



HAL
open science

Spéciation allopolyploïde et dynamique fonctionnelle du génomme chez les Spartines

Houda Chelaifa

► **To cite this version:**

Houda Chelaifa. Spéciation allopolyploïde et dynamique fonctionnelle du génome chez les Spartines. Biochimie [q-bio.BM]. Université Rennes 1, 2010. Français. NNT: . tel-00536586

HAL Id: tel-00536586

<https://theses.hal.science/tel-00536586v1>

Submitted on 16 Nov 2010

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

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



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale (Vie – Agro – Santé)

Présentée par

Houda Chelaifa

Préparée à l'unité de recherche UMR–CNRS 6553 ECOBIO
SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

**Spéciation
allopolyploïde et
dynamique
fonctionnelle du
génomme chez les
Spartines**

Thèse soutenue à Rennes le 13 avril
2010

devant le jury composé de :

Alain BOUCHEREAU

PRU - U. Rennes 1 / *président*

Boulos CHALHOUB

DR URGV - INRA-CNRS Evry / *rapporteur*

Philippe LASHERMES

DR IRD, Montpellier / *rapporteur*

Anne-Marie CHEVRE

DR INRA APBV, Le Rheu, / *examinatrice*

Marie-Angèle GRANDBASTIEN

DR INRA, Versailles / *examinatrice*

Malika AINOUCHE

PRU –U. Rennes 1/ *directrice de thèse*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé grâce au financement d'une bourse ministérielle, fléchée sur le sujet par le Président de l'Université de Rennes 1 et l'Ecole Doctorale Vie Agro Santé de l'Université de Rennes 1. Les recherches ont bénéficié du soutien financier de l'ANR à travers le programme « Biodiversité », projet « Effets de la Polyploïdie sur la biodiversité et l'évolution du génome des plantes », et du CNRS à travers un programme de collaboration internationale (PICS) avec les USA (équipe de Jonathan Wendel, Iowa State University), sur le thème « Evolution du génome des plantes polyploïdes: approche comparative ». Ce travail de thèse a également bénéficié de l'aide financière de l'école doctorale Vie Agro Santé de Rennes pour une formation sur l'analyse des données de puces.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance à Malika Ainouche, Professeur à l'Université de Rennes 1 pour avoir dirigé mon travail de thèse, pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude. Je la remercie d'avoir facilité ma participation à plusieurs conférences scientifiques et de m'avoir fait bénéficier de plusieurs collaborations en France et à l'étranger. Plus qu'une encadrante, pendant ces quatre ans, j'ai trouvé en elle des qualités humaines qui m'ont aidé aussi bien dans le travail que dans la vie de tous les jours quand j'en avais besoin.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie Monsieur Boulos Chalhoub, Directeur de Recherches à l'Unité de Recherche en Génomique Végétale d'Evry et Monsieur Philippe Lashermes, Directeur de Recherches à l'Institut de Recherches et Développement de Montpellier de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'éprouve un profond respect pour leur travail et leur parcours. Leurs remarques et suggestions lors de la lecture de mon rapport m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce dernier.

Merci à Marie Angèle Grandbastien, Directrice de Recherches à l'INRA de Versailles, d'avoir accepté de faire partie du jury. Son implication dans mon travail et son accueil au sein de son laboratoire m'ont permis de plonger dans l'univers des éléments transposables. Ses critiques et ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Je remercie Anne Marie Chèvre, Directrice de Recherches à l'INRA du Rheu, qui malgré un emploi du temps très chargé a accepté de faire partie de mon jury.

Merci à Alain Bouchereau, Professeur à l'Université de Rennes 1 d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir fait bénéficier de beaucoup de conseils lors de mes comités de thèse. Je tiens également à remercier les membres de mes comités de thèses qui ont apporté des conseils précieux au déroulement de la thèse: Maria Manzanares (Agrocampus, Rennes), Abdelhak El amrani (Université de Rennes 1), et Annabelle Monnier (Université de Rennes 1) qui m'a guidée lors de la réalisation expérimentale des analyses par microarray.

Un grand merci à Marie Thérèse Misset qui m'a chaleureusement accueillie au sein de l'équipe Mécanismes à l'Origine de la Biodiversité de l'UMR Ecobio (Université de Rennes 1). Sa lecture de mon rapport m'a permis d'apporter des améliorations à la qualité de ce dernier, et j'ai pu bénéficier de sa grande connaissance de l'univers des plantes. Un grand merci aussi pour les fars bretons et les gâteau au potiron (je n'ai pas encore parfaitement réussi la recette !!) qui ont soutenu mon effort intellectuel au cours de ces années de thèse...

Merci à Kader Ainouche pour m'avoir initiée aux logiciels informatiques de traitements de données et pour les discussions enrichissantes sur les éléments transposables.

Un grand merci à Jonathan Wendel, Professeur à l'Université d'Iowa (Ames, USA) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour les discussions passionnantes sur la polypléidie. Parmi les membres du « Wendel Lab », un très grand merci à Ryan Rapp qui m'a éclairée sur le chemin des analyses statistiques des données de puces et qui m'a beaucoup encouragée et soutenue. Un grand merci à Lex Flagel qui malgré un emploi du temps très chargé m'a fait découvrir avec beaucoup d'enthousiasme le modèle du coton.

J'ai eu également le plaisir de bénéficier de plusieurs interactions avec des laboratoires français. Je pense en premier lieu à Corinne Mhiri (INRA de Versailles) pour avoir consacré plusieurs jours de son temps à me former à la méthode SSAP. Merci aussi à Christian Parisod (INRA de Versailles) pour la mise au point de cette méthode sur les spartines et pour ses précieux renseignements sur les traitements des données. Merci également à Nicholas (INRA de Versailles) pour m'avoir donné un coup de main quand je paniquais. Un grand merci à Frédérique Eber (INRA du Rheu) dont l'aide était indispensable pour vérifier les niveaux de ploïdies de toutes mes plantes.

Un grand merci à Nathalie Pourtau, qui m'a initiée aux techniques de biologie moléculaire. Tu as su être là pour répondre à mes questions scientifiques. Ta gentillesse est vraiment à la hauteur de tes qualités scientifiques!

Merci aussi à Xavier Dauvergne qui a relu généreusement ce manuscrit ce qui m'a permis de profiter de ses commentaires et d'avancer plus vite.

Merci à Armel Salmon avec qui j'ai partagé le bureau pendant une année. Ton aide et nos discussions m'ont été particulièrement utile pour les analyses multilocus.

Un grand merci à toute l'équipe du Projet Tassili, spécialement à Malika Ourari, ton aide m'a été précieuse lors des derniers jours de la rédaction. Bon courage c'est toi la prochaine.

Je remercie Régis Bouvet et Amandine Etcheverry pour leur accueil et leur aide à la plateforme transcriptomique Biogenouest® (Villejean, Rennes).

Je tiens à remercier Fabienne Defrance et Jocelyne Beven pour leur gentillesse et leur efficacité à surmonter les difficultés administratives et logistiques que j'ai pu rencontrer. Un grand merci à Thierry et à Fouad pour avoir bien pris soin de mes spartines à la serre.

Un merci particulier à Michèle Tarayre et à Rozène Guesné, pour leur gentillesse et leur amitié durant ces quatre années.

Je tiens aussi à remercier mes amis thésards ou non qui m'ont aidée au cours des trois ans de cette thèse. Un remerciement très particulier à Florence pour son soutien et sa présence tout au long de ces années, Frédéric pour les interactions stimulantes sur les analyses bioinformatiques et sans qui cette dernière année aura été dure à tenir, Myriam, Philippe, Fanny, Hugues, Karim, Mouhanned toujours prêt à aider. Un grand merci à Julie F qui a dû faire face à mes derniers mois de stress de rédaction. Bon courage pour ta thèse je suis certaine que ça va bien se passer. Une pensée pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café, pendant ces quatre années: Julie J, Sidonie, Morgane, Mira, Benjamin, Romain, Damien... et toute la troupe du très convivial Laboratoire de Botanique.

Mes plus grands remerciements vont bien évidemment à mon mari Sami. Ton amour et ta générosité m'ont fourni un cadre de vie idéal. Tu m'as soutenue pendant mes périodes de doutes, et tu m'as prodigué des encouragements répétés. Pour tout cela et pour les trajets Paris - Rennes que tu as endurés, du fond du cœur : MERCI !

Merci à mon petit cœur Sirine, mon bébé formidable qui a vu le jour à la fin de ma première année de thèse. Elle était pour moi un véritable stimulant au quotidien. C'est vrai que ça n'a pas toujours été facile, mais ta tendresse et ton innocence m'ont permis de travailler avec plus de courage et de persévérance.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif de mes parents. Je les remercie de m'avoir donné un environnement idéal pendant mon enfance et de m'avoir enseigné les valeurs essentielles et qui m'ont été très utiles pour le travail scientifique et les relations humaines. Merci d'avoir su me comprendre dans les moments les plus difficiles et de m'avoir toujours fait confiance. Sachez que l'amour que je vous porte est immense et que je vous serai toujours très reconnaissante...

A mon cher PAPA

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre 1- Spéciation et évolution du transcriptome: Données de la littérature	
I. Spéciation dichotomique et divergence transcriptomique	7
II. Evolution réticulée, polyploïdie et évolution du transcriptome	11
II.1. Spéciation par hybridation homoploïde	11
II.2. Spéciation par polyploïdie	13
Chapitre 2- Le système <i>Spartina</i>	
I. Présentation du système biologique <i>Spartina</i>	20
I.1. Le genre <i>Spartina</i>	20
I.2. Histoire, distribution et écologie des espèces étudiées	20
II. Evolution génétique	24
Chapitre 3- Matériel et méthodes	
I. Matériel biologique	27
I.1. Echantillonnage et cultures expérimentales	27
I.2. Vérification des niveaux de ploïdie	28
II. Extractions d'ARN et synthèse d'ADNc	31
II.1. Extraction d'ARN	31
II.2. Synthèse d'ADNc	31
II.3. Réalisation d'une banque d'ADNc et séquençage d'ESTs	32
III. Analyses du transcriptome	32
III.1. Choix méthodologiques	32
III.2. Analyse globale du transcriptome des spartines par microarrays	35
III.2.1. Test préliminaire	35
III.2.2. Hybridation des cinq espèces de spartines	37
III.2.3. Analyses des données de puces	39
III.3. Validation par PCR-Q	40
III.4. Analyse des polymorphismes transcriptomiques par SSAP et AFLP	41
III.4.1. Présentation des éléments transposables	41
III.4.2. La méthode du « Transposon Display »	44
III.4.3. Analyse du polymorphisme transcriptomique par AFLP d'ADNc	45
III.4.4. Analyse des données et démarche suivie	47

Chapitre 4- Divergence transcritomique entre les espèces parentales <i>S. maritima</i> et <i>S. alterniflora</i>	49
Chapitre 5- Spéciation allopolyploïde et évolution du transcriptome	78
Partie A : Changements transcritomiques chez l'hybride <i>S. x townsendii</i> et l'allopolyploïde <i>S. anglica</i>	80
Partie B : Spéciation allopolyploïde et éléments transposables	94
I. Introduction générale et démarche suivie	109
I.1. <i>Démarche suivie</i>	110
II. Résultats	111
II.1. <i>Analyse de la variabilité des profils SSAP et AFLP d'ADNc chez les cinq espèces de spartines</i>	111
II.2. <i>Comparaison des effets génomiques et transcritomiques de l'hybridation chez l'hybride F1</i>	115
II.3. <i>Effets génomiques et transcritomiques de la duplication du génome chez l'allopolyploïde <i>S. anglica</i></i>	117
III. Discussion	119
Chapitre 6- Effet de l'hybridation interspécifique sur le transcriptome: cas des hybrides homoploïdes : <i>S. x neyrautii</i> et <i>S. x townsendii</i>	
I. Introduction	126
II. Matériel et méthodes	128
III. Résultats	130
III.1. <i>Analyse comparative des données génomiques et transcritomiques</i>	130
III.2. <i>Effets de l'hybridation sur les transcriptomes de <i>S. x neyrautii</i> et <i>S. x townsendii</i> : écarts à l'additivité parentale</i>	132
III.3. <i>Différences transcritomiques entre les deux hybrides F1</i>	135
III.4. <i>Identification des gènes différenciellement exprimés entre les deux hybrides F1</i>	136
IV. Discussion	144
Chapitre 7- Discussion générale et perspectives	144
Références bibliographique	152

Introduction générale

Celui qui commence a déjà fait la moitié du chemin. (Horace)

Introduction générale

La spéciation est un mécanisme central de la diversification biologique au cours duquel se mettent en place de nouvelles lignées isolées reproductivement des autres lignées apparentées. Chez les plantes, les processus accompagnant cette diversification peuvent être très variés (Rieseberg & Willis 2007).

La spéciation peut intervenir suite à un processus de divergence dichotomique plus ou moins lent, par lequel deux (ou plusieurs) groupes de populations vont se différencier (jusqu'à l'isolement reproductif) et pouvoir éventuellement explorer des conditions environnementales différentes. C'est le cas notamment de la spéciation de type allopatrique qui découle de l'isolement géographique des populations.

La formation de nouvelles espèces peut se produire de façon plus rapide dans un contexte sympatrique, suite à l'hybridation interspécifique (spéciation dite « homoploïde », lorsque la nouvelle espèce hybride garde le même niveau de ploïdie que les parents) ou à la duplication du génome (polyploïdie) qui intervient généralement par formation de gamètes non réduits. Les autopolyploïdes se forment par duplication du génome de la même espèce, tandis que les allopolyploïdes résultent de la duplication du génome d'un hybride interspécifique, qui contient de ce fait deux ou plusieurs génomes différenciés (dits homéologues) dupliqués. Dans ce dernier cas, la duplication du génome restaure la fertilité plus ou moins limitée des hybrides interspécifiques, chez lesquels les problèmes d'appariement chromosomique rendent les méioses irrégulières. De ce fait, l'allopolyploïdie est un des mécanismes de spéciation les plus répandus chez les plantes, et conduit à la formation de nouvelles lignées montrant des capacités adaptatives souvent supérieures à leurs parents diploïdes. Ces capacités, qui se traduisent dans la nature par une plus large expansion de ces espèces (dont certaines se montrent envahissantes), ont été largement exploitées par l'homme, qui a ainsi domestiqué un grand nombre d'espèces jouant aujourd'hui un rôle économique majeur comme le blé, le coton, ou le maïs (Wendel & Doyle 2005, Paterson 2005, Udall & Wendel 2006).

La polyploïdisation est connue depuis longtemps chez les Angiospermes où l'on considèrerait que 30 à 70 % des espèces étaient concernées (Materson 1994). Ces dernières

années, la découverte du passé paléopolyploïde de la plupart des génomes séquencés à ce jour, (*Arabidopsis*, riz, vigne, peuplier..) chez des espèces que l'on considèrerait diploïdes (Blanc & Wolfe 2003, 2004a, Paterson *et al.* 2004, Zhuang & Adams 2007, Jaillon *et al.* 2007) a suscité un intérêt renouvelé pour la polyploïdie et ses conséquences sur le fonctionnement et la dynamique des génomes (Wendel 2000, Chen 2007). De plus, on s'est aperçu que ce phénomène a marqué l'histoire de nombreuses autres lignées eucaryotes, telles que les poissons ou les reptiles, et s'avère être à l'origine du génome des Vertébrés (Wolfe 2001).

Les données récentes montrent que les génomes allopolyploïdes sont particulièrement plastiques suite au choc génomique résultant de l'hybridation et à la redondance d'information résultant de la polyploïdie (Adams 2008, Chen *et al.* 2007, Doyle *et al.* 2008). Des progrès importants ont été accomplis dans la compréhension de cette dynamique, à travers (1) les données de la génomique comparative (qui a montré comment les génomes polyploïdes évoluent à long-terme chez les paléopolyploïdes) et (2) les données issues de modèles expérimentaux (allopolyploïdes synthétiques) qui ont montré comment les génomes réagissent à court-terme à l'hybridation et à la polyploïdisation (Adams & Wendel 2005, Chen 2007, Comai 2005).

Une avancée majeure de la dernière décennie a été la prise de conscience que les génomes allopolyploïdes ne représentaient pas forcément la simple addition et duplication des génomes parentaux, mais que dès les premières générations, des changements importants pouvaient intervenir. Ces changements modifient la structure du génome et son fonctionnement (expression des gènes), et attribuent à l'hybridation et à la duplication du génome un rôle important dans la plasticité phénotypique et les capacités adaptatives des nouvelles espèces. Au plan structural, des éliminations de séquences et des réarrangements chromosomiques ont été démontrés chez plusieurs allopolyploïdes naturels ou resynthétisés artificiellement. Les exemples du colza (Song *et al.* 1995, Pires *et al.* 2004, Udall *et al.* 2004, Szadkowski *et al.* 2010) ou des blés (Liu *et al.* 1998, Ozkan *et al.* 2001, Levy & Feldman 2004, Chantret *et al.* 2005) représentent des cas désormais notoires d'instabilité génomique consécutive à l'allopolyploïdisation (voir toutefois Mestiri *et al.* 2010). Les recombinaisons non légitimes, associées ou non à la présence d'éléments transposables (Sabot *et al.* 2005), ou les recombinaisons entre génomes homéologues (Udall *et al.* 2005, Nicolas *et al.* 2007, Cifuentes *et al.* 2010) font partie des mécanismes pouvant causer ces restructurations.

Chez les paléopolyploïdes, des avancées marquantes ont été réalisées concernant les effets de la polyploïdisation à long terme et les mécanismes associés à la diploïdisation (Lim *et al.* 2007). On a notamment découvert que les pertes de gènes dupliqués accompagnant la diploïdisation n'étaient pas toujours aléatoires (Blanc & Wolfe 2004b). La catégorie fonctionnelle et les pressions sélectives variables apparaissent ainsi jouer un rôle important non seulement dans la plasticité fonctionnelle des génomes juste après la polyploïdisation, mais également à plus long terme au niveau structural. La sous-fonctionnalisation (expression différentielle de gènes dupliqués dans des organes ou à des stades de développement différents), observée chez différents systèmes polyploïdes (Adams *et al.* 2004, Lee *et al.* 2001, Wang *et al.* 2004) soumet à la sélection les différentes copies et favorise leur rétention (Lynch & Force 2000).

Les conséquences à court-terme de l'hybridation et de la polyploïdie sur l'expression génique ont d'abord été étudiées sur des systèmes modèles ou cultivés comme *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2006), le blé (*Triticum*, Pumphrey *et al.* 2009), le coton (*Gossypium*, Flagel *et al.* 2010), ou *Brassica* (Gaeta *et al.* 2009), mais aussi chez quelques systèmes spontanés comme les séneçons (*Senecio* Hegarty *et al.* 2005) et les salsifis sauvages (*Tragopogon*, Buggs *et al.* 2010). Les différents types de changements d'expression observés et des mécanismes associés, qui augmentent la plasticité fonctionnelle des génomes polyploïdes ont fait l'objet de plusieurs revues (Osborn *et al.* 2003, Adams & Wendel 2005, Chen 2007, Doyle *et al.* 2008, Hegarty & Hiscock 2008) et seront examinés dans le chapitre 1 de ce manuscrit.

Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes dupliqués par polyploïdie. Ces mécanismes font intervenir la méthylation de l'ADN ou des histones, l'acétylation des histones, ou les petits ARNs (Rapp & Wendel 2005). Ces phénomènes ont été particulièrement bien étudiés dans le système *Arabidopsis* (Comai 2000, Chen *et al.* 2008). Les mécanismes épigénétiques interviennent également dans le contrôle des éléments transposables qui se trouvent généralement dans des régions hétérochromatiques très méthylées (Okamoto & Hirochika 2001) et peuvent être activés suite à un choc génomique tel que l'hybridation (Mc Clintock 1984, Liu & Wendel 2001), ou à la suite de stress environnementaux (Grandbastien 1998). Chez le tabac, l'allopolyplôïdie est accompagnée de restructurations de certaines familles d'éléments transposables (Petit *et al.* 2010). La question du réveil d'activité des éléments transposables a été surtout examinée dans le contexte de l'évolution structurale des génomes polyploïdes, et moins souvent au niveau du transcriptome (pour revue : Parisod *et al.* 2010a).

Les changements d'expression du génome associés à la polyploïdisation se traduisent non seulement au niveau transcriptomique mais également au niveau protéomique. Chez le colza synthétique, Albertin *et al.* (2006) montrent une variation quantitative (plutôt que qualitative) importante des protéines synthétisées. Les changements intervenus ne semblent pas liés à une catégorie fonctionnelle particulière (Albertin *et al.* 2007) et s'avèrent résulter de modifications post-transcriptionnelles (Marmagne *et al.* 2010).

Enfin, il est possible d'associer la dynamique des génomes polyploïdes à de nombreux changements phénotypiques à forte valeur adaptative: une plus grande variabilité par rapport aux traits parentaux concernant l'appareil végétatif, les structures florales et la période de floraison a été observée chez le colza (Shranz *et al.* 2000, Osborn *et al.* 2003, Lukens *et al.* 2004) ou *Arabidopsis* (Madlung *et al.* 2002). La dynamique des génomes polyploïdes est actuellement considérée comme la raison majeure de leur succès évolutif à long-terme (Van de Peer *et al.* 2009).

Dans la série de travaux publiés ces dernières années, il ressort une grande diversité de réponse des génomes végétaux à l'allopolyplôidie et il est important de poursuivre ces investigations sur différents systèmes biologiques. De plus, le comportement des génomes allopolyplôïdes dans les populations naturelles est une question qui reste encore très peu explorée, en raison notamment des gros efforts technologiques requis et des problèmes méthodologiques associés. Il est également à noter que jusqu'à présent, peu de travaux ont fait la part des effets de l'hybridation interspécifique et de la duplication du génome dans la dynamique évolutive des allopolyplôïdes.

Au cours de cette thèse, nous nous proposons d'analyser différents volets de la plasticité transcriptomique accompagnant la spéciation chez les spartines, plantes pérennes de la famille des Poacées. L'histoire du genre *Spartina* est caractérisée par différents types de spéciation, divergente et réticulée, faisant intervenir hybridations interspécifiques et spéciation allopolyplôïde de façon prépondérante (Ainouche *et al.* 2009). Ce genre contient un des exemples classiques de spéciation récente par allopolyplôidie, *Spartina anglica* C.E Hubbard, formée par duplication du génome d'un hybride interspécifique (*S. x townsendii* H. Groves & J. Groves). Par son rôle dans la dynamique sédimentaire des marais salés, et sa distribution actuelle intercontinentale, la nouvelle espèce *S. anglica*, à expansion rapide (envahissante), présente également un grand intérêt écologique. Ce système offre l'opportunité assez rare de pouvoir comparer le génome d'une nouvelle espèce à celui de ses

parents dans les populations naturelles (Ainouche *et al.* 2004a), et notamment de pouvoir dissocier les effets de l'hybridation (chez l'hybride F1) de ceux de la duplication du génome (chez l'allopolyploïde).

Nous explorerons dans un premier temps les conséquences transcriptomiques de la spéciation divergente entre les espèces parentales *Spartina maritima* (Curtis) Fern. (native des côtes atlantiques euro-africaines) et *Spartina alterniflora* Loiseleur (originaire des côtes atlantiques est-américaines). Nous comparerons ensuite le transcriptome de l'hybride interspécifique F1 et celui de l'allopolyploïde à ceux des espèces parentales, ce qui nous permettra de faire la part des effets de l'hybridation interspécifique de ceux de la duplication du génome dans le contexte de la spéciation allopolyploïde. Enfin, nous comparerons les conséquences de l'hybridation interspécifique chez deux hybrides naturels (*Spartina x townsendii* H. Groves & J. Groves, et *Spartina x neyrautii* Foucaud) présentant une base génétique commune (car formés indépendamment à partir des même espèces parentales) mais caractérisés par une morphologie nettement différente.

Ce document s'articule de la façon suivante :

- Un premier chapitre présente les données de la littérature sur l'évolution du transcriptome dans le contexte de la spéciation.
- Un second chapitre présente le système *Spartina* et l'état des connaissances actuelles sur ce système.
- Un troisième chapitre décrit le matériel végétal et les méthodes utilisées.
- Un quatrième chapitre est consacré à l'étude des différences transcriptomiques entre les deux parents *S. maritima* et *S. alterniflora*. Ce chapitre intègre un article intitulé « **Transcriptome divergence between the hexaploid salt-marsh sister species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae)** » accepté dans la revue *Molecular Ecology*
- Un cinquième chapitre explore les effets de l'hybridation et de la duplication du génome sur le transcriptome des spartines. Cette partie intègre un article publié dans la revue *New Phytologist* qui s'intitule « **Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina x townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae)** ». Ce chapitre intègre également un second volet d'analyse qui s'intéresse aux régions du génome voisines des éléments

transposables. Ce volet est présenté sous forme d'un projet d'article intitulé « **Spéciation allopolyploïde et éléments transposables** ».

- Un sixième chapitre compare les conséquences des deux événements indépendants d'hybridations naturelles chez les spartines et se présente sous forme d'un projet d'article intitulé « **Conséquences de l'hybridation interspécifique chez les spartines: Le cas des hybrides homoploïdes *S. x townsendii* et *S. x neyrautii*** ».
- Un septième chapitre est consacré à la discussion générale et aux perspectives de ce travail.

Chapitre 1

**Spéciation et évolution du
transcriptome: Données de la
littérature**

La variation de l'expression des gènes résulte de nombreux mécanismes génétiques faisant intervenir les polymorphismes dans les zones codantes, promotrices ou régulatrices, (Wittkopp *et al.* 2004) et de mécanismes épigénétiques (Jaenisch & Bird 2003). Le niveau d'expression d'un gène représente ainsi un phénotype complexe, qui joue un rôle déterminant dans l'adaptation des populations et l'évolution des espèces.

A l'issue de la spéciation, l'isolement reproductif entraîne l'évolution indépendante de deux ou plusieurs groupes de populations, se traduisant par une différenciation plus ou moins marquée liée au temps de divergence et à la nature (sélective et neutre) des pressions évolutives s'exerçant sur les nouvelles lignées.

Si les changements associés à la formation de nouvelles espèces sont assez bien documentés au niveau phénotypique (morpho-anatomique, physiologique), écologique, et plus récemment génétique (évolution des séquences d'ADN, analyse comparative de la structure des génomes), un palier important de l'interface génome – phénotype, celui du transcriptome (résultant de l'expression des gènes et de leur régulation), commence à peine à être exploré. Dans les paragraphes qui suivent, nous tenterons de faire le point des études issues de l'analyse comparative des transcriptomes d'espèces proches permettant de mesurer la divergence d'expression des gènes suite à la spéciation.

Le mode de spéciation (dichotomique ou réticulé, suite à l'hybridation interspécifique) apparaît jouer un rôle fondamental dans la dynamique évolutive des espèces, et nous examinerons successivement les changements transcriptomiques (et mécanismes associés) dans les différents contextes de spéciation.

I. Spéciation dichotomique et divergence transcriptomique

L'idée que la divergence dans la régulation de l'expression des gènes pouvait jouer un rôle clé dans la mise en place et l'évolution de nouvelles espèces a été très tôt émise (King & Wilson 1975). Les analyses comparatives de transcriptome se sont cependant développées surtout ces dernières années grâce aux puces à ADN (microarrays) qui permettent d'examiner simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes, et d'avoir donc une vision plus globale des profils d'expression à l'échelle du génome entier.

Les systèmes les plus étudiés à cet égard sont les primates (Khaitovitch *et al.* 2004, 2005, Gilad *et al.* 2005, Lemos *et al.* 2005), les drosophiles (Rifkin *et al.* 2003, Holloway *et al.* 2007) et les levures (Tirosh *et al.* 2006). Ces données permettent de mettre en évidence les

différentes pressions évolutives, neutres ou adaptatives, à l'origine de la divergence d'expression entre les lignées. Il a été ainsi montré que chez les Primates la lignée humaine s'est distinguée par une accélération des taux de changement d'expression des gènes s'exprimant dans le cerveau, sous l'effet de relâche de contraintes sélectives ou de sélection positive (Khaitovitch *et al.* 2005). Holloway *et al.* (2007) ont comparé le polymorphisme d'expression (intraspécifique) à la divergence interspécifique chez *Drosophila simulans*, *D. melanogaster* et *D. yakuba* pour tester l'évolution neutre ou adaptative de la divergence d'expression à l'échelle du génome. Ils montrent que si les éléments cis-régulateurs en 5' peuvent intervenir dans la variabilité d'expression des gènes, ce sont les régions régulatrices en 3' (intervenant dans le contrôle de la stabilité des ARNm) qui sont plus impliquées dans la divergence adaptative entre lignées. Toutefois la divergence d'expression entre espèce sœurs de levures (Tirosh *et al.* 2009) s'avère résulter de changements dans les séquences cis-régulatrices, tandis que les facteurs de régulation en amont (trans) semblent affecter les réponses différentielles de certains gènes à l'environnement au sein de chaque espèce.

Chez les plantes, les Brassicacées bénéficient des ressources du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Mitchell-Olds 2001), et ont donc été plus particulièrement étudiées. Broadley *et al.* (2008) ont comparé le transcriptome de 14 espèces de Brassicacées et ont pu ainsi montrer la corrélation entre la distance phylogénétique et la divergence d'expression (Figure 1), ce qui est en accord avec la théorie neutraliste prédisant un taux régulier de changement au cours du temps (Khaitovitch *et al.* 2004).

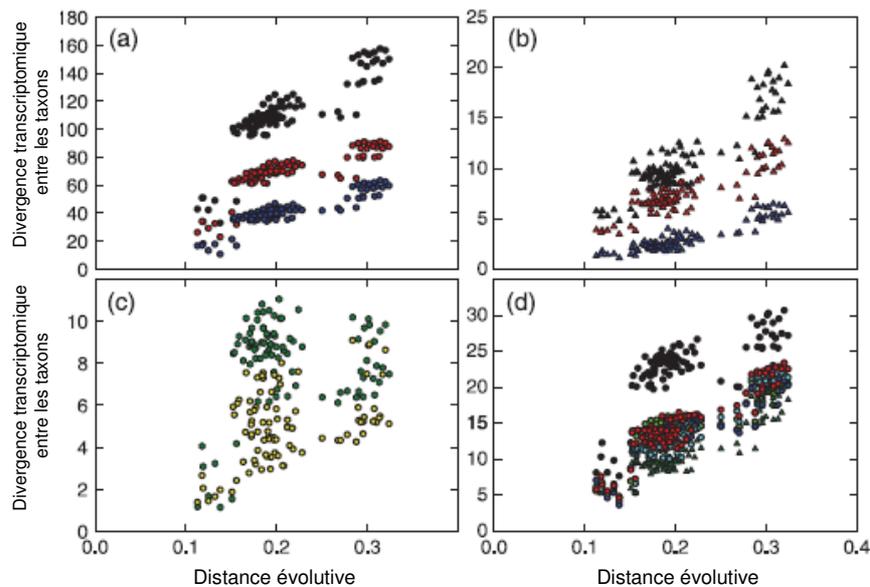


Figure 1. Différentes catégories de gènes chez les Brassicacées montrent une divergence transcriptomique corrélée à la distance phylogénétique (d'après Broadley *et al.* 2008).

Arabidopsis thaliana et *Arabidopsis arenosa* ont divergé il y a 5,8 MA et se sont naturellement hybridées pour former l'allopolyploïde *Arabidopsis suecica* (Koch *et al.* 2000). Au niveau des feuilles, et en utilisant une puce à oligos longs (70 mer) contenant 26.090 gènes, ces deux parents montrent ~15% de gènes qui sont différentiellement exprimés (Wang *et al.* 2006). En utilisant la même puce désignée par Wang *et al.* (2005), *Brassica oleracea* et *Brassica rapa* qui ont divergé il y a 3-4 MA montrent jusqu'à 15% de gènes différentiellement exprimés au niveau des feuilles (Gaeta *et al.* 2009). En utilisant également une puce d'*Arabidopsis*, une étude récente du genre *Pachycladon* (Voelckel *et al.* 2008), endémique de la Nouvelle-Zélande, a montré 13% de gènes différentiellement exprimés entre les feuilles des deux espèces proches, issues d'une radiation récente et adaptées à différentes conditions altitudinales. Les profils d'expression différentielle de gènes impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates et la biosynthèse des flavonoïdes se sont révélés être caractéristiques de chaque espèce, et corrélés à des chémotypes à valeur adaptative dans les interactions plantes-herbivores en milieu naturel.

Hegarty *et al.* (2009) ont analysé le transcriptome de deux espèces de séneçon originaires de Sicile, *Senecio chrysanthemifolius* qui se développe à basse altitude au pied du Mt Etna, et *S. aethnensis* qui pousse à plus de 2500m d'altitude et ont pu montrer une expression différentielle de plusieurs transcrits exprimés dans les organes floraux et impliquant notamment des gènes de tolérance à de hautes intensités lumineuses.

Chez les cotonniers (genre *Gossypium*), Rapp *et al.* (2009) ont comparé des représentants de lignées diploïdes (*G. arboreum*, *G. bickii*, *G. thurberi*) originaires de continents différents (Afrique, Australie, Amérique du Nord) ayant divergé d'un ancêtre commun il y a environ 5-10 MA ; l'analyse comparative de transcriptomes de feuilles a révélé une proportion importante de gènes différentiellement exprimés (42 à 53 % des 40300 gènes analysés par microarrays). Quatre espèces de cotonniers (2 diploïdes et 2 tétraploïdes) ont été domestiquées il y a environ 5000 ans (Wendel *et al.* 2010). La domestication est un processus sélectif qui offre une situation particulièrement intéressante à analyser dans le contexte de l'évolution de l'expression des gènes sur une courte période de temps évolutif. Chaudhary *et al.* (2008) ont montré que chez la tétraploïde *G. barbadense*, 4200 gènes (environ 10% des gènes examinés) s'exprimaient de façon différentielle au cours du développement de la fibre de coton, entre échantillons sauvages et domestiqués.

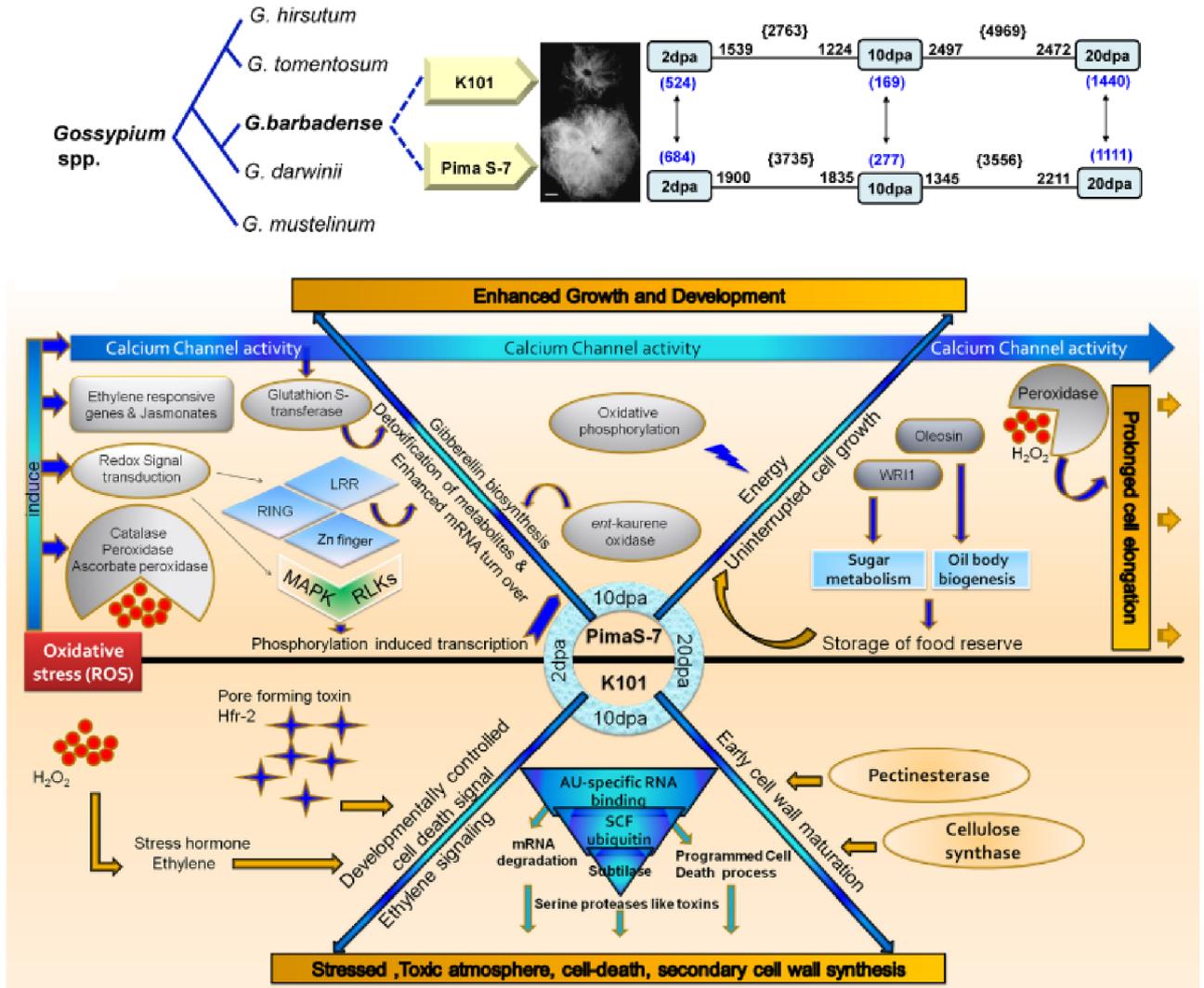


Figure 2. Evolution du transcriptome au cours du développement de la fibre de coton suite à 5000 ans de domestication chez *Gossypium barbadense*. Comparaison du phénotype sauvage (K 101) et du phénotype domestiqué (Pina S-7) à différentes périodes après l’anthèse (dpa= « days post-anthesis »), et illustration des fonctions affectées par l’expression différentielle des gènes entre forme sauvage et domestiquée (D’après Chaudhary *et al.* 2008)

La domestication, associée à un développement prolongé de la cellule épidermique fournissant la fibre de coton s'est accompagnée d'une surexpression de gènes impliqués dans les transductions de signal hormonaux et la sous-expression des gènes de maturation des parois cellulaires, ce qui retarde l'arrêt du développement de la fibre (Figure 2). Les processus impliqués dans la régulation d' H_2O_2 et les ROS (Reactive Oxygen Species) apparaissent particulièrement importants dans les différences d'expression associées à la domestication. Cette évolution s'avère accompagner de façon parallèle la domestication intervenue de façon indépendante chez les différentes espèces cultivées de coton (Chaudhary *et al.* 2009). Hovav *et al.* (2008) ont montré que chez les espèces cultivées tétraploïdes comme *Gossypium hirsutum*, la dynamique du transcriptome sous l'effet de la domestication récente s'ajoute à celle, plus ancienne (1-2 MA) engendrée par l'allopolyploïdie (voir ci-dessous).

II. Evolution réticulée, polyploïdie et évolution du transcriptome

L'hybridation et la polyploïdie représentent un mode rapide de spéciation sympatrique par lequel un isolement reproductif peut s'instaurer en quelques générations, entre l'hybride (ou le polyploïde) et ses parents. Nous présenterons successivement l'évolution du transcriptome dans les contextes de spéciation homoploïde puis polyploïde.

II.1. Spéciation par hybridation homoploïde

Les hybrides interspécifiques sont souvent stériles, en raison de méioses irrégulières et d'incompatibilités génomiques résultant de la divergence des génomes parentaux. La multiplication végétative permet toutefois de maintenir dans les populations naturelles des individus à stérilité plus ou moins importante. Les cas de spéciation hybride au niveau homoploïde sont moins fréquents que ceux résultant de polyploïdie (Rieseberg & Willis 2007, Soltis & Soltis 2009).

Dans certains cas, les recombinaisons intervenant au cours de la méiose de l'hybride peuvent donner naissance à des structures génomiques fertiles, à bonne valeur adaptative (Buerkle *et al.* 2000). Un des cas les mieux étudiés correspond au genre *Helianthus* (Rieseberg 1991, Ungerer *et al.* 1998) dans lequel l'hybridation entre *Helianthus annuus* et *H. petiolaris* a donné naissance à trois espèces hybrides: *H. anomalus*, *H. deserticola* et *H. paradoxus*. La sélection a joué un rôle déterminant dans la divergence de ces espèces, qui occupent des habitats différents de ceux des parents (Karrenberg *et al.* 2007). Les trois hybrides homoploïdes présentent des structures caryotypiques particulières, fruit de différents réarrangements chromosomiques (Lai *et al.* 2005) et montrent des caractères extrêmes

(transgressifs) par rapport aux parents, tant aux plans de la distribution écologique (adaptation à des milieux désertiques ou salés), que morphologiques ou physiologiques (Lexer *et al.* 2003).

Les profils d'expression de l'hybride *Helianthus deserticola* ont été comparés à ceux des parents par microarray (Lai *et al.* 2006). Sur environ 3000 gènes examinés, 58 présentaient une expression transgressive (sur-expression ou sous-expression) chez l'hybride. La divergence écologique rapide d'*H. deserticola* (sur une soixantaine de générations dans la nature) s'est accompagnée de différences d'expression de gènes impliqués dans le transport de protéines, jouant un rôle important pour le maintien osmotique et la régulation ionique permettant la résistance à la dessiccation en milieu aride.

L'hybridation interspécifique, qui met en contact deux génomes plus ou moins divergents ayant évolué indépendamment, représente un « choc génomique » (MacClintock 1984) mettant en présence des réseaux hiérarchiques de régulation divergents (Riddle & Birchler 2003). Les changements observés chez les hybrides font intervenir l'interaction de facteurs de régulation en *cis* et *trans* (Wittkopp *et al.* 2004, Stupar & Springer 2006, Zhuan & Adams 2007, Tirosh *et al.* 2009), pouvant avoir des conséquences phénotypiques et adaptatives importantes (exemple : décalage de floraison chez *Arabidopsis*, Wang *et al.* 2006). Chez les Salmonidés, Renaut *et al.* (2009) ont montré comment ce choc génomique entraînait une dérégulation de l'expression des gènes et induisait une stérilité des hybrides, renforçant ainsi l'isolement reproductif entre les espèces parentales.

Les changements d'expression des gènes résultant de l'hybridation pourraient également expliquer le phénomène de l'hétérosis ou vigueur hybride, bien connu des programmes d'amélioration génétique (Hochholdinger & Hoecker 2007). Ce phénomène, bien étudié chez le maïs (Figure 3), décrit la performance supérieure des hybrides F1 hétérozygotes par rapport à la performance moyenne des parents homozygotes, en termes de croissance, biomasse, productivité, ou fertilité.

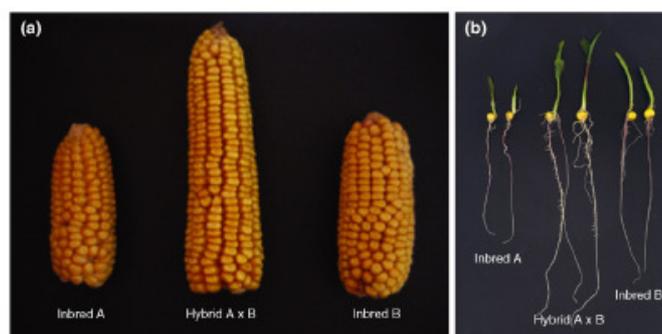


Figure 3. Manifestation de l'hétérosis chez le maïs (Hochholdinger & Hoecker 2007)

Les approches récentes de transcriptomique chez des hybrides expérimentaux suggèrent que l'hétérosis est le résultat d'une variété de mécanismes s'exprimant de façon différentielle selon les tissus ou les stades de développement et induisant une large palette d'expression additive et non additive de réseaux de gènes (Figure 4).

La variation de l'expression des gènes suite à l'hybridation interspécifique peut également résulter d'altérations épigénétiques comme les changements de méthylation (Shaked *et al.* 2001, Salmon *et al.* 2005, Marfil & Masuelli 2006) ou l'acétylation des histones (Chen & Tian 2007). On a également montré que ces changements de méthylation étaient associés à une répression de la transposition déclenchée par l'hybridation (Liu & Wendel 2000), ou pouvaient induire une évolution de l'auto-incompatibilité permettant l'autofécondation d'hybrides formés à partir d'espèces auto-incompatibles (Nasrallah *et al.* 2007). Ni *et al.* (2009) ont montré chez *Arabidopsis* comment la régulation épigénétique de gènes intervenant dans l'horloge circadienne altèrent différentes voies métaboliques pouvant expliquer la vigueur des hybrides mentionnée ci-dessus.

II.2. Spéciation par polyploïdie

La spéciation par polyploïdie résulte de la duplication du génome tout entier. La non réduction gamétique au cours de la méiose semble être la voie la plus fréquente menant à la polyploïdie puisqu'en général les parents des polyploïdes produisent souvent un important nombre de gamètes non réduits (Thompson & Lumaret 1992, Ramsey & Schemske 1998). Les tétraploïdes peuvent se former via un «pont triploïde» (Ramsey & Schemske 1998). La polyploïdie peut aussi intervenir par doublement des chromosomes somatiques (Thompson & Lumaret 1992, Ramsey & Schemske 1998, Mallet 2007).

Plusieurs modèles ont été proposés concernant l'évolution des gènes dupliqués au plan fonctionnel (Conant & Wolfe 2008). Le modèle classique d'Ohno (1970) prédit qu'à terme l'une des deux copies peut perdre sa fonction par accumulation de mutations (pseudogénéisation) ou éventuellement évoluer vers une nouvelle fonction par divergence («neofonctionnalisation»). Depuis le développement de la génomique et la prise de conscience de l'importance des duplications dans les génomes, de nouveaux modèles ont été développés, incluant la possibilité de répartition des fonctions ancestrales (sous-fonctionnalisation) qui rendent chaque copie nécessaire et donc soumise aux contraintes sélectives, ce qui favorise leur rétention.

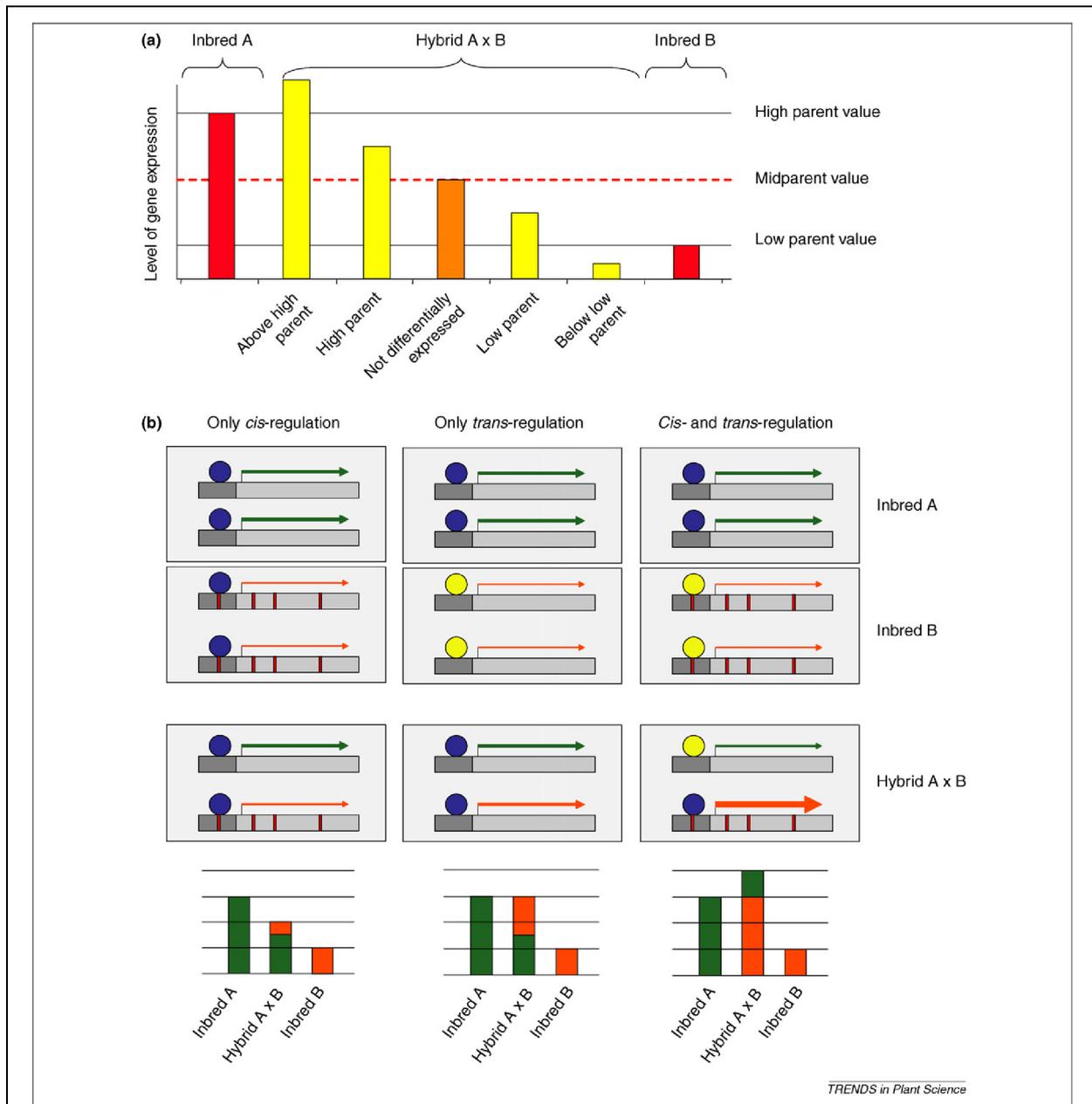


Figure 3. Relative gene expression levels in hybrids and regulation of allele-specific gene expression in hybrids. **(a)** Gene expression levels in hybrids are not strictly related to the genetic concepts of dominance and overdominance. Therefore, a systematic terminology that was previously suggested [27] should be used to describe gene expression in hybrids A x B (yellow and orange) compared to their parental inbred lines A and B (red). Gene expression in a hybrid gene can be manifested in an additive manner (orange) as the average expression of the parental inbred lines (no differential expression). Alternatively, gene expression can be significantly different from the midparent value either between the high and low parent value, or above the high or below the low parent value (yellow). **(b)** Effects of *cis*- and *trans*-regulation on the allelic contribution to gene expression in hybrids. Genes that are completely subject to *cis*-regulation reflect the relative expression levels of the parental inbred lines in the allelic ratio of gene expression in the hybrid. Genes that are exclusively regulated by *trans*-acting factors show equal expression of the two alleles in the hybrid. Genes that are subject to *cis*- and *trans*-regulation fall in between the two classes, that is, the relative allelic contribution to gene expression in hybrids for this class of genes neither displays the relative expression levels of the parental inbred lines nor an equal expression of both alleles. Genes are indicated by gray bars. The dark grey 5' end of the genes represents the regulatory promoter and/or enhancer region, whereas the light-grey part corresponds to the transcribed region of the gene. Distinct *trans*-acting factors (e.g. transcription factors, repressors) are indicated as blue or yellow circles binding to the promoter and/or enhancer region. *Cis*-differences of genes (e.g. SNPs, insertions, deletions) are indicated as red bars in the grey gene structure. Size of green and orange arrows indicate expression levels of the allele. Green and orange areas in the histograms indicate allelic contribution to gene expression in the inbred lines and hybrids.

Figure 4. : Modèle d'expression génétique additive et non additive chez les hybrides interspécifiques et mécanismes de régulation *cis* et *trans* impliqués (d'après Hochholdinger & Hoecker 2007).

C'est ce que prévoit notamment le modèle DDC (Duplication Degeneration Complementation) de Lynch & Force (2000). Ce modèle s'est avéré empiriquement vérifié chez différents polyploïdes anciens ou récents comme *Arabidopsis* (Duarte *et al.* 2006, Ha *et al.* 2009) ou *Gossypium* (Flagel *et al.* 2008). Une avancée récente concernant les modalités d'évolution d'expression des gènes chez les polyploïdes résulte de la prise en compte de la nécessité pour la cellule de maintenir un équilibre des nombres de copies des gènes sensibles aux effets de dosage, dans notre cas au niveau de ploïdie (Veitia *et al.* 2008). Ce modèle repose sur un équilibre de dosage (« dosage-balance hypothesis ») qui prend en compte un niveau d'interaction (et donc de contraintes) supplémentaire dépendant de la stœchiométrie des molécules synthétisées pour la réalisation d'une fonction donnée et s'avère en accord avec les constatations effectuées chez les paléopolyploïdes. On note en effet chez ces derniers, une rétention différentielle de certaines catégories de gènes: Par exemple, les gènes impliqués dans la machinerie de réparation, l'apoptose, ou les récepteurs transmembranaires ont tendance à revenir à un état de copie unique. Au contraire, les gènes affectés par les effets de dosage, ou ceux appartenant à des familles multigéniques semblent préférentiellement retenus. En effet, leur diversité est nécessaire à la réalisation de certaines fonctions (Blanc & Wolfe 2004b, Thomas *et al.* 2006, Aury *et al.* 2006, Birchler & Veitia 2010). Chez les Astéracées, une rétention préférentielle de certaines catégories de gènes après plusieurs événements de polyploïdisation a été observée. Néanmoins, ces catégories s'avèrent différentes de celles notées chez *Arabidopsis*. (Barker *et al.* 2008).

La duplication du génome peut intervenir au sein de la même espèce (autopolyploïdie) ou chez un hybride interspécifique (allopolyploïdie). Dans ce dernier cas, ce processus rétablit la fertilité qui était plus ou moins limitée chez l'hybride et conduit à une spéciation instantanée (Chen & Ni 2006). On peut s'attendre à ce que les conséquences de la polyploïdie se manifestent différemment au niveau de l'expression des gènes selon le mode de formation du polyploïde. En effet, si la redondance d'information provenant des gènes dupliqués est une caractéristique commune à tous les polyploïdes, les allopolyploïdes subissent en plus la réunion de deux génomes divergents suite à l'hybridation.

Les autopolyploïdes ont été relativement peu étudiés dans le contexte de l'évolution des génomes (pour revue Parisod *et al.* 2010b). Au plan de l'expression des gènes, les quelques études effectuées chez le maïs (Birchler *et al.* 2001), le chou (Albertin *et al.* 2005), la pomme de terre (Stupar *et al.* 2007) et le tournesol (Church & Spauling 2009) indiquent un effet modéré de l'autopolyploïdie sur le transcriptome ou le protéome.

Les conséquences de l'allopolyploïdie sur l'expression des gènes ont fait l'objet de plusieurs études ces dernières années (pour revue: Osborn *et al.* 2003, Adams & Wendel

2005, Chen & Ni 2006, Chen 2007, Doyle *et al.* 2008). Ces travaux ont permis de montrer que l'expression des génomes polyploïdes pouvait être additive par rapport aux profils d'expression des espèces parentales (ce qui est conforme à une hypothèse nulle d'absence d'évolution de l'expression suite à la spéciation), mais que dans de nombreux cas, les profils d'expression des gènes dérogeaient à cette hypothèse d'additivité parentale.

L'expression « non-additive » des génomes polyploïdes se traduit de différentes façons, selon que l'on compare le niveau d'expression globale du génome de l'allopolyploïde à celui de ses parents ou que l'on cherche à déterminer la contribution de chaque sous-génome homéologue (provenant des différentes espèces parentales) au transcriptome de l'allopolyploïde.

La non-additivité d'expression des gènes chez un polyploïde peut tout d'abord être une conséquence immédiate de modifications structurales rapides conduisant à la perte de loci dupliqués. C'est ce qui a notamment été observé pour les allopolyploïdes synthétiques des genres *Brassica* (Song *et al.* 1995, Gaeta *et al.* 2009), *Triticum* (Kashkush *et al.* 2002), ou chez les jeunes allopolyploïdes naturels du genre *Tragopogon* (Tate *et al.* 2006, Buggs *et al.* 2009a), pour lesquels des pertes de fragments parentaux d'ADNc (analysés par enzymes de restriction) sont décrits.

Dans le cas (majoritaire chez les espèces récentes) d'une rétention des copies parentales chez l'allopolyploïde, la mise sous silence d'une des copies parentales a été souvent rapportée (Comai *et al.* 2000, Adams *et al.* 2003, 2004, Wang *et al.* 2004, Buggs *et al.* 2010). Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle important dans la mise sous silence des gènes. Ceci a été particulièrement bien montré chez l'allopolyploïde synthétique *Arabidopsis suecica* (Lee & Chen 2001, Wang *et al.* 2004, Chen *et al.* 2008). Les changements de méthylation suite à l'allopolyploïdie peuvent également engendrer une activation transcriptionnelle des éléments transposables qui peut affecter l'expression des gènes (Slotkin & Martienssen 2007). Chez *Arabidopsis* l'activation transcriptionnelle d'un élément de type « *Sunfish* » a été observée, (Madlung *et al.* 2005) tandis que chez les blés synthétiques, Kashkush *et al.* (2003) ont montré un réveil d'activité transcriptionnelle d'éléments transposables affectant l'expression de gènes adjacents. Chez le blé allohexaploïde, des modifications épigénétiques et une activité transcriptionnelle ont été détecté chez 7 rétrotransposons et le transposon *CACTA* (*in* Parisod *et al.* 2010a).

La mise sous silence permet notamment la sous-fonctionnalisation des copies homéologues, qui peuvent ainsi s'exprimer alternativement dans différents organes et à différents stades de développement. Chez *Gossypium*, il est assez remarquable de noter que la sous-fonctionnalisation détectée chez des allopolyploïdes re-synthétisés artificiellement se

retrouve chez les allopolyploïdes naturels formés il y a 1-2 MA (Adams *et al.* 2003), indiquant que les mécanismes de régulation déclenchés juste après la spéciation allopolyploïde pouvaient se maintenir sur une longue période de temps évolutif.

Un résultat majeur des études récentes, concerne la mise en évidence d'une contribution inégale, et flexible, des copies homéologues au transcriptome des allopolyploïdes. Cette mise en évidence n'a été possible que par le développement d'une technologie adaptée permettant de distinguer les niveaux d'expression de copies homéologues dans le transcriptome d'un allopolyploïde. Grâce à la mise au point d'une puce désignée de façon à distinguer les deux génomes parentaux du coton allotétraploïde sur la base de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) entre homéologues (Udall *et al.* 2006), Flagel *et al.* (2008) ont montré la contribution inégale des génomes parentaux (A et D) au transcriptome des pétales, avec un biais en faveur du génome D (paternel), tandis qu'un biais en faveur de l'un ou de l'autre génome parental est observé au cours du développement de la fibre de coton (Hovav *et al.* 2008). Toujours chez le coton allotétraploïde, Chaudhary *et al.* (2009) ont utilisé une technique de spectrométrie de masse à haute résolution (« Sequenom MassARRAY »), et ont pu distinguer les niveaux d'expression des copies homéologues de 63 paires de gènes homéologues dupliqués dans 24 tissus. Différents types de biais d'expression (inégaux) des copies parentales ont été mis en évidence, variant d'un tissu à l'autre, incluant sous-fonctionnalisation, et néofonctionnalisation (Figure 5).

La plupart des analyses transcriptomiques réalisées chez les polyploïdes ont été effectuées à l'aide de puces permettant de comparer le niveau d'expression global (sans distinction des homéologues) de l'allopolyploïde à celui de ses parents (Wang *et al.* 2004, 2006, Hegarty *et al.* 2005, Gaeta *et al.* 2009, Pumphrey *et al.* 2009).

Wang *et al.* (2006) ont montré 8% de gènes exprimés différemment (en majorité sous-exprimés) entre l'allotétraploïde *Arabidopsis suecica* resynthétisé artificiellement et ses parents. La plupart des gènes fortement exprimés chez le parent *A. thaliana* (par rapport à l'autre parent *A. arenosa*) se retrouvent sous-exprimés chez l'allopolyploïde, suggérant une dominance d'expression du génome d'*A. arenosa*. La dominance d'expression d'un des deux parents a été également décrite chez plusieurs allotétraploïdes synthétisés artificiellement chez le cotonnier par Rapp *et al.* (2009) qui signalent qu'une fraction non négligeable des gènes qui pourraient statistiquement apparaître exprimés au même niveau que l'expression parentale moyenne (« mid-parent value » généralement utilisée comme référence d'additivité parentale) correspondent en réalité à des situations de dominance parentale.

Parmi les gènes à expression parentale non additive chez les allopolyploïdes, il faut aussi noter l'expression transgressive (sur-expression ou sous-expression par rapport aux

parents) de gènes pouvant avoir d'importantes conséquences phénotypiques et adaptatives. Il est intéressant de noter que la dominance d'expression diminue entre les cotonniers allopolyploïdes synthétiques et leurs équivalents naturels, tandis que les gènes à expression transgressive deviennent plus fréquents, reflétant l'évolution du transcriptome en conditions naturelle, postérieure à la spéciation allopolyploïde (Flagel *et al.* 2010).

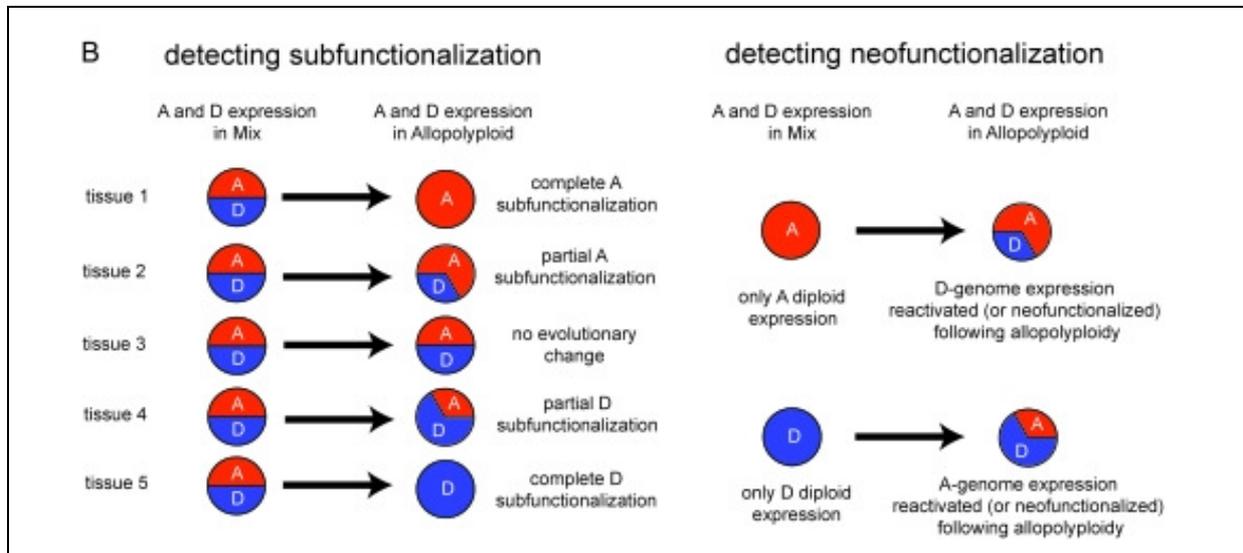


Figure 5. Contribution des sous-génomes homéologues au transcriptome chez le coton allotétraploïde (d'après Chaudhary *et al.* 2009).

Il est à noter que les études portant sur l'expression des génomes polyploïdes ne différencient pas toujours clairement les rôles respectifs joués par l'hybridation et la duplication du génome dans les changements transcriptomiques observés, et sont de ce fait parfois ambiguës sur la question. Par exemple, l'allotétraploïde synthétique *Arabidopsis suecica* cité plus haut est réalisé en croisant deux taxons autotétraploïdes (*A. thaliana* et *A. arenosa*). La comparaison du transcriptome de l'« allotétraploïde » à celui des parents mesure donc en réalité essentiellement l'effet de l'hybridation et non celui de la duplication du génome (déjà présente chez les parents).

Les deux études ayant tenté de faire la part de ces deux processus importants ont été réalisées chez *Senecio* (Hergarty *et al.* 2006) et *Gossypium* (Flagel *et al.* 2010). Dans les deux cas, l'hybridation apparaît jouer un rôle majeur dans les changements d'expression observés, et les changements semblent s'atténuer (« effet calmant ») suite à la duplication du génome chez *Senecio* (Hergarty *et al.* 2006).

La Figure 6 résume les différents volets de l'évolution des génomes allopolyploïdes, et montre comment l'interaction des mécanismes génétiques et épigénétiques peut avoir des conséquences adaptatives immédiates au niveau phénotypiques. On peut aujourd'hui dénombrer de nombreux cas bien documentés dans la littérature, montrant le lien entre

changements d'expression et évolution des phénotypes (pour revue : Chen *et al.* 2007). Ceci donne toute la mesure de l'importance de la dynamique d'expression pour l'adaptation et l'évolution des espèces à court-terme et à long terme.

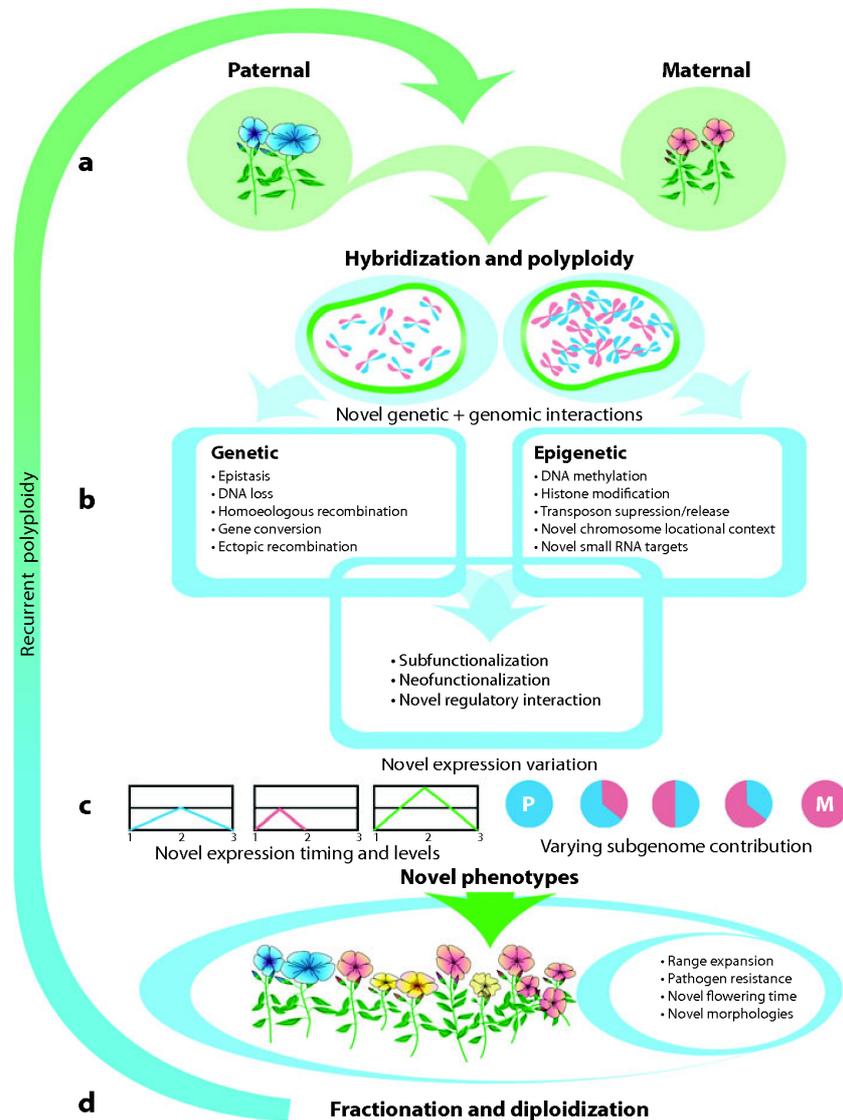


Figure 6. Différents volets de l'évolution des génomes allopolyploïdes (d'après Doyle *et al.* 2008).

Chapitre 2

Le système *Spartina*

I. Présentation du système biologique *Spartina*

I.1. Le genre *Spartina*

Le genre *Spartina* Schreb. (Poacées, sous-famille des Chloridoideae) est constitué de plantes herbacées pérennes colonisant les marais salés littoraux et parfois à l'intérieur des terres. Ce sont donc des halophytes qui peuvent tolérer des niveaux variables de salinité dans les zones intertidales. Le centre de diversité du genre est situé sur le continent américain qui contient la majorité des espèces (une douzaine, d'après Mobberley 1956). Le nombre chromosomique de base est de 10 dans le genre *Spartina* (Marchand 1968) et les espèces sont tétraploïdes ($2n=40$), hexaploïdes ($2n=60-62$) ou dodécaploïdes ($2n=120, 122, 124$). Des cytotypes heptaploïdes ($2n=70$) et nonaploïdes ($2n=90$) ont été récemment décrits (Fortuné *et al.* 2008, Ayres *et al.* 2008, Renny-Byfield *et al.* 2010). Aucune espèce diploïde n'est connue.

Le genre *Spartina* a évolué en deux lignées principales (Baumel *et al.* 2002a): l'une contenant l'essentiel des espèces tétraploïdes américaines, et l'autre regroupant le clade des espèces hexaploïdes avec à leur base la tétraploïde *Spartina argentinensis*. La Figure 7 présente une phylogénie simplifiée du genre *Spartina*, qui illustre la fréquence des événements d'hybridations interspécifiques et de polyploïdisation ayant jalonné l'histoire de ce genre (Ainouche *et al.* 2009).

Au cours de ce travail, nous centrerons nos analyses sur les espèces du clade hexaploïde et leurs descendants, incluant plus précisément *Spartina maritima*, *Spartina alterniflora*, deux hybrides F1 (*S. x townsendii* et *S. x neyraultii*) et l'allopolyloïde *Spartina anglica*.

I.2. Histoire, distribution et écologie des espèces étudiées

Sur les cinq espèces étudiées (Figure 8), quatre sont natives des côtes européennes: *Spartina maritima*, distribuée sur les côtes atlantiques européennes et africaines, *Spartina x neyraultii* localisée au Pays Basque en France, *Spartina x townsendii* dans la Baie de Southampton en Angleterre et *S. anglica*, originaire de Southampton, distribuée aujourd'hui sur plusieurs continents. Ces trois dernières espèces se sont formées à la fin du 19^{ème} siècle, suite à l'introduction (aux alentours de 1850) de *Spartina alterniflora*, native des côtes est-américaines, dans l'ouest de l'Europe où elle s'est hybridée avec l'espèce indigène *S. maritima*.

Celle-ci semble en régression sur les côtes européennes, où elle fleurit mais ne produit que rarement des graines. *Spartina alterniflora* possède au contraire une distribution plus large aujourd'hui, suite à son introduction non seulement en Europe (sud de l'Angleterre, Finistère et côte Basque en France), mais également en Californie où elle s'hybride avec l'espèce native *Spartina foliosa* (Ayres *et al.* 1999) et en Chine où elle s'est rapidement étendue (An *et al.* 2007, Li *et al.* 2009).

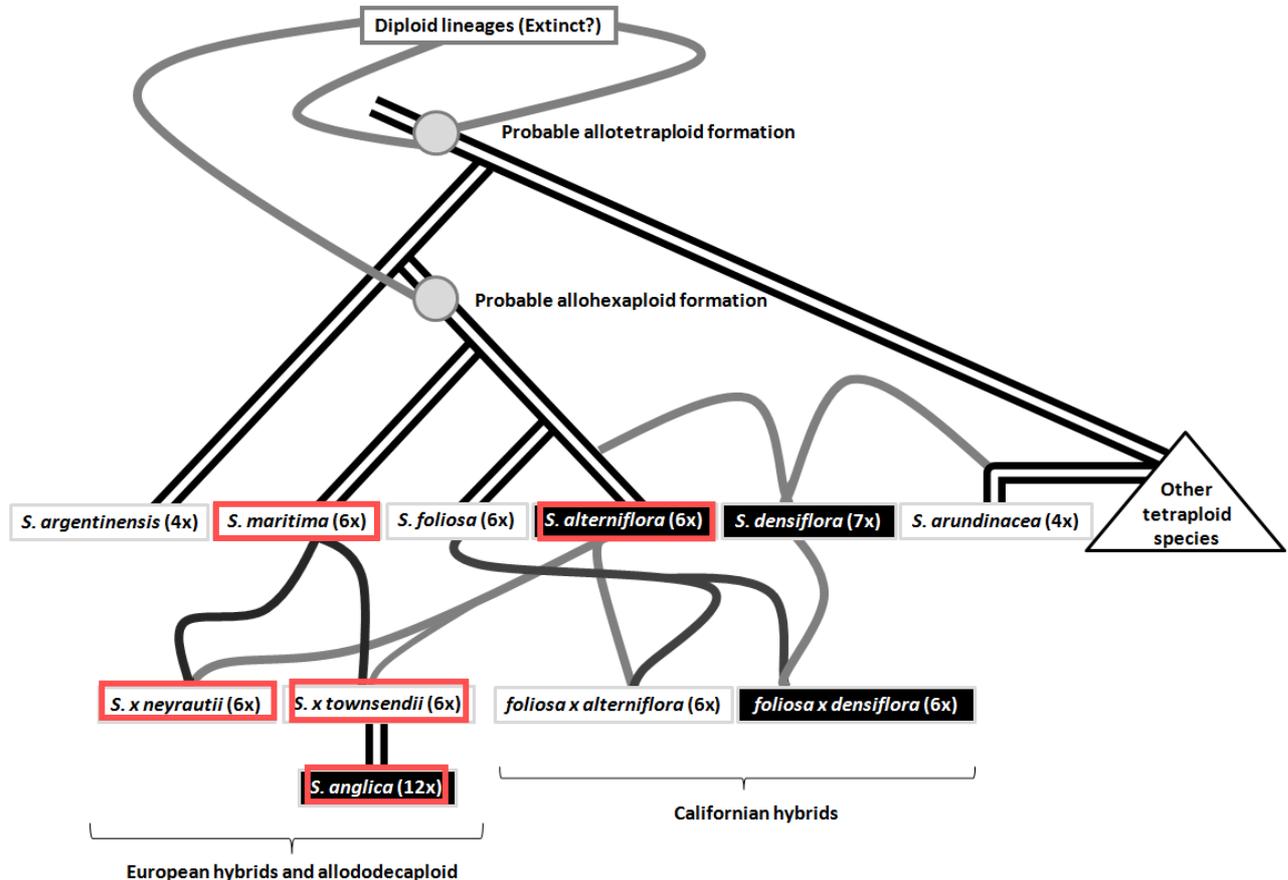


Figure 7. Représentation des relations phylogénétiques dans le genre *Spartina* (modifiée d'après Ainouche *et al.* 2009). Les lignes courbes indiquent une origine hybride. Les rectangles noirs indiquent les espèces envahissantes. Les espèces encadrées en rouge sont celles étudiées au cours de ce travail.

L'hybridation entre *S. alterniflora* et *S. maritima* en Europe est intervenue à deux reprises, au Pays Basque (pour donner *S. x neyrautii*) et en Angleterre (pour donner *S. x townsendii*). Dans les deux cas, le croisement s'est fait dans le même sens, avec *S. alterniflora* comme parent maternel et donneur du génome chloroplastique (Baumel *et al.* 2003). Toutefois, il est assez intéressant de noter que les deux hybrides présentent une morphologie très différente, *S. x neyrautii* étant très semblable à *S. alterniflora*, tandis que *S. x townsendii* est morphologiquement intermédiaire entre les deux parents. Ces deux hybrides de première génération sont stériles, mais se sont maintenus par multiplication végétative

sur leur site d'origine. La population de *S. x neyrautii* a été extrêmement réduite (Baumel *et al.* 2003) suite à l'urbanisation dans la région (construction d'un aéroport). En revanche, la population anglaise de *S. x tonzsendii* reste importante et particulièrement vigoureuse (Renny-Byfield *et al.* 2010).

La duplication du génome de l'hybride anglais a donné naissance vers 1890 à l'allopolyploïde *S. anglica*, très fertile, qui est devenu envahissant (Gray *et al.* 1990, Thompson 1991). Actuellement, de nombreuses tentatives d'éradication sont en cours dans plusieurs pays (Hacker *et al.* 2001, Hammond & Cooper 2002, Cottet *et al.* 2007). Les deux espèces parentales *S. alterniflora* ($2n=62$) et *S. maritima* ($2n=60$) sont hexaploïdes, et *S. anglica* ($2n=120, 122, 124$) est donc dodécaploïde (Marchant 1968). Les parents, comme l'allopolyploïde, présentent un comportement méiotique régulier (formation majoritaire de bivalents à la méiose).

Spartina anglica présente une large amplitude écologique. Elle se développe sur les pentes douces du littoral, sur substrat sableux vaseux et peut occuper une situation pionnière en avant de la végétation existante (Ainouche *et al.* 2009). Elle peut ainsi supporter plusieurs heures d'immersion dans l'eau de mer. *Spartina anglica* joue un rôle important dans la dynamique sédimentaire et successionnelle du marais salé. Par ses racines et puissants rhizomes, elle accélère le dépôt des sédiments fins, participant à l'atterrissement des estrans, ce qui permet l'installation d'autres plantes, moins tolérantes à la salinité. Dans les eaux de faible profondeur, elle provoque une élévation des vasières. Les spartines sont caractérisées par un métabolisme photosynthétique en C_4 (Long *et al.* 1975, Maricle *et al.* 2009). *S. anglica*, *S. maritima* et *S. alterniflora* contiennent comme beaucoup d'espèces halophytes des osmoprotecteurs comme la proline et la glycine bêtaïne (Mulholland & Otte 2002); elles présentent de plus la particularité (rare chez les Angiospermes) de produire du 3-dimethylsulphopropionate ou DMSP (Larher *et al.* 1977) à travers une voie métabolique qui semble leur être propre (Kocsis & Hanson, 2000). Le rôle de cette molécule chez les plantes est encore discuté (Otte *et al.* 2004), elle serait impliquée dans différents mécanismes de tolérance au stress.

Spartina anglica a hérité de ses parents une adaptation aux conditions anoxiques, facilitée par un système anatomique aérochymateux qui permet à la plante de stocker l'oxygène atmosphérique et de le transporter vers les racines (Maricle & Lee 2002). Ses capacités de détoxification des sédiments pollués en font un bon candidat pour la phytoremédiation (Lee 2003).



S. alterniflora
($2n=62$)



S. maritima
($2n=60$)



S. x townsendii



S. x neyrautii



S. anglica
($2n=120-124$)

Figure 8. Présentation des cinq espèces de spartines étudiées.

Dans ce contexte, il a été également démontré que *S. maritima* a un fort potentiel d'accumulation de Cu, Cd et Pb (Reboreda & Cacador 2007, 2008). La tolérance importante de *S. anglica* aux conditions réductrices et riches en sulfites des sédiments fournit à cette espèce des propriétés physiologiques particulières lui permettant d'occuper une niche vacante (Maricle *et al.* 2006).

II. Evolution génétique

Le succès écologique et les capacités envahissantes de la jeune espèce *S. anglica* sont à mettre en rapport avec la nature dupliquée de son génome hybride (Ainouche *et al.* 2009). Ces dernières années, une série de travaux ont été menés, visant à préciser le contexte génétique de la formation de cette espèce, les liens phylogénétiques, l'histoire des espèces dans le genre *Spartina*, et l'évolution du génome allopolyploïde de *S. anglica*. Les populations de *S. anglica* montrent une diversité génétique inter-individuelle extrêmement réduite dans l'Ouest de l'Europe et dans les régions plus récemment colonisées comme l'Australie (Baumel *et al.* 2001). Toutes les populations de *S. anglica* montrent un génotype nucléaire multilocus quasi-identique à celui de l'hybride F1 *S. x townsendii*, et un génome chloroplastique identique à celui de *S. x townsendii* et du parent maternel *S. alterniflora* (Baumel *et al.* 2001, Ainouche *et al.* 2004b). Les espèces parentales (*S. alterniflora* et *S. maritima*) présentent également une très faible variation génétique dans l'Ouest de l'Europe (Yannic *et al.* 2004). Ces éléments appuient l'idée d'un très fort goulot génétique à l'origine de *S. anglica*, qui résulterait d'un événement unique d'hybridation, ou de multiples événements impliquant des génotypes parentaux très similaires (Ainouche *et al.* 2004a). Les études phylogénétiques (basées sur les séquences nucléaires *Waxy* et *ITS* et sur des séquences chloroplastiques) conduites dans le genre *Spartina* (Baumel *et al.* 2002a, Fortuné *et al.* 2007) ont révélé que le genre *Spartina* a évolué en deux lignées principales contenant les espèces tétraploïdes (essentiellement américaines) et le clade des espèces hexaploïdes, qui dérivent d'un même ancêtre probablement lui aussi d'origine hybride. Au sein de ce clade, *S. maritima* et *S. alterniflora* apparaissent nettement divergentes, ce qui explique la stérilité des hybrides F1 formés entre ces deux espèces. Fortuné *et al.* (2007) ont montré qu'au cours de leur évolution, ces espèces hexaploïdes avaient retenu de façon différentielle les copies de gènes nucléaires homéologues qui avaient été dupliquées chez l'ancêtre allohexaploïde.

Le génome de la jeune espèce allopolyploïde *S. anglica* paraît encore très peu remanié au plan structural; il présente une additivité quasi-parfaite des génomes parentaux dans la globalité du génome (Baumel *et al.* 2001, 2002a, Ainouche *et al.* 2004a), comme dans

l'environnement des éléments transposables (Baumel *et al.* 2002b, Parisod *et al.* 2009). Le génome de *S. anglica* est pratiquement identique à celui de l'hybride F1 (*S. x townsendii*) dont il est issu; toutefois on a noté chez *S. x townsendii* et *S. anglica* la perte de quelques fragments AFLP, affectant préférentiellement le génome originaire de *S. alterniflora*. Cette dynamique semble aussi être observée dans l'environnement des éléments transposables (Parisod *et al.* 2009, Ainouche *et al.* 2009).

Les changements les plus importants notés chez *S. anglica* à ce jour concernent les altérations de la méthylation du génome, qui se déclenchent suite à l'hybridation, chez *S. x townsendii* et *S. x neyrautii* et sont transmis à l'allopolyploïde (Salmon *et al.* 2005). Ces changements épigénétiques apparaissent encore plus importants dans les régions voisines des éléments transposables (Parisod *et al.* 2009). Ceci suggère que chez ce système biologique qui paraît structurellement stable, la dynamique la plus précoce qui se met en place concerne l'aspect épigénétique.

Les questions qui restent posées concernent (1) l'identification des régions génomiques affectées par les changements épigénétiques, (2) les conséquences fonctionnelles (expression des gènes) de l'allopolyploïdisation (3) leur impact sur la plasticité des phénotypes et les capacités adaptatives de l'allopolyploïde envahissant.

L'examen de ces questions dans le système *Spartina* bénéficie d'un certain nombre d'avantages mais aussi de difficultés qu'il a fallu cerner. Les avantages concernent l'opportunité offerte par ce modèle d'étudier en milieu naturel l'évolution d'une espèce naissante dans un contexte historique, écologique et génétique qui est aujourd'hui bien établi, et de comparer cette espèce avec ses parents bien identifiés, et qui ont peu évolué depuis l'événement (récent) d'hybridation. L'existence de deux hybrides F1 qui, bien que stériles, se maintiennent dans la nature par voie végétative, permet de dissocier les effets de l'hybridation (chez *S. x townsendii*) de ceux de la duplication du génome (chez *S. anglica*) dans le cadre de la spéciation allopolyploïde. Elle permet également de vérifier la nature aléatoire, ou biaisée, des changements qui pourraient se produire lors de deux événements d'hybridation indépendants dans la nature (chez *S. x townsendii* et *S. x neyrautii*), ayant impliqué des génotypes parentaux très similaires côté maternel et paternel.

Les difficultés qui devront être prises en compte concernent (1) le haut niveau de ploïdie de ce système (parents hexaploïdes et descendant allo-dodécaploïde) et donc la forte redondance génétique (6x et 12x respectivement) potentiellement présente à chaque locus et (2) l'absence de ressources génomiques qui caractérise la majorité des systèmes biologiques

« non modèles ». La stratégie que nous avons développée dans ce travail a donc été ajustée aux contraintes du modèle.

Chapitre 3

Matériel et méthodes

*La racine du début est parfois amère, mais la saveur de la fin est
toujours exquise (proverbe Chinois)*

I. Matériel biologique

I.1. Echantillonnage et cultures expérimentales

Notre étude est centrée sur le clade des espèces hexaploïdes du genre *Spartina* formé par les deux parents *S. maritima* et *S. alterniflora*, les deux hybrides F1 *S. x townsendii* et *S. x neyrautii* et le néo-allopolyploïde *S. anglica*.

Les plantes analysées ont été récoltées lors de trois campagnes de terrain (étés 2006, 2007 et 2008) en France et en Angleterre. Les échantillons étudiés sont répertoriés dans le Tableau 1. Les échantillons de plantes récoltés en 2006 ont été utilisés pour les analyses AFLP et SSAP d'ADNc. Les échantillons récoltés en 2007 ont été utilisés pour les analyses par microarray.

Le parent maternel *S. alterniflora* a été échantillonné près des sites d'introduction en Angleterre et en France (Finistère). Tous les échantillons de l'espèce paternelle *S. maritima* analysés proviennent de France, cette espèce est en effet en régression dans le sud de l'Angleterre et a disparu du site initial d'hybridation. Les analyses précédemment effectuées (Baumel *et al.* 2001, 2003, 2002a, Yannic *et al.* 2004) sur les populations européennes des espèces parentales ont indiqué une diversité génétique très réduite. Ainsi, il est raisonnable de considérer que les plantes échantillonnées sont proches des génotypes initiaux étant impliqués dans les événements d'hybridation. Les hybrides F1 ont été prélevés sur leur site d'hybridation d'origine à Hythe en Angleterre (pour *S. x townsendii*) et Hendaye au Pays Basque (pour *S. x neyrautii*). L'allododécaploïde *S. anglica* a été échantillonné en France (Bretagne) et en Angleterre (près du site d'origine d'hybridation dans la Baie de Southampton). Un échantillon introduit aux USA (Baie de San Francisco) a été également inclus dans nos analyses SSAP et AFLP d'ADNc afin d'évaluer la variation entre populations distantes géographiquement.

Les plantes entières ont été prélevées sur le terrain avec une motte de sol autour des racines, puis transplantées en serre de Botanique (Campus de Beaulieu, Université de Rennes1) en conditions contrôlées. Les plantes ont été maintenues dans des pots de 3 à 7 litres, contenant un mélange équivalent de sable et de terre. L'arrosage (automatique) biquotidien (matin et soir) durait environ 6 mn. Le cycle d'éclairage est lié à la photopériode naturelle. Après 20 jours d'acclimatation, des jeunes feuilles ont été récoltées et congelées immédiatement dans l'azote liquide puis stockées à -80°C.

Pour s'assurer de la reproductibilité des profils transcriptomiques observés pour chaque espèce (notamment pour l'étude par microarray), les analyses ont été effectuées sur cinq échantillons provenant du même site de récolte (Récolte 2007, Tableau 1).

Tableau 1. Espèces et populations de spartines étudiées

Espèces	Année d'échantillonnage	Origine	ploïdie
<i>S. alterniflora</i>	2006	Landerneau (Finistère)	6x
	2006	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
	2007	Landerneau (Finistère, F)	6x
<i>S. maritima</i>	2006	Saint-Armel (Morbihan, F)	6x
	2006	La Rodière (Morbihan, F)	6x
	2006	Quenouille (Morbihan, F)	6x
	2007	Ile de Tascon (Morbihan, F)	6x
<i>S. x neyrautii</i>	2006	Hendaye (F)	6x
	2007	Hendaye (F)	6x
<i>S. x townsendii</i>	2006	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
	2007	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
<i>S. anglica</i>	2006	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	12x
	2006	Saint-Armel (Morbihan, F)	12x
	2006	San Francisco (USA)	12x
	2007	Roscoff (Finistère, F)	12x

Des feuilles des espèces parentales des deux hybrides et de l'allopolyploïde ont été également récoltées *in situ* dans différentes populations selon un transect le long du shore, et stockés dans une solution « ARN later » (Ambion, USA). Ces échantillons non analysés dans le cadre de ce travail serviront à des études futures au sein de l'équipe.

I.2. Vérification des niveaux de ploïdie

Les niveaux de ploïdie (hexaploïde pour les parents et les hybrides F1, dodécaploïde pour *S. anglica*) ont été vérifiés en cytométrie en flux (Figure 9). Cette vérification est particulièrement importante sur les sites où les espèces parentales et l'allopolyploïde cohabitent. Elle est importante aussi là où la plasticité morphologique de certains taxons rend la détermination délicate sur le terrain en absence d'inflorescence (exemple : le Golfe du Morbihan en France pour *S. maritima* et *S. anglica*).

Cette vérification a aussi été nécessaire, sur les sites d'origine des hybrides et de l'allopolyploïde, dans la Baie de Southampton (localité de Hythe), où coexistent des individus morphologiquement proche et pouvant correspondre à *S. anglica* ou à l'hybride *S. x townsendii*, et où seul le nombre chromosomique ou la taille du génome permettent de discriminer sans ambiguïté les taxons. De plus, des individus avec un niveau de ploïdie intermédiaire ($2n=9x=90$), résultant probablement de back-cross entre l'allopolyploïde et ses parents, ont été détectés près du site d'origine de *S. anglica* (Marchant 1967, Renny-Byfield *et al.* 2010). La taille du génome ($2C$) des différentes espèces de spartines précédemment estimée par cytométrie en flux par la technique de l'Iodure de Propidium (Coba de la Pena & Brown 2001) est comprise entre 3,70 et 3,85 pg pour *S. maritima* ($2n=60$) et entre 4,33 et 4,36 pg pour *S. alterniflora* $2n=62$ (Fortuné *et al.* 2008). Elle est en moyenne de 3,95 pg pour *S. x townsendii*, de 3,90 pg pour *S. x neyrautii* et de 8,1 pg pour l'allopolyploïde *S. anglica* (M. Ainouche, données non publiées). Les quantités globales d'ADN apparaissent donc additives chez les hybrides F1, et légèrement supérieures au double de la taille de l'hybride F1 chez l'allopolyploïde.

Les mesures des niveaux de ploïdie de nos échantillons ont été réalisées à la plateforme de cytogénétique de l'INRA (Le Rheu), à l'aide d'un cytomètre en flux PA-I Partec GmbH. Des suspensions nucléaires de cellules foliaires ont été obtenues à partir de fragments de feuilles fraîches dilacérés à l'aide d'une lame de rasoir dans une solution tampon contenant un fluorochrome (Partec Kit DAPI solution 05.5002 -CyStain UV). Le logiciel DPAC (Partec) permet de mesurer les émissions de fluorescence émises par les noyaux en suspension. Compte tenu de la précision de l'appareil, la quantité d'ADN n'est pas mesurée de façon précise, mais cette technique permet de distinguer sans ambiguïté des niveaux de ploïdie différents qui seront exprimés en niveaux relatifs de fluorescence par rapport à un standard interne de taille de génome connue. Le pois (*Pisum sativum*), $2n=14$, dont la taille de génome correspondante (valeur $2C$) est de 8,84 pg, a été utilisé comme étalon interne (Bennett & Leitch 2004). Durant toute la session de mesures, l'émission de fluorescence correspondant à l'échantillon témoin de pois a été ajustée au canal 300.

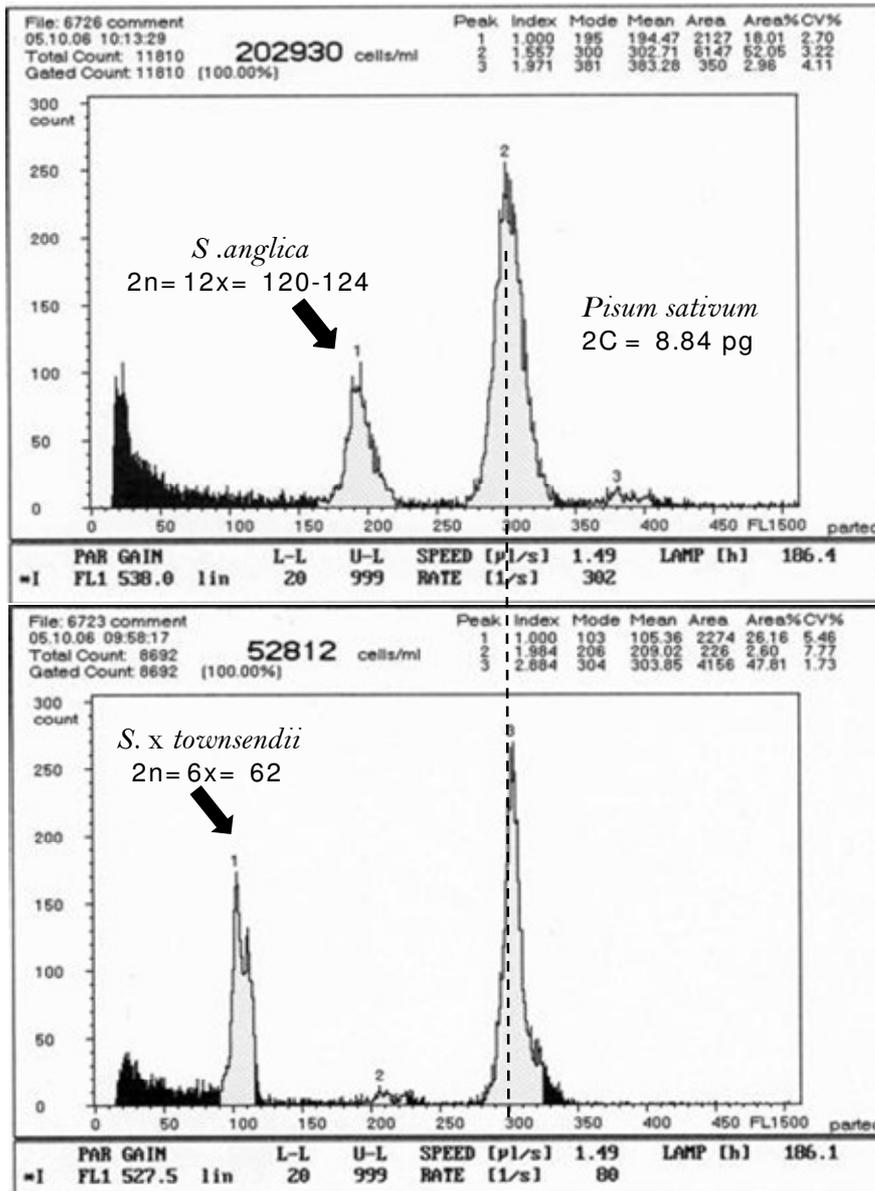


Figure 9. Vérification des niveaux de ploïdie par cytométrie en flux ; les pics indiquent les niveaux de fluorescence des échantillons correspondants en phase G1 du cycle cellulaire

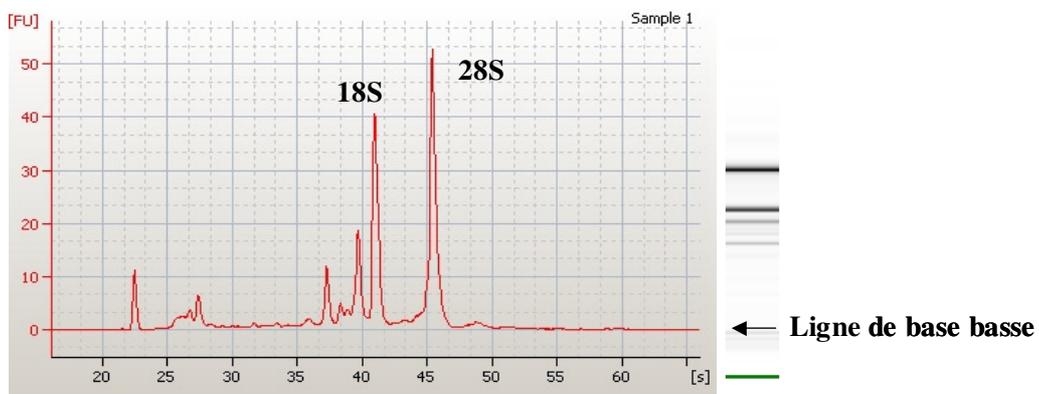


Figure 10. Electrophérogramme d'un extrait d'ARN de *S. anglica* (Bioanalyseur Agilent)

II. Extractions d'ARN et synthèse d'ADNc

II.1. Extraction d'ARN

Les ARN analysés ont été extraits à partir de feuilles de plantes cultivées en conditions contrôlées (en serre) et conservés à moins 80°C comme indiqué précédemment. La mise au point de l'extraction d'ARN sur racines a été réalisée dans la perspective de comparer ultérieurement le transcriptome de plusieurs organes (travail non présenté, projet GENOSPART de séquençage du génome et du transcriptome des feuilles et des racines des spartines).

En raison de la rigidité des feuilles, les ARN de spartines sont délicats à extraire. La première partie de ce travail a donc consisté à mettre au point un protocole d'extraction standard et reproductible. Ce protocole nécessite un broyage minutieux des feuilles (environ 1g de matière fraîche) dans l'azote liquide. Une première phase d'extraction à l'aide de TriReagent (Sigma T9424) puis un premier cycle de précipitation des ARN à l'aide d'isopropanol (Sigma) suivi par un lavage avec de l'éthanol à 75% afin d'éliminer toute contamination, sont ensuite réalisés. Une deuxième étape de précipitation par de l'éthanol à 100% et du Na acétate 3M (pH= 5,3) a permis de maximiser le rendement en ARN extrait des feuilles de spartines. Un dernier cycle de précipitation avec l'isopropanol a été nécessaire pour l'obtention d'ARN de bonne qualité. Les ARN ont ensuite été re-suspendus dans de l'eau ultrapure stérile puis dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc). La qualité de ces ARN a été déterminée en utilisant le kit RNA 6000 Nano LabChip à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Figure 10). Les ARN extraits ont été aliquotés puis stockés à -80°C.

Ces ARNs ont été utilisés d'une part pour des analyses par puces (microarrays) et d'autre part pour la synthèse d'ADNc destinée à la SSAP « Sequence-Specific Amplification Polymorphism », l'AFLP « Amplified Fragment-Length Polymorphism» et aux RT-PCR.

II.2. Synthèse d'ADNc

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) a été réalisé à partir de 50 ng d'ARN de feuilles des échantillons précédemment extraits selon un protocole de transcription inverse pleine longueur et en utilisant le kit InvitroGen (Super Script II Reverse Transcriptase system). La transcription inverse est initiée par une amorce EcoRI possédant une extrémité 3'- libre. Après la synthèse du premier brin, une Taq polymérase va catalyser la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice. Ensuite, la

réaction PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc double brin. Le produit final est un ADN dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt. La qualité des ADNc a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ADNc ont ensuite été stockés à -20°C et utilisés pour différentes expérimentations (analyse globale par AFLP et analyses ciblées de régions flanquant les éléments transposables par SSAP d'ADNc).

II.3. Réalisation d'une banque d'ADNc et séquençage d'ESTs

Les spartines appartiennent à une des lignées des Poacées (sous famille des *Chloridoideae*), pour la quelle très peu d'informations génomiques sont disponibles dans les bases de données. Au début de notre travail, les bases de données d'ESTs « Expressed Sequence Tags » de spartines étaient quasiment inexistantes. En 2007, 2290 ESTs de *S. alterniflora* ont été déposées dans Genbank (Baisackh *et al.* 2007). Afin d'élargir la connaissance des zones codantes chez les spartines, nous avons réalisé une banque d'ADNc chez *S. maritima*. L'ARN de *S. maritima* a été extrait selon la procédure décrite ci-dessus, à partir de 10 plantes échantillonnées dans la même population (Rivière d'Étel, Morbihan, France) et maintenues en serre sous les mêmes conditions. Deux mg d'ARN total de feuilles ont été expédiés à la société MacroGen, Korea (www.macrogen.com), qui a réalisé la banque d'ADNc. Le vecteur *SK Bluescript* a été utilisé lors du clonage de la banque. Nous avons analysé 1056 séquences clonées. Les fichiers de qualité des séquences ont été générés à l'aide du logiciel *Phred* (Ewing *et al.* 1998, Ewing & green 1998). Les séquences ont ensuite été nettoyées en éliminant les portions correspondant au vecteur à l'aide du logiciel *Lucy* (Chou *et al.* 2001). La taille moyenne des séquences obtenues est de 1386 pb. Les séquences ont ensuite été assemblées en 71 contigs et 811 singletons, aboutissant à un total de 882 séquences qui ont été annotées à l'aide du logiciel *blast2go* (<http://www.blast2go.org>). Ces séquences ont été utilisées pour comparer les espèces de spartines entre elles et avec les génomes des plantes modèles voisines dans la famille des Poacées (riz, maïs). Ces comparaisons nous ont permis d'estimer la divergence nucléotidique de portions codantes de 10 gènes entre *S. maritima*, *S. alterniflora* et *Oryza sativa* et de mettre au point des amorces pour des analyses de PCR Q (voir ci-dessous).

III. Analyses du transcriptome

III.1. Choix méthodologiques

Le développement de la génomique fonctionnelle a permis de déployer différentes méthodes qui ont commencé à être appliquées à l'analyse des polyploïdes à partir du début

des années 2000. Dans un premier temps, les changements d'expression ont été étudiés chez les allopolyploïdes en utilisant des méthodes dérivées de l'analyse des polymorphismes comme l'AFLP ou la méthode SSCP (Single Strand conformation Polymorphism) appliquées à l'ADNc (Lee & Chen 2001, Khashkush *et al.* 2002, Adams *et al.* 2003, 2004, Tate *et al.* 2006, Gaeta *et al.* 2007). Ces méthodes présentent l'avantage de cibler simultanément plusieurs centaines de loci, avec la possibilité d'identifier *a posteriori* les fragments polymorphes d'intérêts, en récupérant, réamplifiant et séquençant les bandes d'intérêts. De plus, elles ne nécessitent pas la connaissance préalable du génome étudié. L'avènement des puces à ADN (microarrays) permet aujourd'hui de détecter rapidement les différences d'expression entre les gènes à l'échelle d'un génome complet, et de porter les comparaisons des transcriptomes à plusieurs milliers de gènes. La plupart des technologies employant les puces, requièrent la connaissance du génome ciblé et leur utilisation reste d'autant plus coûteuse qu'elle nécessite plusieurs réplicats techniques et/ou biologiques. Ainsi, chez les polyloïdes, leur emploi reste encore limité à *Arabidopsis* ou aux plantes cultivées (*Triticum*, *Gossypium*), disposant d'un nombre important d'ESTs dans les bases de données, permettant le dessin de sondes homologues.

Le premier travail ayant utilisé les puces pour étudier l'effet de la polyploïdie a été réalisé pour mettre en évidence des changements d'expression entre cytotypes autotétraploïdes et diploïdes chez *Arabidopsis thaliana* par Lee *et al.* (2004) et Wang *et al.* (2004). Ces auteurs ont utilisé des puces composées de 26 000 sondes à longs oligonucléotides (70-mers) désignés sur le génome d'*Arabidopsis*. Le travail de cette équipe a été poursuivi par l'utilisation de ces puces pour l'analyse d'expression de gènes chez l'allotétraploïde naturel *Arabidopsis suecica* (résultant du croisement entre un cytotype tétraploïde d'*A. thaliana* et le tétraploïde *Cardaminopsis arenosa*) et chez des allotétraploïdes synthétiques (Wang *et al.* 2005, 2006). Une puce à long oligonucléotides (70-mers) a également été développée chez le blé allohexaploïde par Pumphrey *et al.* (2009) pour comparer l'expression des génomes parentaux et ceux d'un allopolyploïde synthétique. Enfin, le coton allotétraploïde (*Gossypium hirsutum*, génome AADD) est le modèle polyploïde qui a été à ce jour le plus étudié par microarrays. Deux types de puces ont été développés chez ce modèle. Le premier type est comme pour les modèles précédents, basé sur des oligonucléotides longs (60-mers) désignés à partir d'une large collection d'ESTs de coton, permettant de comparer les variations globale du transcriptome des parents et de

l'allopolyploïde (Chaudhary *et al.* 2008, Flagel & Wendel, 2008, Flagel *et al.* 2010, Rapp *et al.* 2009).

Le second type de puces relève d'une démarche originale et unique à ce jour dans la littérature des polyploïdes, visant à différencier pour chaque gène les deux copies homéologues provenant des génomes diploïdes A et D. Ces puces sont constituées de sondes courtes d'oligonucléotides (20-25 mers, Nimblegen) désignées dans des régions différentielles contenant des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) permettant d'hybrider alternativement l'un des deux génomes A ou D, au niveau de centaines de paires de gènes homéologues (Udall *et al.* 2006). Cette méthode, qui requiert également une large connaissance des génomes des espèces parentales et un travail préalable de détection des SNPs à grande échelle, permet de pallier l'une des principales limites de l'emploi des puces chez les génomes redondants de la plupart des plantes, à savoir la difficulté à différencier les gènes dupliqués ayant conservé suffisamment d'homologie pour s'hybrider sur la sonde d'un gène donné (Poole *et al.* 2007). La combinaison de ces deux types de puces a permis d'examiner chez différents allopolyploïdes du genre *Gossypium* les conséquences transcriptomiques de l'allopolyploïdie dans plusieurs organes, dans différents contextes évolutifs (espèces sauvages ou domestiquées) et à différentes échelles de temps chez des allopolyploïdes synthétiques ou naturels (Hovav *et al.* 2008, Flagel *et al.* 2008, 2009, 2010 Chaudhary *et al.* 2009, Rapp *et al.* 2009).

Chez les polyploïdes non modèles et ne disposant pas de ressources génomiques, deux approches alternatives ont été développées: la première a consisté à utiliser des sondes anonymes d'ADNc pour comparer les transcriptomes des parents, hybrides et allopolyploïdes chez *Senecio* (Hegarty *et al.* 2005, 2006, 2008). Les transcrits montrant une expression différentielle peuvent être séquencés et identifiés *a posteriori*. Une puce à sondes anonymes d'ADNc de tournesol a permis de montrer l'effet de l'hybridation chez l'hybride homoploïde *Helianthus deserticola* (Lai *et al.* 2006). Cette méthode a également été utilisée pour examiner les conséquences de l'autopolyploïdie chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Stupar *et al.* 2007). La seconde méthode consiste à utiliser une puce désignée sur une espèce modèle proche, en se basant sur la conservation des séquences géniques permettant ainsi une hybridation hétérologue. Cette approche, a été employée récemment en chez le colza allotétraploïde (*Brassica napus*) par Gaeta *et al.* (2009). Ces auteurs ont utilisé la puce à oligonucléotides (70-mers) de l'espèce modèle *A. thaliana*.

La spartine est une plante non modèle avec un génome peu connu, ainsi la conception des puces à sondes ADN spécifique de spartines aurait demandé du temps et des moyens de

séquençage considérables. Nous avons choisi d'utiliser les ressources génomiques du riz, plante modèle de la même famille dont le génome est séquencé, et d'explorer l'utilité d'une puce à longs oligonucléotides développée par la société Agilent. Les hybridations de l'ARN des spartines sur les puces de riz ont été réalisées à la plateforme transcriptomique Biogenouest® (Université de Rennes 1, campus de Villejean, Rennes).

Nous avons été confortés dans cette démarche, à la suite des tests préliminaires ayant montré un alignement satisfaisant (86-93% d'identité) entre les séquences de riz et les séquences issues de la banque d'ADNc de *Spartina maritima* (voir résultats chapitre 4). Nous avons complété cette approche en analysant les conséquences transcriptomiques de la spéciation allopolyploïde dans les régions voisines d'éléments transposables par SSAP d'ADNc. De plus, nous avons comparé nos résultats aux données de l'analyse globale du transcriptome des spartines par AFLP d'ADNc réalisée au laboratoire par Nathalie Pourtau et Xavier Dauvergne.

III.2. Analyse globale du transcriptome des spartines par microarrays

Cette analyse a été effectuée à l'aide des puces à oligonucléotides de riz 4x44k (Agilent, G2519F). Il s'agit d'une puce pangénomique contenant 42.803 sondes oligonucléotides de 60 mers couvrant 21.509 gènes du génome du riz. Les oligonucléotides sont déposés en 4 exemplaires sur une même lame. Nous avons dans un premier temps réalisé un test préliminaire d'hybridation des ARN de spartines sur la puce de riz, avant de réaliser l'expérimentation complète impliquant les cinq espèces de spartines.

III.2.1. Test préliminaire

Ce test avait pour but d'évaluer le niveau d'hybridation des ARNs de spartines sur la puce de riz et de vérifier la stabilité des niveaux d'hybridation d'une lame à l'autre. Compte tenu du coût de cette manipulation exploratoire, seules les espèces parentales (*S. maritima* et *S. alterniflora*) et l'allopolyploïde *S. anglica* ont été testées. Nous avons utilisé la technologie de marquage double couleur selon le protocole décrit par Agilent (<http://www.chem.agilent.com/scripts/>). Cette technique qui utilise deux fluorochromes Cyanines : Cy5 (émission de fluorescence à une longueur d'onde de 662 - 670 nm, couleur rouge) et Cy3 (émission de fluorescence à une longueur d'onde de 563 - 570 nm, couleur vert) (Figure 11), permet de comparer les niveaux d'expressions relatifs de deux transcriptomes différents sur une seule puce.

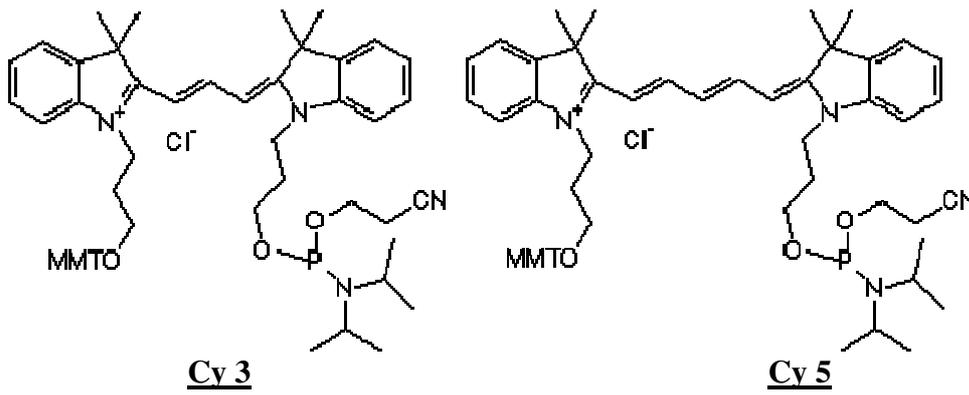


Figure 11. Fluorochromes marqueurs d'ARN (Cy3 et Cy5)

Extraction et vérification de la qualité des ARNs

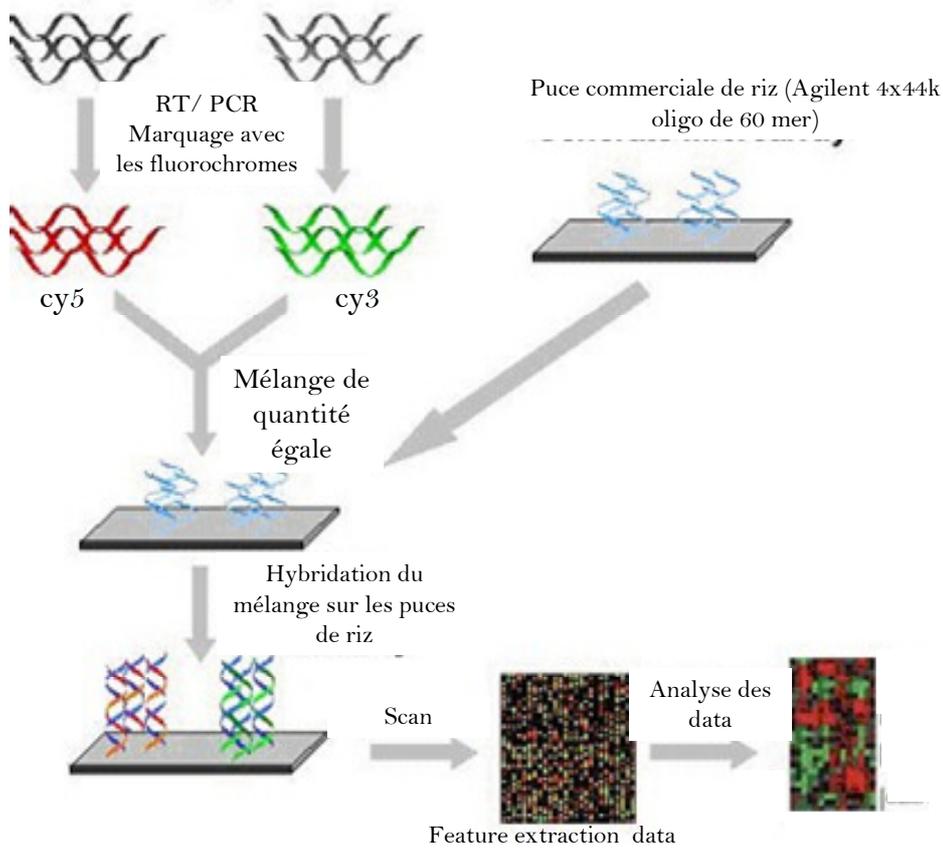


Figure 12. Etapes de marquage et d'hybridation des ARN en double couleur

Ceci nous a permis d'avoir un référent commun pour les 4 puces, représenté par un « pool » équimolaire des ARN des 3 espèces de spartines étudiées (Marqué en vert: Cy3), contre lequel on hybride l'ARN de chaque espèce de spartine (marqué en rouge: Cy5). Les étapes montrant l'obtention d'ARN simple brin fluorescent sont décrites dans le protocole Agilent et sont illustrées dans la Figure 12. Pour valider la technologie employée, nous avons hybridé sur la première puce un extrait d'ARN de riz marqué en Cy5 contre le pool référent de spartines. Les trois autres puces ont été hybridées chacune avec de l'ARN d'une espèce de spartines contre le pool référent.

Le dépôt des cibles marquées sur les puces déclenche l'hybridation qui se réalise pendant 17 heures à 65°C dans un four rotatif Agilent. Cette étape est suivie d'un lavage du substrat qui permet l'élimination des cibles non fixées. Après séchage, la puce est scannée (scanner Agilent G2565BA) afin d'analyser les intensités d'hybridation.

III.2.2. Hybridation des cinq espèces de spartines

Au vu des résultats obtenus précédemment, un dispositif expérimental impliquant les 5 espèces de spartines concernées (les deux parents, les deux hybrides F1 et l'allopolypléide) a été mis en place. La double couleur utilisée précédemment offre l'avantage de déposer deux échantillons par puce, mais étant donné le coût du marquage des échantillons, nous nous sommes orientés vers un plan d'hybridation mono couleur. Cette technique, permet de s'affranchir du biais lié aux couleurs. Les tests de fiabilité et de stabilité à été réalisé à la plateforme Biogenouest® (Université de Rennes 1). L'économie de marquage réalisée nous a permis d'augmenter le nombre de répliqués.

Cinq répliqués biologiques par espèce ont été hybridés contre les oligonucléotides de la puce de riz. Un mélange équimolaire d'ARN des deux parents correspondant à la Mid Parent Value « *MPV* » a été réalisé pour simuler un transcriptome « hybride » et tester l'hypothèse nulle d'additivité des profils d'expression parentale chez les deux hybrides *S. x townsendii* et *S. x neyrautii*. Cette additivité d'expression attendue a été également simulée « *in silico* » en additionnant les profils d'expression moyens obtenus chez les deux espèces parentales « *MPV* ». Ces deux méthodes d'estimation de Mid Parent Value « *MPV* » pour comparer les transcriptomes d'hybrides ou d'allopolypléides à leurs parents sont utilisées de façon équivalente dans la littérature.

Le marquage monocouleur (en Cy3) des puces à ADN a été réalisé selon le protocole de marquage du « One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis » (<http://www.chem.agilent.com>).

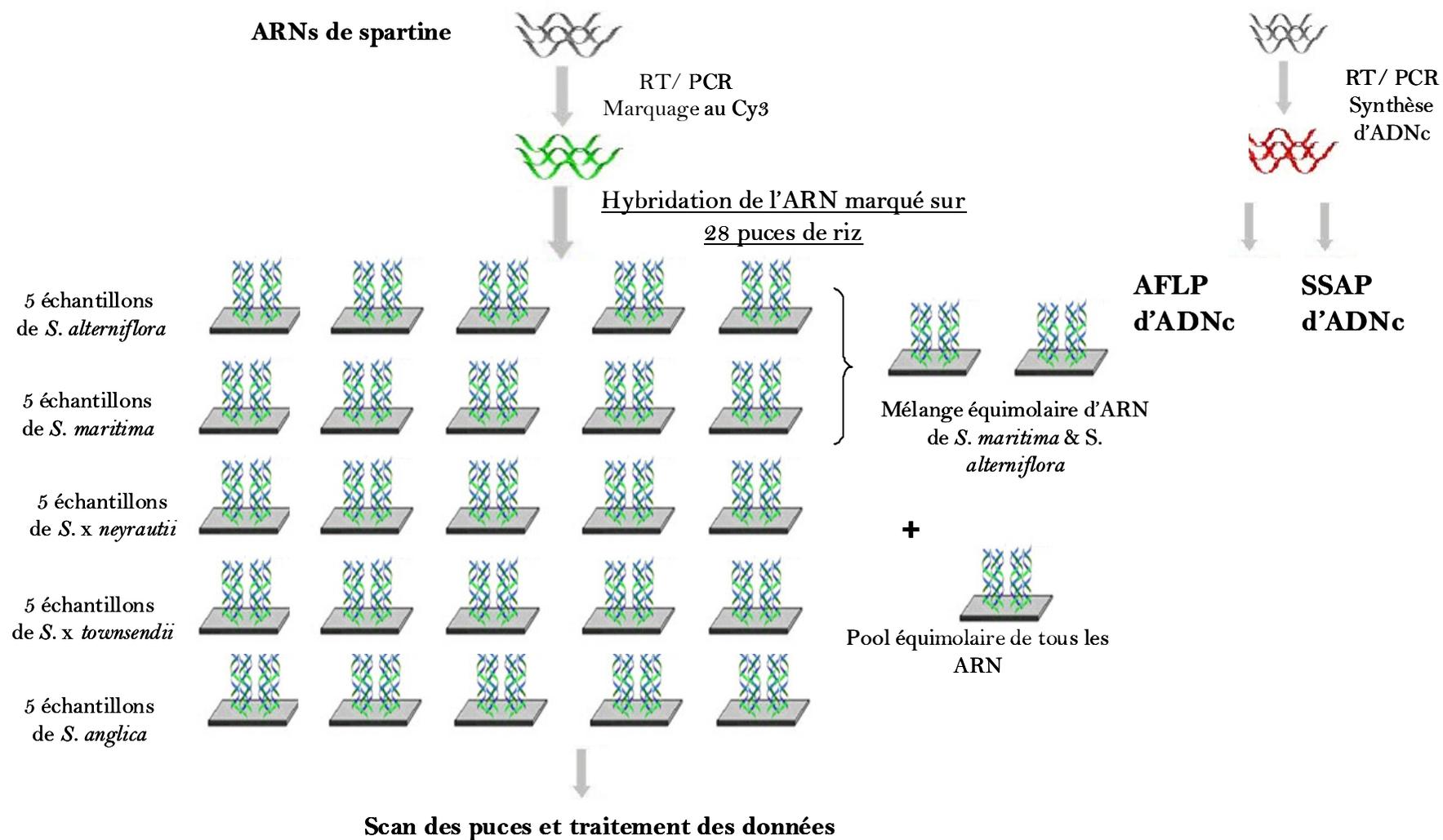


Figure 13. Schéma récapitulatif des méthodes utilisées pour l'analyse du transcriptome chez les spartines

Le marqueur Dye Spike (Agilent One-Color Spike-Mix) a été utilisé tout au long de cette étape afin d'éviter les biais de marquage. Ce marqueur, dilué 1000 fois a été ajouté à 500 ng de chaque échantillon d'ARN total selon les recommandations d'Agilent. Les réactions de marquage ont été réalisées à l'aide du Kit d'amplification Low ARN (Agilent) en présence de Cyanine 3-CTP. L'ARNc marqué (5 échantillons par espèce) a été hybridé individuellement sur les puces de riz (25 réactions d'hybridation). En outre, un mélange équimolaire d'ARNc des deux parents a été hybridé sur deux puces supplémentaires. Un mélange équimolaire de tous les ARN marqués a aussi été hybridé sur une autre lame pour contrôle, soit 28 puces hybridées au total (Figure 13). Les ARNc marqués ont ensuite été fragmentés et hybridés sur les puces à 65°C pendant 17 heures. Les puces hybridées ont ensuite été lavées dans un premier tampon de lavage à température ambiante pendant 1 minute. Ce premier lavage a été suivi d'un rinçage pendant 1 minute et d'un second lavage avec du « Wash Buffer 2 » (Agilent Gene Expression Wash Buffer 5188-5326) à 37°C.

III.2.3. Analyses des données de puces

Filtrage et normalisation des données

Les données acquises par le scanner Agilent (G2565BA) ont été extraites à l'aide du logiciel Feature Extraction (version 9.5, Agilent). Les fichiers extraits ont été chargés dans le logiciel *GeneSpring*® GX (deux versions de ce logiciel: 7.3 et 10 ont été successivement utilisées) pour analyses ultérieures. Tous les spots obtenus signalés comme non uniformes ou saturés par le logiciel Agilent Feature Extraction (Agilent), ont été considérés comme absents par le logiciel *GeneSpring* GX. Ces spots ont donc été exclus de l'analyse. Seuls les spots (« flags ») désignés comme présents ou marginaux dans les cinq réplicats ont été utilisés pour analyser les changements transcriptomiques chez les spartines. Les données ont ensuite été normalisées dans *GeneSpring* GX 10 de la façon suivante:

- Transformation des données: les valeurs d'intensité inférieure à 0,01 ont été fixées à 0,01.
- Normalisation par puce: chaque mesure d'intensité prise sur une puce a été divisée par l'intensité médiane de toutes les mesures effectuées sur toutes les puces.
- Normalisation par gène: pour chaque gène, les valeurs d'intensité d'expression dans chaque puce ont été normalisées à la valeur d'intensité médiane de ce gène dans les 28 puces au cinquantième percentile.

L'intensité du signal de chaque gène utilisé pour les analyses statistiques est une moyenne des intensités normalisées à travers les cinq réplicats de chaque espèce.

Après les étapes de normalisation, une analyse hiérarchique par clustering nous a permis d'évaluer les corrélations entre les différentes puces de la même espèce et de filtrer les puces qui montrent un faible coefficient de corrélation.

Analyse statistique des données

Afin d'estimer le nombre de gènes de spartines qui s'hybrident avec les oligos de riz, la variance par gène a été estimée en utilisant le logiciel R (<http://www.r-project.org/>). Un gène est considéré comme « exprimé » chez une espèce donnée s'il est hybridé sur au moins deux puces.

L'identification des gènes différentiellement exprimés entre les différentes espèces de spartines s'est appuyée sur des analyses statistiques de variance ($p < 0,05$) avec la correction de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995) au moyen du logiciel *Genespring*.

Certaines comparaisons ont été effectuées en utilisant le critère du « fold change » qui correspond au ratio des niveaux d'expression d'un gène donné dans deux échantillons différents (Tusher *et al.* 2001). Pour chaque comparaison, une confrontation des listes des gènes différentiellement exprimés fournies par les deux méthodes (statistique et le fold change), a été réalisée. Cette comparaison nous a permis d'ajuster le seuil du ratio du fold change le plus adapté selon les analyses et les objectifs de l'étude. Plusieurs études ont montré la fiabilité (reproductibilité des listes des gènes obtenues par les deux tests) de ces deux méthodes dans la détection des gènes différentiellement exprimés par les puces (Shi *et al.* 2006, Guo *et al.* 2006).

Les catégories fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés entre les espèces de spartines ont été identifiées par le logiciel *Gene Ontology* (www.gene-ontology.org) intégré à *GeneSpring* et par le logiciel *Easy go* (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/easygo>).

III.3. Validation par PCR-Q

Afin de confirmer les profils d'expression observés avec les données de puces, deux échantillons d'ARN par espèce (avec trois répétitions techniques par échantillon) ont été analysés de façon quantitative par PCR Q (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA). L'ARN total (100 ng) de chaque échantillon a été transcrit en utilisant des oligo dT et la transcriptase inverse *Superscript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Des échantillons RT⁻ d'ARN (amplifié sans enzyme de transcription) ont permis de contrôler l'existence d'une contamination des échantillons d'ARN par l'ADN génomique. À chaque échantillon dilué d'ADNc, on a rajouté 2µl de SYBR Green TaqMan® (Applied Biosystems) et les amorces spécifiques à chaque gène. Les amorces utilisées ont été conçues à l'aide du

logiciel primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) et choisies pour amplifier des séquences de 180 à 200 pb. Toutes les données ont été normalisées au moyen de répétitions par rapport à un gène de ménage qui est le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GA3PDH) (Baisakh *et al.* 2006).

La sélection des gènes validés par PCR quantitative s'est faite à partir de la banque d'ADNc de *S. maritima* et a été basée sur les différences de niveau d'expression détectées entre les différentes espèces de spartines (données microarrays). Les gènes choisis et leurs amorces correspondantes sont indiqués dans le Tableau 2.

III.4. Analyse des polymorphismes transcriptomiques par SSAP et AFLP

Les régions voisines des éléments transposables semblent représenter un compartiment dynamique chez les spartines, puisqu'elles subissent d'importants changements de méthylation de l'ADN (Parisod *et al.* 2009). Nous avons donc comparé les profils d'expression des différentes espèces de spartines en ciblant les régions flanquant les éléments transposables par la méthode SSAP; ces résultats ont également été confrontés à ceux obtenus aléatoirement sur l'ensemble du génome par AFLP d'ADNc.

III.4.1. Présentation des éléments transposables

Les éléments transposables se répartissent en deux grandes classes selon leur mécanisme de transposition (Figure 14) :

- Les éléments de la classe I ou rétrotransposons se déplacent et se copient via un ARN intermédiaire par un mécanisme «copier-coller». Les rétrotransposons bordés de LTR (Long Terminal Repeats) forment le type le plus commun des ETs chez les plantes à gros génome (San Miguel & Bennetzen 1998, Vicient *et al.* 2001). Ils sont divisés en sous classes Ty1/*copia* et Ty3/*gypsy* selon l'organisation des fonctions de leur séquence codante (Reverse transcriptase/endonucléase). Les éléments TRIM (Terminal-repeat Retrotransposon In Minature) sont de petits éléments dépourvus de séquences codantes et ne sont donc pas autonomes. Les rétrotransposons sans LTR ou rétroposons sont divisés en longues et courtes séquences entrecoupées par des éléments nucléaires: les LINE (Long Interspersed Nuclear Element) qui sont des longues entités très simples, codantes et autonomes mais limitées au volume cellulaire et les SINE (Short Interspersed Nuclear Element) qui sont des petits éléments non-autonomes s'amplifiant via un intermédiaire ARN.

Tableau 2. Listes d'amorces et de gènes validés par pcr Q.

Régions codantes (<i>S. maritima</i> ESTs)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Vacuolar <i>ATPase</i> B subunit	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
18S Ribosomal	GGAAACAGCCCAATTCTTCA	ACAAGAACGTGTTTGCCACA
Poly(A)-binding protein	TGGATGCTGCAAGAGCTATG	AGATTGGCCCATTTTCATCTG
28S Ribosomal	CATGGGTAAGCCGATCCTAA	CAGGCCGTTAAGCAGAAAAG
<i>OsPAG1</i>	GGTCTATGGGGAACCCATTT	TTTGCAGCCTGTCTTCCTTT
Actin	CTGCCATGTATGTTGCCATC	TAGCCCCTCTCGGTAAGGAT
Ribulose-phosphate 3-epimerase	CCCTTCCATCCTATCTGCAA	GATCAGTCACTGGACGCAGA
<i>NADPH</i> oxidase	TGTATGACGTCAGGCTCTCG	TCCAACCCAACCACTAAAGC
Malate synthase-like family protein	GGTGTCCCGACTTTCCTGT	CAGCCATGCTTCTCTCCTTC
PCK *	*CAGCGACAGCTCCCTCAAGT	*CGATCTTGTAGCTGGCGAACAC
GA3PDH**	**AGAGTGCCTCGTCAAGGAGA	**CTCCCAAGCAATCCTCATGT

* d'après Christin *et al.* (2009), ** d'après Baisack *et al.* (2006). PCK : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

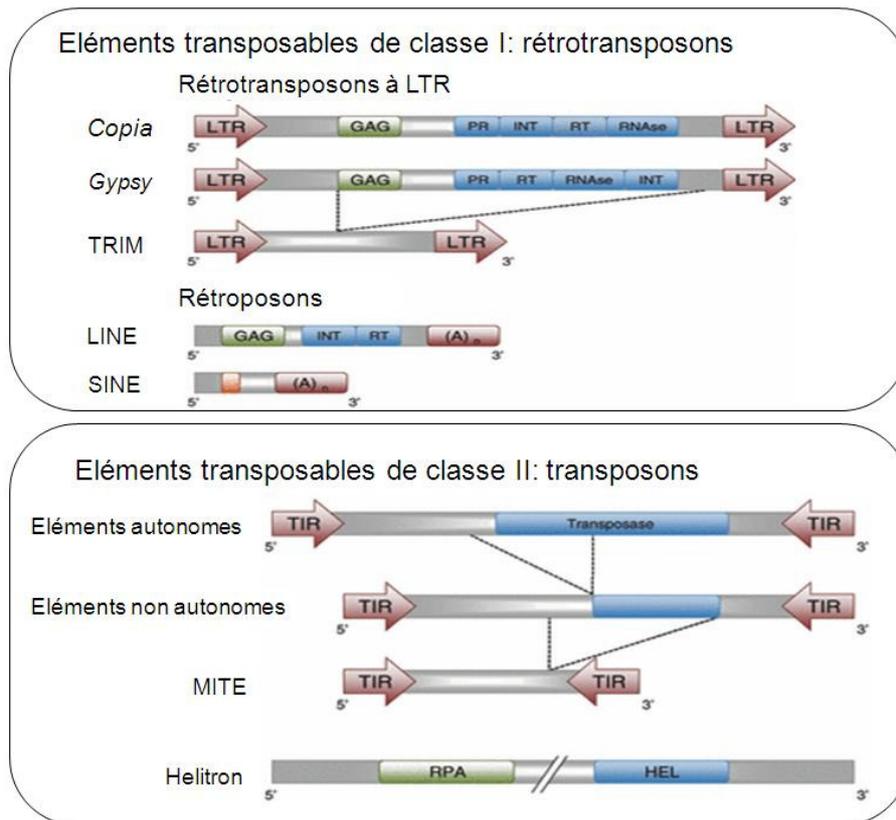


Figure 14. Différentes classes d'éléments transposables (modifiée d'après Parisod *et al.* 2010). GAG : protéine de capsid; PR : protéase; INT : intégrase, RT : transcriptase inverse, RNase : ribonucléase; RPA : protéine de réplication; HEL : hélicase.

- Les éléments de la classe II ou transposons à ADN, se passent de l'étape ARN et se déplacent via des intermédiaires ADN par un mécanisme «couper-coller». Ce sont des éléments plus courts que les éléments de classe I et leur mode de transposition limite leur volume de séquence dans le génome. La plupart des transposons à ADN sont bordés de TIR (Terminal Inverted Repeat) caractéristiques de chaque famille, et se décomposent en éléments complets autonomes, porteurs d'une transposase active (et de plusieurs autres fonctions chez certains éléments complexes), et en éléments non autonomes, transactivables par un élément autonome de la même famille. Les MITE sont dépourvus de séquences codantes, et sont probablement une forme particulière de dérivés non autonomes d'éléments complets (Mhiri & Grandbastien 2004, Wicker *et al.* 2007).

Les deux classes comportent des éléments non-autonomes : les SINE pour la classe I et les MITE pour la classe II. Ces éléments sont de petites tailles et ne contiennent pas de séquences codantes. Ils utilisent donc les enzymes codées par des transposons autonomes pour se répliquer ou transposer.

Nous avons choisi d'analyser sur ADNc les mêmes éléments que ceux précédemment étudiés sur ADN génomique par Parisod *et al.* (2009) chez les mêmes espèces de spartines. Deux éléments de classe I (*Wis-like* et *Cassandra*) et un élément de classe II (*Ins2*) ont été étudiés. *Wis-like* est un rétrotransposon de type Ty1/*copia*-LTR d'environ 5 KB (Schulman *et al.* 2002) détecté chez l'allopolyploïde *S. anglica* par Baumel *et al.* (2002b). *Wis-like* possède la structure caractéristique d'un rétrotransposon, avec les régions LTR encadrant des zones codant les enzymes nécessaires à leur répllication (protéases, intégrases, et transcriptases inverses). La région LTR de cet élément est très semblable à celle de l'élément *BARE 1* isolé chez l'orge (Vicent *et al.* 1999, 2005). Après un alignement des séquences disponibles de l'élément *Wis like* chez les *Poaceae*, une amorce (Tableau 3) a été désignée dans la partie conservée de l'extrémité 5' de l'élément.

Tableau 3. Amorces des éléments transposables utilisées en SSAP

Ets	Classe	Séquence (5'-3')
<i>Cassandra</i> (Kalendar <i>et al.</i> 2008)	I :Terminal Repeat rétrotransposons In Miniature (800 pb)	CTTAACCCCAGAGTTCTCTGCAG
<i>Wis-like</i> (Baumel <i>et al.</i> 2002b)	I : Long Terminal Repeat (LTR) rétrotransposons (5 KB)	TGAGTGAATC CTCGACATCG
<i>Ins2</i> (Ralston <i>et al.</i> 1988)	II : Transposon non autonome (367 pb)	GCCCGTTTAGCACGAAAAA

Le deuxième élément étudié, *Cassandra* est un TRIM (Terminal-repeat Retrotransposon In Miniature) de 800 pb isolé chez *S. alterniflora* (GB accession AY603377) par Kalendar *et al.* (2008). La région LTR de cet élément varie de 240 à 350 pb selon les espèces (Whitte *et al.* 2001) et contient des domaines très conservés correspondant à des promoteurs de l'ARN polymérase III qui transportent des séquences d'ARN 5S. Cet élément apparaît donc nécessaire aux gènes de l'ARN ribosomique (en tant que promoteur) et il apparaît capable de s'intégrer dans d'autres gènes ou protéines (Kalendar *et al.* 2008).

Le troisième élément (de classe II), *Ins2* est un transposon non autonome de 367 pb isolé du Maïs par Ralston *et al.* (1988). *Ins2* est bien conservé à travers les espèces. Les séquences de type *Ins2* ont été détectées chez le riz, ainsi que dans la région promotrice et la région 3'UTR de certains gènes du maïs (Jiang *et al.* 2004). Chez le riz, *Ins2* a une longueur de 581 bp. Les premières 14 pb sont identiques entre le riz et le maïs. De même, cet élément est flanqué par 8 pb qui se répètent et qui sont identiques entre le riz et le maïs (Goettel & Messing 2009). L'amorce utilisée pour l'amplifier chez la spartine est présentée dans le Tableau 3.

III.4.2. La méthode du « Transposon Display »

Afin de détecter des changements de profils transcriptomiques (de l'ADNc) dans l'environnement des éléments transposables chez les hybrides et l'allopolyploïde, nous avons utilisé une méthode dérivée de l'AFLP, proche de la SSAP permettant de mettre en évidence les polymorphismes d'insertion des éléments transposables dans les génomes (Waugh *et al.* 1997).

Les protocoles utilisés sont ceux préalablement mis au point chez le maïs (M Tenailon, communication personnelle) et adaptés aux spartines (Parisod *et al.* 2009), en collaboration avec l'équipe de M-A Grandbastien à l'INRA de Versailles, et dans le but d'analyser de façon parallèle le polymorphisme d'insertion sur ADN génomique (Parisod *et al.* 2009) et sur transcriptome (ADNc).

Sept µl d'ADNc ont été digérés par une paire d'enzymes de restriction (*EcoRI* et *MspI* dans notre cas), et les fragments obtenus sont ligués à des adaptateurs. Après dilution de l'ADNc digéré et ligué, une pré-amplification de 3 µl est réalisée à l'aide de l'amorce complémentaire de l'adaptateur *MspI*+ C. La PCR présélective a été effectuée pendant 28 cycles (94 °C pendant 30 s, puis 60 °C pendant 1mn, 72 °C pendant 3 mn), suivis d'une extension finale à 72 °C pendant 3 mn. Après vérification sur gel de la qualité de l'ADNc pré amplifié, une réaction de PCR sélective est réalisée avec cet ADN pré amplifié et dilué à l'aide de deux amorces, dont l'une est complémentaire à l'adaptateur (*MspI*+C) et l'autre

correspond à une amorce spécifique d'un élément transposable (Figure 15). Les amorces des éléments transposables sont marquées au Phosphore 33. La PCR a été réalisée en 25 cycles à 94 ° C pendant 30 s, puis 56° C pendant 30 s, et 72° C pendant 1mn. Afin de limiter les fluctuations liées à la technique (exemple: digestion incomplète de l'ADNc de certains échantillons par les enzymes de restriction), chaque échantillon d'ADNc a été digéré deux fois selon le protocole décrit ci-dessus et seules les bandes répliquables ont été analysées.

Les produits amplifiés sont alors séparés en fonction de leur taille sur des gels de polyacrylamide à haute résolution à 6% pendant 5 h (75 V, limité à 2000 W) permettant d'analyser les profils d'insertion : la présence d'une bande traduit l'existence d'une insertion de l'élément à un endroit donné du transcrit, tandis que l'absence de celle-ci indique une mise sous silence potentielle du transcrit correspondant à une modification de structure (absence de l'insertion ou mutation sur le site de restriction).

La comparaison des profils d'insertion entre les différentes espèces a permis de détecter les fragments polymorphes, dont ceux résultant de changements intervenus chez les hybrides et/ou l'allopolypléide (Figure 15). Environ 24 bandes polymorphes ont été excisées des gels de polyacrylamide et éluées chacune dans 100 µl d'eau. L'ADNc a été extrait à partir du gel de polyacrylamide par un cycle de 30 min à 37° C suivi par un cycle de 5 min à 94° C. Ces fragments ont été réamplifiés en utilisant le même couple d'amorce incluant l'ET correspondant (amorce non marquée), et les produits PCR obtenus ont été séquencés. Les séquences résultantes ont été comparées avec la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant BLASTN.

III.4.3. Analyse du polymorphisme transcriptomique par AFLP d'ADNc

L'application de l'AFLP sur ADNc a été développée par Bachem *et al.* (1996), qui ont adapté le protocole standard de l'AFLP décrit par Vos *et al.* (1995). Ce protocole a été appliqué au laboratoire par N. Pourtau et X. Dauvergne sur les mêmes échantillons d'ADNc utilisés en SSAP de cDNA.

Sept microlitres d'ADN complémentaire ont été digérés par deux enzymes de restriction (*EcoRI* et *MseI*) à 37°C pendant 3 h. L'ADN complémentaire digéré a été ligué à des adaptateurs *EcoRI*, et *MseI* à l'aide d'une T4ADN ligase (Invitrogen). Une première pré-amplification sélective a été accomplie en utilisant des amorces *EcoRI* + 1 et *MseI* + I (Tableau 4). Chaque réaction de PCR contenait 5 pg de chaque amorce, 200 µl de dNTP et 0,5 de unités la GoTaq ADN polymérase (Promega). Après vérification de la qualité des pré amplifications (sur gel d'agarose), une amplification sélective a été effectuée avec amorces sélectives *EcoRI* + 3 et *MseI* + 3 marquées aux fluorochromes IRD 700nm et IRD 800nm.

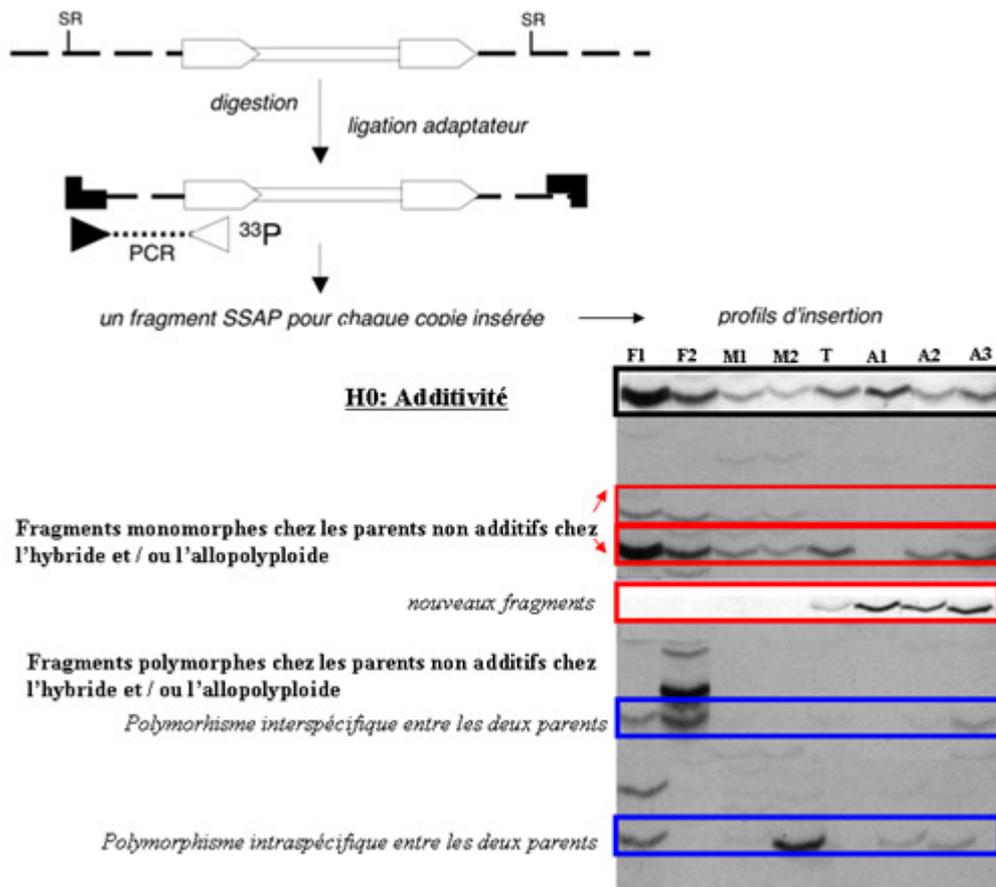


Figure 15. Principe de la SSAP (« Sequence-Specific Amplification Polymorphism ») et détection des polymorphismes. F1: *S. alterniflora* (F), F2: *S. alterniflora* (UK), M1: *S. maritima* (F), M1: *S. maritima* (F), T: *S. x townsendii* (UK), A1: *S. anglica* (F), A2: *S. anglica* (F), A3: *S. anglica* (UK). F: échantillons récoltés en France, UK: échantillons récoltés en Angleterre

Tableau 4. Combinaisons d'amorces utilisées en AFLP

		Mse+		
		CAA	CAC	CAG
Eco+	AAC	X	X	
	ACA	X	X	X
	ACG	X	X	
	AGA	X	X	X
	AGT			X
	ATG			X
	ATA			X
Eco+	CAA	X	X	X
	CAC	X	X	X
	CAG	X	X	
	CAT	X	X	
	CTA			X

Vingt-quatre combinaisons d'amorces (*EcoRI* et *MseI*) ont été utilisées dans les réactions d'amplification sélective (Tableau 4).

Les réactions d'amplification sélective ont été déposées sur des gels de polyacrylamide à 6,5% en utilisant un système de gel sur un séquenceur Licor. Les profils AFLP obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Quantar Pro (Keygene, version 1.04). Seuls les fragments d'AFLP visibles sans ambiguïté et reproductibles ont été pris en compte dans les analyses. Les fragments présents chez tous les individus sont décrits comme monomorphes, alors que ceux absents chez au moins un individu sont décrits comme polymorphes. La présence d'une bande témoigne de la présence d'un transcrit, tandis que son absence peut résulter d'une mise sous silence ou d'une modification structurale du site de restriction. Comme précédemment, une sélection de fragments polymorphes d'intérêts a été excisée, réamplifiée, clonée et séquencée pour identification.

III.4.4. Analyse des données et démarche suivie

Les fragments amplifiés ont été marqués comme présents (1) ou absents (0) afin de créer une matrice de données binaire des différents profils SSAP et AFLP obtenus. Les hybrides et l'allopolypléide ont été comparés à un Profil Additif Théorique « *PAT* » des deux parents correspondant soit à l'addition des profils observés chez les deux parents (un fragment présent chez au moins un individu d'une espèce parentale est considéré présent dans le profil additif) soit à un mix équimolaire d'ADN des deux espèces parentale (analyse AFLP, d'après Salmon *et al.* 2005, Salmon *et al.* données non publiées). La matrice obtenue a été soumise à une analyse phénétique (Analyse en coordonnées principales (ACP) basée sur une matrice de distance de Dice (Dice 1945, Nei & Li 1979). Ces individus ont alors été positionnés dans un espace à deux dimensions, défini par les deux premières coordonnées (C1 & C2). Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel *R* (<http://www.r-project.org/>).

Les matrices de données de présence-absence (1/0) nous ont aussi permis de déterminer pour chaque élément transposable étudié, comme pour l'ensemble des 3 ETs, la proportion des fragments polymorphes au niveau intraspécifique (plusieurs échantillons ont été analysés par espèce) et interspécifique. Un intervalle de confiance à 95% a été calculé pour tous les pourcentages obtenus selon la méthode de Newcombe (1998) à l'aide du logiciel *VassarStats* (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

Nous avons ainsi comparé les résultats obtenus à ceux obtenus sur ADN génomique de spartines avec les mêmes Ets par Parisod *et al.* (2009). La comparaison statistique des

différents pourcentages a été réalisée avec logiciel *VassarStats* et en se basant sur le calcul du *Z* ratio.

Ces analyses comparatives nous permettront ainsi de confronter les effets de la spéciation allopolyploïde de façon globale (par AFLP) et de façon ciblée (dans les zones voisines d'éléments transposables) au niveau du génome (ADN) et du transcriptome (ADNc).

Chapitre 4

**Divergence transcriptomique entre les
espèces parentales
S. maritima & *S. alterniflora***

Ce chapitre fait l'objet d'une publication, acceptée dans *Molecular Ecology* (« **Transcriptome divergence between the hexaploid salt-marsh sister species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae)** »).

A travers cet article, nous étudions les conséquences transcriptomiques de la spéciation divergente entre les deux espèces parentales *S. maritima* (native des côtes atlantiques euro-africaines) et *S. alterniflora* (originaire des côtes atlantiques est-américaines). Ces deux espèces présentent une écologie contrastée sur les marais salés : *S. maritima* est une espèce en régression dans sa zone native où elle occupe les zones pionnières du shore, et tolère de plus longues périodes d'immersion dans l'eau salée, tandis que *S. alterniflora* remonte le long des estuaires et tolère des eaux plus saumâtres. Elle se comporte volontiers comme une espèce envahissante là où elle a été introduite et présente aujourd'hui une large distribution sur plusieurs continents.

Nous avons dans un premier temps utilisé une banque d'EST de *Spartina maritima* réalisée au laboratoire afin d'évaluer la divergence nucléotidique entre *S. maritima* et *S. alterniflora* sur une dizaine de zones codantes du génome nucléaire. Nous avons ensuite comparé ces gènes aux homologues putatifs de riz, identifiés par analyses de similitude. Cette dernière comparaison nous a permis de vérifier que les zones codantes entre le riz et les spartines étaient suffisamment conservées (84 à 92% d'identité) pour envisager raisonnablement l'utilisation d'une hybridation hétérologue de l'ARN des spartines sur une puce de riz.

Le transcriptome des deux espèces de spartines a été analysé à l'aide des puces de riz Agilent à oligonucléotides longs (60-mers) en utilisant cinq réplicats biologiques par espèce. Les résultats sont répétables, et nous avons pu hybrider environ 70% des gènes représentés sur la puce de riz. Nous avons ainsi détecté l'expression différentielle de 1247 gènes entre les deux espèces (13% des gènes analysés) dont la majorité sont sur-exprimés chez *S. alterniflora* et ont été identifiés comme impliqués dans la croissance et le développement cellulaire. Les différences d'expression sont discutées en relation avec les différences morphologiques et écologiques que ces espèces ont développé depuis leur divergence à partir d'un ancêtre commun hexaploïde il y a environ 2 à 3 millions d'années.

Transcriptome divergence between the hexaploid salt-marsh sister species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae)

Chelaifa H.¹, Mahé F.¹, Ainouche M.^{1*}

¹ UMR CNRS 6553 University of Rennes 1, Bât. 14A Campus de Beaulieu 35 042 Rennes Cedex (France)

*Corresponding author: Malika Ainouche, Université de Rennes 1, UMR 6553 ECOBIO.

Keywords: *Spartina*, transcriptome evolution, speciation, invasion, ESTs, microarray

Abstract

Invasive species are ideal model systems to investigate the evolutionary processes associated with their ecological success by comparison with closely related species. In this paper we explore transcriptome evolution following divergence between two closely related salt marsh species, the invasive *Spartina alterniflora* (native to the East-American Atlantic coast, introduced in several continents) and the declining *Spartina maritima* (native to the Euro-African Atlantic coast). We have explored the utility of cross species hybridization microarrays using rice (*Oryza sativa*) oligo-microarrays to compare leaf expression patterns between these species. Coding sequence comparisons from 10 nuclear genes (2256 bp) revealed that nucleotide divergence between *Spartina* and *Oryza* range from 8 to 14%. More than 70% of the 60-mer oligonucleotide sequences spotted on the rice microarray exhibited stable and repeatable patterns when hybridized against *Spartina* RNA. 9353 (44.5%) genes of the array hybridized with both species *S. maritima* and *S. alterniflora*. Among these genes, 1247 genes were found to be differentially expressed between the two *Spartina* species, most of them (957) being up-regulated in *S. alterniflora*. In particular, developmental and cellular growth genes (Gene ontology, biological process) were highly up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima*, whereas genes involved in stress response were up-regulated in *S. maritima*. Our findings indicate the suitability of cross species microarray hybridization between *Spartina* and *Oryza sativa* and reveal the extent of leaf transcriptome evolution that took place during the divergence between *S. alterniflora* and *S. maritima*. Expression patterns are consistent with the morphological differentiation and differential expansion of the two species.

Introduction

Variation of genome expression is an important component of population and species evolution, and is critical to adaptation in changing environment. In spite of the recent development of functional genomic approaches, little is known about expression evolution following the speciation process. There is still a great need for comparative analyses across natural plant species. How gene expression has diverged in related versus distant lineages in various ecological conditions is a critical question that remains largely underexplored, except a few studies in the Brassicaceae family (*e.g.* Broadley *et al.* 2008) that take advantage of the genomic and transcriptomic information available for *Arabidopsis thaliana*. More data are needed to determine to what extent closely related species with different morphologies and ecological traits differ in gene expression.

Microarrays have become a central tool in the comparison of genome-wide expression patterns (Lockhart & Winzeler 2000; Ji *et al.* 2004). These analyses have greatly helped our understanding of the functional systems and gene networks involved in the various biological functions in different organisms, and have provided a unique perspective on genome function and evolution when performed in a comparative context (Ranz & Machado 2006). Most studies were first focused on model organisms where large EST datasets or full genome sequences were available and for which dedicated arrays were developed. These approaches are now being increasingly employed in wild species (reviewed in Kammenga *et al.* 2007) to understand evolutionary and adaptive processes: *e.g.* differential zinc accumulation among *Thlaspi* species (Hammond *et al.* 2006), transcriptome differences between species adapted to different altitudes (Voelckel *et al.* 2008; Hegarty *et al.* 2009), consequences of hybrid and polyploid speciation on genome expression (*e.g.* Lai *et al.* 2006; Hegarty *et al.* 2006, 2008; Flagel *et al.* 2008, 2010; Ha *et al.* 2009) or selective effects of domestication (Hovav *et al.* 2008; Chaudhary *et al.* 2008, 2009).

In this paper we explore transcriptome divergence between two closely related salt marsh species, *Spartina maritima* (Curt.) Fern. and *Spartina alterniflora* Lois. (Chloridoideae, Poaceae), that are native to the Euro-African and American Atlantic coasts respectively.

The origin and evolution of these species is now fairly well documented. *Spartina* is composed of 13-17 perennial species exhibiting various ploidy levels (basic chromosome number $x = 10$), ranging from tetraploid to dodecaploid (Ainouche *et al.* 2004a and references therein). *Spartina maritima* and *S. alterniflora* represent sister lineages deriving from a common hexaploid ($2n = 60$) ancestor (Baumel *et al.* 2002). The hexaploid *Spartina*

clade that is believed to have diverged from the tetraploid species ca 2.5-3 MYA (Christin *et al.* 2008) includes three currently living taxa for which chromosome numbers were first reported by Marchant (1977): *S. maritima* ($2n = 60$), *S. alterniflora* ($2n=62$) and *S. foliosa* ($2n=60$). The latter species is native to California. It is weakly morphologically and genetically differentiated from *S. alterniflora* with which fertile, introgressant hybrids occur in the San Francisco Bay area (Ayres *et al.* 1999) where *S. alterniflora* was introduced. *Spartina alterniflora* was also introduced to Europe where it hybridized with *S. maritima* during the end of the 19th century (reviewed in Ainouche *et al.* 2004b). The sterile F₁ hybrid (*S. x townsendii*) that was formed in England gave rise by chromosome doubling to a fertile vigorous and highly invasive allopolyploid species, *S. anglica* ($2n = 120-124$). Thus *Spartina maritima* and *S. alterniflora* have attracted a growing interest in evolutionary ecology as progenitors involved in a now classical example of recent allopolyploid speciation that has important ecological consequences (Ainouche *et al.* 2009).

These species exhibit marked morphological differences (Mobberley 1956), different physiology and ecological preference on coastal salt marshes (Castillo *et al.* 2008; Maricle & Lee 2007). *Spartina* species have C₄ photosynthetic system that uses the ATP-dependent phosphoenol pyruvate carboxykinase (*PCK*) as decarboxylating enzyme, like other Chloridoideae species (Christin *et al.* 2009; Maricle *et al.* 2007). The hexaploid *Spartina* lineage (including *S. maritima* and *S. alterniflora*) and its derived hybrid-allopolyploid species (Ainouche *et al.* 2009) are characterized by low-marsh salt tolerant species colonizing the intertidal zone, whereas the other (tetraploid) clade is formed by high-marsh or freshwater species; this ecological zonation is accompanied by differential leaf anatomical features resulting from adaptation to water stress and salinity (Maricle *et al.* 2007). Low marsh species can tolerate several hours of inundation (Adams & Bates 1995). *Spartina alterniflora* is also encountered on brackish waters along creek or river banks and estuaries. By increasing sediment accretion, these species are considered as “ecosystem engineer” that play a critical role in the marsh dynamics.

These two species have contrasted expansion status: *Spartina alterniflora* has one of the largest species distributions in the genus and displays invasive abilities in the areas where it is introduced. In its native range (East coast of America) it is distributed from Canada to Argentina. It is introduced to the Pacific coast of California, to Western Europe (Southern England, Western France, and North-East Spain) and China where it had a spectacular expansion (An *et al.* 2007). In contrast, *S. maritima* populations are confined to their native area on the European and African Atlantic coasts. This species is being progressively extinct

in its northern range limit (Southern England and Northern Brittany in France). Most healthy populations are encountered in warmer climatic conditions of Western France, Spain and Mauritania. The recession of *S. maritima* was first thought a consequence of the rapid expansion of its derivative invasive allopolyploid *S. anglica* in Western Europe that would compete in the same niche; however as *S. maritima* is also declining in sites not colonized by *S. anglica*; environmental factors such as climatic changes and anthropogenic habitat disturbance are more likely influencing the recession of *S. maritima* (Raybould *et al.* 1991). Although this species flowers, it rarely produces seeds in Europe where the propagation seems to be mainly the result of clonal growth. As a result, populations of *S. maritima* lack inter-individual genetic diversity (Yannic *et al.* 2004).

Spartina as most other Chloridoideae, lacks genomic resources such as ESTs or large genomic datasets, contrasting with other lineages of the grass family that include model crops like rice, maize or wheat. In this context, two alternative approaches are generally employed for global transcriptome analyses using microarrays. The first one involves anonymous cDNA arrays where anonymous cDNA clones are printed on the array and where cDNA clones that display interesting expression patterns are sequenced *a posteriori* (Hegarty *et al.* 2005; Lai *et al.* 2006). The second approach is based on cross-species (“heterologous”) hybridization, employing microarrays designed for another related (model) species (*e.g.* Hammond *et al.* 2006; Li *et al.* 2009; Davey *et al.* 2009; Gaeta *et al.* 2009), and relies on sequence conservation in homologous coding regions of related species. The strength and weaknesses of the latter approach were carefully discussed regarding the phylogenetic distance of the species involved, the nature and length of the DNA probes, and the experimental design (reviewed in Buckley 2007). Authors agree about the fact that long probes and high stringency in hybridization conditions limit the potential bias resulting from mismatches (Chismar *et al.* 2002; Oshlak *et al.* 2007).

In this study, we have explored the utility of cross-species microarrays in *Spartina*, using the Agilent 4x44K 60-mer oligo-microarrays designed on the sequenced rice genome. More specifically the following questions were addressed: (i) What is the level of hybridization between *Spartina* and the rice oligonucleotide features, and how repeatable are the expression levels detected on the arrays (ii) Is cross-species hybridization sensitive enough to differentiate transcriptomic patterns between two *Spartina* sister species? The goal is to elucidate the nature of transcriptomic differences between two morphologically differentiated *Spartina* species, one native to the Old World (*S. maritima*) and the other to the New- World (*S. alterniflora*) that have diverged during the last million years.

Materials and methods

Plant sampling

Native *S. maritima* and introduced *S. alterniflora* plants were sampled in Brittany (France), on the Etel River (Ile de Tascon, Morbihan) and the Elorn River (Landerneau, Finistère) respectively. Previous molecular analyses have indicated that both *S. maritima* (Yannic *et al.* 2004) and *S. alterniflora* (Baumel *et al.* 2003) lack genetic diversity in Western Europe. Thus, weak interindividual genetic variation is expected among the different individuals sampled per species. The plants were transplanted in the greenhouse (Campus de Beaulieu, University of Rennes 1, France) and were grown in the same conditions (30 cm³ daily watered pots containing 2:1 mixture of soil and sand respectively; daytime temperature was 20°C to 22°C and night-time temperature was 14°C to 16°C). After 20 days of acclimatization, 10 to 15 young leaves (*c.a.* 1-2 g) were collected from five plants per species, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RNA preparation

Total RNA was extracted from frozen leaves with Trizol reagent (Sigma, CA, USA) using three cycles of precipitation with isopropanol (Sigma, USA). All RNA samples were quantified using a Nanodrop Spectrophotometer ND 1000 (Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) and the quality of RNA (absence of degradation and DNA contamination) was checked on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). After processing, RNA was stored at -80°C.

Microarray experiment design and RNA hybridizations

The microarray experiments were performed at the Transcriptomic Platform BiogenOUEST® (Campus de Villejean, University of Rennes 1, France). A one colour design with five replicates per species was used to provide comparisons between *S. maritima* and *S. alterniflora*. 350 ng of total RNA were reverse-transcribed to cDNA, and a T7 sequence was introduced into cDNA. T7 RNA polymerase-driven RNA synthesis was used for the preparation and labelling of RNA with 2.4 µl of Cy3 dye. Dye Spike was used throughout in order to prevent the dye-bias during the sample labelling. The fluorescent cRNA probes were purified using Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., CA), and an equal amount (1.65µg) of Cy3 labelled cRNA probes were hybridized on a 44 K Rice Agilent array (Agilent G2519F), which contains 43.803 probes of 60-mer covering 21509 genes of the rice

genome. RNA from each sample was hybridized at 65°C in the Agilent's hybridization oven (Agilent Technologies, CA, USA).

The hybridized slides were washed using a commercial kit buffer (Agilent Technologies, CA, USA) and then scanned using Genepix 4100A scanner with Feature Extraction Software (Agilent Technologies).

Microarray data collection and analysis

All signals (feature extraction files) were imported into GeneSpring 7.3 [Agilent] software package and only data with intensity > 0.01 from the five replicates were subjected to per-chip normalization to the 50th percentile and to per gene normalization to median. Data were analyzed using variance analysis ($p < 0.05$) with a Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) multiple test correction (Genespring [Agilent] software package) to identify significant up and down regulated genes. Gene clustering patterns were determined using hierarchical cluster analysis. The gene ontology terms associated with significantly differentially expressed genes were also used to identify functional groups.

Quantitative PCR

In order to confirm the expression patterns observed from microarray data analysis, three replicates from two RNA samples (total: 6 replicates) were analysed per species using quantitative polymerase chain reaction (q PCR) with a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). 100 ng of total RNA from each sample was reverse-transcribed with oligo(dT)₂₀ primers using the Superscript III first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and were diluted 20 times with sterile distilled water. Absence of genomic DNA contamination in the RNA samples was confirmed by using RNA RT⁻, amplified without reverse transcriptase. Two µl of each diluted cDNA were used per reaction with Applied Biosystems SYBR Green TaqMan® MIX and with specific forward and reverse primers (table 1). Primers were designed using primer 3 software and selected to yield amplicons of 180 – 200 bp. PCR conditions were as follows: 50 °C for 2mn, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 1 min and 72°C for 60s. Primer pairs that produce dimers were eliminated by melting-curve analysis. All data replicates were normalized using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH), gene that was amplified with the primer sequences AGAGTGCCTCGTCAAGGAGA (F) and CTCCAAGCAATCCTCATGT (R) (Baisakh *et al.* 2006).

Verification of the microarray results by q-RT PCR was done by determining the expression levels for the following selection of genes, based on expression level differences encountered

between the two species: 18S ribosomal RNA gene, 28S ribosomal RNA gene, vacuolar *ATPase B* gene, poly (A) binding protein, *OsPAG1*, actin, ribulose- phosphate 3 epimerase, *NADPH* oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase), malate synthase-like family protein and *PCK* (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase). Primers (table 1) were designed in *Spartina* from EST sequences obtained in *S. maritima* as detailed in the next section.

cDNA library preparation and EST analysis

Because no information was previously available from the genome of *Spartina* species, and because nucleotide divergence between *Spartina* and rice had not been investigated previously, we compared nucleotide differences between *Spartina* and *Oryza sativa* in coding regions.

A cDNA library was constructed for *S. maritima* as follows: Total RNA was extracted as described above from *S. maritima* leaves collected from 10 individuals from the same population (Ile de Tascon, Morbihan). Total RNA from each plant was pooled and quantified using a Nanodrop Spectrophotometer (ND 1000). Two mg of total leaves RNA were sent to Macrogen (Korea; www.macrogen.com). cDNA was prepared and ligated to *pBluescript SK* vector. Clones were sequenced and 1056 sequences were analysed. Sequence quality files were generated using the *PHRED* software (Ewing *et al.* 1998; Ewing & Green 1998). Clean-up to remove leading vector and short (<50 bp) sequences was performed using the *LUCY* software (Chou & Holmes 2001). The average size of the sequenced clones was 1386 bp. Sequences were assembled into 71 contigs and 811 singletons, resulting in a total of 882 sequences. ESTs were annotated with *Blast2GO* software (<http://www.blast2go.org>).

Homology searches between *S. maritima* ESTs and 21,495 Rice 60-mer Agilent Microarray oligonucleotides were performed using BLASTn analysis (*E value* e^{-11}). From these ESTs, ten coding regions, exhibiting differential expression levels between species in the microarray analysis, were amplified by RT-PCR in the American species *S. alterniflora* using the primers described in table 1. PCR products were purified and sequenced. Sequence alignment was performed using *CLUSTAL W* (<http://align.genome.jp/>). Nucleotide identities between the two *Spartina* species and between each of them and rice (*NCBI Oryza sativa* genome data base) were calculated using *BioEdit* (Hall 1999).

RESULTS

Nucleotide divergence among *S. maritima*, *S. alterniflora* and *Oryza sativa* coding regions

Sequences from 10 genes (table 2) were compared among *S. maritima*, *S. alterniflora* and *Oryza sativa* to evaluate the nucleotide divergence in coding regions among the three species. The two *Spartina* species exhibited high sequence identity for most comparisons (table 2) ranging from 94% (malate synthase-like family) to 99.75% (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, *PCK*). Thus, for the ten genes tested, *S. alterniflora* and *S. maritima* displayed less than 5% nucleotide divergence. Sequence identities between rice and the two *Spartina* species ranged from 86 % (*NADPH* oxidase, malate synthase-like gene) to 98.5% (18S ribosomal RNA). The *PCK* gene, which exhibited the highest nucleotide identity between *S. maritima* and *S. alterniflora*, appears in contrast as one of the most highly diverged of the 10 gene regions between *Spartina* and rice (87% sequence identity). As expected from phylogenetic relationships, nucleotide divergence between rice and each *Spartina* species was equivalent for all 10 genes (table 2). Sequence identity between rice and *Spartina* averaged 90.5% in the 10 coding regions, indicating a high degree of conservation suggesting the likelihood of cross-hybridization between *Spartina* genes and *Oryza* microarray features.

As expected from phylogenetic relationships, nucleotide divergence between rice and each *Spartina* species is equivalent for all the compared genes (table 2). The sequence identity between rice and *Spartina* averages 90.5%, indicating a consistent conservation in the coding regions between the *Spartina* and *Oryza* lineages, that is an important parameter for the cross-hybridization strategy employed in this study for the microarray analysis.

Hybridization signals and reproducibility of the microarrays

Because cross species hybridization may affect the sensitivity of microarrays when comparing expression profiles between different species, the reproducibility of hybridization patterns was carefully examined. A stringent data filtration procedure was adopted according to the Agilent GeneSpring 7.3 options "present, marginal, or absent" flags that indicate whether a gene is expressed or not. Only probes that were "present" were considered as expressed and were subjected to normalization. Pearson correlation was further calculated for the five replicates of each species. Only two slides (one for each species) exhibited correlation coefficient values below 0.9 and were subsequently deleted from analyses. Clustering expression analysis of the eight retained slides for *S. maritima* and *S. alterniflora* confirmed the reproducibility of the expression patterns among replicates (figure 1).

Analyses of expression changes between *S. maritima* and *S. alterniflora*

The ANOVA per gene analysis (using the R software, <http://www.r-project.org/>) indicated that 13,573 genes of *S. maritima* and 13,993 genes of *S. alterniflora* exhibited stable and repeatable expression levels on at least two rice chips. This represents about 70% of the 21,510 rice genes on the microarrays that include genes potentially expressed in various organs. Previous tests (H. Chelaifa unpublished data) indicated that about 90% of these oligonucleotides hybridized to RNA from rice leaves.

To identify gene expression differences between the two *Spartina* species, statistical analyses of array data in each species were made using the Genespring 7.3 software package. This analysis identified 1,247 genes that exhibited significant expression changes ($p < 0.01$) between *S. maritima* and *S. alterniflora* among the 9,353 genes that hybridized to the array in both species, which represents about 13.3% transcriptomic divergence. Most of the differentially expressed genes appeared over-expressed in *S. alterniflora* compared to *S. maritima* (above diagonals, figure 2) with more than two-fold differences encountered.

Identification of genes differentially expressed between *S. maritima* and *S. alterniflora*

Genes that passed all criteria for stringent analysis of differential expression were identified using Gene Ontology (GO). GO slim terms were assigned to all genes on the array for biological process (figure 3a) and molecular function (figure 3b) categories. These functions were used to identify gene classes that are differentially expressed between *S. maritima* and *S. alterniflora*. The gene ontology of the differentially expressed genes was compared with the GO of all genes on the array with a p value cut off 0.1.

A total of 532 genes were identified to GO biological process. As noticed above, the majority of the differentially expressed genes were up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima*. Among these, genes potentially involved in development and cellular growth were more represented (15.8%) than those involved in other functions (figure 3a). Other GO classes of genes differentially expressed in the leaves of these species included metabolism of proteins, carbohydrate and lipid systems, cytoplasm organization, and biogenesis and transcription system. We examined differential expression patterns in genes belonging to development and cellular growth that may account for the marked morphological differences between the two species. Among the 181 differentially expressed genes in this category, only 34 genes were up-regulated in *S. maritima* and down-regulated in *S. alterniflora*.

The *IPS1* (Induced by Phosphate Starvation 1) gene (Figure 4a) was over-expressed in *S. maritima* ($p = 0.000535$). The *Spatula* (*spt*) gene (Figure 4a) was also over-expressed in *S.*

maritima ($p=0.00731$). This gene is involved in the development of carpel margins and carpel tissues. Among the genes up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima* involved in growth and cellular development (Figure 4b), the cell division protein *FtsH* gene appeared differentially expressed ($p= 5.69 e^{-5}$).

A putative leaf development protein, Argonaute (*AGO*), was over expressed in *S. alterniflora* ($p= 0.00194$). Argonaute proteins are essential components of the molecular machinery that drives RNA silencing and modulates gene expression (Höck & Meister 2008). The Wuschel-like Homeobox (*WOX1*) gene, which is involved in the early pre-embryo development of leaves and roots (Dai *et al.* 2007), was also found to be over-expressed in *S. alterniflora* ($p= 0.000143$, Figure 4b).

Chloroplast and vacuolar genes exhibited highly significant p -values in *S. alterniflora* leaves. For instance, the *psbB* gene, over expressed in *S. alterniflora* ($p= 3.38 e^{-5}$, Figure 4b), is involved in the production of the photosystem II chlorophyll-a binding protein. The accumulation of this protein is differentially influenced by light through a process characteristic of C₄ photosynthesis (Rock *et al.* 1987). Among the vacuolar proteins involved in growth and cellular development, the vacuolar H⁺ *ATPase* and tonoplast intrinsic protein (*TIP*) genes (Figure 4b) were over-expressed in *S. alterniflora* and under-expressed in *S. maritima* ($p=0.00921$ and $p= 0.000655$ respectively).

For the GO Molecular Function category, transporter activity including ionic transport genes represent the major functions that showed expression differences between *S. maritima* and *S. alterniflora* (Figure 4b) leaf tissues. Our results (Figure 4c) indicate that peptide transport systems *PTR* and *PTR2*, which play an important role in plant growth and development (Song *et al.* 1997), were highly expressed in leaves of *S. alterniflora* ($p= 0.000229$ and $p=0.00165$ respectively). Nucleic acid binding proteins that were differentially expressed included RNA binding proteins such as the glycine-rich protein *OsGRP1* (differential expression: $p=0.000116$), which is specifically associated with cell elongation and differentiation (Xu *et al.* 1995), and by DNA binding proteins such as chloroplast nucleoid DNA binding protein, that also was over-expressed in *S. alterniflora* ($p=0.00315$). Transcripts that were differentially accumulated in *S. alterniflora* and *S. maritima* leaves included transporters of sugar, ions, and peptides. Ionic transporter activity genes were mostly represented by potassium transporters and more specifically the *KT/HAK* family genes (*haK1* $p= 2.38 e^{-5}$, *haK2*, *haK7*, *haK8*, *KT2*) (Figure 4c).

Catalytic activity was represented by transferases, including arginine methyltransferases (*PRMT1*) and glutathione transferase (differential expression between *S. alterniflora* and *S.*

maritima: $p= 0.000185$, $p= 0.00178$ respectively). Differential gene expression affecting enzymatic antioxidant activity included peroxidase *PRX2* ($p=0.00293$), cytochrome c oxidase ($p= 0.00186$) and glutathione-peroxidase (figure 4d).

Quantitative RT-PCR

Seven genes exhibiting different expression patterns in the microarray analyses were analysed using quantitative real-time RT-PCR, and their expression levels compared to those obtained with the rice microarrays (figure 5). On the array, the 18S ribosomal RNA gene, ribulose-phosphate 3-epimerase, poly (A) binding protein and *NADPH* genes were significantly up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima*; these results were confirmed by qRT-PCR.

The *OsPAG1* gene was not differentially expressed between the two *Spartina* species on the arrays and this was also confirmed by qRT-PCR (figure 5). Similarly, the actin gene showed no significant expression difference between the two species.

Although same relative expression patterns between *S. maritima* and *S. alterniflora* were observed in microarrays and qRT-PCR for most genes, expression levels appear significantly higher for both species when estimated with qRT-PCR than with microarrays (figure 5). This is a frequently observed phenomenon in comparisons reported in the literature. These differences in the expression levels may be accentuated by several factors, including differential sensitivity of the two techniques, effects of cross-hybridization on the array, and/or preferential amplification of homeologous or paralogous transcripts in polyploids when using different techniques.

DISCUSSION

In this study, we have explored the utility of rice oligo-microarray to analyse the transcriptomic divergence between two related species (*S. maritima* and *S. alterniflora*) that exhibit marked morphological and ecological differences. Using this approach, we have shown that more than 70% of the 60-mer oligonucleotide sequences spotted on the Rice Agilent microarray yielded reproducible hybridization across the five replicates for each of the *Spartina* species analysed.

Our coding sequence comparisons from 10 nuclear genes (2,256 bp) revealed that nucleotide divergence between *Spartina* and *Oryza* range from 8 to 14%. Recent molecular dating estimates suggest that Erhartoideae (containing former members of the Oryzoideae with rice) and the PACC clade (containing Chloridoideae and *Spartina*) diverged ca 40-50 MYA

(Christin *et al.* 2008). Sequence divergence between *S. maritima* and *S. alterniflora* of 0.25–5% are consistent with their close phylogenetic relationship and confirm the low substitution rate in coding gene portions, compared to intergenic spacers and introns, indicated by previous nuclear and chloroplast sequence phylogenies (Baumel *et al.* 2002; Fortuné *et al.* 2007). Pairwise nucleotide divergence in exons of orthologous copies of the *Waxy* gene ranged from 0–2.4% among *Spartina* species (Fortuné *et al.* 2007). The propensity of nuclear genes to undergo individual duplication, coupled with the recurrent genome duplications affecting Angiosperm genomes (Cui *et al.* 2006) make orthology assessment difficult when evaluating sequence divergence following speciation events. This was taken into account in our similarity searches. For instance, the *PCK* (Phosphoenolpyruvate decarboxylase) gene was among the most divergent genes (13%) compared between *Spartina* and rice. Two paralogues occur in the rice genome, resulting from a duplication that predates grass diversification (Christin *et al.* 2008). The sequence we obtained for *Spartina* was then compared to the rice orthologue based on the *PCK* gene tree topology of Christin *et al.* (2009).

The relatively high sequence conservation between orthologous rice and *Spartina* genes (86–92% identity in our comparisons) thus limits the influence of mismatches on microarray hybridization that could potentially affect the sensitivity of the method employed to detect expression changes between divergent lineages. Our results based on 60-mer rice oligo microarrays gave repeatable results across the five replicates we performed per species. Using stringent experimental conditions and data filtration, we found that 70% of the 21,510 rice genes on the microarrays hybridized with *Spartina* leaf RNA. Although rates of hybridization vary according to biological systems, to divergence rates and to the employed technology, cross-taxon array studies have been successful in several other groups as well. Hammond *et al.* (2006) successfully employed cross-species hybridization microarrays designed to detect transcriptome changes between two *Thalpi* species (Brassicaceae) using Affymetrix *Arabidopsis thaliana* microarrays. The sequence identities between *Thalpi* and *Arabidopsis*, which diverged about 20 MYA (Bailey *et al.* 2006) range from 71.7% to 89%. Over 83% of maize oligos cross hybridized with cDNAs from *Andropogon gerardii* (Travers *et al.* 2007). *Pachycladon* species hybridized with *Arabidopsis thaliana* microarray with about 76% of hybridization (Voelckel *et al.* 2008). In fishes, cross species hybridization between *Medaka* and *Xiphophorus* provide about 85% of hybridization level (Boswel *et al.* 2008). Studies using cross species hybridization among mammals (Hittel & Storey 2001; Magnanou *et al.* 2009) and fungi species (Nowrousian *et al.* 2004) show the same level of hybridization

as in plants and fishes. Gilad *et al.* (2005) have developed a multi-species cDNA array procedure that allowed comparative analyses across primate species that diverged up to 70 MYA.

Using the rice microarrays, we were able to detect significant changes in gene expression patterns of the two closely related *Spartina* species. Consistent up and down regulation of 1,247 genes (13.3 % of the 9,353 genes that commonly hybridized on the array) were detected. Similar levels of transcriptomic differences estimated using microarrays have been reported in the literature between species from the same genus: For example, 13.17% genes were differentially expressed, between two related *Pachycladon* species (Brassicaceae) with distinct altitudinal preferences (Voelckel *et al.* 2008). Wang *et al.* (2006) found that 15% of genes were differentially expressed between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis arenosa*, which diverged 5.8 MYA. About 15% of genes were also differentially expressed between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*, which diverged 3-4 MYA, when hybridized on *Arabidopsis* 70-mer oligonucleotide microarrays (Gaeta *et al.* 2009). The levels of transcriptome divergence between related species may vary across cell types, organs or different developmental stages. *Gossypium* diploid species diverged ca. 5-10 MY and are only on average 3% diverged in coding sequence; whereas only 20–22 % of genes are differentially expressed in homologous cotton fiber cells in these species (Hovav *et al.* 2008; Chaudhary *et al.* 2009), expression differences of 42-53% were found in their leaves (Rapp *et al.* 2009).

Spartina alterniflora and *S. maritima* derive from a common hexaploid ancestor, and thus have retained up to 3 duplicated pairs of homeologues, although at many loci the actual number is likely to be lower due to differential retention of duplicated (Fortuné *et al.* 2007). The technology employed here does not allow distinguishing homeologous expression patterns, but the redundant (and probably hybrid) nature of the ancestral hexaploid genome has definitely played an important role in the subsequent evolution and partitioning of duplicate gene expression in the derived species (Adams 2007). This is well-illustrated in *Arabidopsis* where duplicated genes retained from paleopolyploidization events exhibit higher levels of expression divergence between *A. thaliana* and *A. arenosa*, than do single copy-genes (Ha *et al.* 2009); the same trend was observed for the non-additively expressed genes in their derived natural and synthetic allotetraploids. Interestingly, genes whose expression appears affected by recent allopolyploidy (in *Spartina x townsendii* and *S. anglica*) following hybridization between *S. maritima* and *S. alterniflora* are almost the same as those found differentially expressed in this study (Chelaifa *et al.* 2010). Comparative transcriptomic

approaches using the next-generation sequencing technologies provide complementary information to microarrays in allowing expression changes to be assayed at homeologous alleles in polyploid species.

In most of the studies involving different systems mentioned above, differentially-regulated genes were evenly distributed between congeneric species, whereas in the two *Spartina* species our analyses reveal that the majority of differentially expressed genes are over-expressed in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima*. The large difference in expression of developmental and cellular growth genes, highly up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima* is consistent with their different morphology and growth: *S. alterniflora* is a tall plant exhibiting long and fleshy leaves and long rhizomes, producing higher numbers of inflorescences (Liao *et al.* 2007) whereas *S. maritima* plants are much smaller (usually less than 40 cm high). Both species play an important role as primary salt marsh colonists. They are able to trap and stabilize sediment efficiently, thus facilitating ecological succession (Castillo *et al.* 2000). European populations of *S. maritima* are characterized by slow lateral extension of individuals that flower but rarely reproduce sexually (Marchant 1967). The plants analysed in this study were maintained in the same conditions in the greenhouse. These conditions actually represent a rather different (and perhaps stressful) environmental situation than natural salt marsh conditions. Genes up-regulated in the European native species (*S. maritima*) are involved in stress responses such as phosphate starvation-induced genes (*IPS*) and *Spatula* genes. This gene is also expressed in several other tissues including leaves, petals, stamens and roots, where it may act redundantly to control growth (Alvarez & Smyth, 1999; Groszmann *et al.* 2008). In *Arabidopsis*, expression of the *IPS* gene is strongly intensified by phosphate starvation (Rausch & Bucher, 2002; Ticconi & Abel, 2004; Müller *et al.* 2005). Over-expression of these genes represents mostly stress responses, which suggest that *S. maritima* is more sensitive to environmental changes than *S. alterniflora*.

Genes up-regulated in *S. alterniflora* are mostly involved in growth and cellular development, and include genes involved in leaf development such as *Argonaute 1* (*ago1*). Bohmert *et al.* (1998) found that *ago1* controls longitudinal differentiation of leaf primordia. The *Ftsh1* gene, a member of the *Ftsh* protease family, is also up-regulated in *S. alterniflora*. Expression of this protease during leaf development is considered to be very important for all leaf developmental stages in *Populus* and *Arabidopsis* (García-Lorenzo *et al.* 2006). In *Arabidopsis*, it also plays an important role in regulating the photosynthetic apparatus, especially under changing environmental conditions (Zaltsman *et al.* 2005; Shen *et al.* 2007).

Similarly, the vacuolar-type H^+ *ATPase* (*V-ATPase*) is over-expressed in *S. alterniflora*. *V-ATPase* is a multimeric enzyme involved in diverse functions in plants such as nutrient transport, flowering, stress tolerance, guard cell movement and development (Michelet & Boutry 1995; Zhen *et al.* 1997). Aquaporins (here: *TIP*, vacuolar H^+ *ATPase*) may accelerate both cell expansion and cell division by increasing water permeability through the vacuolar membrane (Li *et al.* 2008; Okubo-Kurihara *et al.* 2009). Over-expression of this protein may influence ionic transporter activity. In our case, Potassium transporters and more specifically the *KT/HAK* family are mostly over-expressed in *S. alterniflora*. Differential expression of these genes may explain the differential range expansion of these species, providing *S. alterniflora* with larger ecological amplitude in saline and brackish waters.

Interestingly, among genes of the GO category Molecular Function, a glutathione transferase (*GSTs*) is differentially expressed among *Spartina* species; this transferase belongs to the enzymes catalyzing the nucleophilic addition of glutathione (*GSH*) to the electrophilic groups of a large variety of hydrophobic molecules, thus potentially helping to detoxify cells from harmful compounds (Amstrong 1994). Recent studies have highlighted the potential usefulness of *S. maritima* and *S. alterniflora* as bio monitors of the degree of environmental contamination. Both species accumulate heavy metals and they have potential for phytoremediation (Lin *et al.* 2002; Reboreda & Cacador 2007, 2008; Cambrolle *et al.* 2008). Previous studies do not provide comparisons between these two species, but our transcriptomic data suggests higher detoxifying potential of *S. alterniflora* than its sister species *S. maritima*.

Altogether, these results indicate that despite high sequence identity in their coding sequences, *S. alterniflora* and *S. maritima* have diverged substantially at the transcriptome level during their separate colonizations of the American (*S. alterniflora*) and Euro-African Atlantic (*S. maritima*) coasts.

The nature of the genes affected by this transcriptome evolution appears consistent with the morphological and ecological differences between the two species. Comparing the leaf transcriptome between these species provided new insights into the invasive ability of *S. alterniflora* compared to *S. maritima*. Genes identified in this study are ideal candidates for future studies not only regarding targets of both divergent and reticulate evolution, but also regarding the functions determining adaptation and expansion of these species, both of which are considered “ecosystem engineers” in coastal salt-marshes. Our study opens new perspectives regarding genes whose expression could be explored under various natural

conditions, including native and introduced populations facing different local constraints such as differential pollution levels, salinity gradients, or competition.

REFERENCES

- Adams KL (2007) Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of Heredity* **98**(2), 136-141.
- Adams JB, Bate CG (1995) Ecological implications of tolerance of salinity and inundation by *Spartina maritima*. *Aquatic Botany* **52**, 183-191.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A (2004a) *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 475-484.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G (2004b) Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **161**, 165-172.
- Ainouche ML, Fortune PM, Salmon A, *et al.* (2009) Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae) *Biological Invasions* **11**, 1159-1173.
- Alvarez J, Smyth DR (1998) Genetic pathways controlling carpel development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **111**, 295-298.
- Alvarez J, Smyth DR (1999) *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* **126**, 2377-2386.
- Armstrong RN (1994) Glutathione S-transferase: structure and mechanism of an archetypal detoxification enzyme. *Advanced Enzymology* **69**, 1-44.
- An SQ, Gu BH, Zhou CF, Wang ZS, *et al.* (2007) *Spartina* invasion in China, implications for invasive species management and future research. *Weed Research* **47**, 183-191.
- Ayres DR, Garcia-Rossi D, Davis HG, Strong DR (1999) Extent and degree of hybridization between exotic (*Spartina alterniflora*) and native (*S. foliosa*) cordgrass (Poaceae) in California, USA determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Molecular Ecology* **8**, 1179-1186.
- Bailey CD, Koch MA, Mayer M, *et al.* (2006) Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 2142-2160.
- Baisakh N, Subudhi PK, Parami NP (2006) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Plant Science* **170**, 1141-1149.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, Ainouche AK, Misset MT (2002) Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**, 303-314.
- Baumel A, Ainouche ML, Misset MT, Gourret JP, Bayer RJ (2003) Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* x *neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution* **237**, 87-97.
- Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO Journal* **17**, 170-180.
- Boswell MG, Wells MC, Kirk LM, *et al.* (2009) Comparison of gene expression responses to hypoxia in viviparous (*Xiphophorus*) and oviparous (*Oryzias*) fishes using a *MEDAKA* microarray. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **149**, 258-265.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, *et al.* (2008) Evidence of neutral transcriptome evolution in plants. *New Phytologist* **180**, 587-593.
- Buckley BA (2007) Comparative environmental genomics in non-model species: using heterologous hybridization to DNA-based microarrays. *Journal of Experimental Biology* **210**, 1602-1606.

- Cambrolle J, Redondo-Gomez S, Mateos-Naranjo E, Figueroa ME (2008) Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 2037-2042.
- Castillo JM, Fernández-Baco L, Castellanos EM, Luque CJ, Figueroa ME, Davy AJ (2000) Lower limits of *Spartina densiflora* and *S. maritima* in a Mediterranean salt marsh determined by different ecophysiological tolerances. *Journal of Ecology* **88**, 801-812.
- Castillo JM, Leira-Doce P, Rubio-Casal AE, Figueroa E (2008) Spatial and temporal variations in aboveground and belowground biomass of *Spartina maritima* (small cordgrass) in created and natural marshes. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **78**, 819-826.
- Chaudhary B, Hovav R, Flagel L, Mittler R, Wendel JF (2009) Parallel expression evolution of oxidative stress-related genes in fiber from wild and domesticated diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). *BMC Genomics* **10**.
- Chaudhary B, Hovav R, Rapp R, *et al.* (2008) Global analysis of gene expression in cotton fibers from wild and domesticated *Gossypium barbadense*. *Evolution & Development* **10**, 567-582.
- Chelaifa H, Monnier A, Ainouche M (2010). Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina x townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03179.x.
- Chismar JD, Mondala T, Fox HS, *et al.* (2002) Analysis of results variability from high-density oligonucleotide arrays comparing same-species and cross-species hybridisations. *Biotechniques* **33**, 516-524.
- Chou HH, Holmes MH (2001) DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* **17**, 1093-1104.
- Christin PA, Besnard G, Samaritani E, *et al.* (2008) Oligocene CO₂ decline promoted C-4 photosynthesis in grasses. *Current Biology* **18**, 37-43.
- Christin PA, Petitpierre B, Salamin N, Buchi L, Besnard G (2009) Evolution of C-4 Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Grasses, from Genotype to Phenotype. *Molecular Biology and Evolution* **26**, 357-365.
- Cui LY, Wall PK, Leebens-Mack JH, *et al.* (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* **16**, 738-749.
- Dai MQ, Hu YF, Zhao YU, Liu HF, Zhou DX (2007) A *WUSCHEL*-LIKE *HOMEOBOX* gene represses a *YABBY* gene expression required for rice leaf development. *Plant Physiology* **144**, 380-390.
- Davey MW, Graham NS, Vanholme B, Swennen R, May ST, Keulemans J. (2009) Heterologous oligonucleotide microarrays for transcriptomics in a non-model species; a proof-of concept study of drought stress in *Musa*. *BMC Genomics* **10**:436.
- Ewing B, Green P (1998) Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8**, 186-194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**, 175-185.
- Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J (2008) Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* **6**, 16.
- Flagel L, Wendel J (2010) Evolutionary rate variation, genomic dominance, and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation. *New Phytologist* **186**: doi: 10.1111/j.1469-8137.
- Fortuné PM, Schierenbeck KA, Ainouche AK, Jacquemin J, Wendel JF, Ainouche ML (2007) Evolutionary dynamics of *Waxy* and the origin of hexaploid *Spartina* species (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**, 1040-1055.

- Gaeta RT, Yoo S-Y, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC (2009) Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70 mer Oligo Microarrays. *PLoS ONE* **4**(3): e4760.
- García-Lorenzo M, Sjödin A, Jansson S, Funk C (2006) Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **6**, 30.
- Gibson G, Weir B (2005) The quantitative genetics of transcription. *Genetics* **21**, 616-623.
- Gilad Y, Rifkin SA, Bertone P, Gerstein M, White KP (2005) Multi-species microarrays reveal the effect of sequence divergence on gene expression profiles. *Genome Research* **15**, 674-680.
- Groszmann M, Paicu T, Smyth DR (2008) Functional domains of *Spatula*, a *bHLH* transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **55**, 40-52.
- Ha M, Kim ED, Chen ZJ (2009) Duplicate genes increase expression diversity in closely related species and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 2295-2300.
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* **41**: 95-98.
- Hammond JP., Bowen HC, White PJ, Mills V, Pyke KA, Baker JMA, Whiting SN, May ST, Broadley MR (2006) A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytologist* **170**: 239-260.
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, *et al.* (2009) Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Molecular Ecology* **18**, 877-889.
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, *et al.* (2008) Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants, further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**, 3055-3069.
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, *et al.* (2006) Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* **16**, 1652-1659.
- Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, *et al* (2005) Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Molecular Ecology* **14**(8), 2493-510.
- Hittel D, Storey KB (2001) Differential expression of adipose- and heart-type fatty acid binding proteins in hibernating ground squirrels. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1522**, 238-243.
- Hovav R, Udall JA, Chaudhary B, *et al.* (2008) The evolution of spinnable cotton fiber entailed prolonged development and a novel metabolism. *Plos Genetics* **4**.
- Höck J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biology* **9**, 210.
- Ji W, Zhou WL, Gregg K, Yu N, Davis S (2004) A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research* **32**.
- Kammenga JE, Herman MA, Ouborg NJ, Johnson L, Breitling R (2007) Microarray challenges in ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 273-279.
- Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana JP, Tyagi AK, Kapoor S (2008) Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics* **9**.
- Lai Z, Gross B, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH (2006) Detecting differential gene expression in homoploid hybrid sunflower species using microarrays. *Molecular Ecology* **15**, 1213-1227.

- Li GW, Peng YH, Yu X, *et al.* (2008a) Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *Journal of Plant Physiology* **165**, 1879-1888.
- Li L, He H, Zhang J, *et al.* (2008b) Transcriptional analysis of highly syntenic regions between *Medicago truncatula* and *Glycine max* using tiling microarrays. *Genome Biology* **9**.
- Liao CZ, Luo YQ, Jiang LF, Zhou XH, Wu XW, Fang CM, Chen JK, Li B (2007) Invasion of *Spartina alterniflora* enhanced ecosystem carbon and nitrogen stocks in the Yangtze Estuary, China. *Ecosystems* **10**, 1351-1361.
- Lin QX, Mendelsohn IA, Suidan MT, Lee K, Venosa AD (2002) The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin* **4**, 897-902.
- Lockhart DJ, Winzler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827-836.
- Marchant CJ (1967) Corrected chromosome numbers for *Spartina x townsendii* and its parent species. *Nature* **31**, 929.
- Marchant CJ (1977) Hybrid characteristics in *Spartina x neyrautii* Fouc., a taxon rediscovered in northern Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **74**, 289-296.
- Maricle BR, Cobos DR, Campbell CS (2007) Biophysical and morphological leaf adaptations to drought and salinity in salt marsh grasses. *Environmental and Experimental Botany* **60**, 458-467.
- Maricle BR, Lee RW (2007) Root respiration and oxygen flux in salt marsh grasses from different elevational zones. *Marine Biology* **151**, 413-423.
- Magnanou E, Malenke JR, Dearing MD (2009) Expression of biotransformation genes in woodrat (*Neotoma*) herbivores on novel and ancestral diets, identification of candidate genes responsible for dietary shifts. *Molecular Ecology* **18**, 2401-2414.
- Michelet B, Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺ ATPase – a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiology* **108**, 1-6.
- Mobberley DG (1956) Taxonomy and distribution of the genus *Spartina*. *Iwo State college journal of Science* **30**, 471-498.
- Müller R, Nilsson L, Hamborg Nielsen L, Hamborg Nielsen T (2005) Interaction between phosphate starvation signalling and hexokinase-independent sugar sensing in *Arabidopsis* leaves. *Physiologia Plantarum* **124**, 81-90.
- Nowrousian M, Würtz C, Pöggeler S, Kück U (2004) Comparative sequence analysis of *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa* as a means to improve genome annotation. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 285-292.
- Okubo-Kurihara E, Sano T, Higaki T, Kutsuna N, Hasezawa S (2009) Acceleration of vacuolar regeneration and cell growth by overexpression of an aquaporin *NtTIP1*; in *Tobacco by-2* Cells. *Plant and Cell Physiology* **50**, 151-160.
- Oshlack A, Chabot AE, Smyth GK, Gilad Y (2007) Using DNA microarrays to study gene expression in closely related species. *Bioinformatics* **23**, 1235-1242.
- Ranz JM, Machado CA (2006) Uncovering evolutionary patterns of gene expression using microarrays. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 29-37.
- Rapp RA, Udall JA, Wendel JF (2009) Genomic expression dominance in allopolyploids. *BMC Biology* **7**.
- Rausch C, Bucher M (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**, 23-37.
- Raybould AF, Gray AJ, Lawrence MJ, Marschall DF (1991) The evolution of *Spartina-anglica* Hubbard, C.E. (Gramineae) – genetic variation and status of parental species in Britain. *Biological Journal of the Linnean Society* **44**, 369- 380.

- Reboreda R, Cacador I (2007) Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.
- Reboreda R, Cacador I (2008) Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*, Potential contribution for phytoremediation of metals. *Marine Environmental Research* **65**, 77-84.
- Rock CD, Barkan A, Taylor WC (1987) The maize plastid *PSBB-PSBF-PETB-PETD* gene-cluster - spliced and unspliced *PETB* and *PETD* RNAs encode alternative products. *Current Genetics* **12**, 69-77.
- Shen G, Adam Z, Zhang H (2007) The E3 ligase *AtCHIP* ubiquitylates *FtsH1*, a component of the chloroplast *FtsH* protease, and affects protein degradation in chloroplasts. *The Plant Journal* **52**, 309-321.
- Song W, Koh S, Czako M, *et al.* (1997) Antisense expression of the peptide transport gene *AtPTR2-B* delays flowering and arrests seed development in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **114**, 927-935.
- Ticconi CA, Abel S (2004) Short on phosphate, plant surveillance and countermeasures. *Trends in Plant Science* **9**, 548-555.
- Travers SE, Smith MD, Bai JF, *et al.* (2007) Ecological genomics: making the leap from model systems in the lab to native populations in the field. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**, 19-24.
- Voelckel C, Heenan PB, Janssen B, *et al.* (2008) Transcriptional and biochemical signatures of divergence in natural populations of two species of New Zealand alpine *Pachycladon*. *Molecular Ecology* **17**, 4740-4753.
- Wang JL, Tian L, Lee HS, *et al.* (2006) Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* **172**, 507-517.
- Xu DP, Lei M, Wu R (1995) Expression of the rice OSGRP1 promoter gus reporter gene is specifically associated with cell elongation expansion and differentiation. *Plant Molecular Biology* **28**, 455-471.
- Yannic G, Baumel A, Ainouche M (2004) Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Journal of Heredity* **93**, 182-188.
- Zaltsman A, Feder A, Zach A (2005) Developmental and light effects on the accumulation of FtsH protease in *Arabidopsis* chloroplasts – implications for thylakoid formation and photosystem II maintenance. *The Plant Journal* **42**, 609-617.
- Zhen RG, Kim EJ, Rea PA (1997) The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized proton translocation at the vacuolar membrane. In: *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology, Vol 25*, 297-337. Academic Press Ltd, London.

Author information box

H. Chelaifa is a PhD student working on transcriptome evolution in *Spartina*. F. Mahe is a PhD student working on genome evolution and bioinformatics. M. Ainouche works on plant evolution and speciation, with special interest in invasive species of hybrid and / or polyploid origin.

Table 1: Primers used for the RT-PCR analysis

Coding regions (<i>S.maritima</i> ESTs)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Vacuolar <i>ATPase</i> B subunit	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
18S Ribosomal	GGAAACAGCCCAATTCTTCA	ACAAGAACGTGTTTGCCACA
Poly(A)-binding protein	TGGATGCTGCAAGAGCTATG	AGATTGGCCCATTTTCATCTG
28S Ribosomal	CATGGGTAAGCCGATCCTAA	CAGGCCGTTAAGCAGAAAAG
<i>OsPAG1</i>	GGTCTATGGGGAACCCATTT	TTTGCAGCCTGTCTTCCTTT
Actin	CTGCCATGTATGTTGCCATC	TAGCCCCTCTCGGTAAGGAT
Ribulose-phosphate 3-epimerase	CCCTTCCATCCTATCTGCAA	GATCAGTCACTGGACGCAGA
<i>NADPH</i> oxidase	TGTATGACGTCAGGCTCTCG	TCCAACCCAACCACTAAAGC
Malate synthase-like family protein	GGTGTCCCRACTTTCACTGT	CAGCCATGCTTCTCTCCTTC
Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*	*CAGCGACAGCTCCCTCAAGT	*CGATCTTGTAGCTGGCGAACAC

* Primers from Christin *et al.* (2009)

Table 2: Nuclear DNA sequence comparisons among *S. maritima*, *S. alterniflora* and *Oryza sativa* in 10 coding regions

Genes	Length	<i>S. mar</i> / <i>S. alter</i>		<i>S. mar</i> / <i>Oryza</i>		<i>S. alter</i> / <i>Oryza</i>	
		Id (%)	Sb (%)	Id (%)	Sb (%)	Id(%)	Sb (%)
Vacuolar <i>ATPase</i> B (AF375052, GU204977, GU204978)	127	96.2	3	90.5	11	89.7	12
18S Ribosomal (AF069218, GU204991, GU204992)	196	98.4	3	98.4	3	97.9	4-
Poly(A)-binding protein (NM_001059783, GU734105, GU734106)	180	97.7	3	88.3	14	87.7	15
28S Ribosomal (AK289006, GU204989, GU204990)	149	95.9	2	93.0	9	93.1	9
<i>OsPAG1</i> (NM_001051123, GU204979, GU204980)	166	99.4	1	92.6	12	91.5	13
Actin (NM_001060954, GU204981, GU204982)	107	97.1	3	88.7	14	88.7	14
Ribulose -phosphate 3-epimerase (NM_001055631, GU734108, GU734107)	130	94.5	5	85.0	16	86.6	13
<i>NADPH</i> oxidase (NM_001071533, GU204983, GU204984)	202	99.5	1	86.0	27	86.0	27
Malate synthase-like family protein (NM_001050003, GU204985, GU204986)	169	94.0	9	86.0	23	86.1	23
Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (NM_001056130, GU204987, GU204988)	830	99.7	2	87.2	100	87.1	101

(Id: identity, Sb: substitutions, *S. mar*: *S. maritima*, *S. alter*: *S. alterniflora*)

() Genbank accessions in *Oryza sativa*, *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* respectively

Legends of figures

Fig 1. Clustered microarray data from the leaves of *S. alterniflora* (*S. alter*) and *S. maritima* (*S. mar*) performed by the Genespring software

Fig 2. Gene expression scatter plot in *S. maritima* vs *S. alterniflora* for 9353 genes. (Green lines indicate two-fold changes limits). Colour and size of the dots (= genes) vary according to the corresponding expression levels in *S. alterniflora*.

Fig 3. Functional distribution of differentially expressed genes among GO Biological process (a) and among GO Molecular function (b)

Fig 4. Example of differentially expressed genes belonging to development and cellular growth among GO biological process (a) and (b) and among GO molecular function (c) and (d)

Fig 5. Gene expression level comparisons in *S. maritima* and *S. alterniflora* estimated from rice microarrays and q RT-PCR

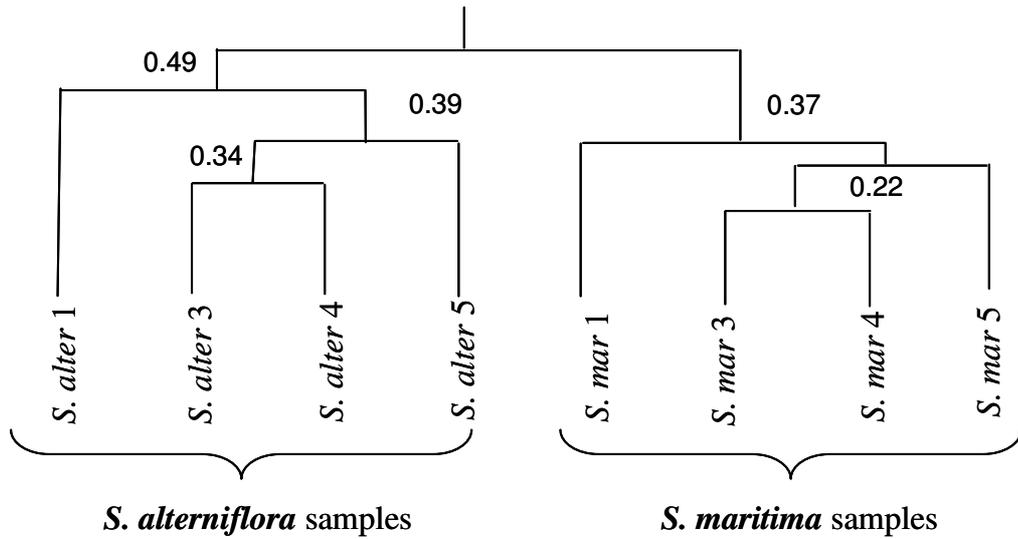


Figure 1 Clustered microarray data from the leaves of *S. alterniflora* (*S. alter*) and *S. maritima* (*S. mar*) performed by the Genespring software

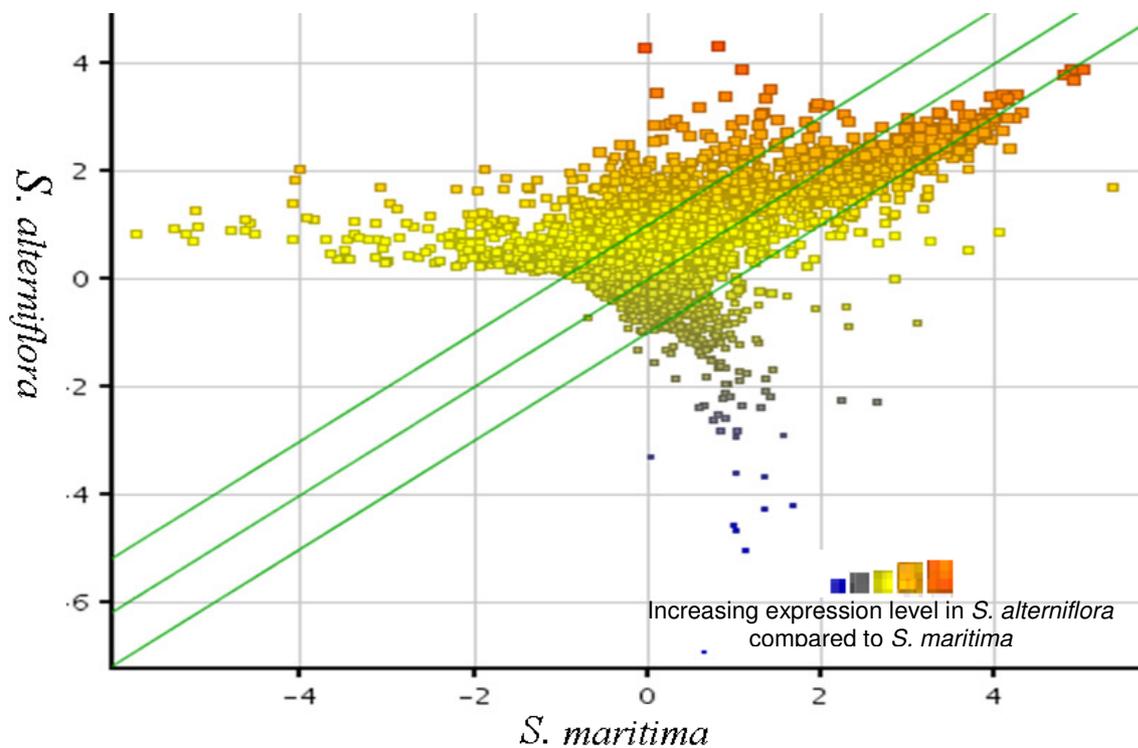


Figure 2 Gene expression scatter plot in *S. maritima* vs *S. alterniflora* for 9353 genes. (Green lines indicate two-fold changes limits). Colour and size of the dots (= genes) vary according to the corresponding expression levels in *S. alterniflora*

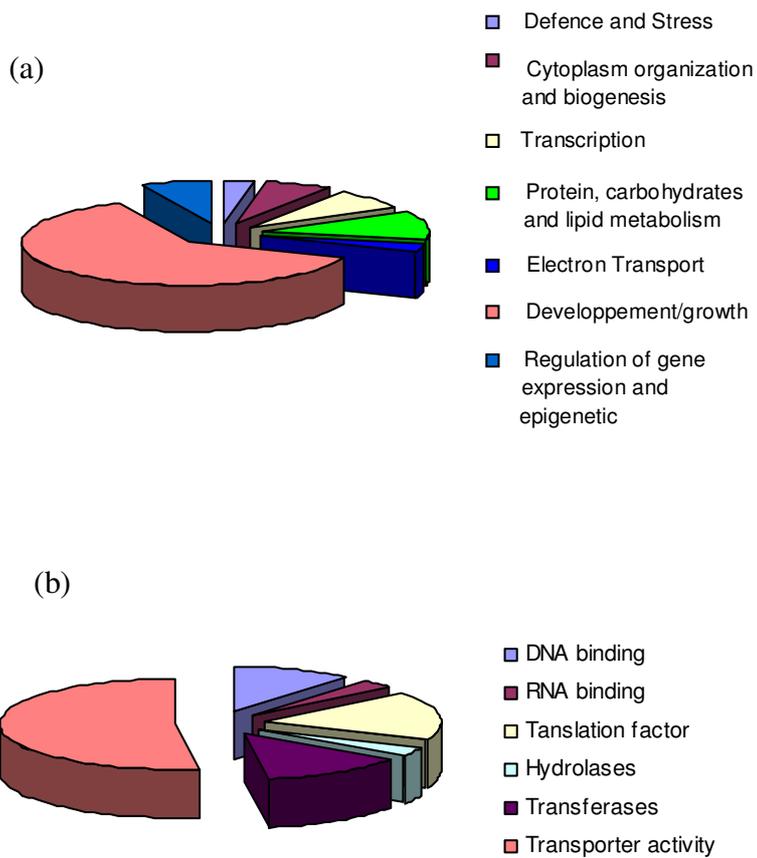


Figure 3 Functional distribution of differentially expressed genes among GO Biological process (a) and among GO Molecular function (b)

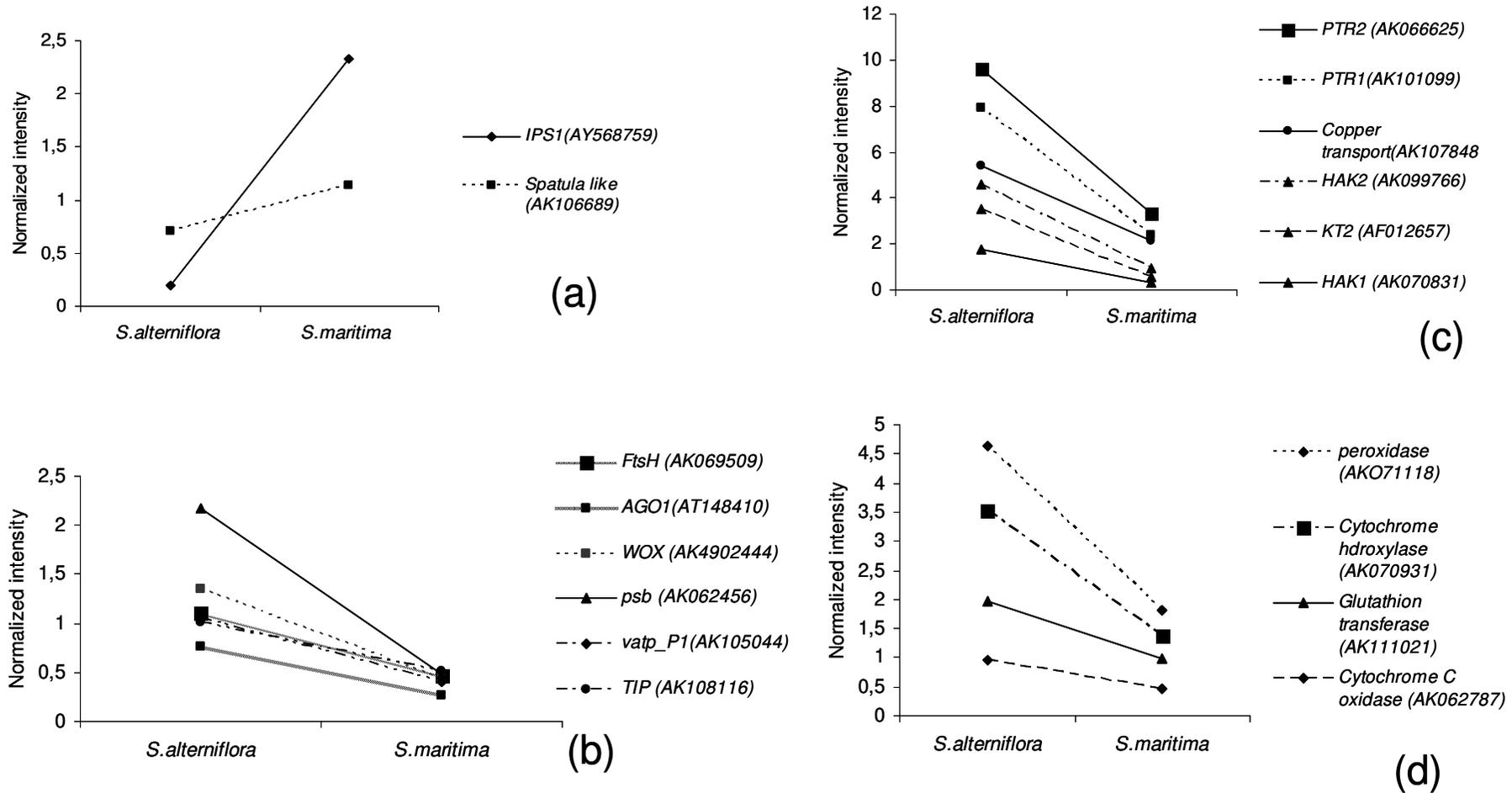


Figure 4 Example of differentially expressed genes belonging to development and cellular growth among GO biological process (a) and (b) and among GO molecular function (c) and (d)

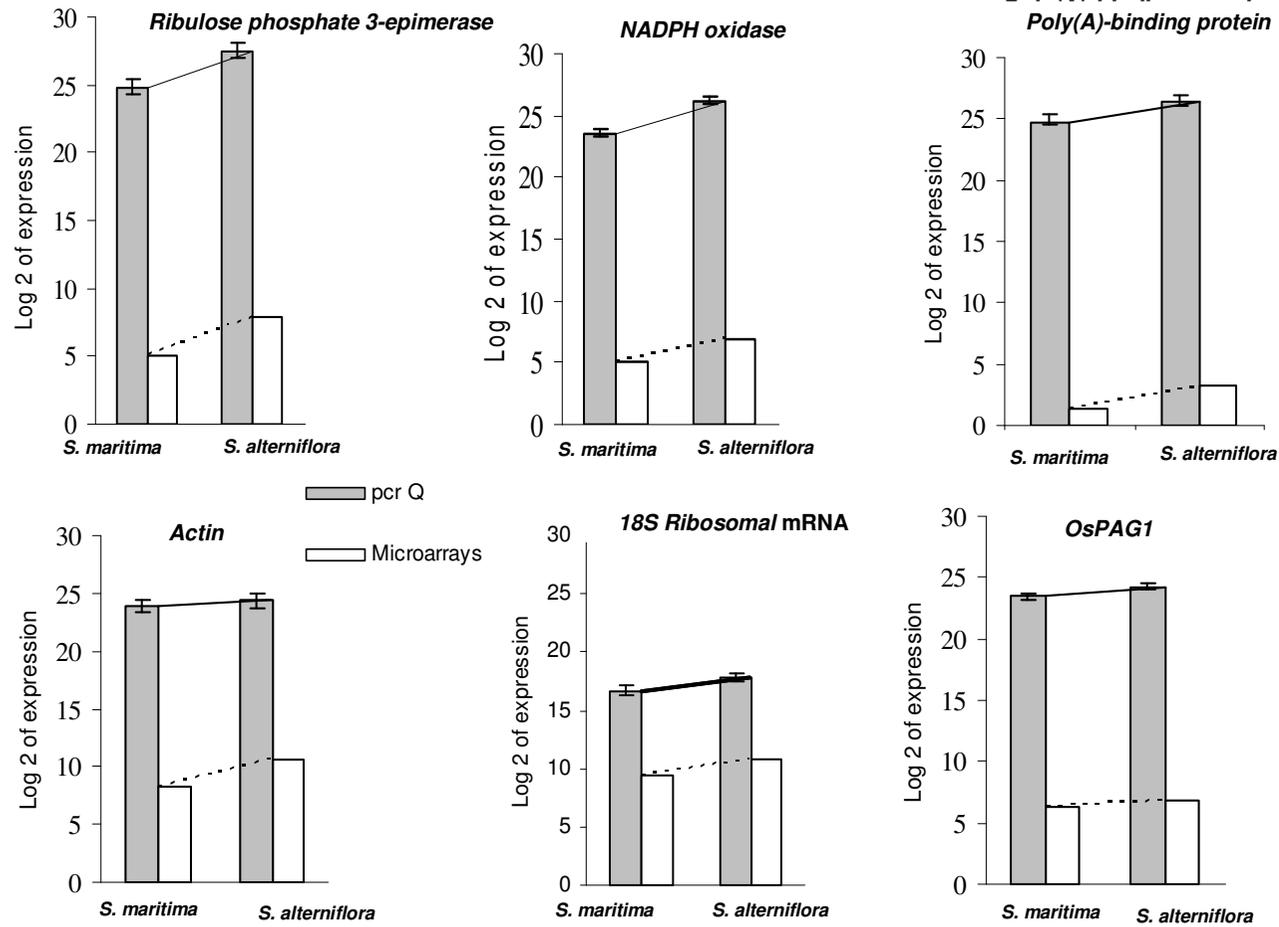


Figure 5 Gene expression level comparisons in *S. maritima* and *S. alterniflora* estimated from rice microarrays and q RT-PCR.

Chapitre 5

Spéciation allopolyploïde

&

Evolution du transcriptome

Ce chapitre s'articule en deux volets (parties A et B) présentés sous forme d'articles. Le premier est paru dans la revue *New Phytologist* (2010, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03179.x). Le deuxième est rédigé en français et fera ultérieurement l'objet de rédaction d'un article.

Dans la première partie (A), nous nous sommes intéressés à l'effet de la spéciation allopolyploïde récente sur le transcriptome, à travers la formation de l'allo-dodécaploïde *Spartina anglica*, formée par duplication du génome hybride de *S. x townsendii*. Le but de cette étude est de mesurer les différences d'expression des gènes entre *S. anglica* et ses parents, et de faire la part des effets de l'hybridation (chez *S. x townsendii*) et de la duplication du génome (en comparant *S. x townsendii* à *S. anglica*).

Les analyses du transcriptome ont été réalisées à l'aide des puces à oligonucléotides 60-mer Agilent désignées sur le génome du riz. Cinq réplicats par espèce ont été réalisés comme décrit précédemment. Afin d'évaluer les changements consécutifs à l'hybridation et la polyploïdie, les transcriptomes de *S. x townsendii* et de *S. anglica* ont été comparés d'une part à ceux des espèces parentales *S. maritima* et *S. alterniflora*, et d'autre part à la moyenne des profils d'expression parentaux estimée *in silico* pour simuler un profil d'expression parentale théorique additif chez l'hybride et l'allopolyploïde. Cette dernière mesure représente une référence généralement désignée sous le terme « Mid Parent Value » (MPV).

Les analyses transcriptomiques révèlent une dynamique particulière du génome des spartines au cours de la spéciation allopolyploïde. Des résultats antérieurs avaient montré qu'on n'observait pas de changements structuraux majeurs des génomes parentaux chez *S. x townsendii* et *S. anglica* (Baumel *et al.* 2002a, Ainouche *et al.* 2004b). L'hybridation déclenche des changements notables de méthylation du génome (Salmon *et al.* 2005, Parisod *et al.* 2009). L'allopolyploïde *S. anglica* hérite des changements de méthylations intervenus chez *S. x townsendii* mais la duplication du génome ne semble pas entraîner de nouvelles altérations de la méthylation. Nos analyses de transcriptome en revanche, montrent que non seulement l'hybridation, mais aussi la duplication, induisent une reprogrammation de l'expression du génome au cours de la spéciation allopolyploïde. Toutefois, nos données mettent en évidence des effets différenciés de la réunion de génomes divergents et de leur duplication : L'écart à l'additivité parentale est nettement plus marqué chez l'hybride F1, et s'accompagne non seulement d'une expression transgressive, mais surtout d'une forte dominance de l'expression du génome du parent maternel *S. alterniflora*. La dominance maternelle s'avère

atténuée suite à la duplication du génome chez *S. anglica* qui montre cependant une proportion plus élevée de gènes transgressifs sur-exprimés par rapport aux parents et à l'hybride F1.

Dans la deuxième partie (B) de ce chapitre, nous étudions les conséquences transcriptomiques de l'allopolyploïdie dans les régions flanquant les éléments transposables, qui se sont avérées plus particulièrement touchées par les changements de méthylation (Parisod *et al.* 2009). Dans cette partie du travail, nous avons introduit des échantillons provenant de différentes populations par espèce ce qui nous a permis d'évaluer, même à travers un échantillonnage limité, l'importance de la variabilité intra spécifique des profils transcriptomiques des régions ciblées sur des plantes maintenues en même condition. Une analyse comparative nous a permis de confronter les effets de la spéciation allopolyploïde de façon globale (par AFLP) et de façon ciblée (dans l'environnement des éléments transposables par SSAP) au niveau du génome (ADN) et du transcriptome (ADNc).

Partie A

Changements transcriptomiques chez

l'hybride *S. x townsendii*

&

l'allopolyploïde *S. anglica*

Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina x townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae)

Houda Chelaifa¹, Annabelle Monnier², Malika Ainouche^{1*}

¹ UMR CNRS 6553 Université de Rennes 1, Bât. 14A Campus de Beaulieu 35 042 Rennes Cedex (France)

² Present address : UMR CNRS 6061 Génétique et Développement, Université de Rennes 1

* Corresponding author: Malika Ainouche, Université de Rennes 1, UMR 6553 ECOBIO; 35042 Rennes; France; Ph. +33(0)223235111; Fax +33(0)223235047; e-mail:

malika.ainouche@univ-rennes1.fr

Abstract

- Allopolyploidy results from two events: the merger of divergent genomes and genome duplication. Both events have important functional consequences for the evolution and adaptation of newly formed allopolyploid species. In spite of a significant progress made the last years, a few studies have decoupled the effects of hybridization from genome duplication in the observed patterns of expression changes accompanying allopolyploidy in natural conditions.
- We used Agilent Rice oligo-microarrays to explore gene expression changes following allopolyploidy in *Spartina* that includes a classical example of recent allopolyploid speciation, *S. anglica* formed during the 19th century following genome duplication of the hybrid *S. x townsendii*.
- Our data indicate important, though different effects of hybridization and genome duplication in the expression patterns of the hybrid and allopolyploid. Deviation from parental additivity was most important following hybridization and was accompanied by maternal expression dominance, although transgressively expressed genes were also encountered.
- Maternal dominance is attenuated following genome duplication in *S. anglica* while this species exhibits an increased number of transgressively over-expressed genes.

- These results reflect the decoupled effects of the “genomic shock” following hybridization and genome redundancy, on the genetic, epigenetic and regulatory mechanisms characterizing transcriptomic evolution in allopolyploids.

Key words: polyploidy, interspecific hybridization, speciation, transcriptome evolution, microarray, *Spartina*

Introduction

In the recent years, significant advances have been made in our understanding of the functional consequences of reticulate evolution (resulting from interspecific hybridization) and polyploidy (resulting from whole genome duplication), reviewed in Osborn *et al.*, (2003); Adams & Wendel, (2005); Chen & Ni, (2006); Chen, (2007); Adams, (2008); Doyle *et al.*, (2008); Hegarty & Hiscock (2008), Soltis & Soltis (2009). These two processes may occur independently or consecutively in the contexts of homoploid hybrid speciation, autopolyploid or allopolyploid speciation (Gross & Rieseberg, 2005; Wendel & Doyle, 2005) and they are now recognized as central diversifying forces in plants and most eukaryotic lineages.

The paleopolyploid *Arabidopsis thaliana* allowed investigation of the long-term effects of duplicate gene expression (Blanc & Wolfe, 2004; Chapman *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006; Ha *et al.*, 2009), while experimentally re-synthesized hybrids and allopolyploids revealed the immediate consequences of genome merger and polyploidy that could be compared to their more or less recent natural counterpart (Adams *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006a; Flagel *et al.*, 2008; Rapp *et al.*, 2009). Integration of these patterns over a broad evolutionary time-scale suggests that short-term processes affecting the expression of redundant genes duplicated by polyploidy (homeologues) have a critical impact on the differential long-term loss or retention of the homoeologues (Freeling, 2009).

An important component of the expression changes discovered in allopolyploids is the biased expression of the parental homeologous genes, that was first detected using cDNA-AFLP and SSCP approaches (Adams *et al.*, 2003, 2004; Lee & Chen, 2001; Khashkush *et al.*, 2002; Tate *et al.*, 2006). This phenomenon was particularly well analysed in *Gossypium* allotetraploids (Hovav *et al.*, 2008; Flagel *et al.*, 2008, 2009; Chaudhary *et al.*, 2009) since Udall *et al.*, (2006) developed a new microarray strategy differentiating homeologous genes. Following these studies, subfunctionalization through homeologue expression partitioning in different organs or different developmental stages is now recognized as an important

immediate outcome of allopolyploidy with critical consequences on the metabolic plasticity and associated phenotypic changes (Chen, 2007).

Microarrays also allowed examining global levels of expression changes at a larger genomic scale in hybrids or allopolyploids, by comparing the total expression level of the allopolyploid to its parents and / or to the mid-parental expression value (Wang *et al.*, 2006a; Hegarty *et al.*, 2005; Rapp *et al.*, 2009; Gaeta *et al.*, 2009; Pumphrey *et al.*, 2009). The analyses indicate that hybrid or allopolyploid speciation is accompanied by non-additive expression patterns that reflect either parental expression dominance where gene expression is up- or down- regulated to the level of one of the parents (Wang *et al.*, 2006a; Rapp *et al.*, 2009) or transgressive patterns (Hegarty *et al.*, 2009).

In natural allopolyploids, the expression changes reflect the superimposed effects of hybridization (reuniting divergent regulatory networks), genome duplication (entailing functional redundancy and altered dosage), and subsequent long-term evolution of the allopolyploid lineage in various selective environmental contexts. It is thus difficult to elucidate the respective impacts of these important evolutionary processes on a single system. Studies attempting to distinguish these phenomena have involved a combination of synthetic F₁ hybrids that were compared to synthetic and / or natural allopolyploids *e.g.* in *Senecio* (Hegarty *et al.*, 2006), or *Gossypium* (Flagel *et al.*, 2008, 2010 this volume). These studies, though performed in different technical contexts (see discussion) provide the first clues on the respective roles of hybridization and genome duplication in allopolyploid transcriptome evolution.

Genus *Spartina* (Poaceae) that is composed of perennial plants colonising salt-marshes, is one of the few systems where both the F₁ hybrid and the resulting allopolyploid are alive in natural conditions; the parental species are identified and available for analysis. Moreover, the natural hybridization and polyploidization events are recent as they happened during the end of the 19th century, thus allowing exploration of the immediate consequences of allopolyploidy (Ainouche *et al.*, 2004a). The homoploid F₁ hybrid *Spartina* x *townsendii* was formed in Southern England following hybridization between the introduced hexaploid (2n=62) East-American species *Spartina alterniflora* Loiseleur (as female parent) and the European hexaploid species *Spartina maritima* (Curtis) Fernald (2n=60). Genome duplication in *S. x townsendii* gave rise to *Spartina anglica* C. E. Hubb., a highly fertile and vigorous dodecaploid (2n = 122-124, Marchant, 1963) that has rapidly expanded in range and is now introduced in several continents. A notable feature of the neopolyploid is its larger ecological range compared to the parental species and its ability to rapidly colonise a vacant

niche as pioneer species down the shore where it is able to tolerate several hours of tidal submersion, making this species highly invasive (Ainouche *et al.*, 2009).

The genetic context of the allopolyploid species formation in Western Europe (*i.e.* Genetic diversity of the parents, hybrid and allopolyploid) has been well-documented (Baumel *et al.*, 2001, 2002a, 2003; Yannic *et al.*, 2004) as well-as the phylogenetic relationships and genetic divergence of the parents (Baumel *et al.*, 2002b; Ainouche *et al.*, 2004b). A strong genetic bottleneck has precluded the formation of the allopolyploid as a result of limited diversity of the parental species and “unique origin” at the hybridization site. The populations of *Spartina anglica* analysed through the species range are composed of a major genotype that is identical to *S. x townsendii* and that exhibits additivity of the parental patterns (Ainouche *et al.*, 2004a and references therein). No major structural changes seems to have affected the homeologous genomes reunited in *S. anglica* (Baumel *et al.*, 2002a; Salmon *et al.*, 2005; Parisod *et al.*, 2009), whereas consistent methylation alterations were recorded in the hybrid, that were transmitted to the allopolyploid (Salmon *et al.*, 2005; Parisod *et al.*, 2009).

The aim of this paper is to explore transcriptomic changes in the *Spartina* system that represents an ideal situation to differentiate the effects of hybridization from the effects of genome duplication that occur immediately after natural allopolyploid speciation. As few genomic resources were available in *Spartina*, we used Rice Agilent oligomicroarrays that allowed detecting repeatable expression differences between the parental species *S. maritima* and *S. alterniflora* (Chelaifa *et al.*, unpublished). More specifically, we ask the following questions: (1) what is the extent of the “transcriptomic shock” induced by interspecific hybridization in *S. x townsendii*? (2) What is the effect of genome doubling in the neoallopolyploid *S. anglica*? (3) Are there common features of transcriptome evolution following allopolyploid speciation emerging from the systems analysed to date?

Materials and methods

Plant materials and RNA samples

As mentioned above, the parents *S. maritima* and *S. alterniflora* and the allopolyploid *S. anglica* have low inter-individual genetic diversity in Western Europe. Thus, weak genetic diversity is expected among individuals within and between populations, which expand by predominately clonal propagation. We have collected in Brittany (France) the parental species *S. maritima* (Tascon Island, Morbihan) and *S. alterniflora* (Landerneau, Finistère) and the allopolyploid *S. anglica* (Roscoff, Finistère). The hybrid *S. x townsendii* was sampled in

Hythe (England) at the original hybridization site. Several individuals were collected at each site. Plants were transplanted in the greenhouse (at Rennes University) and were grown in the same conditions (30 cm³ daily watered pots containing 2:1 mixture of soil and sand respectively) under day temperature from 20 to 22°C and night temperature from 14°C to 16°C. The ploidy level was checked for each plant using flow cytometry. After 20 days of acclimatization, 1-2 g young leaves per plant were collected from five individuals per species (originating from the same population) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Sigma, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Each RNA sample was quantified using a Nanodrop® ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) and the RNA quality was checked on RNA 6000 Nanochips using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). After processing, RNA was stored at -80°C.

Microarray experiment design and RNA hybridizations

The microarray experiments were performed at the Transcriptomic Platform BiogenOUEST® (Campus de Villejean, University of Rennes 1, France). A total of 20 slides (five replicates per species) were hybridized on a 44 K Rice Agilent array (Agilent G2519F), which contains 43,803 probes of 60-mer covering ~ 21,509 genes of the rice genome. Microarray slides were washed and scanned with an Agilent scanner (G2566AA), according to the standard protocol of the manufacturer. Information from probe features was extracted from microarray scan images using the Agilent Feature Extraction software v.9.5.1. Expression data were submitted to the National Center for Biotechnology Information's (NCBI's) Gene Expression Omnibus (GEO) repository and are available under the accession number (GenBank: GSE18961).

Microarray data analysis

As our analyses are performed in the context of cross species hybridization, reproducibility of the hybridization patterns was carefully examined. The ANOVA per gene analysis (using the R software) was used to estimate the number of *Spartina* genes that hybridized with rice oligos in all replicates.

All signals (feature extraction files) were imported into GeneSpring 10 [Agilent] software package. Only data flagged as "present" from the five replicates were subjected to normalisation. A per-chip normalisation to the 50th percentile and a per gene normalisation to median were adopted. Data were analyzed using the variance analysis ($p < 0.05$) with a

Benjamani-Hochberg multiple test correction to identify significant up- and down- regulated genes. To mimic parental additivity in the hybrid and the allopolyploid, the “*in-silico*” Mid-Parent Value (MPV) was calculated by averaging the values obtained for the parents across all replicates.

Gene ontology associated with significantly differentially expressed genes was also used to identify functional groups using GeneSpring 10 software.

Quantitative PCR

Microarray results were confirmed using real time quantitative RT-PCR for ten selection of identified genes for which the corresponding oligos were found differentially expressed on the microarray: 18S ribosomal RNA gene, 28S ribosomal RNA gene, vacuolar ATPase B gene, poly (A) binding protein, *OsPAG1*, actin gene, ribulose- phosphate 3-epimerase, *NADPH* oxidase, malate synthase-like family protein and phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PCK*) gene. Primers (table 1) were designed in *Spartina* from EST sequences obtained in *S. maritima* (Chelaifa *et al.*, unpublished).

In order to confirm the expression patterns obtained from the microarray analysis, three replicates from two RNA samples (total: 6 replicates) were analysed for each species using quantitative polymerase chain reaction (q PCR) with a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). 100 ng of total RNA from each sample were reverse-transcribed with oligo(dT)₂₀ primers using the Superscript III first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) and were diluted 20 times with sterile distilled water. Absence of genomic DNA contamination in the RNA samples was confirmed by using RNA RT⁻, amplified without reverse transcriptase. 2µl of each diluted cDNA were used per reaction with Applied Biosystems SYBR Green TaqMan® MIX and with specific forward and reverse primers (table 1). Primers were designed using primer 3 software and selected to yield amplicons of 180 – 200 bp. PCR conditions were: 50 °C for 2 min., 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 1 min and 72°C for 60s. Primer pairs that produce dimers were eliminated by melting-curve analysis. All data replicates were normalized using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH) gene amplified with the primer sequences AGAGTGCCTCGTCAAGGAGA (F) and CTCCAAGCAATCCTCATGT (R) from Baisakh *et al.*, (2006).

Results

Microarray data quality and hybridization signals

Although high stringency in hybridization conditions and long (60-mer) probes limit the potential bias induced by cross species hybridization of *Spartina* RNA on the rice microarray, we examined carefully the reproducibility of the hybridization level in each species. The ANOVA per gene analysis (using the R software) indicated that RNA from *S. maritima*, *S. alterniflora*, *S. x townsendii* and *S. anglica* hybridized with 13,573, 13,993, 13,210 and 13,535 rice genes of the array respectively, and exhibited a stable and repeatable expression level. This represents about 70% of the 21,510 rice genes of the microarrays. This proportion is consistent with the high coding sequence conservation (averaging 90%) estimated between rice and *Spartina* (Chelaifa *et al.*, unpublished). Recent studies show that cross-genus microarray hybridization is both feasible and informative in plants (Davey *et al.*, 2009; Gaeta *et al.*, 2009; Hammond *et al.*, 2006), although rates of hybridization may vary according to biological systems, to divergence rates and to the employed technology. For example over 83% of maize oligos cross hybridized with cDNAs from *Andropogon gerardii* (Travers *et al.*, 2007). *Pachycladon* species hybridized with *Arabidopsis thaliana* microarray with about 76% of hybridization (Voelckel *et al.*, 2008).

Our experimental design and statistical analyses using Genespring 10.0 allowed identification of reproducible expression differences among the five species. After data filtration with Genespring 10.0 (only flags “present” were taken into account), we were able to compare the expression of a total of 10, 744 genes that were expressed in at least one *Spartina* species.

*Gene expression comparison between the parents *S. maritima* and *S. alterniflora**

Comparisons of the two parents identified 1247 genes that exhibit significant expression differences ($p < 0.05$), which represents about 11.6 % transcriptomic divergence when considering the genes that hybridized with *Spartina* RNA on the array (10,744). Most of the differentially expressed genes appear over-expressed in *S. alterniflora* (958 genes) compared to *S. maritima* (257 genes) with more than two-fold differences. Annotation of the differentially expressed genes between *S. maritima* and *S. alterniflora* according to Biological process revealed that genes potentially involved in development and cellular growth were more represented (15.8%) than those involved in other functions. It is also noticed that genes involved in the metabolism of proteins, carbohydrate and lipid systems, cytoplasm organization, and also in biogenesis and transcription system are differentially expressed in

the leaves of these species. The large difference in expression of developmental and cellular growth genes, highly up-regulated in *S. alterniflora* and down-regulated in *S. maritima* is consistent with their different morphology and growth (Chelaifa *et al.*, unpublished).

Gene expression in the homoploid hybrid S. x townsendii

Comparison of the expression patterns of *S. x townsendii* with the Mid-parent Value” was performed for 10,744 genes that hybridized on the array in the parental species and the hybrid, and that passed all criteria of normalisation and flag filter. This analysis provided a list of 689 genes (6.4%) which showed significant differences in expression ($p < 0.05$). Most of these genes (89%) whose expression was altered in the hybrid exhibit differential expression between the parents *S. maritima* and *S. alterniflora*.

When comparing *S. x townsendii* with its parents, 1235 genes (11.5%) were found differentially expressed between the hybrid and *S. maritima*. In contrast, only 338 genes (2.9%) were differentially expressed between the hybrid and *S. alterniflora*. This four fold difference (11.5 % and 2.9%) suggests expression dominance of the maternal parent *S. alterniflora* in the hybrid. Sixty five genes exhibited transgressive patterns, *i.e.* differentially expressed between the hybrid and both parents. Among these, 40 genes were up-regulated and 25 were down-regulated in the hybrid (figure 1).

Following the analytical method developed by Rapp *et al.*, (2009), 14 expected (additive or non-additive) expression patterns of the hybrid compared to the parents were distinguished (figure 2). Additive parental patterns in the hybrid include cases where the parents have either similar or different expression patterns, and where the hybrid has intermediate expression, being either statistically different or not with the parents. An important fraction (92%) of the expressed genes in the leaves of *Spartina* exhibit additive expression patterns in the hybrids. Among the genes that are differentially expressed between the parents, the most frequent situation is when genes are up-regulated in *S. alterniflora*, down-regulated in *S. maritima* with intermediate expression level in the hybrid that is not statistically different to both parents (figure 2).

Among the genes that are not additively expressed in the hybrid, we have distinguished those that exhibit transgressive patterns (*i.e.* over-expressed or under-expressed compared to the parents) from those displaying parental dominance in the hybrid (figure 2). The number of genes that exhibit parental expression dominance appear relatively important, *S. alterniflora* being the most frequently dominant, specifically for up-regulated genes (n=573, figure 2).

Gene expression patterns in the allopolyploid S. anglica

The effects of genome duplication on the transcriptome of *S. anglica* were evaluated by comparing the allopolyploid with *S. x townsendii*, with the *in-silico* MPV and with the parental species *S. alterniflora* and *S. maritima*.

When comparing the expression patterns of *S. anglica* and *S. x townsendii* we found 497 genes (4.6%) that exhibited significant expression differences ($p < 0.05$). The majority of these genes (310) are over-expressed in the allopolyploid. We found that 391 (3.6%) genes were differentially expressed between *S. anglica* and the MPV, which suggests that the deviation from the parental expression additivity is less pronounced in the allopolyploid than in the F₁ hybrid (6.4%).

Spartina anglica exhibits 656 differentially expressed genes with *S. maritima* (6.1 %), where 569 genes are over-expressed in *S. anglica*. When we compared the allopolyploid with *S. alterniflora*, we found that 496 (4.6%) gene are differentially expressed. Among these genes (figure 3), 118 were transgressive in *S. anglica* (*i.e.* significantly exceeding the expression levels of both parental species, figure 3). The majority (101) of these transgressive genes are up-regulated in the allopolyploid. Forty of these genes were also transgressive and up-regulated in the F₁ hybrid. Our data indicate that these transgressive genes have greater expression levels in the allopolyploid than in the hybrid.

An important fraction (88.2%) of the genes that hybridized on the array exhibited additive parental expression patterns in the allopolyploid (figure 4). No particular parental expression dominance was observed (figure 4), *S. alterniflora* being only slightly more frequently dominant than *S. maritima*.

The transcriptomic differences among the parents, the hybrid and the allopolyploid are summarized in figure 6. This figure illustrates (i) the relatively important transcriptomic divergence between the parents (11.6%), (ii) the changes resulting from hybridization (6.4% difference between the F₁ hybrid and the expected expression additivity estimated by the *in-silico* MPV), (iii) the expression dominance of the maternal parent (*S. alterniflora*) in the F₁ hybrid, (iiii) the additional expression changes (4.6%) entailed by genome doubling in *S. anglica*. Genome duplication appears to have a balancing effect regarding expression divergence with the parents, as genome doubling in *S. anglica* decreases the expression divergence with *S. maritima* (which was higher in *S. x townsendii*) and increases the expression divergence with *S. alterniflora* (that was lower in *S. x townsendii*). Thus polyploidization per-se had a global buffering effect on the initial non-additive expression

levels observed following hybridization, although the non-additively expressed genes in *S. anglica* were significantly over-expressed compared with the parental species and the F₁ hybrid.

Biological significance of genes differentially expressed between Spartina species

The gene ontology (GO) of the differentially expressed genes was compared with the GO of all genes present on the array with a *p* value cut off 0.1. GO terms were assigned to all genes on the array for Biological Process. The functional category of genes which expression was affected (*i.e.* differentially expressed) by hybridization and genome duplication were identified by comparing the hybrid and the MPV on one hand and the hybrid and the allopolyploid on the other hand (figure 5).

Genes affected by hybridization are involved in various functions according to annotation by biological process (figure 5a). Electron transporters, growth and cellular development and nucleotide metabolism are more represented than the others groups and represent more than 50% of the totality of genes. Cytoplasm organization (15.7 %) and transcription factors (16%) were also largely represented, including *WRKY* transcription factor 50 (AK109578, *p*= 0.00126), general transcription factor *TFIIB* (AK068941, *p*=0.00201) and *bZIP* transcription factor (AK070887, *p*=0.02130).

We attempted to identify the functional category of the genes exhibiting transgressive expression patterns in the hybrid. Although a specific function could not be assigned for most of these genes, we were able to identify the LTR-retrotransposon *Skipper* (AK062058), the *adh1* gene (AK110720) and a GTP binding protein (*RACDP* AK06779) as up-regulated in *S. x townsendii*. A large proportion of the genes repressed in the hybrid (28%) were involved in carbohydrate metabolism.

Annotation by biological process of the genes exhibiting differential expression between the hybrid and the allopolyploid revealed that again, genes potentially involved in development and cellular growth (44.7%) were significantly more represented (figure 5b). It is also notable that transporters are highly represented (18.4%). Genes involved in carbohydrate and lipid metabolism, cytoplasm organization, and in transcription factor are also differentially expressed in the leaves of the hybrid *S. x townsendii* and the allopolyploid *S. anglica*. This distribution of the functional categories (abundance of growth and cellular development functions) in the comparison between the F₁ hybrid and the allopolyploid is similar to the distribution of genes differentially expressed between the parental species *S. maritima* and *S. alterniflora*.

The largest proportion of genes that displayed expression activation in the allopolyploid *S. anglica* is involved in catalytic activities (27.7%). Genes involved in binding lipid protein (6.7%) and in protein biosynthesis (5.2%) are also represented. Only one important transcription factor is activated: *TATA*-binding protein *TBP2* (AK061103).

Among the repressed genes in the allopolyploid, the largest proportion affected chloroplast genes (29.4%) including the chloroplast 4.5S, 5S, 16S and 23S (AK060185) and the chloroplast *rpoC2* (AK062380) genes. Two mitochondrial genes: mitochondrial 26S ribosomal RNA (AK061547) and a mitochondrial *NADH* dehydrogenase (AK064531) are also repressed in *S. anglica*.

Quantitative RT-PCR

A quantitative PCR (qRT-PCR) was employed to confirm the gene expression changes indicated by the microarray data. Seven genes exhibiting different expression patterns in the microarray were analysed, and the expression levels compared to those obtained with the rice microarrays (figure 7). This comparison revealed similar expression trends (figure 7). For example, the ribulose -phosphate 3-epimerase, *OsPAG1* and *NADPH* genes displayed the same level of expression in both qRT-PCR and microarrays: they are differentially expressed in *S. maritima* and *S. alterniflora*, highly expressed in the hybrid compared to the parents and they exhibit highest expression in *S. anglica*. Poly (A) binding protein, 18S ribosomal gene and actin genes also showed the same expression patterns with qRT-PCR and microarrays: they are differentially expressed between the parents, their expression in the hybrid is down-regulated compared to *S. alterniflora*, and *S. anglica* exhibits the highest expression. More variable expression between the qRT-PCR and microarrays was observed in the Vacuolar ATPase. For all genes and all species, expression levels appear significantly higher when estimated with qRT-PCR than with microarrays. Although this is a frequently observed phenomenon in comparisons reported in the literature (due to different sensitivities of the techniques), these differences may be accentuated by the cross-species hybridization procedure used here.

Discussion

Despite the number of genes masked by stringent statistical analyses and the effect of cross species hybridization, our results demonstrate that the rice oligomicroarray can be used to identify repeatable gene expression differences in *Spartina* species. High stringency of hybridization conditions, long (60-mer) oligo-probes limit the potential bias resulting from mismatches (Oshlak *et al.*, 2007) and have increased the reliability of the heterologous

microarray approach employed in this study. The relative high coding sequence conservation between rice and *Spartina* and among *Spartina* species (averaging 90% and 97% identity respectively, Chelaifa *et al.*, unpublished) has also limited the influence of mismatches on microarray hybridization that could potentially affect the detection of expression changes between species. Comparisons of the expression patterns in the leaves of the natural hybrid *S. x townsendii* and its parents reveal that genome merger had immediate and important consequences. The main observation is the high level of expression changes between the hybrid and its paternal parent *S. maritima* (11.4%). The level of these changes is equivalent to the proportion of differentially expressed genes (11.6%) between the parental species *S. maritima* and *S. alterniflora* that diverged from a common hexaploid ancestor ca 1 MYA and that exhibit 1-5% nucleotide divergence (Chelaifa *et al.*, unpublished). There are also clearly differences of gene expression between the natural allododecaploid *S. anglica* and the F₁ hybrid (4.6%). These results suggest that allopolyploid speciation was accompanied by two distinct phases of transcriptomic evolution, involving significant alterations following hybridization (in the hexaploid homoploid hybrid *S. x townsendii*) followed by additional changes in the allododecaploid. Only few allopolyploid monocotyledonous species have been studied to date with regard to transcriptomic evolution, apart from wheat (*e.g.* He *et al.*, 2003, Pumphrey *et al.*, 2009) where, contrasting with *Spartina*, present-day species have undergone human-selective pressure.

Non-additivity and maternal dominance in the hybrid S. x townsendii

We evaluated the effects of interspecific hybridization on gene expression by comparing the natural hybrid *S. x townsendii* to the *in silico* “Mid- parent Value”. About 6.4% of the analysed genes were non-additively expressed compared to the parents *S. maritima* and *S. alterniflora*. These results suggest consistent changes induced by the merger of differentiated genomes. Gene misexpression resulting from the reunion of divergent regulatory networks may underlie reproductive isolation mechanisms in interspecific hybrids (Renaut *et al.*, 2009). “Transcriptome shock”, the extended view of the “genome shock” concept (Mc Clintock, 1984) appears to be a common feature of the interspecific hybrids examined to date even though the results were obtained in different genetic and technical contexts. In plants, using long (70-mer) oligonucleotide microarrays, Wang *et al.*, (2006a) detected 5.2 to 5.6 % deviations from parental expression additivity in leaves from hybrids between the tetraploids *Arabidopsis thaliana* and *A. arenosa*. Hegarty *et al.*, (2005) have employed anonymous cDNA microarrays that revealed 5-7% genes of the array differentially

expressed in flowers between the interspecific triploid hybrid *Senecio x baxteri* resulting from hybridization between the diploid *S. squalidus* and the tetraploid *S. vulgaris*. *Helianthus* EST-based cDNA microarrays allowed detecting expression changes between the homoploid interspecific hybrid *Helianthus deserticola* and its parental diploid species *H. annuus* and *H. petiolaris* (Lai *et al.*, 2006) where 12.8 % genes on the array exhibited differential expression across seedlings from the three species. Flagel *et al.*, (2008) employed a microarray technology which uses homeolog (*i.e.* parental) specific probe sets, and showed that 24% of the genes exhibited biased expression patterns (unequal parental contributions) in a synthetic interspecific hybrid between the diploid *Gossypium arboreum* and *G. raimondii*.

An important proportion of the non-additively expressed genes in *S. x townsendii* exhibit similar expression patterns to the maternal parent *S. alterniflora*. This phenomenon, termed “expression dominance” was thoroughly described by Rapp *et al.*, (2009) in two experimentally re-synthesized allotetraploids (colchicine doubled hybrids) from the genus *Gossypium*, where the maternal parent was alternatively the “dominant” or “recessive” depending on the specific genomic combination. Expression dominance was also observed in synthetic hybrids between tetraploid *Arabidopsis thaliana* and the tetraploid *A. arenosa* (Wang *et al.*, 2006a; Chen, 2007) where most of the genes expressed at higher levels in *A. thaliana* than in *A. arenosa* were repressed to the level of *A. arenosa* in the hybrids. In *S. x townsendii*, the expression dominance affects genes that were either up-regulated or down-regulated in *S. alterniflora* compared to *S. maritima*. The maternal expression dominance was unexpected as it contrasts with the analyses performed at the genomic (DNA) level, where the maternal genome from *S. alterniflora* seems to be more prone to genetic changes as examined with AFLP (Salmon *et al.*, 2005) and SSAP (Parisod *et al.*, 2009) markers.

Not all the non-additively expressed genes were the result of parental dominance as 60 genes were also found to exhibit transgressive patterns in *S. x townsendii*. Extreme phenotypes relative to parents are frequently observed in interspecific hybrids (Gross & Riesberg, 2005). Transgressive expression patterns were found correlated with adaptation to xeric condition in the homoploid hybrid *Helianthus deserticola* (Lai *et al.*, 2006). Equal number of transgressive genes were up-regulated or down-regulated compared to the parents, whereas in our study, most transgressive genes (40/60) were up-regulated. No particular functional category was over-represented among the genes that were non-additively expressed in *S. x townsendii*, as also encountered in the hybrid *Senecio x baxteri* (Hegarty *et al.*, 2006). Transgressive expression patterns were also reported in both the natural and experimentally resynthesized homoploid hybrid *Senecio squalidus* occurring in

the UK (Hegarty *et al.*, 2009) where most non-additive genes were up-regulated compared to the Mid-Parental Value.

Gene expression changes in hybrids involve various mechanisms that are being elucidated. The reunion of divergent genomes in the same nucleus results into interaction of diverged regulatory hierarchies (Riddle & Birchler, 2003). Interacting cis- and trans-regulatory factors were shown to be involved in expression changes of synthetic hybrids (Wittkop *et al.*, 2004; Stupar & Springer, 2006; Zhuang & Adams, 2007; Tirosh *et al.*, 2009; Chaudhary *et al.*, 2009). These changes may have important phenotypic impact (*e.g.* flowering time variation in *Arabidopsis*, Wang *et al.*, 2006b).

Epigenetic regulation represents an important mechanism altering expression following hybridization. Important methylation changes were reported in *S. x townsendii* (Salmon *et al.*, 2005). Transposable elements are usually targets to epigenetic repression that may be altered following genomic stress such as hybridization. In this study, we have also identified a LTR-retrotransposon *Skipper* among the transgressively expressed genes in *S. x townsendii*, which is consistent with previous findings reporting activation of transposable elements following hybridization (Khaskush *et al.*, 2002). This transcriptional activation does not obviously entail transposition bursts (Madlung *et al.*, 2005; Parisod *et al.*, this volume) but it may alter expression of adjacent genes (Kashkush *et al.*, 2003). In *Arabidopsis* interspecific hybridization resulted in the activation of the paternal copies of the normally silenced *ATHILA* transposable element (Josefsson *et al.*, 2006) that was associated to hybrid inviability; this activation was found sensitive to parental genome dosage. Interestingly, in *Spartina*, most methylation alterations following hybridization were found in regions flanking transposable elements (Parisod *et al.*, 2009).

The multiple molecular mechanisms involved in the expression changes occurring in hybrids play a central role in the hybrid vigour or heterosis (Birchler *et al.*, 2003; Swanson-Wagner *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Although sterile, *S. x townsendii* exhibits particular vigour for vegetative traits (Marchant, 1967) and a recent survey in southern England revealed that this F₁ hybrid still fares well at its site of origin where it co-occurs with the allopolyploid *S. anglica* (Renny-Byfield *et al.*, accepted with revisions). Despite its aggressive ecological habit, *S. anglica* has not out-competed *S. x townsendii* at the hybridization site after more than 100 years.

Hybridization versus genome duplication -induced expression changes

Hybridization is considered to play a major role in the expression changes exhibited by allopolyploidy (Adams, 2007; Hegarty *et al.*, 2006, 2008; Albertin *et al.*, 2006), whereas moderate changes seem to be associated with autopolyploidy (Wang *et al.*, 2006; Stupar *et al.*, 2007). Contrasting with previous investigations at the DNA level highlighting the high genomic similarity between the F₁ hybrid and the allopolyploid (Baumel *et al.*, 2002; Ainouche *et al.*, 2004; Salmon *et al.*, 2005; Ainouche *et al.*, 2009), chromosome doubling appear to have an important effect on the transcriptome of *S. anglica*. Epigenetic changes (methylation alteration at CpG sites) were found about five-times greater following hybridization than after genome doubling at both random loci (Salmon *et al.*, 2005) and in the vicinity of transposable elements (Parisod *et al.*, 2009), where *S. anglica* inherited almost all the parental additive and non-additive patterns encountered in the F₁ hybrid. Our study indicates that additionally to hybridization, genome duplication and subsequent generations caused 4.6% of gene expression changes between the hybrid *S. x towensendii* and the allopolyploid.

It is now well-established that allopolyploidy is accompanied by both additive and non-additive patterns of parental gene expression affecting various organs and functions in different plant genera such as *Arabidopsis* (Lee & Chen 2001; Wang *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2009), *Brassica* (Chen & Pikaard, 1997; Gatea *et al.*, 2007, 2009) *Gossypium* (Adams *et al.*, 2003; Udall *et al.*, 2006; Hovav *et al.*, 2008; Flagel *et al.*, 2008; Chaudhary *et al.*, 2009; Rapp *et al.*, 2009) *Triticum* (He *et al.*, 2003; Pumphrey *et al.*, 2009), *Senecio* (Hegarty *et al.*, 2005, 2006), *Tragopogon* (Tate *et al.*, 2006), although the patterns and intensity of these changes, together with the associated mechanisms vary among the models investigated to date (reviewed in Osborn *et al.*, 2003; Adams, 2007; Chen, 2007; Doyle *et al.*, 2008). It should be noticed that not all studies have dissociated the respective effects of hybridization and genome duplication. Moreover, most of the knowledge gained on the immediate consequences of allopolyploidy on gene expression reported in the literature is based on experimentally resynthesized polyploids that are eventually compared to their natural counterpart. In most cases, naturally occurring F₁ hybrids were not available, thus limiting the analysis to experimental conditions. To our knowledge, our study is the first that performs comparison between the actual F₁ hybrid and its immediate derived allopolyploid that were formed and survived in natural conditions. Contrasted results were reported in the two studies that have compared global gene expression patterns between synthetic F₁ hybrids and allopolyploids: Hegarty *et al.*, (2006) found that genome duplication in the allohexaploid *Senecio cambrensis*

had a “calming (reducing) effect” on the altered patterns of gene expression they detected in the synthetic triploid F₁ hybrid *Senecio x baxteri* mentioned above. In natural and synthetic allotetraploid cotton, Flagel *et al.*, (2008) showed that homeolog biased expression resulting from the unequal contribution of the parental genomes to the total transcriptome was due essentially to genome merger, but that additional changes (amplification of expression bias) appeared in the allopolyploids, that were not instigated by genome merger. In *Spartina*, the deviation from parental expression additivity (as estimated with the MPV) was more pronounced in the F₁ hybrid *S. x townsendii* (6.4%) than in the allopolyploid *S. anglica*, suggesting a similar trend to that observed in *Senecio*. However, genome duplication also entailed expression changes in *S. anglica* (discussed below) as found in *Gossypium*.

Over expression following genome duplication in the recent allododecaploid S. anglica

The maternal expression dominance encountered in *S. x townsendii* (for 573 genes) appears attenuated in *S. anglica* (126 genes). However, a remarkable feature of the effect of genome duplication in *S. anglica* is the increased number of transgressively expressed genes (compared to the F₁ hybrid) that are over-expressed, indicating that genome duplication had also an immediate effect on the transcriptome evolution. This over-expression trend revealed in *S. anglica* is interesting and contrasts with previous observations where gene silencing was the main phenomenon characterizing expression alteration following polyploidy (Adams & Wendel, 2004; Adams, 2007; Chen, 2007). Wang *et al.*, (2004, 2006a) reported mainly transcript deactivation in *Arabidopsis*; Pumphrey *et al.*, (2009) found 7% down-regulated genes and 9% up-regulated genes (compared to MPV) in seedling leaves of synthetic allohexaploid wheat. Over-expressed genes following genome duplication in *Spartina* were mainly involved in catalytic activity. Down-regulated genes were also encountered in *S. anglica* and they were mostly represented by cytoplasmic genes. Although dosage of cytoplasmic genes is not affected by whole genome duplication, it is interesting to note that Hegarty *et al.*, (2009) reported altered expression of cytoplasmic genes (including over-expression of a fertility-restorer like gene) following interspecific hybridization in *Senecio squalidus* and considered the potential impact of misregulation of the cytoplasmic genes on the cytoplasmic male sterility that affect interspecific hybrids.

Various genetic, epigenetic and regulatory mechanisms may account for the expression changes in polyploids. In recent *Tragopogon* allotetraploids, preferential expression of parental homeologues (detected using cDNA AFLP) was found correlated with loss of parental genomic fragments (Tate *et al.*, 2006). These changes were not observed in the

experimentally re-synthesized *Tragopogon* F₁ hybrids, indicating that they arose following genome duplication. The allotetraploid *Tragopogons* were formed reciprocally multiple times and appear karyotypically unstable regarding the parental contribution (Lim *et al.*, 2008). Homeolog loss and gene silencing is occurring in independently formed allopolyploid populations (Tate *et al.*, 2009; Buggs *et al.*, 2009). Similar findings were reported in *Brassica napus*, another noteworthy structurally unstable allotetraploid (Cifuentes *et al.*, this volume, Gaeta & Pires, this volume, Gaeta *et al.*, 2007). Genome-wide analysis of gene expression (using *Arabidopsis* microarrays) in the *Brassica napus* lines exhibiting different number of genetic changes at the S_{5:6} generation, indicated however no global effect of genomic rearrangement (Gaeta *et al.*, 2009). *Spartina anglica* is in contrast a genetically stable allopolyploid that exhibits identical sequence composition and methylation patterns as the F₁ hybrid *S. x townsendii* (Baumel *et al.*, 2002a; Ainouche *et al.*, 2004; Salmon *et al.*, 2005), so the observed changes are not likely the result of neither structural changes nor massive methylation alterations, as found in allotetraploid cotton (Liu *et al.*, 2001).

The observed expression changes in *S. anglica* reflect functional consequences of the high genomic redundancy of the allododecaploid genome. As *S. anglica* is a perennial clonal species where individuals may survive more than 10 years, one century of evolution may actually represent a limited number of generations elapsed since the time of the species formation. Thus, it is likely that most of the observed changes represent immediate or very short-term responses to whole genome duplication, although we cannot rule out evolutionary events affecting the transcriptome subsequent to allopolyploid speciation, as reported in recent *Tragopogon* allopolyploids (Buggs *et al.*, 2009; Buggs *et al.*, this volume). Following duplication, different gene categories can exhibit various expression patterns. It has been shown that most regulatory genes are dosage-dependent, whereas housekeeping or enzymatic/metabolic genes usually exhibit dominance or recessive patterns between allelic alternatives (Birchler *et al.*, 2003). Dosage compensation is known as a regulatory phenomenon reducing duplicate gene expression to a “diploid-like” level (Birchler *et al.*, 2005). A balance in regulatory processes, where the components are sensitive to stoichiometric relationships, appears to play an important role in the long-term maintenance of duplicated genes during the evolution of polyploid species (Birchler & Veitia, 2007).

In conclusion, our analyses of the *Spartina* system allowed us analyzing separately the short-term consequences of genome merger and duplication in a natural system during the allopolyploid speciation process.

Our data indicate important, though different effects of both processes reflecting the decoupled effects of hybridization on one hand and genome redundancy on the other hand, on the genetic, epigenetic and regulatory mechanisms that characterize transcriptomic evolution in allopolyploids. The changes detected are underestimated, regarding the cross-hybridization microarray procedure and stringent analysis. Moreover, the global gene expression analysis does not allow distinguishing the relative contribution of the homeologues to the transcriptome, and to differentiate the cases where similar levels of expression are attained either via equal expression of the homeologous parental genomes or via biased parental expression. Different homeologs may also have different binding affinities to the oligos when in competition to each other, that are not exhibited when they are not in competition. The new massive parallel sequencing technologies might offer promising perspectives to previously poorly investigated genomes of natural systems such as *Spartina* and to develop comparisons across various allopolyploids that will provide a clear picture of the general trends characterising transcriptome evolution during the speciation process.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency (ANR, Polyploidy and Biodiversity project) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). H.C was supported by a fellowship from the French Ministry of Education. Regis Bouvet is thanked for assistance during the microarray experiments. We are grateful to R. Rapp and J. Wendel for helpful exchanges on transcriptome analyses in polyploids, and to three anonymous reviewers for their constructive comments.

References

- Adams KL. 2007.** Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of Heredity* **98**(2): 136-141
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003.** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**(8): 4649-4654.
- Adams KL, Percifield R, Wendel JF. 2004.** Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* **168**(4): 2217-2226.
- Adams KL, Wendel JF. 2004.** Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 573-581.
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(2): 135-141.

- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A. 2004a.** *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 475-484.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G. 2004b.** Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **161**(1): 165-172.
- Ainouche ML, Fortune PM, Salmon A, Parisod C, Grandbastien MA, Fukunaga K, Ricou M, Misset MT 2009.** Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biological invasions* 1387-3547
- Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H. 2006.** Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* **173**(2): 1101-1113.
- Baisakh N, Subudhi PK, Parami NP. 2006.** cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Plant Science* **170**(6): 1141-1149.
- Baumel A, Ainouche M, Kalendar R, Schulman AH. 2002a.** Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution* **19**(8): 1218-1227.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, Ainouche AK, Misset MT. 2002b.** Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**(2): 303-314.
- Baumel A, Ainouche ML, Levasseur JE. 2001.** Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology* **10**(7): 1689-1701.
- Baumel A, Ainouche ML, Misset MT, Gourret JP, Bayer RJ. 2003.** Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* x *neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution* **237**(1-2): 87-97.
- Birchler JA, Auger DL, Riddle NC. 2003.** In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* **15**(10): 2236-2239.
- Birchler JA, Riddle NC, Auger DL, Veitia RA. 2005.** Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends in Genetics* **21**(4): 219-226.
- Birchler JA, Veitia RA. 2007.** The gene balance hypothesis: From classical genetics to modern genomics. *Plant Cell* **19**(2): 395-402.
- Blanc G, Wolfe KH. 2004.** Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**(7): 1667-1678.
- Buggs RJA, Doust AN, Tate JA, Koh J, Soltis K, Feltus FA, Paterson AH, Soltis PS, Soltis DE. 2009.** Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. *Heredity* **103**(1): 73-81.
- Buggs RJA, Elliott et al.,** in this volume.
- Chen ZJ. 2007.** Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 377-406.
- Chen ZJ, Ni ZF. 2006.** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays* **28**(3): 240-252.
- Chen ZJ, Pikaard CS. 1997.** Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: Biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **94**(7): 3442-3447.
- Chapman MA, Burke JM. 2006.** Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *New Phytologist* **170**(3): 429-443.

- Chaudhary B, Fligel L, Stupar RM, Udall JA, Verma N, Springer NM, Wendel JF. 2009.** Reciprocal Silencing, Transcriptional Bias and Functional Divergence of Homeologs in Polyploid Cotton (*Gossypium*). *Genetics* **182**: 503–517
- Christin PA, Petitpierre B, Salamin N, Buchi L, Besnard G. 2009.** Evolution of C-4 phosphoenolpyruvate carboxykinase in grasses, from genotype to phenotype. *Molecular Biology and Evolution* **26**(2): 357–365.
- Davey MW, Graham NS, Vanholme B, Swennen R, May ST, Keulemans J. 2009.** Heterologous oligonucleotide microarrays for transcriptomics in a non-model species; a proof-of concept study of drought stress in *Musa*. *BMC Genomics* **10**:436
- Doyle JJ, Fligel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF. 2008.** Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. *Annual Review of Genetics* **42**: 443–461.
- Fligel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J. 2008.** Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* **6**.
- Fligel L, Chen L, Chaudhary B, Wendel J. 2009.** Coordinated and fine-scale control of homoeologous gene expression in allotetraploid cotton. *Journal of Heredity* **100**: 487–490.
- Fligel L & Wendel J.** Evolutionary rate variation, genomic dominance, and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation. In this volume
- Freeling M. 2009.** Bias in Plant Gene Content Following Different Sorts of Duplication: Tandem, Whole-Genome, Segmental, or by Transposition. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 433–453.
- Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007.** Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* **19**(11): 3403–3417.
- Gaeta RT, Yoo S-Y, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC. 2009.** Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70 mer Oligo Microarrays. *PLoS ONE* **4**(3): e4760.
- Gross BL, Rieseberg LH. 2005.** The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity* **96**:241–252.
- Ha M, Kim ED, Chen ZJ. 2009.** Duplicate genes increase expression diversity in closely related species and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**(7): 2295–2300.
- Hammond JP, Bowen HC, White PJ, Mills V, Pyke KA, Baker JMA, Whiting SN, May ST, Broadley MR. 2006.** A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytologist* **170**: 239–260
- He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. 2003.** Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* **52**(2): 401–414.
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, Edwards KJ, Abbott RJ, Hiscock SJ. 2008.** Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**(1506): 3055–3069.
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, Edwards KJ, Abbott RJ, Hiscock SJ. 2009.** Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Molecular Ecology* **18**(5): 877–889.
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. 2006.** Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* **16**(16): 1652–1659.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ. 2008.** Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Current Biology* **18**(10): R435–R444.

- Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA, Sanchez-Baracaldo P, Liu G, Buggs RJ, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. 2005.** Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Molecular Ecology* **14**(8):2493-510
- Hovav R, Chaudhary B, Udall JA, Flagel L, Wendel JF. 2008.** Parallel domestication, convergent evolution and duplicated gene recruitment in allopolyploid cotton. *Genetics* **179**(3): 1725-1733.
- Josefsson C, Dilkes B, Comai L. 2006.** Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology* **16**(13): 1322-1328.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002.** Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* **160**(4): 1651-1659.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003.** Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* **33**(1): 102-106.
- Lai Z, Gross B, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH. 2006.** Detecting differential gene expression in homoploid hybrid sunflower species using microarrays. *Molecular Ecology* **15**:1213-1227
- Lee HS, Chen ZJ. 2001.** Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**(12): 6753-6758.
- Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Clarkson JJ, Grandbastien MA, Leitch AR. 2007.** Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. *New Phytologist* **175**(4): 756-763.
- Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC, Wendel JF. 2001.** Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **44**(3): 321-330.
- Li X, Wei Y, Nettleton D, Brummer EC. 2009.** Comparative gene expression profiles between heterotic and non-heterotic hybrids of tetraploid *Medicago sativa*. *BMC Plant Biology* **9**:107
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang HM, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L. 2005.** Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant Journal* **41**(2): 221-230.
- McClintock B. 1984.** The Significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**(4676): 792-801.
- Marchant CJ. 1963.** Corrected chromosome numbers for *Spartina x townsendii* and its parent species. *Nature* **31**: 929
- Marchant CJ. 1967.** Evolution in *Spartina* (Gramineae). I. The history and morphology of the genus in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **60**: 1-24.
- Ni ZF, Kim ED, Ha MS, Lackey E, Liu JX, Zhang YR, Sun QX, Chen ZJ. 2009.** Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**(7227): 327-U327.
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA. 2003.** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**(3): 141-147.
- Oshlack A, Chabot AE, Smyth GK, Gilad Y. 2007.** Using DNA microarrays to study gene expression in closely related species. *Bioinformatics* **23** : 1235-1242.
- Parisod C, Salmon A, Zerjal T, Tenaillon M, Grandbastien MA, Ainouche M. 2009.** Rapid structural and epigenetic reorganization near Transposable Elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina*. *New phytologist*. In press
- Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, Ainouche M, Chalhoub B, Grandbastien M-A. 2009.** Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. In this volume

- Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS. 2009.** Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics* **181**: 1147–1157
- Rapp RA, Udall JA, Wendel JF. 2009.** Genomic expression dominance in allopolyploids. *BMC Biology* **7**: 18.
- Renaut S, Nolte AW, Bernatchez L. 2009.** Gene expression divergence and hybrid misexpression between lake Whitefish Species Pairs (*Coregonus spp. Salmonidae*) *Molecular Biology and Evolution*. **26**(4):925–936.
- Riddle NC, Birchler JA. 2003.** Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics* **19**(11): 597-600.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. 2005.** Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**(4): 1163-1175.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The role of hybridization in plant speciation. Annual Review of *Plant Biology* (**60**):561-588.
- Stupar RM, Springer NM. 2006.** Cis-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F-1 hybrid. *Genetics* **173**(4): 2199-2210.
- Swanson-Wagner RA, Jia Y, DeCook R, Borsuk LA, Nettleton D, Schnable PS. 2006.** All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F-1 hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**(18): 6805-6810.
- Tate JA, Ni ZF, Scheen AC, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D, Chen ZJ, Soltis PS, Soltis DE. 2006.** Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (*Asteraceae*), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* **173**(3): 1599-1611.
- Tate JA, Joshi P., Soltis KA, Soltis PS, Soltis DE. 2009.** On the road to diploidization? Homeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (*Asteraceae*). *BMC Plant Biology* **9** (80): 1-10.
- Travers SE, Smith MD, Bai JF, Hulbert SH, Leach JE, Schnable PS, Knapp AK, Milliken GA, Fay PA, Saleh A, Garrett KA. 2007.** Ecological genomics: making the leap from model systems in the lab to native populations in the field. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 19-24
- Tirosh I, Reikhav S, Levy AA, Barkai N. 2009.** A yeast hybrid Provides Insight into the evolution of gene expression regulation. *Science* **324**(5927): 659-662.
- Thomas BC, Pedersen B, Freeling M. 2006.** Following tetraploidy in an *Arabidopsis* ancestor, genes were removed preferentially from one homeolog leaving clusters enriched in dose-sensitive genes. *Genome Research* **16**(7): 934-946.
- Udall JA, Swanson JM, Nettleton D, Percifield RJ, Wendel JF. 2006.** A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics* **173**(3): 1823-1827.
- Voelckel C, Heenan PB, Janssen B, Reichelt M, Ford K, Hofmann R, Lockhart PJ. 2008.** Transcriptional and biochemical signatures of divergence in natural populations of two species of New Zealand alpine *Pachycladon*. *Molecular Ecology* **17**: 4740-4753
- Wang JL, Tian L, Lee HS, Chen ZJ. 2006b.** Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in *Arabidopsis* allopolyploids. *Genetics* **173**(2): 965-974.
- Wang JL, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ. 2004.** Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* **167**(4): 1961-1973.

- Wang JL, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang HM, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ. 2006a.** Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* **172**(1): 507-517.
- Wendel JF. 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**(1): 225-249.
- Wendel JF, Doyle J. 2005.** Polyploidy and evolution in plants. In R.J. Henry (ed.) *Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants: 97-117.*
- Wittkopp PJ, Haerum BK, Clark AG. 2004.** Evolutionary changes in Cis and Trans gene regulation. *Nature* **430**(6995): 85-88.
- Yannic G, Baumel A, Ainouche M. 2004.** Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Heredity* **93**(2): 182-188.
- Zhuang Y, Adams KL. 2007.** Extensive allelic variation in gene expression in *Populus* F-1 hybrids. *Genetics* **177**: 1987-1996.

Table 1

Primers used for the qRT-PCR analysis

Coding regions (<i>S. maritima</i> ESTs)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Vacuolar ATPase B	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
18S ribosomal	GGAAACAGCCCAATTCTTCA	ACAAGAACGTGTTTGCCACA
Poly(A)-binding protein	TGGATGCTGCAAGAGCTATG	AGATTGGCCCATTTTCATCTG
28S ribosomal	CATGGGTAAGCCGATCCTAA	CAGGCCGTTAAGCAGAAAAG
OsPAG1	GGTCTATGGGGAACCCATTT	TTTGCAGCCTGTCTTCCTTT
Actin	CTGCCATGTATGTTGCCATC	TAGCCCCTCTCGGTAAGGAT
Ribulose-phosphate 3-epimerase	CCCTTCCATCCTATCTGCAA	GATCAGTCACTGGACGCAGA
NADPH oxidase	TGTATGACGTCAGGCTCTCG	TCCAACCCAACCACTAAAGC
Malate synthase-like family protein	GGTGTCCCGACTTTCCTGT	CAGCCATGCTTCTCTCCTTC
Phosphoenolpyruvate carboxykinase*	*CAGCGACAGCTCCCTCAAGT	*CGATCTTGTAGCTGGCGAACAC

* Primers from Christin *et al.*, (2009)

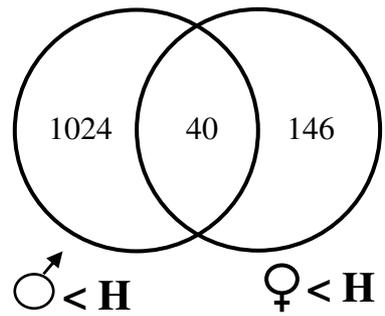
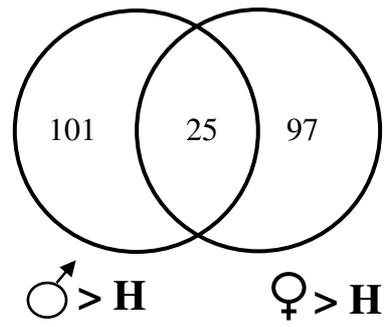


Figure 1 Venn diagram of genes with significant differential expression between the hybrid *S. x townsendii* (H) and the parental species (paternal *S. maritima* and maternal *S. alterniflora*) in the case of up- and down- regulation

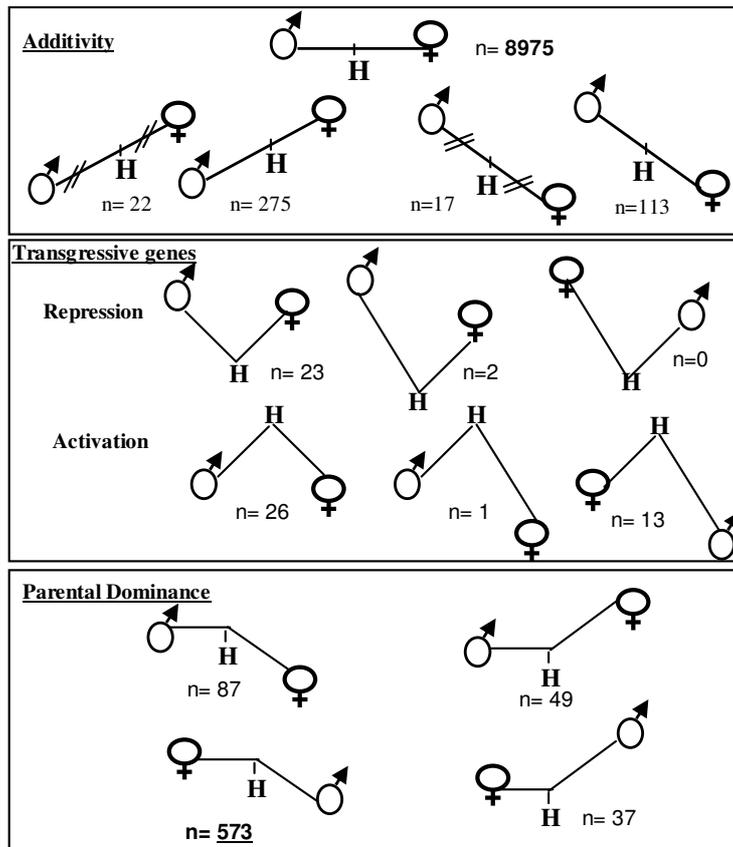


Figure 2 Expression patterns in the hybrid (H), the (paternal) *S. maritima* and (maternal) *S. alterniflora*). n represents the corresponding number of genes in each condition. Double bars indicate significant expression difference between the hybrid and the parents in the additive patterns.

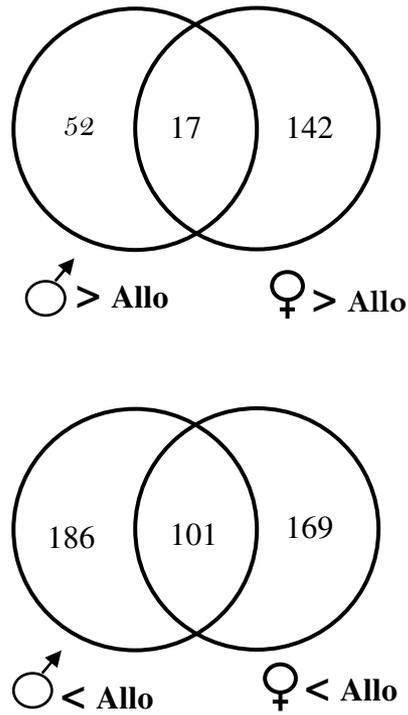


Figure 3 Venn diagram of genes with significant differential expression between the parents (paternal *S. maritima* and maternal *S. alterniflora*) and the allopolyploid *S. anglica* (Allo) in the case of up- and down- regulation

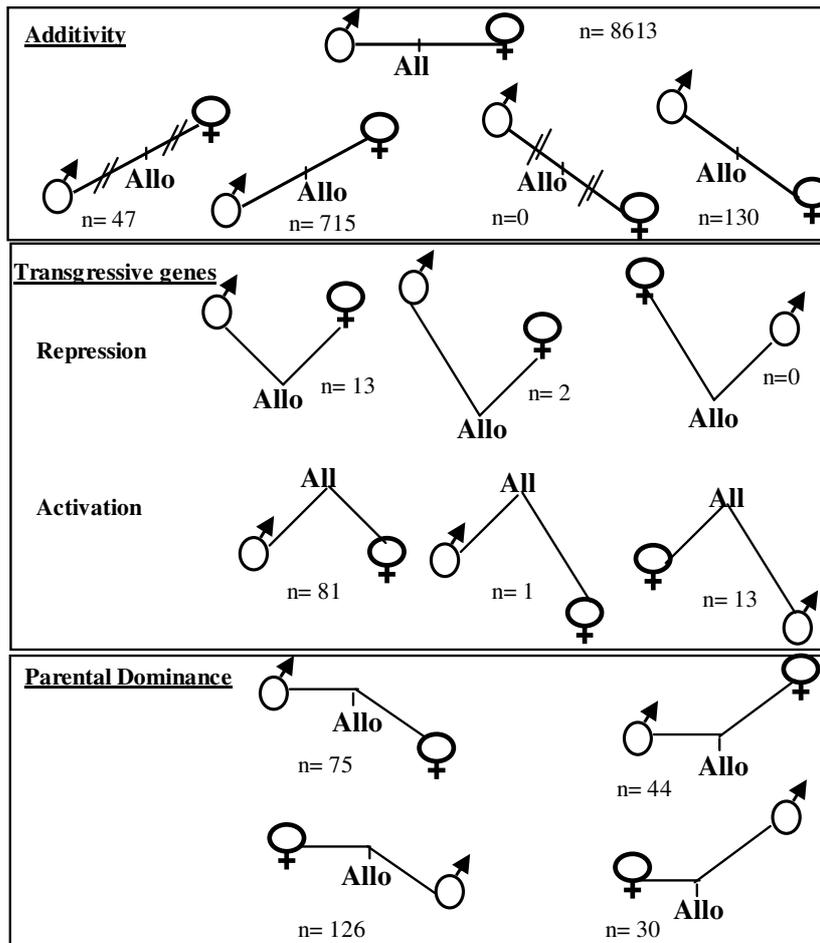


Figure 4 Expression patterns in the allopolyploid *S. anglica* (Allo) and the parents (paternal *S. maritima* and maternal *S. alterniflora*). n represents the corresponding number of genes in each condition. Double bars indicate significant expression difference between the allopolyploid and the parents in the additive patterns

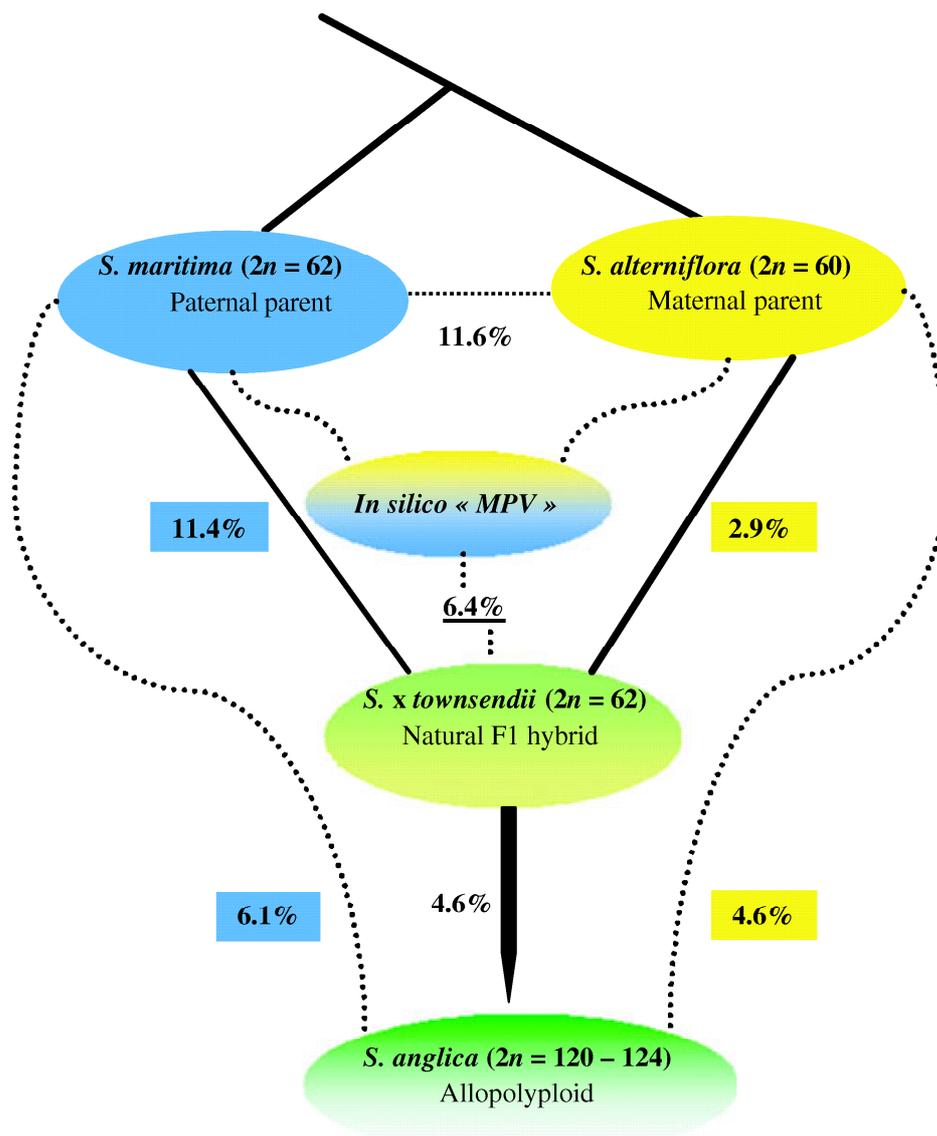


Figure 5 Transcriptomic differences among the five *Spartina* species, with the percent of genes differentially expressed between the hybrid or the allopolyploid with the maternal parent *S. alterniflora* (in yellow) and with the male parent (in blue) *S. maritima*. The underlined value indicates genes differentially expressed between the hybrid and the *in-silico* MPV. Black lines represent natural genealogical relationships, including divergence of *S. maritima* and *S. alterniflora* from a common hexaploid ancestor, hybridization between *S. maritima* and *S. alterniflora* and genome duplication (thicker line) of the hybrid *S. x townsendii*

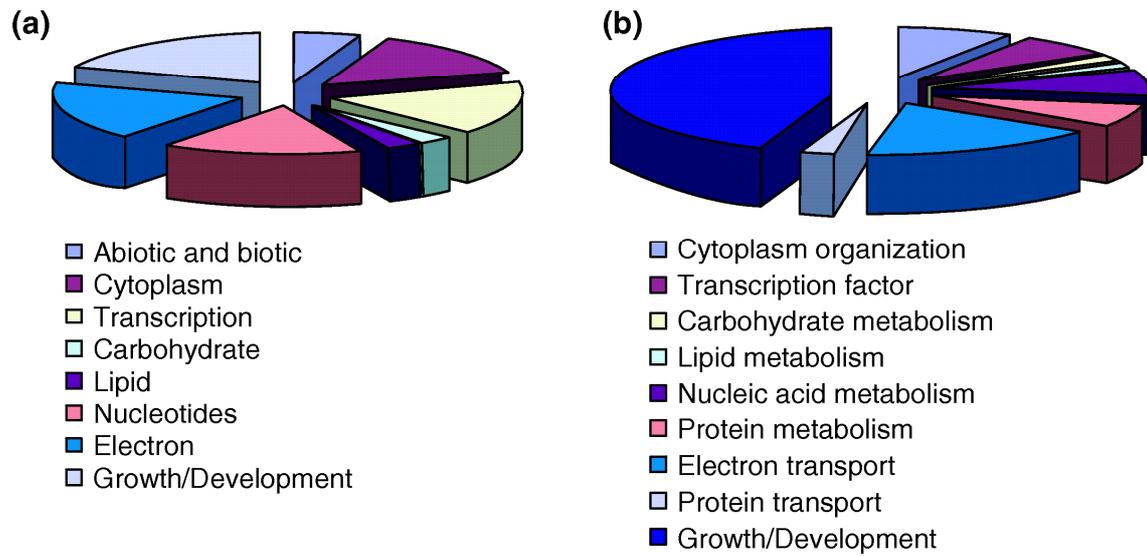


Figure 6 Functional distribution of the differentially expressed genes among GO Biological process annotated genes (a) between the hybrid *S. x towensendii* and the “MPV” (b) between the hybrid *S. x towensendii* and the allopolyploid *S. anglica*

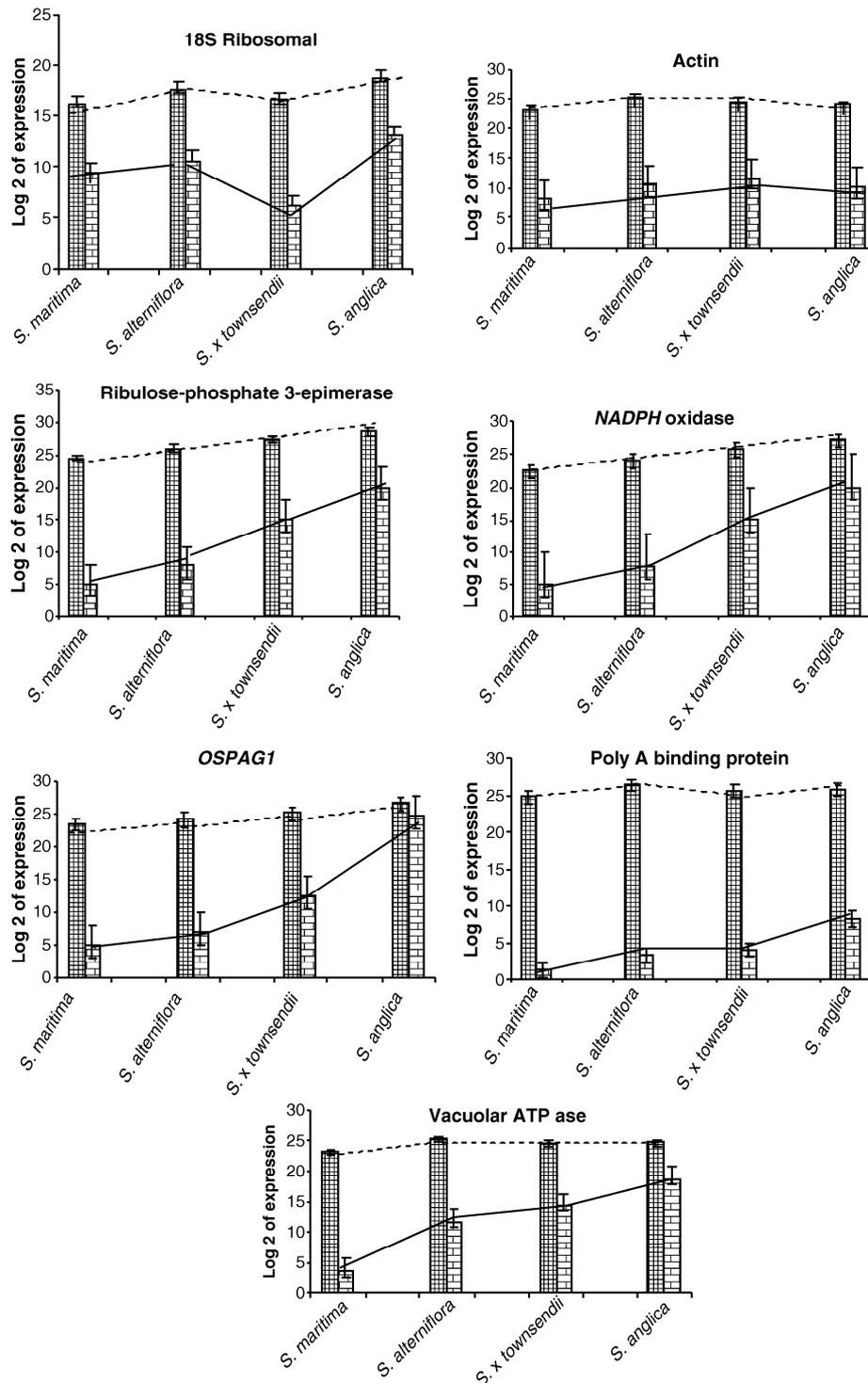


Figure 7 Comparison of the microarray and the qPCR expression patterns for seven genes. Broken lines indicate the expression changes between species with qPCR data and continuous lines indicate of expression changes with microarrays data

Partie B

Spéciation allopolyploïde

&

Éléments transposables

I. Introduction générale et démarche suivie

Les éléments transposables (ETs) sont les composantes les plus importantes du génome des eucaryotes (Bennetzen 2001, 2005). De ce fait, ils représentent un compartiment majeur susceptible d'être affecté par l'hybridation et la duplication du génome au cours de la spéciation allopolyploïde (Parisod *et al.* 2010a). Depuis que la notion du dynamisme particulier des génomes polyploïdes (Wendel 2000) a été révélée, une attention particulière a été accordée au rôle des éléments transposables dans cette évolution. Plusieurs travaux ont montré que l'allopolyploïdization est généralement associée à des altérations structurelles et fonctionnelles rapides des génomes dans les régions voisines des ETs (Matzke & Matzke 1998, Comai *et al.* 2003).

L'analyse des génomes d'espèces polyploïdes plus ou moins anciennes, révèle que des changements peuvent être causés par les éléments transposables au niveau génétique (*e.g.* Zhao *et al.* 1998; Petit *et al.* 2010), épigénétique (*e.g.* Parisod *et al.* 2009) ou transcriptionnel (*e.g.* Kashkush *et al.* 2003). La dynamique d'amplification-délétion (« turnover ») des éléments transposables pourrait ainsi contribuer à la divergence plus ou moins rapide des génomes polyploïdes par rapport aux espèces progénitrices (Ozkan *et al.* 2003, Grover *et al.* 2007). Chez le blé allotétraploïde (AABB), Les données du séquençage de régions génomiques du chromosome 3B dans les génomes A et B ont montré que l'allopolyploïdization n'avait pas entraîné de prolifération d'éléments transposables (Charle *et al.* 2008).

Chez les spartines, les éléments transposables ont commencé à être explorés au niveau structural et épigénétique, à l'aide de différentes méthodes de « transposon display » comme l'IRAP (Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified polymorphism) par Baumel *et al.* (2002b), et MSTD (Methyl-Sensitive Transposon Display) par Parisod *et al.* (2009). La formation de la nouvelle espèce *S. anglica* ne s'est pas accompagnée d'une transposition notable pour les éléments testés à ce jour, néanmoins, elle est associée à d'importants changements des profils de méthylation dans les régions voisines d'éléments transposables.

Dans ce chapitre, nous étudions les conséquences transcriptomiques de l'hybridation et de la polyploïdie dans les régions flanquant les éléments transposables, en utilisant la méthode SSAP. Nous avons appliqué cette méthode sur l'ADNc de différentes espèces de spartines afin d'examiner les conséquences transcriptomiques de la spéciation allopolyploïde dans les régions voisines de 3 éléments transposables de classe I (*Wis-like* et *Cassandra*) et de

classe II (*Ins2*). L'introduction de plusieurs échantillons (provenant de différentes populations) par espèce nous a également permis d'évaluer la variabilité intra spécifique des profils transcriptomiques des régions ciblées sur des plantes maintenues en mêmes conditions expérimentales.

I.1. Démarche suivie

Nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus dans l'équipe (1) sur ADN génomique ciblant les mêmes éléments chez les spartines (Parisod *et al.* 2009) et (2) par AFLP d'ADNc portant sur les mêmes échantillons (Dauvergne et Pourtau, données non publiées). Cette analyse comparative permet de confronter les effets de la spéciation allopolyploïde de façon globale (par AFLP) et de façon ciblée (dans l'environnement des éléments transposables) au niveau du génome (ADN) et du transcriptome (ADNc).

Au cours de ce travail, nous avons étudié plusieurs populations par espèce de *S. maritima* (France), *S. alterniflora* (France et Angleterre) et de l'allopolyploïde *S. anglica* afin d'évaluer la variation des profils transcriptomiques entre échantillons issus de populations d'origines différentes (Tableau 5) et maintenus dans les mêmes conditions de culture, sachant que la variation génétique intra-population chez ces trois espèces est connue pour être très faible dans l'ouest de l'Europe (Baumel *et al.* 2001, 2002a, 2003).

Les ADNc synthétisés à partir d'ARN de feuilles de ces différents échantillons ont été analysés d'une part par SSAP (à l'aide d'amorces ciblant trois ETs) et d'autre part par AFLP d'ADNc.

Tableau 5. Echantillons étudiés en SSAP et en AFLP d'ADN complémentaire

Espèces	Etiquetage	Origine	ploïdie
<i>S. alterniflora</i>	F3, F4	Landerneau (Finistère, F)	6x
	F1, F2	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
<i>S. maritima</i>	M1, M2	Saint Armel (Morbihan, F)	6x
	M3	La Rodière (Morbihan, F)	6x
	M4	Quenouille (Morbihan, F)	6x
<i>S. x townsendii</i>	T1	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
	T2	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	6x
<i>S. anglica</i>	A1	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	12x
	A2, A3	Eling Marchwood (Hampshire, UK)	12x
	A5	Saint Armel (Morbihan, F)	12x
	A6	San Francisco (CA, USA)	12x

II. Résultats

II.1. Analyse de la variabilité des profils SSAP et AFLP d'ADNc chez les cinq espèces de spartines

Les profils obtenus par SSAP d'ADNc ont permis d'analyser le polymorphisme de 179 fragments pour les trois éléments transposables. L'élément de type I *Cassandra* représente 35,5% de l'ensemble des fragments obtenus par SSAP d'ADNc, ce qui correspond à une proportion légèrement inférieure à celle qui a été trouvée en ADN génomique (44, 4%) par Parisod *et al.* (2009) chez ces espèces. Le nombre de fragments obtenus pour cet élément varie de 66 à 55 selon les échantillons. Au niveau intraspécifique, la proportion de fragments polymorphes est de 28,6% chez *S. maritima* (4 échantillons analysés), de 47,6% chez *S. alterniflora* (4 échantillons), de 14,2% chez *S. anglica* (6 échantillons) et de 7% chez l'hybride *S. x townsendii* (2 échantillons).

L'autre élément de type I analysé, *Wis-like* représente 31,4% de l'ensemble des fragments obtenus par SSAP d'ADNc. Cette proportion est assez proche de celle trouvée avec le même élément en ADN génomique (33,7%) par Parisod *et al.* (2009). Le nombre de fragments obtenus pour cet élément varie de 57 à 41 selon les échantillons. Au niveau intraspécifique, la proportion de fragments polymorphes est de 32,7% chez *S. alterniflora*, de 21,4% chez *S. maritima*, de 18,1% chez *S. anglica* et de 7,9% chez l'hybride *S. x townsendii*.

Le seul élément de type II analysé est l'élément *Ins2*. Cet élément représente 23,8% des fragments totaux obtenus par SSAP de cDNA. La proportion des bandes obtenues avec cet élément en ADN génomique est nettement supérieure et atteint 44,5% (d'après Parisod *et al.* 2009). Le nombre de fragments obtenus pour cet élément varie de 42 à 39 selon les échantillons. Au niveau intraspécifique, la proportion des fragments polymorphes est de 30% chez *S. alterniflora*, de 12% chez *S. maritima*, et de 14,2% chez *S. anglica*.

Les données de présence – absence des fragments polymorphes ont été traitées par analyse en coordonnées principales. La Figure 16a représente la variation observée pour l'élément *Wis-like*. On note la dispersion particulière des échantillons de *S. alterniflora* qui se montrent les plus polymorphes pour cet élément. La variation intraspécifique est nettement plus faible chez *S. maritima*, *S. x townsendii* et *S. anglica*. On note la similitude des hybrides F1 avec le parent mâle *S. maritima*, tandis que l'allopolyploïde *S. anglica* se distingue nettement de ses parents.

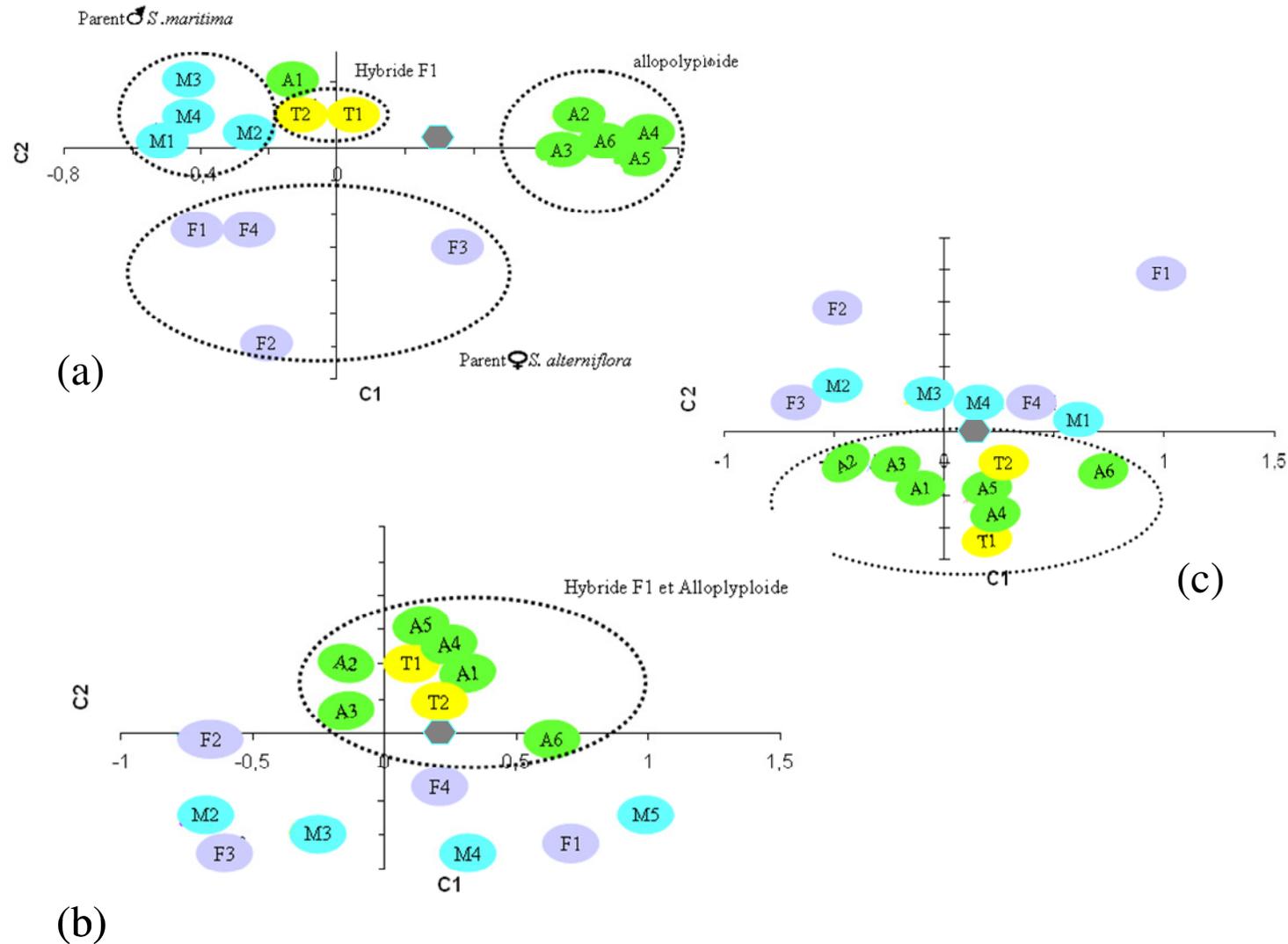


Figure 16. : Analyse en coordonnées principales des profils SSAP d'ADNc pour 3 éléments transposables (a) *WIS-like*, (b) *Cassandra* et (c) *Ins2* (F : *S. alterniflora*, M : *S. maritima*, T : *S. x townsendii* et A : *S. anglica*). \blacklozenge « PAT » : Profil additif théorique

Pour les deux autres éléments *Cassandra* et *Ins2* (Figure 16 b-c), la distinction entre les espèces (notamment entre les parents *S. alterniflora* et *S. maritima*) est beaucoup moins nette ; on peut toutefois discriminer par rapport à l'axe 2, les espèces parentales par rapport aux individus de *S. x townsendii* et *S. anglica* (qui apparaissent très proches), suggérant un effet comparable de l'hybridation et de la duplication du génome sur les régions voisines de ces deux éléments transposables.

L'analyse en coordonnées principales des données d'AFLP d'ADNc (Figure 17a) révèle également une diversité intraspécifique, qui paraît plus importante chez *S. anglica*. Les individus analysés se distribuent en trois groupes nettement discriminés ; le premier est constitué des échantillons de *S. maritima*, le second de *S. alterniflora*, et le troisième regroupe l'hybride F1 et l'allopolyploïde. On note que ce dernier groupe est plus proche du parent maternel *S. alterniflora* par rapport à l'axe 1 qui les sépare du parent paternel *S. maritima*. La distinction des trois groupes est plus nette en AFLP génomique (Figure 17b). On note la proximité entre le groupe allopolyploïde - hybride F1 et le mélange équimolaire d'ADN des deux parents *S. maritima* et *S. alterniflora* qui exprime l'additivité des génomes parentaux chez l'hybride F1 et l'allopolyploïde.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des origines des bandes SSAP d'ADNc observées chez l'hybride et l'allopolyploïde.

Origine des bandes	chez <i>S. x townsendii</i>			chez <i>S. anglica</i>		
	<i>Ins 2</i>	<i>Cas</i>	<i>Wis</i>	<i>Ins 2</i>	<i>Cas</i>	<i>Wis</i>
<i>Additivité</i>						
<i>S. maritima</i>	1	2	2	4	2	2
<i>S. alterniflora</i>	4	7	3	5	7	4
Bandes communes aux 2 espèces	26	37	39	25	57	40
<i>Non additivité</i>						
<i>S. maritima</i>	4	6	4	2	-	1
<i>S. alterniflora</i>	1	2	1	1	1	2
Bandes communes aux 2 espèces	11	15	17	9	2	1
Nouvelles bandes	-	1	1	1	1	2

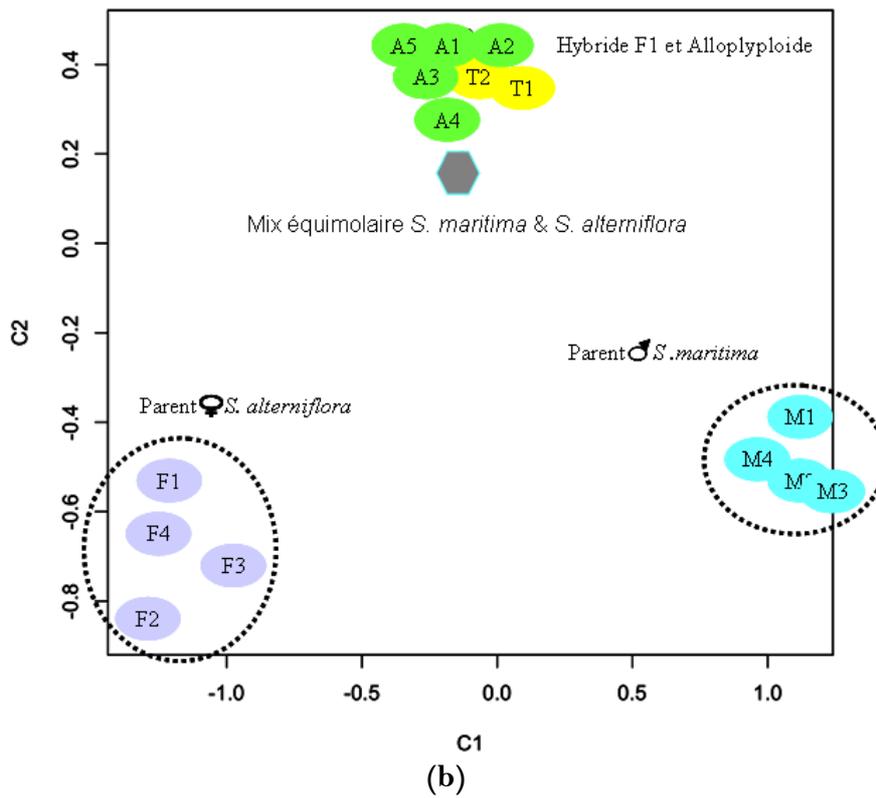
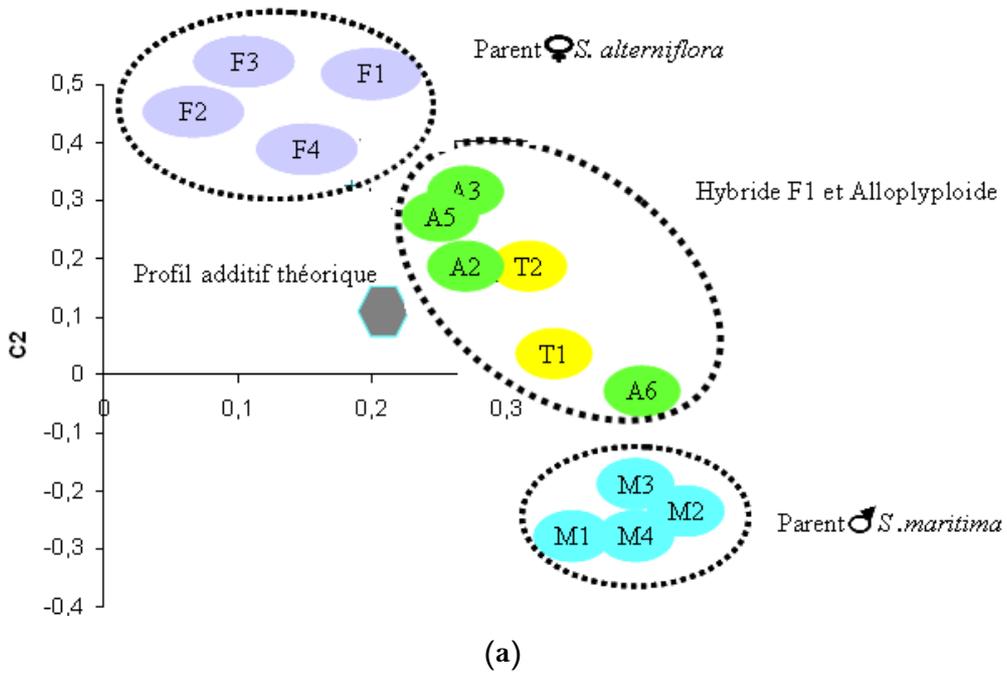


Figure 17. : Analyse en coordonnées principales des profils (a)AFLP de cDNA, et (b) AFLP génomique

II.2. Comparaison des effets génomiques et transcriptomiques de l'hybridation chez l'hybride F1

Les conséquences de l'hybridation ont été étudiées en comparant les profils de restriction obtenus chez l'hybride F1 (en SSAP de cDNA et d'ADN génomique) à ceux des deux parents. L'écart à l'additivité des profils parentaux chez l'hybride est calculé en comparant les fragments observés à un profil « théorique » résultant de l'addition des fragments (monomorphes et polymorphes) présents chez les deux espèces parentales noté « *PAT* ».

L'additivité des profils transcriptomiques dans l'environnement des éléments transposables varie de 63 à 66 % selon l'élément étudié (Figure 18). L'additivité des profils parentaux est nettement plus importante (82 à 92%) dans le cas de l'ADN génomique (par rapport à l'ADNc), l'élément *Ins2* montrant la plus forte additivité. Cet élément appartient à la classe II de type « couper coller » (transposant par l'intermédiaire d'une copie ADN). Pour les deux autres éléments, l'additivité parentale au niveau génomique est moins importante que pour *Ins2* (82% avec l'élément *Wis-like* et 85% avec le TRIM *Cassandra*) alors qu'au niveau transcriptomique ces trois éléments montrent un même niveau d'additivité (63% avec l'élément *Wis-like* et 67% avec le TRIM *Cassandra*) (Tableau 6). L'effet de l'hybridation dans l'environnement des trois éléments transposables (en sommant les trois profils des 3 ETs) est statistiquement beaucoup plus important au niveau transcriptomique (35% d'écarts à l'additivité) qu'au niveau génomique (13,6% d'écarts à l'additivité) (Z ratio= 5,72).

Le mode de transposition de l'élément *Ins2* pourrait expliquer son taux plus important d'additivité parentale transcriptomique par rapport aux rétroéléments *Cassandra* et *Wis-like* qui transposent par l'intermédiaire d'un ARN. En effet, la régulation de l'activité transcriptionnelle est relative à la nature de l'élément transposable et à son cycle de vie (Feschotte *et al.* 2002). Chez les retrotransposons à LTR, les régions LTR 5' et 3' contiennent un promoteur qui conduisent à la transcription de séquences en aval de l'élément inséré (Kumar & Bennetzen 1999). Ceci a été démontré chez des retrotransposons de plantes tels que le Tnt1 (Grandbastien 1998) chez le tabac ou chez la canne à sucre (Araujo *et al.* 2005).

La majorité des changements transcriptomiques observés chez l'hybride F1 *S. x townsendii* dans l'environnement des trois ETs étudiés concerne des pertes de fragments parentaux (Tableau 6) notamment ceux d'origine paternelle *S. maritima* (14 fragments de *S. maritima* sont perdus chez l'hybride *S. x townsendii* contre 4 fragments chez *S. alterniflora*). Le profil de l'hybride dans l'environnement des 3 ETs étudiés montre 7,8% de fragments

spécifiques au parent maternel *S. alterniflora* contre 2,7% de fragments spécifiques du parent paternel *S. maritima*.

La comparaison globale des profils transcriptomiques obtenus pour les trois éléments transposables (en sommant les profils SSAP obtenus pour chaque élément) avec les profils transcriptomiques obtenus par AFLP de cDNA (Figure 18b) montre que l'additivité parentale est plus faible dans le voisinage des ETs analysés par SSAP (65%) que dans l'ensemble du génome examiné aléatoirement par AFLP (75%) (Z ratio= 5,04). Au niveau génomique (Salmon *et al.* 2005, Parisod *et al.* 2009) cette différence n'est pas significative (z ratio= 0,54).

La différence significative au niveau transcriptomique entre le génome global et les régions voisines des ETs n'a pas été montrée au niveau génomique. Ce ci indique un effet plus marqué de l'hybridation sur le transcriptome dans les régions flanquant ces éléments transposables.

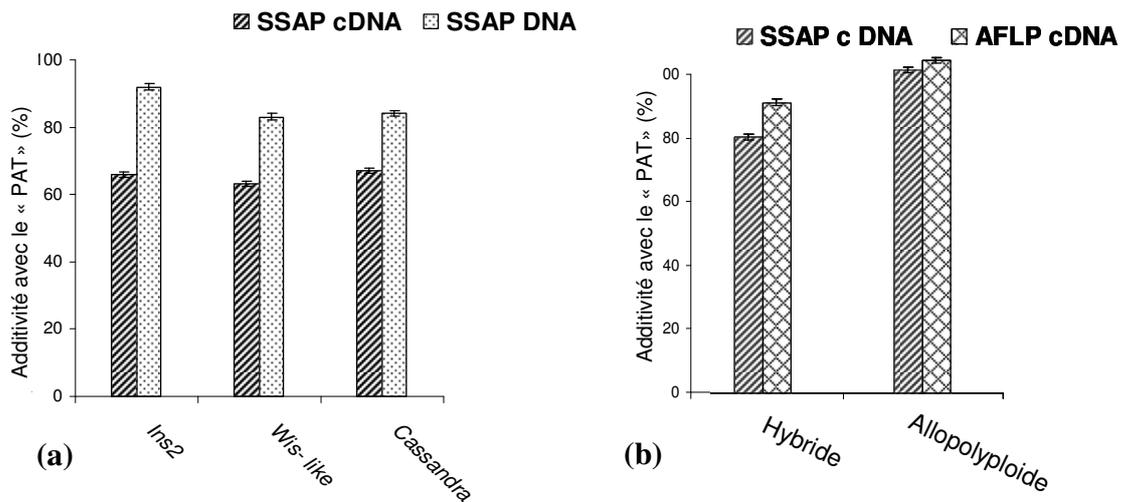


Figure 18. : (a) Additivité des fragments parentaux chez l'hybride pour les 3 ETs au niveau transcriptomique (SSAP de cDNA) et génomique (SSAP sur ADN génomique) (b) Comparaison de l'additivité des fragments parentaux chez l'hybride et l'allopolyploïde dans l'environnement des trois ETs (SSAP de cDNA) et sur l'ensemble du transcriptome (AFLP de cDNA). «PAT»: Profil additif théorique.

II.3. Effets génomiques et transcriptomiques de la duplication du génome chez l'allopolyploïde *S. anglica*

L'effet de la polyploïdie a été évalué en comparant les profils de l'allopolyploïde *S. anglica* à ceux de l'hybride F1 *S. x townsendii* et des espèces parentales *S. maritima* et *S. alterniflora*.

Nous constatons que la duplication du génome de *S. x townsendii* s'est également accompagnée de changements transcriptomiques dans l'environnement des 3 éléments testés chez l'allopolyploïde *S. anglica* (Figure 19). Ces changements induits par la polyploïdisation se traduisent par 10 à 27 % de fragments polymorphes (63% à 90% de similitude, selon l'élément considéré, figure 4) par rapport à l'hybride F1 *S. x townsendii*. En revanche, les changements génomiques (révélés par SSAP d'ADN génomique) causés par la duplication du génome dans les mêmes régions restent mineurs (95 à 97% de similitude entre l'hybride et l'allopolyploïde).

La comparaison du profil de l'allopolyploïde *S. anglica* par rapport au profil théorique d'addition des fragments parentaux issus de *S. maritima* et *S. alterniflora* (Figure 18b) montre une additivité de 77 à 87% pour les profils de SSAP de cDNA et de 93 à 97,2% pour les profils de SSAP d'ADN génomique. La majorité des changements génomique observés chez l'allopolyploïde *S. anglica* dans l'environnement des trois ETs étudiés concerne des pertes de fragments du parent maternel *S. alterniflora* (d'après Parisod *et al.* 2009), alors qu'au niveau transcriptomique la perte des fragments parentaux est répartie d'une façon égale entre les fragments des deux parents (4 fragments de *S. alterniflora* et 3 fragments de *S. maritima* sont perdus chez l'allopolyploïde *S. anglica*) (Tableau 6)

Ceci suggère, pour les régions flanquant les éléments testés, un « retour » à l'additivité chez l'allopolyploïde, tant au niveau transcriptomique que génomique. Ce retour à l'additivité parentale, suite à la duplication du génome chez *S. anglica*, est plus accentué pour l'élément *Wis-like*.

La comparaison des profils SSAP ADNc (pour les 3 ETs) aux profils AFLP de ADNc de *S. x townsendii* et *S. anglica* montre qu'il n'y a pas de différence statistique entre les deux effets (z ratio= 0,3), ce qui indique que la duplication du génome a le même effet sur l'ensemble du transcriptome (Figure 16b). Contrairement à l'événement de l'hybridation, une différence significative est détectée au niveau génomique entre les profils d'AFLP et les régions voisines des ETs (z ratio= 3,92).

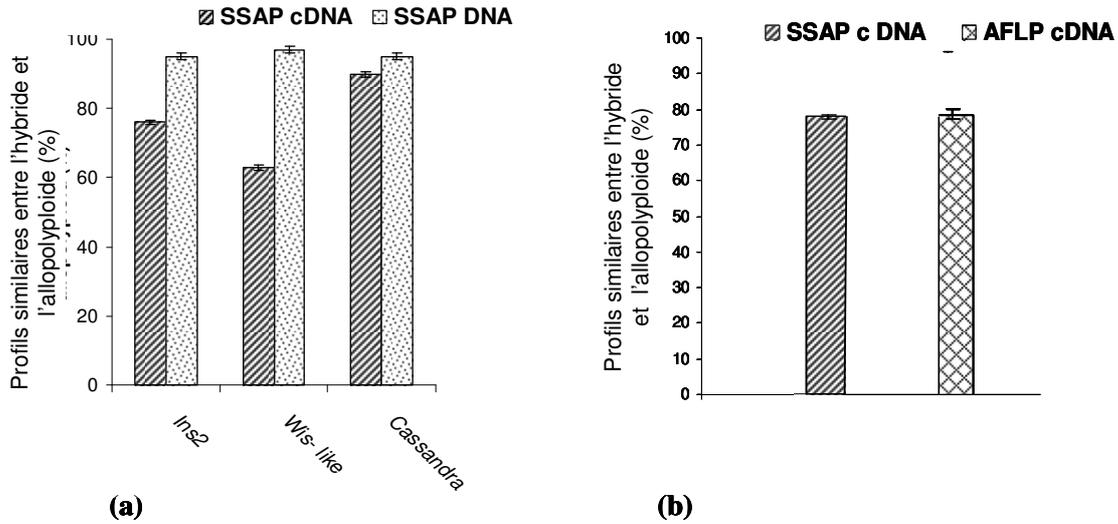


Figure 19. Pourcentage de profils similaires entre l'hybride *S. x townsendii* et l'allopolyploïde *S. anglica* (a) dans l'environnement de 3 ETs au niveau transcriptomique et génomique (b) sur l'ensemble du transcriptome (AFLP de cDNA).

Tableau 7. Identification des séquences d'ADNc réamplifiées ; les carrés de couleur indiquent l'espèce où la bande est présente ; les carrés blanc indiquent que la bande correspondante est absente.

Fragments identifiés et séquencés en AFLP	Fragments identifiés et séquencés en SSAP
<p>PPR repeat protein-like [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]</p>	<p>UniGene info <i>Zea mays</i> clone 281642 peptide transporter PTR2 mRNA (E value=$2e-92$)</p>
<p>Putative methyltransferase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]</p>	<p>UniGene infoGene info <i>Triticum aestivum</i> TaWIN1 mRNA, complete cds (E value=$6e-98$)</p>
<p>Cytochrome cd1-nitrite reductase-like [<i>Oryza</i>] 26S protease regulatory subunit 7 [<i>Oryza</i>]</p>	<p><i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group) clone Sp924 heat stress transcription factor (Sp17) gene, partial cds (E value=$2e-30$)</p>
<p>Ca²⁺-dependent lipid-binding protein , contains C2domain</p>	
<p>RNA polymerase Rpb1 [<i>Oryza</i>]</p>	<p>Polymorphisme des bandes</p> <p><i>S.mar</i> <i>S.alt</i> <i>S.xtown</i> <i>S.ang</i></p>

Identification des fragments d'ADNc polymorphes

Cette étape a nécessité une longue mise au point technique, et s'est avérée délicate. Nous avons sélectionné 24 bandes polymorphes pour les trois ETs analysés (Tableau 4). Les bandes ont été découpées sur les gels d'acrylamide et ré-amplifiées avec les amorces de l'élément correspondant.

Seules 3 bandes amplifiées avec l'amorce de l'élément TRIM *Cassandra* ont pu être séquencées avec succès. Une des bandes est présente chez les deux parents, perdue chez l'hybride F1 et réapparaît chez l'allopolyploïde. Les deux autres bandes sont présentes chez toutes les espèces, Les séquences obtenues ont été comparées avec la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant BLASTN.

De la même manière, 48 bandes polymorphes en AFLP d'ADNc ont été sélectionnées pour identification. Cinq bandes (correspondant à différentes situations de polymorphisme entre les parents, l'hybride et l'allopolyploïde) ont pu être réamplifiées et séquencées avec succès. Comme pour les séquences de SSAP, les résultats obtenus ont été comparés avec la base de données Genbank en utilisant BLASTN (Tableau 7). Les résultats obtenus montrent que les zones amplifiées correspondent à des séquences codantes tant en AFLP d'ADNc qu'en SSAP d'ADNc.

III. Discussion

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la méthode SSAP sur ADNc dans le but d'évaluer les changements transcriptomiques associés à la spéciation allopolyploïde chez les spartines, en ciblant les régions flanquant trois types d'éléments transposables. Nos résultats, comparés à ceux obtenus au niveau de l'ADN génomique par les mêmes méthodes d'analyse (SSAP et AFLP) et au niveau transcriptomique global (par AFLP d'ADNc) permettent d'appréhender les effets de l'hybridation et de la duplication du génome à différents niveaux.

La Figure 20 synthétise les effets de la spéciation allopolyploïde en distinguant hybridation (chez *S. x townsendii*) et duplication (chez *S. anglica*) au niveau transcriptomique global (par AFLP de cDNA), au niveau transcriptomique dans les régions flanquant les trois éléments transposables testés (par SSAP de cDNA), au niveau génomique dans les mêmes régions (SSAP d'ADN génomique) et au niveau génomique global par AFLP génomique (Salmon *et al.* 2005). L'effet de l'hybridation est nettement plus important au niveau transcriptomique qu'au niveau génomique.

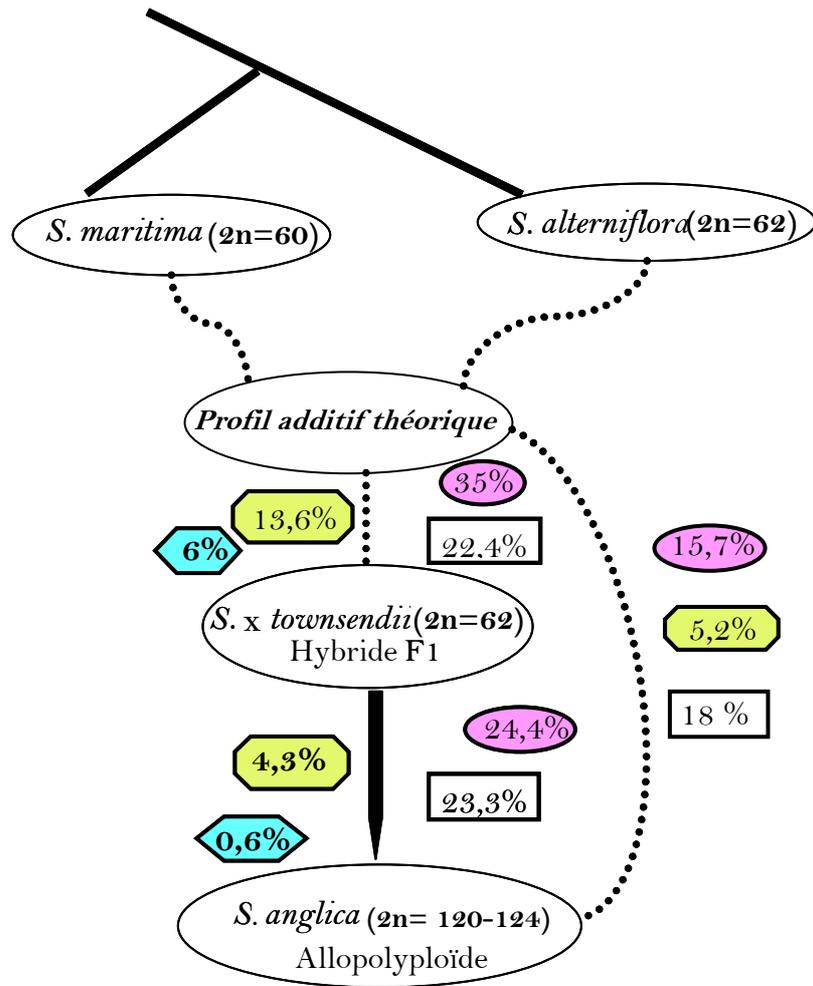


Figure 20. Effets de la spéciation allopolyploïde sur le génome et sur le transcriptome.

Ecart à l'additivité estimé par SSAP cDNA, SSAP DNA, AFLP cDNA, *AFLP DNA

* d'après Salmon *et al.* (2005).

Au niveau du génome global, l'écart à l'additivité entre l'hybride et le profil théorique additif des deux parents est de 6% (Salmon *et al.* 2005). Cet écart est doublé (13,6%) dans l'environnement des trois ETs étudiées par SSAP génomique d'après Parisod *et al.* (2009). Au niveau transcriptomique, l'écart à l'additivité est aussi plus important dans l'environnement des éléments transposables étudiés (SSAP de ADNc 35%) que dans le génome global (AFLP de cDNA 22,4 %). De même, la duplication du génome induit plutôt des changements au niveau transcriptomique qu'au niveau génomique. Au niveau génomique c'est l'environnement des ETs étudiés qui est plus touché (4%) par l'événement de la duplication que le génome global (0,6%). La duplication du génome a le même effet sur l'ensemble du transcriptome (23,3%) que sur l'environnement des ETs étudiés (24,4%).

Nos analyses SSAP ont permis d'examiner le polymorphisme de 179 fragments d'ADNc pour les trois éléments, contre 338 fragments obtenus pour les mêmes éléments avec l'ADN génomique (Parisod *et al.* 2009). Dans les deux études, le même site de restriction (MspI) et les mêmes amorces d'éléments transposables ont été utilisés, combinés avec une amorce MspI + C pour l'ADNc et une amorce MspI + CGG, +CGC, +CGT et +CTA pour l'ADN génomique, ce qui permettait l'amplification potentielle d'un plus grand nombre de régions sur ADNc.

Bien que les zones que nous avons ciblées en ADN génomique et ADNc ne soient probablement pas les mêmes, la proportion globale des fragments d'ADNc amplifiés par SSAP (par rapport à celle obtenue sur ADN génomique) suggère qu'une fraction non négligeable des éléments transposables (et notamment ceux que nous avons ciblés) peut se distribuer à proximité ou à l'intérieur des gènes transcrits. Ceci est en accord avec les données de la littérature : il est en effet maintenant établi qu'un bon nombre d'éléments transposables sont insérés dans les régions codantes ou régulatrices (Deloger *et al.* 2009, Grandbastien 2010, Krom *et al.* 2008), où ils contribuent à l'adaptation et à la régulation transcriptionnelle des gènes (Biéumont & Vieira 2006, Lockton & Gaut 2009), ce qui expliquerait leur rétention dans ces régions du génome (Gonzales *et al.* 2009).

A notre connaissance, peu d'études ont employé la SSAP sur ADNc : Lou & Chen (2007) ont montré par SSAP la présence d'éléments *Ty1-copia* dans l'ADNc chez le concombre. Kashkush *et al.* (2003) ont analysé par SSAP d'ADNc le transcriptome de polyploïdes synthétiques du blé en utilisant le rétroélément (*Wis-2*), et ont montré que son activation transcriptionnelle affectait l'expression de gènes adjacents. La même équipe (Kashkush & Khasdan 2007) a utilisé la méthode de SSAP d'ADNc pour étudier l'effet de la méthylation des régions LTR sur l'expression des gènes sur deux tissus et deux sous espèces du riz.

En analysant plusieurs échantillons par espèces de spartines, nous avons pu noter une variation intraspécifique du transcriptome de plantes maintenues dans les mêmes conditions contrôlées. Ceci est particulièrement net pour les régions flanquant l'élément *Wis-like* examinées par SSAP chez *S. alterniflora* et pour toutes les espèces examinées par AFLP d'ADNc. Il est peu probable qu'une telle variation résulte de différences génétiques compte tenu des études précédentes d'analyses de polymorphisme effectuées chez espèces (Baumel *et al.* 2001, 2002a, 2003). Ces résultats sont confirmés par les données de l'AFLP d'ADN génomique (figure 2b) présentés ci-dessus, dans lesquels une plus grande homogénéité intraspécifique est observée. Ces résultats exprimeraient une plasticité plus ou moins importante du transcriptome des feuilles de spartines dans les conditions analysées.

Malgré cette variation intraspécifique, les profils transcriptomiques des deux espèces parentales *S. maritima* et *S. alterniflora* sont nettement distincts pour l'élément *Wis-Like* testé par SSAP et pour l'ensemble du transcriptome examiné par AFLP d'ADNc. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les microarrays, où 1247 gènes (13% des gènes examinés) présentaient une différence significative des niveaux d'expression entre les parents.

L'analyse comparative des profils SSAP d'ADNc chez les 5 espèces de spartines indique que l'hybridation (chez *S. x townsendii*), puis la duplication du génome (chez *S. anglica*) ont des conséquences importantes. Nous observons en effet, de nettes différences de profils transcriptomiques, entre les parents et l'hybride (35%) puis entre l'hybride et l'allopolyploïde (24%). Un effet comparable (quoique moins prononcé chez l'hybride : 22,4 % d'écart à l'additivité chez *S. x townsendii* et 23,6% entre l'hybride et l'allopolyploïde) est observé sur l'ensemble du transcriptome analysé par AFLP d'ADNc.

L'effet de l'hybridation dans l'environnement des éléments transposables s'avère plus important au niveau du transcriptome qu'au niveau génomique, puisque pour les mêmes éléments Parisod *et al.* (2009) détectaient 13,6% de changements chez *S. x townsendii*, par rapport à l'additivité des profils parentaux. Au niveau transcriptomique, les changements enregistrés pour les trois éléments transposables concernent essentiellement la perte de fragments paternels (issus de *S. maritima*). Ces résultats sont en accord avec les analyses de transcriptome effectuées par microarray (Chelaifa *et al.* 2010), qui révèlent une dominance de l'expression des gènes du parent maternel (*S. alterniflora*) chez l'hybride *S. x townsendii*.

Une dominance d'expression d'un des deux parents (maternel ou paternel, selon les cas) a été également observée chez un hybride synthétique entre deux espèces tétraploïdes

chez *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2006) et chez des allotétraploïdes synthétiques du genre *Gossypium* (Rapp *et al.* 2009).

Contrairement aux analyses transcriptomiques, les mêmes approches appliquées au niveau génomique (ADN) par des marqueurs AFLP (Salmon *et al.* 2005) et SSAP (Parisod *et al.* 2009) ont montré que le génome maternel de *S. alterniflora* subit le plus de modifications (perte de fragments).

En résumé, l'hybridation apparaît donc comme un stimulus majeur de la dynamique du génome au cours de la spéciation allopolyploïde chez les spartines. Au niveau structural, cette dynamique apparaît limitée sur l'ensemble du génome (Baumel *et al.* 2001, Salmon *et al.* 2005), bien qu'elle s'avère un peu plus importante dans l'environnement des éléments transposables (Ainouche *et al.* 2008, Parisod *et al.* 2009). Comme cela a été noté plus haut, ces changements concernent essentiellement des pertes de fragments AFLP ou SSAP, et ne révèlent pas de « burst » de transposition, en accord avec les données recueillies à ce jour sur d'autres systèmes (pour revue: Parisod *et al.* 2010a). L'activation par l'hybridation interspécifique de rétrotransposons de type *Copia* et *Gypsy* s'avère rapidement réprimée (par des mécanismes épigénétiques) chez les riz sauvages (Liu & Wendel 2000). Une activité transcriptionnelle d'élément transposable de type « *Sunfish* », associée à une déméthylation a également été détectée suite à l'hybridation expérimentale entre deux espèces tétraploïdes du genre *Arabidopsis* (Madlung *et al.* 2005). D'après la revue de Parisod *et al.* (2010a), des modifications épigénétiques et une activité transcriptionnelle ont été détectées chez le blé allohexaploïde. Chez le tabac synthétique, une activité transpositionnelle a été détectée avec *Tnt1* (Petit *et al.* 2010)

Chez les spartines, les effets de l'hybridation se concentrent au niveau épigénétique et transcriptomique. Des altérations notables de la méthylation du génome apparaissent chez *S. x townsendii* (Salmon *et al.* 2005), et s'avèrent nettement plus importantes dans les régions flanquant les trois éléments transposables testés (Parisod *et al.* 2009). Nos résultats montrent l'extension du stimulus de l'hybridation au niveau transcriptomique, qui apparaît également affecter de façon particulière ces régions voisines des mêmes éléments transposables.

Si la duplication du génome n'engendre pas de changements importants (par rapport à l'hybridation) aux niveaux génomique et épigénétique (méthylation du génome), il en est autrement au niveau transcriptomique. Nos analyses de SSAP d'ADNc, comme celles d'AFLP d'ADNc ou encore les analyses de transcriptome par microarray (Chelaifa *et al.* 2010, sous presse), indiquent que la redondance d'information engendrée par la duplication du

génomique affecte le transcriptome de l'allopolyploïde comparé à l'hybride F1 et aux espèces parentales. Nos données transcriptomiques de SSAP de cDNA montrent, en effet, pour les trois éléments transposables étudiés 24,4% de polymorphisme entre l'hybride et l'allopolyploïde. Cet effet de la duplication est aussi observable avec le même degré (23 %) au niveau de la totalité du génome (estimé par AFLP d'ADNc). Un résultat intéressant concerne l'effet « modérateur » de la duplication du génome sur le transcriptome, puisqu'il tend à réduire l'écart à l'additivité des profils transcriptomiques parentaux observé chez l'hybride F1. Cet effet modérateur, qui a également été détecté par microarray chez *S. anglica* (Chelaifa *et al.* 2010, sous presse) est probablement l'une des généralisations qui pourrait être déduite de l'effet immédiat de l'allopolyploïdie sur le transcriptome, puisqu'il est aussi rapporté chez *Senecio* (Hegarty *et al.* 2006) et *Gossypium* (Flagel *et al.* 2009, 2010). Pour ces deux derniers systèmes, les observations ont été effectuées sur des allopolyploïdes synthétiques ; nos analyses confirment donc pour la première fois ce phénomène dans un contexte naturel.

L'essentiel des changements transcriptomiques détectés chez *S. anglica*, dans les régions flanquant les 3 éléments transposables correspond à des pertes de fragments. Nous n'avons pas détecté de transcrits nouveaux dans ces régions, ce qui indique que l'allopolyploïdie n'a pas déclenché d'activation transcriptionnelle depuis la formation de *S. anglica* il y a environ un siècle. En analysant par SSAP un allopolyploïde synthétisé artificiellement suite à une hybridation entre *Arabidopsis thaliana* et *Arabidopsis lyrata*, Beaulieu *et al.* (2009) notent également une absence d'événement de transposition. Malgré l'activation transcriptionnelle, Kashkush *et al.* (2003) ne détectent pas d'événement de transposition dans les premières générations suivant la synthèse expérimentale du blé hexaploïde. Récemment, Charles *et al.* (2008) ont comparé les génomes homéologues A et B constituant les blés tétraploïdes et hexaploïdes, et ont démontré que l'amplification différentielle d'éléments transposables au sein des deux génomes s'est faite antérieurement à l'évènement de tétraploïdisation intervenu il y a moins de 500 000 ans. L'allopolyploïdie s'avère n'avoir ni amplifié ni reprimé la transposition. En revanche, chez le coton allotétraploïde formé il y a environ 2 millions d'années (MA), le taux de délétion des éléments transposables semble avoir surpassé celui de l'amplification (Grover *et al.* 2008). Chez le tabac allotétraploïde, formé il y a environ 0,2 MA, Petit *et al.* (2007) observent une dynamique variable selon les rétroéléments analysés ; la majorité des changements (évalués par SSAP) consiste essentiellement en une perte de fragments parentaux. En resynthétisant le tabac (*Nicotiana tabacum*) par croisement expérimental entre *Nicotiana sylvestris* et *N. tomentosiformis*, Petit *et al.* (2010) n'observent aucun changement chez l'hybride F1 et la

première génération (S0-S1) suivant la duplication du génome. En revanche, une prolifération du rétro-élément *Tnt1* a été observée en génération S4, suggérant un rôle important de la méiose. A ce jour, les différents éléments analysés chez le tabac suggèrent que les éléments jeunes et actifs (comme *Tnt1*) sont les plus susceptibles de réagir aux stress génomiques tels que l'allopolyploïdie. Dans notre cas, nous ne disposons pas de données concernant l'abondance, dans le génome des spartines, des éléments analysés par SSAP, et il est difficile de savoir si les tendances que nous observons sont restreintes à ces éléments ou sont représentatives de l'évolution globale du compartiment répété du génome des spartines. Toutefois, malgré les données limitées récoltées à ce jour chez les allopolyploïdes naissants, les données de la littérature résultant essentiellement des études effectuées chez les allopolyploïdes synthétiques convergent avec nos observations.

En conclusion, l'approche comparative basée sur différentes méthodes dérivées de l'AFLP : au niveau génomique et transcriptomique globale ou ciblée dans l'environnement des éléments transposables, a permis d'obtenir une vision plus complète des conséquences de la spéciation allopolyploïde récente chez les spartines. Cette démarche nous a permis d'amplifier et d'analyser simultanément plusieurs insertions d'ETs ou de sites de restrictions sur l'ensemble du génome et du transcriptome. Si ces méthodes présentent certaines limites (régions du génome ciblées dépendant des sites de restriction et des amorces choisies, nature dominante et qualitative des marqueurs), elles présentent l'avantage d'explorer des génomes peu connus comme ceux des spartines. Un autre avantage non négligeable dans le contexte de notre travail, consiste à pouvoir identifier (pour les marqueurs polymorphes entre espèces parentales) l'origine maternelle ou paternelle des changements observés chez les hybrides ou allopolyploïdes. Enfin, il est particulièrement intéressant de noter la concordance des informations apportées au niveau du transcriptome, entre approches différentes (AFLP d'ADNc et microarrays), entre régions flanquant les éléments transposables (analysées par SSAP d'ADNc) et au niveau du transcriptome global (analysé par SSAP d'ADNc).

Chapitre 6

**Conséquences de l'hybridation
interspécifique chez les spartines:**

Cas des hybrides homoploïdes

S. x townsendii & S. x neyrautii

If one were to push the rewind button, erase life's history, and let the tape run again the results would be completely different each time..." (SJ Gould)

I. Introduction

L'hybridation est un important mécanisme naturel, générateur d'évolution et de biodiversité (Rieseberg & Willis 2007, Mallet 2007, Buggs *et al.* 2009, Soltis & Soltis 2009). L'hybridation peut, soit par l'introgression (suite à des back-cross avec les parents) soit par la spéciation, générer de nouvelles combinaisons génétiques et une variation phénotypique permettant aux espèces d'explorer de nouvelles conditions écologiques (Hegarty & Hiscock, 2005, Rieseberg 1997, Rieseberg *et al.* 2003, Zhuang & Adams 2007).

La réunion de deux génomes chez l'hybride génère une dynamique particulière se traduisant par des réarrangements chromosomiques (Shaked *et al.* 2001), la mobilisation d'éléments transposables (Liu & Wendel 2000, Parisod *et al.* 2009), des altérations de la méthylation de l'ADN (Salmon *et al.* 2005) ou d'importantes modifications de l'expression des gènes (Adams 2007, Hegarty *et al.* 2009, Lai *et al.* 2006). Cette dynamique est maintenant mise en rapport avec la vigueur des hybrides (« heterosis »), bien connue au niveau phénotypique (Birchler *et al.* 2003, 2006, Zhuang & Adams 2007).

Dans cette partie, nous examinerons les conséquences de l'hybridation interspécifique chez deux hybrides F1 formés naturellement chez les spartines à partir des mêmes espèces parentales et de façon indépendante sur deux sites ouest-européens. Ces deux hybrides se sont formés à la fin du 19^{ème} siècle, suite à l'introduction de *S. alterniflora*, native des côtes est-américaines, dans l'ouest de l'Europe où elle s'est hybridée avec l'espèce indigène *S. maritima*. L'hybridation est intervenue à deux reprises : dans la baie de Southampton en 1870 pour donner *Spartina x townsendii* (Groves & Groves 1882) et au Pays Basque, près de Hendaye, pour donner naissance à l'hybride *Spartina x neyrautii* (Foucaud 1894). Dans les deux cas, le croisement s'est fait dans le même sens, avec *S. alterniflora* comme parent maternel et donneur du génome chloroplastique (Baumel *et al.* 2003, Ainouche *et al.* 2004). Ces deux hybrides de première génération sont stériles et se maintiennent par multiplication végétative sur leur site d'origine. Un événement de polyploïdisation s'est produit chez l'hybride anglais *S. x townsendii* pour donner une nouvelle espèce allopolyploïde fertile et particulièrement vigoureuse, *Spartina anglica* (Marchant 1967, 1968). En revanche, au Pays Basque, aucun doublement de génome n'a été détecté à partir de l'hybride *S. x neyrautii* (Baumel *et al.* 2003). Toutefois, il est assez intéressant de noter que malgré des génotypes très similaires, les deux hybrides présentent des phénotypes stables (se maintenant en culture en même milieu) mais très différents (Marchant 1977). *S. x neyrautii* est très

semblable à *S. alterniflora*, tandis que *S. x townsendii* est morphologiquement intermédiaire entre les deux parents. *S. x townsendii* forme une large et vigoureuse population qui continue à se propager par voie végétative dans la Baie de Southampton (Renny-Byfield *et al.* 2010), tandis que seulement quelques rares clones de *S. x neyrautii* survivent au Pays Basque, menacés par l'urbanisation de la région (Hubbard *et al.* 1978, Baumel *et al.* 2003, M. Ainouche communication personnelle).

Les deux hybrides présentent le même nombre chromosomique ($2n=62$), comme leur parent *S. alterniflora* ($2n=62$), tandis que l'autre parent (*S. maritima*) présente $2n=60$ chromosomes (Marchant 1968, 1977). La méiose des deux hybrides est irrégulière, avec toutefois un plus fort taux d'appariement des chromosomes (sous forme de trivalents) chez *S. x neyrautii* comparé à celui de *S. x townsendii* (Marchant 1977). Cette différence de comportement des chromosomes, ajoutée aux différences morphologiques, avait renforcé l'idée d'une origine par croisement réciproque des espèces parentales, hypothèse qui fût démentie par l'analyse des génomes chloroplastiques révélant que les deux hybrides présentaient un génome chloroplastique identique à celui de *S. alterniflora* (Baumel *et al.* 2003). Les analyses de diversité des populations parentales dans l'ouest de l'Europe ont, de plus, montré une très faible variation génétique entre les individus de *S. maritima* et entre ceux de *S. alterniflora* dans la région où les hybridations ont eu lieu, indiquant ainsi, que les deux hybrides se sont formés à partir d'une base génétique similaire. *S. x townsendii* et *S. x neyrautii* présentent des niveaux similaires de changement de méthylation du génome par rapport aux espèces parentales (Salmon *et al.* 2005), mais dans les deux cas, la nature des séquences affectées par ces changements n'a pas été élucidée.

La question des causes génomiques des différences entre *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* reste donc posée et renvoie à des notions fondamentales en biologie évolutive, sur la nature aléatoire ou dirigée des changements génétiques et sur le lien entre génome et phénotype. A ce jour, le compartiment transcriptomique n'a jamais été analysé chez ces deux hybrides et nous posons donc l'hypothèse qu'une différence de régulation (génétique ou épigénétique) de l'expression des gènes pourrait expliquer la divergence morphologique et écologique des deux hybrides.

Nous examinerons donc plus précisément les questions suivantes :

- Les effets de l'hybridation au niveau génomique et transcriptomique sont-ils similaires chez *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* ?
- Quelle sont la proportion et la nature des gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides, et peut-on relier ces différences au niveau phénotypique ?

II. Matériel et méthodes

Les deux hybrides F1 *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* ont été prélevés sur leur site d'origine à Hythe en Angleterre (pour *S. x townsendii*) et à Hendaye au Pays Basque (pour *S. x neyrautii*), et ont été comparés aux espèces parentales *S. maritima* (France) et *S. alterniflora* (France et Angleterre). Les niveaux de ploïdie des hybrides ont été vérifiés par cytométrie en flux. Les échantillons étudiés ont été maintenus dans les mêmes conditions en serre expérimentale à l'Université de Rennes 1.

Les analyses ont été effectuées sur de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN extraits de feuilles provenant de 2 à 5 échantillons (selon les analyses) par hybride et de 4 à 5 échantillons par espèce parentale. Les analyses de transcriptome ont été effectuées par AFLP d'ADNc, par SSAP d'ADNc et par microarrays.

Les résultats d'AFLP et de SSAP ont été comparés aux jeux de données obtenus sur ADN génomique par A. Salmon (Salmon *et al.* 2005 et Salmon données non publiées) et par C. Parisod (Parisod *et al.* 2009) avec les mêmes couples d'amorces et enzymes de restriction. Les mêmes éléments transposables (*Ins2*, *Wis like*, *Cassandra*) ont été ciblés pour la SSAP sur ADNc et sur ADN génomique.

Le traitement des profils de restriction obtenus en AFLP et en SSAP s'est fait de la même façon pour les deux hybrides en les comparant à un profil théorique additif (addition des profils des deux parents). Les données ont été traitées par Analyse en Coordonnées Principales. Les différences de profil entre les deux hybrides ont également été examinées.

L'analyse globale du transcriptome par les puces de riz a été faite sur les deux hybrides et sur les deux parents avec cinq réplicats biologiques pour chaque hybride selon la méthode de marquage, d'hybridation, de lavage et de scanner recommandé par Agilent (<http://www.chem.agilent.com>). Le traitement statistique des données de puces s'est fait à l'aide du logiciel *Genespring* 10. Pour comparer l'effet de l'hybridation chez les deux hybrides, le profil d'expression de chaque hybride a été comparé à un profil théorique d'expression parentale additive (« MPV » ou « mid-parent value »), mesuré en simulant *in silico* l'addition des profils parentaux obtenus chez les parents. Les gènes présentant une expression différentielle entre les deux hybrides ont été examinés et les catégories fonctionnelles ont été identifiées par *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>) et à l'aide du logiciel *Easy go* (<http://bioinformatics.cau.edu.cn/easygo>).

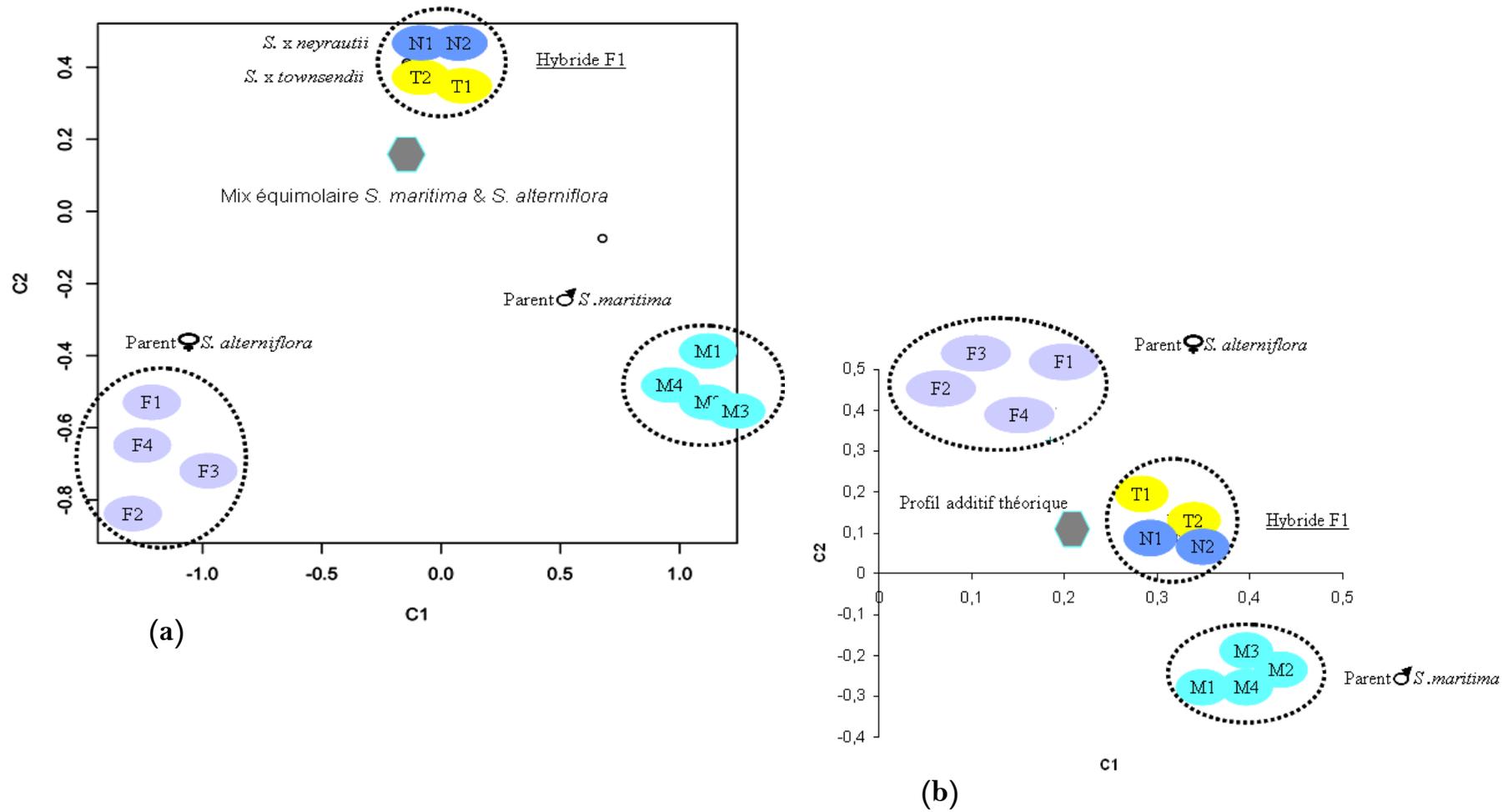


Figure 21. Analyse en coordonnées principales des profils (a) AFLP génomique et (b) AFLP de cDNA.

III. Résultats

III.1. Analyse comparative des données génomiques et transcriptomiques

Les profils obtenus par SSAP d'ADNc, par AFLP d'ADNc et par AFLP génomique ont permis d'analyser le polymorphisme de fragments entre les deux hybrides. L'analyse en coordonnées principales des données d'AFLP génomique (Figure 21a) révèle que les deux hybrides F1 sont très similaires et proches du mélange équimolaire d'ADN des deux parents. Ce groupe, nettement distinct des deux parents, se rapproche un peu plus du parent paternel *S. maritima* que du parent maternel *S. alterniflora*. La distribution observée confirme les données d'AFLP génomique de Salmon *et al.* (2005) qui a montré que les hybrides *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* présentaient respectivement 3% et 1,3% de profil non additifs avec le parent *S. alterniflora* contre 1,6% et 0,8% de profils non-additifs avec le parent *S. maritima*.

L'analyse des mêmes individus par AFLP d'ADNc (Figure 21b) montre également une situation intermédiaire des hybrides par rapport aux parents, se rapprochant du profil théorique additif. On note que dans ce groupe, l'hybride *S. x townsendii* est un peu plus proche du parent maternel *S. alterniflora* par rapport à l'axe 1 qui les sépare du parent paternel *S. maritima* alors que suivant le même axe, l'hybride *S. x neyrautii* est plus proche de *S. maritima* que de *S. alterniflora*. Il est à noter que la distinction des trois groupes est plus nette en AFLP génomique (Figure 21a).

De même qu'en AFLP génomique et d'ADNc, les données de présence – absence des fragments polymorphes obtenus en SSAP d'ADNc ont été traitées par analyse en coordonnées principales. La Figure 22 représente la variation observée pour trois ETs étudiés. La Figure 22a représente la variation obtenue avec l'élément *Wis-like* et montre la similitude des deux hybrides F1, et le rapprochement, en particulier, de *S. x neyrautii* avec le parent mâle *S. maritima* selon l'axe 1. Les individus de *S. alterniflora* sont plus dispersés, suggérant un polymorphisme inter-individuel plus important. Pour les deux autres éléments *Cassandra* et *Ins2* (Figure 22b-c), la distinction entre les deux hybrides et l'échantillon théorique additif est plus nette. On peut discriminer par rapport à l'axe 2, les espèces parentales par rapport aux individus des deux hybrides F1, ce qui suggère l'importance de l'effet de l'hybridation chez les deux hybrides au niveau des régions avoisinant ces deux éléments transposables.

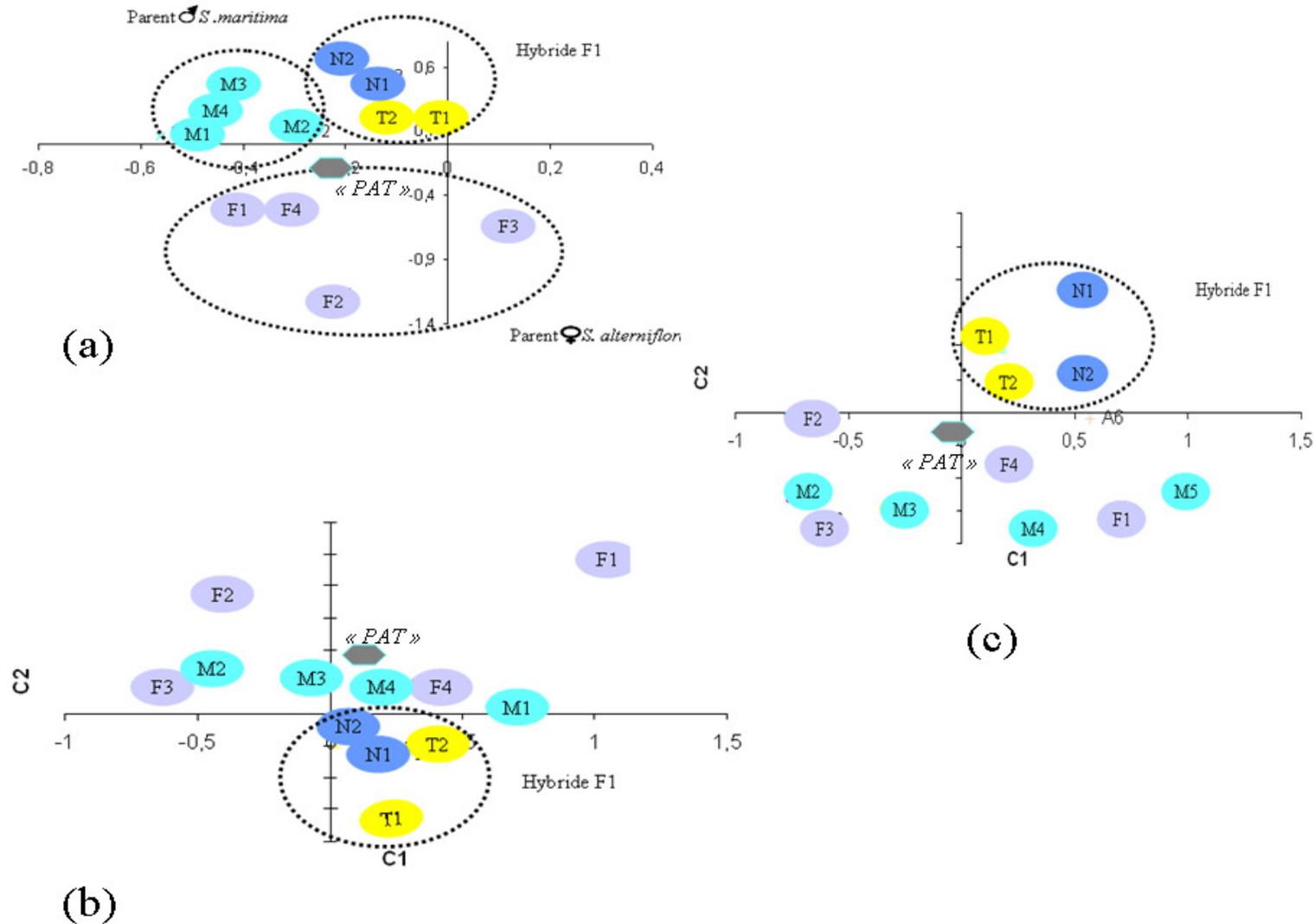


Figure 22. Analyse en coordonnées principales des profils SSAP d'ADNc pour 3 éléments transposables (a) *WIS-like*, (b) *Cassandra* et (c) *Ins2* F: *S. alterniflora*, M: *S. maritima*, T: *S. x townsendii*, N: *S. x neyrautii*, « PAT » : Profil Additif Théorique)

III.2. Effets de l'hybridation sur les transcriptomes de *S. x neyraultii* et *S. x townsendii* : écarts à l'additivité parentale

Les conséquences de l'hybridation ont été analysées en estimant l'écart à l'additivité attendue des profils d'expression obtenus dans les régions voisines des éléments transposables (analysées par SSAP de cDNA) et sur l'ensemble du transcriptome par microarrays.

L'analyse par SSAP indique que dans les séquences voisines des éléments transposables, l'additivité des profils transcriptomiques varie selon l'élément étudié de 63% (pour *Wis-like*) à 87% (pour *Cassandra*) chez *S. x neyraultii* et de 63% (pour *Wis-like*) à 67% (pour *Cassandra*) chez *S. x townsendii* (Figure 23). L'écart à l'additivité est le même pour *Wis-like* et pour *Ins2* chez les deux hybrides, tandis que la déviation est nettement plus importante chez *S. x townsendii* que chez *S. x neyraultii* pour l'élément *Cassandra*, ce qui indique un impact différentiel de l'hybridation pour cet élément. Il est à noter que la majorité des changements observés chez les deux hybrides F1 concerne des pertes de fragments du parent paternel *S. maritima*

Par comparaison, les données d'AFLP d'ADNc (X. Dauvergne, communication personnelle) indiquent un niveau similaire d'écart à l'additivité parentale chez *S. x neyraultii* (29%) et *S. x townsendii* (26%). L'écart à l'additivité se traduit également par une majorité de perte de fragments (98%), et seulement 2% de nouveaux fragments. Il est intéressant de noter que *S. x neyraultii* perd plus de fragments maternels (de *S. alterniflora*) que *S. x townsendii*.

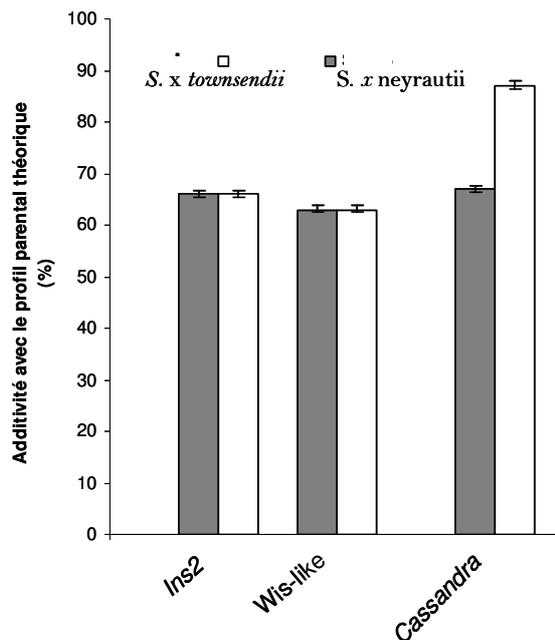


Figure 23. Comparaison des profils SSAP d'ADNc chez les deux hybrides F1.

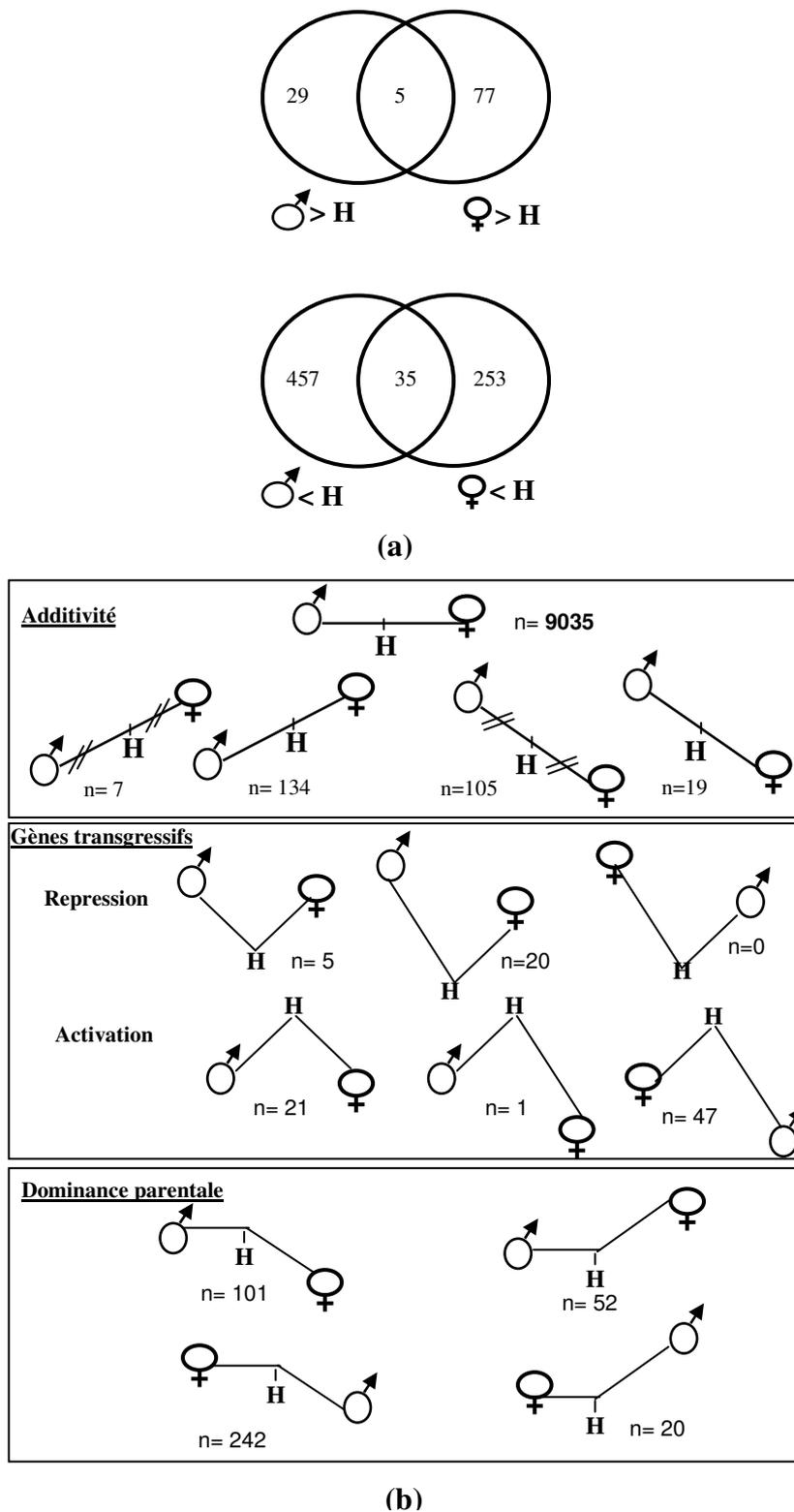


Figure 24. (a) Gènes transgressifs chez l'hybride *S. x neyrautii* (b) profils d'expression de l'hybride *S. x neyrautii* par rapport aux parents, H : l'hybride *S. x neyrautii*, ♂ *S. maritima*, ♀ *S. alterniflora*.

L'analyse transcriptomique des deux hybrides par microarrays a permis d'examiner 13210 gènes chez *S. x townsendii* et 13411 chez *S. x neyrautii* qui se sont hybridés sur la puce de riz.

Chez *S. x townsendii*, l'écart à l'additivité parentale a été estimé à 6,3% (chapitre V, partie A). La comparaison des profils d'expression de *S. x neyrautii* avec ceux des deux parents a été effectuée pour 9816 gènes qui se sont hybridés entre les deux espèces parentales et l'hybride, et qui ont passé tous les critères de normalisation et de filtration. Cette analyse a fourni une liste de 679 gènes (6,1%) qui montrent des différences d'expression significatives (d'un facteur double : « two fold change ») entre *S. x neyrautii* et la valeur attendue d'additivité parentale (« mid-parent value»). Lorsque l'on compare *S. x neyrautii* à ses parents, 526 (5,35%) gènes sont différentiellement exprimés entre l'hybride et le parent *S. maritima* et 370 (3,7%) gènes ont une expression différentielle entre l'hybride et l'espèce maternelle *S. alterniflora*. Cette différence indique une expression plus importante du génome maternel chez l'hybride *S. x neyrautii*. Toutefois, cette dominance d'expression du parent maternel *S. alterniflora* est encore plus importante (2 fois plus importante) chez *S. x townsendii* que chez *S. x neyrautii* (3,3% de gènes différentiellement exprimés entre *S. alterniflora* et *S. x townsendii* contre 12,3% de gènes différentiellement exprimés entre le parent paternel *S. maritima* et *S. x townsendii*).

Chez *S. x neyrautii*, 40 gènes différentiellement exprimés par rapport aux parents sont transgressifs. Parmi eux, 35 gènes sont sur-exprimés et 5 gènes sont sous-exprimés chez cet hybride (Figure 24a). Selon la méthode d'analyse développée par Rapp *et al.* (2009), 14 profils (additifs ou non) d'expression de l'hybride par rapport à ses parents peuvent être distingués (Figure 24b). Une fraction importante (9035) des gènes exprimés chez les parents sont additifs chez l'hybride. Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les parents, la situation de dominance d'expression par le parent maternel *S. alterniflora* est la plus représentée (262 gènes) contre 156 gènes dominés par l'expression du parent paternel *S. maritima*. La comparaison de la réaction des deux génomes de *S. x townsendii* et *S. x neyrautii* à l'hybridation interspécifique est résumée dans le Tableau 8.

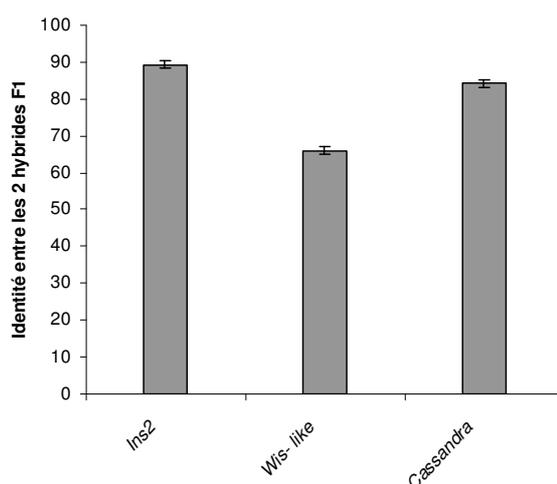
Cette comparaison confirme que la dominance d'expression du parent maternel *S. alterniflora* est nettement plus importante chez *S. x townsendii*. Une partie des gènes différentiellement exprimés par rapport aux deux parents sont communs aux deux hybrides *S. x neyrautii* et *S. x townsendii*. En revanche, il est notable que les gènes transgressifs détectés chez les deux hybrides sont totalement différents.

Tableau 8. Comparaison des nombres de gènes différentiellement exprimés entre les hybrides F1 et les parents

	<i>S. x townsendii</i>	<i>S. x neyraultii</i>	Gènes communs chez les 2 hybrides
gènes ≠ exprimés avec <i>S. maritima</i>	1235	526	270
gènes ≠ exprimés avec <i>S. alterniflora</i>	338	370	223
Gènes transgressifs (-)	25	5	0
Gènes transgressifs (+)	40	35	0
Gènes dominés par <i>S. maritima</i>	136	156	129
Gènes dominés par <i>S. alterniflora</i>	610	262	209

III.3. Différences transcriptomiques entre les deux hybrides F1

Dans les régions voisines d'éléments transposables, la comparaison des profils SSAP d'ADNc des deux hybrides montre une similitude de 66% (pour *Wis-like*) à 89% (pour *Ins2*) selon l'élément étudié (Figure 25). La comparaison globale des profils obtenus pour les trois éléments transposables chez les deux hybrides montre que dans l'environnement des éléments analysés par SSAP, la différence des profils entre les deux hybrides atteint 20%. Ces données suggèrent des différences transcriptomiques importantes entre les deux hybrides dans l'environnement des trois ETs étudiés.

**Figure 25.** Comparaison des profils transcriptomiques des deux hybrides F1 dans les régions voisines de 3 ETs

La comparaison des profils transcriptomiques des deux hybrides par microarrays a permis d'identifier 667 gènes qui présentent une différence significative d'expression entre *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* sur 5877 gènes hybridés en commun et d'une façon répétable sur les 10 puces des deux hybrides. Ce chiffre correspond à 8,68 % de divergence transcriptomique d'expression entre les deux hybrides avec un changement d'expression supérieur ou égal à 1,5 (« 1,5 fold change »). Parmi ces gènes différentiellement exprimés, 55,9% sont su-rexprimés chez l'hybride *S. x neyrautii* contre 43,7% qui sont sur-exprimés chez l'hybride *S. x townsendii*. Si l'on analyse l'expression de ces gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides selon leurs 14 profils d'expression possibles par rapport aux parents (Figure 26), on distingue chez les deux hybrides une fraction importante de gènes qui sont additifs entre les parents et les hybrides. La comparaison des gènes transgressifs et différentiellement exprimés entre les deux hybrides montre un nombre important de gènes transgressifs en cas d'activation (68) chez *S. x neyrautii*. Un nombre plus faible de gènes transgressifs (sur-exprimés ou sous-exprimés) est observé chez *S. x townsendii*. En revanche, chez ce dernier, on note une dominance d'expression maternelle (73 gènes suivent l'expression des gènes maternels de *S. alterniflora* contre 28 gènes qui suivent l'expression du génome paternel de *S. maritima*). Chez *S. x neyrautii*, un même nombre de gènes est dominé par l'expression paternelle (n=21) et par l'expression maternelle (n=22).

Il est à noter que les gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides représentent environ 1/3 des gènes différentiellement exprimés entre les deux parents *S. maritima* et *S. alterniflora* (1247, voir chapitre 5). La Figure 27 montre le comportement de ces gènes chez les parents et chez les deux hybrides.

III.4. Identification des gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides F1

Les gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides ont été identifiés à l'aide de *Gene Ontology* (GO) en se référant à la catégorie fonctionnelle des processus biologiques. Comme montré par le graphe (Figure 28), les gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides ont une distribution presque égale entre les différentes catégories. On note que les gènes potentiellement impliqués dans le développement et la croissance cellulaire, dans le métabolisme nucléotidique, dans le transport d'électrons ainsi que dans les facteurs de transcription restent plus représentés que ceux impliqués dans d'autres fonctions.

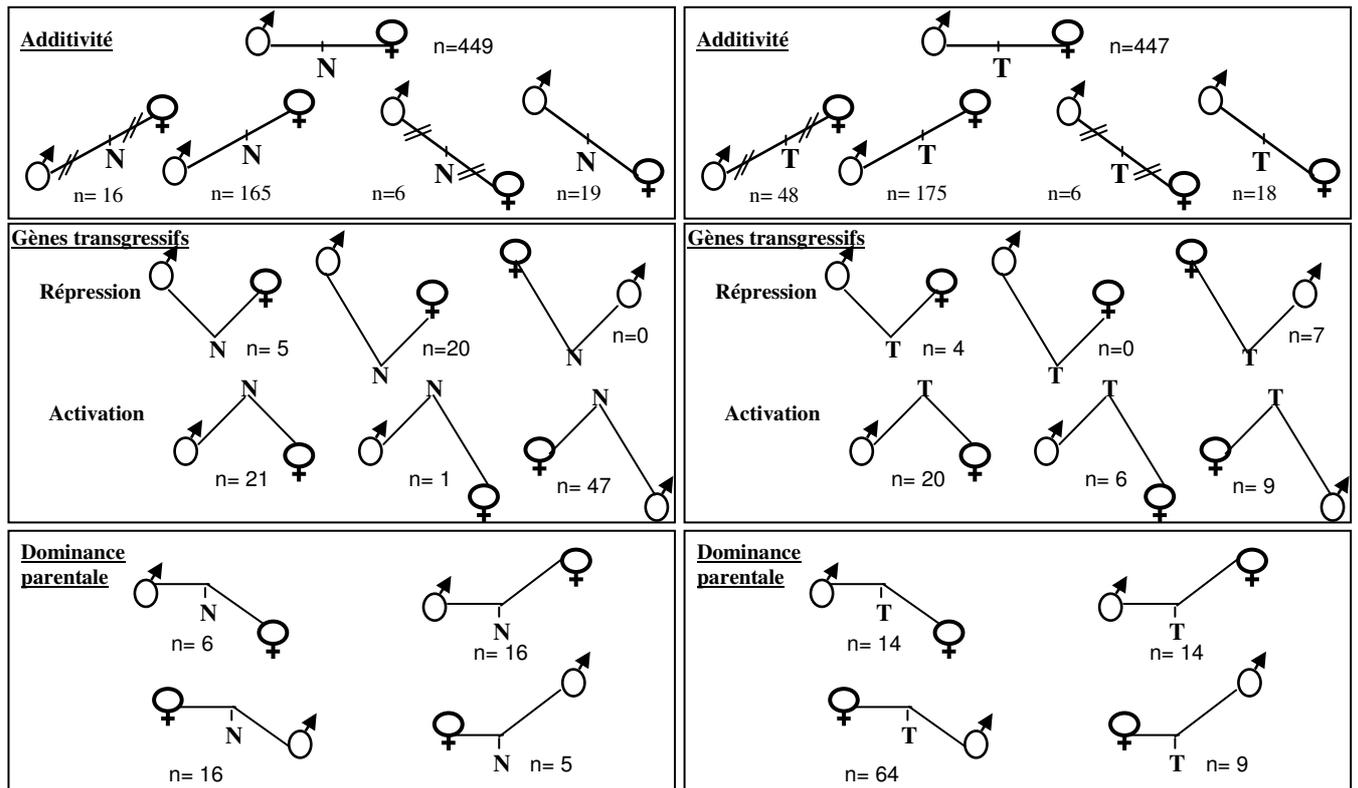


Figure 26. Profils d'expression des gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides par rapport aux deux parents. T : *S. x townsendii*, N : *S. x neyrautii*

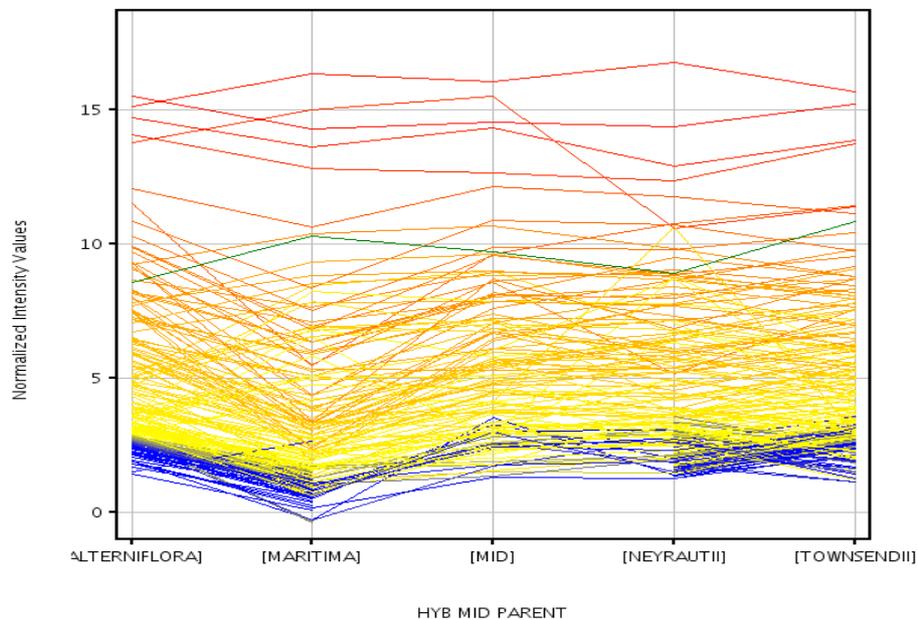


Figure 27. Flux de gènes différentiellement exprimés entre les deux parents et les deux hybrides.

L'identification des gènes sur-exprimés chez l'hybride *S. x neyrautii* montre que 65% de ces gènes interviennent dans la croissance et le métabolisme cellulaire, tels que la *3-ketoacyl-CoA synthase* (A_71_P117135, *Evalue*=0) qui intervient dans la formation et l'élongation de chaînes lipidiques. Plusieurs kinases impliquées dans la différenciation et la croissance cellulaire sont aussi sur-exprimées chez *S. x neyrautii* telles que la *leucine-rich repeat receptor protein kinase precursor*, (A_71_P124899, *Evalue*=0) ou la protéine kinase (A_71_P116538 *Evalue*=4e-33). Le gène de synthèse de la chlorophylle «*chlorophylle a-b binding protein*» (*Evalue*=4e-156) joue en plus de son rôle de capteur d'énergie lumineuse, un rôle important dans le développement cellulaire. 20% de gènes sur-exprimés chez l'hybride *S. x neyrautii* sont considérés comme des facteurs de transcription qui agissent sur le développement et la différenciation des cellules comme le gène *Leunig* (A_71_P111266, *Evalue*=5e-70) qui agit en tant que co-répresseur transcriptionnel des gènes homéotiques au cours des premiers stades du développement (Franks *et al.* 2002) ou l'homeobox *Wuschel* (A_71_P118971, *Evalue*=5e-150) qui favorise la différenciation et le maintien des cellules souches (Kiffer *et al.* 2006). Le facteur de transcription homeobox *Glabra2* (A_71_P111955, *Evalue*=0) joue un rôle dans le développement de l'épiderme racinaire et favorise la densité cytoplasmique (volume vacuolaire et élongation) (Masussi *et al.* 1996).

Les gènes sur-exprimés chez l'hybride *S. x townsendii* sont répartis d'une façon égale entre les différentes catégories fonctionnelles. On peut trouver des facteurs de transcription tels que les facteurs *NAC* (A_71_P103078, *Evalue*= 0) ou le *DNA binding protein* (A_71_P103651, *Evalue*=9e-45). On note aussi la présence de gènes de transport qui peuvent être impliqués dans la réponse à un stress salin, tels que le gène *OsRR6* (A_71_P111832, *Evalue*=2e-90) ou à un stress causé par les métaux lourds, tel le gène décrit comme *heavy metal-associated domain containing protein* (A_71_P101367, *Evalue*= 0).

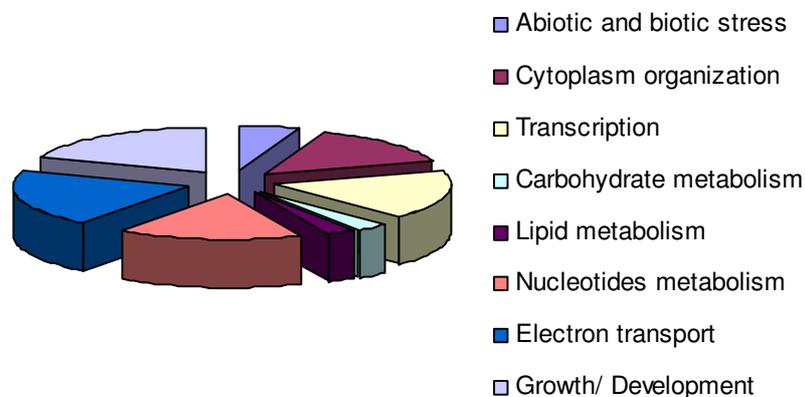


Figure 28. Catégories fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés entre les deux hybrides.

IV. Discussion

Les analyses comparatives des deux hybrides homoploïdes naturels *S. x neyrautii* (formé au Pays Basque) et *S. x townsendii* (formé en Angleterre), révèlent une réaction différente du génome face à des événements d'hybridation interspécifique intervenus dans le même contexte génétique. A notre connaissance, ce travail est le premier à étudier la nature des changements observés chez deux hybrides F1 naturels qui se sont formés indépendamment, à partir de parents génétiquement similaires sur deux sites d'hybridation, et avec le même sens de croisement.

Nous avons postulé que les différences morphologiques marquées de ces deux hybrides pouvaient résulter d'une différence dans la régulation et donc dans les niveaux d'expression des gènes suite au « choc » de la réunion des deux génomes différenciés de *S. maritima* (parent mâle) et *S. alterniflora* (parent femelle). Ceci se trouve pleinement confirmé par les différences quantitatives et qualitatives, ainsi que par les niveaux d'altération différentiels des transcriptomes parentaux dans l'expression des gènes des deux hybrides.

Un même sens de croisement et deux hybrides F1 différents en termes d'écart à l'additivité parentale

S. x townsendii et *S. x neyrautii* partagent un génome additif, peu restructuré par rapport à celui de leurs parents, comme en témoigne l'analyse d'AFLP sur ADN génomique, qui confirme les précédentes analyses de polymorphisme multilocus effectuées sur ces taxons (Baumel *et al.* 2001, 2003, Salmon *et al.* 2005). La divergence nucléotidique relativement marquée entre les espèces parentales (Baumel *et al.* 2002a, Chelaifa *et al.* ChapitreIV) montre que ces deux hybrides partagent une large proportion d'hétérozygotie. L'examen des régions voisines d'éléments transposables n'a pas révélé d'amplification notable chez ces hybrides (Baumel *et al.* 2002b, Parisod *et al.* 2009, Ainouche *et al.* 2009). La nature et la représentation des différentes catégories d'éléments transposables dans le génome des spartines ne sont pas connues, mais il semblerait que la dynamique du génome des hybrides soit affectée de façon différente puisque Parisod *et al.* (2009) notent une restructuration plus importante des régions flanquant les éléments du génome maternel chez *S. x townsendii*. Chez les deux hybrides, ces régions sont particulièrement affectées par des changements de méthylation (Parisod *et al.* 2009). La dynamique insertionnelle et les phénomènes épigénétiques associés ont déjà été reliés à des changements phénotypiques (*e.g.* Comai 2000, Madlung 2002), et il

serait tentant de poser la question du lien entre les changements préférentiels des séquences maternelles chez *S. x townsendii* et sa plus faible ressemblance avec *S. alterniflora* (parent maternel) comparé à *S. x neyrautii*.

Au plan transcriptomique, les niveaux de déviation par rapport à l'additivité parentale dans l'environnement des éléments transposables semblent plus importants chez l'hybride *S. x townsendii* (35%) que chez l'hybride *S. x neyrautii* (28%), alors qu'au plan génomique Parisod *et al.* (2009) observait chez ces hybrides le même niveau d'additivité des profils pour les mêmes éléments. A ce jour, l'essentiel des changements liés aux éléments transposables chez les hybrides ont été rapportés au niveau transcriptomique (Kashkush *et al.* 2002, 2003, Parisod *et al.* 2010a).

Sur l'ensemble du transcriptome, les niveaux de déviation par rapport à l'additivité parentale (« MPV ») sont très similaires entre les deux hybrides par les deux approches étudiés : par les puces, 6,7% de déviation pour *S. x townsendii* et 6,1% pour *S. x neyrautii*, et par AFLP d'ADNc, 26,2% de déviation pour *S. x townsendii* et 29,1% pour *S. x neyrautii*.

Des changements rapides du transcriptome dans les premières générations suivant l'hybridation sont également rapportés dans la littérature. Chez le peuplier, Zhuang & Adams (2007) ont détecté des changements d'expression significatifs pour 13 gènes sur 19 analysés, chez quatre hybrides différents, formés par hybridation entre différents génotypes de *Populus trichocarpa* et *P. deltoides*. Les changements mettent en jeu la mise sous silence d'une copie parentale, et le plus souvent, l'interaction de mécanismes génétiques de régulation en *cis* et *trans*. Hegarty *et al.* (2009) ont comparé les changements transcriptomiques entre un hybride naturel homoploïde (*Senecio squalidus*) formé par hybridation entre deux espèces diploïdes endémiques de Sicile (*S. aethnensis* et *S. chrysantemifolius*) et introduit depuis environ 300 ans en Grande Bretagne, avec un hybride synthétique, suivi sur plusieurs générations. Il est intéressant de noter que l'écart à l'additivité observé chez l'hybride synthétique est nettement plus important que l'écart à l'additivité observé chez l'hybride naturel, suggérant un effet de la sélection opérant au fil des générations en conditions naturelles, sur la diversité d'expression générée par l'hybridation. Une expression transgressive par rapport aux parents est notée chez l'hybride *S. squalidus*, celle-ci a probablement joué un rôle important dans l'adaptation au milieu récemment colonisé par cette espèce dans la région où elle a été introduite. L'expression transgressive de gènes est connue pour jouer un rôle important dans l'adaptation des hybrides naturels, leur permettant de coloniser une nouvelle niche comme cela a été montré chez les hybrides homoploïdes du genre *Helianthus* (Lexer *et al.* 2003, Lai *et al.* 2006).

Chez les spartines, une expression transgressive caractérise également les changements intervenant chez les hybrides. Il est intéressant de noter qu'un nombre plus important de gènes transgressifs (60) est détecté chez l'hybride *S. x townsendii* que chez l'hybride *S. x neyrautii* (40 gènes). La majorité de gènes transgressifs sont sur-exprimés chez les deux hybrides (40/60 et 35/40 respectivement). Chez les hybrides homoploïdes ayant évolué depuis plusieurs générations en milieu naturel, l'expression transgressive est généralement interprétée comme le résultat possible de recombinaison entre facteurs de régulation parentaux qui agissent de manière polygénique (Rieseberg *et al.* 2003, Hegarty *et al.* 2009). Toutefois, chez les hybrides F1 stériles (comme c'est le cas de *S. x townsendii* et *S. x neyrautii*), les causes génétiques de tels phénomènes pourraient plutôt résulter d'interactions épistatiques et de dominance entre les copies parentales (Hegarty *et al.* 2009).

Parmi les gènes exprimés de façon non-additive chez les hybrides de spartines, on note une proportion importante de dominance d'expression parentale. Chez *S. x townsendii*, comme chez *S. x neyrautii*, une dominance d'expression maternelle affecte les gènes qui sont surexprimés chez le parent *S. alterniflora* (par rapport au parent paternel). Il est intéressant de relever que cette dominance maternelle d'expression est deux fois plus importante chez l'hybride *S. x townsendii* que chez *S. x neyrautii*, contrairement à ce que la morphologie des plantes et les données structurales auraient pu laisser penser. Rapp *et al.* (2009) ont montré que des allotétraploïdes synthétiques du genre *Gossypium* peuvent être dominés par l'expression paternelle ou maternelle selon le croisement. On notera que chez les spartines, les deux hybrides sont issus des mêmes parents, mais montrent des cas de dominances différents.

Comme nous l'avons souligné précédemment, il est à présent admis que l'écart à l'additivité d'expression parentale joue un rôle important dans l'hétérosis ou la vigueur des hybrides (Birchler *et al.* 2003, Swanson -Wagner *et al.* 2006). Les deux hybrides de spartine montrent à cet égard une expression différente de la vigueur. *S. x neyrautii* présente une biomasse importante, notamment lorsqu'elle est maintenue en culture en conditions expérimentale (observations personnelles) alors qu'elle semble fragilisée sur le terrain par les perturbations anthropiques (Hubbard *et al.* 1978, M. Ainouche communication personnelle). A l'inverse, *S. x townsendii* montre une taille plus limitée que *S. x neyrautii*, notamment au niveau des feuilles (Marchant 1977) mais reste très vigoureux sur le terrain et s'est largement propagé par voie végétative sur le site naturel d'hybridation, concurrençant localement son descendant allopolyploïde *S. anglica*, pourtant fertile (Renny-Byfield *et al.* 2010).

Divergence d'expression entre les deux hybrides

L'analyse par microarrays a permis d'estimer à 8,7% (sur 5877 gènes comparés) la proportion des gènes montrant une différence d'expression significative entre *S. x neyrautii* et *S. x townsendii*. On a encore peu de recul sur les comparaisons de la divergence d'expression globale du génome estimée par microarrays entre taxons (voir discussion Chelaifa et al. Chapitre IV). A titre comparatif, la divergence d'expression mesurée sur la base de la même technique entre les espèces parentales de spartines (qui ont divergé depuis environ 2 à 3 MA) a été estimée à 13% (Chelaifa et al. 2010, chapitre V). Des proportions variables au niveau des différences transcriptomiques suite à plusieurs événements d'hybridation ou d'alloploïdisation ont été reportées dans la littérature, qu'il est difficile de comparer à nos valeurs en raison des contextes techniques et biologiques différents de ces études. Par exemple, Tate *et al.* (2006, 2009) ont comparé les conséquences de l'alloploïdie suite à plusieurs événements d'hybridation naturels récents entre *Tragopogon porrifolius*, *T. dubius* et *T. pratensis*, ayant donné naissance aux deux allotétraploïdes *T. mirus* et *T. miscellus*. Ces auteurs reportent 5,8% de bandes polymorphes détectées par AFLP d'ADNc entre les deux alloploïdes, ce qui représente une valeur nettement plus faible que ce qui est obtenu avec la même technique entre les deux hybrides de spartines (28%, X. Dauvergne communication personnelle). Une comparaison intéressante de l'évolution de l'expression de 4 espèces allotétraploïdes du genre *Gossypium* s'étant différenciées à partir d'un même ancêtre allotétraploïde il y a 1 à 2 millions d'années, révèle un niveau de changement d'expression similaire des 5 tétraploïdes actuels par rapport aux espèces parentales, mais ayant évolué selon une direction différente dans chaque cas (Flagel *et al.* 2010). Ceci représente une situation assez comparable à ce que nous observons cette fois, immédiatement après l'hybridation chez nos deux hybrides de spartines formés indépendamment.

Les gènes différentiellement exprimés entre *S. x townsendii* et *S. x neyrautii* se répartissent de façon égale entre les différentes catégories fonctionnelles identifiés par GO et ces gènes sont équitablement répartis entre sur-expression et sous-expression. La plus grande différence entre les deux hybrides concerne la catégorie du développement et de la croissance cellulaire qui sont sur-exprimés chez *S. x neyrautii* et sous-exprimés chez *S. x townsendii*, ce qui est en accord avec les différences morphologiques entre ces taxons. L'hybride *S. x neyrautii* est en effet, une plante de grande taille, aux feuilles longues et à rhizomes plus longs, produisant un plus grand nombre d'inflorescences et ressemblant davantage au parent maternel *S. alterniflora*. L'autre hybride, *S. x townsendii*, est une plante

nettement plus petite aux feuilles plus réduites et dressées. On note que chez cet hybride, les gènes sur-exprimés sont plutôt des gènes de transport, de détoxification ou de stress.

En résumé, nos résultats montrent un nouvel aspect des conséquences de l'hybridation interspécifique à travers des modalités différentes de changement d'expression. La différence entre les deux hybrides génétiquement très proches se situe essentiellement au niveau d'un faible pourcentage de gènes différents à expression transgressive, et d'une dominance d'expression parentale plus forte du parent maternel chez *S. x townsendii* et plus modérée chez *S. x neyraultii*. Dans les études en milieu naturel, on a jusqu'à présent surtout mis l'accent sur le rôle des hybridations multiples et récurrentes, à partir de génotypes parentaux différents, dans la dynamique ultérieure des hybrides ou des allopolyploïdes. Notre étude montre que des génotypes très similaires peuvent générer par le seul biais du « choc génomique » de l'hybridation, des effets multiples pouvant avoir des conséquences phénotypiques importantes. Enfin, nous montrons également que les différences phénotypiques entre *S. x neyraultii* et *S. x townsendii* qui intriguent les botanistes de longue date, trouvent leur causes à un niveau génomique global (celui notamment de la régulation de l'expression) plutôt que local (au niveau de gènes particuliers).

Discussion générale
&
Perspectives

Discussion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes fixé pour objectif d'explorer les changements transcriptomiques dans les contextes de spéciation dichotomique et réticulée chez les spartines, plantes pérennes de la famille des Poacées, chez lesquelles la spéciation allopolyploïde (notamment récente) est récurrente.

Nous avons analysé l'évolution du transcriptome chez deux espèces sœurs (*S. maritima* et *S. alterniflora*) dérivant d'un même ancêtre hexaploïde, et chez leurs descendants hybrides homoploïdes F1 (*S. x neyrautii* et *S. x townsendii*) et allo-dodécaploïde (*S. anglica*). Ce système offre la possibilité d'examiner l'évolution des populations et des espèces dans un contexte historique et génétique aujourd'hui bien établi, et de comparer les génomes hybrides et allopolyploïde à ceux des parents, juste après la spéciation. Les exemples du séneçon allohexaploïde (*Senecio cambrensis*, Hegarty *et al.* 2006) et des salsifis allotétraploïdes (*Tragopogon mirus* et *T. miscellus*, Buggs *et al.* 2010) comptent parmi les rares cas comparables d'allopolyploïdes récents bien documentés dans les populations naturelles. Les spartines offrent en plus la possibilité de comparer l'hybride F1 (*S. x townsendii*) à l'allopolyploïde *S. anglica*. Cette dernière s'est de plus formée de façon unique, et non multiple comme chez *Senecio* (Ashton & Abbott 1992) et *Tragopogon* (Soltis *et al.* 2004), où plusieurs génotypes différents de chaque espèce parentale se sont hybridés en plusieurs endroits, ce qui augmente la variation génétique inter-individuelle des populations, tandis que cette variation est extrêmement réduite sur toute l'aire de distribution naturelle de *S. anglica* (Ainouche *et al.* 2004b).

Toutefois, si le genre *Spartina* présente un intérêt incontestable en écologie évolutive, il représente un défi pour les approches de génétique et de génomique, en raison non seulement du haut niveau de ploïdie mais surtout parce qu'il appartient au clade le moins connu de la famille des Poacées, celui des Chloridoideae, peu représentées en région tempérée et ne contenant pas d'« espèce modèle ». Les croisements expérimentaux ne sont pas réalisables (les multiples tentatives effectuées par des chercheurs en Angleterre (Marchant 1968) de re-créeer artificiellement les hybrides interspécifiques ont échoué. Il n'existe pas de carte génétique dans le genre *Spartina* qui pourrait permettre de situer les

marqueurs analysés. De plus, les taux de germination chez les spartines sont extrêmement faibles en condition expérimentale, y compris pour *S. anglica* qui est très fertile. En revanche, la nature pérenne des plantes facilite leur transplantation et leur maintien en conditions contrôlées, permettant leur analyse par différentes approches. La méthodologie choisie a donc pris en compte ces caractéristiques.

Le défi méthodologique

Dans le contexte des difficultés mentionnées ci-dessus, les méthodes d'analyse multilocus basées sur les polymorphismes de restriction se sont avérées très informatives, tant au niveau génétique (Baumel *et al.* 2001, 2002b, Ainouche *et al.* 2004b, 2009) qu'épigénétique (Salmon *et al.* 2005, Parisod *et al.* 2009). Dans notre travail, l'analyse comparative de régions digérées aléatoirement par AFLP d'ADN génomique ou d'ADNc, ou de régions spécifiques comme celles contenant des éléments transposables (par SSAP d'ADN génomique ou d'ADNc) a été extrêmement informative. En détectant les polymorphismes sur plusieurs centaines de loci, elle nous a permis de contraster l'évolution du génome et du transcriptome des spartines de façon globale et de façon ciblée (sur certaines catégories d'éléments transposables), et d'identifier l'origine (maternelle ou paternelle) des fragments parentaux polymorphes dans le génome nucléaire des hybrides et de l'allopolyploïde. Malgré la nature co-dominante des marqueurs (qui fait que les polymorphismes détectés sont sous-estimés), nous obtenons une parfaite cohérence entre les résultats obtenus avec ces méthodes et ceux résultant d'autres approches (exemple : AFLP d'ADNc et microarrays) concernant l'intensité et la direction des changements intervenant au cours de la spéciation, ce qui indique que malgré les limites inhérentes à chaque technique et à notre modèle, nos résultats traduisent bien une réalité biologique.

Lorsque nous avons entamé ce travail (fin 2006), les analyses de transcriptome par microarrays (qui permettent cette fois d'analyser simultanément plusieurs milliers de gènes) s'étaient répandues chez les espèces modèles de la génétique, notamment chez les animaux et les micro-organismes et plus rarement chez les modèles végétaux en dehors d'*Arabidopsis thaliana*. L'utilisation de cette technologie nécessite en effet la connaissance du génome analysé ou tout au moins une large base de données d'ESTs permettant le dessin de sondes spécifiques sur la puce. L'emploi des microarrays chez les polyploïdes a fait l'objet de longues réflexions et de circonspection dans les équipes s'intéressant à l'expression des gènes chez les polyploïdes. Ces hésitations étaient dictées par le coût des expérimentations (fabrication

ou achat des puces, coût des hybridations qui nécessitent plusieurs réplicats) mais surtout par le souci de la validité des résultats dans le contexte de gènes dupliqués sur l'ensemble du génome (problème qui se pose en fait même pour les espèces animales ou végétales diploïdes en raison de la présence de gènes paralogues ou de la présence de paleopolyploïdie), et celui de la distinction des changements d'expression entre espèces proches (parents et polyploïdes) et du « bruit de fond » technique. Une réflexion s'est alors engagée de façon à optimiser la conception des sondes, le plan expérimental des hybridations avec plusieurs espèces, et le traitement statistique des signaux de fluorescence permettant de déduire les niveaux d'expression des gènes, ayant abouti aux premiers travaux permettant l'analyse des niveaux d'expression globale des gènes chez les polyploïdes (Wang *et al.* 2005). Ceci a abouti à la première analyse des changements de l'expression des gènes chez l'allopolyploïde *Arabidopsis suecica* (Wang *et al.* 2006), suivi d'un nombre limité d'études chez quelques modèles cultivés (Udall *et al.* 2007, Stupar *et al.* 2007, Pumphrey *et al.* 2009), parmi lesquels il faut relever la puce particulière construite chez le coton, permettant de distinguer l'expression des gènes homéologues chez l'allotétraploïde *Gossypium hirsutum* (Udall *et al.* 2006). Chez les polyploïdes sauvages, Hegarty *et al.* (2005) ont contourné la difficulté de l'absence de ressource génomique du séneçon pour examiner les changements d'expression par une puce anonyme contenant des ADNc.

Chez les spartines, nous avons réalisé avec succès l'une des premières tentatives d'hybridation hétérologue chez un polyploïde (avec le colza, Gaeta *et al.* 2009), en utilisant une puce désignée à partir du génome du riz, dont la lignée a divergé de celle des spartines il y a environ 50 MA (Christin *et al.* 2008). Le degré de conservation des séquences codantes entre les deux lignées (que nous avons estimées entre 84-92%), et entre les espèces parentales (94-99%) nous a permis d'hybrider l'ARN des spartines avec environ 70% des oligos de riz sur la puce, et d'obtenir des signaux d'hybridation répétables sur les cinq réplicats effectués par espèce. La forte stringence des conditions de l'hybridation des puces ainsi que la longueur des oligonucléotides hybridés (60-mer) ont limité les biais causés par l'hybridation hétérologue. Nous avons également choisi une démarche stringente dans la sélection des seuils d'hybridation pour la prise en compte des gènes de riz hybridés sur l'ARN de spartines. De ce fait, nous avons certainement éliminé de nos analyses des changements d'expression plus subtils, sous-estimant ainsi les effets de l'hybridation et de la duplication du génome. De la même façon, la technologie employée ne permet pas de distinguer les gènes des hybrides ou de l'allopolyploïde pour lesquels la contribution des sous-génomes parentaux homéologues est différente s'ils montrent un même niveau

d'expression globale. Toutefois, ces analyses nous ont permis de porter à niveau jamais atteint jusqu'à présent chez les spartines, le degré d'information sur l'expression des gènes; elles nous ont permis d'affiner de façon complémentaire aux AFLPs, la compréhension des conséquences de l'alloploïdie, en précisant les variations en terme de niveau d'expression et en identifiant les gènes concernés par ces changements.

Aujourd'hui, les possibilités offertes par les nouvelles technologies de séquençage à haut débit représentent une opportunité particulière pour analyser à plus grande échelle le génome et le transcriptome des espèces non modèles en s'affranchissant des biais techniques de l'hybridation moléculaire, tout en suscitant de nouveaux défis de traitement et d'interprétation des données (Wang *et al.* 2010). L'identification des copies dupliquées chez les polyploïdes sera également facilitée. A la fin de cette étude, j'ai participé à la mise en place des analyses génomiques et transcriptomiques par pyroséquençage (technologie 454 Roche), en cours actuellement au laboratoire en collaboration avec le Génoscope (Evry) et la plateforme de Génomique Environnementale du CAREN (Rennes).

Stase génomique ou évolution rapide chez les spartines polyploïdes?

L'idée des changements « rapides » résultant de la spéciation par polyploïdie s'est répandue dans la fin des années 1990 suite aux premiers résultats obtenus chez les alloploïdes synthétiques (pour revue : Wendel 2000). La question de la généralisation de ces conclusions s'était alors posée, et les données sur ce thème n'ont pas cessé de s'accumuler durant cette dernière décennie. Il ressort de ces études la grande variété des réponses des génomes des plantes à l'hybridation et la polyploïdie (Doyle *et al.* 2008). Les mécanismes génétiques intervenant au cours de la méiose, et déterminant les restructurations génomiques résultant notamment d'appariement et de recombinaisons entre génomes homéologues commencent à être mieux compris (Gaeta *et al.* 2010, Mestiri *et al.* 2010, Szadowski *et al.* 2010, Salmon *et al.* 2010). Chez les spartines, les génomes parentaux homéologues restent peu remaniés (Baumel *et al.* 2002b, Ainouche *et al.* 2004b), ce que nous avons confirmé par les analyses d'AFLP sur ADN génomique où les individus de *S. anglica* restent très similaires à l'hybride F1 et au profil parental théorique additif. Les allotétraploïdes naturels du genre *Tragopogon* semblent plus dynamiques, puisque des pertes de locus (Tate *et al.* 2009a), des degrés variables d'homogénéisation variable des séquences répétées (Kovarik *et al.* 2005) et une évolution rapide des caryotypes (Lim *et al.* 2008) ont été rapportés. Les *Tragopogons* alloploïdes se sont formés dans la moitié du vingtième siècle,

et on estime leur évolution à 80 générations (Tate *et al.* 2009b). *Spartina anglica* s'est formée au 19^{ième} siècle, mais compte tenu de la nature vivace des plantes, de la prédominance de sa propagation par voie végétative et de la capacité des clones à survivre plus d'une dizaine d'années, on peut raisonnablement estimer l'évolution de cette espèce à 10-15 générations (M. Ainouche, communication personnelle). Ceci, combiné à la régularité de la méiose observée chez cette espèce (Marchant 1968), pourrait expliquer que chez les spartines, nous ne détectons pas de remaniement génétique majeur, à l'échelle des approches qui ont pu être utilisées à ce jour.

Chez les spartines, la dynamique se manifeste essentiellement au niveau épigénétique et transcriptomique. Suite à l'hybridation d'importantes altérations de la méthylation du génome interviennent, qui sont transmises en majorité à l'allopolyploïde *S. anglica* (Salmon *et al.* 2005, Parisod *et al.* 2009). Une des originalités de notre travail réside dans la mise en évidence des effets nuancés de l'hybridation et de la duplication du génome sur le transcriptome. L'hybridation provoque d'importants changements d'expression se traduisant par une expression transgressive des gènes. Ce caractère transgressif joue un rôle important dans les capacités adaptatives des génomes hybrides (Lai *et al.* 2006, Hegarty *et al.* 2009). Mais la caractéristique la plus frappante du génome de l'hybride F1 *S. x townsendii* réside dans la dominance d'expression du parent maternel, dans le sens où les profils d'expression de l'hybride sont similaires à ceux de *S. alterniflora* et différents de *S. maritima*, pour la majorité des gènes à expression non additive. Ce phénomène a aussi été observé suite à l'hybridation entre un cytotype autotétraploïde d'*A. thaliana* et le tétraploïde *A. arenosa* (Wang *et al.* 2006), et chez deux allotétraploïdes synthétiques (Rapp *et al.* 2009). La duplication du génome chez *S. anglica* atténue la dominance maternelle, rappelant l'effet « calmant » de la duplication évoqué par Hegarty *et al.* (2006), mais se caractérise surtout par l'augmentation du nombre de gènes à expression transgressive. Il est intéressant de noter que des conclusions très proches des nôtres sont tirées de l'analyse de 5 allotétraploïdes naturels et un hybride F1 synthétique chez *Gossypium* par Flagel *et al.* (2010) qui montrent une atténuation de la dominance parentale et une augmentation du nombre de gènes transgressifs entre l'hybride synthétique et les allotétraploïdes. Toutefois, chez *Gossypium*, l'expression transgressive concerne autant la sous-expression que la surexpression des gènes, tandis que chez *Spartina*, nous observons essentiellement une surexpression par rapport à l'hybride F1. De plus, chez *Gossypium*, la proportion des gènes transgressifs est nettement plus faible chez les allopolyploïdes synthétiques (Rapp *et al.* 2009) que chez les allotétraploïdes naturels s'étant formés il y a 1-2 MA (Flagel *et al.* 2010),

ce qui conduit ces auteurs à attribuer cet effet transgressif à des processus sélectifs agissant sur le long-terme. Nos résultats chez les spartines montrent par contre, que ce phénomène peut intervenir à une échelle de temps évolutif bien plus courte, après quelques générations d'évolution en conditions naturelles.

Les éléments transposables représentent un compartiment potentiellement mobile des génomes. Dans le transcriptome, les zones flanquant les éléments transposables que nous avons testées à l'aide de la SSAP montrent des changements relativement importants suite à l'hybridation interspécifique (35% d'écart à l'additivité parentale) et à la duplication du génome (24%, figure 20). Au niveau génomique (ADN), ces changements restent notables suite à l'hybridation (14%) tandis qu'ils sont beaucoup plus faibles (4%) suite à la duplication (figure 20). Ces régions du génome semblent également plus affectées par les changements de méthylation CpG après l'hybridation qu'après la duplication (Parisod *et al.* 2009). La distribution et la représentation des éléments transposables testés dans le génome des spartines n'est pas connue. Il sera intéressant, à la lumière des données de séquençage à haut débit du génome et du transcriptome, d'examiner leur position par rapport aux gènes, et éventuellement leur contribution au transcriptome. Ces nouvelles données devraient également permettre l'analyse plus précise de la distribution des changements de méthylation entre les différentes espèces de spartines.

Hasard et nécessité

L'analyse des changements d'expression au cours de la spéciation suscite de nombreuses questions qui commencent à peine à être explorées: Quelle est l'importance de la divergence d'expression des gènes suite à une évolution indépendante sur une longue période de temps évolutif? Les différences d'expression sont-elles proportionnelles au degré de divergence génétique? Quelles sont les contraintes évolutives qui agissent sur l'amplitude de la variation du transcriptome? L'évolution du transcriptome peut-elle se « répéter » dans des conditions similaires?

Un des principaux résultats de nos analyses est l'importante divergence transcriptomique (environ 12% des gènes examinés par microarrays) qui existe entre les deux parents dérivant d'un même ancêtre hexaploïde *S. maritima* et *S. alterniflora*. Comme précisé ci-dessus, cette évaluation est très probablement sous-estimée. En accord avec les analyses phylogénétiques précédentes (Baumel *et al.* 2002, Fortuné *et al.* 2007), nous avons

montré que ces deux espèces sœurs présentent une faible divergence nucléotidique (inférieure à 5% pour une dizaine de gènes testés). La nature hexaploïde du génome ancestral a certainement joué un rôle important dans l'évolution et l'expression des gènes chez ces allopolyploïdes. Il est intéressant de noter qu'une bonne partie des gènes qui sont différentiellement exprimés entre ces espèces se retrouve parmi les gènes dont l'expression est modifiée chez leurs descendants hybrides et allopolyploïde. Cette tendance se retrouve chez les allotétraploïdes naturels et synthétiques d'*Arabidopsis* (Adams *et al.* 2007) et dans un autre contexte d'allotétraploïdisation récent chez *Tragopogon* (Buggs *et al.* 2009a). Ceci suggérerait que la différence d'expression entre les parents est susceptible d'être un facteur de divergence entre les systèmes allopolyploïdes, et que cette disparité doit être prise en compte dans les changements d'expression observés (Hegarty & Hiskock 2009).

L'existence de deux hybrides F1 *S. x neyrautii* et *S. x townsendii* formés indépendamment à partir de parents génétiquement similaires nous a donné l'opportunité d'examiner la nature potentiellement dirigée ou aléatoire des changements transcriptomiques suite à l'hybridation. Nos analyses montrent, pour un niveau de changement équivalent, des modalités très différentes de l'expression des génomes des deux hybrides par comparaison aux parents. Ces résultats amènent un éclairage nouveau sur les causes potentielles des différences phénotypiques entre les deux hybrides.

Du transcriptome au phénotype

Nos analyses du transcriptome ont permis d'identifier des catégories de gènes impliquées dans les différences d'expression entre espèces de morphologie et d'écologie différente. Les gènes différentiellement exprimés entre *S. maritima* et *S. alterniflora* sont majoritairement surexprimés chez *S. alterniflora* et interviennent essentiellement dans la croissance et le développement cellulaire, ce qui est en accord avec la différence de taille (hauteur des plantes, longueur et largeur des feuilles) entre les deux espèces. Les gènes surexprimés chez *S. maritima* se sont avérés impliqués dans les processus de réponse au stress, en accord avec la plus grande sensibilité de *S. maritima* aux changements environnementaux.

Nous avons montré que les deux hybrides F1 génétiquement très proches présentaient 8% de gènes différentiellement exprimés (sur environ 5800 gènes comparés sur

les puces). Une grande partie (60%) des gènes surexprimés chez *S. x neyrautii* (morphologiquement très ressemblante à *S. alterniflora*) sont aussi impliqués dans le développement et le métabolisme cellulaire. Les gènes surexprimés chez *S. x townsendii* appartiennent à différentes catégories fonctionnelles, dont des facteurs de transcription, des gènes de transport impliqués dans la réponse au stress salin ou aux métaux lourds.

Ces différences d'expression jouent sans aucun doute un rôle important dans la distribution écologique de ces espèces et leurs capacités à répondre aux contraintes environnementales. Notre étude ouvre de nouvelles perspectives d'analyse *in situ* de gènes candidats dans différentes conditions, entre populations issues des zones natives ou récemment colonisées, ou entre populations subissant différents niveaux de pollution, différents gradients de salinité ou de compétition.

Références Bibliographiques

A

- Adams JB, Bate GC. 1995.** Ecological implications of tolerance of salinity and inundation by *Spartina maritima*. *Aquatic Botany* **52**(3): 183-191.
- Adams KL. 2007.** Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of Heredity* **98**(2): 136-141.
- Adams KL. 2008.** Insights into the evolution of duplicate gene expression in polyploids from *Gossypium*. *Botany-Botanique* **86**(8): 827-834.
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003.** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(8): 4649-4654.
- Adams KL, Percifield R, Wendel JF. 2004.** Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* **168**(4): 2217-2226.
- Adams KL, Wendel JF. 2004.** Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 573-581.
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(2): 135-141.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A, Yannic G. 2004a.** Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **161**(1): 165-172.
- Ainouche ML, Baumel A, Salmon A. 2004b.** *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 475-484.
- Ainouche ML, Fortune PM, Salmon A, Parisod C, Grandbastien MA, Fukunaga K, Ricou M, Misset MT 2009.** Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biological invasions* **11**: 1159-1173.
- Albertin W, Alix K, Balliau T, Brabant P, Davanture M, Malosse C, Valot B, Thiellement H. 2007.** Differential regulation of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization. *Bmc Genomics* **8**.
- Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H. 2006.** Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* **173**(2): 1101-1113.
- Albertin W, Brabant P, Catrice O, Eber F, Jenczewski E, Chevre AM, Thiellement H. 2005.** Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics* **5**(8): 2131-2139.
- An SQ, Gu BH, Zhou CF, Wang ZS, Deng ZF, Zhi YB, Li HL, Chen L, Yu DH, Liu YH. 2007.** *Spartina* invasion in China: implications for invasive species management and future research. *Weed Research* **47**(3): 183-191.
- Anssour S, Krugel T, Sharbel TF, Saluz HP, Bonaventure G, Baldwin IT. 2009.** Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*. *Annals of Botany* **103**(8): 1207-1217.
- Araujo PG, Rossi M, de Jesus EM, Saccaro NL et al. 2005.** Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. *Plant J.*, **44**, 707-717.
- Ashton P, Abbott RJ. 1992.** Multiple origins and genetic diversity in the newly arisen allopolyploid species, /*Senecio cambrensis*/ Rosser (Compositae). *Heredity* **68**: 25-32
- Aury JM, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, Segurens B et al. 2006.** Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature* **444**(7116): 171-178.
- Ayres DR, Garcia-Rossi D, Davis HG, Strong DR. 1999.** Extent and degree of hybridization between exotic (*Spartina alterniflora*) and native (*S. foliosa*) cordgrass (Poaceae) in California, USA determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Molecular Ecology* **8**(7): 1179-1186.
- Ayres DR, Zaremba K, Sloop CM, Strong DR. 2008.** Sexual reproduction of cordgrass hybrids (*Spartina foliosa* x *alterniflora*) invading tidal marshes in San Francisco Bay. *Diversity and Distributions* **14**(2): 187-195.

B

- Bahem CW, Oomen RJF, Visser RG.** 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**, 157–173.
- Bailey CD, Koch MA, Mayer M, Mummenhoff K, O’Kane SL, Warwick SI, Windham MD, Al-Shehbaz IA.** 2006. Toward a global phylogeny of the *Brassicaceae*. *Molecular Biology and Evolution* **23**(11): 2142–2160.
- Baisakh N, Subudhi PK, Parami NP.** 2006. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Plant Science* **170**(6): 1141–1149.
- Barker MS, Kane NC, Matvienko M, Kozik A, Michelmore W, Knapp SJ, Rieseberg LH.** 2008. Multiple Paleopolyploidizations during the Evolution of the Compositae Reveal Parallel Patterns of Duplicate Gene Retention after Millions of Years. *Molecular Biology and Evolution* **25**(11): 2445–2455.
- Barton NH, Hewitt GM.** 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497–503.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, Ainouche AK, Misset MT.** 2002a. Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**(2): 303–314.
- Baumel A, Ainouche M, Kalendar R, Schulman AH.** 2002b. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution* **19**(8): 1218–1227.
- Baumel A, Ainouche ML, Levasseur JE.** 2001. Molecular investigations in populations of *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) invading coastal Brittany (France). *Molecular Ecology* **10**(7): 1689–1701.
- Baumel A, Ainouche ML, Misset MT, Gourret JP, Bayer RJ.** 2003. Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* x *neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution* **237**(1–2): 87–97.
- Benjamini Y, Hochberg Y.** 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* **57** : 289–300.
- Bennetzen JL.** 2002. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetica* **115**(1), 29–36.
- Bennetzen JL.** 2005. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in 396 flowering plants. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**: 621–627.
- Bennett MD, Leitch IJ.** 2004. Angiosperm DNA C-values Database (Release 5.0, Dec. 2004).
- Beaulieu J, Jean M, Belzile F.** 2009. The allotetraploid 392 *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Molecular Genetics and Genomics* **281**: 421–435.
- Biémont Ch & Vieira C.** 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**(7111), 521–524.
- Birchler JA, Auger DL, Riddle NC.** 2003. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* **15**(10): 2236–2239.
- Birchler JA, Bhadra U, Bhadra MP, Auger DL.** 2001. Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: Implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Developmental Biology* **234**(2): 275–288.
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S.** 2006. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(35): 12957–12958.
- Birchler JA, Veitia RA.** 2010. The gene balance hypothesis: implications for gene regulation, quantitative traits and evolution. *New Phytologist*, Doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03087.x
- Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH.** 2003. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Research* **13**(2): 137–144.
- Blanc G, Wolfe KH.** 2004a. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell* **16**(7): 1679–1691.
- Blanc G, Wolfe KH.** 2004b. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16**(7): 1667–1678.
- Boswell MG, Wells MC, Kirk LM, Ju Z, Zhang Z, Booth RE, Walter RB.** 2009. Comparison of gene expression responses to hypoxia in viviparous (*Xiphophorus*) and oviparous (*Oryzias*)

- fishes using a medaka microarray. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology* **149**(2, Sp. Iss. SI): doi:10.1016/j.cbpc.2008.1011.1005.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Graham NS, Bowen HC, Emmerson ZF, Fray RG, Iannetta PPM, McNicol JW, May ST. 2008.** Evidence of neutral transcriptome evolution in plants. *New Phytologist* **180**(3): 587-593.
- Buerkle CA, Morris RJ, Asmussen MA, Rieseberg LH. 2000.** The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity* **84**(4): 441-451.
- Buckler E, Gore M. 2007.** An Arabidopsis haplotype map takes root. *Nature Genetics* **39**(9): 1056-1057.
- Buckley BA. 2007.** Comparative environmental genomics in non-model species: using heterologous hybridization to DNA-based microarrays. *Journal of Experimental Biology* **210**(9): 1602-1606.
- Buggs RJA. 2008.** Towards natural polyploid model organisms. *Molecular Ecology* **17**(8): 1875-1876.
- Buggs RJA, Doust AN, Tate JA, Koh J, Soltis K, Feltus FA, Paterson AH, Soltis PS, Soltis DE. 2009a.** Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. *Heredity* **103**(1): 73-81.
- Buggs RJA, Soltis PS, Soltis DE. 2009b.** Does hybridization between divergent progenitors drive whole-genome duplication? *Molecular Ecology* **18**(16): 3334-3339.
- Buggs RJA, Elliott NM, Zhang L, Koh J, Viccini LF, Soltis DE, Soltis PS. 2010.** Tissue-specific silencing of homeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus*. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03205.x.
- ### C
- Cambrolle J, Redondo-Gomez S, Mateos-Naranjo E, Figueroa ME. 2008.** Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* **56**(12): 2037-2042.
- Castillo JM, Leira-Doce P, Rubio-Casal AE, Figueroa E. 2008.** Spatial and temporal variations in aboveground and belowground biomass of *Spartina maritima* (small cordgrass) in created and natural marshes. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **78**(4): 819-826.
- Chain FJ, Ilieva D, Evans BJ. 2008a.** Duplicate gene evolution and expression in the wake of vertebrate allopolyploidization. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S et al. 2005.** Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *aegilops*). *Plant Cell* **17**(4): 1033-1045.
- Chapman MA, Burke JM. 2006.** Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *New Phytologist* **170**(3): 429-443.
- Charles M, Belcram H, Just J, Huneau C, Viollet A, et al. 2008.** Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. *Genetics* **180**: 1071-1086
- Chaudhary B, Hovav R, Flagel L, Mittler R, Wendel JF. 2009.** Parallel expression evolution of oxidative stress-related genes in fiber from wild and domesticated diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). *Bmc Genomics* **10**.
- Chaudhary B, Hovav R, Rapp R, Verma N, Udall JA, Wendel JF. 2008.** Global analysis of gene expression in cotton fibers from wild and domesticated *Gossypium barbadense*. *Evolution & Development* **10**(5): 567-582.
- Chen ZJ. 2007.** Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 377-406.
- Chen ZJ, Ha M, Soltis D. 2007.** Polyploidy: genome obesity and its consequences. *New Phytologist* **174**(4): 717-720.
- Chen ZJ, Ni ZF. 2006.** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays* **28**(3): 240-252.
- Chen M, Ha M, Lackey E, Wang JL, Chen ZJ. 2008.** RNAi of met1 reduces DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in Arabidopsis allopolyploids. *Genetics* **178**(4): 1845-1858.
- Chen ZJ, Pikaard CS. 1997.** Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & Development* **11**(16): 2124-2136.

- Christin PA, Besnard G, Samaritani E, Duvall MR, Hodkinson TR, Savolainen V, Salamin N. 2008.** Oligocene CO₂ decline promoted C-4 photosynthesis in grasses. *Current Biology* **18**(1): 37-43.
- Christin PA, Petitpierre B, Salamin N, Buchi L, Besnard G. 2009.** Evolution of C-4 Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Grasses, from Genotype to Phenotype. *Molecular Biology and Evolution* **26**(2): 357-365.
- Chung CH. 2006.** Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China. *Ecological Engineering* **27**(1): 49-57.
- Church SA, Spaulding EJ. 2009.** Gene Expression in a Wild Autopolyploid Sunflower Series. *Journal of Heredity* **100**(4): 491-495.
- Cifuentes M, Grandont L, Moore G, Chèvre A-M, Jenczewski E. 2010.** Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03084.x.
- Coba de la Pena T, Brown S. 2001.** In "Plant Cell Biology : a practical approach", *Oxford University Press Cytometry Hawes and Satiat-Jeunemaitre eds*, pp 85-107
- Comai L. 2000.** Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* **43**(2-3): 387-399.
- Comai L. 2005.** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**(11): 836-846.
- Comai L, Madlung A, Josefsson C, Tyagu A. 2003.** Do the different parental 'heteronomes' cause genomic shock in newly formed allopolyploids? *Philosophical Transactions of the Royal Society London B - Biological Sciences* **358**: 1149-1155.
- Conant GC, Wolfe KH. 2008.** Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics* **9**(12): 938-950.
- Cottet M, Montaudouin X, Blanchet H, Lebleu P. 2007.** *Spartina anglica* eradication experiment and in situ monitoring assess structuring strength of habitat complexity on marine macrofauna at high tidal level. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **71** (3):629-640.
- Covshoff S, Majeran W, Liu P, Kolkman JM, van Wijk KJ, Brutnell TP. 2008.** Deregulation of maize C-4 photosynthetic development in a mesophyll cell-defective mutant. *Plant Physiology* **146**(4): 1469-1481.
- Cui LY, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, dePamphilis CW. 2006.** Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* **16**(6): 738-749.

D

- Deloger M, Cavalli FMG, Lerat E, Biemont C, Sagot MF, Vieira C. 2009.** Identification of expressed transposable element insertions in the sequenced genome of *Drosophila melanogaster*. *Gene* **439**(1-2): 55-62.
- Dice, Lee R. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26** (3): 297-302
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF. 2008.** Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. *Annual Review of Genetics* **42**: 443-461.
- Duarte JM, Cui LY, Wall PK, Zhang Q, Zhang XH, Leebens-Mack J, Ma H, Altman N, dePamphilis CW. 2006.** Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution* **23**(2): 469-478.

E

- Eddy SF, Storey KB. 2008.** Comparative molecular physiological genomics. *Methods in Molecular Biology*: 81-110.
- Engelmann JC, Rahmann S, Wolf M, Schultz J, Fritzilas E, Kneitz S, Dandekar T, Muller T. 2009.** Modelling cross-hybridization on phylogenetic DNA microarrays increases the detection power of closely related species. *Molecular Ecology Resources* **9**(1): 83-93.
- Ewing B, Green P .1998.** Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8**: 186-194.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P .1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**: 175-185.

F

Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. 2002. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* **3**(5): 329-341.

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

Flagel L, Chen L, Chaudhary B, Wendel J. 2009. Coordinated and finescale control of homoeologous gene expression in allotetraploid cotton. *Journal of Heredity* **100**: 487-490.

Flagel L, Wendel J 2010. Evolutionary rate variation, genomic dominance, and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03107.x.

Fortuné PM, Schierenbeck KA, Ainouche AK, Jacquemin J, Wendel JF, Ainouche ML. 2007. Evolutionary dynamics of Waxy and the origin of hexaploid *Spartina* species (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**(3): 1040-1055.

Fortuné PM, Schierenbeck K, Ayres D, Bortolus A, Catrice O, Brown S, Ainouche ML. 2008. The enigmatic invasive *Spartina densiflora*: A history of hybridizations in a polyploidy context. *Molecular Ecology* **17**(19): 4304-4316.

Franks RG, Wang CX, Levin JZ, Liu ZC. 2002. SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* **129**(1): 253-263.

Foucaud. 1897. Un *Spartina* inédit. Annales de la Société de Sciences Naturelles Charente Inférieure **32**: 220-222.

Foucaud. 1894. *Spartina* × *neyrautii*, Bull. Soc. Sci. Nat. Charente-Inf

Freeling M. 2009. Bias in Plant Gene Content Following Different Sorts of Duplication: Tandem, Whole-Genome, Segmental, or by Transposition. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 433-453.

G

Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* **19**(11): 3403-3417.

Gaeta RT, Yoo S-Y, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC. 2009. Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70 mer Oligo Microarrays. *PLoS ONE* **4**: e4760.

Gerstein AC, Chun H-JE, Grant A, Otto SP. 2006. Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **2**(9): e145.

Gibson G, Weir B. 2005. The quantitative genetics of transcription. *Trends in Genetics* **21**(11): 616-623.

Gilad Y, Man O, Glusman G. 2005. A comparison of the human and chimpanzee olfactory receptor gene repertoires. *Genome Research* **15**(2): 224-230.

Goettel W, Messing J. 2009. Change of Gene Structure and Function by Non-Homologous End-Joining, Homologous Recombination, and Transposition of DNA. *Plos Genetics* **5**(6).

González J, Macpherson JM, Petrov DA. 2009. A recent adaptive transposable element insertion near highly conserved developmental loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* **26**(9), 1949-1061.

Gore M, Bradbury P, Hogers R, Kirst M, Verstege E, van Oeveren J, Peleman J, Buckler E, van Eijk M. 2007. Evaluation of target preparation methods for single-feature polymorphism detection in large complex plant genomes. *Crop Science* **47**(2): S135-S148.

Grandbastien MA. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* **3**(5): 181-187.

Grandbastien MA. 2010. Plant transposable elements and plasticity of host genomes: the stress connection. In Press for Genetics and epigenetics of Transgenerational Response to stress, Ed I. Kovalchuk, NovaScience Publishers, Inc., NY, USA

- Gray AJ, Benham PEM, Raybould AF. 1990.** *Spartina anglica* - the evolutionary and ecological background. In: Gray AJ and Benham PEM eds. *Spartina anglica - a research review*. Institute of Terrestrial Ecology, *Natural Environment Research Council* 5-10
- Gross BL, Turner KG, Rieseberg LH. 2007.** Selective sweeps in the homoploid hybrid species *Helianthus deserticola*: evolution in concert across populations and across origins. *Molecular Ecology* **16**(24): 5246-5258.
- Grover CE, Kim H, Wing RA, Paterson AH, Wendel JF. 2007.** Microcolinearity and genome evolution in the *Adha* region of diploid and polyploid cotton (*Gossypium*). *The Plant Journal* **50**: 995-1006
- Grover CE, Yu Y, Wing RA, Paterson AH, Wendel JF. 2008.** A phylogenetic analysis of indel dynamics in the cotton genus. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1415-1428.
- Groves H, Groves J. 1880.** *Spartina* × *townsendii* Nobis. *Report of the Botanical Society and Exchange Club of the British Isles* **1**: 37.
- Guo L, Lobenhofer EK, Wang C, Shippy R, Harris SC et al. 2006.** Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms', *Nature Biotechnology* **24**: 1162-1169.

H

- Hubbard JCE. 1968.** *Grasses, 2nd edn*. London, UK: Penguin Books.
- Hubbard JCE, Grimes BH, Marchant CJ. 1978.** Some observations on the ecology and taxonomy of *Spartina* × *neyrautii* and *Spartina alterniflora* growing in France and Spain and comparison with *Spartina* × *townsendii* and *Spartina anglica*. *Documents Phytosociologiques* **2**: 273-282.
- Ha M, Kim ED, Chen ZJ. 2009.** Duplicate genes increase expression diversity in closely related species and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(7): 2295-2300.
- Ha M, Li WH, Chen ZJ. 2007.** External factors accelerate expression divergence between duplicate genes. *Trends in Genetics* **23**(4): 162-166.
- Hacker SD, Heimer D, Hellquist CE, Reeder TG, Reeves B, Riordan Jr TJ, Dethier MN. 2001.** A marine plant (*Spartina anglica*) invades widely varying habitats: potential mechanisms of invasion and control. *Biol Invasions* **3**: 211-217
- Hammond MER, Cooper A. 2002.** *Spartina anglica* eradication and intertidal recovery in Northern Ireland estuaries. In: Veitch CR, Clout MN (eds) *Turning the tide: the eradication of invasive species*, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge UK, pp124-131
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, Edwards KJ, Abbott RJ, Hiscock SJ. 2008.** Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **363**(1506): 3055-3069.
- Hegarty MJ, Barker GL, Brennan AC, Edwards KJ, Abbott RJ, Hiscock SJ. 2009.** Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Molecular Ecology* **18**(5): 877-889.
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. 2006.** Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* **16**(16): 1652-1659.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ. 2008.** Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Current Biology* **18**(10): R435-R444.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ. 2009.** The complex nature of allopolyploid plant genomes. *Heredity* **103**(2): 100-101.
- Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA, Sanchez-Baracaldo P, Liu GQ, Buggs RJA, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. 2005.** Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Molecular Ecology* **14**(8): 2493-2510.
- Henry IM, Dilkes BP, Young K, Watson B, Wu H, Comai L. 2005.** Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics* **170**(4): 1979-1988.
- Hittel D, Storey KB. 2001.** Differential expression of adipose- and heart-type fatty acid binding proteins in hibernating ground squirrels. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1522**(3): 238-243.

- Hochholdinger F, Hoecker N. 2007.** Towards the molecular basis of heterosis. *Trends in Plant Science* **12**(9): 427-432.
- Holloway AK, Lawniczak MKN, Mezey JG, Begun DJ, Jones CD. 2007.** Adaptive gene expression divergence inferred from population genomics. *Plos Genetics* **3**(10): 2007-2013.
- Hovav R, Udall JA, Chaudhary B, Hovav E, Flagel L, Hu GJ, Wendel JF. 2008.** The evolution of spinnable cotton fiber entailed prolonged development and a novel metabolism. *Plos Genetics* **4**(2).

J

- Jaillon O, Aury JM, Noel B et al. 2007.** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**(7161): 463-U465.
- Jaenisch R, Bird A. 2003.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* **33**: 245-254.
- Ji W, Zhou WL, Gregg K, Yu N, Davis S. 2004.** A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research* **32**(11).
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR. 2004.** Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* **431**: 569-573.
- Josefsson C, Dilkes B, Comai L. 2006.** Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization. *Current Biology* **16**(13): 1322-1328.

K

- Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman AH. 2008.** Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(15): 5833-5838.
- Kammenga JE, Herman MA, Ouborg NJ, Johnson L, Breitling R. 2007.** Microarray challenges in ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **22**(5): 273-279.
- Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana JP, Tyagi AK, Kapoor S. 2008.** Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *Bmc Genomics* **9**.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002.** Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* **160**(4): 1651-1659.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003.** Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* **33**(1): 102-106.
- Kashkush K, Khasdan V. 2007.** Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes. *Genetics* **177**(4): 1975-1985.
- Kassahn KS. 2008a.** Microarrays for comparative and ecological genomics: beyond single-species applications of array technologies. *Journal of Fish Biology* **72**(9): 2407-2434.
- Khaitovich P, Hellmann I, Enard W, Nowick K, Leinweber M, Franz H, Weiss G, Lachmann M, Paabo S. 2005.** Parallel patterns of evolution in the genomes and transcriptomes of humans and chimpanzees. *Science* **309**(5742): 1850-1854.
- Khaitovich P, Muetzel B, She XW, Lachmann M, Hellmann I, Dietzsch J, Steigele S, Do HH, Weiss G, Enard W, Heissig F, Arendt T, Nieselt-Struwe K, Eichler EE, Paabo S. 2004.** Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains. *Genome Research* **14**(8): 1462-1473.
- Kirst M, Caldo R, Casati P, Tanimoto G, Walbot V, Wise RP, Buckler ES. 2006a.** Genetic diversity contribution to errors in short oligonucleotide microarray analysis. *Plant Biotechnology Journal* **4**(5): 489-498.
- King MC, Wilson AC. 1975.** Evolution at two levels in Humans and Chimpanzees. *Science* **188**: 107-116.
- Koch MA, Haubold B, Mitchell-Olds T. 2000.** Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1483-1498
- Kocsis MG, Hanson AD. 2000.** Biochemical evidence for two novel enzymes in the biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Spartina alterniflora*. *Plant Physiology* **123**(3): 1153-1161.

- Koyro HW. 2000.** Effect of high NaCl-salinity on plant growth, leaf morphology, and ion composition in leaf tissues of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* **74**(1-2): 67-73.
- Kumar A & Bennetzen JL. 1999.** Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 479-532.

L

- Lai Z, Nakazato T, Salmaso M, Burke JM, Tang SX, Knapp SJ, Rieseberg LH. 2005.** Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. *Genetics* **171**(1): 291-303.
- Lai Z, Gross B, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH. 2006.** Detecting differential gene expression in homoploid hybrid sunflower species using microarrays. *Molecular Ecology* **15**: 1213-1227.
- Larher F, Hamelin J, Steward GR. 1977.** L'acide diméthylsulphonium-3-propanoïque de *Spartina anglica*. *Phytochemistry* **16**, 2019-2020
- Lee HS, Chen ZJ. 2001.** Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(12): 6753-6758.
- Lee HS, Wang JL, Tian L, Jiang HM, Black MA, Madlung A, Watson B, Lukens L, Pires JC, Wang JJ, Comai L, Osborn TC, Doerge RW, Chen ZJ. 2004.** Sensitivity of 70-mer oligonucleotides and cDNAs for microarray analysis of gene expression in *Arabidopsis* and its related species. *Plant Biotechnology Journal* **2**(1): 45-57.
- Lemos B, Meiklejohn CD, Caceres M, Hartl DL. 2005.** Rates of divergence in gene expression profiles of primates, mice, and flies: Stabilizing selection and variability among functional categories. *Evolution* **59**(1): 126-137.
- Lexer C, Welch ME, Raymond O, Rieseberg LH. 2003.** The origin of ecological divergence in *Helianthus paradoxus* (Asteraceae): Selection on transgressive characters in a novel hybrid habitat. *Evolution* **57**(9): 1989-2000.
- Levy AA, Feldman M. 2004.** Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 607-613.
- Li HL, Zhi YB, An SQ, Zhao L, Zhou CF, Deng ZF, Gu SP. 2009.** Density-dependent effects on the dieback of exotic species *Spartina anglica* in coastal China. *Ecological Engineering* **35**(4): 544-552.
- Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Clarkson JJ, Grandbastien MA, Leitch AR. 2007.** Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. *New Phytologist* **175**(4): 756-763.
- Liu B, Vega J M, Segal G, Abbo S, Rodova M, Feldman M. 1998.** Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome* **41**(2): 272-277
- Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC, Wendel JF. 2001.** Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **44**(3): 321-330.
- Liu B, Wendel JF. 2000.** Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome* **43**(5): 874-880.
- Liu ZL, Adams KL. 2007** Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. *Current Biology* **17**: 1669-1674.
- Lockhart DJ, Winzeler EA. 2000.** Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**(6788): 827-836.
- Lockton S, Gaut BS. 2009.** The contribution of transposable elements to expressed coding sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Evolution* **68**: 80-89.
- Long SP, Incoll LD, Woolhouse HW. 1975.** C₄ photosynthesis in plants from cool temperate regions, with particular reference to *Spartina townsendii*. *Nature* **257**: 622-624.
- Long TA, Benfey PN. 2006.** Transcription factors and hormones: new insights into plant cell
- Lou Q, Chen J. 2007.** Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. *Genome* **50**(9):802-10.
- Lukens L, Zou F, Lydiate D, Parkin I, Osborn T. 2003.** Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**(1): 359-372.
- Lynch M, Force AG. 2000.** The origin of interspecific genomic incompatibility via gene duplication. *American Naturalist* **156**(6): 590-605.

M

- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. 2002.** Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiology* **129**(2): 733-746.
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang HM, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L. 2005.** Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant Journal* **41**(2): 221-230.
- Mallet J. 2007.** Hybrid speciation. *Nature* **446**(7133): 279-283.
- Marchant CJ. 1968.** Evolution in *Spartina* (Gramineae). II. Chromosomes, basic relationships and the problem of *Spartina x townsendii* agg. *Bot J Linn Soc* **60**: 381-409
- Marchant CJ. 1963.** Corrected chromosome numbers for *Spartina x townsendii* and its parent species. *Nature* **31**: 929.
- Marchant CJ. 1977.** Hybrid characteristics in *Spartina x neyrautii* Fouc., a taxon rediscovered in northern Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **74**: 289-296.
- Maricle BR, Crosier JJ, Bussiere BC, Lee RW. 2006.** Respiratory enzyme activities correlate with anoxia tolerance in saltmarsh grasses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **337**: 30-37
- Maricle BR, Lee RW. 2002.** Aerenchyma development and oxygen transport in the estuarine cordgrasses *Spartina alterniflora* and *S. anglica*. *Aquatic Botany* **74**: 109-120
- Maricle BR, Lee RW. 2007.** Root respiration and oxygen flux in salt marsh grasses from different elevational zones. *Marine Biology* **151**(2): 413-423.
- Maricle BR, Koteyeva NK, Voznesenskaya EV, Thomasson JR, Edwards GE. 2009.** Diversity in leaf anatomy, and stomatal distribution and conductance, between salt marsh and freshwater species in the C-4 genus *Spartina* (Poaceae). *New Phytologist* **184**(1): 216-233.
- Marmagne A, Brabant P, Thiellement H, Alix K. 2010.** Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03139.x
- Masterson J. 1994.** Stomatal size in fossil plants – evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**: 421-424.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. 1996.** Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **8**(9): 1505-1517.
- Matzke MA, Matzke AJM. 1998.** Polyploidy and transposons. *Trends in Ecology & Evolution* **13**(6): 241-241.
- McClintock B. 1984.** The significance of responses of the genome to challenge. *Science* **226**: 792-801.
- Mestiri I, Chagué V, Tanguy A.M, Huneau et al. 2010.** Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytologist*, doi 10.1111/j.1469-8137.2010.03186.x
- Mhiri C & Grandbastien M.-A. 2004.** Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale. In *La génomique en biologie végétale* (p. 377-402). INRA éditions.
- Mitchell-Olds T. 2001.** *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**(12): 693-700.
- Mobberley DG. 1956.** Taxonomy and distribution of the genus *Spartina*. *Iowa State Coll. J. Sci* **30**: 471-574.
- Mullholland MM, Otte ML. 2002.** The effects of nitrogen supply and salinity on DMSP, glycinebetaine and proline concentration in leaves of *Spartina anglica*. *Aquatic Botany* **72**: 193-200.

N

- Nasrallah JB, Liu P, Sherman-Broyles S, Schmidt R, Nasrallah ME. 2007.** Epigenetic mechanisms for breakdown of self-incompatibility in interspecific hybrids. *Genetics* **175**(4): 1965-1973.
- Nei M, Li W.H. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 5269-5273.
- Ni ZF, Kim ED, Ha MS, Lackey E, Liu JX, Zhang YR, Sun QX, Chen ZJ. 2009.** Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**(7227): 327 -U327.

Nicolas SD, Le Mignon G, Eber F, Coriton O, Monod H, Clouet V, Huteau V, LOSTANLEN A, Delourme R, Chalhoub B, Ryder CD, Chevre AM, Jenczewski E. 2007. Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that

O

Okamoto H, Hirochika H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science* 6(11): 527-534.

Ohno S. 1970. Evolution by gene duplication. *Springer-Verlag, New York*.

Osborn TC, Butrulle DV, Sharpe AG, Pickering KJ, Parkin IAP, Parker JS, Lydiate DJ. 2003a. Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in *Brassica napus*. *Genetics* 165(3): 1569-1577.

Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19(3): 141-147.

Oshlack A, Chabot AE, Smyth GK, Gilad Y. 2007. Using DNA microarrays to study gene expression in closely related species. *Bioinformatics* 23(10): 1235-1242.

Otte LM, Wilson G, Morris JM, Moran MB. 2004. Dimethylsulphopropionate (DMSP) and related compounds in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 55: 1919-1925.

Otto SP, Whitton J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401-437.

Ozkan H, Feldman M. 2001. Genotypic variation in tetraploid wheat affecting homoeologous pairing in hybrids with *Aegilops peregrina*. *Genome* 44(6): 1000-1006.

Ozkan H, Levy AA, Feldman M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* 13(8): 1735-1747.

Ozkan H, Tuna M, Arumuganathan K. 2003. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Journal of Heredity* 94(3): 260-264.

P

Parisod C, Salmon A, Zerjal T, Tenaillon M, Grandbastien MA, Ainouche M. 2009. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina*. *New Phytologist* 184: 1003-1015.

Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, Ainouche M, Chalhoub B, Grandbastien M-A. 2010. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03096.x

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010b. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03142

Paterson AH. 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica* 123(1-2): 191-196.

Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA. 2004. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9903-9908.

Paun O, Fay MF, Soltis DE, Chase MW. 2007. Genetic and epigenetic alterations after hybridization and genome doubling. *Taxon* 56(3): 649-656.

Paun O, Forest F, Fay MF, Chase MW. 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. *New Phytologist* 182(2): 507-518.

Pumphrey M, Bai J, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson O, Gill BS. 2009. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics* 181: 1147-1157.

Petit M, Guidat C, Daniel J, Denis E, Montoriol E, Bui Q.T, Lim K. Y, Kovarik A, Leitch AR, Grandbastien MA, Mhiri C. 2010. Mobilization of retrotransposons in synthetic allotetraploid tobacco. *New Phytologist*, doi 10.1111/j.1469-8137.2009.03140.x

Pires JC, Zhao JW, Schranz ME, Leon EJ, Quijada PA, Lukens LN, Osborn TC. 2004. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized Brassica polyploids (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 82(4): 675-688.

R

Ramsey J, Schemske DW. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467-501.

- Ranz JM, Machado CA. 2006.** Uncovering evolutionary patterns of gene expression using microarrays. *Trends in Ecology & Evolution* **21**(1): 29-37.
- Rapp RA, Udall JA, Wendel JF. 2009.** Genomic expression dominance in allopolyploids. *Bmc Biology* **7**.
- Rapp RA, Wendel JF. 2005.** Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* **168**(1): 81-91.
- Ralston EJ, English JJ, Dooner HK. 1988.** Sequence of three 603 *bronze* alleles of maize and correlation with the genetic fine-structure. *Genetics* **119**: 185-197.
- Reboreda R, Cacador I. 2007.** Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**(10): 1655-1661.
- Reboreda R, Cacador I. 2008.** Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*: Potential contribution for phytoremediation of metals. *Marine Environmental Research* **65**(1): 77-84.
- Renaut S, Nolte AW, Bernatchez L. 2009.** Gene Expression Divergence and Hybrid Misexpression between Lake Whitefish Species Pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae). *Molecular Biology and Evolution* **26**(4): 925-936.
- Renny-Byfield S, Ainouche M, Leitch IJ, Lim KY, Le Comber SC, Leitch AR. 2010.** Flow cytometry and GISH reveal mixed ploidy populations and *Spartina* nonaploids with genomes of *S. maritima* and *S. alterniflora*. *Annals of Botany*, doi: 10.1093/aob/mcq008
- Riddle NC, Birchler JA. 2003.** Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics* **19**(11): 597-600.
- Riddle NC, Birchler JA. 2008.** Comparative analysis of inbred and hybrid maize at the diploid and tetraploid levels. *Theoretical and Applied Genetics* **116**(4): 563-576.
- Riddle NC, Jiang HM, An LL, Doerge RW, Birchler JA. 2010.** Gene expression analysis at the intersection of ploidy and hybridity in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **120**(2): 341-353.
- Rieseberg LH. 1991.** Homoploid reticulate evolution in *Healiantus* (ASTERACEAE) – evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany* **78**(9): 1218-1237.
- Rieseberg LH. 1997.** Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**: 359-389.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK. 1999.** Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* **83**: 363-372.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C. 2003.** Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301**(5637): 1211-1216.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**(5840): 910-914.
- Rieseberg LH, Wood TE, Baack EJ. 2006.** The nature of plant species. *Nature* **440**(7083): 524-527.
- Rifkin SA, Kim J, White KP. 2003.** Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Nature Genetics* **33**(2): 138-144.
- S**
- Sabot F, Guyot R, Wicker T, Chantret N, Laubin B, Chalhoub B, Leroy P, Sourdille P, Bernard M. 2005.** Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations. *Molecular Genetics and Genomics* **274**(2): 119-130.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. 2005.** Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**(4): 1163-1175.
- Sanmiguel P, Bennetzen JL. 1998.** Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Annals of Botany* **82**: 37-44.
- Shi LM, Tong WD, Fang H, Scherf U, Han J. et al. 2005.** Cross-platform comparability of microarray technology: Intraplatform consistency and appropriate data analysis procedures are essential', *Bmc Informatics* **6**:S12.
- Schranz ME, Osborn TC. 2000.** Novel flowering time variation in the resynthesized polyploid *Brassica napus*. *Journal of Heredity* **91**(3): 242-246.
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. 2001.** Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* **13**(8): 1749-1759.

- Slotkin RK, Martienssen R. 2007.** Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics* **8**(4): 272-285.
- Soltis DE, Soltis PS, Pires JC, Kovarik A, Tate JA, Mavrodiev E. 2004.** Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 485-501.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561-588.
- Song KM, Lu P, Tang KL, Osborn TC. 1995** Rapid genome changes in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploidy evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(17): 7719-7723.
- Song W, Koh S, Czako M, Marton L, Drenkard E, Becker JM, Stacey G. 1997.** Antisense expression of the peptide transport gene AtPTR2-B delays flowering and arrests seed development in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Physiology* **114**(3): 927-935.
- Sousa AI, Lillebo AI, Cacador I, Pardal MA. 2008.** Contribution of *Spartina maritima* to the reduction of eutrophication in estuarine systems. *Environmental Pollution* **156**(3): 628-635.
- Stupar RM, Beaubien KA, Jin WW, Song JQ, Lee MK, Wu CC, Zhang HB, Han B, Jiang JM. 2006.** Structural diversity and differential transcription of the patatin multicopy gene family during potato tuber development. *Genetics* **172**(2): 1263-1275.
- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR, Jiang JM. 2007.** Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* **176**(4): 2055-2067.
- Stupar RM, Springer NM. 2006.** Cis-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F-1 hybrid. *Genetics* **173**(4): 2199-2210.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M et al. 2010.** The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist* doi 10.1111/j.1469-8137.2010.03182.x

T

- Tate JA, Joshi P, Soltis KA, Soltis PS, Soltis DE. 2009a.** On the road to diploidization? Homeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Bmc Plant Biology* **9**.
- Tate JA, Ni ZF, Scheen AC, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D, Chen ZJ, Soltis PS, Soltis DE. 2006.** Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* **173**(3): 1599-1611.
- Tate JA, Joshi P, Soltis KA, Soltis PS, Soltis DE. 2009a.** On the road to diploidization? Homeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Bmc Plant Biology* **9**.
- Tate JA, Symonds VV, Doust AN, Buggs RJA, Mavrodiev E, Majure LC, Soltis PS, Soltis DE. 2009b.** Synthetic polyploids of *Tragopogon Miscellus* and *T.-mirus* (Asteraceae): 60 years after ownbey's discovery. *American Journal of Botany* **96**(5): 979-988.
- Thomas BC, Pedersen B, Freeling M. 2006.** Following tetraploidy in an *Arabidopsis* ancestor, genes were removed preferentially from one homeolog leaving clusters enriched in dose-sensitive genes. *Genome Research* **16**(7): 934-946.
- Thompson JD, Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploidy plants - origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution* **7**(9): 302-307.
- Thompson JD, McNeilly T, Gray AJ. 1991.** Population variation in *Spartina anglica* C. E. Hubbard. I. Evidence from a common garden experiment. *New Phytologist* **117**: 115-128
- Tirosh I, Reikhav S, Levy AA, Barkai N. 2009.** A Yeast Hybrid Provides Insight into the Evolution of Gene Expression Regulation. *Science* **324**(5927): 659-662.
- Tirosh I, Weinberger A, Carmi M, Barkai N. 2006.** A genetic signature of interspecies variations in gene expression. *Nature Genetics* **38**(7): 830-834.
- Travers SE, Smith MD, Bai JF, Hulbert SH, Leach JE, Schnable PS, Knapp AK, Milliken GA, Fay PA, Saleh A, Garrett KA. 2007.** Ecological genomics: making the leap from model systems in the lab to native populations in the field. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**(1): 19-24.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. ‘Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 5116–5121.

U

Udall JA, Quijada PA, Polewicz H, Vogelzang R, Osborn TC. 2004. Phenotypic effects of introgressing Chinese winter and resynthesized *Brassica napus* L. germplasm into hybrid spring canola. *Crop Science* **44**(6): 1990–1996.

Udall JA, Flagel LE, Cheung F, Woodward AW, Hovav R, Rapp RA, Swanson JM, Lee JJ, Gingle AR, Nettleton D, Town CD, Chen ZJ, Wendel JF. 2007a. Spotted cotton oligonucleotide microarrays for gene expression analysis. *Bmc Genomics* **8**.

Udall JA, Quijada PA, Osborn TC. 2005. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* **169**(2): 967–979.

Udall JA, Swanson JM, Nettleton D, Percifield RJ, Wendel JF. 2006. A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy. *Genetics* **173**(3): 1823–1827.

Udall JA, Wendel JF. 2006. Polyploidy and crop improvement. *Crop Science* **46**: S3–S14.

Ueng PP, Hang A, Tsang H, Vega JM, Wang L, Burton CS, He FT, Liu B. 2000. Molecular analyses of a repetitive DNA sequence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* **43**(3): 556–563.

Ungerer MC, Baird SJE, Pan J, Rieseberg LH. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(20): 11757–11762.

V

Van de Peer, Y., Fawcett, J., Proost, S., Sterck, L., Vandepoele, K. 2009. The flowering world: a tale of duplications. *Trends Plant Science* **14** (12): 680–8.

Veitia RA, Bottani S, Birchler JA. 2008. Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends in Genetics* **24**(8): 390–397.

Vicent CM, Jaaskelainen MJ, Kalendar R, Schulman AH. 2001. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiology* **125**(3): 1283–1292.

Vicent CM, Kalendar R, Schulman AH. 2005. Variability, recombination, and mosaic evolution of the barley BARE-1 retrotransposon. *Journal of Molecular Evolution* **61**(3): 275–291.

Vicent CM, Suoniemi A, Anamthawat-Jonsson K, Tanskanen J, Beharav A, Nevo E, Schulman AH. 1999. Retrotransposon BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell* **11**(9): 1769–1784.

Voelckel C, Heenan PB, Janssen B, Reichelt M, Ford K, Hofmann R, Lockhart PJ. 2008. Transcriptional and biochemical signatures of divergence in natural populations of two species of New Zealand alpine *Pachycladon*. *Molecular Ecology* **17**(21): 4740–4753.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP – a new technique for DNA- FingerprintingN. *Nucleic Acids Research* **23**(21): 4407–4414.

W

Wang HB, Yu LJ, Lai F, Liu LS, Wang JF. 2005. Molecular evidence for asymmetric evolution of sister duplicated blocks after cereal polyploidy. *Plant Molecular Biology* **59**(1): 63–74

Wang JL, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ. 2004. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* **167**(4): 1961–1973.

Wang JL, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang HM, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ. 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* **172**(1): 507–517.

Wang J, Lee JJ, Tian L, Lee HS, Chen M, Rao S, Wei EN, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ. 2005. Methods for genome-wide analysis of gene expression changes in polyploids. *Methods Enzymol.* **395**:570–596

Wang L, Pinghua L, Thomas P. 2010. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. *Briefing In Functional Genomics*, doi:10.1093/bfgp/elp057

- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W. 1997.** Genetic distribution of *Bare-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by Sequence-Specific Amplification Polymorphisms (S-SAP). *Molecular & General Genetics* **253**: 687-694.
- Wendel JF. 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**(1): 225-249.
- Wendel JF, Curt B, and Tosak S. 2010.** The origin and evolution of *Gossypium*.. *Physiology of Cotton*. 1-18.
- Wendel JF, Doyle J 2005.** Polyploidy and evolution in plants. diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants. In: *Henry RJ, ed. Plant* Cambridge CA, USA: CABI Publishing, 97-117.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH. 2007.** A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* **8**: 973-982
- Witte CP, Le QH, Bureau T, Kumar A .2001.** Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:13778-13783.
- Wittkopp PJ, Haerum BK, Clark AG. 2004.** Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. *Nature* **430**(6995): 85-88.
- Wolfe KH. 2001.** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* **2**(5): 333-341.
- Wu LM, Ni ZF, Meng FR, Lin Z, Sun QX. 2003.** Cloning and characterization of leaf cDNAs that are differentially expressed between wheat hybrids and their parents. *Molecular Genetics and Genomics* **270**(3): 281-286.
- X**
- Xu YH, Zhong L, Wu XM, Fang XP, Wang JB. 2009.** Rapid alterations of gene expression and cytosine methylation in newly synthesized Brassica napus allopolyploids. *Planta* **229**(3): 471-483.
- Y**
- Yannic G, Baumel A, Ainouche M. 2004.** Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (Poaceae), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast. *Heredity* **93**(2): 182-188.
- Z**
- Zhang YY, Lai JB, Sun SH, Li Y, Liu YY, Liang LM, Chen MS, Xie Q. 2008.** Comparison analysis of transcripts from the halophyte *Thellungiella halophila*. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**(10): 1327-1335.
- Zhao XP, Si Y, Hanson RE, Crane CF, Price HJ, Stelly DM, Wendel JF, Paterson AH. 1998.** Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton.
- Zhuang Y, Adams KL. 2007.** Extensive allelic variation in gene expression in Populus F-1 hybrids. *Genetics* **177**: 1987-1996

Spéciation allopolyploïde et dynamique fonctionnelle du génome chez les Spartines

La spéciation est un mécanisme central de la diversification biologique. Ce travail vise à analyser l'évolution transcriptomique accompagnant la spéciation chez les spartines (Poaceae) qui jouent un rôle important dans la dynamique sédimentaire des marais salés. Ce genre est caractérisé par différents types de spéciation divergente et réticulée au niveau polyploïde. L'évolution du transcriptome par différentes analyses de polymorphisme et par microarrays a été analysée chez deux espèces sœurs hexaploïdes *S. maritima* (en régression en Europe) et *S. alterniflora* (envahissante). Malgré une faible divergence nucléotidique, ces deux espèces montrent des différences d'expression importantes. Les conséquences de l'hybridation et de la duplication du génome ont été examinées chez deux hybrides F1 (*S. x neyrautii* et *S. x townsendii*) formés récemment et indépendamment à partir des mêmes parents, et chez l'allopolyploïde envahissant *S. anglica*. Nos résultats ont montré les effets importants, mais différents de l'hybridation et de la duplication du génome sur le transcriptome. Cet effet se manifeste par une dominance d'expression maternelle (chez les hybrides F1) qui s'atténue chez l'allopolyploïde. Ce dernier se distingue par une sur-expression de la majorité des gènes. Les régions flanquant les éléments transposables *Ins2*, *Wis-like*, *Cassandra* apparaissent également affectées par cette dynamique. Les deux événements d'hybridation ont engendré des réponses différentes, en accord avec la morphologie très différente des hybrides. Les catégories de gènes différentiellement exprimées entre les espèces sont discutées dans le contexte des différences phénotypiques et écologiques de ces espèces.

Allopolyploid speciation and functional genome dynamics in *Spartina*

Speciation is a central process to biological diversification. In this study, transcriptome evolution following divergent and reticulate speciation at the polyploid level was examined in species from the genus *Spartina* (Poaceae) that play an important role in the salt marsh sedimentary dynamics. Transcriptomic changes were analysed using restriction polymorphisms and microarrays. Divergent speciation was examined between the two sister hexaploid species, the declining *S. maritima* from Western Europe and the invasive *S. alterniflora*. In spite of limited nucleotide divergence, these species exhibit consistent expression differences. The consequences of interspecific hybridisation and genome duplication were analysed in two recently and independently formed F1 hybrids (*S. x neyrautii* & *S. x townsendii*) sharing the same parents and in the invasive allopolyploid *S. anglica*. The results indicate significant, though different effects of hybridisation and genome duplication on the transcriptome, with maternal expression dominance in the F1 hybrids, that is attenuated in the allopolyploid which is characterized by overexpressed genes. Sequences flanking *Ins2*, *Wis-like*, *Cassandra* transposable elements seem to be affected by a similar dynamics. The two independent hybridisation events had different transcriptomic effects, in agreement with their different morphologies. The functional categories of the differentially expressed genes are discussed in the context of the phenotypic and ecological differences between the analysed species.