaturés provenant des extraits protéiques bruts avant les IPs ainsi que des produits d'IP (figure III- 26A, B). La faisabilité de l'expérimentation a ainsi

Informations gènes				Informations protéines / Données de spectrométrie de masse				
N° gène (V4)	N° Chr	Expression relative	Expression relative CS	Description (UniProt)	Taille (kDa)	Couverture	Peptides	Peptides uniques
Zm00001d014157	5	pollen	0,27	Flavoprotein wrbA	25,71	12,90	2	2
Zm00001d047457	9	anthères	0,35	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 6	44,22	22,63	8	6
Zm00001d038792	6	anthères	1,84	Phosphotransferase /hexokinase	54,66	65,68	28	17
Zm00001d042182	3	anthères	1,23	Uncharacterized protein	61,61	10,07	4	4
Zm00001d043271	3	anthères	0,07	BTB/POZ domain-containing protein	69,63	6,18	3	2
Zm00001d015798	5	panicule	0,19	Subtilisin-like protease SBT5.3	85,75	20,94	13	12
Zm00001d024533	10	constitutif	6,25	Putative DEAD-box ATP-dependent RNA helicase family protein	119,71	6,48	4	4
Zm00001d043249	3	constitutif	254,65	Minor allergen / NAD(P)H dehydrogenase	21,66	49,26	6	2
Zm00001d013269	5	constitutif	0,61	Beta-glucanase	69,29	40,76	28	28
Zm00001d052022	4	anthères	0,00	Plasma membrane ATPase	97,73	54,19	58	36
Zm00001d039217	6	anthères	4,95	Eukaryotic aspartyl protease family protein	58,35	45,69	22	16
Zm00001d004720	2	anthères	0,00	Putative methyltransferase PMT25	99,39	41,39	28	26
Zm00001d007712	2	anthères	9,17	p-loop nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein with Calponin Homology domain	109,53	20,42	15	13
Zm00001d044095	3	anthères	ND	Carbonic anhydrase	21,97	65,00	11	11
Zm00001d021659	7	anthères	168,84	TBC domain containing protein / Rab-GTPase	54,21	21,09	9	9
Zm00001d026140	10	anthères	1,70	Putative subtilase family protein	84,45	27,02	19	19
Zm00001d037643	6	anthères	0,00	Phospholipase D	100,79	43,05	32	32
Zm00001d015175	5	anthères	0,59	Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein SFH10	71,32	7,60	4	4
Zm00001d030583	1	anthères	0,00	Pectin lyase-like superfamily protein	37,21	41,28	12	6
Zm00001d009648*	8	anthères	0,00	Oleosin Bn-V	16,43	25,48	6	6
Zm00001d010529	8	panicule	0,13	HSP70 / Putative mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c	70,91	36,83	26	2
Zm00001d002422	2	constitutif	1,33	Pectin acetylesterase	43,09	56,17	19	19
Zm00001d025132	10	constitutif	29,01	Nucleic acid-binding OB-fold-like protein	16,64	47,95	7	2
Zm00001d036151	6	constitutif	7,31	Nucleic acid-binding OB-fold-like protein	16,34	47,92	7	2
Zm00001d048396	9	constitutif	ND	putative ubiquitin-conjugating enzyme family	21,69	15,54	3	3
Zm00001d044819*	9	anthères	5,60	Myosin-9	173,34	50,69	63	60
Zm00001d016686	5	anthères	19,99	SNAP25 homologous protein SNAP33	28,81	40,46	9	9
Zm00001d031340*	1	anthères	0,00	Calcium-transporting ATPase	83,86	37,85	26	15
Zm00001d025588	10	anthères	33,15	Pectinesterase	61,74	45,65	25	14
Zm00001d026249	10	anthères	ND	Villin-4	113,68	10,77	8	8
Zm00001d017516*	5	anthères	255,43	Actin-depolymerizing factor	15,88	68,35	9	4
Zm00001d053799*	4	anthères	33,28	Transglycosylase SLT domain containing protein expressed	65,22	15,24	7	7
Zm00001d015036	5	anthères	37,51	Putative ROP family GTPase ROP9	21,61	37,56	5	5
Zm00001d016660	5	constitutif	2101,65	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18,35	45,93	6	6
Zm00001d035037	6	constitutif	ND	Fructokinase-2	35,77	43,20	12	12
Zm00001d037934	6	constitutif	1,00	UDP-glucuronic acid decarboxylase 4	50,39	23,31	7	7
Zm00001d012103*	8	constitutif	48,17	Fructose-bisphosphate aldolase	38,44	81,13	29	6
Zm00001d018187	5	constitutif	0,62	Mitochondrial phosphate carrier protein 3 mitochondrial	38,58	32,79	12	12

Tableau III-9 : Identification des potentiels intéractants protéiques de NLD par immunoprécipitations des fusions NLD_{-HD99}:CITRINE et NLD_{-PK6}:CITRINE, suivies de spectrométrie de masse.
Immunoprécipitations (IPs) avec un anticorps dirigé contre la GFP sur des extraits protéiques totaux de pollen provenant des lignées *pNLD::NLD$_{-PK6}$:CITRINE* (protéine sauvage), *pNLD::NLD$_{-PK6}$:CITRINE* (protéine tronquée), *pACTIN::NLD$_{-HD99}$* (GFP libre) et A188 (témoin non transgénique). Quatre réplicats biologiques ont été analysés par lignée. Les produits d'IPs ont été analysés par spectrométrie de masse. Des scores ont été calculés pour les protéines ressortant de cette analyse, en fonction des résultats obtenus pour les différents réplicats biologiques. Lorsqu'une protéine est identifiée pour un réplicat, une note de 1 est attribuée. Les plages colorées du tableau correspondent à ; bleu foncé : un score de 0 ou de 1 pour les réplicats NLD_{-PK6}:CITRINE et de 3 ou de 4 pour les réplicats NLD_{-HD99}:CITRINE, cette liste correspond donc aux protéines identifiées pour interagir spécifiquement avec la protéine NLD sauvage et non avec la protéine NLD tronquée, bleu (clair et foncé) : scores de 3 ou de 4 pour les réplicats NLD_{-HD99}:CITRINE et de 0 ou de 1 pour les réplicats contrôles A188 et « GFP libre », orange : score de 2 pour les réplicats NLD_{-HD99}:CITRINE et de 0 pour les réplicats contrôles A188 et « GFP libre ».
Les protéines présentées dans ce tableau ont été identifiées par comparaison de la liste de peptides obtenus avec la base de données UniProt (https://www.uniprot.org/).
N° gène : identifiant des gènes correspondant aux protéines identifiées (version 4 du génome du maïs).
N° chr : Chromosome sur lequel se trouvent les gènes identifiés.
Expression relative : Expressions relatives des gènes identifiés obtenues avec à partir de la base de données eFP maïs (http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi). Les données proviennent des études de transcriptomiques de Sekhon *et al*., (2011) et Downs *et al.,* (2013). Expression relative SC : données d'expressions relatives dans les cellules spermatiques (SC) obtenues à partir de l'étude de Chen *et al.,* (2017). Les gènes sont considérés comme exprimés si l'expression relative est supérieure à 1.
Couverture : Pourcentage des séquences protéiques des candidats couvertes par les peptides identifiés. Peptides : nombre de peptides identifiés. Peptides uniques : nombre de peptides spécifiques d'une protéine donnée identifiés.
Les astérisques (*) rouges signalent des gènes qui ressortent surexprimés dans le pollen de maïs chez deux lignées isogéniques pour l'allèle *NLD* mutant et inductrices d'haploïdes en comparaison à deux lignées isogéniques pour l'allèle *NLD* sauvage et non-inductrices, dans l'étude de transcriptomique (RNA-seq) de Kelliher *et al.,* (2017).

pu être mise en évidence, par l'identification de bandes aux tailles attendues de 73,6 kDA pour la protéine NLD$_{-HD99}$:CITRINE (sauvage), 70,75 kDA pour la protéine NLD$_{-PK6}$:CITRINE (tronquée) et 27 kDA pour la protéine CITRINE. En revanche aucune bande n'a pu être identifiée à partir des IPs réalisées sur le pollen sauvage A188, confirmant ainsi la spécificité des bandes observées avec les échantillons mentionnés ci-dessus. Concernant les extraits protéiques bruts analysés avant les IPs, de nombreuses bandes aspécifiques ont été identifiées par western blots, y compris avec les extraits protéiques de pollen sauvage, rendant donc la détection de la fusion protéique NLD:CITRINE difficile (figure III-26A). Il est envisageable que la présence de certains composés dans les grains de pollen, comme une grande quantité d'amidon par exemple, interfère avec l'activité de l'anticorps et conduise à des hybridations aspécifiques de celui-ci. En revanche, de par l'obtention de bons résultats sur les produits d'IP, cette absence de résultat exploitable sur les extraits bruts ne limite pas la suite de l'analyse.

Il est intéressant de noter qu'un enrichissement de la protéine fusionnée NLD$_{-PK6}$:CITRINE a pu être possible (figure III-26B) alors que celle-ci n'était pas observable dans les grains de pollen par microscopie confocale (figure III-11C, D). Ces résultats suggèrent donc que la protéine tronquée est bien présente dans le pollen des lignées inductrices, mais très certainement en trop faibles quantités pour la rendre détectable par microscopie, probablement en raison d'un processus de dégradation en cours.

Après la validation des enrichissements en protéines fusionnées d'intérêt, NLD$_{-HD99}$:CITRINE (sauvage) et NLD$_{-PK6}$:CITRINE (tronquée), les produits d'IP ont été analysés par spectrométrie de masse par la plate-forme de protéomique « Protein Science Facility » de l'IFR (Structure Fédératrice de Recherche) Bioscience de Lyon. Dans un premier temps, il est intéressant de noter que 30 peptides uniques, c'est-à-dire spécifiques, correspondant à la protéine NLD ont pu être identifiés avec les quatre répétitions biologiques d'IP obtenues sur les extraits protéiques de pollen NLD$_{-HD99}$:CITRINE. Ces peptides assurent une couverture de la séquence protéique de NLD de 68% (figure III-26C) et constituent ainsi un indicateur de validité du processus expérimental, puisqu'il est évident d'identifier la protéine NLD dans les produits d'IP de la fusion NLD:CITRINE. De même, ces peptides ont également été identifiés avec la protéine tronquée. En revanche, aucun peptide correspondant à NLD n'a été identifié pour les lignées témoins, non transgénique (A188) et *pCsVMV::GFP* (résultats non montrés).

Parmi les protéines ressortant de cette analyse, uniquement celles identifiées spécifiquement avec les produits d'IP obtenus sur les extraits protéiques de pollen NLD$_{-HD99}$:CITRINE et NLD$_{-PK6}$:CITRINE et absentes des produits d'IP obtenus sur les extraits protéiques de pollen GFP et sauvage (A188) ont été sélectionnées. Les protéines correspondant

aux divers peptides ont été prédites à partir de la base de données « UniProtKB ». L'absence ou la présence des protéines pour une catégorie donnée ont été définies par le calcul de scores définis en fonction des résultats obtenus avec les différents réplicats biologiques. Ainsi, une protéine est considérée comme présente lorsque des peptides correspondants ont été identifiés par spectrométrie de masse pour au moins trois (seuil haut) ou deux (seuil bas) réplicats biologiques. En revanche, elle est considérée comme absente lorsque des peptides sont identifiés pour moins d'un réplicat biologique. L'application de ces critères sur la liste des 121 protéines identifiées par spectrométrie de masse a ainsi permis l'établissement de 38 protéines candidates pour interagir physiquement avec NLD, dont 9 pour interagir plus spécifiquement avec la protéine NLD sauvage et non avec la protéine NLD tronquée (tableau III-9). Parmi cette liste de protéines, la majorité des gènes correspondants (26 gènes sur 38) semblent, d'après les bases de données publiques de transcriptomique, être spécifiquement exprimés dans les organes reproducteurs mâles, les anthères (tableau III- 9) (Downs *et al.,* 2013; Sekhon *et al.,* 2011). De plus, parmi ces gènes, 15 d'entre eux ne sont pas exprimés dans les cellules spermatiques à l'identique de *NLD* (Chen *et al.,* 2017a). Par exemple, la protéine prédite comme « plasma membrane ATPase » codée par le gène *Zm00001d026140* pourrait être un candidat intéressant de par ces similitudes d'expression avec *NLD*. De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'implication des phospholipases A_2 ainsi que de leurs produits, les lysophospholipides, dans l'activité enzymatique des ATPases membranaires chez différentes espèces végétales (Palmgren *et al.,* 1988; Wielandt *et al.,* 2015). De même, différentes protéines intervenant dans les voies de régulation et/ou de signalisation des lipides/phospholipides ont pu être identifiées (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 6, Phospholipase D, Phosphatidylinositol/ phosphatidylcholine), pouvant ainsi donner des indications sur les putatives voies moléculaires dans lesquelles pourraient intervenir *NLD* qui code pour une phospholipase prédite de type A_2 et contenant un domaine de type PATATIN (figure II).

De plus, il est également à noter que deux gènes se retrouvent présents dans des intervalles génétiques identifiés pour être liés à l'induction d'haploïdes. Ainsi, le gène *Zm00001d044819*, codant pour une myosine prédite et le gène *Zm00001d013269* codant pour Beta-glucanase prédite se situent respectivement sur les QTLs *qhir8* et *qhir6* identifiés par Prigge *et al.,* (2012). Ces résultats sont particulièrement intéressants compte tenu du fait que, par exemple, le QTL *qhir8* explique 20% de la variance phénotypique de l'induction d'haploïdes (Liu *et al.,* 2015). Le gène codant pour une myosine présent dans cet intervalle génétique pourrait donc putativement être un gène modulateur de l'induction d'haploïdes, bien que des approches complèmentaires soient necessaires avant toute conclusion.

Récemment, Kelliher *et al.,* (2017) ont réalisé une étude de transcriptomique (RNA-seq) afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les lignées inductrices et les lignées non inductrices d'haploïdes. Cette étude a été réalisée sur du pollen mature de maïs provenant de deux lignées isogéniques pour l'allèle *NLD* mutant et inductrices d'haploïdes en comparaison à deux lignées isogéniques pour l'allèle *NLD* sauvage et non-inductrices (Kelliher *et al.,* 2017). Par conséquent, une comparaison de la liste des gènes codant pour les protéines identifiées dans ce projet a été réalisée avec la liste de gènes exprimés différentiellement chez les lignées inductrices ressortant des travaux de Kelliher *et al.,* (2017). Ainsi, six gènes codant pour des protéines identifiées par protéomique s'avèrent être surexprimés chez les lignées inductrices en comparaison aux lignées non-inductrices (tableau III-9). Parmi, ces gènes se retrouve le gène *Zm00001d044819*, codant pour une myosine déjà mis en lumière dans le paragraphe précédent de par sa présence sur un QTL lié à l'induction d'haploïdes. Cette observation constitue donc un argument supplémentaire à le considérer comme candidat pour être un gène modulateur de l'induction d'haploïdes, dont la protéine en résultant interagirait avec NLD. En revanche, il faut tout de même nuancer ce candidat, car cette myosine n'a été identifiée, par spectrométrie de masse, comme interactant putatif de NLD qu'avec un seuil de décision « moyen » et non avec un seuil « fort ». Cela signifie que des peptides correspondant à cette myosine n'ont pu être identifiés que dans deux réplicats biologiques de pollen parmi les quatre étudiés (tableau III-9).

Cette expérimentation préliminaire a permis l'identification de putatifs interactants protéiques de NLD (tableau III-9). La démonstration de ces interactions par des approches complémentaires (doubles hybrides, co-immunoprécipitations, etc.) reste maintenant à faire afin de sélectionner des gènes candidats ayant un rôle dans la gynogenèse *in vivo*.

III-5 - Influence des soies femelles sur les taux d'induction d'haploïdes de la lignée inductrice RWS

Comme présenté dans la partie I.4.3.1, différentes études ont mis en évidence que le pollen provenant des lignées inductrices était moins compétitif pour la fécondation que le pollen non-inducteur. L'hypothèse peut ainsi être émise que cette faible compétitivité serait corrélée avec un dysfonctionnement s'opérant chez les lignées inductrices d'haploïdes, ralentissant/perturbant le parcours du tube pollinique et/ou le transport des cellules spermatiques *via* le complexe MGU, des grains de pollen inducteurs dans les tissus femelles. Dans ce contexte, il est alors envisageable que les caractéristiques des soies femelles puissent intervenir afin de favoriser/faciliter ou non le transport de la MGU jusqu'à l'ovule. Afin de vérifier cette hypothèse, différentes expérimentations ont été réalisées avec trois lignées femelles indépendantes (notées 1 à 3) qui ont été pollinisées avec du pollen de la lignée inductrice RWS. Ces lignées femelles, provenant des ressources génétiques de Limagrain Europe, possèdent des caractéristiques propres. Trois critères différents ont été évalués pour leur influence putative sur l'induction d'haploïdes, incluant la longueur de soies, l'âge des soies et la position des grains haploïdes sur la rafle (figure III-27).

Ainsi, dans un premier temps, l'influence de la longueur des soies femelles sur la capacité d'induction du pollen RWS a été évaluée. Pour cela, deux jours après l'apparition des premières soies sur les inflorescences femelles, celles-ci ont été coupées à différentes longueurs : à la base de la rafle pour les soies dites « courtes », au milieu de la longueur des soies pour celles dites « moyennes » et uniquement à la pointe des soies pour les celles dites « longueurs » (figure III-27A). Des inflorescences femelles aux soies non coupées ont également été analysées afin de vérifier que le stress engendré par la coupure n'avait pas une influence sur l'induction d'haploïdes (figure III-27A). Un jour après la découpe des soies, les fleurs femelles ont été pollinisées avec du pollen inducteur RWS, contenant le gène de coloration *R1-Navajo*. Les épis provenant de ces croisements ont par la suite été analysés afin d'évaluer les HIRs moyens. Ainsi, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence, pour les trois lignées femelles, entre les quatre modalités testées (figure III-27A), suggérant donc que la longueur des soies femelles n'est pas un critère influençant la capacité d'induction d'haploïdes du pollen inducteur RWS.

Dans un second temps, l'influence de l'âge des soies sur la capacité d'induction d'haploïdes a été évaluée. Pour cela, des plantes des lignées femelles 1 à 3 ont été pollinisées à différents temps après le jour de la sortie des premières soies sur les inflorescences femelles,

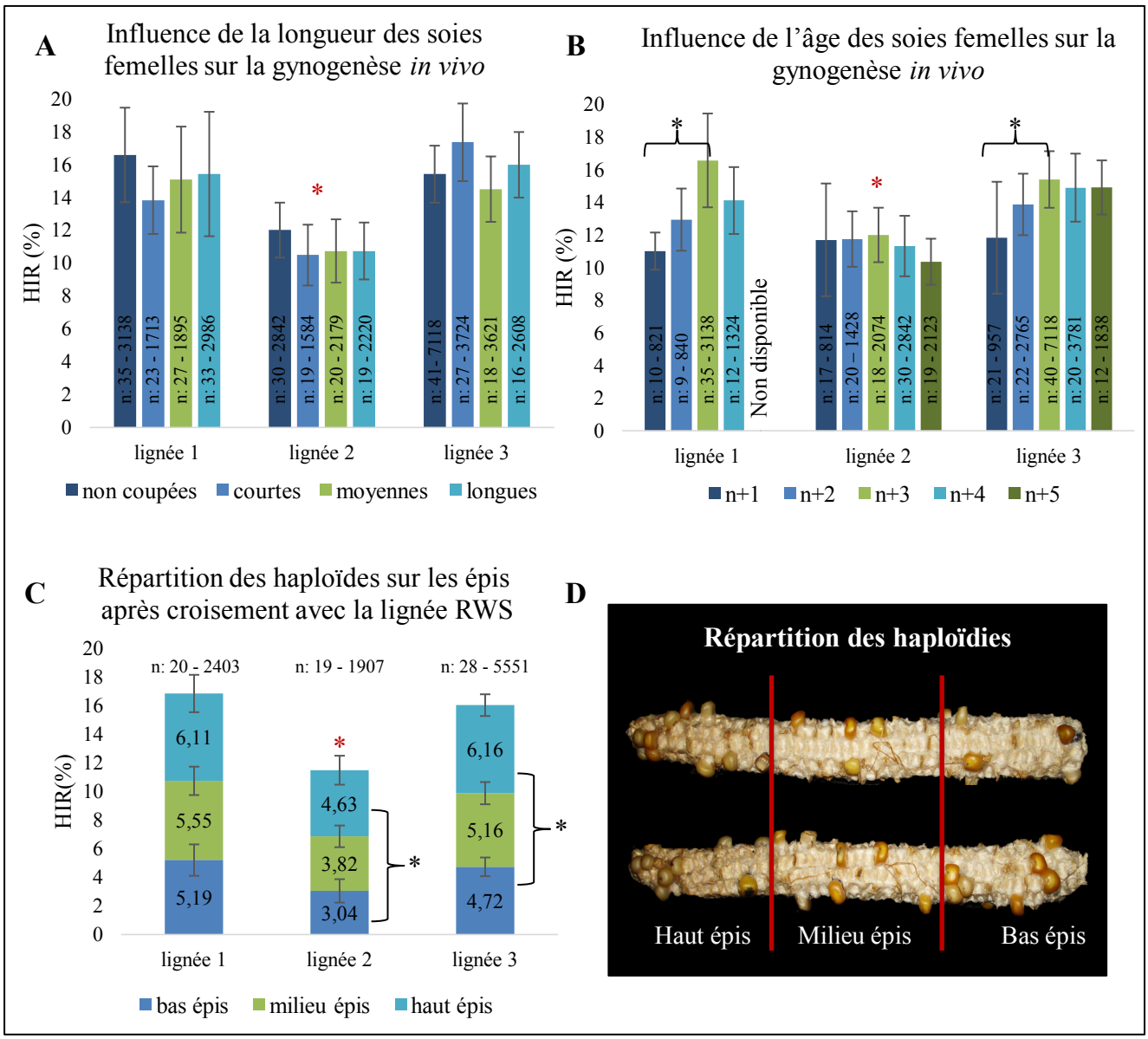


Figure III-27 : Evaluation de l'influence des soies femelles sur la gynogenèse *in vivo*.
Les différents histogrammes représentent les taux d'induction d'haploïdes (HIRs) de la lignée RWS en fonction de différentes conditions appliquées sur les soies femelles pour trois lignées indépendantes. Les grains putativement haploïdes sont dénombrés sur le critère de coloration « Navajo » (absence de coloration de l'embryon). n = nombre de plantes observées - nombre de grains dénombrés. Barres d'erreur = écarts types. Les (*) indiquent des différences significatives ; rouges : entre les différentes modalités, noires : entre les différentes lignées femelles (p-value <0,05 ; tests Kruskal-Wallis + Nemenyi post-hoc).
A : Influence de la longueur des soies femelles sur les HIRs. Les soies ont été coupées un jour avant la pollinisation avec du pollen de l'inducteur RWS à différentes longueurs ; courtes: soies coupées à la base de la rafle, moyennes : soies coupées à la moitié de la longueur des soies, longues : soies coupées juste au niveau des pointes, non coupées : soies non coupées, utilisées comme contrôles négatifs. ND : Non Disponible.
B : Influence de l'âge des soies femelles sur les HIRs. Le jour « n » est compté dès l'apparition des premières soies ; n+1 : un jour après la sortie des soies, n+2 : deux jours après la sortie des soies, n+3 : trois jours après la sortie des soies, n+4 : quatre jours après la sortie des soies et n+5 : cinq jours après la sortie des soies.
C, D : Répartition des grains identifiés comme putatifs haploïdes sur les épis. **C** : Les barres des histogrammes représentent les HIRs des différentes lignées femelles (croisements faits à n+3 jours après la sortie des soies), les couleurs représentent la répartition des grains haploïdes dans les différentes zones de l'épis (bas, milieu, haut), soit la proportion que représente une zone dans le HIR moyen de chaque lignée femelle. Ces zones ont été définies par mesure des épis : chacune représente un tiers de l'épis. La proportion des grains haploïdes identifiés dans chaque zone a été normalisée par le nombre de grains total dans la zone.
D : Photos d'épis après un croisement avec de la lignée testeur « glossy » avec du pollen de la lignée RWS, uniquement les grains avec des embryons blancs sont gardés sur l'épis.

noté le jour « n ». Ainsi, des pollinisations ont été réalisées avec du pollen RWS, deux, trois, quatre et cinq jours après la sortie des premières soies et notés respectivement ; « n+1 », « n+2 », « n+3 », « n+4 » et « n+5 ». L'évaluation des HIRs sur les épis provenant de ces croisements révèle des différences significatives entre les modalités « n+1 » et « n+3 » pour les lignées femelles 1 et 3 (figure III-27B). En effet, les HIRs obtenus pour les lignées 1 et 3, avec des soies de « n+3 » jours sont respectivement de 16,57 ± 5,75% (n=3138) et 15,40 ± 3,47% (n=7118) contre seulement 11,01 ± 2,28% (n=821) et 11,83 ± 6,86% (n=957) pour les HIRs obtenus avec des soies de « n+1 » jours (figure III-27B). Une tendance similaire est également observable pour la lignée 2, même si la différence observée n'est pas significativement différente des autres modalités (figure III-27B). De manière plus globale, les taux d'inductions les plus élevés ont été obtenus avec les pollinisations réalisées sur des soies de « n+3 » jours en comparaison aux autres modalités et les taux les plus bas, pour les lignées 1 et 3, ont été obtenus avec les pollinisations réalisées sur des soies de « n+1 » jours (figure III-27B). L'ensemble de ces résultats suggère donc une influence potentielle de l'âge de soies femelles au moment de la pollinisation avec les lignées inductrices sur la capacité d'induction d'haploïdes. Il est alors envisageable que les soies présentent une réceptivité optimale à trois jours après leur sortie des inflorescences femelles, favorisant ainsi, par un facteur encore inconnu, la pollinisation par le pollen inducteur moins compétitif que le pollen non-inducteur.

Pour finir, la répartition des grains haploïdes a été évaluée sur des épis provenant de croisements des trois lignées femelles avec du pollen de la lignée RWS, afin d'évaluer si la position des ovaires sur les rafles pouvait avoir une influence sur l'induction d'haploïdes (figure III-27C, D). Plus spécifiquement, les épis ont été mesurés afin de définir trois zones représentant chacune un tiers de l'épi, incluant en partant de la base ; la zone « basse », la zone « moyenne » et la zone « haute » (figure III-27D). Le dénombrement des grains putativement haploïdes, c'est-à-dire avec des embryons non colorés, dans ces différentes zones des épis a mis en évidence la présence d'une majorité de grains haploïdes dans les zones « hautes » pour les trois lignées femelles avec des différences significatives par rapport aux zones « basses » pour les lignées 2 et 3 (figure III-27C). Par exemple, pour la lignée femelle 2, la proportion du HIR moyen correspondant à la zone « haute » des épis est de 4,63% contre seulement 3,04% pour la zone « basse », indiquant que les haploïdes se retrouvent à une fréquence plus élevée dans la partie « haute » des épis (figure III-27C). Ces résultats suggèrent donc que la position des ovaires sur les rafles au moment de la pollinisation peut avoir une influence sur la capacité d'induction du pollen inducteur. Ces observations peuvent être mises en relation avec celles présentées dans le paragraphe précédent mettant en lumière l'influence de l'âge des soies sur l'induction

d'haploïdes. En effet, les soies des ovaires se développeront différentiellement dans le temps en fonction de leur position sur la rafle avec une première initiation débutant de la base de la rafle. Ainsi, les soies se situant à la base seront donc plus vieilles que les soies en haut de la rafle. Il est alors envisageable qu'il y ait plus de grains haploïdes en haut des épis de par une meilleure réceptivité des soies en haut de la rafle au moment de la pollinisation, favorisant ainsi la transmission des gamètes mâles des grains de pollen inducteurs.

Pour conclure, si la longueur des soies femelles ne semble pas avoir d'influence sur la capacité d'induction d'haploïdes du pollen inducteur RWS, l'âge des soies semble quant à lui avoir son rôle à jouer dans la réceptivité de celles-ci à l'induction. Ces résultats indiquent que la nature, dans ce cas l'âge avec tous les paramètres qui en découlent (sénescence plus ou moins avancée par exemple), des soies femelles au moment de la pollinisation peut avoir un effet sur la capacité d'induction du pollen inducteur. De plus, de manière plus générale, dans ces expérimentations des différences significatives des taux d'induction moyens ont pu être observées entre les trois lignées femelles. En effet, la lignée 2 semble significativement moins réceptive à l'induction d'haploïdes que les deux autres lignées, avec par exemple un HIR observé dans la troisième expérimentation de seulement 11,49% (n=1907), contre des HIRs respectivement de 16,86% (n=2403) et de 16,04% (n=5551) pour les lignées 1 et 3 (figure III-27C). Ces résultats sont particulièrement intéressants compte tenu du fait que le pollen provenant de mêmes plantes mâles a été utilisé pour toutes les pollinisations réalisées dans ces expérimentations. Ils mettent ainsi en lumière une implication non négligeable des fonds génétiques femelles dans la réceptivité à la gynogenèse *in vivo*, comme cela a déjà pu être montré dans des travaux de recherche ayant identifié des traits quantitatifs liés à ce paramètre (Wu *et al.,* 2014). La question reste maintenant en suspens de savoir l'origine de cette influence maternelle sur la gynogenèse *in vivo* chez le maïs et si celle-ci est dépendante ou indépendante de l'influence paternelle.

Annexes
Résutats

Lignées	Locus NLD	N° plante	Haplo	Diplo	Grains	HIR
BC1S1	A188/A188	X1023-69	0	384	384	0,00
	A188/A188	X1023-9	0	431	431	0,00
	A188/A188	X1023-11	1	963	964	0,10
	A188/A188	X1023-78	1	435	436	0,23
	A188/A188	6021-2	0	308	308	0,00
	A188/A188	6022-1	0	206	206	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,06 ± 0,09**
	PK6/PK6	X1023-17	14	212	226	6,19
	PK6/PK6	X1023-21	13	533	546	2,38
	PK6/PK6	X1023-22	9	201	210	4,29
	PK6/PK6	X1023-29	2	100	102	1,96
	PK6/PK6	X1023-30	35	420	455	7,69
	PK6/PK6	X1023-26	26	424	450	5,78
	PK6/PK6	X1023-22	18	323	341	5,28
	PK6/PK6	X1023-27	8	209	217	3,69
	PK6/PK6	X1023-14	1	203	204	0,49
	PK6/PK6	X1023-5	9	278	287	3,14
		HIR moyen ± Ecart type				**4,09 ± 2,19**
F2	A188/A188	X1024-5	0	408	408	0,00
	A188/A188	X1025-20	0	304	304	0,00
	A188/A188	X1025-39	0	310	310	0,00
	A188/A188	X1025-16	0	312	312	0,00
	A188/A188	X1024-82	1	309	310	0,32
	A188/A188	X1024-9	3	307	310	0,97
	A188/A188	X1024-14	0	206	206	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,19 ± 0,37**
	PK6/PK6	W103-2	4	252	256	1,56
	PK6/PK6	W103-1	0	250	250	0,00
	PK6/PK6	W103-12	8	155	163	4,91
	PK6/PK6	W103-25	10	350	360	2,78
	PK6/PK6	W103-9	8	272	280	2,86
	PK6/PK6	6052-1	5	274	279	1,79
	PK6/PK6	6051-1	4	304	308	1,30
	PK6/PK6	6051-2	1	302	303	0,33
	PK6/PK6	X1024-113	9	189	198	4,55
	PK6/PK6	X1024-94	5	195	200	2,50
	PK6/PK6	X1024-75	13	185	198	6,57
	PK6/PK6	X1024-58	6	192	198	3,03
	PK6/PK6	X1024-47	24	176	200	12,00
	PK6/PK6	X1024-43	8	189	197	4,06
	PK6/PK6	X1024-42	18	181	199	9,05
	PK6/PK6	X1024-34	16	176	192	8,33
	PK6/PK6	X1024-26	5	191	196	2,55
	PK6/PK6	X1024-18	5	195	200	2,50
	PK6/PK6	X1024-13	3	195	198	1,52
	PK6/PK6	X1025-74	0	200	200	0,00
	PK6/PK6	X1025-59	2	197	199	1,01
	PK6/PK6	X1025-35	10	189	199	5,03
	PK6/PK6	X1025-50	9	191	200	4,50
	PK6/PK6	X1025-65	12	187	199	6,03
	PK6/PK6	X1025-26	14	186	200	7,00
	PK6/PK6	X1025-9	10	189	199	5,03
	PK6/PK6	X1025-58	16	179	195	8,21
	PK6/PK6	X1025-48	1	197	198	0,51
	PK6/PK6	X1025-80	11	181	192	5,73
	PK6/PK6	X1025-92	3	191	194	1,55
	PK6/PK6	X1025-72	4	195	199	2,01
	PK6/PK6	X1025-83	1	199	200	0,50
	PK6/PK6	X1025-13	11	188	199	5,53
	PK6/PK6	X1025-97	4	196	200	2,00
	PK6/PK6	X1025-93	0	99	99	0,00
	PK6/PK6	X1025-89	14	186	200	7,00
		HIR moyen ± Ecart type				**3,72 ± 2,95**

Lignée	Locus NLD	N° plante	Haplo	Diplo	Grains	HIR
BC1S1-S2	A188/A188	6043-1	0	307	307	0,00
	A188/A188	6043-2	0	305	305	0,00
	A188/A188	6044-2	0	312	312	0,00
	A188/A188	6044-1	1	304	305	0,33
	A188/A188	1015-4	0	210	210	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,07 ± 0,15**
	PK6/PK6	6053-1	0	309	309	0,00
	PK6/PK6	6054-1	6	302	308	1,95
	PK6/PK6	6041-1	2	204	206	0,97
	PK6/PK6	6041-2	12	199	211	5,69
	PK6/PK6	X1015-20	2	208	210	0,95
	PK6/PK6	X1015-14	3	212	215	1,40
	PK6/PK6	X1016-8	6	199	205	2,93
		HIR moyen ± Ecart type				**1,86 ± 1,87**
BC2S1-S2	A188/A188	W1008-11	0	505	505	0,00
	A188/A188	W1008-4	0	308	308	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,00 ± 0,00**
	PK6/PK6	W1.6	3	240	243	1,23
	PK6/PK6	W1.21	1	201	202	0,50
	PK6/PK6	W1.7	2	295	297	0,67
	PK6/PK6	W1.23	0	42	42	0,00
	PK6/PK6	W1008-16	0	202	202	0,00
	PK6/PK6	W1008-22	4	408	412	0,97
	PK6/PK6	W1008-37	6	373	379	1,58
	PK6/PK6	W1008-8	6	320	326	1,84
	PK6/PK6	W1008-9	8	605	613	1,31
	PK6/PK6	W1008-5	3	349	352	0,85
	PK6/PK6	6031-1	1	306	307	0,33
		HIR moyen ± Ecart type				**0,84 ± 0,61**
BC3S1-S2	A188/A188	W1011-38	1	410	411	0,24
	A188/A188	W1011-19	0	301	301	0,00
	A188/A188	W1011-39	0	401	401	0,00
	A188/A188	W1011-37	0	203	203	0,00
	A188/A188	W1011-11	0	519	519	0,00
	A188/A188	W1011-2	0	297	297	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,04 ± 0,10**
	PK6/PK6	W1011-25	5	815	820	0,61
	PK6/PK6	W1011-3	6	1021	1027	0,58
	PK6/PK6	W1011-1	2	105	107	1,87
	PK6/PK6	W1011-43	1	100	101	0,99
	PK6/PK6	6032-1	2	306	308	0,65
	PK6/PK6	6032-2	0	310	310	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,78 ± 0,62**
BC4S1-S2	A188/A188	W520-8	0	315	315	0,00
	A188/A188	W583-7	0	203	203	0,00
	A188/A188	W583-9	1	101	102	0,98
	A188/A188	W581-8	0	214	214	0,00
	A188/A188	W583-8	0	109	109	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,20 ± 0,44**
	PK6/PK6	X1017-3	1	208	209	0,48
	PK6/PK6	X1017-7	1	99	100	1,00
	PK6/PK6	X1017-6	0	108	108	0,00
	PK6/PK6	W520-2	1	201	202	0,50
	PK6/PK6	W520-5	2	99	101	1,98
	PK6/PK6	W581-11	3	306	309	0,97
	PK6/PK6	W581-3	2	310	312	0,64
	PK6/PK6	W581-5	0	315	315	0,00
	PK6/PK6	W582-5	0	51	51	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,62 ± 0,64**
BC5S1-S2	A188/A188	X1026-2	0	738	738	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,00 ± 0,00**
	PK6/PK6	6034-1	0	206	206	0,00
	PK6/PK6	6034-2	1	126	127	0,79
	PK6/PK6	X1026-21	2	318	320	0,63
	PK6/PK6	X1020-1	5	316	321	1,56
	PK6/PK6	X1026-8	0	106	106	0,00
		HIR moyen ± Ecart type				**0,50 ± 0,63**

Annexe III-1 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) des différentes plantes-sœurs provenant des rétrocroisements présentés dans la figure III-2B et le tableau III-2. N° plante : code utilisé en interne afin d'identifier les différentes plantes-sœurs. Haplo : nombre de grains haploïdes identifiés, Diplo : nombre de grains diploïdes identifiés. Total : nombre de grains total criblé. Les plages colorées correspondent aux données des différentes introgressions : bleu = introgression de l'allèle NLD_{-A188} dans PK6, orange = hybrides A188 X PK6 autofécondés, jaune = introgression de l'allèle NLD_{-PK6} dans le fonds génétique A188. S1 : 1ère génération d'autofécondations, S2 : 2ème génération d'autofécondations.

Lignées	Effectifs			Induction haploïdes			Ségrégation BASTA	
	N° Plante	Epis	Grains	Diploïdes	Haploïdes	HIR (%)	S (%)	R (%)
BC3S1 A188$^{NLD-PK6}$ + *OE::NLD*$_{-HD99}$ -/-	W223-13	1	315	309	3	0,95	100	0
	W223-1	1	80	78	1	1,25	100	0
	W223-3	1	505	499	0	0,00	100	0
	W223-21	1	315	311	0	0,00	100	0
	W222-18	1	198	196	0	0,00	100	0
	W220-1	1	301	293	3	1,00	100	0
	W222-10	1	377	370	3	0,80	100	0
	W220-7	1	114	110	2	1,75	100	0
	W222-14	1	301	294	0	0,00	100	0
	W222-19	2	595	582	2	0,34	100	0
	W222-1	1	306	300	1	0,33	100	0
	X102-14	2	637	627	2	0,31	100	0
	X101-10	2	428	414	3	0,70	100	0
	X102-4	2	338	326	3	0,89	100	0
Moyenne ± Ecart type						**0,59 ± 0,54**		
BC3S1 A188$^{NLD-PK6}$ + *OE::NLD*$_{-HD99}$ +/-	W221-1	1	302	295	1	0,33	54	46
	W221-2	1	316	311	0	0,00	53	47
	W222-17	1	326	321	0	0,00	46	54
	W223-11	1	306	304	0	0,00	47	53
	W223-19	1	313	303	1	0,32	94	6
	W223-10	1	99	91	0	0,00	47	53
	W222-13	1	103	97	1	0,97	48	52
	W222-12	1	56	55	0	0,00	43	57
	X101-30	2	1144	1135	3	0,26	46	54
	X100-17	1	305	299	4	1,31	47	53
Moyenne ± Ecart type						**0,32 ± 0,46**		
BC3S1 A188$^{NLD-PK6}$ + *OE::NLD*$_{-HD99}$ +/+	W223-18	1	305	302	0	0,00	0	100
	W223-25	1	301	299	0	0,00	0	100
	X101-32	1	417	413	0	0,00	0	100
	X101-13	2	944	938	0	0,00	0	100
	X100-20	1	308	306	0	0,00	0	100
Moyenne ± Ecart type						**0,00 ± 0,00**		

Annexe III-2 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) relatifs à la stratégie de complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes N°1, présentée dans la figure III-3 et le tableau III-4. Introgression du transgène *OE::NLD*$_{-HD99}$ dans le fonds génétique BC3S1-A188$^{NLD-PK6}$. Evaluation des HIRs par croisement des plantes à tester avec la lignée testeur « glossy ».
Lignées : plantes BC3S1-A188$^{NLD-PK6}$ contenant le transgène « *OE::NLD*$_{-HD99}$ » à l'état homozygote (+/+), hémizygote (+/-) ou absent (-/-). N° plante : code utilisé en interne afin d'identifier les différentes plantes-sœurs. Epis : nombre d'épis, provenant de croisements différents avec la lignée testeur, observés pour chaque plante-sœur analysée. Grains : nombre total de grains criblés. Diploïdes : nombre de plantules diploïdes identifiées, Haploïdes : nombre de plantules haploïdes identifiées. Les plantes ont été sélectionnées pour contenir ou non le transgène par une analyse qPCR de la quantité de T-DNA relative au gène *BAR,* de résistance au BASTA. Les résultats qPCR ont été confirmés par traitement des plantules provenant des croisements de la lignée « testeur » avec les différentes plantes à tester. S : pourcentage de plantules sensibles au BASTA, R : pourcentage de plantules résistantes au BASTA. Les plantes sensibles au BASTA ne contiennent pas le transgène *OE::NLD*$_{-HD99.}$

Lignées	Effectifs			Induction haploïdes			Ségrégation BASTA	
	N° Plante	Epis	Grains	Diploïdes	Haploïdes	HIR (%)	S (%)	R (%)
$F2^{NLD\text{-}PK6}$ + $NLD_{\text{-}HD99}$:*CITRINE (-/-)*	W803-27	2	308	302	6	1,95	100	0
	W802-54	3	516	503	13	2,52	100	0
	W801-79	1	100	100	0	0,00	100	0
	W800-62	1	202	197	5	2,48	100	0
	W803-23	1	105	101	4	3,81	100	0
	W800-39	1	204	203	1	0,49	100	0
	W803-30	1	103	98	5	4,85	100	0
	W800-1	1	309	301	8	2,59	100	0
	W801-48	2	213	202	11	5,16	100	0
	W801-23	1	101	95	6	5,94	100	0
Moyenne ± Ecart type						**2,98 ± 1,96**		
$F2^{NLD\text{-}PK6}$ + $NLD_{\text{-}HD99}$:*CITRINE (+/-)*	W800-44	2	519	515	4	0,77	68	32
	W800-64	1	313	308	5	1,60	70	30
	W800-30	2	326	318	8	2,45	70	33
	W800-68	1	324	320	4	1,23	56	44
Moyenne ± Ecart type						**1,51 ± 0,71**		
$F2^{NLD\text{-}PK6+}$ $NLD_{\text{-}HD99}$:*CITRINE (+/+)*	W802-48	4	1033	1032	1	0,10	0	100
	W801-51	4	1127	1125	2	0,18	0	100
	W802-44	4	917	916	1	0,11	0	100
	W802-34	1	309	309	0	0,00	0	100
	W802-79	1	312	312	0	0,00	0	100
	W801-78	1	315	315	0	0,00	0	100
Moyenne ± Ecart type						**0,06 ± 0,08**		

Annexe III-3 : Données détaillées des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) relatifs à la stratégie de complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes N°2 présentée dans la figure III-3 et le tableau III-4. Introgression du transgène *$NLD_{\text{-}HD99}$:CITRINE* dans le fonds génétique $F2^{NLD\text{-}PK6}$. Evaluation des HIRs par croisement des plantes à tester avec la lignée testeur « glossy ».
Lignées : $F2^{NLD\text{-}PK6}$ contenant le transgène *$NLD_{\text{-}HD99}$:CITRINE* à l'état homozygote (+/+), hémizygote (+/-) ou absent (-/-). N° plante : code utilisé en interne afin d'identifier les différentes plantes-sœurs. Epis : nombre d'épis, provenant de croisements différents avec la lignée testeur, observés pour chaque plante sœurs analysée. Grains : nombre total de grains criblés. Diploïdes : nombre de plantules diploïdes identifiées, Haploïdes: nombre de plantules haploïdes identifiées. Les plantes ont été sélectionnées pour contenir ou non le transgène par une analyse qPCR de la quantité de T-DNA relatif au gène *BAR,* de résistance au BASTA. Les résultats qPCR ont été confirmés par traitement des plantules provenant des croisements de la lignée « testeur » avec les différentes plantes à tester. S : pourcentage de plantules sensibles au BASTA, R : pourcentage de plantules résistantes au BASTA. Les plantes sensibles au BASTA ne contiennent pas le transgène *$NLD_{\text{-}HD99}$:CITRINE*.

***NLD*$_{-WT}$: nombre de codons : 429**

MASYSSRRPCNTCSTKAMAGSVVGEPVVLGQRVTVLTVDGGGVRGLIPGTILAFLEARLQELDGPEARLADYFDYIA
GTSTGGLITAMLTAPGKDKRPLYAAKDINHFYMQNCPRIFPQKSRLAAAMSALRKPKYNGKCMRSLIRSILGETRVS
ETLTNVIIPAFDIRLLQPIIFSTYDAKSTPLKNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTEDANGKEREYNLIDGGVAAN
NPTMVAMTQITKKMLASKDKAEELYPVKPSNCRRFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWLRNNGMAPIIDIF
MAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLRGAAATVDAATPENMRTLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYEPVT
GEGSNADALGGLARQLSEERRTRLARRVSAINPRGSRCASYDI*

***crinld-1* : nombre de codons : 145**

MASYSSRRPCNTCSTKAMAGSVVGEPVVLGQRVTVLTVDGGGVRGLIPGTILAFLEARLQELDGPEARLADYFDYIA
GTSTGGLITAMLTAPGKDKRPLYAVQGHQPLLHAELPAHLSSEEQACGRHVRAEEAKVQRQVHAQPD*

***crinld-2* : nombre de codons : 130**

MASYSSRRPCNTCSTKAMAGSVVGEPVVLGQRVTVLTVDGGGVRGLIPGTILAFLEARLQELDGPEARLADYFDYIA
GTSTGGLITAMLTAPGKDKRPLYAPRTSTTFTCRTARASFLRRAGLRPPCPR*

***crinld-3* : nombre de codons : 398**

MASYSSRRPCNTCSTKAMAGSVVGEPVVLGQRVTVLTVDGGGVRGLIPGTILAFLEARLQELDGPEARLADYFDYIA
GTSTGGLITAMLTAPGKDKRPLYAAKDINHFYMQNCPRIFPQKSRLAAAMSALRKPKYNGKCMRSLIRSILGETRVS
ETLTNVIIPAFDIRLLQPIIFSTYDAKSTPLKNALLSDVCIGTSAAPTYLPAHYFQTEDANGKEREYNLIDGGVAAN
NPTMVAMTQITKKMLASKDKAEELYPVKPSNCRRFLVLSIGTGSTSEQGLYTARQCSRWGICRWLRNNGMAPIIDIF
MAASSDLVDIHVAAMFQSLHSDGDYLRIQDNSLRGAAATVDAATPENMRTLVGIGERMLAQRVSRVNVETGRYTGDW
RRKQCRCPRWAR*

Annexe III-4 : Séquences protéiques prédites à partir des séquences codantes des allèles *NLD*$_{-WT}$ (sauvage), *crinld-1* et *crinld-2* et *crinld-3*.

Prédictions réalisées à partir de l'outil disponible sur le site internet http://didac.free.fr/seq/dna2pro.htm. Les astérisques (*) représentent les codons STOPS. Les séquences colorées en bleu représentent les séquences protéiques de crinld-1, crinld-2 et crinld-3 différentes de la séquence NLD sauvage. Les mutations *crinld-1, crinld-2* et *crinld-3* entrainent l'apparition de codons STOPS prématurément conduisant dans les séquences codantes à la formation de protéines prédites tronquées.

PARTIE IV

Discussion

Bien que les déterminismes génétiques à l'origine de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs soient restés énigmatiques pendant près de soixante ans (Coe, 1959), nos travaux de recherche ont permis le clonage positionnel et l'identification du gène *NOT LIKE DAD* (*NLD*), codant pour une phospholipase A, comme étant causal de l'induction d'haploïdes (figures III-1, III-5, tableaux III-1, III-7). Il s'avère que toutes les lignées de maïs inductrices testées présentent une mutation de 4-pb dans le dernier exon du gène *NLD* qui conduit à la formation d'une protéine tronquée responsable de la gynogenèse *in vivo* (Gilles *et al.,* 2017). De plus, il a pu être mis en évidence que cette mutation n'entraînait pas un défaut spatial ou temporel de l'expression du gène (figures III-6, III-10) mais une délocalisation et une déstabilisation de la protéine au niveau de la MIV (Membrane Interne Végétative) de l'unité mâle germinative dans le grain de pollen (figures III-11, III-12). En parallèle, il a pu être observé que la mutation du gène *NLD*, en plus de conduire à la formation d'haploïdes maternels, entraînait de nombreux phénotypes pléiotropes de grains anormaux (figures III-19, III-21). Ces phénotypes de grains, liés à l'utilisation des lignées inductrices, peuvent putativement être corrélés avec des défauts de ploïdies relatifs à une élimination progressive du génome paternel après la double fécondation (figures III-21, III-23, tableau III-8). Bien que la mécanistique de la localisation subcellulaire de la protéine, basée sur une association entre des ancres lipidiques et des interactions électrostatiques entre la protéine et les membranes (membranes plasmiques et MIV), ait été décryptée (figures III-13, III-16), la manière dont une altération de ce processus peut avoir une relation avec une élimination du génome paternel après la fécondation reste un mystère.

Si l'ensemble de ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans l'amélioration de du processus d'obtention d'haploïdes maternels chez le maïs et dans son transfert à d'autres espèces d'intérêt agronomique, la question reste toujours en suspens de savoir en quoi l'altération d'une phospholipase membranaire peut avoir une influence sur l'unité mâle germinative (MGU) et à plus long terme sur la double fécondation et la gynogenèse *in vivo*.

IV.1 - *NLD*, un gène-clé dans l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, mais pas le seul gène impliqué dans ce processus

IV.1.1 - La perte de fonction de NLD est causale à l'induction d'haploïdes

Parmi les huit régions chromosomiques identifiées comme étant liées à l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs (Barret *et al.,* 2008; Prigge *et al.,* 2012), le QTL majeur présent sur le chromosome n°1, nommé *gynogenesis inducer 1* (*ggi1*), identifié dans un premier temps par Barret *et al.,* (2008) et, par la suite, confirmé et renommé *quantitative haploid induction rate 1* (*qhir1*) par Prigge *et al.,* (2012) explique 66% de la variance phénotypique de l'induction d'haploïdes. A partir de ces travaux, trois équipes indépendantes, incluant les équipes de Kelliher *et al.,* (2017) et Dong et al, (2013), ainsi que notre équipe (Martinant *et al.,* 2016 ; Gilles et al ., 2017a) ont réalisé la cartographie fine du QTL *ggi1/qhir1*, réduisant ainsi l'intervalle génétique associé à la gynogenèse *in vivo* respectivement à 570-Kpb, 240-Kpb et 166-Kpb (par rapport au génome de référence B73). Si ces trois études s'accordent sur l'implication de cette région génétique de *ggi1/qhir1* comme ayant une implication majeure dans l'induction de la gynogenèse *in vivo*, les travaux de Hu *et al.,* (2016) ont favorisé une région différente comme prépondérante. En effet, à partir d'une étude GWAS (Genome-Wide Association Study), réalisée sur une population de lignées inductrices et non-inductrices d'haploïdes, la région génétique contenant *ggi1/qhir1* a été subdivisée en deux sous-régions : *qhri11* (540-Kpb), comprenant l'intervalle génétique identifié par Kelliher *et al.,* (2017), Dong *et al.,* (2013) et Gilles *et al.,* (2017) et *qhir12* (3,97-Mpb), en aval de la région identifiée par les deux autres études. Les auteurs ont défavorisé la région *qhir11* par rapport à la région *qhir12* en raison de l'identification de deux lignées non-inductrices (Mo1W et TX303), présentant, dans l'intervalle génétique *qhir11*, un haplotype *a priori* similaire à celui de 53 lignées inductrices étudiées (Hu *et al.,* 2016). Cependant, par l'analyse des lignées Mo1W et TX303 nous avons pu mettre en évidence que celles-ci n'arboraient pas le polymorphisme de 4-pb sur le gène *NLD*, causal de l'induction d'haploïdes (résultats non montrés dans ce manuscrit mais visibles dans l'article Gilles *et al.,* (2017)), invalidant ainsi les conclusions de Hu *et al.,* (2016). De même, les travaux de Nair *et al.,* (2017) contredisent également l'implication de *qhir12* et viennent appuyer l'effet significatif de la sous-région *qhir11* dans l'induction d'haploïdes (Nair *et al.,* 2017).

En dépit d'un désaccord mineur sur la région de *ggi1/qhir1* impliquée dans l'induction d'haploïdes, les différentes données obtenues en interne, associées aux travaux de cartographies fines réalisés par des études indépendantes sur des fonds génétiques différents (Dong *et al.,* 2013;

Kelliher *et al.,* 2017; Nair *et al.,* 2017), constituent suffisamment d'arguments afin de privilégier l'intervalle génétique de 166-kpb, en amont de *qhir12*, comme causal de l'induction d'haploïdes. Par comparaison de cet intervalle génétique au génome de la lignée de référence, B73, la présence de trois gènes a été mise en lumière ; *GRMZM2G471240* (*NLD*)*, GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313*. La cartographie fine du locus *ggi1/qhir1* a permis d'identifier *NLD* comme le seul gène codant présent dans l'intervalle de confiance de 80-Kpb de la lignée inductrice PK6. L'implication des gènes candidats *GRMZM2G062320* et *GRMZM2G062313*, présents dans le génome de référence B73, mais absents dans l'intervalle d'intérêt chez PK6, a pu être réfutée en raison de l'analyse de deux lignées non-inductrices ayant un haplotype similaire à celui de PK6, mais sans l'insertion de 4-pb sur *NLD* (figure III-1, tableau III-1). Ces travaux ont donc permis de définir *NLD* comme l'unique gène candidat présent dans l'intervalle génétique d'intérêt se trouvant au niveau de la sous-région *qhri11*. En parallèle, deux autres équipes indépendantes ont également identifié, sur des fonds génétiques différents, par des approches similaires et complémentaires, le gène *NLD* et l'existence d'un polymorphisme entre les lignées inductrices et non-inductrices d'haploïdes à ce locus. Ces équipes ont respectivement nommé ce gène *MATRILINEAL* (*MTL*) (Kelliher *et al.,* 2017) et *Zea mays PHOSPHOLIPASE A1* (*ZmPLA1*) (Liu *et al.,* 2017). Par ailleurs, les travaux de Kelliher *et al.,* (2017) ont permis d'exclure le gène *GRMZM2G062320* par une approche complémentaire, puisque la complémentation du phénotype d'induction ne s'avère pas effective avec l'introgression d'un allèle inducteur dans un fonds génétique sauvage (Kelliher *et al.,* 2017).

La causalité de *NLD/MTL/ZmPLA1* dans l'induction d'haploïdes a été démontrée, *via* la mise en place de différentes stratégies de validations fonctionnelles complémentaires, par ces trois études indépendantes. Ainsi, il a été mis en évidence que l'introgression d'un allèle sauvage dans un fonds génétique inducteur abolit la capacité d'induction d'haploïdes (figure III-3, tableau III-4,) (Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017). Par ailleurs, la mutation du gène *NLD via* l'utilisation des technologies CRISPR-Cas9 (figure III-5, tableau III-7) (Gilles *et al.,* 2017; Liu *et al.,* 2017b) et TALEN (Transcription-Activator-Like Effector Nuclease) (Kelliher *et al.,* 2017) confère la capacité d'induction à des fonds génétiques initialement non-inducteurs. En revanche, nos travaux montrent que la surexpression de l'allèle *NLD* mutant ainsi que la sous-expression de l'allèle *NLD* sauvage chez une lignée non-inductrice n'entraîne pas de phénotype d'induction d'haploïdes (tableaux III-5, III-6). Ces résultats suggèrent, d'une part, que la présence d'un allèle *NLD* mutant n'est pas suffisante en présence d'un allèle *NLD* sauvage endogène afin de conduire à un phénotype d'induction d'haploïdes, et d'autre part, que la faible expression résiduelle de l'allèle sauvage est suffisante afin de conserver un phénotype non-inducteur. Ces derniers

résultats restent tout de même à nuancer étant donné que Kelliher *et al.,* (2017) sont parvenus à conférer une faible capacité d'induction d'haploïdes par RNAi chez une lignée non-inductrice, mettant ainsi en évidence ; soit l'implication du fonds génétique, soit une efficacité plus forte du RNAi utilisé, sans exclure la possibilité d'une combinaison de ces deux effets.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la mutation du gène *NLD* ne conduit pas à un gain de fonction mais plutôt à une perte de fonction, qui s'avèrera être une perte de la localisation subcellulaire de la protéine mutante tronquée au niveau de la MIV de la MGU (figures III-11, III-12). De manière intéressante, puisque la génération d'une non-fonctionnalité de *NLD* par des mutations en partie 5' du gène (CRISPR, TALLEN) (Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017; Liu *et al.,* 2017b) conduit à un phénotype d'induction d'haploïdes, il semblerait que la mutation de 4-pb ne soit pas l'élément central dans ce processus, mais que ce soit plutôt la perte de fonction de la protéine qui en découle et donc très certainement l'absence de celle-ci au niveau de la MIV de la MGU. En effet, la troncation de la protéine NLD et donc sa délocalisation doit probablement rendre cette protéine instable et entraîner sa dégradation précoce. Celle-ci ne pourra alors plus assurer sa fonction. Cette hypothèse de dégradation peut être appuyée par l'absence de signal fluorescent dans le pollen transgénique contenant la fusion protéique NLD-$_{PK6}$:CITRINE (protéine tronquée), alors que celle-ci a pu être détectée par des analyses biochimiques après un enrichissement par immunoprécipitation (figure III-26). Ces observations suggèrent donc que la protéine tronquée est présente mais en très faible quantité. De même, Kelliher *et al.,* (2017) par des analyses de protéomique n'ont pas détecté la protéine tronquée dans le pollen de maïs inducteur, appuyant ainsi ces conclusions.

Pour conclure, il semblerait donc que l'élément central à l'origine de l'induction de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs soit l'absence de la protéine NLD dans les grains de pollen inducteurs et plus spécifiquement au niveau de la MIV de la MGU, plutôt qu'une perte de la fonctionalité de la protéine (activité enzymatique par exemple).

IV.1.2 - Le déterminisme génétique de la gynogenèse *in vivo* n'est pas monogénique

S'il apparaît maintenant évident que *NLD* est le gène majeur lié à la gynogenèse *in vivo* chez le maïs (Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017; Liu *et al.,* 2017b), des études antérieures ainsi que les résultats ressortant de ce projet de thèse, démontrent que d'autres composantes génétiques contribuent également à l'induction d'haploïdes (Barret *et al.,* 2008; Dong *et al.,* 2013; Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017; Liu *et al.,* 2017; Nair *et al.,* 2017; Prigge *et al.,*

2012). En effet, sept autres QTLs ont déjà été identifiés pour avoir une implication dans ce processus (Prigge *et al.,* 2012). Par exemple, le QTL *qhir8*, présent sur le chromosome n°9, explique la part non négligeable de 20% de la variance phénotypique associée à l'induction d'haploïdes. De manière intéressante, la présence du locus *qhir8* d'origine inducteur, seule, ne confère pas la capacité d'induction haploïdes, mais combinée avec l'allèle mutant au locus *NLD*, elle augmente les taux d'induction (Liu *et al.,* 2015), indiquant une interaction entre les gènes sous-jacents et putativement entre les produits géniques.

Dans ce projet, il a été observé que l'introgression de manière empirique de l'allèle *NLD* mutant provenant de la lignée inductrice PK6 (*NLD-PK6*) dans le fonds génétique non-inducteur A188 entraînait une baisse significative des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) au cours des différentes générations d'introgression pour atteindre un HIR de seulement 0,5% (pour le BC5S1), significativement inférieur à celui évalué chez PK6, de 8,77% (figure III-2, tableau III-2). De plus, une grande variabilité a pu être observée entre les différentes plantes-sœurs d'une même génération d'introgressions, pouvant aller de plantes ayant un HIR de 12% à des plantes ayant perdu entièrement leur capacité d'induction d'haploïdes (annexe III-1). De manière plus globale, ces tendances ont pu être observées lors des différentes introgressions de l'allèle *NLD-PK6* dans des fonds génétiques non-inducteurs (figures III-2, III-25, partie III-3.2). Dans la même idée, l'analyse des populations de cartographie générées par Nair *et al.,* (2017) et Dong *et al.,* (2013), respectivement avec un inducteur tropical et un inducteur tempéré, mettent en évidence une grande variabilité des HIRs entre les différentes plantes-sœurs.

Par ailleurs, il est également intéressant de noter que parmi les fonds génétiques non-inducteurs d'haploïdes, certains s'avèrent plus favorables à la gynogenèse *in vivo* que d'autres. Par exemple, la lignée A188 semble être un fonds génétique très défavorable à l'induction d'haploïdes puisque, d'une part, elle n'a pas de taux d'induction résiduel (tableau III-2), alors qu'il a été montré que les lignées de maïs ont un taux d'induction spontanée en moyenne de 1/1000 (Chase, 1949; Lashermes and Beckert, 1988) et d'autre part, la génération d'allèles *NLD* non fonctionnels dans ce fonds génétique conduit à des HIRs compris uniquement entre 1% et 2% (figure III-5, tableau 7). Liu *et al.,* (2017) obtiennent des résultats relativement similaires avec l'analyse de mutants *nld* générés par la technologie CRISPR, qui induisent 2% d'haploïdes. Les taux d'induction observés dans ces deux études sont faibles en regard des HIRs qui auraient pu être attendus avec un déterminisme génétique monogénique (5-15%) (De La Fuente *et al.,* 2018; Prigge *et al.,* 2011, 2012). En ce qui concerne la lignée HD99, utilisée pour la cartographie fine de *ggi1/qhri1*, il s'avère que celle-ci semble plutôt favorable à l'induction d'haploïdes, puisqu'elle possède un taux d'induction résiduelle non nul et que des taux d'induction similaires

à ceux de la lignée PK6 ont pu être observés chez les différents recombinants ressortant de la population en ségrégation issue du croisement HD99 X PK6 (figures II, III-1, tableau III-1). De même, le fonds génétique non-inducteur, NP2222, utilisé par Kelliher *et al.,* (2017), s'avère être un fonds génétique réceptif à l'induction. Ainsi, les auteurs sont parvenus à obtenir des lignées quasi isogéniques NP2222, contenant l'allèle *NLD* provenant de la lignée inductrice RWK, avec un HIR élevé de 10,2% et des lignées TALLEN avec un HIR de 6,6%.

Bien qu'une partie de la variabilité observée dans ces études indépendantes, réalisées sur des fonds génétiques différents, puisse être éventuellement explicable par des variations environnementales (De La Fuente *et al.,* 2018; Prigge *et al.,* 2011), l'ensemble de ces résultats montrent que *NLD* est le gène majeur nécessaire à l'induction d'haploïdes mais que d'autres composantes génétiques, dites modulatrices de l'induction, se retrouvent présentes chez les lignées inductrices. Les variabilités importantes des HIRs entre les différentes plantes-sœurs résultant d'un même croisement initial (inducteur X non-inducteur) pourraient s'expliquer du fait que certaines d'entre elles possèdent encore une ou plusieurs composante(s) modulatrice(s) de l'induction en comparaison à d'autres qui les ont déjà perdues au cours des générations d'introgressions dans le fonds génétique non-inducteur, entraînant ainsi une baisse des HIRs. Cette théorie est en accord avec une hypothèse proposée par Prigge *et al.,* (2012), qui soutiennent que *ggi1*/*qhir1* est nécessaire afin de conférer la capacité d'induction d'haploïdes, mais que plusieurs autres QTLs pourraient agir comme des activateurs de la fonction de *ggi1*/*qhir1* et que s'ils se retrouvaient accumulés dans un génotype donné, ils pourraient considérablement améliorer la capacité d'induction d'haploïdes. De même, il est envisageable, qu'en plus de l'absence de composantes génétiques favorables à l'induction d'haploïdes dans les fonds génétiques peu favorables à l'induction, des éléments défavorables y soient présents, comme des gènes ayant des fonctions redondantes avec *NLD* par exemple.

De manière intéressante, les taux d'induction d'haploïdes obtenues avec la mutation de *NLD* par CRISPR dans des fonds génétiques *a priori* défavorables à l'induction se rapprochent fortement de ceux observés chez la première lignée inductrice identifiée ; Stock6 (1-2%) (Coe, 1959). Du fait que cette lignée possède la mutation de 4-pb dans *NLD* (Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017; Liu *et al.,* 2017b), l'hypothèse peut être émise que les taux d'induction d'haploïdes élevés de 5% à 15% des lignées inductrices utilisées aujourd'hui dans les schémas de sélection résulteraient de la sélection empirique d'autres composantes génétiques favorables à l'induction d'haploïdes. La gynogenèse *in vivo* semble donc provenir d'un déterminisme polygénique dont le principal acteur est *NLD*. Les questions restent maintenant en suspens de

savoir quels sont les gènes présents derrières ces QTLs modulateurs et s'ils s'intègrent dans la même voie moléculaire que *NLD* ou dans une/des voie(s) indépendante(s).

IV.1.3 - Vers une identification des gènes modulateurs de l'induction d'haploïdes chez le maïs

Une nouvelle expérimentation originale de recherche de QTLs vient d'être initiée afin d'identifier de nouvelles composantes génétiques et/ou de confirmer celles déjà identifiées par le passé (Prigge *et al.,* 2012). Celle-ci se base sur l'étude des plantes F1S1$^{NLD\text{-}PK6}$ résultant du croisement entre la lignée inductrice PK6 et la lignée non-inductrice A188, qui possèdent une grande variabilité dans leur capacité à induire des haploïdes (HIRs entre 0% et 12%) (annexe III-1). L'utilisation de la lignée A188, fortement récalcitrante à l'induction d'haploïdes s'avère être un atout considérable afin d'identifier les gènes modulateurs de l'induction d'haploïdes. En effet, la présence de composantes génétiques défavorables et/ou l'absence de composantes favorables à l'induction sont probablement à l'origine de la grande variabilité d'induction obtenue dans la descendance. Cette variabilité peut être exploitée afin de réaliser une recherche de QTLs de par la possibilité d'exploiter les spécificités inhérentes aux phénotypes d'induction d'haploïdes. L'originalité de l'expérimentation réside dans le fait que la recherche de QTLs a été entreprise sur des ADNs provenant des albumens de grains issus des croisements entre la lignée testeur « glossy » et les différentes plantes F1S1$^{NLD\text{-}PK6}$ et non directement à partir des plantes mères. En effet, il est connu que (i) l'induction d'haploïdes chez le maïs est un caractère gamétophytique (se produisant dans les grains de pollen haploïdes), (ii) il y a des réarrangements chromosomiques après la méiose (partie I-I.2.2.1c), ce qui signifie que chaque grain de pollen contient une combinaison chromosomique spécifique et (iii) l'albumen adjacent à un embryon haploïde doit avoir reçu les mêmes informations génétiques paternelles (en tenant compte de la limite apportée par l'hétérofécondation (Gao *et al.,* 2011; Liu *et al.,* 2017a; Tian *et al.,* 2018)). L'objectif est donc de sélectionner les grains avec des embryons haploïdes et d'identifier, à partir du génotypage des albumens, les allèles exacts (en prenant en compte les réarrangements méiotiques) correspondants. Cela permettra donc de reconstituer les allèles présents spécifiquement dans les grains de pollen inducteurs qui sont à l'origine des individus haploïdes. En comparaison avec le génotypage des albumens des grains ayant des embryons diploïdes, une recherche de QTLs sera alors entreprise afin d'identifier les composantes génétiques liées à la formation des embryons haploïdes. De plus, étant donné que tous les individus analysés contiennent l'allèle mutant *nld*, cela permettra de passer outre l'influence du gène majeur lié à la

gynogenèse *in vivo*. Les QTLs ressortant de cette étude seront comparés à ceux déjà décrits en utilisant différents fonds génétiques (Barret *et al.,* 2008; Dong *et al.,* 2013; Prigge *et al.,* 2012). Ces résultats pourront alors être confrontés à la liste d'interactants putatifs de NLD identifiés par protéomique (tableau III-9) et aux études de RNAseq réalisées par Kelliher *et al.,* (2017) sur du pollen de lignées inductrices *versus* des lignées non inductrices, afin d'identifier des gènes candidats modulateurs de l'induction d'haploïdes. Les gènes candidats identifiés pourront, par la suite, être mutés chez la lignée isogénique BC5-A188$^{NLD\text{-}PK6}$, ayant des taux d'induction d'haploïdes très faibles (tableau III-2), afin d'évaluer si leur mutation contribue à l'augmentation de ces taux. Les lignées BC5-A188$^{NLD\text{-}PK6}$ contiennent majoritairement un fonds génétique A188, répondant favorablement à la transformation génétique. L'absence d'induction résiduelle dans le fonds génétique A188, confère un bruit de fond quasi-nul à ces lignées, constituant ainsi un avantage considérable afin d'évaluer l'effet des gènes modulateurs introduits. Cette validation fonctionnelle pourra être entreprise *via* l'utilisation de la technologie CRISPR maitrisée au sein de l'équipe d'accueil (Doll *et al.,* (2018), soumis). Les résultats ainsi obtenus permettront d'identifier d'autres éléments géniques impliqués dans la gynogenèse *in vivo* et d'éventuellement de les mettre en relation avec le mode d'action de *NLD* afin de reconstituer la voie moléculaire dans laquelle il s'intègre.

IV.2 - Défauts lors de la double fécondation ou élimination du génome paternel post-fécondation ?

Bien que le mécanisme sous-jacent à l'origine de la gynogenèse *in vivo* chez le maïs *via* l'utilisation des lignées inductrices, reste encore énigmatique, actuellement deux hypothèses majeures, encore très controversées, sont présentes dans la bibliographie afin d'expliquer ce processus. La première hypothèse soutient que l'induction d'haploïdes maternels pourrait être due à une/des irrégularité(s) durant la formation des cellules spermatiques et/ou lors de la double fécondation (Bylich and Chalyk, 1996; Chalyk *et al.,* 2003; Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Swapna and Sarkar, 2012; Tian *et al.,* 2018) alors que la seconde hypothèse prône une élimination sélective du génome paternel dans les embryons après une fusion normale des gamètes mâles et femelles (Li *et al.,* 2009; Zhang *et al.,* 2008; Zhao *et al.,* 2013). Dans ce projet de thèse, des expérimentations ont été conduites afin de mieux comprendre la gynogenèse *in vivo* chez le maïs et de se positionner sur l'une ou sur l'autre de ces deux hypothèses, sans pour autant écarter la possibilité d'un cumul de plusieurs facteurs.

IV.2.1 - La gynogenèse *in vivo*, des irrégularités lors de la double fécondation ?

Des études ont mis en avant que les grains de pollen des lignées inductrices chez le maïs ne présentaient pas d'anomalies phénotypiques majeures (grains tricellulaires avec un pore unique) (Mahendru and Sarkar, 2000) et avaient une viabilité et une capacité de germination équivalentes à celles des lignées non-inductrices (Li *et al.,* 2017; Tian *et al.,* 2018). Dans ce contexte, il est envisageable que l'induction d'haploïdes résulte d'un défaut à l'échelle des gamètes mâles, les cellules spermatiques et non du grain de pollen entier. Cette hypothèse est soutenue par Bylich et Chalyk (1996) qui ont identifié un certain pourcentage de dimorphisme chez les cellules spermatiques d'une lignée inductrice. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en avant un processus accru d'hétérofécondation lors de l'utilisation du pollen de différents fonds génétiques inducteurs d'haploïdes (Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Tian *et al.,* 2018). Les auteurs se sont appuyés sur ces observations afin de soutenir une absence de fécondation de la cellule œuf ou/et de la cellule centrale permettant ainsi une fécondation par un autre grain de pollen. Plus récemment, Tian *et al.,* (2018) ont observé dans certains sacs embryonnaires, résultant d'une pollinisation avec du pollen inducteur, une absence d'initiation de l'embryogenèse (divisions cellulaires) de la cellule œuf mais un développement normal de la cellule centrale fécondée. Ces anomalies ont été interprétées comme des événements de

fécondations simples, pouvant ainsi apporter une explication probable aux taux élevés d'hétérofécondation identifiés avec l'utilisation du pollen des lignées inductrices (Tian *et al.,* 2018). Ces observations peuvent s'apparenter à celles réalisées par Swapna et Sarkar, (2012) qui ont également identifié des défauts d'initiation de l'embryogenèse après la pollinisation avec un inducteur. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces fécondations anormales étaient dues à des défauts lors de la fusion des gamètes mâles et femelles, qui se produiraient une fois les deux cellules spermatiques relâchées dans la synergide (Swapna and Sarkar, 2012), bien qu'aucune preuve ne puisse assurer cette absence de fusion.

Dans ce projet, initialement l'hypothèse d'un défaut de la fusion des cellules spermatiques avec les cellules œufs a été privilégiée, en raison d'une erreur d'interprétation de la localisation subcellulaire de NLD, qui a été attribuée à la membrane plasmique des cellules spermatiques (Gilles *et al.,* 2017). En effet, chez *A.thaliana*, plusieurs protéines localisent à cette membrane et ont un rôle dans l'attachement et la fusion des gamètes, comme par exemple la protéine GEX2 (Mori *et al.,* 2014), intervenant dans l'attachement des gamètes ou la protéine GCS1/HAP2, impliquée dans la plasmogamie (Besser *et al.,* 2006; Mori *et al.,* 2006; Wong *et al.,* 2010). Ainsi, il a été envisagé que la délocalisation d'une phospholipase (NLD) de la membrane plasmique des cellules spermatiques vers le cytoplasme puisse perturber ces mécanismes d'adhésions/fusions. Cependant, cette hypothèse peut maintenant être écartée, puisque l'isolement des cellules spermatiques hors de la MGU (figure III-12), indique que NLD ne semble pas localiser à la membrane plasmique des cellules spermatiques mais à la membrane de la MGU, d'origine végétative ; la MIV (figure I-11). Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de Kelliher *et al.,* (2017) qui suggèrent une localisation subcellulaire de NLD/MTL dans le cytoplasme des cellules spermatiques. En regard de nos résultats, de par une absence de signal fluorescent relatif à la fusion protéique NLD:CITRINE dans le cytoplasme des cellules spermatiques isolées, cette hypothèse peut maintenant clairement être écartée (figure III-12). La localisation subcellulaire de NLD au niveau de la MIV doit encore être étayée avec une expérimentation d'immunomarquage dans les grains de pollen afin d'être en mesure de différencier les membranes plasmiques des cellules spermatiques et la MIV, qui sont physiquement très proches dans la MGU (actuellement en cours). Néanmoins, bien que NLD ne semble pas intervenir directement dans la fusion des gamètes, la question du devenir et du rôle de la MIV durant ou juste avant la fusion des cellules spermatiques reste ouverte. En effet, les cellules spermatiques sont incluses dans la MIV et pour fusionner avec les gamètes femelles, elles doivent donc logiquement se séparer de celle-ci. De façon intéressante, l'observation de sacs embryonnaires sauvages après une pollinisation avec du pollen transgénique contenant la

fusion protéique NLD/MTL::GFP révèle un signal fluorescent GFP au niveau de la synergide en dégénéresence (Kelliher *et al.,* 2017), suggérant une perte de cette MIV juste avant la double fécondation bien que ce processus soit encore peu décrit.

Dans le scénario où la MIV de la MGU serait altérée dans les grains de pollens inducteurs, il est possible de spéculer que ces défauts puissent entraîner une irrégularité lors de la double fécondation, en raison d'un défaut lors du transport ou/et de la libération de l'une ou des deux cellules spermatiques par le complexe MGU, jusqu'au sac embryonnaire. Cette hypothèse peut être appuyée par la faible transmission dans la descendance des allèles des mutants *mud* et *gum*, affectés respectivement dans l'intégrité et le positionnement de la MGU, suggérant ainsi qu'une MGU fonctionnelle est importante pour la double fécondation (Lalanne, 2002). Par ailleurs, il a été montré qu'un traitement à la chaleur sur du pollen d'*A.thaliana*, conduisait à une dissociation du complexe MGU, interférant ainsi avec le transport synchronisé des deux cellules spermatiques dans le tube pollinique (Ge *et al.,* 2011). Il serait alors envisageable qu'en l'absence de NLD au niveau de la MIV, la MGU soit affectée et que l'une des deux cellules spermatiques des grains de pollen inducteurs n'arrive pas jusqu'au sac embryonnaire, dont résulterait une simple fécondation à l'image de l'hypothèse proposée par Krapchev *et al.,* (2003) et Tian *et al.,* (2018) qui soutiennent que, dans certains cas, l'induction d'haploïdes serait due à une simple fécondation, suivie d'une reprogrammation de la cellule œuf.

IV.2.2 - La gynogenèse *in vivo*, une élimination du génome paternel post-fécondation ?

Si certaines données peuvent soutenir l'hypothèse d'une simple fécondation afin d'expliquer la gynogenèse *in vivo*, nos résultats mis en regard des travaux de plusieurs équipes indépendantes, laissent plutôt envisager une anomalie post-fécondation allant dans le sens d'une élimination du génome paternel dans les embryons haploïdes (Li *et al.,* 2009; Zhang *et al.,* 2008; Zhao *et al.,* 2013).

En effet, nos travaux de génotypage à l'échelle du génome entier, d'embryons et d'albumens provenant de grains normaux et de grains présentant des anomalies phénotypiques identifiées grâce à l'utilisation de la lignée rapportrice « inductrice GUS », ont permis de mettre en évidence la présence de fragments de génome paternel dans des génomes essentiellement maternels ainsi que des cas d'aneuploïdies dans ces deux tissus (y compris dans des grains identifiés comme *a priori* diploïdes), après un croisement avec la lignée inductrice (figure III-21, III-23, tableau III-8). Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par plusieurs études

indépendantes ayant également reporté des cas d'aneuploïdes dans des épis provenant de croisements avec du pollen issu de différents fonds génétiques inducteurs d'haploïdes (Li *et al.,* (2009), Zhao *et al.,* (2013), Qiu *et al.,* (2014) et Li *et al.,* (2017), Zhang *et al.,* 2008). En revanche, l'obtention d'embryons identifiés comme *a priori* haploïdes mais comportant des fragments de chromosomes paternels semble être un évènement plutôt rare. En effet, nous avons observé ce cas de figure uniquement pour un embryon parmi 50 classés comme haploïdes (tableau III-8). De même, par des travaux similaires, Zhang *et al.,* (2008) ont observé deux grains de ce type parmi 253 grains et Zhao *et al.,* (2013) un grain sur 48 grains analysés. Dans le cas des individus aneuploïdes, l'élimination d'un ou plusieurs chromosome(s) paternel(s) semble envisageable par un mécanisme similaire à celui observé lors des croisements interspécifiques (partie I.3.2.3) (Gernand *et al.,* 2005; Ho and Kasha, 1975; Lange and Jochemsen, 1976; Laurie and Bennett, 1989). En effet, par des analyses cytologiques, Zhang *et al.,* (2008) ont identifié la présence de micronoyaux, caractéristiques du processus d'élimination observé lors des croisements interspécifiques, chez des individus provenant de croisements avec une lignée inductrice. S'il semblerait que dans les croisements interspécifiques l'élimination du génome paternel ait un lien avec un défaut au niveau de CENH3 (Sanei *et al.,* 2011), le fait qu'aucune gène codant pour ces protéines ne soit présent dans les QTLs identifiés par Prigge *et al.,* (2012) peut laisser imaginer un mécanisme différent dans les croisements intraspécifiques (Li *et al.,* 2017). De manière intéressante, lors des croisements interspécifiques, en plus de ceux identifiés lors de la mitose, des structures ressemblant à des micronoyaux ont été observées, attachées aux noyaux interphasiques. Ces micronoyaux semblent avoir été expulsés du noyau interphasique, sans exclure le fait d'une fusion en cours avec le noyau principal plutôt qu'une fission (l'inverse de l'élimination) (Gernand *et al.,* 2005, 2006), ce qui pourrait par extrapolation aux croisements intraspécifiques expliquer la présence de fragments de chromosomes paternels chez les individus haploïdes. L'élimination sélective des chromosomes réalisée *via* la formation d'exclusions nucléaires rappelle le processus observé dans certaines cellules tumorales chez les mammifères (Utani *et al.,* 2011), ce qui laisse entrevoir la possibilité intrigante d'un processus évolutif permettant de distinguer l'ADN de l'hôte de l'ADN étranger ou endommagé afin de l'éliminer.

L'existence d'aneuploïdes dans les albumens (tableau III-8) (Li *et al.,* 2009, Qiu *et al.,* 2014) indique que l'élimination du génome paternel n'est pas un évènement spécifique des embryons haploïdes mais un processus commun aux deux compartiments issues de la double fécondation. L'albumen (3n) est connu pour être un tissu fortement dépendant du ratio entre le génome maternel (2n) et le génome paternel (1n), afin de se développer normalement (Carputo *et al.,* 1999). Ainsi, il est envisageable que contrairement aux embryons haploïdes capables de

se reprogrammer et de continuer leur développement, les grains dont les albumens sont fortement affectés dans l'élimination du génome paternel, avortent plus ou moins prématurément en fonction du degré de l'élimination. En regard de ces albumens aneuploïdes, un parallèle peut être fait avec les stratégies d'obtentions d'haploïdes *via* des croisements interspécifiques, qui nécessitent la réalisation de sauvetages d'embryons de par une non-reprogrammation des albumens après l'élimination du génome paternel (Devaux, 2003). De plus, il est à noter que Li *et al.,* (2009) ont mis en évidence que l'élimination du génome paternel dans les albumens pouvait se produire jusqu'à deux semaines après la pollinisation, apportant ainsi une explication différente et probable à l'origine des divers phénotypes de grains avortés observés, en fonction du stade de développement où a été initiée l'élimination.

Étonnamment, le génotypage de jeunes plantules de 17 jours provenant de croisements avec une lignée inductrice n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'aneuploïdes mais uniquement la présence d'un fragment chromosomique paternel chez une plantule haploïde parmi les 18 analysées, à l'image des résultats obtenus sur un grain immature avec l'inducteur GUS (tableau III-8). L'hypothèse peut donc être émise que l'élimination du génome paternel se produirait lors des premières étapes de l'embryogenèse conduisant ainsi à l'obtention de plantules soit diploïdes, soit haploïdes, avec éventuellement quelques cas rares contenant des fragments de chromosomes paternels. Il est cependant à noter que des traces de génome paternel peuvent encore être présentes dans les premières étapes du développement des plantules, puisque Zhang *et al.,* (2008) ont identifié des individus aneuploïdes par l'analyse des racines de grains germés résultant de croisements avec un inducteur. Il serait alors intéressant de faire une cinétique de ce processus d'élimination à différents stades de développements des grains et des plantules afin de mieux caractériser le comportement du génome paternel inducteur lors de l'embryogenèse. De plus, il serait également intéressant de suivre ces fragments de génome paternel dans les plantules haploïdes lors du doublement chromosomique et de la transmission à la génération suivante. Dans le cas d'une conservation de ces fragments entre les générations cela pourrait laisser entrevoir de nombreuses applications, notamment afin de transférer des gènes d'intérêt dans des fonds génétiques d'intérêt agronomique *via* ce processus. Cela apporterait également des connaissances sur la mécanistique sous-jacente, puisque si ces fragments se retrouvent dans les générations suivantes, donc après avoir subi un cycle de division méiotique, cela voudra très certainement dire qu'ils auront été intégrés dans les chromosomes maternels, par un mécanisme encore inconnu.

L'analyse des lignées mutantes pour le gène *NLD*, générées par la technologie CRISPR, confirme que les phénotypes de grains avortés, observés dans la descendance des lignées

inductrices, sont bien engendrés par la mutation de *NLD*. Concernant les autres phénotypes de grains anormaux également observés lors des croisements avec les lignées inductrices (grains sans embryon et grains « non développés »), plusieurs résultats préliminaires, obtenus avec les lignées inductrices et non inductrices *GUS*, indiquent qu'ils semblent également associés à la mutation du gène *NLD* (figure III-21). Ainsi, cette mutation n'aboutit pas uniquement au déclenchement de la gynogenèse *in vivo* (embryons haploïdes), mais également à la formation de divers grains anormaux qui proviendraient d'aneuploïdie plus ou moins marquée. Ces résultats indiquent donc que le phénotype associé à la mutation *nld* a une pénétrance beaucoup plus importante que les 5% à 10% d'individus haploïdes usuellement considérés. Dans ce contexte, l'étude de la gynogenèse *in vivo* doit être abordée sous un angle différent afin de ne pas rechercher un évènement « rare » (haploïdes) mais un problème plus global lors de la double fécondation.

Pour conclure, lorsqu'une lignée inductrice d'haploïdes est utilisée en parent mâle, il semblerait qu'une élimination du génome paternel se produise dans les deux compartiments du grain fécondé, lors l'embryogenèse précoce. En fonction, du degré d'élimination et des tissus affectés (embryons ou albumens), divers phénotypes seront observables, incluant les grains avortés et les grains haploïdes. Plus globalement, la présence incomplète du génome paternel dans les deux compartiments issus de la double fécondation ainsi que dans quelques plantules suggère indirectement que la fusion des gamètes mâles, provenant des lignées inductrices, avec les gamètes femelles se passerait correctement et que ce serait des évènements anormaux se produisant après la double fécondation qui entraîneraient la formation des individus haploïdes et des aneuploïdies.

IV.2.3 - La gynogenèse *in vivo*, un cumul de plusieurs facteurs ?

L'utilisation du séquençage génomique sur des noyaux isolés a récemment permis de mettre au jour l'existence de fragmentations chromosomiques dans des cellules spermatiques des grains de pollen des lignées inductrices (Li *et al.,* 2017). Cette découverte peut, en un sens, réconcilier les deux grandes hypothèses pouvant expliquer la formation d'embryons haploïdes présentées dans les paragraphes précédents (voir parties IV.2.1 et IV.2.2). En effet, il est possible que la fragmentation/élimination de certains chromosomes dans les cellules spermatiques entraîne la formation d'individus aneuploïdes et haploïdes après fécondation, en raison de l'absence de certaines composantes génétiques paternelles et/ou d'un processus d'élimination du génome paternel altéré, lors des premières divisions embryonnaires. Cette hypothèse peut être

appuyée en la mettant en regard du processus de fragmentation de l'ADN observé dans les cellules spermatiques des grains de pollen irradiés, également à l'origine de l'induction d'haploïdes chez certaines espèces (Borrino *et al.,* 1985; Chat *et al.,* 2003; Snape *et al.,* 1983; Werner *et al.,* 1984).

Dans les travaux de *Li et al.,* (2017), le séquençage pour un grain de pollen donné des deux cellules spermatiques ainsi que du noyau végétatif a permis de mettre en évidence que : (1) les chromosomes de la cellule végétative n'étaient pas affectés et (2) parmi les cellules spermatiques isolées d'un même grain de pollen, plusieurs cas d'aneuploïdies sont possibles, c'est-à-dire avec les deux cellules spermatiques affectées, une seule sur les deux, ou aucune (dans la majorité des cas). Ainsi, ces différentes configurations peuvent très bien expliquer les différents phénotypes de grains de maïs anormaux mis en lumière après le croisement avec une lignée inductrice (figures III-19, III-21). Il est alors envisageable qu'en fonction du niveau de fragmentation dans les deux cellules spermatiques, cela engendre des cas d'aneuploïdies plus ou moins marquées qui seront à l'origine de différents phénotypes dans l'albumen et/ou dans l'embryon, en fonction de si l'une ou si les deux cellules spermatiques sont affectées. Cela pourrait également expliquer les situations observées lors de l'utilisation de la lignée inductrice GUS, où certains grains présentant une absence de coloration dans l'albumen, dans l'embryon ou dans les deux compartiments, se sont révélés contenir la majorité du génome paternel. Il est alors envisageable que la fragmentation dans les cellules spermatiques de l'inducteur ait conduit à une élimination du fragment chromosomique contenant le gène paternel *GUS*. Concernant les grains avec des embryons haploïdes où des albumens avortés dont le génome paternel n'est presque plus présent, il est envisageable que l'ADN fragmenté des cellules spermatiques ne soit plus reconnu par la femelle qui déclencherait après la fusion des gamètes un processus d'élimination du génome paternel « anormal ». Dans ce contexte, l'existence de déterminismes génétiques du coté femelle dans l'induction d'haploïdes (Wu *et al.,* 2014) pourrait être interprété comme la capacité du fonds génétique maternel à être plus ou moins favorable à l'élimination du génome paternel. Cette hypothèse pourrait ainsi apporter une explication à la variabilité observée dans les taux d'induction d'haploïdes des trois lignées femelles différentes, pollinisées avec un même inducteur mâle dans des conditions de cultures identiques (figure III-27).

En plus de donner une explication probable aux différents phénotypes de grains obtenus après le croisement avec une lignée inductrice d'haploïdes, l'existence de cette fragmentation dans certaines cellules spermatiques pourrait également donner un sens à la faible compétitivité du pollen mutant en regard du pollen sauvage et des forts biais de ségrégation de l'allèle *NLD* mutant qui ont pu être observés lors du clonage positionnel de *NLD* (Barret *et al.,* 2008; Dong *et*

al., 2013; Gilles *et al.,* 2017; Kelliher *et al.,* 2017; Xu *et al.,* 2013). En effet, il est envisageable que certaines cellules spermatiques dont l'ADN est fragmenté perdent leur fonction et ne soient plus aptes à la fécondation. Dans ce contexte, le pollen sauvage se retrouvera donc avantagé par rapport au pollen inducteur avec plus de probabilité de féconder les gamètes femelles. Cette hypothèse va ainsi dans le sens de celle proposée par Tian *et al.,* (2018) qui soutiennent que la gynogenèse *in vivo* pourrait résulter dans certains cas d'une élimination du génome paternel et dans d'autres cas d'une simple fécondation. Par ailleurs, cette non-fonctionnalité putative de certaines cellules spermatiques pourrait également donner une explication aux taux plus élevés d'hétérofécondation observés avec les lignées inductrices (Kraptchev *et al.,* 2003; Liu *et al.,* 2017a; Tian *et al.,* 2018).

Pour conclure, il semblerait que l'induction d'haploïdes résulte d'une combinaison multifactorielle dont les principales conséquences sont des irrégularités chromosomiques durant la formation des cellules spermatiques et une élimination du génome paternel après la double fécondation, en raison de ces irrégularités. Cette nouvelle hypothèse met en relation les deux grandes hypothèses majeures présentes dans la bibliographie et controversées depuis plus de soixante ans.

IV.3 - Comment la mutation de *NLD* pourrait expliquer les gynogenèse *in vivo* ?

La découverte chez les lignées inductrices de cellules spermatiques aneuploïdes (Li *et al.,* 2017) soulève maintenant la question du mécanisme moléculaire sous-jacent et notamment du rôle de *NLD* dans ce processus. En effet, il serait intéressant de comprendre s'il y a une relation entre l'altération de la phospholipase membranaire NLD au niveau de la MIV de la MGU avec une fragmentation des chromosomes à l'intérieur des cellules spermatiques.

Les phospholipases chez les plantes sont connues pour avoir deux fonctions majeures ; à la fois structurelle et de signalisation. En effet, ces enzymes participent au métabolisme lipidique et au remodelage membranaire mais génèrent également des messagers moléculaires, primaires et secondaires, dérivés du clivage des phospholipides ; les lysophospholipides, qui auront de nombreux rôles biologiques (Aloulou *et al.,* 2012; Brown *et al.,* 2003; Scherer, 2002; Scherer *et al.,* 2010; Wang *et al.,* 2012b). Actuellement, il n'est pas encore possible de connaître la fonction de NLD, mais le fait que cette protéine localise à la MIV, une membrane très particulière autour des cellules spermatiques, et que le problème à l'origine de la gynogenèse *in vivo* semble provenir d'un défaut des cellules spermatiques rendent difficile d'entrevoir un rôle dans une signalisation intracellulaire. Il est à noter que la MIV semble disposer de caractéristiques particulières en regard de la membrane plasmique de la cellule végétative en raison d'une affinité très spécifique avec NLD. Afin d'avoir plus d'informations sur la voie moléculaire dans laquelle s'intègre NLD, la collaboration initiée avec Alexandre Noiriel et Abdelkarim Abousalham (ICBMS) afin de caractériser son activité enzymatique pourrait apporter des premiers éléments de réponse. En effet, connaître le substrat de NLD, ainsi que les produits résultant de son activité enzymatique constitueront des indications sur sa fonction. Ces résultats pourront être confrontés avec les putatifs interactants de NLD, identifiés par immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse. De manière intéressante, différentes protéines pouvant intervenir dans les voies de régulation et/ou de signalisation des lipides/phospholipides ont pu être identifiées lors de cette étude (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 6, Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine) (tableau III-9), bien que ces interactions restent encore à être confirmées par des approches complémentaires, qui vont très prochainement être initiées (doubles hybrides, Co-immunoprécipitation).

Concernant un putatif rôle de NLD dans le maintien de l'intégrité physique de la membrane plasmique, il serait alors envisageable que l'absence de NLD à la MIV ait pour

conséquence une modification de sa composition lipidique et donc de sa structure. Par exemple, plusieurs études ont mis en évidence que la composition lipidique des membranes (bicouches lipidiques) pouvait avoir une influence sur leur courbure et leur déformation (Brown *et al.,* 2003; Graham and Kozlov, 2010; Kooijman *et al.,* 2003; Melero *et al.,* 2018; Zimmerberg and Kozlov, 2006). Dans ce contexte, il est facilement imaginable qu'une modification de la structure membranaire de la MIV puisse avoir des conséquences sur les cellules spermatiques. En effet, il est possible que la MIV joue un rôle d'interface entre les cellules spermatiques et le cytoplasme de la cellule végétative, notamment à travers les structures ressemblant à des plasmodesmes décrites par Cresti *et al.,* (1987) afin d'échanger divers éléments, dont des signaux moléculaires et des nutriments essentiels à la vie cellulaire, à l'image de l'hypothèse proposée par Mogensen, (1992). Il a d'ores et déjà été démontré que la cellule végétative produisait des petits ARNs ayant une action directe sur la régulation des éléments transposables présents dans les cellules spermatiques (Grant-Downton *et al.,* 2013; Martinez *et al.,* 2018; Slotkin *et al.,* 2009). Par ailleurs, Jiang *et al.,* (2015) ont mis en évidence que la protéine ABA-Hypersensitive Germination3 (AHG3) localisait, en partie, dans les cellules spermatiques alors que le gène correspondant était exprimé dans la cellule végétative, laissant entrevoir un passage possible d'ARNs messagers d'une cellule à l'autre, donc à travers la MIV (Jiang *et al.,* 2015). Il est alors envisageable, que l'absence de ces différents petits ARNs ou ARNs messagers, dans le cas d'une putative MIV altérée, pourrait conduire à une altération des cellules spermatiques, se caractérisant par une fragmentation chromosomique. Afin de vérifier cette hypothèse, d'une altération physique de la MIV en l'absence de la protéine NLD, des analyses par microscopie électronique en transmission sont actuellement en cours afin d'évaluer s'il y a des différences phénotypiques entre les MIVs des grains de pollen provenant des lignées inductrices et des lignées non-inductrices. De même, un séquençage des petits ARNs contenus dans les cellules spermatiques des lignées inductrices pourrait être envisageable afin d'évaluer si leurs quantités sont moins importantes en regard de celles présentes dans les cellules spermatiques des lignées non-inductrices. Cela pourrait alors suggérer une réception amoindrie des petits ARNs provenant de la cellule végétative dans le pollen inducteur.

De manière intéressante, les travaux de Li *et al.,* (2017) mettent en évidence que bien que l'apparition de fragmentations chromosomiques lors de la formation du grain de pollen soit un processus continu, celles-ci sont à leurs apogées lors des étapes proches, en amont ou en aval, de la seconde mitose pollinique, responsable de la division de la cellule générative et donc de la formation des deux cellules spermatiques matures. Il se trouve que le début de l'expression du gène *NLD* coïncide parfaitement avec cette plage temporelle (figure III-9). Ces résultats ont pu

être confirmés par Liu *et al.,* (2017) qui ont réalisé une analyse transcriptomique sur du pollen à différents stades de développements. Dans ce contexte, il serait alors envisageable que la protéine NLD ait un rôle dans le bon déroulement de la seconde mitose pollinique et que son action sur le phénotype d'induction d'haploïdes se joue à ce niveau-là. Étant donné que des éléments (petits ARNs, ARNs messagers) semblent pouvoir passer de la cellule végétative vers les cellules spermatiques (Grant-Downton *et al.,* 2013; Jiang *et al.,* 2015; Martinez *et al.,* 2018; Slotkin *et al.,* 2009), il est alors imaginable qu'en l'absence de NLD à la MIV certaines informations, découlant d'une voie de signalisation résultant de l'activité enzymatique de NLD et/ou ne pouvant plus passer l'interface de la MIV en raison de sa déstructuration, ne parviennent pas jusqu'à la cellule générative avant ou pendant la division cellulaire, entraînant ainsi l'apparition d'anomalies. Des premières indications laissent à penser que le problème ne viendrait pas d'une initiation de la mitose et donc d'une éventuelle désynchronisation ou d'un dysfonctionnement du cycle cellulaire, puisque les grains de pollen des lignées inductrices semblent tricellulaires (Mahendru and Sarkar, 2000). En effet, chez *A.thaliana*, il a été montré que les mutants affectés dans les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire lors de la seconde mitose pollinique présentaient des phénotypes de grains de pollen bicellulaires (*cdka1, fbl17, duo1,3*) indiquant une absence de mitose (Brownfield *et al.,* 2009b; Durbarry *et al.,* 2005; Iwakawa *et al.,* 2006; Kim *et al.,* 2008; Liu *et al.,* 2008; Rotman *et al.,* 2005). De manière intéressante, bien que cela soit un contexte différent, dans la situation des croisements interspécifiques, il semblerait qu'un défaut lors des mitoses soit à l'origine de l'élimination du génome paternel dans les cellules. Cette élimination résulterait de problèmes lors de la ségrégation de certains chromosomes conduisant à la formation de micronoyaux qui seraient éliminés par l'activité d'une endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN dans les cellules somatiques (Gernand *et al.,* 2005; Lange and Jochemsen, 1976; Laurie and Bennett, 1989; Mochida *et al.,* 2004; Sanei *et al.,* 2011; Tan *et al.,* 2015). Ainsi, dans le pollen inducteur, si un défaut lors de l'initiation de la mitose peut *a priori* être écarté, il est alors envisageable qu'un problème se produise durant le processus de mitose et notamment lors de la condensation et/ou de la migration des chromosomes. Par exemple, il peut être imaginé que l'absence de NLD à la MIV ait un impact sur l'organisation du cytosquelette lors de la mitose. Cette hypothèse peut être mise en regard d'une étude réalisée chez *A.thaliana*, qui montre qu'une PLA_2 est impliquée dans une voie de signalisation ayant un rôle sur l'organisation des microtubules dans les cellules racinaires (Gardiner *et al.,* 2008). Par l'étude du pollen des lignées inductrices contenant la fusion rapportrice de la TUBULINE ALPHA (TUBα:YFP), identifiée par Kliwer et Dresselhaus, (2010) pour être spécifique de la lignée générative et non de la cellule végétative, il a pu être mis

en évidence, sous condition d'un stress osmotique, une désorganisation du cytosquelette dans les cellules spermatiques, par la présence d'agrégats de la fusion protéique TUBα:YFP (figure III-25). Ces résultats laissent envisager deux hypothèses principales ; (1) soit les cellules spermatiques, en raison de leur ADN fragmenté, sont plus sensibles aux stress et réagissent donc au niveau de leur cytosquelette de manière accrue comme cela a pu être observé dans les cellules des plantes en réponse aux stress (Blancaflor and Hasenstein, 1995; Nemenoff *et al.,* 1993; Nick, 2013; Smertenko *et al.,* 1997; Zandomeni and Schopfer, 1994) , (2) soit le cytosquelette des MGU de grains de pollen des lignées inductrices présente des anomalies. Afin de vérifier ces hypothèses il serait intéressant de réaliser une cinétique, par l'observation du pollen des lignées rapportrices, avec et sans l'application d'un stress osmotique, durant l'ensemble du processus de division mitotique pollinique, afin de voir s'il se produit des anomalies lors de l'agencement des microtubules et/ou lors de la séparation des chromosomes. Ces analyses pourront être couplées avec la réalisation d'un caryotype lors des différentes étapes de la seconde mitose pollinique afin de voir s'il y a la présence de micronoyaux et/ou de chromosomes retardataires, ce qui pourrait suggérer un processus d'élimination des chromosomes en cours. De plus, afin d'évaluer la conséquence de la fragmentation de l'ADN dans les cellules spermatiques sur leur intégrité, il serait intéressant d'évaluer leur état de stress par rapport à des cellules spermatiques sauvages, *via* la mesure par exemple des ROS dans le pollen des lignées inductrices en comparaison aux lignées non-inductrices (Bibov *et al.,* 2018) .

Pour conclure, bien que le rôle de la protéine NLD dans la fragmentation chromosomique s'opérant dans les cellules spermatiques ne soit pas encore élucidé, sa localisation subcellulaire au niveau de la MIV de la MGU et la délocalisation de la protéine tronquée laisse à penser qu'un processus essentiel se produit au niveau de cette membrane particulière, encore très peu caractérisée. De plus, l'expression très spécifique du gène *NLD* lors les étapes proches de la seconde mitose pollinique et l'apparition de fragmentations chromosomiques dans les gamètes mâles durant cette même plage temporelle laissent à penser que l'origine de la gynogenèse *in vivo* proviendrait d'une anomalie lors de ce processus et par extrapolation d'une anomalie résultant de la mutation de *NLD*.

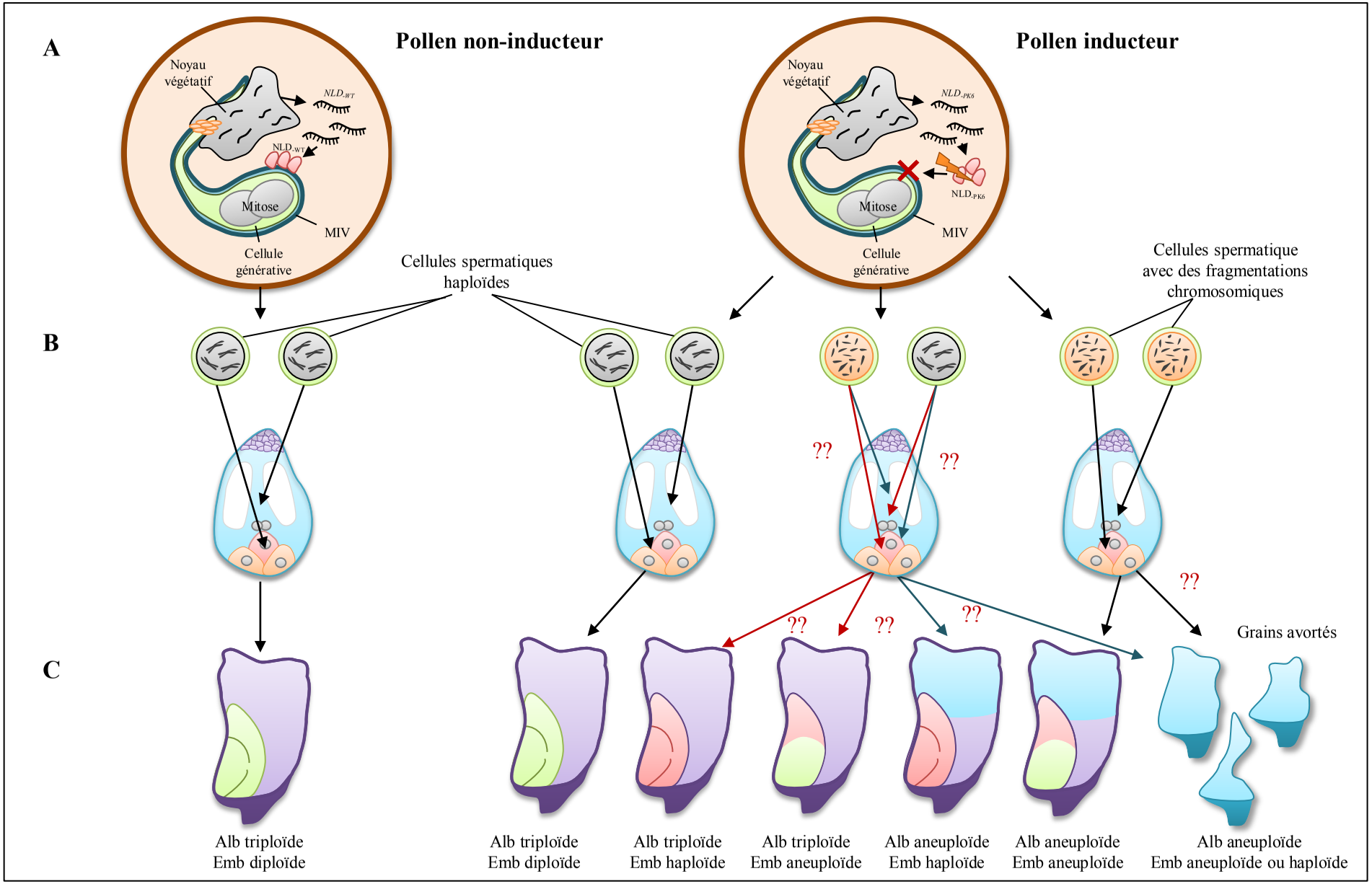


Figure IV : Modèle proposé pour expliquer la gynogenèse *in vivo* chez le maïs. A : Dans les grains de pollen non-inducteurs, lors de la mitose, la protéine NLD sauvage (NLD_{-WT}) localise au niveau de la MIV de la MGU alors que dans le pollen inducteur la protéine tronquée (NLD_{-PK6}) perd cette localisation, entraînant sa probable dégradation. **B** : Les cellules spermatiques du pollen non-inducteur sont haploïdes. Dans le pollen inducteur, certaines cellules spermatiques sont aneuploïdes en raison de fragmentations chromosomiques, probablement survenues lors de la mitose. L'hypothèse peut être émise que l'absence de NLD à la MIV aurait une relation avec cette fragmentation. **C** : Les cellules spermatiques aneuploïdes conduisent à différents phénotypes de grains anormaux en fonction de leurs degrés d'aneuploïdie et/ou de l'importance de l'élimination du génome paternel par la femelle après la fécondation. Alb = Albumen, Emb = Embryon.

IV.4 - Model proposé pour expliquer la gynogenèse *in vivo*

En confrontant les résultats ressortant de ce projet de thèse au regard de ceux présents dans la littérature, un modèle pouvant expliquer l'induction d'haploïdes maternels chez le maïs peut être proposé (figure IV).

Chez les lignées sauvages, la protéine NLD localise au niveau de la MIV de la MGU. Bien que la fonction de la MIV reste encore énigmatique, il est probable que cette membrane joue un rôle d'interface entre la cellule végétative et les cellules spermatiques. Chez les lignées inductrices, la mutation du gène *NLD* entraîne la troncation de la partie C-ter de la protéine qui ne pourra alors plus assurer sa fonction. Cette perte de fonction résulterait du fait que la protéine tronquée ne s'accumulerait plus normalement au niveau de la MIV, en raison de la perte d'éléments indispensables à son adressage ; un site d'ancrage d'ancres lipidiques et des acides aminés cationiques, favorisant les interactions électrostatiques avec la MIV. Du fait que *NLD* code pour une phospholipase A_2, l'absence de la protéine au niveau de la MIV pourrait alors avoir deux conséquences majeures plausibles, c'est à dire (1) des anomalies structurales relatives à la maintenance de l'intégrité membranaire de la MIV, pouvant putativement impacter les échanges entre la cellule végétative et les cellules spermatiques ou (2) des défauts engendrés par la perte de certaines voies de signalisation dépendantes des produits du clivage des phospholipides de la MIV par NLD. L'expression de *NLD* débute dans les étapes proches, en amont ou en aval, de la seconde mitose pollinique, ce qui coïncide temporellement avec l'apparition de fragmentations chromosomiques accrues spécifiquement dans les cellules spermatiques des lignées inductrices (Li *et al.,* 2017). Dans ce contexte, il est alors envisageable que la cellule générative, à l'origine des cellules spermatiques, perde des informations cruciales, qui auraient dû découler de l'action de NLD, lors de la seconde mitose du grain de pollen. Cette perte d'informations conduira putativement à un processus de mitose altéré, dont résultera une fragmentation chromosomique responsable de cellules spermatiques aneuploïdes. Il est possible que certaines de ces cellules spermatiques ne soient plus fonctionnelles pour la fécondation et entraînent des cas de simples fécondations, putativement à l'origine de la reprogrammation de certaines cellules œufs en embryons haploïdes. En revanche, certaines cellules spermatiques seraient toujours aptes à la fécondation, mais après la fusion des gamètes, les informations génétiques paternelles, soit ne seront pas entièrement apportées par les cellules spermatiques aneuploïdes, soit ne seront pas reconnues par la femelle qui déclenchera un processus d'élimination du génome paternel, à l'image du processus observé lors des croisements

interspécifiques et éventuellement lors des pollinisations avec des grains de pollen irradiés (voir partie I.3.2.2). Résulteraient de ces éliminations, des phénotypes de grains anormaux, plus ou moins marqués en fonction du degré d'altération du génome dans les cellules spermatiques et/ou d'élimination du génome paternel après la fusion des gamètes mâles et femelles, pour atteindre le stade d'élimination/absence complète avec les grains haploïdes.

IV.5 - La gynogenèse *in vivo* : les perspectives à long terme

L'ensemble de ce projet de recherche a apporté des connaissances nouvelles sur la gynogenèse *in vivo* chez le maïs, avec l'identification de *NLD* comme le gène causal de l'induction d'haploïdes ainsi que des premiers éléments de réponse sur son mode de fonctionnement (expression, localisation). Il serait maintenant intéressant d'exploiter ces connaissances afin d'améliorer les taux d'induction d'haploïdes chez le maïs et de transférer cette technologie chez d'autres espèces d'intérêt agronomique pour lesquelles elle n'est pas encore applicable.

IV.5.1 - Vers une amélioration de l'induction d'haploïdes chez le maïs

Les applications des connaissances qui découlent de ce projet sont multiples dans la filière HD. Par exemple, l'utilisation d'un marqueur génétique discriminant les 4-pb présentes sur *NLD* et causales de l'induction d'haploïdes chez les lignées inductrices, permet de vérifier la pureté des lots de semences provenant des croisements avec les lignées inductrices, souvent contaminés par des croisements avec des grains de pollens étrangers, en raison de la faible compétitivité du pollen inducteur (voir partie I.4.3.1) (Martinant *et al.,* 2016). Par ailleurs, ce marqueur peut facilement être intégré dans les programmes de sélection assistée par marqueurs, visant à créer de nouvelles lignées inductrices dans des fonds génétiques plus adaptés à certains environnements de culture. Les taux d'induction d'haploïdes des lignées inductrices modernes utilisées dans les schémas de sélection restent inférieurs à 15%. L'amélioration de ces taux pourrait largement contribuer à augmenter l'efficience du processus de production d'HDs. L'un des enjeux des années à venir résidera donc dans l'identification d'autres composantes génétiques modulatrices de l'induction d'haploïdes, dans l'optique de les cumuler dans une seule lignée. Dans ce projet, des études préliminaires ont été entreprises (voir partie IV.1.3) et pourront donc apporter de nouvelles connaissances afin d'optimiser d'avantage les schémas de sélection et d'augmenter les taux d'induction d'haploïdes des futures lignées inductrices.

La variabilité des taux d'induction d'haploïdes, observée pour une lignée inductrice donnée, durant l'ensemble de ce projet de thèse et les résultats ressortant de plusieurs études indépendantes indiquent que les conditions environnementales semblent avoir une influence sur les taux d'induction d'haploïdes (De La Fuente *et al.,* 2018; Prigge *et al.,* 2011). En revanche, les processus sous-jacents à cette relation environnement et capacité d'induction restent énigmatiques. Un rapprochement entre la découverte de *NLD* comme causal de la gynogenèse

in vivo, dont la protéine localise au niveau de la MGU et un effet avec l'environnement peut être fait *via* l'étude de Ge *et al.,* (2011). Les auteurs montrent, chez *A.thaliana*, qu'un traitement à la chaleur conduit à une dissociation de la MGU, laissant envisager une influence de la température sur l'intégrité de la celle-ci. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester différentes conditions de températures sur l'induction d'haploïdes, ainsi que l'effet d'autres conditions de culture (stress hydriques, luminosité, humidité, etc.). L'utilisation des outils générés dans ce projet, comme par exemple les plantes inductrices possédant le gène rapporteur *TUBα* spécifique des cellules spermatiques dans le grain de pollen (voir partie III.3.3) pourrait s'avérer utile afin de suivre leurs comportements dans un fonds génétique inducteur en fonction de l'environnement, en plus de l'évaluation des taux l'induction d'haploïdes. Par ailleurs, connaissant maintenant la plage temporelle de l'expression de *NLD* et de l'apparition des défauts chromosomiques dans les cellules spermatiques des lignées inductrices, il serait judicieux d'intervenir durant la seconde mitose pollinique afin de tester les différentes conditions de culture. Par la mesure de la taille des anthères, il est facile de corréler le moment de cette mitose avec le stade de développement du pollen, ce qui facilitera les analyses. Si des résultats concluants ressortent de cette étude, il sera envisageable de les appliquer aux processus de production d'haploïdes, en ayant recours à des conditions de culture optimales afin de favoriser l'induction.

IV.5.2 - Transfert de la gynogenèse *in vivo* à d'autres espèces d'intérêt agronomique

Actuellement, l'exploitation de la gynogenèse *in vivo* afin de produire des plantules haploïdes est un processus qui reste très spécifique à la filière HD maïs (voir partie I.3). De par les atouts considérables de cette méthode par rapport aux méthodes *in vitro* (voir partie I.3), il pourrait donc y avoir de nombreux avantages à transférer cette technologie à d'autres espèces d'intérêt agronomique chez lesquelles elle n'est pas encore applicable. L'identification du gène *NLD* comme causal de l'induction d'haploïdes chez le maïs laisse envisager l'existence d'orthologues chez d'autres espèces, qu'il serait intéressant d'identifier. A ce propos, des analyses phylogéniques permettent d'identifier facilement des gènes candidats orthologues de *NLD* chez différentes monocotylédones (sorgho, riz, brachypodium) (Martinant *et al.,* 2016). Récemment, l'orthologue de *NLD* a pu être identifié chez le riz et nommé *Oryza sativa MATRILINEAL* (*OsMATL*) (Yao *et al.,* 2018). Les auteurs sont parvenus par la génération de mutations sur le gène *OsMATL, via* l'utilisation de la technologie CRISPR, à obtenir des taux d'induction d'haploïdes chez le riz entre 2% et 6%, apportant ainsi la preuve du concept de la

faisabilité du transfert de la gynogenèse *in vivo*, *via* la mutation d'un orthologue de *NLD* chez cette espèce. Dans ce contexte, il envisageable que des résultats similaires soient possibles avec diverses monocotylédones. En revanche, concernant les dicotylédones, les orthologues de *NLD* semblent plus difficiles à identifier par des méthodes de phylogénie (Gilles *et al.,* 2017; Martinant *et al.,* 2016). Les différentes informations relatives à *NLD* obtenues durant ce projet (expression, localisation à la MIV, mécanistique d'adressage de la protéine) pourront contribuer à orienter le choix dans les orthologues candidats. Par ailleurs, le fait d'avoir montré que la protéine NLD de maïs localisait également à la MIV de la MGU dans le pollen d'*A.thaliana* (figure III-13) suggère une conservation des propriétés électrostatiques de la MIV de la MGU et de l'adressage de NLD entre les monocotylédones et les dicotylédones. Afin de démontrer la preuve du concept chez *A.thaliana*, des expériences préliminaires ont été initiées avec un gène codant pour une phospholipase A (*At1g61850*), pouvant putativement être un orthologue de *NLD*. Ce candidat a été choisi pour deux raisons : (1) il semble, d'après les bases de données publiques de transcriptomiques, être exprimé spécifiquement dans les grains de pollen immatures tricellulaires (Winter *et al.,* 2007) et (2) la protéine correspondante présente des sites de prédictions d'ancrage lipidiques présentant des profils similaires à ceux de NLD (Xie *et al.,* 2016). Des mutants d'insertion sont disponibles pour ce gène et des analyses sont actuellement en cours afin d'évaluer leur capacité d'induction d'haploïdes.

Les conclusions ressortant de cette étude laissent fortement à supposer que la délocalisation de NLD de la MIV vers le cytoplasme de la cellule végétative entraîne l'induction d'haploïdes chez le maïs. Tenant compte de ces nouvelles connaissances, un autre niveau d'action pourrait être de développer des stratégies visant à reproduire artificiellement la délocalisation de NLD dans le pollen d'espèces d'intérêt *via* des méthodes chimiques. Dans ce contexte, il serait intéressant de traiter du pollen avec les drogues PAO et 2-BP, conduisant à une délocalisation de NLD dans les cellules racinaires du système hétérologue *A.thaliana* (figures III-15, III-16), afin d'évaluer si cela conduit à une induction d'haploïdes. Dans la même idée, des tests pourraient être envisagés avec l'utilisation de différents inhibiteurs des phospholipases A, afin de voir si cela confère la capacité d'induction d'haploïdes. Dans le cas de résultats concluants, cette stratégie pourrait apporter de nouvelles perspectives afin de transférer la gynogenèse *in vivo* à de nombreuses espèces d'intérêt agronomique.

PARTIE V

Matériels et Méthodes

V.1 - Conditions de culture

V.1.1 - Conduites de culture du maïs

Durant les trois années de ce projet de thèse, les plantes de maïs ont été cultivées dans différentes conditions de cultures ; en plein champ ou dans des infrastructures de cultures contrôlées (serres et chambres de cultures). Il est à noter que les plantes ont été cultivées avec une variabilité des conditions environnementales, pouvant putativement avoir une influence sur les taux d'induction d'haploïdes, à prendre en compte dans l'interprétation des résultats (De La Fuente *et al.,* 2018; Prigge *et al.,* 2011). De plus, la mise en place de nouvelles infrastructures de cultures a nécessité une optimisation des conditions de cultures (humidité, luminosité, température), accentuant cette variabilité environnementale suivant les cycles de culture. Les expérimentations conduites ont généralement été réalisées par séries comparables, permettant ainsi de limiter cette influence des conditions de culture sur les résultats. L'ensemble des pollinisations sont réalisées à la main par la couverture des épis femelles et des panicules mâles avec des sachets papiers. Les sachets sur les panicules sont déposés le matin, puis le pollen frais est prélevé et utilisé pour polliniser les soies femelles entre 2 et 3 heures après.

V.1.1.1 - Cultures en plein champ

Les plantes non transgéniques ont été, en partie, cultivées en plein champ (pendant la période estivale) à l'ENS de Lyon avec un apport d'engrais à libération lente Osmocote Exact® (N : 15%, P : 9%, K : 12% + 2% de MgO + TE) (N : azote, P : phosphore, K, potassium) (Scotts) quinze jours après la mise au champ. Les semis se réalisent en conditions de culture contrôlées et les jeunes plantules restent dans ces conditions pendant une semaine. Elles sont ensuite acclimatées dans un tunnel ouvert pendant une semaine avant d'être transférées en plein champ avec une densité de plantation de 14 centimètres entre chaque plante. L'irrigation est réalisée par goutte à une goutte une à deux heures par jour en fonction des conditions climatiques. L'essai de l'évaluation de l'influence de la longueur des soies femelles sur l'induction d'haploïdes (partie III-5) a été réalisé à la station expérimentale de Limagrain Europe située à Nérac (France).

V.1.1.2 - Cultures en conditions contrôlées

Les plantes transgéniques sont cultivées dans des infrastructures habilitées de type S2. Durant la moitié de ce projet, les plantes ont été cultivées dans la serre de l'ENS de Lyon, avec

une photopériode de 16h/8h (jour/nuit), une température de 24°C/19°C (jour/nuit) et sans contrôle de l'humidité ambiante. Dans la seconde moitié du projet, les plantes ont été cultivées dans des chambres de culture de 15m² (Strader), contenant un système d'éclairage constitué d'une combinaison de 10 spots LED avec une intensité de 500W (NEPTUNE LED) et 8 lampes à sodium de 400 W, dont résultera une PPF (Photosynthetic Photon Flux) d'environ 300 à 400 $\mu mol.s^{-1}$ à hauteur de plantes. Les plantes sont conduites avec une photopériode de 16h/8h (jour/nuit) et une humidité relative contrôlée de 55%/65% (jour/nuit). La température est de 24°C/17°C (jour/nuit) durant les 80 premiers jours après semis et de 26°C/28°C (jour/nuit) dans les jours suivants jusqu'à la récolte des épis. Les semis sont réalisés dans des godets avec 0,2 litre de substrat Favorit MP Godet® (N : 20%, P : 0,2%, K : 40%) (Eriterre), puis les plantules sont transférées entre 10 et 15 jours après le semis dans des pots contenant 8 litres de substrat Favorit Argile TM® + 20% perlite (N : 20%, P : 0,2%, K : 40%) (Eriterre) supplémentés de 50 ml d'engrais Osmocote Exact® (N : 15%, P : 9%, K : 12% + 2% de MgO + TE) (Scotts). Durant la culture des apports d'engrais Osmotop® (N : 25%, P : 5%, K : 10% + 2% de MgO + TE) (Scotts) sont réalisés entre une à deux fois. L'irrigation est réalisée à la main une fois par jour.

V.1.2 - Conduites de culture de l'Arabette

V.1.2.1 - Culture *in vitro* en conditions contrôlées

Après la récolte manuelle, les graines sont mises en séchage dans une étuve à 37°C puis sont placées trois jours à l'obscurité à 4°C afin de les stratifier et ainsi d'homogénéiser la germination. Les graines sont stérilisées dans une boite hermétique contenant du gaz Dichlore (3 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 40% dans 100 ml d'hypochlorite de sodium (NaClO)) pendant deux heures. Concernant les graines résultant des transformations génétiques (voir partie V.4.4), celles-ci sont stérilisées par un passage de 10 minutes dans une solution contenant 50% d'éthanol 100% et 50% de NaClO. Trois rinçages sont alors réalisés avec de l'éthanol 100%, suivis d'un séchage sous une hôte stérile à flux laminaire pendant une nuit. Les graines ainsi stérilisées sont semées sur boites de Petri contenant du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) gélosé, supplémenté avec l'antibiotique nécessaire à la sélection des lignées considérées. Dans cette étude il s'agira exclusivement de la kanamycine monosulfate (50 µg/l). Après dix jours de croissance verticale ou horizontale (suivant les expérimentations) dans des incubateurs de type Sanyo (MLR-350) en jours continus à 20°C, avec 65% d'humidité et 30% d'éclairage (lampes Osram Biolux L36W (Aquascape) et Grolux F36W (Sylvania)), les plantules sont observées et/ou transférées en substrat et en chambres de culture.

Lignée	Fonds génétique	Transgène	Description de la lignée
pNLD::NLD$_{HD99}$:CITRINE	A188	*pNLD::NLD$_{HD99}$:CITRINE*	Lignée rapportrice contenant la fusion traductionnelle du gène *NLD* sauvage (provenant de HD99) au gène rapporteur *CITRINE*
pNLD::NLD$_{PK6}$:CITRINE	A188	*pNLD::NLD$_{PK6}$:CITRINE*	Lignée rapportrice contenant la fusion traductionnelle du gène *NLD* mutant (provenant de PK6) au gène rapporteur *CITRINE*
pNLD$_{B73}$::GUS	A188	*pNLD-$_{B73}$::GUS*	Lignée rapportrice contenant la fusion transcriptionnelle du gène rapporteur *GUS* sous contrôles du promoteur de *NLD$_{B73}$* (2576-pb en amont du gène)
pNLD$_{PK6}$::GUS	A188	*pNLD$_{PK6}$::GUS*	Lignée rapportrice contenant la fusion transcriptionnelle du gène rapporteur *GUS* sous contrôles du promoteur de *NLD$_{PK6}$* (2534-pb en amont du gène)
pNLD-H2B5-2XmCherry	A188	*pNLD-H2B5-2XmCherry*	Lignée rapportrice contenant la fusion transcriptionnelle du gène rapporteur *mCherry* à l'histone H2B5 pour un adressage aux noyaux, sous contrôle du promoteur *pNLD*
OE::NLD$_{HD99}$	A188	*pACTIN::NLD$_{HD99}$*	Lignée surexprimant la version sauvage de *NLD* (*NLD$_{HD99}$*)
OE::NLD$_{PK6}$	A188	*pACTIN::NLD$_{PK6}$*	Lignée surexprimant la version mutante de *NLD* (*NLD$_{PK6}$*)
RNAi$_{NLD}$	A188	*pACTIN:RNAi-NLD*	Lignée contenant un RNAi spécifique de *NLD*
crinld-1	A188	*X*	Lignée mutante pour *NLD* générée avec la technologie CRISPR (cible B)
crinld-2	A188	*X*	Lignée mutante pour *NLD* générée avec la technologie CRISPR (cible B)
crinld-3	A188	*X*	Lignée mutante pour *NLD* générée avec la technologie CRISPR (cible C)
Inducteur GUS	F2 ?? X PK6	*pACTIN::GUS*	Descendance F2, contenant l'allèle sauvage *NLD$_{HD99}$* provenant du croisement entre une lignée contenant le gène *GUS* sous contrôle du promoteur *pACTIN* (donnée par Thomas Dresselhaus) et la lignée inductrice PK6
Non-inducteur GUS	F2 ?? X PK6	*pACTIN::GUS*	Descendance F2, contenant l'allèle mutant *NLD$_{PK6}$* provenant du croisement entre une lignée contenant le gène *GUS* sous contrôle du promoteur *pACTIN* (donnée par Thomas Dresselhaus) et la lignée inductrice PK6
Inducteur TUBα:YFP	F2 ?? X PK6	*pTUBα::TUBα:YFP*	Descendance F2, contenant l'allèle sauvage *NLD$_{HD99}$* provenant du croisement entre une lignée contenant la fusion traductionnelle du gène *TUBα* au gène rapporteur *YFP* (Kliwer and Dresselhaus, (2010)) et la lignée inductrice PK6
Non-inducteur TUBα:YFP	F2 ?? X PK6	*pTUBα::TUBα:YFP*	Descendance F2, contenant l'allèle mutant *NLD$_{PK6}$* provenant du croisement entre une lignée contenant la fusion traductionnelle du gène TUBα au gène rapporteur YFP (Kliwer and Dresselhaus, (2010)) et la lignée inductrice PK6

Tableau V-1 : Liste des lignées transgéniques de maïs utilisées pendant cette étude.

Milieu MS solide : Dans 1 litre d'H_2O ultra pure (générée *via* l'utilisation du système de purification Milli-Q® Integral (MerckMillipore)) : 8 g d'agar et 4,4 g de milieu MS « Basal Salt Mixture » (Duchefa Biochemie®), le pH est ajusté avec du KOH à 5,7 avec un pH mètre Mettler Toledo SevenCompact™ pH/Ion Meters S220 (Sigma-Aldrich®). Stérilisation par autoclavage.

V.1.2.1 - Culture sur substrat en conditions contrôlées

Après semis sur boites de Petri ou en godets sur substrat, les plantules sont repiquées dans des godets individuels contenant 0,2 litre de substrat Kultursubstrat Argile 10 (N : 20%, P : 0,2%, K : 40%) (Eriterre) et mises en chambres de culture. Les plantules sont cultivées en jours longs avec une photopériode de 16h/8h (jour/nuit), une intensité lumineuse de 70µ$Em^{-2}sec^{-1}$, avec une température de 24°C/17°C (jour/nuit) et une humidité relative contrôlée de 55%/65% (jour/nuit).

V.2 – Matériels végétals

V.2.1 - Lignées de maïs

L'ensemble des transformations génétiques ont été réalisées dans le fonds génétique A188 (Gerdes and Tracy 1993). Les lignées transgéniques déjà disponibles utilisées dans ce projet ainsi que celles générées sont présentées dans le tableau V.1. La lignée non-inductrice HD99, la lignée inductrice PK6, ainsi que la population de cartographie découlant du croisement entre HD99 et PK6 présentée dans la partie II ont été données à l'équipe par Pierre Barret et sont décrites dans Barret *et al.,* (2008). Les lignées inductrices publiques caractérisées dans le panel de diversité (voir partie III.1.1) ont été données par Alain Charcosset (Camus-Kulandaivelu *et al.,* 2006)

V.2.2 - Lignées d'arabette

Les transformations génétiques ont été réalisées dans l'écotype Columbia-0 (Col-0). Les différentes lignées transgéniques déjà disponibles utilisées dans ce projet ainsi que celles générées sont présentées dans le tableau V.2.

Lignée rapportrice	Fonds génétique	Transgène	Description des protéines générées
NLD-$_{HD99}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE*	Protéine NLD sauvage (provenant de HD99)
NLD-$_{PK6}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{HD99}$:CITRINE*	Protéine NLD tronquée (provenant de PK6)
NLD$_{-HD99}$-Cter	col0	*pUB10::CITRINE:NLD-$_{HD99}$-Cter*	Partie C-terminale de la protéine sauvage NLD$_{-HD99}$
NLD$_{-PK6}$-Cter	col0	*pUB10::PK6:NLD-$_{HD99}$-Cter*	Partie C-terminale de la protéine sauvage NLD$_{-PK6}$
NLD-$_{9R\rightarrow 9K}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{9R\rightarrow 9K}$:CITRINE*	Protéine NLD$_{-HD99}$ dont 9 arginines (R) en partie C-terminale ont été remplacées par des lysines (K)
NLD-$_{9R\rightarrow 9Q}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{9R\rightarrow 9Q}$:CITRINE*	Protéine NLD$_{-HD99}$ dont 9 arginines (R) en partie C-terminale ont été remplacées par des glutamines (Q)
NLD-$_{C10S}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{C10S}$:CITRINE*	Protéine NLD$_{-HD99}$ dont la cystéine (C) en position 10 a été remplacée par une Sérine (S)
NLD-$_{C423S}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{C423S}$:CITRINE*	Protéine NLD$_{-HD99}$ dont la cystéine (C) en position 423 a été remplacée par une Sérine (S)
NLD-$_{C10,423S}$:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{C10,C423S}$:CITRINE*	Protéine NLD$_{-HD99}$ dont les cystéines (C) en positions 10 et 423 ont été remplacées par une sérine (S)
NLD$_{-PK6}$-Farn(4+):CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{PK6}$-Farn(4+):CITRINE*	Protéine NLD$_{-PK6}$ fusionnée en C-ter avec un site d'ancrage d'une Farnelysation, couplé à quatre acides aminés cationiques
NLD$_{-PK6}$-Farn(6+):CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{PK6}$-Farn(6+):CITRINE*	Protéine NLD$_{-PK6}$ fusionnée en C-ter avec un site d'ancrage d'une Farnelysation, couplé à six acides aminés cationiques
NLD$_{-PK6}$-Farn(8+):CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{PK6}$-Farn(8+):CITRINE*	Protéine NLD$_{-PK6}$ fusionnée en C-ter avec un site d'ancrage d'une Farnelysation, couplé à huit acides aminés cationiques
NLD$_{-PK6}$-Gege(8+):CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{PK6}$-Gege(8+):CITRINE*	Protéine NLD$_{-PK6}$ fusionnée en C-ter avec un site d'ancrage d'une Geranylgeranylation, couplé à huit acides aminés cationiques
NLD-$_{PK6}$-LTI6B:CITRINE	col0	*pUB10::NLD-$_{PK6}$-LTI6B:CITRINE*	Protéine NLD$_{-PK6}$ fusionnée à la protéine LTI6B
Lignées contrôles, données par Yvon Jaillais (RDP, ENS Lyon) (Simon et al., 2014, 2016)			
LTI6B:GFP	col0	*pUB10::LTI6B: GFP*	LTI6B est une protéine membranaire contenant un domaine transmembranaire
1XPH^{FAPPI}	col0	*pUB10::CITRINE:1XPH^{F}$_{APPI}$*	« Biosenseur des PI4Ps » comportant un domaine lipidique de type PH^{FAPPI} (Pleckstrin HomologyFour-Phosphate-Adaptor Protein) interagissant avec les PI4Ps
FARN6+	col0	*pUB10::CITRINE:Farn6+*	« Biosenseur des charges », comportant une fusion traductionnelle d'un site d'ancrage d'une ancre lipidique de type Farnelysation, couplé à six acides aminés cationiques

Tableau V-2 : Liste des lignées transgéniques d'*A.thaliana* utilisées pendant cette étude.

V.3 - Caractérisations phénotypiques des lignées de maïs

V.3.1 - Evaluation des taux d'induction d'haploïdes

Durant ce projet de thèse, l'évaluation des taux d'induction d'haploïdes (HIRs) a majoritairement été réalisée par l'intermédiaire de croisements contrôles avec la lignée hybride HD7 X F564, dite « testeur glossy ». Cette lignée possède la mutation récessive, *glossy1* à l'état homozygote, qui entraîne une altération au niveau de la cuticule des feuilles, due à une modification des cires épicuticulaires (Sturaro *et al.,* 2005). Ainsi, les feuilles présenteront un phénotype particulier avec un aspect brillant et de couleur plus foncée que des feuilles normales. De plus, lorsqu'une pulvérisation d'eau est réalisée sur ces plantes, les feuilles vont retenir les gouttelettes de manière caractéristique, permettant ainsi de cribler les plantules haploïdes (Bordes *et al.,* 1997). Puisque cette mutation est récessive, les plantules haploïdes obtenues après croisement avec la lignée testeur présenteront donc un phénotype « glossy ». Ainsi le processus d'évaluation du taux d'induction d'haploïdes d'une lignée mâle d'intérêt est réalisé : (1) en croisant la lignée testeur (femelle) avec la lignée d'intérêt à évaluer en parent mâle, puis (2) en faisant germer la descendance obtenue et en pulvérisant de l'eau au stade 3-4 feuilles. Le nombre de plantules ayant des feuilles retenant les gouttelettes d'eau (plantules « glossy ») permet ainsi d'évaluer le taux d'induction d'haploïdes de la lignée paternelle ayant servi à faire le croisement. Une lignée testeur hybride F1 a été utilisée, car en plus d'être le moyen le plus fiable de détection des haploïdes (Melchinger *et al.,* 2016b), le caractère hybride permet l'obtention d'un nombre important de grains (>500 généralement) et d'avoir des marqueurs génétiques du coté femelle à l'état hétérozygote. Ainsi, une plante haploïde devra posséder un seul allèle pour ces marqueurs femelles, représentant ainsi un moyen génétique de vérifier le caractère haploïde de ces plantules. Lors de la réalisation de la cartographie fine, des analyses ont également été réalisées en collaboration avec l'entreprise Limagrain Europe afin d'évaluer les taux d'induction d'haploïdes en utilisant une autre lignée testeur hybride (PHD3 X PHD8) contenant la mutation *liguleless*, conduisant à l'état homozygote à l'absence de ligule au niveau de l'insertion des limbes, ce qui aura pour conséquence un port érigé des feuilles (Becraft *et al.,* 1990; Sylvester *et al.,* 1990). Pour les expérimentations présentées dans les parties III.3.1 et III.5, la lignée inductrice mâle RWS contenant l'allèle dominant *R1-Navajo* responsable en partie d'une coloration violette/pourpre des grains a été utilisée. Ainsi, les embryons haploïdes ne contenant pas l'information génétique paternelle ne seront pas colorés et donc facilement identifiables.

Pour chaque croisement réalisé visant à évaluer les taux d'induction, au minimum cent grains ont été analysés. Les individus haploïdes identifiés sont prélevés systématiquement et génotypés avec un kit de marqueurs moléculaires polymorphes qui permettent de discriminer le génome maternel du génome paternel. Ces marqueurs sont disponibles dans Gilles *et al.,* (2017). Seules les plantules présentant ces marqueurs à l'état homozygote, donc maternels ont été dénombrées comme haploïdes. Les taux d'induction d'haploïdes (Haploid Induction Rates) ont été calculés par le pourcentage de plantules haploïdes par rapport au nombre de plantules criblées ((nombre d'haploïdes/nombre totale de plantes criblées) X 100). Les HIRs totaux correspondent aux HIRs calculés sur le total des plantules analysées pour une lignée donnée (cumul de plusieurs épis résultant de croisements avec la lignée testeur) et les HIRs moyens correspondent à la moyenne des HIRs obtenus sur plusieurs plantes-sœurs pour une lignée donnée.

V.3.1 - Evaluation des taux de grains avortés

La gynogenèse *in vivo* étant décrite comme fortement corrélée avec l'induction de grains avortés précocement après la fécondation, les taux d'induction de grains avortés, nommés AIRs (Aborted Induction Rates) ont également été évalués durant l'ensemble de ce projet. Par chaque épi résultant d'un croisement avec la lignée utilisée en parent mâle à analyser (croisement avec la lignée testeur ou autofécondation), le nombre de grains avortés est dénombré lors de l'égrainage, sur l'ensemble de l'épi. Les AIRs totaux correspondent aux AIRs calculés sur le total des grains observés pour une lignée donnée et les AIRs moyens correspondent à la moyenne des AIRs obtenus pour différentes plantes-sœurs d'une même lignée.

V.4 - Génération des lignées transgéniques

V.4.1 - Clonages moléculaires

Trois stratégies différentes ont été adoptées afin de réaliser les constructions génétiques utilisées dans de ce projet, comprenant l'utilisation de la technologie Gateway® (Invitrogen®), l'amplification de plasmides préexistants en réalisant une mutagenèse dirigée et l'utilisation de digestions enzymatiques de plasmides préexistants suivies de la ligation des fragments générés complémentaires. Les plasmides générés et les méthodes utilisées pour leur génération sont présentés dans le tableau V.3.

La majorité des clonages moléculaires ont été réalisés *via* l'utilisation de la technologie MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction kit (Invitrogen®). Dans un premier temps, les vecteurs d'entrée ont été générés (la plupart étaient déjà disponibles au sein du laboratoire). Pour cela, les fragments d'intérêt ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec des amorces spécifiques, auxquelles ont été rajoutées des bordures AttB compatibles avec les bordures AttP des vecteurs donneurs, afin de permettre les recombinaisons. Les amorces sont choisies avec le logiciel Pimer3® (Koressaar and Remm, 2007) et sont synthétisées par la société Integrate DNA Technology® (ITD). Elles sont choisies pour avoir des températures d'hybridation entre 55°C et 61°C. La liste des différentes amorces utilisées dans ce projet est présentée dans le tableau V.4. Les amplifications ont été réalisées *via* l'utilisation de l'enzyme haute-fidélité Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific®), dans un thermocycleur (PeqSTAR 2X (OZYME) ou Thermal Cycle 2720 (Applied Biosystem)). Les PCRs sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl, composé de 1 µl de chaque amorce (10 µM), 1 µl de dNTP (préparation en interne), 1 µl d'ADN (100 ng/ µl), 35 µl d'H_2O ultra pure, 5 µl de tampon 5X associé à l'enzyme et 2 µl d'enzyme. (Note : pour les génotypages (voir partie V.6.2), les PCRs sont réalisées dans un volume divisé par deux). Les produits PCR sont purifiés avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Cleau up (Macherey-Nagel®). Les fragments d'ADN purifiés sont ensuite dosés avec un Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific®), vérifiés par migration sur gel d'agarose et intégrés dans les plasmides de destination pDONR™ vector (Invitrogen®), choisis suivant la position qu'aura le fragment dans la future cassette, par l'utilisation du kit BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen®), en suivant les préconisations du fournisseur. Les différents vecteurs d'entrée ainsi générés sont intégrés dans la souche bactérienne DH5α et vérifiés selon les méthodes présentées dans les parties V.4.2 et V.4.3. Les fragments d'ADN d'intérêt (provenant de trois vecteurs d'entrée différents) sont intégrés par recombinaisons homologues dans le vecteur de destination par l'utilisation du Kit LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen®).

La mutagenèse dirigée consiste en l'amplification d'un plasmide déjà existant avec des amorces spécifiques, créer afin d'amplifier le plasmide à l'identique excepté pour quelques bases azotées qui seront modifiées dans les amorces.

Les clonages par digestion-ligation ont été réalisés pour la création des vecteurs d'expression visant à la produire *in vitro* la protéine NLD (voir partie V.8.1). Les digestions enzymatiques sont réalisées avec des enzymes et les tampons correspondants de l'entreprise Takara®. La séparation des fragments d'ADN est réalisée par migration électrophorétique sur un gel d'agarose (1% à 2% d'agarose dissous dans du tampon TAE 1X additionné à du Bromure

Nom	Construit	Fragment 5' (dans pDONRP4-P1R)	Méthode d'obtention	Fragment du milieu (dans pDONR221)	Méthode d'obtention	Fragment 3' (dans pDONRP2R-P3)	Méthode d'obtention	Vecteur de destination
L1540	*pUB10::NLD-HD99:CITRINE*	*promoteur UB10*	Donation Yvon Jaillais (Simon *et al.*, 2016)	*NLD-HD99 sans STOP (L1548)*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces PL-CDS-F_Dtopo et PL-CDS-HD99-R2 et clonage dans pENTR/D-topo (Invitrogen®)	*mCITRINE-STOP*	Donation Yvon Jaillais	*pK7m34GW*
L1541	*pUB10::NLD-PK6:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces PL-CDS-F_Dtopo et PL-CDS-PK6-R2 et clonage dans pENTR/D-topo (Invitrogen®)	*mCITRINE-STOP*		*pK7m34GW*
L1691	*pUB10::NLD-HD99-Cter*	*promoteur UB10*		*mCITRINE-sansSTOP*	Donation Yvon Jaillais	*NLD-HD99-C-ter(L1689)*	Synthèse de gène (Genewiz®) (GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTgggaggtacgaaccggtgactggcgaaggaagcaatgccgatgccctcggtgggctcgctaggcagctctccgaggagaggagaacaaggctcgcgcgccgcgtctctgccatcaacccaagaggctctagatgtgcgtcgtacgatatctaaTCAACTTTATTATACAAAGTTGTCCCC)	*pK7m34GW*
L1692	*pUB10::NLD-PK6-Cter*	*promoteur UB10*		*mCITRINE-sansSTOP*	Donation Yvon Jaillais	*NLD-PK6-C-ter (L1690)*	Synthèse de gène (Genewiz®) (GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTgggagcgaggtacgaaccggtgaccggagaaggaagcaatgccgatgccctcggtgggctcgctagTCAACTTTATTATACAAAGTTGTCCCC)	*pK7m34GW*
L1806	*pUB10::NLD-9R->9K:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-HD99-9R->9K (L1804)*	Synthèse de gène (Genewiz®)	*mCITRINE-STOP*	Donation Yvon Jaillais (Simon *et al.*, 2016)	*pK7m34GW*
L1807	*pUB10::NLD-9R->9Q:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-HD99-9R->9Q (L1805)*	Synthèse de gène (Genewiz®)	*mCITRINE-STOP*		*pK7m34GW*
L1816	*pUB10::NLD-C10S:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-HD99-C10S (L1795)*	Mutagenèse dirigée sur le plasmide L1548 (*NLD-HD99sansSTOP/pDONR221*) avec les amorces NLD-C10-F et NLD-C10-R + digestion avec l'enzyme DnpI du plasmide méthylé	*mCITRINE-STOP*		*pK7m34GW*
L1817	*pUB10::NLD-C423S:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-HD99-C423S (L1796)*	Mutagenèse dirigée sur le plasmide L1548 (*NLD-HD99sansSTOP/pDONR221*) avec les amorces MUT-F et MUT-R + digestion avec l'enzyme DnpI du plasmide méthylé	*mCITRINE-STOP*		*pK7m34GW*
L1818	*pUB10::NLD-C10,423S:CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-HD99-C10,423S (L1800)*	Mutagenèse dirigée sur le plasmide L1795 (*NLD-HD99sansSTOP/pDONR221*) avec les amorces NLD-C10-F et NLD-C10-R + digestion avec l'enzyme DnpI du plasmide méthylé	*mCITRINE-STOP*		*pK7m34GW*
L1765	*pUB10::NLD-PK6-Farn(4+):CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR	*mCITRINE-Farn(4+)*		*pK7m34GW*
L1769	*pUB10::NLD-PK6-Farn(6+):CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR	*mCITRINE-Farn(6+)*		*pK7m34GW*
L1767	*pUB10::NLD-PK6-Farn(8+):CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR	*mCITRINE-Farn(8+)*		*pK7m34GW*
L1768	*pUB10::NLD-PK6-Gege(8+):CITRINE*	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR	*mCITRINE-Gege(8+)*		*pK7m34GW*
	pUB10::NLD-PK6-LTI6B:CITRINE	*promoteur UB10*		*NLD-PK6 sans STOP (L1531)*	Amplification PCR	*mCITRINE-LTI6B*		*pK7m34GW*

Nom	Construit	Fragment 5' (dans pDONRP4-P1R)	Méthode d'obtention	Fragment du milieu (dans pDONR221)	méthode d'obtention	Fragment 3' (dans pDONRP2R-P3)	méthode d'obtention	Vecteur de destination
L1542	*pNLD$_{-B73}$::GUS*	*pNLD$_{-B73}$ (L1533)*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces attB4_prom_PL_2576_B73 et attB1r_prom_PL_2576_B73	*GUS/pEN-L1-S1-L2*	Karimi *et al.*, 2007	pmock3'	X	*pBb7m34GW* (Karimi *et al.*, 2005)
L1543	*pNLD$_{-PK6}$::GUS*	*pNLD$_{-PK6}$ (L1534)*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces attB4_promoPL_2534_PK6 et attB1r_promoPL_2534_PK6	*GUS/pEN-L1-S1-L2*	Karimi *et al.*, 2007	pmock3'	X	
L1759	*pNLD-HD99::H2B5:mCherry*	*pNLD$_{-B73}$ (L1533)*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces attB4_prom_PL_2576_B73 et attB1r_prom_PL_2576_B73	*H2B.5*		*2XmCherry-4myc*	Marquès-Bueno *et al.*, (2016)	
L1483	*pACTIN::NLD$_{-HD99}$*	*pACTIN*	Martinant *et al.*, (2016)	*NLD$_{-HD99}$*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces PL-CDS-F_Dtopo et PL-CDS-HD99-R2 et clonage dans pENTR/D-topo (Invitrogen®)	pmock3'	X	*pBIOS898* W.Paul, Biogemma
L1482	*pACTIN::NLD$_{-PK6}$*	*pACTIN*	Martinant *et al.*, (2016)	*NLD$_{-PK6}$*	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces PL-CDS-F_Dtopo et PL-CDS-PK6-R2 et clonage dans pENTR/D-topo (Invitrogen®)	pmock3'	X	
L1465	*pACTIN:RNAi-NLD*	*pACTIN*	Martinant *et al.*, (2016)	Fragment sans intron de 363-pb dans l'exon 4 (L1457)	Amplification PCR sur des ADNc d'anthères matures avec les amorces G471240-attB1 et G471240-attB2	pmock3'	X	
L1738	*CRISPR-NLD*	Voir Doll *et al.*, (2018)						

>B73_gDNA_NLD

agttcatcactaatcacacttattgtgccctcgacgagtatctatagctagctcattaatcgattcgggggtgtgttgtcgaaggcggcaATGGCGAGCTACTCGTCGCGGCGTCCATGCAATACCTGTAGCACGAAGGCGATGGCCGGGAGCGTG
GTCGGCGAGCCCGTCGTGCTGGGGCAGAGGGTGACGGTGCTGACGGTGGACGGCGGCGGCGTCCGGGGTCTCATCCCGGGAACCATCCTCGCCTTCCTGGAGGCCAGGCTGCAGGAGCTGGACGGACCGGAGGCGAGGCTGGCGGACTACTTCGAC
TACATCGCCGGAACCAGCACCGGCGGTCTCATCACCGCCATGCTCACCGCGCCCGGCAAGGACAACCGGCCGTCATCGACGAGGACATCAACCACTTTTACATGCAGAACTGCCCGCGCATCTTTCCTCAGAAgtgagtccgatgctgccgc
cattgttcttgcatccatccagcatcgtacgtacgtcctctatacatctgcggatcatcatgtgcgcatgtttgtggcatgcatgcatgtgagcagGAGCAGGCTTGCGGCCGCCATGTCCGCGCTGAGGAAGCCAAAGTACAACGGCAAGT
GCATGCGCAGCCTGATTAGGAGCATCCTCGGCGAGACGAGGGTAAGCGAGACGCTGACCAACGTCATCATCCCTGCCTTCGACATCAGGCTGCTGCAGCCTATCATCTTCTCTACCTACGACgtacgtacgtcgtcacgaatgattcatctgtacg
tcgtcgcatgcgaatggctgcctacgtacgccgtgcgctaacatactcagctctttcctatctgctgcgccaatttgcagGCCAAGAGCACGCCTCTGAAGAACGCTCTGCTCTCGGACGTGTGCATTGGCACGTCCGCCGCGCCGACCTACCTCC
CGGCGCACTACTTCCAGACTGAAGACGCCAACGGCAAGGAGCGCGAATACAACCTCATCGACGGCGGTGTGGCGGCCAACAACCCGgtaactgactagctaactggaaaacggacgcacagactccatgtccatggcggcccacaaggtcgatgct
aattgttgcttatgtatgtcgcccgattgcacatgcgtagACGATGGTTGCGATGACGCAGATCACCAAAAAGATGCTTGCCAGCAAGGACAAGGCCGAGGAGCTGTACCCAGTGAAGCCGTCGAACTGCCGCAGGTTCCTGGTGCTGTCCATCGG
GACGGGGTCGACGTCCGAGCAGGGCCTCTACACGGCGCGGCAGTGCTCCCGGTGGGGTATCTGCCGGTGGCTCCGCAACAACGGCATGGCCCCCATCATCGACATCTTCATGGCGGCCAGCTCGGACCTGGTGGACATCCACGTCGCCGCGATGTT
CCAGTCGCTCCACAGCGACGGCGACTACCTGCGCATCCAGGACAACTCGCTCCGTGGCGCCGCGGCCACCGTGGACGCGGCGACGCCGGAGAACATGCGGACGCTCGTCGGGATCGGGGAGCGGATGCTGGCACAGAGGGTGTCCAGGGTCAACGT
GGAGACAGGGAGGTACGAACCGGTGACTGGCGAAGGAAGCAATGCCGATGCCCTCGGTGGGCTCGCTAGGCAGCTCTCCGAGGAGAGGAGAACAAGGCTCGCGCGCCGCGTCTCTGCCATCAACCCAAGAGGCTCTAGATGTGCGTCGTACGATAT
CTAAgacaagtggctttactgtcagtcacatgcttgtaaataagtagactttattttaataaaacataaaaatatatatatgttcttgaatataaaattgataaccaaattaaaattcgaaccatcacttatacataatttttacttttatttttttat
aaaacgtgaacgggaaggac

Disposition des cibles sur la séquence de *NLD*, Cible A, Cible B, Cible C, Cible D, en rouge: les introns

Tableau V-3 : Bilan des plasmides générés dans cette étude et stratégies de clonage adoptées.

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
Citrine-LG-F	gcatcgacttcaaggaggac	Génotypage A.t, fusion CITRINE
L1791-R	cgtacgacgcacatctagagc	Génotypage A.t
L1792-R	atcggcattgcttccttctc	Génotypage A.t
L1795-R	tatcgtacgacgcggctcta	Génotypage A.t
L1796-R	atcgtacgacgcacactgag	Génotypage A.t
L1798-R	cgtacgacgcacacctagag	Génotypage A.t
KRISPR_PL20_F	cgcatccaggacaactcgctc	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles C,D
KRISPR_PL03_F1	gggtgtgttgtcgaaggc	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles A, B
KRISPR_PL20_F2	CGATGTTCCAGTCGCTCCA	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles C,D
KRISPR_PL03_F2	CTATCGTTGCCTCCTCAGTTC	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles A, B
KRISPR_PL20_R	gcatcggcattgcttccttc	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles C,D
KRISPR_PL03_R1	CAGCACCGTCACCCTCTG	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles A, B
KRISPR_PL20_R2	CCTTGTTCTCCTCTCCTCGG	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles C,D
KRISPR_PL03_R2	caggaaggcgaggatggttc	Génotypage sequençage lignées CRISPR NLD, cibles A, B
L1798-F2	CCGAGGAGCTGTACCCAGTGA	Vérification PCR / Sequençage NLD
L1703-1	CTCAAGACCCGTTTAGAGGCC	Vérification PCR / Sequençage NLD
L1703-2	CCGTGTAGAGGCCCTGCTC	Vérification PCR / Sequençage NLD
L1703-3	GGTGCTGGTTCCGGCGAT	Vérification PCR / Sequençage NLD
L1703-4	CCGGTTCGTACCTCCCTGTCTC	Vérification PCR / Sequençage NLD
L1703-5	TTGCCGTTGGCGTCTTCAGT	Vérification PCR / Sequençage NLD
GFPCarlsbergR	CCTCGGCGCGGGTCTTGTAGT	Vérification PCR gène GFP
GFPCarlsbergF	GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA	Vérification PCR gène GFP
GFP1R	AGATCCGCCACAACATCGAG	Vérification PCR gène GFP
GFP1F	ACCATGTGATCGCGCTTCTC	Vérification PCR gène GFP
GFPCarlsbergR	CCTCGGCGCGGGTCTTGTAGT	Vérification PCR gène GFP
GFPCarlsbergF	GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA	Vérification PCR gène GFP
Bar1	GCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATC	Vériffication PCR gène BAR
Bar2	ACGTCATGCCAGTTCCCGTGCTTGAA	Vériffication PCR gène BAR
PLPK6_HDPK_F1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAG GCAATGGCGAGCTACTC	Clonage OE::NLD$_{-HD99 \text{ et } OE::NLD-PK6}$
PLPK6_HD99_R1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA GCCACTTGTCTTAGATAT	Clonage OE::NLD$_{-HD99}$
PLPK6_PK6_R1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCCT TGTTCTCCTCTCCT	Clonage OE::NLD$_{-PK6}$
G471240-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCGA CGTCCGAGCAGGGCC	Clonage RNAi-NLD
G471240-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACC GAGGGCATCGGCATTGCTTCC	Clonage RNAi-NLD
PL-CDS-F_Dtopo	caccatggcgagctactcgtcgcggcgt	Clonage NLD$_{-HD99}$:CITRINE et NLD-PK6:CITRINE
PL-CDS-HD99-R2	gatatcgtacgacgcacatctagag	Clonage NLD$_{-HD99}$:CITRINE
PL-CDS-PK6-R2	gcgagcccaccgagggcat	Clonage NLD$_{-PK6}$:CITRINE
attB4_prom_PL_2576_B73	GGGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGCTTCAAAAT GGTTATGCGTAGGTTGAA	Clonage promoteur NLD
attB1r_prom_PL_2576_B73	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCTGCCGCCT TCGACAACAC	Clonage promoteur NLD
attB4_promoPL_2534_PK6	GGGGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGCTTTTAGGA TAAGCCAGAGTTTGT	Clonage promoteur NLD
attB1r_promoPL_2534_PK6	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCTGCCGCCT TCGACCGCAC	Clonage promoteur NLD
NLD-C10-F	gcggcgtccaAGCaatacctgtagcac	Mutagenèse dirigée site NLD C10
NLD-C10-R	tacaggtattGCTtggacgccgcgacg	Mutagenèse dirigée site NLD C10
MUT-F	AggctctagaAGCgcgtcgtacgatatcaa	Mutagenèse dirigée site NLD C423
MUT-R	cgtacgacgcGCTtctagagcctcttgggt	Mutagenèse dirigée site NLD C423

Tableau V-4 : Liste des amorces utilisées pour la réalisation des analyses par PCR

d'éthidium à 0,5 µg/µl). Les fragments migrent en fonction de leur taille, déterminée par comparaison à un marqueur de taille (SmartLadder MW-1700-10, Eurogentec®). Les gels sont pris en photos sous une lampe UV avec une caméra contenant un détecteur CCD, associée au logiciel BioCapt®. Une fois isolées sur gel, les bandes qui correspondent aux fragments d'intérêts sont excisées, puis purifiées avec le kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel®). Les fragments d'intérêt et les plasmides receveurs préalablement ouverts par digestion enzymatique et purifiés avec le même kit sont ligués avec l'enzyme T4 DNA Ligase du kit Rapid DNA Ligation™ (Thermo Fisher Scientific®), en suivant les préconisations du fournisseur.

Tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 10X : Tris 400mM et EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) 0,01M, pH ajusté à 8.

V.4.2 - Transformations génétiques des souches bactériennes *E.coli*

Les transformations des souches *E.coli* DH5α sont réalisées par un choc thermique. Pour cela, entre 100 ng et 200 ng d'ADN plasmidique sont déposés délicatement dans 50 µl de bactéries thermocompétentes (rendues compétentes en interne) décongelées sur glace. Les tubes sont alors laissés 30 minutes dans la glace, puis un choc thermique de 2 minutes à 42°C est réalisé *via* l'utilisation d'un bloc chauffant. Les bactéries sont conservées 3 minutes dans la glace, puis 250 µl de milieu LB sont ajoutés dans les tubes et les bactéries sont mises en culture une heure à 37°C sous agitation (200 rpm), afin de permettre l'expression du gène de sélection. Les cultures bactériennes sont alors étalées sur boites de Petri avec du milieu LB solide contenant l'agent de sélection antibiotique du plasmide. Afin d'éviter des densités en colonies bactériennes trop importantes, trois boites sont étalées par transformation avec des volumes déposés de respectivement 10 µl, 50 µl et le reste de la culture. Les boites sont mises en incubation dans une étuve à 37°C pour 12 heures.

Milieu LB (Luria Bertani) : Pour un litre dans H_2O ultra pure : tryptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl (Chlorure de sodium) 10 g.

V.4.3 - Analyses et validation des clones recombinants

Afin de valider les clonages moléculaires effectués, cinq colonies par clonage sont prélevées et mises en culture dans 2 ml de milieu LB couplé à l'agent de sélection, une nuit à 37°C, sous agitation (200 rpm). Les ADNs plasmidiques sont alors extraits à partir des culots

bactériens générés par centrifugation de 2 ml de culture bactérienne, *via* l'utilisation du kit d'extraction NucleoSpin Plasmid® - plasmid Miniprep kit (Macherey-Nagel®) qui permet d'avoir des rendements entre 25 µg et 45 µg d'ADN. Un crible par digestions enzymatiques est alors réalisé sur ces ADNs afin de sélectionner une colonie bactérienne ayant intégré le plasmide possédant le bon profil de restriction. Ces profils, spécifiques à chaque vecteur, sont prédits à l'aide du logiciel Vector NTI®. En dernière étape de validation, le clone sélectionné est séquencé entre les bornes RB/LB de l'ADN de transfert. Le séquençage est effectué avec des amorces spécifiques (tableau V.4) par la méthode SANGER par la société GATC®. La validation du plasmide sera confirmée par l'alignement des résultats de séquençage avec la carte vectorielle correspondante. Une fois le clonage validé, un stock glycérol des cultures bactériennes est conservé à -80 °C (250 µl de glycérol 50 % + 250 µl de culture bactérienne liquide).

V.4.4 - Transformations génétiques des souches bactériennes *A.tumefaciens*

Les souches bactériennes d'*A.tumefaciens* C58pmp90 rendues éléctrocompétentes au sein du laboratoire sont utilisées (Mersereau *et al.,* 1990). Les bactéries sont transformées par électroporation avec l'appareil Micropulser^{TM} (Bio-Rad®). Pour cela, entre 100 ng et 200 ng d'ADN plasmidique sont déposés dans 50 µl de bactéries éléctrocompétentes décongelées dans de la glace. Les tubes sont incubés pendant 20 minutes dans la glace puis les bactéries sont transférées dans des cuves à électroporation (Eurogentec) préalablement refroidies dans la glace. Celles-ci sont alors placées dans un éléctroporateur et un choc électrique (2 kV, 335 Ω, 15 µF) de 5 ms est appliqué à travers les parois conductrices des cuves. Après cette étape, 400 µl de milieu LB sont rajoutés et les bactéries sont mises en incubation à 28°C sous agitation (200 rpm) pendant 3 heures. Celles-ci sont ensuite étalées sur boites de Petri contenant du milieu YEB solide couplé avec les antibiotiques de sélection de la souche bactérienne (Gentamycine 20 µg/mL, Spéctinomycine 250 µg/mL et Rifampicine 50 µg/mL) et du plasmide d'intérêt. La culture liquide est répartie en deux boites afin de favoriser la formation de colonies bactériennes isolées : 50 µl sont étalés dans une boite et le reste dans l'autre. Les boites sont mises en incubation dans une étuve à 28°C pendant 48 heures.

Milieu YEB solide (Yeast Extract Beef Extract) : Pour un litre dans H_20 ultra pure : Extrait de bœuf 5 g, extrait de levure 1 g ; peptone 5g, sucrose 5g, bactoagar 15g. pH ajusté à 7,2 et autoclavage.

V.5 - Transformations génétiques des plantes

V5.1 - Transformations génétiques du maïs

Les transformations génétiques de maïs sont réalisées à partir d'embryons immatures, provenant d'autofécondations de A188, avec la souche bactérienne LBA4404 (contenant le plasmide pSB1 comportant une cassette avec un gène de résistance à l'herbicide BASTA sous contrôle du promoteur du gène ACTIN d'*O.sativa* et avec le terminateur *NOS*), selon une méthode préalablement décrite (Ishida et al. 1996, 2007). Ces transformations sont réalisées par la plate-forme de transformation mise en place au sein de l'équipe.

V.5.2 - Transformations génétiques de l'Arabette

Les plantes d'*A.thaliana* (écotype Col-0) sont transformées selon la méthode « floral dip », consistant à imbiber les hampes florales dans une solution bactérienne (Clough and Bent, 1998). Les plantes utilisées doivent contenir de jeunes hampes florales, idéalement sans la présence de siliques déjà formées, environ deux à trois semaines après le semis. Les plantes utilisées proviennent de semis à la volée sur des barquettes contenant du substrat. La souche bactérienne contenant le plasmide d'intérêt est mise en culture sur boite de Petri contenant du milieu YEB solide couplé aux agents de sélection spécifiques de la souche bactérienne (Gentamycine 20 µg/mL, Spéctinomycine 250 µg/ml et Rifampicine 50 µg/ml) ainsi qu'à l'agent de sélection spécifique du plasmide d'intérêt. Pour cela, une dizaine de colonies bactériennes obtenues après la transformation bactérienne d'*A.tumefaciens* sont mélangées dans 50 µl d'H_20 stérile puis l'ensemble du volume est reversé sur la boite de Petri. Deux boites sont préparées pour une transformation. Les boites sont mises en incubation dans une étuve à 28°C pendant deux jours. Les bactéries ainsi développées sont récoltées et mises dans 150 mL de milieu d'infiltration, puis l'ensemble est mélangé. Les hampes florales sont alors trempées dans la solution ainsi préparée pendant environ une minute avec une légère agitation manuelle. Les plantes sont alors enfermées dans un sac en plastique pendant 24 heures à RT (Room Temperature), puis sont mises en chambre de culture après avoir retiré le sac.

Milieu d'infiltration : sucrose 5%, MgCl2 10mM, silweet 0,025%.

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
Pat_qRT_F1	GAGAAGGAAGCAATGCCGATGCC	qRT-PCR *NLD*
Pat_qRT_R1	TGATTGACAGTAAAGCCACTTGTCTTAGATATC	qRT-PCR *NLD*
Bar-F2	AGATTTCGGTGACGGGCAGGA	q-PCR *BAR*
Bar-R2	ATGCACGAGGCGCTCGGATAT	q-PCR *BAR*
isum2E	CGATCTGCTGGCCATATCCTAAGAG	q-PCR *ISUM*
isum2F	AATCATTAAGTTTCGTTCCACCAA	q-PCR *ISUM*
OENLD-F1	TCTCCGAGGAGAGGAGAACA	q-PCR *OE::NLD*
OENLD-R1	GCTGGGTAGCCACTTGTCTT	q-PCR *OE::NLD*
OENLD-F2	GTCTCTGCCATCAACCCAAD	q-PCR *OE::NLD*
OENLD-R2	GAGCATTTAGGATATCACCACTTTG	q-PCR *OE::NLD*
GAPDH 5’	AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG	PCRs de vérification des RTs sur le gène *GAPDH*
GAPDH 3’	GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA	
Divers : analyse du polymorphisme de 4-pb sur *NLD*		
A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTCAACGTGGAGACAGGGAGC	*Mix amorces KASPar (LGC Genomics)*
A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTCAACGTGGAGACAGGGAGG	
C1	GAGGGCATCGGCATTGCTTCCTT	

Tableau V-5 : Liste des amorces utilisées pour la réalisation des analyses par q-PCR

V.6 - Analyses des lignées générées

V.5.1 - Extraction des ADNs génomiques

Les extractions des ADNs génomiques sont réalisées à partir de fragments foliaires d'*A.thaliana* (deux à trois jeunes feuilles) et de maïs (quatre poinçons de 4 mm). Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide dans des plaques 96 contenant des billes métalliques, *via* l'utilisation d'un broyeur à billes TissueLyser II^{TM} (Qiagen®) pendant une minute avec 30 secousse.sec^{-1}. Les ADNs sont ensuite extraits avec le kit d'extraction BioSprint 96 DNA Plant Kit associé à un robot (Qiagen®) permettant une automatisation de l'extraction. Cette méthode permet d'avoir des rendements en ADN entre 100 et 400 ng/µl et des extractions homogènes.

V.6.2 - Evaluation du nombre de copies du transgène et génotypage des plantes *A.thaliana*

Les plantes transgéniques T1 (1ère génération de transformation) résultant de la transformation génétique des plantes T0 sont criblées sur des boites de Petri contenant du milieu MS couplé à l'agent de sélection. Pour chaque construction, dix plantes T1 sont repiquées et conduites en culture. En génération T2, deux évènements de transformation indépendants sont sélectionnés sur différents critères incluant ; l'insertion d'une copie unique du transgène (ségrégation Mendélienne dans la descendante avec ¾ de plantules résistances et ¼ de plantules sensibles), l'absence d'anomalie phénotypique, une forte expression du transgène avec une fluorescence bien visible dans les apex racinaires et une uniformité dans le profil d'expression. Les lignées sélectionnées sont conduites en T3 afin de sélectionner les plantes homozygotes, c'est-à-dire dont la descendance est 100% résistante à l'agent de sélection sur le milieu de culture, afin de constituer le stock de graines. Les plantes T1 sont génotypées dès l'apparition des premières feuilles formées, afin de s'assurer qu'elles ont bien intégré le transgène. Pour cela, des amplifications du transgène par PCRs sont réalisées sur les ADNs génomiques provenant de ces plantules avec des couples d'amorces spécifiques de la cassette insérées (tableau V.4). Les PCRs sont réalisées selon le protocole présenté dans la partie V.4.4, mais avec l'enzyme GoTaq® polymerase (Promega®). Des analyses sont également réalisées sur des plantules Col-0 non transformées afin de s'assurer de la spécificité de l'hybridation des amorces. Les produits PCR résultant de cette analyse sont, après purification, séquencés par la méthode SANGER (GATC®) afin de s'assurer de l'intégrité de la cassette insérée.

V.6.3 - Evaluation du nombre de copies des transgènes dans les plantes transformées de maïs

Pour chaque évènement de transformation ressortant de la plate-forme de transformation, l'évaluation du nombre de copies du transgène (T-DNA) se réalise par des analyses de PCRs quantitatives (qPCR) sur des plantes T1, selon une méthode préalablement décrite (Livak and Schmittgen, 2001). Pour chaque évènement de transformation trois réplicats biologiques sont analysés et trois réplicats techniques sont faits par réplicat biologique. L'évaluation du nombre de copies du transgène est réalisée à partir de l'analyse de nombre de copies du gène de résistance *BAR* avec une normalisation par rapport au gène de ménage *ISUM* (*GRMZM2G136559*) avec les amorces présentées dans le tableau V.5. Ces amorces ont préalablement été testées et évaluées au sein de l'équipe d'accueil. Les qPCRs sont réalisées en plaque 384 puits. Les ADNs génomiques extraits avec la méthode présentée dans la partie V.6.1 sont dilués au 1/10. Le mix réactionnel de 10 µl pour un puit contient 5 µl de mix FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche®), 2,2 µl d'H2O stérile, 0,3 µl de mix avec les amorces (10µM) et 2,5 µl d'ADN dilué. Les plaques sont ensuite centrifugées une minute à 1000 g. Les amplifications des ADNs sont réalisées avec l'appareil Quant Studio 6 Flex (Applied Biosystem®) avec une succession de 40 cycles thermiques (0,03 secondes à 95°C (dénaturation) /30 secondes à 60°C (hybridation et élongation)) après une pré-incubation de 10 minutes à 94°C. La dénaturation/renaturation des ADNs générés est ensuite mesurée (melting curve) *via* le programme suivant : 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et augmentation en continue jusqu'à 95°C (avec ajout de 0,5°C toutes les 15 secondes). Cette étape permet d'établir la spécificité de l'amplification pour chaque échantillon. Les analyses des données seront réalisées avec le logiciel Quant Studio™ 6 and 7 Flex Software. Le nombre de copies du transgène est défini par l'étude des CTs (Cycle Threshold, quantité d'ADN dépassant un certain seuil, exprimé en nombre de cycles), qui seront définis à partir d'un seuil préalablement déterminé, avec la méthode suivante : ΔCT = CT gène ciblé - CT gène de ménage, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ échantillon - ΔCT échantillon de référence, Expression relative = $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. Les plantes homozygotes seront choisies en comparaison à la lignée non transformée A188. La descendance des plantes T1 analysées (croisements avec une lignée testeur ou autofécondations) sera également semée (environ 50 grains) et les plantules au stade 5-6 feuilles seront traitées avec du BASTA afin d'évaluer le pourcentage de plantules résistantes et ainsi de valider les plantes mères prédites homozygotes pour le transgène (100% de résistance attendu).

V.6.4 - Identification des plantes de maïs contenant l'insertion de 4-pb dans le gène *NLD*

Afin de discriminer les plantes contenant l'allèle *NLD* avec l'insertion de 4-pb dans le dernier exon du gène de celles contenant l'allèle sauvage, des génotypages sont réalisés *via* l'utilisation de la technologie KASP™ (LGC®) qui permet de différencier un marqueur moléculaire microsatellite polymorphe entre les deux versions du gène *NLD* (avec et sans l'insertion). Cette méthode, dite la PCR « allèle-spécifique compétitive », se base sur le fait qu'une ADN polymérase peut difficilement incorporer un nucléotide dans un brin en cours de synthèse si le nucléotide fourni n'est pas complémentaire de la matrice, ou si la base extrême en 3' de l'amorce n'est pas correctement hybridée sur la matrice. Ainsi, en mettant en compétition deux amorces marquées différemment (fluorophores), ayant chacune à leur extrémité 3' l'un des allèles attendus à un SNP (Single-Nucleotide Polymorphism), il est donc possible de génotyper ce SNP. Afin de réaliser ce génotypage, l'ADN génomique généré selon la méthode présentée dans la partie V.6.1 est dilué afin d'être à une concentration de 5 ng/ µl. Le facteur de dilution est évalué à partir d'une moyenne de mesures de dosage de l'ADN réalisée sur dix échantillons choisis aléatoirement dans la plaque d'extraction. Les génotypages sont réalisés dans des plaques 96 puits, dont chaque puit contient 5 µl d'ADN à 5 ng/ µl, 5 µl de 2X KASP® Master Mix et 0,14 µl de KASP® Assay Mix, correspondant aux amorces mises en compétition spécifiquement conçues afin de discriminer le marqueur moléculaire polymorphe (tableau IV.5). Les plaques subissent alors un cycle thermique généré avec l'appareil StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystem®). Ce cycle est constitué d'une phase d'activation de 15 minutes à 94°C, une phase de dénaturation/élongation de 10 cycles de 20 secondes à 94°C / 1 minute à 61°C (avec une diminution de 0,6°C par cycle) et une seconde phase de dénaturation/élongation de 35 cycles de 20 secondes à 94°C / 1 minute à 55°C. Les résultats sont visualisés avec le logiciel StepOne™ SoftwareV2.3 avec la fonction « allelic discrimination plot ».

V.7 - Analyse des accumulations relatives de transcrits dans les grains de pollen

V.7.1 - Extraction des ARNs totaux à partir de pollen

Les ARNs sont extraits sur du pollen frais. Pour cela, les panicules sont secouées tôt le matin afin d'éliminer les grains de pollen sénescents restant dans les anthères et des nouveaux

sachets de récolte sont positionnés. Après deux heures de production, le pollen est récolté dans des tubes 2 ml qui sont immergés dans de l'azote liquide, puis stocké à -80°C jusqu'au broyage des échantillons. Environ 100 mg à 200 mg de pollen sont prélevés par tube. Deux broyages sont effectués par échantillon, dans un mortier avec de l'azote liquide, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, qui sera récupérée dans des tubes 2 ml préalablement refroidis dans de l'azote liquide (récupération d'environ 100 mg à 200 mg de poudre, un surplus entraînera des difficultés dans la suite du protocole). Les ARNs totaux sont extraits selon un protocole adapté de Messias *et al.,* (2014) avec des informations de Gambino *et al.,* (2008) (Gambino *et al.,* 2008; Messias *et al.,* 2014). Les poudres obtenues après le broyage du pollen sont reprises dans 900 µl de CTAB préalablement préchauffé à 65°C et incubées pendant 5 minutes à 65°C. Une première extraction des ARNs est réalisée par l'ajout de 900 µl de chloroforme/alcool iso-amylique (24/1, v/v) et les tubes sont mis sous agitation pendant 5 minutes à RT, puis centrifugés pendant 30 minutes à 4°C (vitesse maximun). Les phases aqueuses sont alors récupérées dans des nouveaux tubes. Une seconde extraction est réalisée par l'ajout de 900 µl de chloroforme/alcool iso-amylique (24/1, v/v) selon le même protocole que la première extraction. Le surnageant est récupéré dans une nouveau tube et la précipitation est réalisée par l'ajout de l'équivalent de 1/4 du volume de surnageant récupéré en chloride de lithium 10M (Sigma-Aldrich®). Les échantillons sont incubés 1 heure à -80°C, puis centrifugés 30 minutes (vitesse maximun) à 4°C. Les surnageants sont jetés et les culots sont repris dans 300 µl de tampon SSTE préchauffé à 65°C, puis une nouvelle extraction est réalisée par l'ajout de 300 µl de chloroforme/alcool iso-amylique (24/1, v/v), suivi d'une agitation de 5 minutes et d'une centrifugation de 10 minutes (vitesse maximum) à 4°C. Les surnageants sont alors récupérés dans des nouveaux tubes et les ARNs sont précipités avec l'ajout de 364 µl d'éthanol 100% stocké à -20°C et 18 µl d'acétate de sodium (3M) pH 5,5, puis une incubation d'une heure à -80°C suivie d'une centrifugation de 30 minutes à 4°C (vitesse maximum). Les culots sont rincés deux fois avec l'ajout de 700 µl d'éthanol à 70% préalablement conservé à -20°C, suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 4°C (vitesse maximum). Les surnageants sont jetés et les culots d'ARNs obtenus sont laissés sécher sous une hôte chimique aspirante. Les culots sont élués dans 20 µl d'eau stérile dans la glace pendant 30 minutes. Les ARNs sont dosés au Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific®). Les rendements moyens avant le traitement à la Dnase se situent entre 100 et 400 ng/µl.

Préparation des tampons :

- CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide): CTAB (Sigma-Aldrich®) 2%, PVP40 (Polyvinyl polypyrrolidone40) (Sigma-Aldrich®) 2%, NaCl 5M, Tris-HCL 1M (pH8), EDTA 0,5M (pH8) dans H_20 ultra pure. Autoclavage et ajout de 3,3 % de B-mercaptoethanol.

- SSTE : NaCl 1M, SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,5%, Tris-HCl 10mM (pH8), EDTA 1mM (pH8).

V.7.2 - Traitement des ARNs à la DNase

Afin d'éliminer les ADNs éventuellement présents dans les extractions d'ARNs, les ARNs obtenus sont incubés avec l'enzyme Turbo™ DNAse Ambion® (ThermoFisher Scientific®) à raison de 2 unités d'enzymes pour 10 µg d'ARN et ajout du tampon associé au kit à 1X, pendant 30 minutes à 37°C. Le traitement à la DNAse peut être renouvelé une seconde fois pour plus d'efficacité. La DNAse est alors désactivée avec l'ajout de 2 µl de billes de désactivation associées au kit, puis les tubes sont centrifugés 2 minutes afin de retirer les billes. Les ARNs sont de nouveau dosés après traitement afin d'évaluer les quantités perdues. Avant la suite de l'analyse, l'intégrité des ARNs est vérifiée par dépôt de 1 ng sur un gel d'agarose à 2%. En parallèle, l'absence d'ADN génomique dans les extractions est vérifiée par la réaslisation de PCRs sur les échantillons, en utilisant les amorces GAPDH 5' et GAPDH 3' (tableau IV.4), amplifiants spécifiquement l'ADN génomique et non l'ARN. Les ARNs sont stockés à -80°C.

V.7.3 - Transcription inverse (RT)

Les transcriptions inverses sont réalisées avec l'enzyme RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µL) (ThermoFisher Scientific®) sur les ARNs après le traitement à la DNAse afin d'obtenir des ADNs complémentaires qui pourront être utilisés pour les analyses de PCR quantitative (qPCR). Avant le traitement, les ARNs doivent préalablement être dilués dans de l'eau ultra pure afin d'avoir environ 200 ng pour une unité d'enzyme. Dans un premier temps, 2 µl d'amorces « random primers™ (Invitrogene®) (0,1 µg/µl) sont ajoutés aux ARNs dilués dans 11 µl (200 ng). Le mix est transféré dans un thermocycleur pour subir un cycle de 5 minutes à 72°C suivies d'un refroidissement de 1°C toutes les 10 secondes jusqu'à 20°C. Un mix contenant 4 µl de tampon 5X associé au kit, 2 µl de dNTP (10 mM) et 1 µl d'enzyme est alors rajouté. La RT se réalise avec un cycle composé de 10 minutes à 25°C, 1 heure à 42°C et 10 minutes à 70°C. Après incubation, 180 µl de tampon TE sont ajoutés afin de stopper la réaction enzymatique. La RT est vérifiée par amplification PCR avec les amorces GAPDH 5' et GAPDH 3'.

TE : Tampon d'extraction : Tris-HCl 10 mM (pH8,2), NaCl 25 mM, EDTA 1 mM.

Anticorps primaire	Dilution	Espèce de production	Référence	Anticorps secondaire	Dilution	Espèce de production	Référence
Anti-GFP	1/1000	Lapin - Polyclonale	InVitrogen-Molecular Probes (A6455)	anti-Rabbut IgG, HRP cpnjugate	1/20 000	Ane	Amersham (NA934)
Anti-Poluhistidine Clone HIS-1	1/1000	Souris monoclonale	Sigma (H1029)	anti-Mouse IgG, HRP conjugate	1/20 000	Mouton	GE Healthcare (NA931V)

Tableau V-6 : Liste des anticorps utilisés pour le réalisation des western blots

V.7.4 - Analyse de l'expression relative

L'analyse par qPCR se réalise selon le même protocole que celui présenté dans la partie V.6.3. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau V.5. Celles-ci ont préalablement été testées et évaluées au sein de l'équipe d'accueil. Pour cela, les couples d'amorces ont été testés par PCR sur de l'ADN génomique de maïs afin de vérifier qu'ils amplifiaient bien les fragments d'intérêt. Les couples ont alors été testés en qPCR, *via* la réalisation d'une gamme de dilution d'ADNc. L'efficacité de chaque couple est déterminée en réalisant une représentation graphique du logarithme du nombre de copies en fonction du Ct, sachant que le nombre de copies est fixé à 1 pour le point de la gamme le moins concentré. Le coefficient directeur (a) de la courbe de tendance linéaire appliquée à ce graphique permet de calculer le pourcentage d'efficacité du couple d'amorce avec la formule suivante : $(10^{a}-1)$ x100. Pour qu'un couple d'amorces soit validé, son efficacité doit être supérieure à 95%. La gamme de dilution permet également de déterminer la dilution d'ADNc optimale, choisie pour avoir des Cts inférieurs à 32.

V.8 - Analyses biochimiques

V.8.1 - Réalisation des westerns blots

Pour chaque échantillon préalablement dosé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), environ 20 ng de protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE (SodiumDodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), composé d'une portion supérieure d'entassement à 4% d'acrylamide et d'une portion inférieure séparatrice à 10% d'acrylamide. Un marqueur de taille est déposé sur chaque gel (BlueSart Prestained Protein Marker, NIPPON Genetics®). La migration s'effectue dans un tampon de migration TG-SDS 1X (Euromedex®) à 80V pendant 20 minutes, le temps que les protéines atteignent le gel d'entassement, puis entre 30 minutes et 50 minutes à 120V jusqu'à éteindre le front de migration. Le gel d'entassement est alors retiré et les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant le système de transfert iBlot™2 Transfer Device et les membranes associées iBlot™2 Transfer Stacks, nitrocellulose, mini (ThermoFisher Scientific ®). Après transfert, les membranes sont bloquées dans une solution saturante en protéines. Pour cela, elles sont incubées pendant une heure à RT dans une solution de PBS-T (Phosphate Buffer Saline 1X (Dominique Dutscher®), Tween® 20, 2%) à laquelle 1% de lait en poudre est ajouté. La membrane est ensuite mise dans 10 ml de solution de blocage contenant l'anticorps primaire,

dont la dilution dépendra de l'anticorps utilisé (tableau V.6), la nuit sous agitation à 4°C. La membrane est alors rincée quatre fois avec du PBS-T sous agitation à RT, puis mise en incubation dans 20 ml de PBS-T contenant l'anticorps secondaire dirigé contre un épitope de lapin ou de souris, selon l'anticorps primaire choisi, pendant 1 heure à RT sous agitation. Les anticorps secondaires utilisés dans cette étude sont de type « HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugate » conduisant à un système de révélation par chimioluminescence (tableau V.6). La membrane est ensuite rincée quatre fois avec du PBS-T et est révélée par le biais d'un kit permettant à la réaction de chimioluminescence de se produire (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad®). La membrane est imagée avec le système ChemiDoc™Touch Imaging System (Bio-Rad®) avec des temps d'exposition différents en fonction de l'intensité du signal chimioluminescent. Les images générées sont analysées avec le logiciel ImageLab®.

Gel séparateur : pour deux mini gels: 2,5 ml d'Acrylamide 40%, 2,5 ml de tampon séparateur 4X (Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1 %) et 5ml d'H_2O ultra pure.

Gel d'entassement : pour deux mini gels : 0,5 ml d'Acrylamide 40%, 1,25 ml de tampon d'entassement 4X (Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1 %) et 3,25 ml d'H_2O ultra pure.

Gel « Stain free » : Dans certains cas des gels particuliers sont réalisés dans le but d'évaluer la quantité de protéine transférée depuis le gel sur la membrane *via* l'utilisation de la technique "Stain free staining" développée par Bio-Rad ®. Pour cela, du TCE (2,2,2,Tricholroethanol) à 1% est rajouté dans le gel séparateur. Par la suite, après la migration le gel doit être "activé" par une exposition de 45 secondes sous lumière UV grâce au système ChemiDoc™Touch Imaging (Bio-Rad®). L'activation conduit au "crosslinkage" du TCE aux tryptophanes des protéines présentent sur la membrane. Le TCE soumis aux rayonnements U.V. a la capacité de fluorescer, permettant donc d'évaluer la qualité du transfert et la quantité de protéines transférée.

V.8.2 - Production de la protéine NLD *in vitro* dans le système *E.Coli*

V.8.2.1 - Clonages moléculaires et choix des vecteurs d'expression

Les protéines NLD_{-HD99} (sauvage) et NLD_{-PK6} (tronquée) ont été produites *in vitro*. Afin d'optimiser les chances de réussite d'une production de protéines solubles, les deux versions de *NLD* ont été clonées chez deux systèmes d'expression de protéines recombinantes différents ; dans le vecteur pGAPZB (ThermoFisher Scientific®) introduit chez la levure *Pichia pastoris* et dans le vecteur pET28a (Novagen®) introduit chez la bactérie *E.coli*. Le système levure permet de produire la protéine recombinante de manière constitutive grâce au promoteur constitutif *pGAP* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) et le système bactérien permet la

production de la protéine recombinante de manière transitoire grâce au promoteur T7, inductible à l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), utilisé comme un analogue de l'allolactose. Les clonages moléculaires et la production des protéines dans la bactérie ont été réalisés au sein du laboratoire et la production de NLD dans la levure a été réalisée par Alexandre Noiriel à l'ICBMS. Les transformations génétiques bactériennes ont été réalisées dans deux souches thermocompétentes différentes, afin d'optimiser les conditions de production : dans la souche Rosetta-gami™ 2(DE3) Competent Cells (Novagen®) et dans la souche ArcticExpress (DE3) Competent Cells (Agilent Technologie®) en suivant les préconisations des fournisseurs. Ces deux souches sont de type DE3, c'est-à-dire qu'elles sont un lysogène de λDE3 et portent donc une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, inductible à l'IPTG. En revanche, elles ne contiennent pas le vecteur pLysS, qui conduit à l'expression du lysozyme T7, supprimant l'expression basale de l'ARN polymérase T7.

Les clonages moléculaires ont été réalisés par digestions enzymatiques/ligations. Dans un premier temps, les inserts d'intérêt ont été générés ; ils sont composés du gène codant pour la protéine (sauvage ou tronquée), d'un tag poly-histidines, composé de six histidines (6XHis) qui sera en partie N-terminale des protéines et de sites de restrictions compatibles avec les deux vecteurs d'expression ; EcoRI, HindIII et PciI au niveau du codon d'initiation et XhoI au niveau du codon stop (tableau V.3). Pour obtenir ces inserts, des amplifications PCRs ont été réalisées sur des plasmides contenant les gènes *NLD-HD99* et *NLD-PK6* avec des amorces contenant dans leurs queues flottantes les sites de restrictions et le tag (tableau V.4). Ces produits PCRs ont été introduits dans le plasmide pCR™Blunt II-TOPO™ (Invitrogen®) selon les préconisations du fournisseur et les plasmides générés ont été vérifiés selon la méthode présentée dans la partie V.4. Pour l'introduction des inserts d'intérêt dans les plasmides pET28a et pGAPZB, les ADNs plasmidiques du vecteur donneur et du vecteur de destination ont respectivement été digérés avec les enzymes PciI et XhoI et EcoRI, puis les fragments ont été religués (V.4.1).

V.8.2.2 - Induction à l'IPTG

Les inductions sont réalisées à chaque expérimentation avec de nouveaux étalements bactériens. Environ 5 à 10 colonies isolées sont prélevées (afin de s'assurer d'en avoir une fonctionnelle) et mises en préculture dans 2 ml de milieu LB liquide en incubation à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant 12 heures. A partir de ces précultures, 1 ml de chaque culture sont prélevés et déposés dans des erlenmeyers stériles contenant 200 ml de milieu riche 2xTY. Les cultures sont mises en incubation à 37°C sous agitation, 200 rpm et des mesures de la DO600

sont réalisées toutes les heures à partir de 2 heures de culture ; jusqu'à atteindre une DO600 de 0,6, correspondant à la phase exponentielle de croissance des bactéries. La DO600 est mesurée avec un spectromètre Eppendorf Biophotometer® (Eppendorf®). Les cultures bactériennes sont divisées en deux, une partie sera gardée comme contrôle non induit et la deuxième subira une induction à l'IPTG. L'induction est réalisée avec de l'IPTG 1 mM. Les cultures bactériennes résultant des transformations dans la souche ArticExpress sont mises en culture la nuit à 18°C, sous agitation 200 rpm alors que celles transformées dans la souche Rosetta-gami™ 2 sont mises en incubation à 37°C sous agitation à 200 rpm. Pour cette dernière, des prélèvements de cultures bactériennes de 1 ml (induites et non induites) sont réalisés 1h, 2h, 3h et 12h après l'induction. Note : les résultats optimaux ont été obtenus avec la souche ArticExpress.

Milieu 2xTY : Dans un litre d'H_2O ultra pure : 16g de triptone, 10g d'extrait de levure et 5g de NaCl. Autoclavage

V.8.2.3 - Extractions des protéines

Pour chaque culture bactérienne induite et non induite à l'IPTG, 1 ml de culture est prélevé dans des tubes à sonication de 1,5 ml qui sont centrifugés 10 minutes à RT à 16 000 rpm. Les surnageants sont jetés et les culots sont repris dans 250 µl de tampon de Lyse. Les bactéries sont alors soniquées avec le sonicateur à ultrason Bioruptor® Plus sonication device (Diagenode®) avec 30 cycles de 30 secondes de sonication et 20 secondes de pause réalisés à 4°C. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes et les surnageants (contenant la fraction soluble) sont séparés des culots. Les culots sont repris dans 250 µl de tampon Laemmli (Laemmli, 1970) 1X et 250 µl de tampon Laemmli 2X sont rajoutés aux surnageants. Les protéines sont dénaturées 5 minutes à 95°C.

Tampon de Lyse : 50 mM NaH2PO4 et 300 mM NaCl, ajustement pH8 avec NaOH

V.7.3.3 - Vérification de la production

Afin de vérifier que la production de protéine a bien fonctionné, les protéines sont déposées sur deux gels SDS-PAGE différents, suivant le protocole présenté dans la partie V.8.1. Un gel est utilisé afin de réaliser une coloration des protéines par l'immersion du gel dans du bleu de Coomatie InstantBlue™ (SigmaAldrich®) pendant 10 minutes, suivi de trois rinçage à l'eau ultra pure de 10 minutes. Le second gel est utilisé afin de réaliser un western blot selon le protocole présenté dans la partie V.8.1, avec un anticorps primaire dirigé contre le tag-

polyhistidines (tableau V-6). Des analyses par western blots ont également été réalisées avec ce même anticorps sur les extraits protéiques de levures générés par Alexandre Noiriel.

V.8.3 - Recherche des interactants protéiques de NLD

V.8.3.1 - Immunoprécipitation de la protéine

Les immunoprécipitations ont été réalisées sur du pollen provenant des lignées ayant servi pour la complémentation du phénotype d'induction d'haploïdes, contenant les fusions protéiques NLD$_{-HD99}$:CITRINE (protéine entière) et NLD$_{-PK6}$:CITRINE (protéine tronquée) (tableau V-1). Ces lignées sont des générations F2 provenant du croisement entre la lignée inductrice PK6 et les lignées transgéniques dans le fonds génétique A188, *pNLD::NLD$_{-HD99}$:CITRINE* et *pNLD::NLD$_{-HD99}$:CITRINE*. Elles sont homozygotes pour le transgène et pour l'allèle *NLD$_{-PK6}$*. Du pollen de la lignée sauvage A188 non transformée a été utilisé comme témoin négatif et du pollen de la lignée *OE ::NLD$_{-HD99}$* contenant le gène *GFP* exprimé de manière constitutive et forte grâce au promoteur du gène *Cassava Vein Mosaic Virus* (*pCsVMV*), comme témoin positif. Pour chaque lignée, quatre répétitions biologiques (plantes différentes) ont été analysées. Dans le cas de certaines plantes produisant peu de pollen, les prélèvements ont pu être cumulés sur plusieurs jours. Les enrichissements protéiques sont réalisés *via* l'utilisation de billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre la GFP (kit µMacs GFP isolation kit Miltenyi Biotec®). Les protéines sont extraites à partir de pollen frais, récolté et broyé deux fois selon le même protocole que celui appliqué dans la partie V.7.1. Environ 200 mg de broyat sont utilisés par tube auquel sont rajouté un ml de tampon de lyse provenant du kit, supplémenté de 1% d'inhibiteur de protéase (Protease inhibitor Sigma® P5999) afin d'éviter la dégradation des protéines. Les broyats couplés au tampon de lyse sont incubés pendant 30 minutes dans de la glace en vortexant les tubes toutes les 5 minutes Les débris (grande quantité dans le pollen de maïs) sont éliminés par une succession de trois centrifugations à 4°C de 10 minutes (vitesse maximum). Après cette étape, 40 µl d'extrait protéique sont prélevés afin d'analyser les protéines avant immunoprécipitation (partie V.8.3.2). Les billes magnétiques sont ensuite ajoutées dans les extraits protéiques (50 µl par tube) et les tubes sont mis en incubation pendant 30 minutes dans la glace en vortexant toutes les 5 minutes. Les extraits protéiques couplés aux billes sont alors déposer sur les colonnes magnétiques µMacs (Miltenyi Biotec®) préalablement activées par 200 µl de tampon de lyse couplé à l'inhibiteur de protéase. Les colonnes sont rincées 5 fois selon les préconisations du fournisseur, puis l'élution est initiée par l'ajout de 50 µl de tampon d'élution (après ajout de 20 µl de volume perdu).

V.8.3.2 - Vérification des enrichissements

Afin de s'assurer que les enrichissements ont bien fonctionné, deux types de vérification ont été réalisées ; une coloration des protéines au nitrate d'argent en utilisant le kit ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich®) et un western-blot avec un anticorps primaire dirigé contre la GFP (tableau V.6). Le protocole de western blot est le même que celui présenté dans la partie V.8.1, avec une migration sur un gel « StainFree ».

V.8.3.3 - Spectrométrie de masse en tandem

Les analyses par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisées par la plate-forme de protéomique « Protein Science Facility » de la SFR (Structure Fédérative de Recherche) Bioscience Lyon. Les échantillons sont précipités au TCA (acide Trichloroacétique) sur la nuit à 4°C, après lavage, réduction, alkylation, ils sont digérés à la trypsine sur la nuit à 37°C. En l'absence de connaissance sur la concentration en protéines dans les échantillons (difficultés à doser les échantillons de par la présence d'un colorant bleu dans le tampon d'élution du kit utilisé pour l'IP), 100 ng de trypsine ont été ajoutés dans chaque tube. Un dessalage sur des colonnes Spin columns C18 Pierce (ThermoFischer Scientific®) est alors réalisé (trois élutions avec 20 µl à 70% d'ACN (acétonitrile)) pour chaque échantillon. Les échantillons sont analysés sur un spectromètre de masse haute résolution, Orbitrap (ThermoFischer Scientific®) en mode d'acquisition « DDA TOP20 fragmentation HCD », résolution 60K en MS. Les totalités des échantillons ont été injectées. Les données sont traitées avec le logiciel Proteome Discoverer 2.1^{TM} (ThermoFischer Scientific®). Les peptides identifiés ont été confrontés à la base de données UniProtKb. L'absence ou la présence des protéines pour une catégorie donnée sont définies par le calcul de scores définis en fonction des résultats des différents réplicats biologiques. Ainsi, une protéine est considérée comme présente lorsque des peptides correspondants sont identifiés par spectrométrie de masse pour au moins trois (seuil haut) ou deux (seuil bas) réplicats biologiques. En revanche, elle est considérée comme absente lorsque des peptides sont identifiés pour moins d'un réplicat biologique.

V.9 - Analyses Histochimiques

V.9.1 -Caractérisation de l'activité du promoteur de NLD

V.9.1.1 - Calibration de la taille des anthères de A188 en fonction du stade de développement des grains de pollen

Des anthères immatures et matures de la lignée non transformée A188 ont été prélevées à différents stades de développement de la plante. Pour les premiers stades de développement des anthères, les panicules ne sont pas encore sorties du cône de feuilles terminal, il faut donc disséquer la plante avec un scalpel afin d'atteindre la panicule immature à travers les feuilles. Les anthères de différentes tailles sont placées dans des plaques 48 puits. Elles sont classées par tailles en fonction de la position sur la panicule où elles ont été prélevées. Les anthères à la base de la panicule sont plus jeunes que celles dans les branches supérieures. Des prélèvements sont réalisés sur plusieurs plantes de maturité différente afin de recouvrir un large panel de stades de développement. Les anthères, avant la suite de l'analyse, sont prises en photo avec une loupe binoculaire LEICA M212 contenant une caméra (Axiocam, ZEISS®), associée à une lampe CLS150 (Leica®) et au logiciel ZEN® (ZEISS®). Elles seront par la suite mesurées avec le logiciel imageJ®. Les anthères sont alors écrasées avec une pince sur une lame dans du tampon citrate-phosphate contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) à 1 µg/ ml (ThermoFisher Scientific®), afin de faire sortir les grains de pollen. Le DAPI est une molécule fluorescente capable de se lier aux bases azotées Adénines (A) et Thymines (T) de l'ADN, permettant ainsi les marquages des noyaux (Schnedl *et al.,* 1977). Les tissus des anthères sont retirés et les lames recouvertes de lamelles sont observées entre 10 et 30 minutes après le traitement. Le pollen de maïs ne se conserve pas longtemps dans ce tampon, les observations doivent donc être rapides. Les stades de développement du pollen sont définis selon le schéma I-9. Une corrélation entre les stades de développement observés pour les différentes catégories d'anthères sera ensuite faite suivant la taille des anthères dans une catégorie. Un stade développement est attribué à une taille d'anthère lorsque plus de 80% des grains de pollen pour cette taille sont à ce stade (dénombrement au minimum de 100 grains de pollen). Les grains de pollen sont observés avec un microscope à épifluorescence.

Tampon citrate-phosphate : $C_6H_8O_7$ (acide citrique) 0,1 M, Na_2HPO_4, $2H_2O$ (phosphate) 0,2 M. Ajustement du pH à 4 et ajout du triton® 100X 0,1%.

V.9.1.2 - Evaluation du début de l'activité du promoteur *pNLD* lors du développement des grains de pollen

Afin de définir le profil d'activité du promoteur *pNLD*, les lignées *pNLD-$_{HD99}$::GUS* et *pNLD-$_{PK6}$::GUS* ont été analysées. Ces lignées expriment le gène *GUS* sous contrôle des deux versions du promoteur *pNLD*, respectivement provenant du gène *NLD* sauvage et muté. Le gène *GUS*, provenant d'*E.coli* code pour la *β-glucuronidase*. Le substrat de cette protéine est le X-Gluc, dont le clivage produit un précipité bleu et insoluble qui confère une coloration bleue. Après avoir calibré la taille des anthères en fonction des stades de développement des grains de pollen chez A188, des anthères de différentes tailles pour les stades recherchés ont été prélevées et déposées dans des plaques 48 puits contenant du PBS-T. Les plaques sont mises en incubation 1 heure dans une étuve à 37°C, puis le PBS-T est remplacé par la solution GUS et les plaques sont remises en incubation pour 3 heures. La solution GUS est alors retirée et remplacée par du PBS 1X. Les anthères sont imagées avec une loupe binoculaire et les stades de développement des grains de pollen sont analysés avec un microscope à épifluorescence. Des anthères provenant de trois plantes-sœurs différentes par lignée ont été analysées.

Solutions utilisées pour l'analyse : - Tampon phosphate : mettre 85 ml de NaH_2PO_4 0,5 M puis ajout de Na_2HPO_4 jusqu'à avoir un pH de 7.

- Solution 1 : Solution de substrat X-Gluc : Dans 100 ml de tampon phosphate : X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt) (Duchefa Biochimie®) 2 mM, Triton 100X 0,1%, EDTA 10 mM. Ajustement du pH à 8.
- Solution 2 : Dans 100 ml de tampon phosphate : $K_4Fe(CN)6$ (potassium ferrocyanure) 1 mM et $K_3Fe(CN)6$ (potassium ferricyanure) 1 mM.
- Solution GUS: volumes égaux des solutions 1 et 2.

V.9.1.3 - Evaluation de l'activité du promoteur *pNLD* durant et après la fécondation

Des plantes A188 non transformées ont été pollinisées avec du pollen provenant respectivement des lignées *pNLD-$_{HD99}$::GUS* et *pNLD-$_{PK6}$::GUS*. Des ovules fécondés ont été prélevés plusieurs heures (16h, 24h, 36h, 48h, 60h et 72h) après fécondation sur un même épi pour une lignée donnée. L'analyse a été conduite sur trois croisements avec trois plantes-sœurs différentes pour chaque lignée. Les ovules et des soies femelles après pollinisation sont placés dans du PBS-T en incubation dans une étuve à 37°C pendant une heure. Le PBS-T est retiré et remplacé par la solution GUS. Les échantillons sont mis trois fois sous une pompe à vide pendant

10 minutes et remis en incubation à 37°C pendant une nuit. Les ovules et les soies sont alors imagés avec la loupe binoculaire.

V.9.2 - Suivi du génome paternel dans la descendance des lignées inductrices

Des plantes testeurs HD7 X F564 ont été croisées avec du pollen provenant des lignées « inductrice GUS » et « non inductrice GUS » (tableau V-1). Des grains immatures ont été prélevés sur les épis entre 17 et 20 jours après pollinisation. Les grains sont coupés en deux, une moitié sert pour l'analyse histochimique GUS et l'autre moitié sert pour les génotypages. Les moitiés des grains destinées aux génotypages sont conservées pendant 24h à 4°C dans des plaques 48 puits recouvertes d'un papier-filtre humide, en attendant les résultats de l'analyse histochimique. Une fois les phénotypages réalisés, les grains choisis sont disséqués ; les embryons sont retirés des grains et placés dans des plaques 96 puits Deep Well (ThermoFischer Scientific®). En parallèle, des fragments d'albumen correspondants sont prélevés et placés dans d'autres plaques 96 puits. Lors de ces prélèvements les tissus maternels (péricarpes, testas) sont retirés des fragments d'albumen afin de ne pas fausser les génotypages. Des prélèvements foliaires sur les plantes parentes ayant servi pour faire les croisements sont également réalisés (4 disques foliaires de 4 mm). Les échantillons sont ensuite déshydratés *via* l'utilisation de couvercles Silica gel® (Limagrain Europe). Les ADNs et les génotypages avec des puces à ADN Affymetrix® contenant 20 000 marqueurs moléculaires (20K) sont réalisés par la plate-forme de génotypage de Limagrain Europe (Centre de recherche de Chappes).

Les phénotypages des grains sont réalisés, dans un premier temps, par une analyse visuelle afin d'identifier les grains anormaux (avortés, sans embryon, « non développés ») et dans un second temps, une analyse histochimique est conduite. Pour cela, les grains placés dans des plaques 48 puits sont incubés une heure à 37°C dans 1 ml de PBS-T, puis le PBS-T est retiré et 1 ml de solution GUS (partie V.9.1.2) est déposé. Les plaques sont mises trois fois sous une pompe à vide pendant 10 minutes, puis incubées 12 heures dans une étuve à 37°C. La solution GUS est retirée et les grains sont rincés au PBS 1X deux fois. Les observations sont alors réalisées avec la prise en photo de certains grains avec une loupe binoculaire. Les grains peuvent être conservés dans de l'éthanol à 100% plusieurs mois à 4°C. Pour cela, ils sont progressivement déshydratés avec des bains successifs d'éthanol à 30%, 50%, 70% et 100%.

Les données générées sont analysées avec le logiciel RStudio®. Les outils utilisés ont été développés par Limagrain Europe. La méthode consiste à comparer les profils alléliques obtenus dans la descendance avec ceux des parents. Pour un marqueur donné dans la descendance

l'algorithme établi si le résultat obtenu peut être expliqué par le résultat obtenu pour ce marqueur chez le parent ; si oui une couleur est attribuée sur la représentation schématique des chromosomes en CentiMorgan générée. Par exemple, si le résultat dans la descendance pour un marqueur donné est A/A et que pour le parent il est T/A, une couleur sera attribuée, en revanche si le résultat pour le parent est T/T, il n'y aura pas d'attribution de couleur. Un seuil a été défini pour qu'une région chromosomique ne soit pas colorée uniquement si plus de 30 marqueurs sont problématiques à la suite. Les marqueurs pour lesquels les génotypages n'ont pas marché ont été retirés.

V.10 - Microscopie et analyses d'images

V.10.1 - Observations du pollen de maïs

V.10.1.1- Préparation du pollen pour les observations

Pour les observations réalisées sur du pollen de maïs entier, il est nécessaire de conserver les grains intègres le temps des observations, dans un milieu de culture adapté. En effet, le pollen de maïs est une structure fragile, qui se dégrade facilement et notamment lors de la mise en contact avec de l'eau qui entraîne son éclatement. Pour les observations, le pollen frais (production < 1h) est récolté et placé entre lame et lamelle dans une goutte de milieu d'observation.

Milieu d'observation : ce milieu ressemble au milieu de germination à la différence près que le pH n'est pas adapté pour la germination du pollen de maïs. Préparation du milieu dans H_2O ultra pure : Saccarose 10%, $CaCl_2$ 5mM, $MgSO_4$ (sulfate de magnésium) 1 mM, KCl 5 mM et H_3BO_4 (acide borique) 0,01%. Ajustement du pH avec du KOH à 8.

V.10.1.2 - Germination des grains de pollen

Afin de faire des observations de tubes pollinique, le pollen frais est mis à germer dans du milieu de germination, contenant de l'acide borique. La germination se fait dans des boites de Petri avec un volume d'environ 1 cm. Le pollen est saupoudré sur le milieu, la densité de pollen par boite ne doit pas être trop importante, sinon les grains de pollen ne germeront pas. Les boites sont mises en incubation à 25°C pendant 30 minutes pour observer la sortie du tube pollinique et 2 heures pour un développement maximal. Les grains de pollen germés sont alors prélevés délicatement avec une pipette P200 et déposés sur lame avec du milieu de germination.

Milieu de germination : Préparation du milieu dans H_2O ultra pure : Saccarose 10%, $CaCl_2$ 5mM, $MgSO_4$ 1 mM, KCl 5 mM et H_3BO_4 0,01%. Ajustement du pH avec du KOH à 5,8.

V.10.1.2 - Isolement des cellules spermatiques

Deux méthodes d'isolement des cellules spermatiques ont été entreprises, soit la libération des MGUs, puis des cellules spermatiques hors des grains de pollen par l'application d'un choc osmotique, soit par un isolement des cellules spermatiques par l'utilisation de gradients de Percoll qui permettent d'avoir une plus forte densité en cellules spermatiques et une meilleure pureté.

V.10.1.3a - Libération des cellules spermatiques par un choc osmotique

Le grain de pollen frais sont placés directement entre lame et lamelle dans du milieu Choc contenant du saccarose et des concentrations en ions ajoutées très faibles. Les grains de pollen éclateront très rapidement une fois dans le milieu (entre 5 et 10 minutes), c'est pourquoi les lames doivent être directement observées. Notes : Cette méthode a, entre autres, été utilisée afin d'évaluer l'influence d'un stress osmotique sur du pollen des lignées inductrices contenant la fusion protéique TUBα:YFP en comparaison aux lignées non inductrices. Les photos des cellules spermatiques et des MGUs en dégradation ont été prises avec un microscope confocal, mais le dénombrement des cellules spermatiques avec des agrégats de TUBα:YFP a été réalisé avec un microscope à épifluorescence.

Milieu Choc: Préparation du milieu dans H_2O ultra pure : Saccarose 10%, $CaCl_2$ 5µM, $MgSO_4$ 1 µM, KCl 5 µM et H_3BO_4 0,01%. Pas d'ajustement du pH

V.10.1.3b - Isolement des cellules spermatiques par flottaison

Du pollen frais est récolté (environ 500 mg /tube) puis mis dans un tube Falcon® 15 ml dans lequel sont rajoutés 6 ml de milieu BKMan 0,52M afin de procéder à l'éclatement des grains de pollen. Les tubes sont mis en agitation sur une roue tournante à 4°C pendant 20 minutes. A partir de cette étape, l'ensemble de l'expérimentation se réalisera sur glace. Afin de retirer les plus gros débris, la solution contenant les grains de pollen éclatés est versée sur deux filtres superposés de 40 µm et de 70 µm. Un volume de Percoll 80%, équivalant au volume de filtra, est utilisé afin de rincer les filtres, soit 6 ml. Pour la purification des cellules spermatiques par flottaison, 5 ml de filtrat + Percoll 80% sont prélevés et déposés dans un falcon 15 ml. Par-dessus

ce volume, 1 ml de Percoll 80% est déposé délicatement, puis 5 ml de BK-Man-MOPS. Les tubes sont alors centrifugés 40 minutes à 4°C à 1400 rpm. Après cette étape, deux bandes contenant les cellules spermatiques seront observables dans les tubes, une bande inférieure qui se retrouve à l'interphase entre le dépôt (filtra + Percoll 80%) et le Percoll 20% et une bande supérieure qui se trouve à l'interphase entre le Percoll 80% et le BK-Man-MOPS. Les deux bandes sont délicatement prélevées avec une pipette P1000 puis déposées individuellement dans deux nouveaux tubes. Suivant les volumes prélevés, l'équivalent de six volumes en BK-Man-MOPS sont rajoutés dans les tubes qui sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 4°C, à 1200 rpm. Les surnageants sont éliminés en majorité afin de ne laisser qu'environ 200 µl de solution dans les tubes. Les culots sont alors remis en suspension. Cette suspension contiendra les cellules spermatiques isolées et pourra être observée entre lame et lamelle.

Milieux utilisés pour l'isolement :

- BK* 100X : Pour 1 litre dans H_2O ultra pure : H_3BO_3 1 g, $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$ (nitrate de calcium) 3 g, $MgSO^4$, $7H_2O$ 2 g, KNO_3 (nitrate de potassium) 1g.
- Milieu BK-Man (mannitol) 0,52 M: Pour 1 litre dans H_2O ultra pure : BK* 100X 10 ml, D-Mannitol 94,74 g.
- Milieu BK-Man-MOPS : Pour 1 litre dans H_2O ultra pure : BK* 100X 10 ml, D-Mannitol 94,74g (0,52 M), MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) 2,1 g (10 mM). Ajuster le pH avec NaOH à 7,5.
- Milieu BK-S15-MOPS 2X : Pour 1 litre dans H_2O ultra pure : BK* 100X 10 ml, Saccharose 30 g (30%), MOPS 4,2 g (20 mM). Ajuster le pH avec NaOH à 7,5.
- Percoll 20% : Percoll (DELL®) 20%, milieu BK -15-MOPS 50%, H_2O ultra pure 30%.
- Percoll 80%: Percoll 80%, milieu BK -15-MOPS 20%

V.10.2 - Observations des plantes *A.thaliana*

V.10.2.1 - Observations des grains de pollen et des apex racinaires d'*A.thaliana*

Pour observer les grains de pollen d'*A.thaliana*, les fleurs ouvertes sont retirées sur une hampe florale qui est alors identifiée. Le lendemain des fleurs fraichement ouvertes sont prélevées sur la hampe florale et sont écrasées sur une lame dans de l'eau avec une pince afin de faire sortir les grains de pollen. Les fleurs sont retirées et les grains de pollen peuvent être observés au microscope entre lames et lamelles. Les apex racinaires sont prélevés sur des plantules de sept jours mises en culture *in vitro* verticalement et déposés entre lames et lamelles dans une goutte d'eau.

V.10.2.2 - Traitement des plantules à la PAO et au 2-BP

Les traitements à la PAO (Phényle Arsine Oxide) et au 2-BP (2-bromopalmitate) sont réalisés sur des plantules de sept jours, cultivées *in vitro* verticalement. Pour cela, 5 à 10 plantules sont déposées dans des plaques contenant six puits de 9,6 cm (Dominique Dutscher®). Dans chaque puit 2 ml de MS ½ sont rajoutés, puis les différents traitements sont déposés. Le traitement à la PAO (Sigma-Aldrich®) se fait à une concentration de 60 µM pendant 30 minutes (ajout de 2 µl d'une solution stock à 60 mM dans du DMSO). Le traitement au 2-BP (Sigma-Aldrich®) se fait pendant 2 heures à une concentration de 50 µM (ajout de 2 µl d'une solution stock à 50 mM dans de l'éthanol 100%). Les contrôles négatifs expérimentaux respectifs de la PAO et du 2-BP sont respectivement l'ajout dans le milieu MS ½ de 2 µl de DMSO et de 2 µl d'Ethanol 100% (qui ont servi pour les dissolutions des drogues afin de faire les solutions stocks).

Milieu MS ½ liquide : Dans un litre d'H_2O ultra pure ; 2,2g de milieu MS « salt basal mixure » (Duchefa Biochemie®), pH ajusté avec KOH à 5,7.

V.10.2.3 - Microscopes utilisés

Les observations en microscopie confocale ont été réalisées avec un microscope photonique à balayage laser, Zeiss LSM 710 monté sur AxioImager Z2. Les échantillons ont été observés avec un objectif X40 à immersion à huile (Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27). En fonction des fluorophores observés, différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ont été utilisées : CITRINE, YFP, VENUS : 514 nm / 520-580 nm ; GFP : 488 nm / 495-560 nm; DAPI : 405 nm / 410-480 nm (excitation / bande passante).

Pour les observations avec la technologie SIM (Structured Illumination Microscopy), les grains de pollen ont été imagés avec un objectif à immersion à huile X63 (Apo NA 1.4) avec un microscope Elyra PS1 (ZEISS®) équipé d'un laser 488 nm et d'un filtre de bande passante de 495-557 nm. Des Z-stacks ont été réalisés par la prise de 15 images avec une image tous les 0,125 µm ont été imagées par la réalisation de Z-stacks de 0,125 lm (cinq phases et trois angles). Les images sont ensuite traitées avec le logiciel Zen en utilisant les paramètres suivants : « manual processing », « baseline-shifted », « auto-noise filtering », et « 1.5 weighting ».

Les observations avec un microscope à épifluorescence ont été réalisées avec l'équipement Imager M2 Axio (Zeiss®), contenant une lampe LED X-Cite® 120LED (Excelitas®). Les objectifs X20 et X40 ont été utilisés (PlanApo Chomat Zeiss). Le DAPI est observé après excitation avec un laser 514 et un filtre de la bande passante correspondante.

V.10.2.4 - Analyses d'images

Les analyses d'images ont été réalisées avec le logiciel ImageJ®. Les ratios IFMP/IFC mesurés sur les cellules racinaires correspondent à l'intensité du signal fluorescent au niveau de la membrane plasmique sur l'intensité du signal fluorescent au niveau du cytoplasme. Ces ratios sont mesurés par l'évaluation des niveaux de gris sur une image dans une zone d'intérêt ; pour cela la fonction « Measure » du logiciel a été exploitée, en prenant en compte la valeur moyenne des niveaux de gris sur les pixels (fonction « Mean »). Pour une cellule donnée, deux mesures sont réalisées (une sur sa largeur et l'autre sur sa longueur) au niveau de la membrane plasmide et au niveau du cytoplasme des cellules. Pour cela, des traits définissent les zones à mesurer. Pour l'analyse des différentes lignées transgéniques, les mesures ont été réalisées sur au minimum cinq lignées indépendantes avec la mesure de vingt cellules par racine sur au minimum trois racines par lignée. Pour les analyses pharmacologiques, les mesures ont été réalisées sur trois expérimentations indépendantes, avec la mesure de vingt cellules par racine sur au minimum cinq racines par expérimentation (mais généralement dix ont été analysées).

V.11 - Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel RStudio®. Dans ce projet, les données obtenues n'ont pas respecté les conditions permettant d'appliquer des tests statistiques paramétriques (normalité et égalité des variances). Ainsi, des analyses non-paramétriques ont été conduites. Deux types de tests différents ont été utilisés ; le test de Wilcoxon (ou test U de Mann-Whitney) et le test de Kruskal Wallis suivi du test de Nemenyi post hoc. Le test de Wilcoxon est une alternative au test de Student, applicable sur des données non paramétriques. Il pause l'hypothèse que la distribution des données entre deux groupes est la même. Le test de Kruskal Wallis + Nemenyi post hoc nécessite l'utilisation du package PMCMR (Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package). Il est applicable pour comparer des moyennes obtenues sur des pourcentages, c'est une alternative aux ANOVA.

Références Bibliographies

Abbo, S., Pinhasi van-Oss, R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., and Peleg, Z. (2014). Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. Trends Plant Sci. *19*, 351–360.

Al Yasiri, S., and Rogers, O.M. (1971). Attempting chemical induction of haploidy using toluidine blue. Amer Soc Hort Sci J.

Alandete-Saez, M., Ron, M., Leiboff, S., and McCormick, S. (2011). Arabidopsis thaliana GEX1 has dual functions in gametophyte development and early embryogenesis. Plant J. Cell Mol. Biol. *68*, 620–632.

Alexander, P., Rounsevell, M.D.A., Dislich, C., Dodson, J.R., Engström, K., and Moran, D. (2015). Drivers for global agricultural land use change: The nexus of diet, population, yield and bioenergy. Glob. Environ. Change *35*, 138–147.

Alexandratos, N., and Bruinsma, J. (2012). World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision.

Alfenito, M.R., and Birchler, J.A. (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. Genetics *135*, 589–597.

Allard, R.W., and Allard, R.W. (1999). Principles of Plant Breeding (John Wiley & Sons).

Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? Nat. Rev. Genet. *9*, 923–937.

Aloulou, A., Ali, Y.B., Bezzine, S., Gargouri, Y., and Gelb, M.H. (2012). Phospholipases: an overview. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *861*, 63–85.

Amien, S., Kliwer, I., Márton, M.L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D., and Dresselhaus, T. (2010). Defensin-Like ZmES4 Mediates Pollen Tube Burst in Maize via Opening of the Potassium Channel KZM1. PLOS Biol. *8*, e1000388.

Antoine-Michard, S., and Beckert, M. (1997). Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. *48*, 203–207.

Ariizumi, T., and Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. Annu. Rev. Plant Biol. *62*, 437–460.

Åström, H., Sorri, O., and Raudaskoski, M. (1995). Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. Sex. Plant Reprod. *8*, 61–69.

Aw, S.J., Hamamura, Y., Chen, Z., Schnittger, A., and Berger, F. (2010). Sperm entry is sufficient to trigger division of the central cell but the paternal genome is required for endosperm development in Arabidopsis. Development *137*, 2683–2690.

Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. Cell. Signal. *17*, 1052–1062.

Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (Capsicum annuum L.): subcellular rearrangements through development. Biol. Cell *97*, 709–722.

Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2010). Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. Plant Signal. Behav. *5*, 341–345.

Bárány, I., Berenguer, E., Solís, M.-T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M.E., Crespo, J.L., Risueño, M.C., Díaz, I., and Testillano, P.S. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. J. Exp. Bot. *69*, 1387–1402.

Barcaccia, G., and Albertini, E. (2013). Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. Plant Reprod. *26*, 159–179.

Barman, A., Gohain, D., Bora, U., and Tamuli, R. (2018). Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. Microbiol. Res. *209*, 55–69.

Barret, P., Brinkmann, M., and Beckert, M. (2008). A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for in situ gynogenesis in maize. Theor. Appl. Genet. *117*, 581–594.

Batzenschlager, M., Lermontova, I., Schubert, V., Fuchs, J., Berr, A., Koini, M.A., Houlné, G., Herzog, E., Rutten, T., Alioua, A., et al. (2015). Arabidopsis MZT1 homologs GIP1 and GIP2 are essential for centromere architecture. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 8656–8660.

Becraft, P.W., Bongard-Pierce, D.K., Sylvester, A.W., Poethig, R.S., and Freeling, M. (1990). The liguleless-1 gene acts tissue specifically in maize leaf development. Dev. Biol. *141*, 220–232.

Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. Plant Cell *4*, 879.

Bedinger, P.A., and Fowler, J.E. (2009). The Maize Male Gametophyte. In Handbook of Maize: Its Biology, (Springer, New York, NY), pp. 57–77.

Begcy, K., and Dresselhaus, T. (2017). Tracking maize pollen development by the Leaf Collar Method. Plant Reprod.

Bennett, M.D., Finch, R.A., and Barclay, I.R. (1976). The time rate and mechanism of chromosome elimination in Hordeum hybrids. Chromosoma *54*, 175–200.

Berger, F., and Twell, D. (2011). Germline Specification and Function in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. *62*, 461–484.

Berger, F., Grini, P.E., and Schnittger, A. (2006). Endosperm: an integrator of seed growth and development. Curr. Opin. Plant Biol. *9*, 664–670.

Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., and Higashiyama, T. (2008). Double fertilization – caught in the act. Trends Plant Sci. *13*, 437–443.

Besser, K. von, Frank, A.C., Johnson, M.A., and Preuss, D. (2006). Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. Development *133*, 4761–4769.

BHOJWANI, S.S., DUNWELL, J.M., and SUNDERLAND, N. (1973). Nucleic-Acid and Protein Contents of Embryogenic Tobacco Pollen. J. Exp. Bot. *24*, 863–871.

Bibov, M.Y., Kuzmin, A.V., Alexandrova, A.A., Chistyakov, V.A., Dobaeva, N.M., and Kundupyan, O.L. (2018). Role of the reactive oxygen species induced DNA damage in human spermatozoa dysfunction. AME Med. J. *3*.

Bitsch, C., Gröger, S., and Lelley, T. (1998). Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. Euphytica *103*, 319–323.

Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E., and Bergner, A.D. (1922). A HAPLOID MUTANT IN THE JIMSON WEED, "DATURA STRAMONIUM." Science *55*, 646–647.

Blancaflor, E.B., and Hasenstein, K.H. (1995). Growth and Microtubule Orientation of Zea mays Roots Subjected to Osmotic Stress. Int. J. Plant Sci. *156*, 774–783.

Boavida, L., Becker, J.D., and Feijó, J.A. (2005). The making of gametes in higher plants. Int. J. Dev. Biol. 595–614.

Boavida, L.C., Qin, P., Broz, M., Becker, J.D., and McCormick, S. (2013). Arabidopsis Tetraspanins Are Confined to Discrete Expression Domains and Cell Types in Reproductive Tissues and Form Homo- and Heterodimers When Expressed in Yeast. Plant Physiol. *163*, 696–712.

Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. In Advances in Haploid Production in Higher Plants, (Springer, Dordrecht), pp. 35–46.

Bohanec, J.M. and B. (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding.

Bohanec, B., Jakše, M., Ihan, A., and Javornik, B. (1995). Studies of gynogenesis in onion (Allium cepa L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. Plant Sci. *104*, 215–224.

Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M.A., Jaciubek, M., Schroeder, J.I., and Grossniklaus, U. (2009). Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. Development *136*, 3279–3288.

Bokvaj, P., Hafidh, S., and Honys, D. (2015). Transcriptome profiling of male gametophyte development in Nicotiana tabacum. Genomics Data *3*, 106–111.

Bordes J. (2006). Création de lignées haploïdes doublées de maïs par gynogenèse induite in situ: amélioration de la méthode et intégration dans les schémas de séléction. Thèse de l'Université Clermont II, N°1646, Clermont-Ferrand (France). 124p.

Bordes, J., Dumas de Vaulx, R., Lapierre, A., and Pollacsek, M. (1997). Haplodiploidization of maize (Zea mays L) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. Agronomie *17*, 291–297.

Bordes, J., Charmet, G., Vaulx, R.D. de, Lapierre, A., Pollacsek, M., Beckert, M., and Gallais, A. (2007). Doubled-haploid versus single-seed descent and family variation for testcross performance in a maize population. Euphytica *154*, 41–51.

Borg, M., Brownfield, L., and Twell, D. (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. J. Exp. Bot. *60*, 1465–1478.

Borg, M., Brownfield, L., Khatab, H., Sidorova, A., Lingaya, M., and Twell, D. (2011). The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in Arabidopsis. Plant Cell *23*, 534–549.

Borges, F., Parent, J.-S., Ex, F. van, Wolff, P., Martínez, G., Köhler, C., and Martienssen, R.A. (2018). Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. Nat. Genet. *50*, 186–192.

Borrino, E.M., Caligari, P.D.S., Powell, W., McNaughton, I.H., and Hayter, A.M. (1985). Cytological observation on the effects of pollen irradiation in diploid and polyploid crops. Heredity *54*, 165–170.

Bortiri, E., and Hake, S. (2007). Flowering and determinacy in maize. J. Exp. Bot. *58*, 909–916.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., Lammeren, A.A.M. van, Miki, B.L.A., et al. (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. Plant Cell *14*, 1737–1749.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. *72*, 248–254.

Britt, A.B., and Kuppu, S. (2016). Cenh3: An Emerging Player in Haploid Induction Technology. Front. Plant Sci. *7*.

Brown, R., and Lemmon, B.E. (1991). Pollen development in orchids. 3. A novel generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. J. Cell Sci. *99*, 273–281.

Brown, R.C., and Lemmon, B.E. (1992). Pollen development in orchids 4. Cytoskeleton and ultrastructure of the unequal pollen mitosis in Phalaenopsis. Protoplasma *167*, 183–192.

Brown, W.J., Chambers, K., and Doody, A. (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. Traffic *4*, 214–221.

Brownfield, L., Hafidh, S., Durbarry, A., Khatab, H., Sidorova, A., Doerner, P., and Twell, D. (2009a). Arabidopsis DUO POLLEN3 Is a Key Regulator of Male Germline Development and Embryogenesis. Plant Cell *21*, 1940–1956.

Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., and Twell, D. (2009b). A Plant Germline-Specific Integrator of Sperm Specification and Cell Cycle Progression. PLOS Genet. *5*, e1000430.

Burke, J.E., and Dennis, E.A. (2008). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. J. Lipid Res. *50*, S237–S242.

Bylich, V., and Chalyk, S. (1996). Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid- inducing capacity in ZMS line. Maize Genet. Coop. Newsl.

Cai, G., and Cresti, M. (2009). Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years. J. Exp. Bot. *60*, 495–508.

Cai, G., Parrotta, L., and Cresti, M. (2015). Organelle trafficking, the cytoskeleton, and pollen tube growth. J. Integr. Plant Biol. *57*, 63–78.

Camera, S.L., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D., and Heitz, T. (2009). The Arabidopsis Patatin-Like Protein 2 (PLP2) Plays an Essential Role in Cell Death Execution and Differentially Affects Biosynthesis of Oxylipins and Resistance to Pathogens. Mol. Plant. Microbe Interact. *22*, 469–481.

Cameron, C., and Geitmann, A. (2018). Cell mechanics of pollen tube growth. Curr. Opin. Genet. Dev. *51*, 11–17.

Campbell, A.W., Griffin, W.B., Burritt, D.J., and Conner, A.J. (2001). The Importance of Light Intensity for Pollen Tube Growth and Embryo Survival in Wheat × Maize Crosses. Ann. Bot. *87*, 517–522.

Camus-Kulandaivelu, L., Veyrieras, J.-B., Madur, D., Combes, V., Fourmann, M., Barraud, S., Dubreuil, P., Gouesnard, B., Manicacci, D., and Charcosset, A. (2006). Maize Adaptation to Temperate Climate: Relationship Between Population Structure and Polymorphism in the Dwarf8 Gene. Genetics *172*, 2449–2463.

Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L.S., Faure, J.-E., Berger, F., Pagnussat, G., Krishnan, A., Alvarez-Mejia, C., Vielle-Calzada, J.-P., Lee, Y.-R., et al. (2008). Maternal Control of Male-Gamete Delivery in Arabidopsis Involves a Putative GPI-Anchored Protein Encoded by the LORELEI Gene. PLANT CELL ONLINE *20*, 3038–3049.

Carlson, W.R. (1978). The B chromosome of corn. Annu. Rev. Genet. *12*, 5–23.

Carputo, D., Monti, L., Werner, J.E., and Frusciante, L. (1999). Uses and usefulness of endosperm balance number. Theor. Appl. Genet. *98*, 478–484.

Carrizo García, C., Nepi, M., and Pacini, E. (2017). It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms-a review. Protoplasma *254*, 57–73.

Ceccarelli, S. (2015). Efficiency of Plant Breeding. Crop Sci. *55*, 87–97.

Chaikam, V., Nair, S.K., Babu, R., Martinez, L., Tejomurtula, J., and Boddupalli, P.M. (2015). Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. *128*, 159–171.

Chaikam, V., Martinez, L., Melchinger, A.E., Schipprack, W., and Boddupalli, P.M. (2016). Development and Validation of Red Root Marker-Based Haploid Inducers in Maize. Crop Sci. *56*, 1678.

Chalyk, S.T. (1994). Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. Euphytica *79*, 13–18.

Chalyk, S., Baumann, A., Daniel, G., and Eder, J. (2003). Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. Maize Genet. Coop. Newsl.

Chan, J., and Peter Pauls, K. (2007). Brassica napus Rop GTPases and their expression in microspore cultures. Planta *225*, 469–484.

Chang, M.-T., and Coe, E.H. (2009). Doubled Haploids. In Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 127–142.

Chang, M.T., and Neuffer, M.G. (1989). Maize microsporogenesis. Genome *32*, 232–244.

Chang, Z., and Hong-Yuan, Y. (1981). Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. Plant Sci. Lett. *20*, 231–237.

Charzynska, M., Murgia, M., Milanesi, C., and Cresti, M. (1989). Origin of sperm cell association in the "male germ unit" ofBrassica pollen. Protoplasma *149*, 1–4.

Chase, S.S. (1949). Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. Genetics *34*, 328.

Chase, S.S. (1969). Monoploids and monoploid-derivatives of maize (Zea mays L.). Bot. Rev. *35*, 117–168.

Chat, J., Decroocq, S., and Petit, R.J. (2003). A one-step organelle capture: gynogenetic kiwifruits with paternal chloroplasts. Proc. Biol. Sci. *270*, 783–789.

Chaubal, R., Zanella, C., Trimnell, M.R., Fox, T.W., Albertsen, M.C., and Bedinger, P. (2000). Two male-sterile mutants of Zea Mays (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. Am. J. Bot. *87*, 1193–1201.

Chaubal, R., Anderson, J.R., Trimnell, M.R., Fox, T.W., Albertsen, M.C., and Bedinger, P. (2003). The transformation of anthers in the msca1 mutant of maize. Planta *216*, 778–788.

Chen, X.-Y., and Kim, J.-Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. Plant Signal. Behav. *4*, 489–492.

Chen, Y.C., and McCormick, S. (1996). sidecar pollen, an Arabidopsis thaliana male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. Dev. Camb. Engl. *122*, 3243–3253.

Chen, J., Strieder, N., Krohn, N.G., Cyprys, P., Sprunck, S., Engelmann, J.C., and Dresselhaus, T. (2017a). Zygotic Genome Activation Occurs Shortly after Fertilization in Maize. Plant Cell *29*, 2106–2125.

Chen, J.-F., Cui, L., Malik, A.A., and Mbira, K.G. (2011). In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC *104*, 311–319.

Chen, X., Zhang, H., Sun, H., Luo, H., Zhao, L., Dong, Z., Yan, S., Zhao, C., Liu, R., Xu, C., et al. (2017b). IRREGULAR POLLEN EXINE1 Is a Novel Factor in Anther Cuticle and Pollen Exine Formation. Plant Physiol. *173*, 307–325.

Chen, Z., Tan, J.L.H., Ingouff, M., Sundaresan, V., and Berger, F. (2007). Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in Arabidopsis thaliana. Development *135*, 65–73.

Chen, Z., Hafidh, S., Poh, S.H., Twell, D., and Berger, F. (2009). Proliferation and cell fate establishment during Arabidopsis male gametogenesis depends on the Retinoblastoma protein. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 7257–7262.

Chevalier, É., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E.L., and Matton, D.P. (2011). Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization: Tansley review. New Phytol. *192*, 13–28.

Christensen, C.A., King, E.J., Jordan, J.R., and Drews, G.N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the mutant. Sex. Plant Reprod. *10*, 49–64.

Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., et al. (2006). SIAMESE, a Plant-Specific Cell Cycle Regulator, Controls Endoreplication Onset in Arabidopsis thaliana. Plant Cell *18*, 3145–3157.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method forAgrobacterium-mediated transformation ofArabidopsis thaliana. Plant J. *16*, 735–743.

Coe, E.H. (1959). A Line of Maize with High Haploid Frequency. Am. Nat. *93*, 381–382.

Cordts, S., Bantin, J., Wittich, P.E., Kranz, E., Lörz, H., and Dresselhaus, T. (2001). ZmES genes encode peptides with structural homology to defensins and are specifically expressed in the female gametophyte of maize. Plant J. *25*, 103–114.

Cowan, C.R., Carlton, P.M., and Cande, W.Z. (2001). The Polar Arrangement of Telomeres in Interphase and Meiosis. Rabl Organization and the Bouquet. Plant Physiol. *125*, 532–538.

Cresti, M., Lancelle, S.A., and Hepler, P.K. (1987). Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of Nicotiana and Impatiens. J. Cell Sci. *88*, 373–378.

Crossa, J., Pérez-Rodríguez, P., Cuevas, J., Montesinos-López, O., Jarquín, D., de Los Campos, G., Burgueño, J., González-Camacho, J.M., Pérez-Elizalde, S., Beyene, Y., et al. (2017). Genomic Selection in Plant Breeding: Methods, Models, and Perspectives. Trends Plant Sci. *22*, 961–975.

Crow, J.F. (1998). 90 Years Ago: The Beginning of Hybrid Maize. Genetics *148*, 923–928.

D. Hayward, M., O. Bosemark, N., Romagosa, I., and Cerezo, M. (1993). Plant Breeding: Principles and prospects.

Daniotti, J.L., Pedro, M.P., and Valdez Taubas, J. (2017). The role of S-acylation in protein trafficking. Traffic Cph. Den. *18*, 699–710.

Datta, R., Chamusco, K.C., and Chourey, P.S. (2002). Starch Biosynthesis during Pollen Maturation Is Associated with Altered Patterns of Gene Expression in Maize. Plant Physiol. *130*, 1645–1656.

Davies, D.R. (1974). Chromosome elimination in inter-specific hybrids. Heredity *32*, 267–270.

Davies, P.A., and Sidhu, P.K. (2017). Oat Doubled Haploids Following Maize Pollination. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1536*, 23–30.

Deimling, S., Röbert, F., and Geiger, HH. (1997). Methodik und genetic der in-vio haploideninduktion bei mais. Vortr. Planzenzüchtg. *38:203-224*.

De La Fuente, G., Frei, U., Trampe, B., Nettleton, D., Zhang, W., and Lubberstedt, T. (2018). A Diallel Analysis of a Maize Donor Population Response to In Vivo Maternal Haploid Induction I: Inducibility. Crop Sci.

De Storme, N., and Geelen, D. (2013). Cytokinesis in plant male meiosis. Plant Signal. Behav. *8*.

Denninger, P., Bleckmann, A., Lausser, A., Vogler, F., Ott, T., Ehrhardt, D.W., Frommer, W.B., Sprunck, S., Dresselhaus, T., and Grossmann, G. (2014). Male–female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. Nat. Commun. *5*, 4645.

Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., and Kokotos, G. (2011). Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. Chem. Rev. *111*, 6130–6185.

Dessen, A. (2000). Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). Biochim. Biophys. Acta *1488*, 40–47.

Devaux, P. (2003). The Hordeum bulbosum (L.) method. In Doubled Haploid Production in Crop Plants, M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, and I. Szarejko, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 15–19.

Dhondt, S., Gouzerh, G., Müller, A., Legrand, M., and Heitz, T. (2002). Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. Plant J. *32*, 749–762.

Diboll, A.G. (1968). Fine Structural Development of the Megagametophyte of Zea mays Following Fertilization. Am. J. Bot. *55*, 797–806.

Doebley, J. (2004). The Genetics of Maize Evolution. Annu. Rev. Genet. *38*, 37–59.

Doebley, J., and Stec, A. (1991). Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. Genetics *129*, 285–295.

Doebley, J., Stec, A., and Gustus, C. (1995). teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. Genetics *141*, 333–346.

Doll, N.M., Depège-Fargeix, N., Rogowsky, P.M., and Widiez, T. (2017). Signaling in Early Maize Kernel Development. Mol. Plant *10*, 375–388.

Dong, F., Cai, X., and Makaroff, C.A. (2001). Cloning and characterization of two Arabidopsis genes that belong to the RAD21/REC8 family of chromosome cohesin proteins. Gene *271*, 99–108.

Dong, L., Li, L., Liu, C., Liu, C., Geng, S., Li, X., Huang, C., Mao, L., Chen, S., and Xie, C. (2018). Genome Editing and Double-Fluorescence Proteins Enable Robust Maternal Haploid Induction and Identification in Maize. Mol. Plant *0*.

Dong, X., Xu, X., Miao, J., Li, L., Zhang, D., Mi, X., Liu, C., Tian, X., Melchinger, A.E., and Chen, S. (2013). Fine mapping of qhir1 influencing in vivo haploid induction in maize. Theor. Appl. Genet. *126*, 1713–1720.

Dong, Y.-Q., Zhao, W.-X., Li, X.-H., Liu, X.-C., Gao, N.-N., Huang, J.-H., Wang, W.-Y., Xu, X.-L., and Tang, Z.-H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. Plant Cell Rep. *35*, 1991–2019.

Doucet, J., Lee, H.K., and Goring, D.R. (2016). Pollen Acceptance or Rejection: A Tale of Two Pathways. Trends Plant Sci. *21*, 1058–1067.

Dowd, P.E. (2006). Petunia Phospholipase C1 Is Involved in Pollen Tube Growth. PLANT CELL ONLINE *18*, 1438–1453.

Downs, G.S., Bi, Y.-M., Colasanti, J., Wu, W., Chen, X., Zhu, T., Rothstein, S.J., and Lukens, L.N. (2013). A Developmental Transcriptional Network for Maize Defines Coexpression Modules. Plant Physiol. *161*, 1830–1843.

Dresselhaus, T., and Franklin-Tong, N. (2013). Male–Female Crosstalk during Pollen Germination, Tube Growth and Guidance, and Double Fertilization. Mol. Plant *6*, 1018–1036.

Dresselhaus, T., and Johnson, M.A. (2018). Reproduction: Plant Parentage à Trois. Curr. Biol. *28*, R28–R30.

Dresselhaus, T., and Márton, M.L. (2009). Micropylar pollen tube guidance and burst: adapted from defense mechanisms? Curr. Opin. Plant Biol. *12*, 773–780.

Dresselhaus, T., Lausser, A., and Marton, M.L. (2011). Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses. Ann. Bot. *108*, 727–737.

Dresselhaus, T., Sprunck, S., and Wessel, G.M. (2016). Fertilization Mechanisms in Flowering Plants. Curr. Biol. *26*, R125–R139.

Drews, G.N., Lee, D., and Christensen, C.A. (1998). Genetic analysis of female gametophyte development and function. Plant Cell *10*, 5–17.

Dumas, C., and Mogensen, H. (1993). Gametes and Fertilization: Maize as a Model System for Experimental Embryogenesis in Flowering Plants. Plant Cell *5*, 1337–1348.

Dumas, C., Knox, R.B., McConchie, C.A., and Russell, S.D. (1984). Emerging physiological concepts in fertilization. Whats New Plant Physiol. USA.

Dumas, C., Knox, R.B., and Gaude, T. (1985). The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain ofBrassica. Protoplasma *124*, 168–174.

Dunwell, J.M. (1976). A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of Nicotiana Tabacum. Environ. Exp. Bot. *16*, 109–118.

Dunwell, J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. *8*, 377–424.

Dunwell, J.M., and Sunderland, N. (1973). Anther culture of Solanum tuberosum L. Euphytica *22*, 317–323.

Dupuis, I., Roeckel, P., Matthys-Rochon, E., and Dumas, C. (1987). Procedure to isolate viable sperm cells from corn (Zea mays L.) pollen grains. Plant Physiol. *85*, 876–878.

Durbarry, A., Vizir, I., and Twell, D. (2005). Male Germ Line Development in Arabidopsis. duo pollen Mutants Reveal Gametophytic Regulators of Generative Cell Cycle Progression. Plant Physiol. *137*, 297–307.

Duvick, D.N. (2005). The Contribution of Breeding to Yield Advances in maize (Zea mays L.). In Advances in Agronomy, (Academic Press), pp. 83–145.

Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D., and Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. Biotechnol. Adv. *33*, 812–829.

Eady, C., Lindsey, K., and Twell, D. (1995). The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. Plant Cell *7*, 65–74.

East, E. M. (1908). Inbreeding in corn. Rep. Conn. Agric. Exp. Stn, 1907, 419-428.

Eder, J., and Chalyk, S. (2002). In vivo haploid induction in maize. Theor. Appl. Genet. *104*, 703–708.

Edlund, A.F., Swanson, R., and Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. Plant Cell *16 Suppl*, S84-97.

Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C., and Grossniklaus, U. (2007). The FERONIA Receptor-like Kinase Mediates Male-Female Interactions During Pollen Tube Reception. Science *317*, 656–660.

Evans, M.M.S. (2007). The indeterminate gametophyte1 Gene of Maize Encodes a LOB Domain Protein Required for Embryo Sac and Leaf Development. PLANT CELL ONLINE *19*, 46–62.

Evenson, R.E., and Gollin, D. (2003). Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. Science *300*, 758–762.

Fang, Y., and Spector, D.L. (2005). Centromere Positioning and Dynamics in Living Arabidopsis Plants. Mol. Biol. Cell *16*, 5710–5718.

Faure, J.-E., Digonnet, C., and Dumas, C. (1994). An in Vitro System for Adhesion and Fusion of Maize Gametes. Science *263*, 1598–1600.

Faure, J.-E., Rusche, M.L., Thomas, A., Keim, P., Dumas, C., Mogensen, H.L., Rougier, M., and Chaboud, A. (2003). Double fertilization in maize: the two male gametes from a pollen grain have the ability to fuse with egg cells. Plant J. *33*, 1051–1062.

Feng, X., and Dickinson, H.G. (2007). Packaging the male germline in plants. Trends Genet. TIG *23*, 503–510.

Feng, X., and Dickinson, H.G. (2010). Cell–cell interactions during patterning of the Arabidopsis anther. Biochem. Soc. Trans. *38*, 571–576.

Ferrie, A.M.R., and Caswell, K.L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC *104*, 301–309.

Finch, R.A. (1983). Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. Chromosoma *88*, 386–393.

Floros, J.D., Newsome, R., Fisher, W., Barbosa-Cánovas, G.V., Chen, H., Dunne, C.P., German, J.B., Hall, R.L., Heldman, D.R., Karwe, M.V., et al. (2010). Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. *9*, 572–599.

Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 25–37.

Fonseca, A.E., and Westgate, M.E. (2005). Relationship between desiccation and viability of maize pollen. Field Crops Res. *94*, 114–125.

Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., and Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. *12*, 368–375.

Fransz, P., Jong, J.H. de, Lysak, M., Castiglione, M.R., and Schubert, I. (2002). Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. Proc. Natl. Acad. Sci. *99*, 14584–14589.

Fu, Y. (2015). The cytoskeleton in the pollen tube. Curr. Opin. Plant Biol. *28*, 111–119.

Fujimoto, R., Uezono, K., Ishikura, S., Osabe, K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2018). Recent research on the mechanism of heterosis is important for crop and vegetable breeding systems. Breed. Sci. *68*, 145–158.

Furness, C.A., and Rudall, P.J. (2004). Pollen aperture evolution – a crucial factor for eudicot success? Trends Plant Sci. *9*, 154–158.

Gaillard, A., Vergne, P., and Beckert, M. (1991). Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. Plant Cell Rep. *10*, 55–58.

Gallagher, K., and Smith, L.G. (1997). Asymmetric cell division and cell fate in plants. Curr. Opin. Cell Biol. *9*, 842–848.

Gallais, A. (1988). Heterosis: its genetic basis and its utilisation in plant breeding. Euphytica *39*, 95–104.

Gallais, A., and Bannerot, H. (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection (Editions Quae).

Gambino, G., Perrone, I., and Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochem. Anal. *19*, 520–525.

Gao, S., Babu, R., Lu, Y., Martinez, C., Hao, Z., Krivanek, A.F., Wang, J., Rong, T., Crouch, J., and Xu, Y. (2011). Revisiting the Hetero-Fertilization Phenomenon in Maize. PLOS ONE *6*, e16101.

Gardiner, J., Andreeva, Z., Barton, D., Ritchie, A., Overall, R., and Marc, J. (2008). The phospholipase A2 inhibitor, aristolochic acid, disrupts cortical microtubule arrays and root growth in Arabidopsis. Plant Biol. *10*, 725–731.

Ge, L., Gou, X., Yuan, T., Strout, G.W., Nakashima, J., Blancaflor, E.B., Tian, H.Q., and Russell, S.D. (2011). Migration of sperm cells during pollen tube elongation in Arabidopsis thaliana: behavior during transport, maturation and upon dissociation of male germ unit associations. Planta *233*, 325–332.

Geiger, H.H., and Gordillo, G.A. (2009). DOUBLED HAPLOIDS IN HYBRID MAIZE BREEDING. Maydica 485–499.

Germanà, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC *104*, 283–300.

Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Brüß, C., Kumlehn, J., Matzk, F., and Houben, A. (2005). Uniparental Chromosome Elimination at Mitosis and Interphase in Wheat and Pearl Millet Crosses Involves Micronucleus Formation, Progressive Heterochromatinization, and DNA Fragmentation. Plant Cell *17*, 2431–2438.

Gernand, D., Rutten, T., Pickering, R., and Houben, A. (2006). Elimination of chromosomes in Hordeum vulgare x H. bulbosum crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. Cytogenet. Genome Res. *114*, 169–174.

Gilles, L.M., Khaled, A., Laffaire, J., Chaignon, S., Gendrot, G., Laplaige, J., Bergès, H., Beydon, G., Bayle, V., Barret, P., et al. (2017). Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. EMBO J. *36*, 707–717.

Gilles, L.M., Martinant, J.P., Rogowsky, P.M., Widiez, T. (2017b). Haploid induction in plants. Current Biology 27, R1089–R1107.

Golubovskaya, I.N. (2006). Alleles of afd1 dissect REC8 functions during meiotic prophase I. J. Cell Sci. *119*, 3306–3315.

González-Sánchez, M., González-González, E., Molina, F., Chiavarino, A.M., Rosato, M., and Puertas, M.J. (2003). One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. Heredity *90*, 122–129.

Graham, T.R., and Kozlov, M.M. (2010). Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 430–436.

Grant-Downton, R., Kourmpetli, S., Hafidh, S., Khatab, H., Le Trionnaire, G., Dickinson, H., and Twell, D. (2013). Artificial microRNAs reveal cell-specific differences in small RNA activity in pollen. Curr. Biol. CB *23*, R599-601.

Griggs, R., and Zheng, M.Y. (2016). Nuclear Fusion during Early Stage of Microspore Embryogenesis Indicates Chromosome Doubling in Wheat (Triticum aestivum). Am. J. Plant Sci. *07*, 489–499.

Grimanelli, D., Leblanc, O., Espinosa, E., Perotti, E., León, D.G.D., and Savidan, Y. (1998). Non-Mendelian transmission of apomixis in maize–*Tripsacum* hybrids caused by a transmission ratio distortion. Heredity *80*, 40–47.

Grimanelli, D., Leblanc, O., Perotti, E., and Grossniklaus, U. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. Trends Genet. TIG *17*, 597–604.

Grossniklaus, U. (2017). Polyspermy produces tri-parental seeds in maize. Curr. Biol. *27*, R1300–R1302.

Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y., and Yang, Z. (2003). ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. J. Exp. Bot. *54*, 93–101.

Guan, Y., Guo, J., Li, H., and Yang, Z. (2013). Signaling in Pollen Tube Growth: Crosstalk, Feedback, and Missing Links. Mol. Plant *6*, 1053–1064.

Guha, S., and Maheshwari, S.C. (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of Datura. Nature *204*, 497.

Gürel, S., Gürel, E., and Kaya, Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (Beta vulgaris L.). Plant Cell Rep. *19*, 1155–1159.

Gusti, A., Baumberger, N., Nowack, M., Pusch, S., Eisler, H., Potuschak, T., Veylder, L.D., Schnittger, A., and Genschik, P. (2009). The Arabidopsis thaliana F-Box Protein FBL17 Is Essential for Progression through the Second Mitosis during Pollen Development. PLOS ONE *4*, e4780.

Gutierrez, C. (2009). The Arabidopsis Cell Division Cycle. Arab. Book Am. Soc. Plant Biol. *7*.

Hafidh, S., Fíla, J., and Honys, D. (2016). Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. Plant Reprod. *29*, 31–51.

Hamamura, Y., Nagahara, S., and Higashiyama, T. (2012). Double fertilization on the move. Curr. Opin. Plant Biol. *15*, 70–77.

Hamant, O., Ma, H., and Cande, W.Z. (2006). Genetics of meiotic prophase I in plants. Annu Rev Plant Biol *57*, 267–302.

Han, F., Lamb, J.C., Yu, W., Gao, Z., and Birchler, J.A. (2007). Centromere Function and Nondisjunction Are Independent Components of the Maize B Chromosome Accumulation Mechanism. Plant Cell *19*, 524–533.

Hand, M.L., and Koltunow, A.M.G. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. Genetics *197*, 441–450.

Hand, M.L., de Vries, S., and Koltunow, A.M.G. (2016). A Comparison of In Vitro and In Vivo Asexual Embryogenesis. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1359*, 3–23.

Häntzschel, K.R., and Weber, G. (2010). Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. Protoplasma *241*, 99–104.

Harper, L., Golubovskaya, I., and Cande, W.Z. (2004). A bouquet of chromosomes. J. Cell Sci. *117*, 4025–4032.

Hatch, E.M. and Hetzer, M.W. (2015). Linking Micronuclei to Chromosome Fragmentation. Cell *161*, 1502–1504.

Hause, G., Hause, B., and Lammeren, A.A.M.V. (1992). Microtubular and actin filament configurations during microspore and pollen development in Brassica napus cv. Topas. Can. J. Bot. *70*, 1369–1376.

Heilmann, I., and Ischebeck, T. (2016). Male functions and malfunctions: the impact of phosphoinositides on pollen development and pollen tube growth. Plant Reprod. *29*, 3–20.

Hepler, P.K., and Winship, L.J. (2015). The pollen tube clear zone: Clues to the mechanism of polarized growth: Differential organelle movement creates a clear zone. J. Integr. Plant Biol. *57*, 79–92.

Hermsen, J.G.T., and Verdenius, J. (1973). Selection from Solanum tuberosum group phureja of genotypes combining high-frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot. Euphytica *22*, 244–259.

Heslop-Harrison, J., and Heslop-Harrison, Y. (1981). The Pollen-Stigma Interaction in the Grasses. 2. Pollen-Tube Penetration and the Stigma Response in Secale. Acta Bot. Neerlandica *30*, 289–307.

Heslop-Harrison, J., and Heslop-Harrison, Y. (1989). Conformation and movement of the vegetative nucleus of the angiosperm pollen tube: association with the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. *93*, 299–308.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, J.S., and Heslop-Harrison, Y. (1986). The Comportment of the Vegetative Nucleus and Generative Cell in the Pollen and Pollen Tubes of Helleborus foetidus L. Ann. Bot. *58*, 1–12.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Cresti, M., Tiezzi, A., and Moscatelli, A. (1988). Cytoskeletal Elements, Cell Shaping and Movement in the Angiosperm Pollen Tube. J. Cell Sci. *91*, 49–60.

Hesse, M., Pacini, E., and Willemse, M. (2012). The Tapetum: Cytology, Function, Biochemistry and Evolution (Springer Science & Business Media).

Ho, K.M., and Kasha, K.J. (1975). Genetic Control of Chromosome Elimination during Haploid Formation in Barley. Genetics *81*, 263–275.

Hochholdinger, F., Marcon, C., Baldauf, J.A., Yu, P., and Frey, F.P. (2018). Proteomics of Maize Root Development. Front. Plant Sci. *9*, 143.

Holk, A. (2002). Molecular Identification of Cytosolic, Patatin-Related Phospholipases A from Arabidopsis with Potential Functions in Plant Signal Transduction. PLANT Physiol. *130*, 90–101.

Holk, R.U.P. andré, and Scherer, G.F.E. (1998). Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A2 activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. Plant J. *16*, 601–611.

Holton, T., and Cornish, E. (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. Plant Cell *7*, 1071–1083.

Honys, D., and Twell, D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. Genome Biol. *5*, R85.

Honys, D., Renak, D., and Twell, D. (2006). Male gametophyte development and function. Floric. Ornam. Plant Biotechnol. Adv. Top. Issues *1*, 76–87.

Hu, G., Liang, G.H., and Wassom, C.E. (1991). Chemical induction of apomictic seed formation in maize. Euphytica *56*, 97–105.

Hu, H., Schrag, T.A., Peis, R., Unterseer, S., Schipprack, W., Chen, S., Lai, J., Yan, J., Prasanna, B.M., Nair, S.K., et al. (2016). The Genetic Basis of Haploid Induction in Maize Identified with a Novel Genome-Wide Association Method. Genetics *202*, 1267–1276.

Huang, B.-Q., and Sheridan, W.F. (1994). Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. Plant Cell *6*, 845–861.

Huang, B.Q., and Sheridan, W.F. (1996). Embryo Sac Development in the Maize indeterminate gametophyte1 Mutant: Abnormal Nuclear Behavior and Defective Microtubule Organization. Plant Cell *8*, 1391–1407.

Huck, N., Moore, J.M., Federer, M., and Grossniklaus, U. (2003). The Arabidopsis mutant feronia disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. Dev. Camb. Engl. *130*, 2149–2159.

Humphreys, M. (1978). Chromosome instability in Hordeum vulgare X H. bulbosum hybrids. Chromosoma *65*, 301–307.

Immonen, S., and Tenhola-Roininen, T. (2003). Protocol for rye anther culture. In Doubled Haploid Production in Crop Plants, (Springer, Dordrecht), pp. 141–149.

Inzé, D., and De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. Annu. Rev. Genet. *40*, 77–105.

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., and Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. Plant Cell *13*, 2191–2209.

Ishii, T., Ueda, T., Tanaka, H., and Tsujimoto, H. (2010). Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. *18*, 821–831.

Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., and Houben, A. (2016). Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. *67*, 421–438.

Iwakawa, H., Shinmyo, A., and Sekine, M. (2006). Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. Plant J. *45*, 819–831.

Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C., and Gaude, T. (2008). Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. Plant J. *53*, 237–247.

Jang, J.-H., Lee, C.S., Hwang, D., and Ryu, S.H. (2012). Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. Prog. Lipid Res. *51*, 71–81.

Javed, M.A., Samad, A.A., Hidayat, T., Wagiran, A., and Baqr, R.A.W. (2012). Studies to Investigate the Interactions of Genotypes, Culture Media and Culture Temperatures on Androgenesis in Recalcitrant Indica Rice (Oryza Sativa L.). J. Teknol. *59*.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. *6*, 3901–3907.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. *6*, 3901–3907.

Jensen, W.A., and Fisher, D.B. (1970). Cotton embryogenesis: The pollen tube in the stigma and style. Protoplasma *69*, 215–235.

Jiang, H., Yi, J., Boavida, L.C., Chen, Y., Becker, J.D., Köhler, C., and McCormick, S. (2015). Intercellular communication in Arabidopsis thaliana pollen discovered via AHG3 transcript movement from the vegetative cell to sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 13378–13383.

Juranic, M., Srilunchang, K. -o., Krohn, N.G., Leljak-Levanic, D., Sprunck, S., and Dresselhaus, T. (2012). Germline-Specific MATH-BTB Substrate Adaptor MAB1 Regulates Spindle Length and Nuclei Identity in Maize. Plant Cell *24*, 4974–4991.

Jürgens, G. (2005). Plant cytokinesis: fission by fusion. Trends Cell Biol. *15*, 277–283.

Kadam, D.C., Potts, S.M., Bohn, M.O., Lipka, A.E., and Lorenz, A.J. (2016). Genomic Prediction of Single Crosses in the Early Stages of a Maize Hybrid Breeding Pipeline. G3 Genes Genomes Genet. g3.116.031286.

Karimi-Ashtiyani, R., Ishii, T., Niessen, M., Stein, N., Heckmann, S., Gurushidze, M., Banaei-Moghaddam, A.M., Fuchs, J., Schubert, V., Koch, K., et al. (2015). Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. Proc. Natl. Acad. Sci. *112*, 11211–11216.

Kasahara, R.D., Maruyama, D., Hamamura, Y., Sakakibara, T., Twell, D., and Higashiyama, T. (2012). Fertilization recovery after defective sperm cell release in Arabidopsis. Curr. Biol. CB *22*, 1084–1089.

Kasahara, R.D., Notaguchi, M., Nagahara, S., Suzuki, T., Susaki, D., Honma, Y., Maruyama, D., and Higashiyama, T. (2016). Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. Sci. Adv. *2*, e1600554.

Kasha, K.J. (2005). Chromosome Doubling and Recovery of Doubled Haploid Plants. In Haploids in Crop Improvement II, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 123–152.

Kasha, K.J., and Kao, K.N. (1970). High Frequency Haploid Production in Barley (Hordeum vulgare L.). Nature *225*, 874–876.

Kato, A., and Geiger, H.H. (2002). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. Plant Breed. *121*, 370–377.

KAUL, V., THEUNIS, C.H., PALSER, B.F., KNOX, R.B., and WILLIAMS, E.G. (1987). Association of the Generative Cell and Vegetative Nucleus in Pollen Tubes of Rhododendron. Ann. Bot. *59*, 227–235.

Kawashima, T., and Berger, F. (2015). The central cell nuclear position at the micropylar end is maintained by the balance of F-actin dynamics, but dispensable for karyogamy in Arabidopsis. Plant Reprod. *28*, 103–110.

Kawashima, T., Maruyama, D., Shagirov, M., Li, J., Hamamura, Y., Yelagandula, R., Toyama, Y., and Berger, F. (2014). Dynamic F-actin movement is essential for fertilization in Arabidopsis thaliana. eLife *3*, e04501.

Kelliher, T., and Walbot, V. (2011). Emergence and patterning of the five cell types of the Zea mays anther locule. Dev. Biol. *350*, 32–49.

Kelliher, T., and Walbot, V. (2012). Hypoxia Triggers Meiotic Fate Acquisition in Maize. Science *337*, 345–348.

Kelliher, T., Egger, R.L., Zhang, H., and Walbot, V. (2014). Unresolved issues in pre-meiotic anther development. Front. Plant Sci. *5*.

Kelliher, T., Starr, D., Wang, W., McCuiston, J., Zhong, H., Nuccio, M.L., and Martin, B. (2016). Maternal Haploids Are Preferentially Induced by CENH3-tailswap Transgenic Complementation in Maize. Front. Plant Sci. *7*.

Kelliher, T., Starr, D., Richbourg, L., Chintamanani, S., Delzer, B., Nuccio, M.L., Green, J., Chen, Z., McCuiston, J., Wang, W., et al. (2017). MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. Nature *542*, 105–109.

Kermicle, J.L. (1969). Androgenesis conditioned by a mutation in maize. Science *166*, 1422–1424.

Kessler, S.A., and Grossniklaus, U. (2011). She's the boss: signaling in pollen tube reception. Curr. Opin. Plant Biol. *14*, 622–627.

Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N.F., Wuest, S.E., Ingram, G., Panstruga, R., and Grossniklaus, U. (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. Science *330*, 968–971.

Khush, G.S. (2001). Green revolution: the way forward. Nat. Rev. Genet. *2*, 815–822.

Kiesselbach, T.A. (1949). The Structure and Reproduction of Corn. Univ. Neb. Res. Bull. *161*.

Kim, H.J., Oh, S.A., Brownfield, L., Hong, S.H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D., and Nam, H.G. (2008). Control of plant germline proliferation by SCF^{FBL17} degradation of cell cycle inhibitors. Nature *455*, 1134–1137.

Kim, H.J., Ok, S.H., Bahn, S.C., Jang, J., Oh, S.A., Park, S.K., Twell, D., Ryu, S.B., and Shin, J.S. (2011). Endoplasmic Reticulum– and Golgi-Localized Phospholipase A_2 Plays Critical Roles in *Arabidopsis* Pollen Development and Germination. Plant Cell *23*, 94–110.

Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.-G., and Ryu, S.H. (1998). Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. FEBS Lett. *430*, 231–235.

Kindiger, B., and Hamann, S. (1993). Generation of Haploids in Maize: A Modification of the Indeterminate Gametophyte (ig) System. Crop Sci. *33*, 342–344.

Kitamura, S., Akutsu, M., and Okazaki, K. (2009). Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies. Sex. Plant Reprod. *22*, 9–14.

Kleiber, D., Prigge, V., Melchinger, A.E., Burkard, F., San Vicente, F., Palomino, G., and Gordillo, G.A. (2012). Haploid Fertility in Temperate and Tropical Maize Germplasm. Crop Sci. *52*, 623–630.

Kliwer, I., and Dresselhaus, T. (2010). Establishment of the male germline and sperm cell movement during pollen germination and tube growth in maize. Plant Signal. Behav. *5*, 885–889.

Komaki, S., and Sugimoto, K. (2012). Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. Plant Cell Physiol. *53*, 953–964.

Kooijman, E.E., Chupin, V., Kruijff, B. de, and Burger, K.N.J. (2003). Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. Traffic *4*, 162–174.

Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinforma. Oxf. Engl. *23*, 1289–1291.

Kost, B. (2008). Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. Trends Cell Biol. *18*, 119–127.

Kranz, E., Wiegen, P. von, and Lörz, H. (1995). Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes. Plant J. *8*, 9–23.

Kraptchev, B., Kruleva, M., and Dankov, T. (2003). Induced heterofertilization in maize (Zea mays L.). Maydica *48*, 271–274.

Krohn, N.G., Lausser, A., Juranić, M., and Dresselhaus, T. (2012). Egg Cell Signaling by the Secreted Peptide ZmEAL1 Controls Antipodal Cell Fate. Dev. Cell *23*, 219–225.

La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M., and Heitz, T. (2005). A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. Plant J. *44*, 810–825.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680–685.

Lafon-Placette, C., and Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. Curr. Opin. Plant Biol. *17*, 64–69.

Lalanne, E. (2002). Genetic Control of Male Germ Unit Organization in Arabidopsis. PLANT Physiol. *129*, 865–875.

Lam, W.S. (2005). Characterization of Arabidopsis thaliana SMC1 and SMC3: evidence that AtSMC3 may function beyond chromosome cohesion. J. Cell Sci. *118*, 3037–3048.

Lange, W., and Jochemsen, G. (1976). Karyotypes, nucleoli, and amphiplasty in hybrids between Hordeum vulgare L. and H. bulbosum L. Genetica *46*, 217–233.

Lantos, C., Bóna, L., Nagy, É., Békés, F., and Pauk, J. (2018). Induction of in vitro androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (Triticum spelta L.) genotypes. Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC *133*, 385–393.

Larièpe, A., Mangin, B., Jasson, S., Combes, V., Dumas, F., Jamin, P., Lariagon, C., Jolivot, D., Madur, D., Fiévet, J., et al. (2012). The Genetic Basis of Heterosis: Multiparental Quantitative Trait Loci Mapping Reveals Contrasted Levels of Apparent Overdominance Among Traits of Agronomical Interest in Maize (*Zea mays* L.). Genetics *190*, 795–811.

Larièpe, A., Moreau, L., Laborde, J., Bauland, C., Mezmouk, S., Décousset, L., Mary-Huard, T., Fiévet, J.B., Gallais, A., Dubreuil, P., et al. (2017). General and specific combining abilities in a maize (Zea mays L.) test-cross hybrid panel: relative importance of population structure and genetic divergence between parents. Theor. Appl. Genet. *130*, 403–417.

Lashermes, P., and Beckert, M. (1988). Genetic control of maternal haploidy in maize (Zea mays L.) and selection of haploid inducing lines. Theor. Appl. Genet. *76*, 405–410.

Laurie, D.A., and Bennett, M.D. (1986). Wheat × maize hybridization. Can. J. Genet. Cytol. *28*, 313–316.

Laurie, D.A., and Bennett, M.D. (1989). The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. Genome *32*, 953–961.

Lausser, A., Kliwer, I., Srilunchang, K., and Dresselhaus, T. (2010). Sporophytic control of pollen tube growth and guidance in maize. J. Exp. Bot. *61*, 673–682.

Lee, E.A., and Tracy, W.F. (2009). Modern Maize Breeding. In Handbook of Maize, (Springer, New York, NY), pp. 141–160.

Lee, Y.-R.J., and Liu, B. (2004). Cytoskeletal Motors in Arabidopsis. Sixty-One Kinesins and Seventeen Myosins. Plant Physiol. *136*, 3877–3883.

Lee, H.Y., Bahn, S.C., Kang, Y.-M., Lee, K.H., Kim, H.J., Noh, E.K., Palta, J.P., Shin, J.S., and Ryu, S.B. (2003). Secretory Low Molecular Weight Phospholipase A2 Plays Important Roles in Cell Elongation and Shoot Gravitropism in Arabidopsis. Plant Cell *15*, 1990–2002.

Lee, O.R., Kim, S.J., Kim, H.J., Hong, J.K., Ryu, S.B., Lee, S.H., Ganguly, A., and Cho, H.-T. (2010). Phospholipase A(2) is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the Arabidopsis root. Plant Cell *22*, 1812–1825.

Lee, Y.-R.J., Li, Y., and Liu, B. (2007). Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis. Plant Cell *19*, 2595–2605.

Lermontova, I., Koroleva, O., Rutten, T., Fuchs, J., Schubert, V., Moraes, I., Koszegi, D., and Schubert, I. (2011). Knockdown of CENH3 in Arabidopsis reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation: *Consequences of AtCENH3 depletion*. Plant J. *68*, 40–50.

Leshem, Y., Johnson, C., and Sundaresan, V. (2013). Pollen tube entry into the synergid cell of Arabidopsis is observed at a site distinct from the filiform apparatus. Plant Reprod. *26*, 93–99.

Levan, A. The Effect of Colchicine on Root Mitoses in Allium. Hereditas *24*, 471–486.

Li, Q., and Liu, B. (2017). Genetic regulation of maize flower development and sex determination. Planta *245*, 1–14.

Li, C., Yeh, F.-L., Cheung, A.Y., Duan, Q., Kita, D., Liu, M.-C., Maman, J., Luu, E.J., Wu, B.W., Gates, L., et al. (2015a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as chaperones and co-receptors for FERONIA receptor kinase signaling in Arabidopsis. eLife *4*.

Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X., and Yang, Z. (1999). Control of Pollen Tube Tip Growth by a Rop GTPase–Dependent Pathway That Leads to Tip-Localized Calcium Influx. Plant Cell *11*, 1731–1742.

Li, L., Xu, X., Jin, W., and Chen, S. (2009). Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. Planta *230*, 367–376.

Li, S., Sun, T., and Ren, H. (2015b). The functions of the cytoskeleton and associated proteins during mitosis and cytokinesis in plant cells. Front. Plant Sci. *6*.

Li, X., Meng, D., Chen, S., Luo, H., Zhang, Q., Jin, W., and Yan, J. (2017). Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction. Nat. Commun. *8*, 991.

Li, Y., Suen, D.F., Huang, C.-Y., Kung, S.-Y., and Huang, A.H.C. (2012). The maize tapetum employs diverse mechanisms to synthesize and store proteins and flavonoids and transfer them to the pollen surface. Plant Physiol. *158*, 1548–1561.

Lichter, R. (1982). Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of Brassica napus. Z. Für Pflanzenphysiol. *105*, 427–434.

Lindner, H., Kessler, S.A., Müller, L.M., Shimosato-Asano, H., Boisson-Dernier, A., and Grossniklaus, U. (2015). TURAN and EVAN mediate pollen tube reception in Arabidopsis Synergids through protein glycosylation. PLoS Biol. *13*, e1002139.

Liu, Z., and Song, T. (2000). Correlation analysis between induction of maize parthenogenesis haploid in vivo and intersperm nucleus distances in pollen tubes germinating in vitro of male parent. Acta Bot. Boreali-Occident. Sin. *20*, 495–502.

Liu, C., Li, W., Zhong, Y., Dong, X., Hu, H., Tian, X., Wang, L., Chen, B., Chen, C., Melchinger, A.E., et al. (2015). Fine mapping of qhir8 affecting in vivo haploid induction in maize. Theor. Appl. Genet. *128*, 2507–2515.

Liu, C., Chen, B., Ma, Y., Xu, X., Li, W., Dong, X., Tian, X., Chen, C., Zhong, Y., Chen, M., et al. (2017a). New insight into the mechanism of heterofertilization during maize haploid induction. Euphytica *213*.

Liu, C., Li, X., Meng, D., Zhong, Y., Chen, C., Dong, X., Xu, X., Chen, B., Li, W., Li, L., et al. (2017b). ERALY VIEW A 4bp insertion at ZmPLA1 encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. Mol. Plant *0*.

Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K., Shi, D., Aki, S., Zheng, N., et al. (2008). Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. Plant Cell *20*, 1538–1554.

Liu, Y., Yan, Z., Chen, N., Di, X., Huang, J., and Guo, G. (2010). Development and function of central cell in angiosperm female gametophyte. Genesis *48*, 466–478.

Liu, Z., Wang, Y., Ren, J., Mei, M., Frei, U.K., Trampe, B., and Lübberstedt, T. (2016). Maize Doubled Haploids. In Plant Breeding Reviews, Volume 40, (Wiley-Blackwell), pp. 123–166.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods *25*, 402–408.

Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J. (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell *93*, 1195–1205.

Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D.C., and Chen, Z.J. (2012). Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 5529–5534.

Lu, P., Chai, M., Yang, J., Ning, G., Wang, G., and Ma, H. (2014). The Arabidopsis CALLOSE DEFECTIVE MICROSPORE1 gene is required for male fertility through regulating callose metabolism during microsporogenesis. Plant Physiol. *164*, 1893–1904.

Lu, Y., Yan, J., Guimarães, C.T., Taba, S., Hao, Z., Gao, S., Chen, S., Li, J., Zhang, S., Vivek, B.S., et al. (2009). Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. Theor. Appl. Genet. *120*, 93–115.

Lysak, M.A., Fransz, P.F., Ali, H.B.M., and Schubert, I. (2001). Chromosome painting in Arabidopsis thaliana. Plant J. *28*, 689–697.

M. Fan, X., M. Zhang, Y., H. Yao, W., M. Chen, H., Tan, J., X. Xu, C., L. Han, X., M. Luo, L., and Kang, M. (2009). Classifying Maize Inbred Lines into Heterotic Groups using a Factorial Mating Design. Agron. J. - AGRON J *101*.

Ma, H., and Sundaresan, V. (2010). Development of Flowering Plant Gametophytes. In Current Topics in Developmental Biology, (Elsevier), pp. 379–412.

Ma, H., Li, G., Würschum, T., Zhang, Y., Zheng, D., Yang, X., Li, J., Liu, W., Yan, J., and Chen, S. (2018). Genome-Wide Association Study of Haploid Male Fertility in Maize (Zea Mays L.). Front. Plant Sci. *9*.

Mahendru, A., and Sarkar, K.R. (2000). Cytological analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize (Zea mays L.). Indian J. Genet. Amp Plant Breed. *60*, 37–43.

Maheshwari, S., Tan, E.H., West, A., Franklin, F.C.H., Comai, L., and Chan, S.W. (2015). Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids. PLoS Genet. *11*, e1004970.

Maheshwari, S.C., Tyagi, A.K., Malhotra, K., and Sopory, S.K. (1980). Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms - the current status. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. *58*, 193–206.

Mainiero, S., and Pawlowski, W.P. (2014). Meiotic Chromosome Structure and Function in Plants. Cytogenet. Genome Res. *143*, 6–17.

Maraschin, S.F., de Priester, W., Spaink, H.P., and Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. J. Exp. Bot. *56*, 1711–1726.

Marowa, P., Ding, A., and Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. Plant Cell Rep. *35*, 949–965.

Martinant, J.-P., Comadran, J., Laffaire, J.-B., Rogowsky, P., and Widiez, T. (2016). Polynucleotide Responsible of Haploid Induction in Maize Plants and Related Processes.

Martínez, G., Panda, K., Köhler, C., and Slotkin, R.K. (2016). Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. Nat. Plants *2*, 16030.

Martinez, G., Wolff, P., Wang, Z., Moreno-Romero, J., Santos-González, J., Conze, L.L., DeFraia, C., Slotkin, R.K., and Köhler, C. (2018). Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in Arabidopsis. Nat. Genet. 1.

Márton, M.L., Cordts, S., Broadhvest, J., and Dresselhaus, T. (2005). Micropylar Pollen Tube Guidance by Egg Apparatus 1 of Maize. Science *307*, 573–576.

Maruyama, D., Hamamura, Y., Takeuchi, H., Susaki, D., Nishimaki, M., Kurihara, D., Kasahara, R.D., and Higashiyama, T. (2013). Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes. Dev. Cell *25*, 317–323.

Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., and Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. Curr. Opin. Plant Biol. *39*, 8–17.

Mathur, D.S., Aman, M.A., and Sarkar, K.R. (1980). Induction of maternal haploids in maize through heat treatment of pollen. Curr. Sci. *49*, 744–746.

Matos, A.R., d'Arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J.-C., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A.T. (2001). A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. FEBS Lett. *491*, 188–192.

Matthys-Rochon, E., Vergne, P., Detchepare, S., and Dumas, C. (1987). Male Germ Unit Isolation from Three Tricellular Pollen Species: Brassica oleracea, Zea mays, and Triticum aestivum1. Plant Physiol. *83*, 464–466.

McConchie, C.A., Jobson, S., and Knox, R.B. (1985). Computer-assisted reconstruction of the male germ unit in pollen of Brassica campestris. Protoplasma *127*, 57–63.

McConchie, C.A., Hough, T., and Knox, R.B. (1987). Ultrastructural analysis of the sperm cells of mature pollen of maize, Zea mays. Protoplasma *139*, 9–19.

McCormick, S. (2004). Control of Male Gametophyte Development. Plant Cell *16*, S142–S153.

McCue, A.D., Cresti, M., Feijo, J.A., and Slotkin, R.K. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. J. Exp. Bot. *62*, 1621–1631.

McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling.

Melchinger, A.E., Schipprack, W., Würschum, T., Chen, S., and Technow, F. (2013). Rapid and accurate identification of in vivo-induced haploid seeds based on oil content in maize. Sci. Rep. *3*.

Melchinger, A.E., Schipprack, W., Mi, X., and Mirdita, V. (2015). Oil Content is Superior to Oil Mass for Identification of Haploid Seeds in Maize Produced with High-Oil Inducers. Crop Sci. *55*, 188–195.

Melchinger, A.E., Molenaar, W.S., Mirdita, V., and Schipprack, W. (2016a). Colchicine Alternatives for Chromosome Doubling in Maize Haploids for Doubled-Haploid Production. Crop Sci. *56*, 559–569.

Melchinger, A.E., Brauner, P.C., Böhm, J., and Schipprack, W. (2016b). In Vivo Haploid Induction in Maize: Comparison of Different Testing Regimes for Measuring Haploid Induction Rates. Crop Sci. *56*, 1127–1135.

Melero, A., Chiaruttini, N., Karashima, T., Riezman, I., Funato, K., Barlowe, C., Riezman, H., and Roux, A. (2018). Lysophospholipids Facilitate COPII Vesicle Formation. Curr. Biol. CB *28*, 1950–1958.e6.

Mercier, R., and Grelon, M. (2008). Meiosis in plants: ten years of gene discovery. Cytogenet. Genome Res. *120*, 281–290.

Mercier, R., Mézard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N., and Grelon, M. (2015). The Molecular Biology of Meiosis in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. *66*, 297–327.

Mersereau, M., Pazour, G.J., and Das, A. (1990). Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation. Gene *90*, 149–151.

Messias, R. da S., Galli, V., Buss, J.H., Borowski, J.M., Nora, L., e Silva, S.D. dos A., Margis, R., and Rombaldi, C.V. (2014). ISOLATION OF HIGH-QUALITY RNA FROM GRAINS OF DIFFERENT MAIZE VARIETIES. Prep. Biochem. Biotechnol. *44*, 697–707.

Mignery, G.A., Pikaard, C.S., and Park, W.D. (1988). Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. Gene *62*, 27–44.

Miller, D.D., Scordilis, S.P., and Hepler, P.K. (1995). Identification and localization of three classes of myosins in pollen tubes of Lilium longiflorum and Nicotiana alata. J. Cell Sci. *108 (Pt 7)*, 2549–2563.

Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., and Hasebe, M. (2009). ANXUR1 and 2, Sister Genes to FERONIA/SIRENE, Are Male Factors for Coordinated Fertilization. Curr. Biol. *19*, 1327–1331.

Mochida, K., Tsujimoto, H., and Sasakuma, T. (2004). Confocal analysis of chromosome behavior in wheat x maize zygotes. Genome *47*, 199–205.

Mogensen, H.L. (1992). The Male Germ Unit: Concept, Composition, and Significance. In International Review of Cytology, S.D.R. and C. Dumas, ed. (Academic Press), pp. 129–147.

Molenaar, W.S., Schipprack, W., and Melchinger, A.E. (2018). Nitrous Oxide-Induced Chromosome Doubling of Maize Haploids. Crop Sci. *58*, 650.

Moon, J., Skibbe, D., Timofejeva, L., Wang, C.-J.R., Kelliher, T., Kremling, K., Walbot, V., and Cande, W.Z. (2013). Regulation of cell divisions and differentiation by MALE STERILITY32 is required for anther development in maize. Plant J. Cell Mol. Biol. *76*, 592–602.

Morgan, D.T. (1976). Monoploids in Zea mays L. following crosses with untreated and X-rayed pollen. Genetica *46*, 133–138.

Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., and Kuroiwa, T. (2006). GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. Nat. Cell Biol. *8*, 64–71.

Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S., and Berger, F. (2014). Gamete Attachment Requires GEX2 for Successful Fertilization in Arabidopsis. Curr. Biol. *24*, 170–175.

Musial, K., Bohanec, B., Jakše, M., and Przywara, L. (2005). The development of onion (Allium cepa L.) Embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant *41*, 446–452.

Nair, S.K., Molenaar, W., Melchinger, A.E., Boddupalli, P.M., Martinez, L., Lopez, L.A., and Chaikam, V. (2017). Dissection of a major QTL qhir1 conferring maternal haploid induction ability in maize. Theor. Appl. Genet. *130*, 1113–1122.

Nanda, D.K., and Chase, S.S. (1966). An Embryo Marker for Detecting Monoploids Of Maize (Zea Mays L.). Crop Sci. *6*, 213–215.

Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J., and Ryan, C.A. (1999). Positional Specificity of a Phospholipase A Activity Induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors in Tomato Leaves. Plant Cell *11*, 2249–2260.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF SMC AND KLEISIN COMPLEXES. Annu. Rev. Biochem. *74*, 595–648.

Nemenoff, R.A., Winitz, S., Qian, N.X., Putten, V.V., Johnson, G.L., and Heasley, L.E. (1993). Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. J. Biol. Chem. *268*, 1960–1964.

Nick, P. (2013). Microtubules, signalling and abiotic stress. Plant J. *75*, 309–323.

Ning, J., Otto, T.D., Pfander, C., Schwach, F., Brochet, M., Bushell, E., Goulding, D., Sanders, M., Lefebvre, P.A., Pei, J., et al. (2013). Comparative genomics in Chlamydomonas and Plasmodium identifies an ancient nuclear envelope protein family essential for sexual reproduction in protists, fungi, plants, and vertebrates. Genes Dev. *27*, 1198–1215.

Nowack, M.K., Grini, P.E., Jakoby, M.J., Lafos, M., Koncz, C., and Schnittger, A. (2006). A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. Nat. Genet. *38*, 63–67.

Oh, S.A., Johnson, A., Smertenko, A., Rahman, D., Park, S.K., Hussey, P.J., and Twell, D. (2005). A divergent cellular role for the FUSED kinase family in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. Curr. Biol. CB *15*, 2107–2111.

Oh, S.-A., Bourdon, V., Das 'Pal, M., Dickinson, H., and Twell, D. (2008). Arabidopsis kinesins HINKEL and TETRASPORE act redundantly to control cell plate expansion during cytokinesis in the male gametophyte. Mol. Plant *1*, 794–799.

Oh, S.A., Pal, M.D., Park, S.K., Johnson, J.A., and Twell, D. (2010). The tobacco MAP215/Dis1-family protein TMBP200 is required for the functional organization of microtubule arrays during male germline establishment. J. Exp. Bot. *61*, 969–981.

Oh, S.-A., Jeon, J., Park, H.-J., Grini, P.E., Twell, D., and Park, S.K. (2016). Analysis of gemini pollen 3 mutant suggests a broad function of AUGMIN in microtubule organization during sexual reproduction in Arabidopsis. Plant J. *87*, 188–201.

Onn, I., Heidinger-Pauli, J.M., Guacci, V., Ünal, E., and Koshland, D.E. (2008). Sister Chromatid Cohesion: A Simple Concept with a Complex Reality. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *24*, 105–129.

Owen, H.A., and Makaroff, C.A. (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). Protoplasma *185*, 7–21.

Palevitz, B.A., and Cresti, M. (1989). Cytoskeletal changes during generative cell division and sperm formation in Tradescantia virginiana. Protoplasma *150*, 54–71.

Palmgren, M.G., Sommarin, M., Ulvlskov, P., and Jørgensen, P.L. (1988). Modulation of plasma membrane H+-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A2. Physiol. Plant. *74*, 11–19.

Park, S.K., Howden, R., and Twell, D. (1998). The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. Dev. Camb. Engl. *125*, 3789–3799.

Pastuglia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J.-L., Schmit, A.-C., Guerche, P., and Bouchez, D. (2006). Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in Arabidopsis. Plant Cell *18*, 1412–1425.

Pauls, K.P., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D., and Brazolot, J. (2006). When microspores decide to become embryos — cellular and molecular changesThis review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Plant Cell Biology. Can. J. Bot. *84*, 668–678.

Pawlowski, W.P. (2010). Chromosome organization and dynamics in plants. Curr. Opin. Plant Biol. *13*, 640–645.

Petolino, J.F., and Thompson, S.A. (1987). Genetic analysis of anther culture response in maize. Theor. Appl. Genet. *74*, 284–286.

Pickering, R.A. (1985). Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of Hordeum vulgare L. x H. bulbosum L. Euphytica *34*, 869–874.

Pickett-Heaps, J.D., and Northcote, D.H. (1966). Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. J. Cell Sci. *1*, 109–120.

Potocký, M., Eliáš, M., Profotová, B., Novotná, Z., Valentová, O., and Žárský, V. (2003). Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. Planta *217*, 122–130.

Prasanna, B.M., Chaikam, V., and Mahuku, G. (2012). Doubled haploid technology in maize breeding : theory and practice (CIMMYT).

Prem, D., Solís, M.-T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in Brassica napus. BMC Plant Biol. *12*, 127.

Preuss, D., Rhee, S.Y., and Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. Science *264*, 1458–1460.

Prigge, V., Sánchez, C., Dhillon, B.S., Schipprack, W., Araus, J.L., Bänziger, M., and Melchinger, A.E. (2011). Doubled Haploids in Tropical Maize: I. Effects of Inducers and Source Germplasm on in vivo Haploid Induction Rates. Crop Sci. *51*, 1498.

Prigge, V., Xu, X., Li, L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G.N., and Melchinger, A.E. (2012). New Insights into the Genetics of *in Vivo* Induction of Maternal Haploids, the Backbone of Doubled Haploid Technology in Maize. Genetics *190*, 781–793.

Purugganan, M.D., and Fuller, D.Q. (2009). The nature of selection during plant domestication.

Qiu, F., Liang, Y., Li, Y., Liu, Y., Wang, L., and Zheng, Y. (2014). Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination in vivo upon haploid induction in maize. Curr. Plant Biol. *1*, 83–90.

Rademacher, S., and Sprunck, S. (2013). Downregulation of egg cell-secreted EC1 is accompanied with delayed gamete fusion and polytubey. Plant Signal. Behav. *8*, e27377.

Randolph, L.F. (1932). Some Effects of High Temperature on Polyploidy and Other Variations in Maize. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *18*, 222–229.

Randolph, L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. J. Agric. Res. *53*, 882–916.

Rao, N.G.P. (2004). Plant Breeding Science and Practice in the Twentieth Century: Some Landmarks. In Plant Breeding, (Springer, Dordrecht), pp. 49–64.

Rasmussen, C.G., and Bellinger, M. (2018). An overview of plant division-plane orientation. New Phytol. *219*, 505–512.

Ravi, M., and Chan, S.W.L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. Nature *464*, 615–618.

Ravi, M., Marimuthu, M.P.A., Tan, E.H., Maheshwari, S., Henry, I.M., Marin-Rodriguez, B., Urtecho, G., Tan, J., Thornhill, K., Zhu, F., et al. (2014). A haploid genetics toolbox for Arabidopsis thaliana. Nat. Commun. *5*, 5334.

Reina-Pinto, J.J., Voisin, D., Kurdyukov, S., Faust, A., Haslam, R.P., Michaelson, L.V., Efremova, N., Franke, B., Schreiber, L., Napier, J.A., et al. (2009). Misexpression of FATTY ACID ELONGATION1 in the Arabidopsis Epidermis Induces Cell Death and Suggests a Critical Role for Phospholipase A2 in This Process. Plant Cell *21*, 1252–1272.

Reiser, L., and Fischer, R. (1993). The Ovule and the Embryo Sac. Plant Cell *5*, 1291–1301.

Ren, J., Wu, P., Trampe, B., Tian, X., Lübberstedt, T., and Chen, S. (2017a). Novel technologies in doubled haploid line development. Plant Biotechnol. J. *15*, 1361–1370.

Ren, J., Wu, P., Tian, X., Lübberstedt, T., and Chen, S. (2017b). QTL mapping for haploid male fertility by a segregation distortion method and fine mapping of a key QTL qhmf4 in maize. Theor. Appl. Genet. *130*, 1349–1359.

Rhoades, M.M. (1950). Meiosis in maize. J. Hered. *41*, 59–67.

Rietz, S., Dermendjiev, G., Oppermann, E., Tafesse, F.G., Effendi, Y., Holk, A., Parker, J.E., Teige, M., and Scherer, G.F.E. (2010). Roles of Arabidopsis Patatin-Related Phospholipases A in Root Development Are Related to Auxin Responses and Phosphate Deficiency. Mol. Plant *3*, 524–538.

Rines, H.W. (2003). Oat haploids from wide hybridization. In Doubled Haploid Production in Crop Plants, (Springer, Dordrecht), pp. 155–159.

Rodkiewicz, B. (1970). Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. Planta *93*, 39–47.

Rodríguez-Sanz, H., Solís, M.-T., López, M.-F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2015). Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in Brassica napus. Plant Cell Physiol. *56*, 1401–1417.

Ronceret, A., and Vielle-Calzada, J.-P. (2015). Meiosis, unreduced gametes, and parthenogenesis: implications for engineering clonal seed formation in crops. Plant Reprod. *28*, 91–102.

Ronceret, A., Sheehan, M.J., and Pawlowski, W.P. (2007). Chromosome Dynamics in Meiosis. In Cell Division Control in Plants, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 103–124.

Rotarenco, V., Dicu, G., State, D., and Fuia, S. (2010). New inducers of maternal haploids in maize (PHI). Maize Genet. Coop. Newsl.

Rotman, N., Rozier, F., Boavida, L., Dumas, C., Berger, F., and Faure, J.-E. (2003). Female control of male gamete delivery during fertilization in Arabidopsis thaliana. Curr. Biol. CB *13*, 432–436.

Rotman, N., Durbarry, A., Wardle, A., Yang, W.C., Chaboud, A., Faure, J.-E., Berger, F., and Twell, D. (2005). A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. Curr. Biol. *15*, 244–248.

Rubinstein, A.L., Marquez, J., Suarez-Cervera, M., and Bedinger, P.A. (1995). Extensin-like Glycoproteins in the Maize Pollen Tube Wall. Plant Cell *7*, 2211–2225.

Rusche, M.L., Mogensen, H.L., Shi, L., Keim, P., Rougier, M., Chaboud, A., and Dumas, C. (1997). B Chromosome Behavior in Maize Pollen as Determined by a Molecular Probe. Genetics *147*, 1915–1921.

Russell, S.D. (1984). Ultrastructure of the sperm of Plumbago zeylanica: II. Quantitative cytology and three-dimensional organization. Planta *162*, 385–391.

Russell, S.D., and Cass, D.D. (1981). Ultrastructure of the sperms of Plumbago zeylanica. Protoplasma *107*, 85–107.

Russell, S.D., and Jones, D.S. (2015). The male germline of angiosperms: repertoire of an inconspicuous but important cell lineage. Front. Plant Sci. *6*.

Russell, S.D., Strout, G.W., Stramski, A.K., Mislan, T.W., Thompson, R.A., and Schoemann, L.M. (1996). Microgametogenesis in Plumbago zeylanica (Plumbaginaceae). 1. Descriptive Cytology and Three-Dimensional Organization. Am. J. Bot. *83*, 1435–1453.

Ryu, S.B. (2004). Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. Trends Plant Sci. *9*, 229–235.

Sailer, C., Schmid, B., and Grossniklaus, U. (2016). Apomixis Allows the Transgenerational Fixation of Phenotypes in Hybrid Plants. Curr. Biol. CB *26*, 331–337.

Sandaklie-Nikolova, L., Palanivelu, R., King, E.J., Copenhaver, G.P., and Drews, G.N. (2007). Synergid Cell Death in Arabidopsis Is Triggered following Direct Interaction with the Pollen Tube. Plant Physiol. *144*, 1753–1762.

Sanei, M., Pickering, R., Kumke, K., Nasuda, S., and Houben, A. (2011). Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, E498–E505.

Sangoi, L. (2001). Understanding plant density effects on maize growth and development : an important issue to maximize grain yield. Ciênc. Rural *31*, 159–168.

San Noeum, L. H. (1976). Haploides d, Hordeum vulgare L. par culture in vitro non fecondes. Ann. Amelior Plantes, 26, 751-754.

Sari-Gorla, M., Gatti, E., Villa, M., and Pè, M.E. (1997). A multi-nucleate male-sterile mutant of maize with gametophytic expression. Sex. Plant Reprod. *10*, 22–26.

Sato, H., Shibata, F., and Murata, M. (2005). Characterization of a Mis12 homologue in Arabidopsis thaliana. Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. *13*, 827–834.

Schaart, J.G., van de Wiel, C.C.M., Lotz, L.A.P., and Smulders, M.J.M. (2016). Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. Trends Plant Sci. *21*, 438–449.

Scherer, G.F.E. (2002). Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction. Plant Mol. Biol. *49*, 357–372.

Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., and Heitz, T. (2010). Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. Trends Plant Sci. *15*, 693–700.

Schnedl, W., Mikelsaar, A.-V., Breitenbach, M., and Dann, O. (1977). DIPI and DAPI: Fluorescence banding with only negligible fading. Hum. Genet. *36*, 167–172.

Schneerman, M.C., Charbonneau, M., and Weber, D.F. (2000). A survey of ig containing materials. Maize Genet. Coop. Newsl. 54–55.

Schubert, V. (2009). SMC Proteins and Their Multiple Functions in Higher Plants. Cytogenet. Genome Res. *124*, 202–214.

Schwarzacher-Robinson, T., Finch, R.A., Smith, J.B., and Bennett, M.D. (1987). Genotypic control of centromere positions of parental genomes in Hordeum × Secale hybrid metaphases. J. Cell Sci. *87*, 291–304.

Scott, R.J., Spielman, M., and Dickinson, H.G. (2004). Stamen structure and function. Plant Cell *16*, S46–S60.

Seguí-Simarro, J.M., and Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. Physiol. Plant. *134*, 1–12.

Sekhon, R.S., Lin, H., Childs, K.L., Hansey, C.N., Buell, C.R., de Leon, N., and Kaeppler, S.M. (2011). Genome-wide atlas of transcription during maize development. Plant J. *66*, 553–563.

Seo, J., Lee, H.Y., Choi, H., Choi, Y., Lee, Y., Kim, Y.-W., Ryu, S.B., and Lee, Y. (2008). Phospholipase A2beta mediates light-induced stomatal opening in Arabidopsis. J. Exp. Bot. *59*, 3587–3594.

Sharma, V.P., and Wardhan, H. (2017). Overview of Maize Economy: Production, Procurement, and Marketed Surplus. In Marketed and Marketable Surplus of Major Food Grains in India, (Springer, New Delhi), pp. 77–100.

Sheridan, W.F., Avalkina, N.A., Shamrov, I.I., Batyea, T.B., and Golubovskaya, I.N. (1996). The mac1 Gene: Controlling the Commitment to the Meiotic Pathway in Maize. Genetics *142*, 1009–1020.

Sheridan, W.F., Golubeva, E.A., Abrhamova, L.I., and Golubovskaya, I.N. (1999). The mac1 mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther. Genetics *153*, 933–941.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. *13*, 1501–1512.

Shi, L., Mogensen, H.L., Zhu, T., and Smith, S.E. (2005). Dynamics of nuclear pore density and distribution patterns within developing pollen : implications for a functional relationship between the vegetative nucleus and the generative cell.

Shim, Y.S., Kasha, K.J., Simion, E., and Letarte, J. (2006). The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. Protoplasma *228*, 79–86.

Shull, G.H. (1908). The Composition of a Field of Maize. J. Hered. *os-4*, 296–301.

Shull, G.H. (1914). Duplicate genes for capsule-form in Bursa bursa-pastoris. Z. Für Indukt. Abstamm.-Vererbungslehre *12*, 97–149.

Shull, G.H. (1948). What is“ heterosis”? Genetics *33*, 439.

Sibi, M.L., Kobaissi, A., and Shekafandeh, A. (2001). Green haploid plants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat (Triticum durum Defs.). Euphytica *122*, 351–359.

Simon, M.L.A., Platre, M.P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T., and Jaillais, Y. (2014). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis. Plant J. Cell Mol. Biol. *77*, 322–337.

Simon, M.L.A., Platre, M.P., Marquès-Bueno, M.M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M.-C., and Jaillais, Y. (2016). A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. Nat. Plants *2*, 16089.

Six, D.A., and Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1488*, 1–19.

Skinner, D.J., and Sundaresan, V. (2018). Recent advances in understanding female gametophyte development. F1000Research *7*.

Skinner, D.J., Hill, T.A., and Gasser, C.S. (2004). Regulation of Ovule Development. Plant Cell *16*, S32–S45.

Slotkin, R.K., Vaughn, M., Tanurdžic, M., Borges, F., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Martienssen, R.A. (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. Cell *136*, 461–472.

Smertenko, A., Dráber, P., Viklický, V., and Opatrný, Z. (1997). Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in Nicotiana tabacum cells. Plant Cell Environ. *20*, 1534–1542.

Snape, J.W., Parker, B.B., Simpson, E., Ainsworth, C.C., Payne, P.I., and Law, C.N. (1983). The use of irradiated pollen for differential gene transfer in wheat (Triticum aestivum). Theor. Appl. Genet. *65*, 103–111.

Souza Jr, C.L. de (2011). Cultivar development of allogamous crops. Crop Breed. Appl. Biotechnol. *11*, 8–15.

Sprague, G.F., and Tatum, L.A. (1942). General vs. Specific Combining Ability in Single Crosses of Corn 1. Agron. J. *34*, 923–932.

Sprunck, S., and Groß-Hardt, R. (2011). Nuclear behavior, cell polarity, and cell specification in the female gametophyte. Sex. Plant Reprod. *24*, 123–136.

Sprunck, S., Rademacher, S., Vogler, F., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., and Dresselhaus, T. (2012). Egg Cell–Secreted EC1 Triggers Sperm Cell Activation During Double Fertilization. Science *338*, 1093–1097.

Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, E.D.J., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Angenent, G., Scorza, R., Custers, J.B.M., et al. (2007). Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (Nicotiana tabacum L.). Planta *225*, 341–351.

Stark, E.A., Connerton, I., Bennett, S.T., Barnes, S.R., Parker, J.S., and Forster, J.W. (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. Chromosome Res. *4*, 15–23.

Steinhorst, L., and Kudla, J. (2013). Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1833*, 1573–1581.

Stieglitz, H. (1977). Role of beta-1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. Dev. Biol. *57*, 87–97.

Stitzer, M.C., and Ross-Ibarra, J. (2018). Maize domestication and gene interaction. New Phytol.

Sturaro, M., Hartings, H., Schmelzer, E., Velasco, R., Salamini, F., and Motto, M. (2005). Cloning and characterization of GLOSSY1, a maize gene involved in cuticle membrane and wax production. Plant Physiol. *138*, 478–489.

Subach, F.V., Patterson, G.H., Manley, S., Gillette, J.M., Lippincott-Schwartz, J., and Verkhusha, V.V. (2009). Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. Nat. Methods *6*, 153–159.

Subrahmanyam, N.C., and Kasha, K.J. (1973). Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. Chromosoma *42*, 111–125.

Suen, D.F., Wu, S.S.H., Chang, H.C., Dhugga, K.S., and Huang, A.H.C. (2003). Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. J. Biol. Chem. *278*, 43672–43681.

Swapna, M., and Sarkar, K.R. (2012). Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize (Zea mays L). Maydica *56*.

Sylvester, A.W., Cande, W.Z., and Freeling, M. (1990). Division and differentiation during normal and liguleless-1 maize leaf development. Development *110*, 985–1000.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. Cell *33*, 25–35.

Tan, E.H., Henry, I.M., Ravi, M., Bradnam, K.R., Mandakova, T., Marimuthu, M.P., Korf, I., Lysak, M.A., Comai, L., and Chan, S.W. (2015). Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. eLife *4*.

Tanaka, I., and Ito, M. (1980). Induction of typical cell division in isolated microspores of Lilium longiflorum and Tulipa gesneriana. Plant Sci. Lett. *17*, 279–285.

Tanaka, I., and Ito, M. (1981). Control of division patterns in explanted microspores of Tulipa gesneriana. Protoplasma *108*, 329–340.

Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C., and Machida, Y. (2004). The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. *9*, 1199–1211.

Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. Nat. Cell Biol. *2*, 492–499.

Tekleyohans, D.G., Nakel, T., and Groß-Hardt, R. (2017). Patterning the Female Gametophyte of Flowering Plants. Plant Physiol. *173*, 122–129.

Terasaka, O., and Niitsu, T. (1987). Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. Bot. Mag. Shokubutsu-Gaku-Zasshi *100*, 205–216.

Testillano, P., Georgiev, S., Mogensen, H.L., Coronado, M.J., Dumas, C., Risueno, M.C., and Matthys-Rochon, E. (2004). Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during in vitro maize induced microspore embryogenesis. Chromosoma *112*, 342–349.

Thomas, H.M., and Pickering, R.A. (1983). Chromosome elimination in Hordeum vulgare x H. bulbosum hybrids. Theor. Appl. Genet. *66*, 141–146.

Tian, H.Q., Zhang, Z., and Russell, S.D. (1998). Isolation of the male germ unit: organization and function in tobacco (Nicotiana tabacum L.). Plant Cell Rep. *18*, 143–147.

Tian, X., Qin, Y., Chen, B., Liu, C., Wang, L., Li, X., Dong, X., Liu, L., and Chen, S. (2018). Hetero-fertilization together with failed egg–sperm cell fusion supports single fertilization involved in in vivo haploid induction in maize. J. Exp. Bot.

Tiang, C.-L., He, Y., and Pawlowski, W.P. (2012). Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis, and Meiosis in Plants. Plant Physiol. *158*, 26–34.

Tilman, D. (1998). The greening of the green revolution. Nature *396*, 211–212.

Timofejeva, L., Skibbe, D.S., Lee, S., Golubovskaya, I., Wang, R., Harper, L., Walbot, V., and Cande, W.Z. (2013). Cytological characterization and allelism testing of anther developmental mutants identified in a screen of maize male sterile lines. G3 Bethesda Md *3*, 231–249.

Topp, C.N., Okagaki, R.J., Melo, J.R., Kynast, R.G., Phillips, R.L., and Dawe, R.K. (2009). Identification of a Maize Neocentromere in an Oat-Maize Addition Line. Cytogenet. Genome Res. *124*, 228–238.

Tsukamoto, T., Qin, Y., Huang, Y., Dunatunga, D., and Palanivelu, R. (2010). A role for LORELEI, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in Arabidopsis thaliana double fertilization and early seed development. Plant J. *62*, 571–588.

Twell, D. (1995). Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: Vegetative cell ablation blocks generative cell migration. Protoplasma *187*, 144–154.

Twell, D. (2011). Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. Sex. Plant Reprod. *24*, 149–160.

Twell, D., Park, S.K., and Lalanne, E. (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. Trends Plant Sci. *3*, 305–310.

Twell, D., Park, S.K., Hawkins, T.J., Schubert, D., Schmidt, R., Smertenko, A., and Hussey, P.J. (2002). MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. Nat. Cell Biol. *4*, 711–714.

Uebler, S., Márton, M.L., and Dresselhaus, T. (2015). Classification of EA1-box proteins and new insights into their role during reproduction in grasses. Plant Reprod. *28*, 183–197.

Utani, K., Okamoto, A., and Shimizu, N. (2011). Generation of Micronuclei during Interphase by Coupling between Cytoplasmic Membrane Blebbing and Nuclear Budding. PLOS ONE *6*, e27233.

Uváčková, Ľ., Takáč, T., Boehm, N., Obert, B., and Šamaj, J. (2012). Proteomic and biochemical analysis of maize anthers after cold pretreatment and induction of androgenesis reveals an important role of anti-oxidative enzymes. J. Proteomics *75*, 1886–1894.

Valdivia, E.R., Stephenson, A.G., Durachko, D.M., and Cosgrove, D. (2009). Class B beta-expansins are needed for pollen separation and stigma penetration. Sex. Plant Reprod. *22*, 141–152.

Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neirynck, S., Buffel, Y., et al. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana. Mol. Syst. Biol. *6*, 397.

Vanous, K., Vanous, A., Frei, U., and Lubberstedt, T. (2017). Generation of Maize (Zea mays) Doubled Haploids via Traditional Methods. Curr. Protoc. Plant Biol. 147–157.

Vernoud, V., Hajduch, M., Khaled, A., Depège, N., and Rogowsky, M.P. (2005). Maize embryogenesis. Maydica *50*, 469.

Vernoud, V., Laigle, G., Rozier, F., Meeley, R.B., Perez, P., and Rogowsky, P.M. (2009). The HD-ZIP IV transcription factor OCL4 is necessary for trichome patterning and anther development in maize. Plant J. *59*, 883–894.

Vierstra, R.D. (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 385–397.

Vollbrecht, E., and Hake, S. (1995). Deficiency analysis of female gametogenesis in maize. Dev. Genet. *16*, 44–63.

Walbot, V., and Egger, R.L. (2016). Pre-Meiotic Anther Development: Cell Fate Specification and Differentiation. Annu. Rev. Plant Biol. *67*, 365–395.

Wan, Y., Petolino, J.F., and Widholm, J.M. (1989). Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. *77*, 889–892.

Wang, C.-J.R., Nan, G.-L., Kelliher, T., Timofejeva, L., Vernoud, V., Golubovskaya, I.N., Harper, L., Egger, R., Walbot, V., and Cande, W.Z. (2012a). Maize multiple archesporial cells 1 (mac1), an ortholog of rice TDL1A, modulates cell proliferation and identity in early anther development. Dev. Camb. Engl. *139*, 2594–2603.

Wang, G., Ryu, S., and Wang, X. (2012b). Plant Phospholipases: An Overview. In Lipases and Phospholipases, G. Sandoval, ed. (Humana Press), pp. 123–137.

Wang, H., Studer, A.J., Zhao, Q., Meeley, R., and Doebley, J.F. (2015). Evidence that the Origin of Naked Kernels During Maize Domestication Was Caused by a Single Amino Acid Substitution in tga1. Genetics genetics.115.175752.

Wang, R.L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., and Doebley, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. Nature *398*, 236–239.

Ward, E.J. (1973). Nondisjunction: Localization of the Controlling Site in the Maize B Chromosome. Genetics *73*, 387–391.

Wasteneys, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? J. Cell Sci. *115*, 1345–1354.

Watts, A., Kumar, V., and Bhat, S.R. (2016). Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications. J. Plant Biochem. Biotechnol. *25*, 339–348.

Weber, D.F. (2014). Today's Use of Haploids in Corn Plant Breeding. In Advances in Agronomy, (Elsevier), pp. 123–144.

Wędzony, M. (2003). Protocol for doubled haploid production in hexaploid triticale by crosses with maize. In Doubled Haploid Production in Crop Plants, (Springer, Dordrecht), pp. 135–140.

Wei, L.Q., Xu, W.Y., Deng, Z.Y., Su, Z., Xue, Y., and Wang, T. (2010). Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in Oryza sativa. BMC Genomics *11*, 338.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. Cell *97*, 99–109.

Werner, C.P., Dunkin, I.M., Cornish, M.A., and Jones, G.H. (1984). Gene transfer in *Nicotiana rustica* by means of irradiated pollen II cytogenetical consequences. Heredity *52*, 113–119.

Widiez, T., Ingram, G., Gutierrez-Marcos, J. (2017). Embryo-endosperm-sporophyte interaction in maize seed. In Brian A.Larkins (ed). "Maize Kernel Development", CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International).

Wielandt, A.G., Pedersen, J.T., Falhof, J., Kemmer, G.C., Lund, A., Ekberg, K., Fuglsang, A.T., Pomorski, T.G., Buch-Pedersen, M.J., and Palmgren, M. (2015). Specific activation of the plant P-type plasma membrane H+-ATPase by lysophospholipids depends on the autoinhibitory N- and C-terminal domains. J. Biol. Chem. jbc.M114.617746.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. PLoS ONE *2*.

Witcombe, J.R., Joshi, A., Joshi, K.D., and Sthapit, B.R. (1996). Farmer Participatory Crop Improvement. I. Varietal Selection and Breeding Methods and Their Impact on Biodiversity. Exp. Agric. *32*, 445–460.

Wong, J.L., and Johnson, M.A. (2010). Is HAP2-GCS1 an ancestral gamete fusogen? Trends Cell Biol. *20*, 134–141.

Wong, J.L., Leydon, A.R., and Johnson, M.A. (2010). HAP2(GCS1)-Dependent Gamete Fusion Requires a Positively Charged Carboxy-Terminal Domain. PLoS Genet. *6*, e1000882.

Woriedh, M., Wolf, S., Márton, M.L., Hinze, A., Gahrtz, M., Becker, D., and Dresselhaus, T. (2013). External application of gametophyte-specific ZmPMEI1 induces pollen tube burst in maize. Plant Reprod. *26*, 255–266.

Worrall, D., Hird, D.L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., and Scott, R. (1992). Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. Plant Cell *4*, 759–771.

Wu, P., Li, H., Ren, J., and Chen, S. (2014). Mapping of maternal QTLs for in vivo haploid induction rate in maize (Zea mays L.). Euphytica *196*, 413–421.

Wu, P., Ren, J., Tian, X., Lübberstedt, T., Li, W., Li, G., Li, X., and Chen, S. (2017). New Insights into the Genetics of Haploid Male Fertility in Maize. Crop Sci. *57*, 637–647.

Xie, Y., Zheng, Y., Li, H., Luo, X., He, Z., Cao, S., Shi, Y., Zhao, Q., Xue, Y., Zuo, Z., et al. (2016). GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. Sci. Rep. *6*, 28249.

Xing, J., Sun, Q., and Ni, Z. (2016). Proteomic patterns associated with heterosis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics *1864*, 908–915.

Xu, X., Li, L., Dong, X., Jin, W., Melchinger, A.E., and Chen, S. (2013). Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of a maternal haploid in maize. J. Exp. Bot. *64*, 1083–1096.

Yadegari, R. (2004). Female Gametophyte Development. PLANT CELL ONLINE *16*, S133–S141.

Yamamoto, Y., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., and Noguchi, T. (2003). Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol. *44*, 1192–1201.

Yang, H., Lu, P., Wang, Y., and Ma, H. (2011). The transcriptome landscape of Arabidopsis male meiocytes from high-throughput sequencing: the complexity and evolution of the meiotic process. Plant J. Cell Mol. Biol. *65*, 503–516.

Yang, W., Devaiah, S.P., Pan, X., Isaac, G., Welti, R., and Wang, X. (2007). AtPLAI Is an Acyl Hydrolase Involved in Basal Jasmonic Acid Production and *Arabidopsis* Resistance to *Botrytis cinerea*. J. Biol. Chem. *282*, 18116–18128.

Yang, W.-C., Shi, D.-Q., and Chen, Y.-H. (2010). Female gametophyte development in flowering plants. Annu. Rev. Plant Biol. *61*, 89–108.

Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., et al. (2011b). Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. PLoS ONE *6*, e22981.

Yao, L., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Y., Wang, Y., Liang, D., Liu, J., Sahoo, G., and Kelliher, T. (2018). OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. Nat. Plants *4*, 530–533.

Yi, H., Park, D., and Lee, Y. (1996). In vivo evidence for the involvement of phospholipase A and protein kinase in the signal transduction pathway for auxin-induced corn coleoptile elongation. Physiol. Plant. *96*, 359–368.

Yu, H.-G., Dawe, R.K., Hiatt, E.N., and Dawe, R.K. (2000). The plant kinetochore. Trends Plant Sci. *5*, 543–547.

Yu, H.-S., Hu, S.-Y., and Zhu, C. (1989). Ultrastructure of sperm cells and the male germ unit in pollen tubes ofNicotiana tabacum. Protoplasma *152*, 29–36.

Yu, H.S., Hu, S.Y., and Russell, S.D. (1992). Sperm cells in pollen tubes of Nicotians tabacum L.: three-dimensional reconstruction, cytoplasmic diminution, and quantitative cytology. Protoplasma *168*, 172–183.

Zaki, M. a. M., and Dickinson, H.G. (1991). Microspore-derived embryos in Brassica: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. Sex. Plant Reprod. *4*, 48–55.

Zamariola, L., Tiang, C.L., De Storme, N., Pawlowski, W., and Geelen, D. (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. Front. Plant Sci. *5*.

Zandomeni, K., and Schopfer, P. (1994). Mechanosensory microtubule reorientation in the epidermis of maize coleoptiles subjected to bending stress. Protoplasma *182*, 96–101.

Zeng, N., Zhao, F., Collatz, G.J., Kalnay, E., Salawitch, R.J., West, T.O., and Guanter, L. (2014). Agricultural Green Revolution as a driver of increasing atmospheric CO_2 seasonal amplitude. Nature *515*, 394–397.

Zhang, D., and Yang, L. (2014). Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther. Curr. Opin. Plant Biol. *17*, 49–55.

Zhang, Y., and McCormick, S. (2010). The regulation of vesicle trafficking by small GTPases and phospholipids during pollen tube growth. Sex. Plant Reprod. *23*, 87–93.

Zhang, H., Egger, R.L., Kelliher, T., Morrow, D., Fernandes, J., Nan, G.-L., and Walbot, V. (2014). Transcriptomes and Proteomes Define Gene Expression Progression in Pre-meiotic Maize Anthers. G3 GenesGenomesGenetics *4*, 993–1010.

Zhang, Z., Qiu, F., Liu, Y., Ma, K., Li, Z., and Xu, S. (2008). Chromosome elimination and in vivo haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (Zea mays L.). Plant Cell Rep. *27*, 1851–1860.

Zhao, X., Xu, X., Xie, H., Chen, S., and Jin, W. (2013). Fertilization and Uniparental Chromosome Elimination during Crosses with Maize Haploid Inducers. PLANT Physiol. *163*, 721–731.

Zhong, C.X., Marshall, J.B., Topp, C., Mroczek, R., Kato, A., Nagaki, K., Birchler, J.A., Jiang, J., and Dawe, R.K. (2002). Centromeric Retroelements and Satellites Interact with Maize Kinetochore Protein CENH3. Plant Cell *14*, 2825–2836.

Zhou, L.-Z., Juranić, M., and Dresselhaus, T. (2017). Germline Development and Fertilization Mechanisms in Maize. Mol. Plant *10*, 389–401.

Zickler, D. (2006). From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. Chromosoma *115*, 158–174.

Zimmerberg, J., and Kozlov, M.M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 9–19.

Zonia, L., and Munnik, T. (2008). Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. J. Exp. Bot. *59*, 861–873.

Zonia, L.E., and Tupý, J. (1995). Lithium treatment of Nicotiana tabacum microspores blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane-associated, and induces symmetrical mitosis. Sex. Plant Reprod. *8*, 152–160.

Zonia, L., Tupy, J., and Staiger, C. (1999). Unique actin and microtubule arrays co-ordinate the differentiation of microspores to mature pollen in Nicotiana tabacum. J. Exp. Bot. - J EXP BOT *50*, 581–594.

Zuoyu, Z., and Mingguang, G. (1988). Cytogenetic studies of chemically-induced parthenogenic maize plants. Acta Genet. Sin.

Annexes

Annexe 1: Liste des publications

Gilles, L.M., Lapleige, J., Martinant, J.P, Rogowsky P.M., Widiez, T. (in prep). Lipid anchors and electrostatic interactions localize NLD protein from the pollen vegetative cell to the male gem unit.

Doll, N.M., Gilles, L.M., Gérentes, M.F., Richard, C., Just, J., Borrelli, V.M.G, Gendrot, G., Ingram, G.C., Rogowsky P.M. and Widiez, T. submitted). Single and multiple gene knockout by CRISPR-Cas9 in maize.

Gilles, L.M., Khaled, A., Laffaire, J., Chaignon, S., Gendrot, G., Laplaige, J., Bergès, H., Beydon, G., Bayle, V., Barret, P., et al. (2018). How to make maize seeds that look "not like dad": insights in double fertilization and prospects for novel breeding tools. Oral communication, 60th Annual Maize Genetics Conference.

Gilles, L.M., Martinant, J.P., Rogowsky, P.M., Widiez, T. (2017). Haploid induction in plants. Current Biology 27, R1089–R1107.

Gilles, L.M., Doll, N.M., Rogowsky, P.M., Widiez, T. (2017). Les plantes haploïdes doublées, un outil de choix dans la création de nouvelles variétés. Planet-Vie, https://planet-vie.ens.fr/article/2407/plantes-haploides-doublees-outil-choix-creation-nouvelles-varietes.

Gilles, L.M., Khaled, A., Laffaire, J., Chaignon, S., Gendrot, G., Laplaige, J., Bergès, H., Beydon, G., Bayle, V., Barret, P., et al. (2017). Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. The EMBO Journal 36, 707–717.