



HAL
open science

Evolution et Developpement des grains de pollen chez les angiospermes

Charlotte Prieu

► **To cite this version:**

Charlotte Prieu. Evolution et Developpement des grains de pollen chez les angiospermes. Evolution [q-bio.PE]. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS201 . tel-01282138

HAL Id: tel-01282138

<https://theses.hal.science/tel-01282138>

Submitted on 3 Mar 2016

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.

NNT : 2015SACLS201

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Charlotte Prieu

Évolution et développement des grains de pollen chez les angiospermes

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 8 décembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme Dufay Mathilde, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1,
Rapporteur

Mme Mignot Agnès, Professeur à l'Université Montpellier 2, Rapporteur

Mme Damerval Catherine, Directrice de Recherche au CNRS, Examineur, Présidente
du Jury

Mme Till-Bottraud Irène, Directrice de Recherche au CNRS, Examineur

Mme Albert Béatrice, Maître de Conférences à l'Université Paris Sud, Directeur de thèse

Mr Gouyon Pierre-Henri, Professeur au Museum National d'Histoire Naturelle,
Directeur de thèse



Titre : Évolution et développement des grains de pollen chez les angiospermes

Mots clés : pollen – apertures – microsporogénèse – contraintes développementales – sélection – pollen pantopore

Résumé : Chez les organismes pluricellulaires, la diversité morphologique observée à tous les niveaux est frappante, que ce soit au niveau de la taille, des couleurs, ou de la forme des individus, et des différentes parties qui les composent. La sélection naturelle, ainsi que les contraintes développementales, influencent l'évolution de ces différents attributs, sur le court terme comme sur le long terme. Le modèle choisi ici pour étudier l'évolution des formes est le grain de pollen des plantes à fleurs, qui présente une très grande diversité morphologique. Nous nous sommes focalisés sur un caractère morphologique, les apertures, qui sont des structures de la paroi du grain de pollen impliquées dans la survie et la reproduction. Nous avons étudié l'évolution des apertures à grande échelle taxonomique chez les angiospermes, et nous montrons que s'il existe de nombreuses variations, deux types principaux dominent : un pollen à une ouverture chez les Monocotylédones et les angiospermes divergeant à la base, et un pollen à trois ouvertures chez les Eudicotylédones. En étudiant la dominance du pollen à trois ouvertures, nous avons pu montrer que la stase chez les Eudicotylédones était vraisemblablement due à une sélection stabilisante plutôt qu'à des contraintes développementales. Nous avons également montré, grâce à l'utilisation de mutants de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, qu'un nombre d'ouvertures élevé est défavorable face à un stress osmotique, ce qui pourrait suggérer que les pollens triaperturés représentent un bon compromis entre survie et germination. Enfin, nous nous sommes intéressés à un type particulier de pollen possédant de nombreuses ouvertures, dont nous avons étudié la distribution chez les angiospermes. L'apparition de ce type de pollen est récurrente, mais il n'est que rarement fixé à grande échelle taxonomique, suggérant l'existence d'un mécanisme de sélection interphylétique éliminant ce type de pollen sur le long terme.

Title : Evolution and development of pollen grains in angiosperms

Keywords: pollen – apertures – microsporogenesis – developmental constraints – selection – pantoporate pollen

Abstract: Multicellular organisms are morphologically very diverse at every scale, regarding size, color, and shape of individuals and of their different parts. Natural selection and developmental constraints influence evolution of these characteristics, on the short term as well as on the long term. The model chosen here to study form evolution is the pollen grain of flowering plants, which is much diversified morphologically. We focused on specific features called apertures, which are structures of the pollen wall involved in survival and reproduction. We studied aperture evolution at large taxonomic scale in angiosperms, and we showed that in spite of variations, two main pollen types dominate: a pollen with one aperture in Monocots and early diverging angiosperms, and a pollen with three apertures in Eudicots. The study of this pattern showed that the stasis of triaperturate pollen in Eudicots is likely due to stabilizing selection rather than developmental constraints. Experiments on *Arabidopsis thaliana* mutants also revealed that an increase in aperture number was associated with lower resistance to osmotic stress. This result could suggest that triaperturate pollen grains represent a good trade-off between survival and germination. Moreover, we focused on a particular pollen type with many apertures, to determine its distribution in angiosperms. This type of pollen has many origins, however it is seldom fixed at large taxonomical scale, suggesting the intervention of lineage selection, eliminating this pollen type in the long run.

Remerciements

Tandis que la fin de mon doctorat approche, je m'aperçois que malgré ce que je pensais ces trois années sont passées très vite, notamment grâce aux gens avec qui j'ai travaillé, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Même si c'est mon nom qui figure en gros caractères sur la couverture de ce manuscrit, j'ai été très bien entourée au cours de ces quelques années.

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Béatrice et Pierre-Henri. Ils ont été présents tout au long de ma thèse (et même avant pour mes stages), et ont toujours été très encourageants. Un grand merci Béatrice pour ta disponibilité et ton soutien permanent, pour les petits bugs de Photoshop comme pour les phases un peu plus critiques. Tu as été une encadrante formidable, qui a su me laisser suffisamment d'autonomie tout en étant présente quand j'en avais besoin. Je souhaite de tout cœur aux étudiants hardis qui commencent un doctorat d'avoir un tel encadrement pendant leur thèse. Merci à toi Pierre-Henri pour ton éclairage scientifique toujours pertinent, et ta rigueur scientifique. J'ai énormément profité des discussions que nous avons pu avoir, qu'il s'agisse de théorie sur l'évolution ou de convention d'écriture en botanique. J'espère que nos collaborations futures seront aussi enrichissantes.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de participer à cette aventure, je suis consciente que ce genre de chose prend du temps, et je suis certaine que les échanges que nous allons avoir seront très productifs. Merci aux membres de mon comité de thèse (A. Ressayre, P. Grandcolas et I. Till-Bottraud), j'ai vraiment apprécié ces réunions qui ont toujours été très constructives. Ce travail n'aurait pas été le même sans vos précieuses remarques.

Je tiens également à remercier l'école doctorale Sciences du Végétal, notamment Jacqui et Martine, pour leur disponibilité et leur patience. Merci à tous les enseignants-chercheurs et enseignants avec qui j'ai effectué mon service, toujours avec beaucoup de plaisir : Hervé, Sophie et Bruno pour la botanique, Jaleh, Stéphane et Ludwig en écologie, Béatrice pour les stats, ainsi que tout l'équipe de la prépa agrég SV-STU d'Orsay, qui ont été pour moi des collègues formidables, depuis maintenant six ans : Hélène, Chrystelle, Samuel, Catherine, Christine, Patrick, Christian, Simon et Chadli.

Un grand merci aux deux équipes avec lesquelles j'ai eu le plaisir d'évoluer pendant ces quatre ans : l'ESE à Orsay et l'équipe de botanique au Muséum (avec une mention particulière pour les mycologues), même si les noms de toutes les personnes ne figurent pas ici. Une mention spéciale pour Marianne et Yann, chez qui j'ai toujours trouvé un tiroir rempli et des oreilles compatissantes, ainsi qu'un horoscope fiable, et pour Julien qui m'a aidée à comprendre que le rat taupe n'était pas si universel. Je remercie les doctorants, post-doctorants et étudiants que j'ai rencontrés, pour leur bonne humeur et leur soutien : Laëtitia, Stefan, Elizabeth, Anaëlle, Morgane, Julie, Aurélien, Jeanne, Zohreh et tous ceux que j'oublie ici... Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe EVA, notamment Odile et Sonia, ainsi que Sophie et Hervé, pour l'aide précieuse qu'ils ont su me donner au cours de ma thèse, et pour les nombreuses interactions scientifiques concernant l'enseignement aussi bien que la recherche. Merci à Christian, sans qui les travaux sur *Arabidopsis* n'auraient pas vu le jour, ainsi qu'à Lionel et Amandine pour leur aide. Merci à Antoine, pour tous les échanges que nous avons eus, et pour m'avoir accueillie dans son bureau avec mes plantes moribondes. Un grand merci à Joëlle, Manuela et Sandrine, grâce à qui j'ai passé de très bons moments au Muséum (dont une fête de Noël mémorable), et merci à Florian et Catherine pour les interactions que nous avons eues. Je remercie également mes collaborateurs, notamment Alexis.

La fin des remerciements est réservée à mon entourage personnel, qui m'a toujours soutenue : mes amis et ma famille, en particulier mon mari et mes filles, qui m'ont supportée et encouragée pendant ces quatre années.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 2 |
| I- Évolution du type apertural chez les angiospermes | 12 |
| 1 - La morphologie du pollen comme caractère d'intérêt en phylogénie | 12 |
| 2 - Reconstruction de l'évolution du type apertural : objectifs et méthodologie | 13 |
| 3 - Résultats obtenus en parcimonie sur un échantillon de 375 espèces | 14 |
| 4 - Conclusions sur l'évolution du type apertural chez les angiospermes | 29 |
| II- La dominance des pollens tricolpés chez les Eudicotylédones | 31 |
| 1 - La microsporogénèse des Eudicotylédones est sous sélection stabilisante | 31 |
| 2 - Effet du type apertural sur la résistance du grain de pollen à un stress osmotique chez <i>Arabidopsis</i> | 37 |
| III- Étude d'un type apertural particulier : les pollens pantoporés | 43 |
| 1 - Répartition taxonomique des pollens pantoporés | 43 |
| 2 - Un mécanisme de sélection interphylétique ? | 46 |
| 3 - Microsporogénèse chez les espèces pantoporées | 47 |
| Conclusion | 54 |
| Glossaire | 56 |
| Bibliographie | 57 |
| Annexes | |
| Annexe 1 : reconstruction de l'évolution de la morphologie florale chez les angiospermes | 61 |
| Annexe 2 : Evolutionary stasis in pollen morphogenesis due to natural selection | 62 |
| Annexe 3 : Aperture number influences pollen survival in <i>Arabidopsis</i> mutants | 82 |
| Annexe 4 : More than sixty origins of pantoporate pollen in angiosperms | 99 |
| Annexe 5 : Microsporogenesis in angiosperms producing pantoporate pollen | 116 |
| Annexe 6 : Microsporogenesis in species producing monoporate, tetraporate, monosulcate, disulcate, tricolporate, 10-colporate and syncolpate pollen grains | 126 |

Introduction

Le mot biodiversité, néologisme formé en 1992 lors du sommet de la Terre à Rio, est devenu un terme courant, grâce notamment à la crise que connaît cette biodiversité, et à sa médiatisation. Il est pourtant difficile de définir simplement cette notion, car la diversité du vivant recouvre de nombreuses échelles, et présente de nombreux aspects. On peut parler de diversité aussi bien à l'échelle génétique qu'à l'échelle écosystémique, et les processus contribuant à créer de la diversité au sein du vivant sont nombreux. Si l'on regarde les êtres vivants qui nous entourent (en nous focalisant donc uniquement sur les organismes macroscopiques), on peut voir que les Eucaryotes pluricellulaires présentent une infinité de formes et de modes de vie. Par exemple, l'Herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle compte huit millions de spécimens. Certes cela ne représente pas huit millions d'espèces, mais ce chiffre témoigne de l'incroyable diversité observée au sein des seules plantes terrestres.

Les naturalistes ont depuis longtemps répertorié les espèces et décrit leurs morphologies, mais l'accès à l'ADN et aux technologies de séquençage a peut être laissé un peu de côté ces aspects de la biologie. Pourtant, l'étude des formes est primordiale pour comprendre l'évolution des êtres vivants. La sélection naturelle a un effet à toutes les échelles, mais l'individu est une unité de sélection très importante. Les attributs visibles, comme la forme, la couleur et autres motifs sont soumis à la sélection naturelle et à la sélection sexuelle. Les processus sélectifs sont donc impliqués dans l'évolution de la morphologie, tout comme le développement, qui peut limiter ou favoriser l'apparition de certains types. L'étude du développement des organismes dans un contexte évolutif a permis la naissance d'une nouvelle discipline, l'Evo-Devo, avec de nombreuses retombées en biologie évolutive.

Le travail entrepris au cours de cette thèse vise à répondre à des questions sur l'évolution et le développement des formes, en prenant comme modèle d'étude le grain de pollen des angiospermes. Nous avons cherché à étudier l'évolution de la morphologie du pollen à grande échelle taxonomique, et à comprendre quels mécanismes pouvaient expliquer les observations tirées de cette étude. Nous avons ensuite étudié le développement du grain de pollen en lien avec la morphologie finale, et nous avons cherché à identifier les potentielles pressions de sélection qui pouvaient avoir un effet sur la valeur sélective du pollen. La suite de l'introduction présente plus en détail le groupe d'étude et le modèle choisi, ainsi que son intérêt.

- **Les angiospermes, un groupe de plantes terrestres très diversifié**

Les angiospermes sont le groupe de plantes terrestres le plus diversifié à l'heure actuelle. Ce clade comprend environ 265 000 espèces, qui ont toutes en commun le fait de produire des fleurs et des fruits. Les angiospermes sont cosmopolites, et ont colonisé tous types de milieux : on les retrouve bien sûr dans les écosystèmes terrestres, mais aussi en milieu aquatique (eau douce, milieu marin), dans les milieux arides (déserts chauds et froids, rochers...), et même sur d'autres plantes pour les espèces épiphytes. La plupart des espèces sont capables de faire la photosynthèse (qui existe sous diverses formes : C3, C4 et CAM), mais certaines espèces parasites ont perdu cette capacité et tirent l'intégralité des nutriments organiques de leur hôte. Les interactions développées par les angiospermes avec d'autres êtres vivants sont également nombreuses : on peut notamment citer la

pollinisation, la zoochorie, les mycorhizes, ainsi que toutes les interactions relevant du parasitisme (où la plante peut être hôte ou parasite, en fonction des cas), de l'herbivorie, de la symbiose (notamment bactérienne) etc.

Au niveau de la forme et du port, les angiospermes sont là aussi extrêmement diversifiées : on trouve aussi bien des arbres de grande taille que de petites herbacées, des lianes et des arbustes. La forme des feuilles, des fleurs ou des fruits est très variable en fonction des taxons. Historiquement, la plupart des auteurs se sont basés sur la morphologie florale pour établir un système de classification à grande échelle des angiospermes. Ces classifications ont, en partie, été mises à mal par les résultats obtenus en phylogénie moléculaire au cours des deux dernières décennies, même si la morphologie florale peut, selon les cas, contenir un bon signal phylogénétique.

La classification faisant actuellement consensus est résumée dans la figure 1 ci-dessous. La base de l'arbre a longtemps fait débat au sein des spécialistes, et la vision actuelle la plus partagée place le genre *Amborella* comme groupe frère du reste des angiospermes. Diverge ensuite l'ordre des Nymphéales, comprenant notamment les nénuphars, puis l'ordre des Austrobaileyales. Ces trois taxons sont parfois regroupés en un groupe paraphylétique, le grade ANA, pour des raisons de commodité. Le grand clade restant est appelé Mesangiospermes, et comprend un clade formé par les Magnoliidées et les Chloranthales, les Monocotylédones et les Eudicotylédones. Ces deux clades sont les deux principaux groupes en terme d'espèces : les Monocotylédones comprennent environ 62 000 espèces (soit un peu moins d'un quart du total), et les Eudicotylédones environ 195 000 (soit presque trois quarts du total).

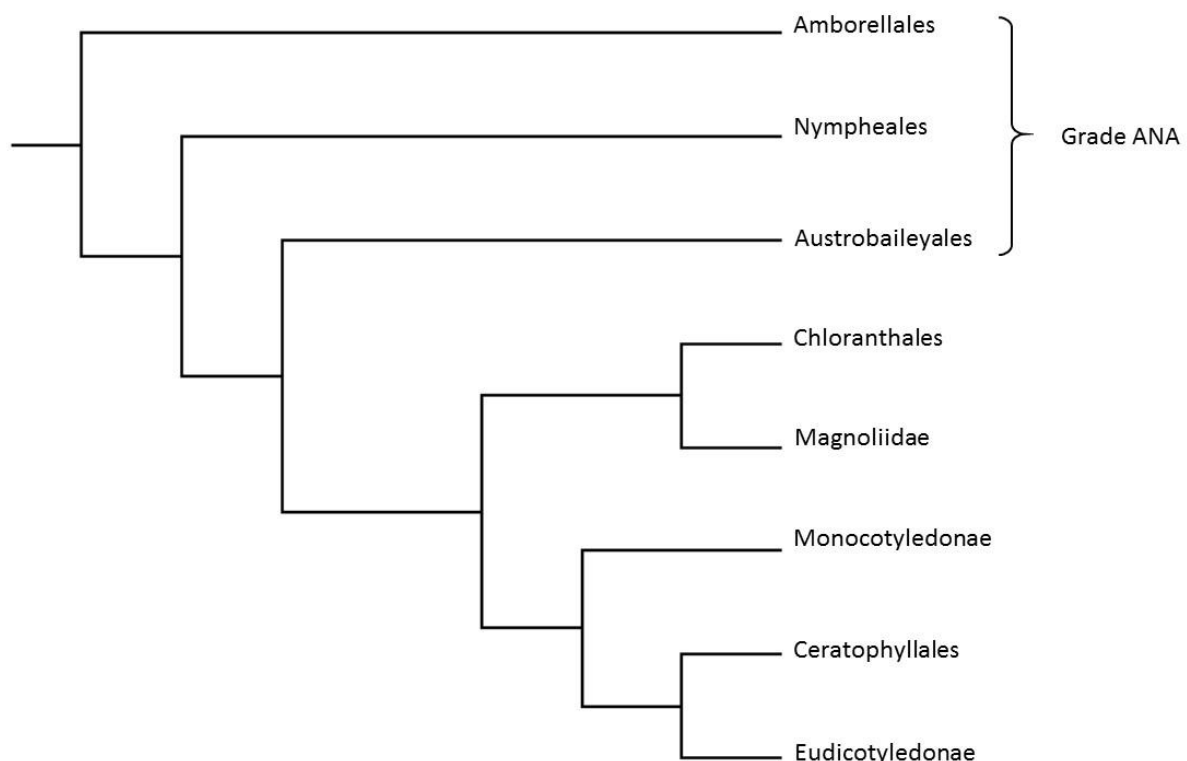


Figure 1 : arbre simplifié des angiospermes (d'après APG III).

- **Le grain de pollen et le type apertural chez les angiospermes**

Si, comme nous l'avons vu précédemment, les angiospermes sont très variées du point de vue de la morphologie, le pollen n'échappe pas à ce constat. Le grain de pollen, ou microgamétophyte, est un petit organisme haploïde, produit par le sporophyte lors de la reproduction. Chez les angiospermes, il comprend deux (ou parfois trois) cellules au moment de sa libération (voir figure 2 ci-dessous). Il est alors transporté (par un vecteur animal ou par le vent) sur le stigmate d'une autre fleur, où il va germer et produire un tube pollinique. Ce tube assurera la fécondation en transportant les gamètes mâles jusqu'à l'ovule, permettant ainsi la formation d'une graine.

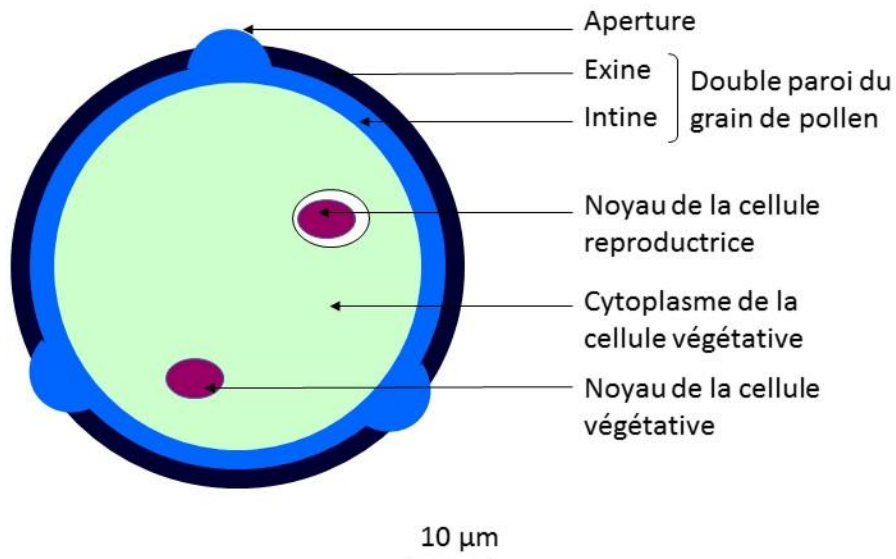


Figure 2 : coupe schématique d'un grain de pollen bicellulaire.

Le grain de pollen est donc une structure de dispersion et de reproduction. Il est doté d'une double paroi particulière (voir figures 2 et 3). La couche extérieure ou exine est constituée principalement de sporopollénine, un matériau extrêmement résistant. C'est une couche rigide, qui assure une protection mécanique, et une certaine imperméabilité. La sporopollénine est présente chez toutes les plantes terrestres (notamment dans les spores), et sa structure biochimique n'a que très peu varié depuis l'apparition du groupe (Fraser et al., 2012). Chez certaines espèces, l'exine est recouverte d'un manteau pollinique, de nature lipidique. La couche interne ou intine est de nature pecto-cellulosique, et est plus souple que l'exine. Elle fait surface au niveau des apertures, qui sont les sites de la paroi dépourvus d'exine. C'est au niveau des apertures que germe le tube pollinique, et que se font les échanges avec l'extérieur (échanges hydriques et respiration notamment ; voir Heslop-Harrison, 1979 ; Edlund et al., 2004). Les apertures ont également une fonction mécanique, dans la mesure où elles permettent l'accommodation des variations de volume, ou harmomécatie (Wodehouse, 1935; Payne, 1972). En effet, la rigidité de l'exine n'autorise que peu de déformations, et les apertures forment des zones plus souples capables d'ajuster la paroi face aux déformations.



Figure 3 : Détail de la paroi du grain de pollen

D'importantes variations de volume ont lieu *in vivo*, principalement avant l'anthèse et lors de la réhydratation sur le stigmate (Heslop-Harrison, 1979b). Après la méiose, les microspores vont se séparer et se différencier en grains de pollen. Avant l'ouverture des anthères, les grains de pollens vont subir une déshydratation poussée, perdant généralement 15 à 35 % d'eau cytoplasmique (Heslop-Harrison, 1979b; Nepi et al., 2001), mais davantage dans certains cas. Cette déshydratation s'accompagne d'une réduction de volume, et la paroi se replie le long des apertures (voir figure 4 ci-dessous). De même, quand le grain de pollen arrive sur un stigmate compatible, il se réhydrate et augmente de volume. Les transferts hydriques, associés à d'importantes variations de la taille du grain, sont donc un processus importants dans la vie du grain de pollen, nécessaires à la dispersion et à la germination du tube pollinique.

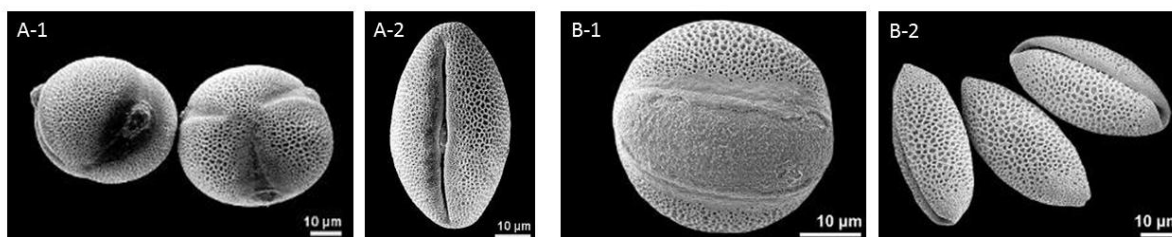


Figure 4 : déformations subies par la paroi lors d'une déshydratation du grain de pollen. A : *Bryonia dioica*, Cucurbitacée, possédant un pollen à trois apertures (Halbritter, 2005a). A-1 : pollen hydraté, A-2 : pollen déshydraté. B : *Butomus umbellatus*, Butomacée, possédant un pollen avec une seule ouverture (Halbritter, 2005b). B-1 : pollen hydraté, B-2 : pollen déshydraté.

Les apertures sont donc un élément clé de la paroi pollinique. Le type apertural est un caractère prenant en compte le nombre, la forme, et la disposition des apertures (Walker and Doyle, 1975). Le nombre d'apertures peut varier de zéro (pour les pollens inaperturés) à plus d'une centaine, même si la plupart des espèces ont un nombre d'apertures généralement inférieur ou égal à six. Les trois formes principales sont le sillon (figure 5B, 5D et 5G), que l'on nomme sulcus ou colpus en fonction de la position dans la tétrade, le pore (figure 5C et 5H), et le colpore (ou colporus), c'est-à-dire une association entre un colpus et un pore (figure 5E et 5F), qui est fréquent chez les Eudicotylédones. Il existe également des grains de pollen sans apertures (figure 5A), et des formes plus atypiques (chez les pollens spiraperturés par exemple, où un sillon parcourt la paroi de manière assez irrégulière). La disposition des apertures fait référence à la position occupée dans la tétrade (polaire ou équatoriale :

voir figure 6). Une tétrade de cellules se forme lors de la méiose mâle, qui va produire quatre microspores haploïdes. Ainsi, l'espèce *Butomus umbellatus* (figure 4-B) présente un seul sillon, en position distale dans la tétrade. On qualifie ce type apertural de monosulqué. L'espèce *Bryonia dioica* (figure 4-A) possède trois sillons équatoriaux, chaque sillon présentant un pore en son centre, ce qui correspond au type apertural tricolporé. Le vocabulaire palynologique est vaste, mais présente l'avantage de décrire précisément chaque type de configuration (voir glossaire p 56).

La figure 5 ci-dessous illustre une partie de la diversité des ouvertures observées chez les angiospermes. Nous voyons que le nombre, la forme, mais aussi la disposition des ouvertures sont variables : par exemple, chez les espèces tricolpées (figure 5D), tricolporées (figure 5E) et polycolporées (figure 5F), les ouvertures sont équatoriales (non visible sur des pollens isolés, mais visible dans la tétrade), tandis qu'elles sont réparties sur toute la surface du grain de pollen chez les espèces pantocolpées et pantoporées (figure 5G et 5H resp.).

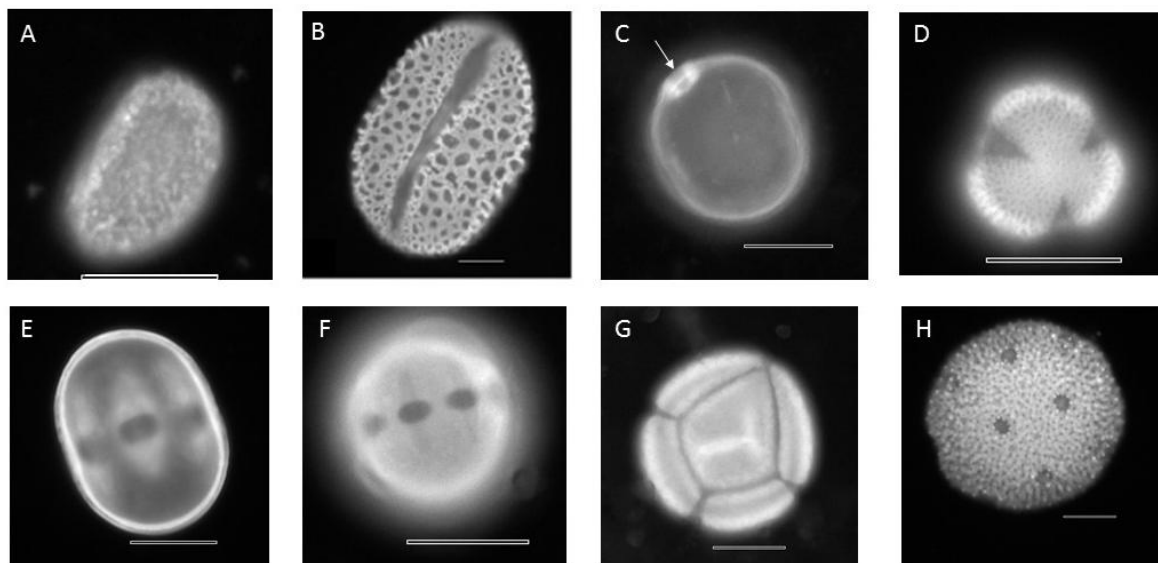


Figure 5 : diversité des types aperturaux chez les angiospermes. A : pollen inaperturé (*Orobanche hederæ*, Orobanchacée) ; B : pollen monosulqué (*Hemerocallis* sp., Asphodelacée) ; C : pollen monoporé (*Dactylis glomerata*, Poacée) ; D : pollen tricolpé (*Capsella bursa-pastoris*, Brassicacée) ; E : pollen tricolporé (*Vicia sepium*, Fabacée) ; F : pollen polycolporé (*Symphytum officinale*, Boraginacée) ; G : pollen pantocolpé (*Pseudofumaria alba*, Papaveracée) ; H : pollen pantoporé (*Saponaria officinalis*, Caryophyllacée). Microscopie à épifluorescence, avec autofluorescence de l'exine. Barre d'échelle : 10 µm.

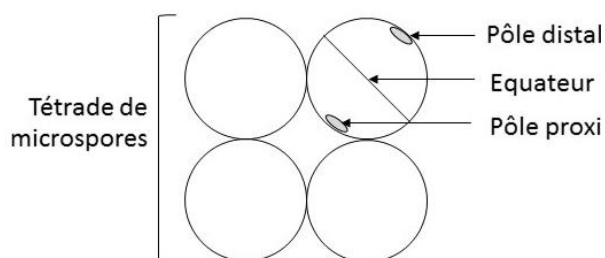


Figure 6 : position du pôle proximal, de l'équateur et du pôle distal dans une tétrade de microspores

Certaines espèces de plantes à fleurs produisent plusieurs types de pollen. Si ces pollens sont produits par des individus différents, on parle de polymorphisme ; c'est le cas notamment chez les espèces pratiquant l'hétérostylie (Mignot et al., 1994). Il existe aussi des espèces où les individus produisent plusieurs types de grains de pollen différents, on parle alors d'hétéromorphisme. C'est le cas pour certaines espèces de violettes, comme *Viola diversifolia*, dont les individus produisent des grains de pollen avec trois ou quatre ouvertures (Dajoz et al., 1991). Une étude chez 186 espèces d'Eudicotylédones a montré qu'un tiers des espèces étudiées étaient hétéromorphes concernant le pollen (Mignot et al., 1994). L'hétéromorphisme a également été documenté chez certaines espèces de Monocotylédones, par exemple dans la famille des Haemodoracées (Pierce and Simpson, 2009).

- **Détermination du type apertural lors de la microsporogénèse**

La microsporogénèse, ou méiose mâle des angiospermes, comprend l'ensemble des étapes permettant de passer d'une cellule mère diploïde à quatre microspores haploïdes, par l'intermédiaire de la méiose (voir figure 7 ci-dessous). Avant de se diviser, la cellule mère s'entoure d'une paroi de callose. Suivent alors la première et la deuxième division de méiose. Des parois de callose se forment entre les microspores, qui restent assemblées dans des tétrades avant que la callose ne soit dégradée à la fin de la microsporogénèse, libérant ainsi les microspores, qui constituent les futurs grains de pollen.

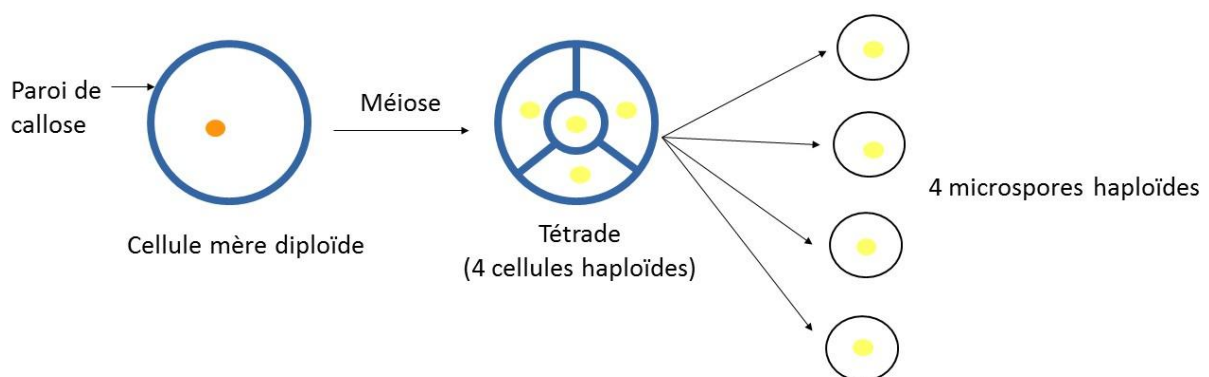


Figure 7 : représentation schématique de la microsporogénèse chez les angiospermes. Orange : noyau diploïde, jaune : noyau haploïde.

Il a été proposé depuis un certain temps que les ouvertures se forment au niveau des derniers points de contact entre les microspores (Wodehouse, 1935). Cette hypothèse repose notamment sur l'observation de tétrades figées, où on voit nettement des sortes de ponts entre les microspores. Ces ponts correspondent à la position des futures ouvertures. A. Ressayre et ses collaborateurs (Ressayre et al., 2002) ont proposé un modèle où la position des derniers points de contact dépend de certains paramètres de la microsporogénèse, à savoir le type de cytokinèse, le mode de dépôt de la callose lors de la formation des parois entre les microspores, et la forme des tétrades (voir figures 8 et 9 ci-dessous). Ce modèle est basé sur une approche physique de la formation des parois de callose, et permet de prédire la position des derniers points de contact. Il prend en compte les trois paramètres

énoncés ci-dessus, ainsi que la disposition groupé ou polaire des apertures. Les apertures groupées se forment directement au niveau des derniers points de contact, tandis que les apertures polaires sont centrées sur le pôle, mais orientées vers les derniers points de contact.

Lors de la microsporogénèse (voir figure 8), des parois de callose se forment entre les microspores, mais ces parois (ou plans) peuvent se former de manière successive ou simultanée : dans le cas d'une cytokinèse successive, une première paroi se forme après la première caryocinèse, puis une deuxième paroi après la deuxième caryocinèse. On passe alors par un stade de dyade. Dans le cas d'une cytokinèse simultanée, toutes les parois se forment en même temps, après la deuxième caryocinèse. Le mode de dépôt de la callose lors de la cytokinèse peut être centripète ou centrifuge, et la croissance de la callose peut se faire le long des plans de division, ou le long des bordures de la tétrade (figure 8). Enfin, il existe diverses formes de tétrades, les plus fréquentes étant les tétrades tétraédriques, tétraogonales, rhomboïdales et décussées, même si certaines formes plus rares peuvent être observées (linéaires, tétrades en T ou en Z...).

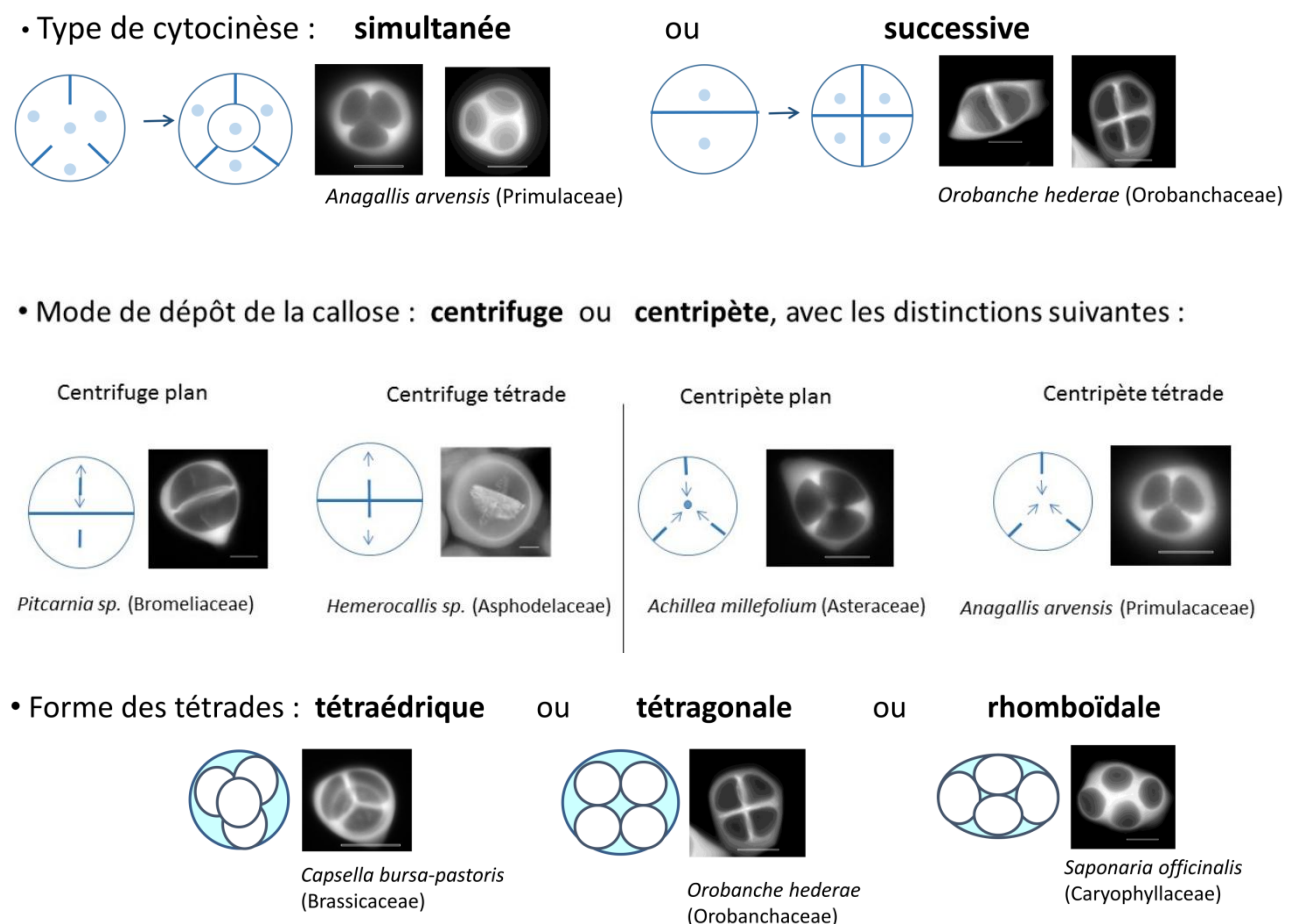


Figure 8 : cytokinèse, mode de dépôt de la callose et forme des tétrades chez les angiospermes

Ce modèle ontogénique a été validé dans un certain nombre de cas. Par exemple, la majorité des Eudicotylédones ont une cytokinèse simultanée, une croissance de la callose centripète et des tétrades tétraédriques. Le modèle prédit un pollen à trois apertures équatoriales (figure 9), ce qui est de fait la morphologie la plus répandue chez les Eudicotylédones. De plus, chez les mutants *tam*

d'*Arabidopsis* où la cytokinèse est successive et non simultanée, le pollen présente trois ouvertures avec une disposition anormale. L'observation de la microsporogénèse chez ce mutant montre que la disposition anormale est due au type de cytokinèse (Albert et al., 2011). Ce modèle ontogénique permet donc d'expliquer la détermination du type apertural lors de la microsporogénèse dans la grande majorité des cas.

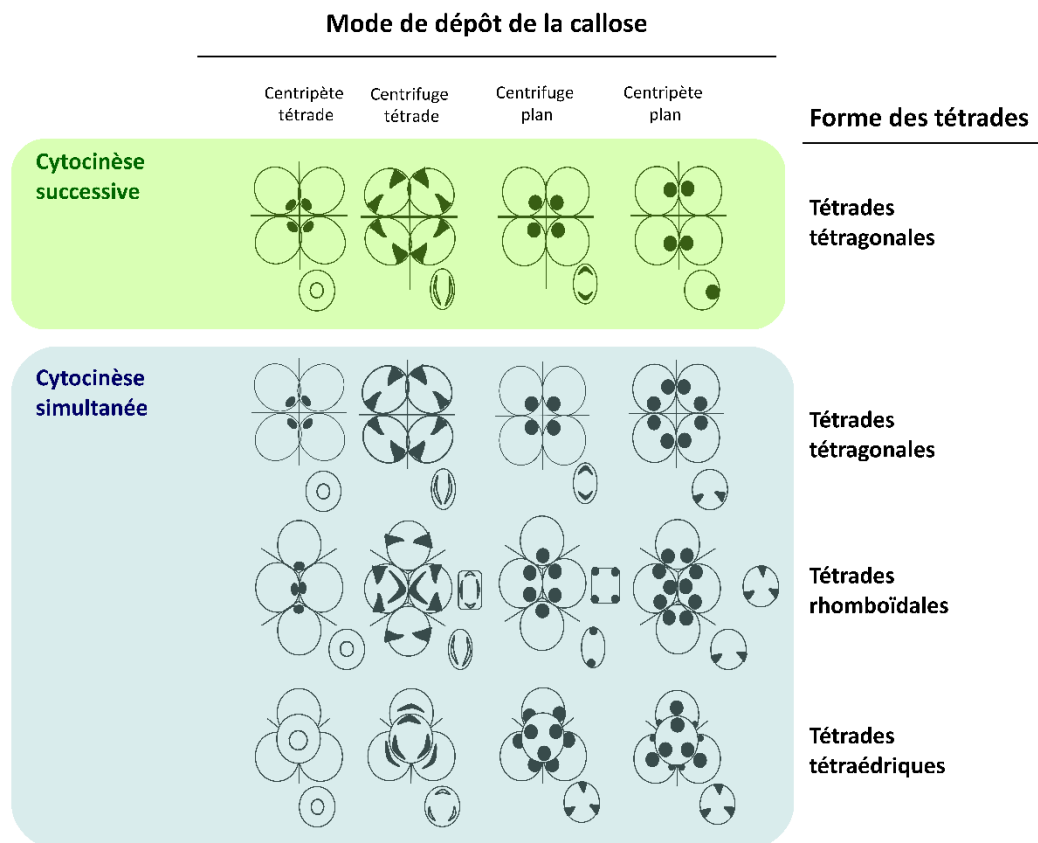


Figure 9 : modèle ontogénique de détermination des ouvertures, dans le cas d'ouvertures groupées (modifié d'après Ressayre 2002). Les cas en vert correspondent à une cytokinèse successive, les cas en bleu à une cytokinèse simultanée. Les lignes indiquées à gauche correspondent à différentes formes de tétrades, et les colonnes représentent différents modes de dépôt de la callose.

Nous avons jusqu'ici présenté un modèle de détermination des ouvertures, c'est à dire un modèle qui permet d'expliquer comment la position et le nombre des ouvertures sont définis au cours du développement ; ce modèle n'explique pas la formation en soi de ces structures. La détermination et la formation des ouvertures sont des processus qui peuvent être *a priori* différents, et qui ne font pas nécessairement intervenir les mêmes acteurs moléculaires. La formation des ouvertures est assez peu étudiée, contrairement à la formation de l'exine qui a fait l'objet de nombreuses études (voir les revues bibliographiques suivantes : Blackmore et al., 2007; Ariizumi and Toriyama, 2011). Des travaux récents menés sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (dont le type sauvage produit du pollen tricolpé) ont mis en évidence le rôle d'une nouvelle protéine, baptisée INP1, qui n'a pas d'autre fonction connue (Dobritsa et al., 2011; Dobritsa and Coerper, 2012). Quand le gène correspondant est muté, le pollen produit par la plante ne possède pas d'ouvertures, et le niveau d'expression de la protéine est corrélé à la longueur des sillons (un niveau plus faible entraînant une réduction de la longueur des ouvertures ; voir Dobritsa and Coerper, 2012). Cette protéine se localise au niveau des

futurs sites aperturaux au stade tétrade. Si INP1 semble impliquée dans la formation des apertures, son mode de fonctionnement demeure pour le moment mystérieux : on ne sait pas par exemple comment elle inhibe la polymérisation de sporopollénine aux endroits où elle est présente.

- **Le type apertural est soumis à différentes pressions de sélection**

Le grain de pollen a déjà fait l'objet d'études sur la valeur sélective, par exemple chez des espèces du genre *Viola*. Certaines espèces de violettes sont hétéromorphes, c'est-à-dire qu'elles produisent plusieurs types de grains de pollen. *Viola diversifolia* produit du pollen avec trois ou quatre apertures, et ces pollens n'ont pas les mêmes caractéristiques : les pollens à trois apertures ont une plus grande longévité que les pollens à quatre apertures, mais ces derniers germent plus rapidement sur le stigmate (Dajoz et al., 1991). Il semble donc exister un compromis entre la survie et la reproduction, et le fait de produire plusieurs types de grains de pollen permettrait de combiner plusieurs stratégies de reproduction. Le cas d'une autre espèce de violette, *Viola calcarata*, est éclairant sur ce sujet : cette espèce produit du pollen à quatre ou cinq apertures, le pollen à quatre apertures survivant plus longtemps que le pollen à cinq apertures (qui germe cependant plus vite ; voir Till-Bottraud et al., 1999). Les proportions de ces deux morphes varient avec l'altitude, les pollens à quatre apertures étant plus fréquents à haute altitude qu'à faible altitude (et inversement pour les pollens à cinq apertures). Cette observation peut être reliée au fait que les pollinisateurs sont plus rares à haute altitude, où il peut être avantageux de produire un pollen qui survit longtemps pour pallier les aléas de la pollinisation ; en revanche, dans un environnement où les pollinisateurs sont nombreux, et la pollinisation moins incertaine, il peut être avantageux de produire un pollen qui germe rapidement, et qui aura un avantage compétitif sur ses concurrents. Ces observations sont en accord avec des modèles de théorie des jeux, qui montrent que l'hétéromorphisme peut être une stratégie évolutivement stable dans un certain nombre de conditions (Till-Bottraud et al., 2001). Le fait de produire plusieurs types de pollen, chaque type étant adapté à des conditions environnementales particulières, pourrait être avantageux à long terme, et expliquer le taux d'hétéromorphisme élevé chez les plantes à fleurs (Mignot et al., 1994).

- **Intérêt du grain de pollen comme modèle d'étude**

Le grain de pollen est un bon modèle pour étudier les processus évolutifs, le développement, et les interactions entre ces deux composantes de la morphologie, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le pollen et les microspores constituent un matériel facile à prélever et à conserver. Concernant les prélèvements en milieu naturel, la quantité de matériel est en général largement suffisante pour les besoins de l'étude, ce qui n'est cependant pas toujours le cas pour les prélèvements en jardins botaniques. L'observation du pollen et de la microsporogénèse sont également simples à réaliser au microscope. De plus, il existe une quantité extraordinaire de données sur la morphologie du pollen (voir par exemple Erdtman, 1952; PalDat, 2015). Les grains de pollen ont depuis longtemps retenu l'attention des botanistes, et la littérature ancienne et récente sur les différentes formes de pollen représente une mine d'informations facilement accessible. De plus, l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle contient une palynothèque qui est une source de matériel et de connaissances importante. Si il peut être laborieux de faire des recherches

systematiques en utilisant des articles ou des livres, la mise en place de la base de données en ligne PalDat facilite les recherches selon divers critères (forme, taxonomie, type de réserves...).

Le pollen est impliqué dans la reproduction, et est donc potentiellement soumis à de fortes pressions de sélection. Si on se focalise sur le type apertural, nous avons vu que les apertures jouaient un rôle important dans la survie du grain de pollen, ainsi que dans la mise en place du tube pollinique (Edlund et al., 2004). Ce caractère est donc probablement soumis à sélection. De plus, le type apertural présente une certaine diversité chez les angiospermes, et il est intéressant d'étudier cette variation. Enfin, nous avons vu qu'il existait un modèle ontogénique de détermination des apertures au cours de la microsporogénèse (Ressayre et al., 2002), c'est à dire un modèle permettant de faire le lien entre les différentes étapes du développement et la morphologie finale. L'étude du type apertural permet donc une étude combinée des processus évolutifs et développementaux. Ce modèle ontogénique permet également de construire un espace représentant les formes possibles et les formes réalisées dans le cas du type apertural et de la microsporogénèse. Il peut alors être intéressant de voir quelle proportion des formes possibles sont effectivement produites, et d'étudier les éventuels biais observés, ce qui peut être l'indice de contraintes par exemple.

Nous avons vu qu'au sein des angiospermes, les grains de pollen présentaient une grande diversité morphologique, et le type apertural n'échappe pas à ce constat. C'est un caractère impliqué dans la survie et la reproduction, et dont la détermination au cours du développement est connue. On peut alors s'interroger sur les processus impliqués dans l'évolution du type apertural chez les angiospermes : comment a évolué le type apertural au cours de l'histoire évolutive des angiospermes ? Quelle est la part de la sélection, et sur quelles aptitudes joue-t-elle exactement ? Quelle est la part des contraintes développementales ?

Le présent manuscrit se propose de donner quelques pistes pour répondre à ces questions, en commençant par une reconstruction de l'évolution du type apertural à grande échelle taxonomique chez les angiospermes. Les résultats obtenus dans cette partie mettent en évidence la dominance de deux types aperturaux distincts, et pour l'un de ces deux types nous nous intéressons aux contributions respectives de la sélection et des contraintes développementales sur cette dominance, ce qui fait l'objet du deuxième chapitre. En marge des deux types aperturaux principaux, il existe néanmoins des pollens présentant d'autres morphologies. Nous nous intéressons dans le dernier chapitre à l'origine et à la nature de la variation par rapport aux deux types dominants, en étudiant un cas particulier de morphologie pollinique, qui correspond aux pollens présentant de multiples apertures en forme de pores (ou pollens pantoporés).

I- Évolution du type apertural chez les angiospermes

Nous allons dans cette première partie présenter les grandes lignes de l'histoire évolutive du type apertural chez les angiospermes, avant de nous interroger sur les facteurs influençant l'évolution de ce caractère (contraintes développementales, sélection) dans la suite du manuscrit.

1°/ La morphologie du pollen comme caractère d'intérêt en phylogénie

Les relations entre les différents groupes d'angiospermes d'une part, et entre les angiospermes et les autres plantes à graines (ou spermaphytes) d'autre part ont longtemps fait l'objet de débats. Si la topologie générale de l'arbre des angiospermes (voir figure 1) est globalement acceptée (même si la position de certaines familles pose encore problème), les relations entre les plantes à graines ne sont pas entièrement résolues. Il semblerait que les angiospermes constituent le groupe frère des autres spermaphytes actuelles, mais il est possible que ce point de vue soit remis en question.

Afin de démêler les relations de parenté au sein des spermaphytes, et au sein des angiospermes, les botanistes se sont depuis un certain temps intéressés aux caractères morphologiques des grains de pollens, qui présentent notamment l'avantage de bien se fossiliser. Walker et Doyle en 1975 se sont appliqués à définir un certain nombre de caractères au niveau du pollen, concernant les ouvertures, la forme du grain, la structure de l'exine notamment (Walker and Doyle, 1975), et ont interprété l'évolution de ces caractères avec les classifications utilisées à l'époque (Cronquist et Takhtajan), reconnaissant ainsi deux groupes distincts : les espèces produisant du pollen monosulqué (Monocotylédones, Magnoliidées), et les espèces produisant du pollen tricolpé (dicotylédones non Magnoliidées, avec des exceptions comme certaines Illiciacées), le pollen monosulqué étant vraisemblablement ancestral. Une quinzaine d'années plus tard, de nouvelles analyses, utilisant la méthode cladistique, ont mis en évidence l'existence d'un clade de dicotylédones produisant du pollen tricolpé (Donoghue and Doyle, 1989), le pollen à trois ouvertures présent chez les Magnoliidées étant alors interprété comme une convergence (ce qui est confirmé par des observations développementales, les ouvertures n'ayant pas le même arrangement dans la tétrade). On retrouve, comme supposé auparavant, que l'état ancestral correspond à un pollen monosulqué. Le clade des dicotylédones tricolpées a ensuite été rebaptisé Eudicotylédones (Doyle and Hotton, 1991). D'autres caractères informatifs ont été mis en évidence, par exemple il apparaît que l'exine des angiospermes a une structure particulière, ce qui constitue une synapomorphie du groupe (on parle d'exine columellée).

Ces travaux ont mis en évidence le fait que les caractères morphologiques des grains de pollen sont des caractères informatifs du point de vue phylogénétique. Le type apertural ancestral est monosulqué, et le pollen tricolpé des Eudicotylédones (c'est-à-dire d'un groupe représentant presque trois quarts des espèces d'angiospermes) est une synapomorphie du groupe. D'autres analyses ont été effectuées depuis, qui visent à reconstruire l'évolution des caractères du pollen sur des arbres obtenus à partir de données moléculaires. La démarche est différente, dans la mesure où les arbres ne sont pas obtenus de la même façon. On peut citer le travail de Doyle en 2005, qui étudie l'évolution de caractères polliniques en parcimonie sur un arbre des angiospermes comprenant une cinquantaine de taxons (Doyle, 2005). Au niveau des ouvertures, on retrouve les

résultats énoncés plus haut. Une autre étude plus récente s'intéresse à l'évolution des caractères morphologiques du pollen en utilisant la classification de référence APGIII (Lu et al., 2015; Wortley et al., 2015). Le premier article de cette série s'intéresse à des aspects méthodologiques, et définit les caractères ainsi que les méthodes à tester (parcimonie, maximum de vraisemblance et inférence bayésienne, les méthodes probabilistes n'ayant jamais encore été utilisées sur le pollen à cette échelle taxonomique : voir Wortley et al., 2015). Une trentaine de caractères, portant sur les ouvertures mais également sur d'autres aspects du pollen, sont proposés. Le deuxième article de cette série présente les premiers résultats obtenus sur les angiospermes divergeant à la base de l'arbre (principalement le grade ANA et les Magnoliidées, avec environ 80 taxons : voir Lu et al., 2015). Les synapomorphies potentielles de chaque groupe sont discutées. Au niveau des ouvertures, on voit par exemple qu'un pollen inaperturé pourrait être une synapomorphie des Laurales (il existe des pollens inaperturés chez d'autres groupes, qui sont des acquisitions indépendantes).

2°/ Reconstruction de l'évolution du type apertural : objectifs et méthodologie

Notre objectif initial était de reconstruire l'évolution du type apertural chez les angiospermes, à grande échelle taxonomique. Nous voulons pour cela utiliser un arbre moléculaire des angiospermes, qui permet de faire des reconstructions en parcimonie mais aussi en utilisant des méthodes probabilistes (maximum de vraisemblance et inférence bayésienne). Ces méthodes permettent de modéliser l'évolution des caractères, et de prendre en compte la longueur des branches. Ainsi, en parcimonie, une transition sur une branche basale (qui a donc un temps de divergence très long) a le même poids qu'une transition sur une branche apicale (où le temps de divergence est plus court). Les méthodes probabilistes permettent d'intégrer le fait qu'une transformation sur une longue durée est plus probable que sur une courte durée. Elles permettent aussi de lever certaines ambiguïtés obtenues en parcimonie. Nous avons choisi d'utiliser un arbre moléculaire réalisé pour une étude de datation des principaux groupes d'angiospermes, qui comprend environ 800 espèces (Magallón et al., 2015). Par rapport aux études précédentes, et notamment à celles publiées en 2015 (Lu et al., 2015; Wortley et al., 2015), nous avons l'avantage de prendre en compte un très grand nombre d'espèces, et de couvrir tous les ordres, ainsi que presque toutes les familles d'angiospermes. Nous nous intéressons cependant à un très faible nombre de caractères comparé à ces études, puisque nous nous focalisons sur les ouvertures, alors que les autres articles détaillent la forme et la taille du pollen, la structure de l'exine etc...

Ce travail n'a pas pu être terminé avant la fin de la thèse. Sur les 792 espèces de plantes à fleurs de l'arbre phylogénétique utilisé, nous avons déterminé le type apertural pour 375 espèces (374 angiospermes et un groupe extérieur, représenté par le ginkgo), soit près de la moitié, grâce à des données bibliographiques. 58 ordres sont représentés (sur les 61 que comptent les angiospermes), et nous totalisons 255 familles, soit plus de la moitié des familles d'angiospermes (qui en possèdent 413 au total). Il n'y a pas de biais taxonomique, tous les principaux clades d'angiospermes étant représentés. Pour chaque espèce le nombre et la forme de l'ouverture (pore, sillon, sillon et pore) ont été renseignés. Comme cette étude n'est pas encore finie, nous présentons seulement les résultats

obtenus en parcimonie grâce au logiciel Mesquite (Maddison and Maddison, 2011). Une fois le jeu de données complété, nous prévoyons d'utiliser des méthodes probabilistes.

3°/ Résultats obtenus en parcimonie sur un échantillon de 375 espèces

Avant de présenter les résultats pour chaque groupe, nous pouvons remarquer que l'arbre global (figure 10, et concaténation des figures 11 à 15) se structure principalement en deux parties : la première comprend le grade ANA à la base de l'arbre, le clade formé par les Chloranthales et les Magnoliidées, et les Monocotylédones. Dans ce groupe, les pollens possédant une seule ouverture en forme de sillon sont les plus répandus. La deuxième partie est constituée par le clade des Eudicotylédones, qui possèdent en grande majorité un pollen à trois ouvertures, généralement en forme de sillon présentant un pore en son centre (colporus). L'acquisition du pollen triaperturé constitue une synapomorphie de ce grand clade (figure 10 page suivante). Les Pentapétales, indiquées en figure 10, constituent un clade regroupant la grande majorité des Eudicotylédones.

Les reconstructions en parcimonie sur ce jeu de données indiquent 65 transitions concernant le nombre d'ouvertures, et 93 transitions au niveau de la forme de l'ouverture. Il semble donc que le type d'ouverture (sillon, colporus ou pore) soit un caractère plus variable que le nombre.

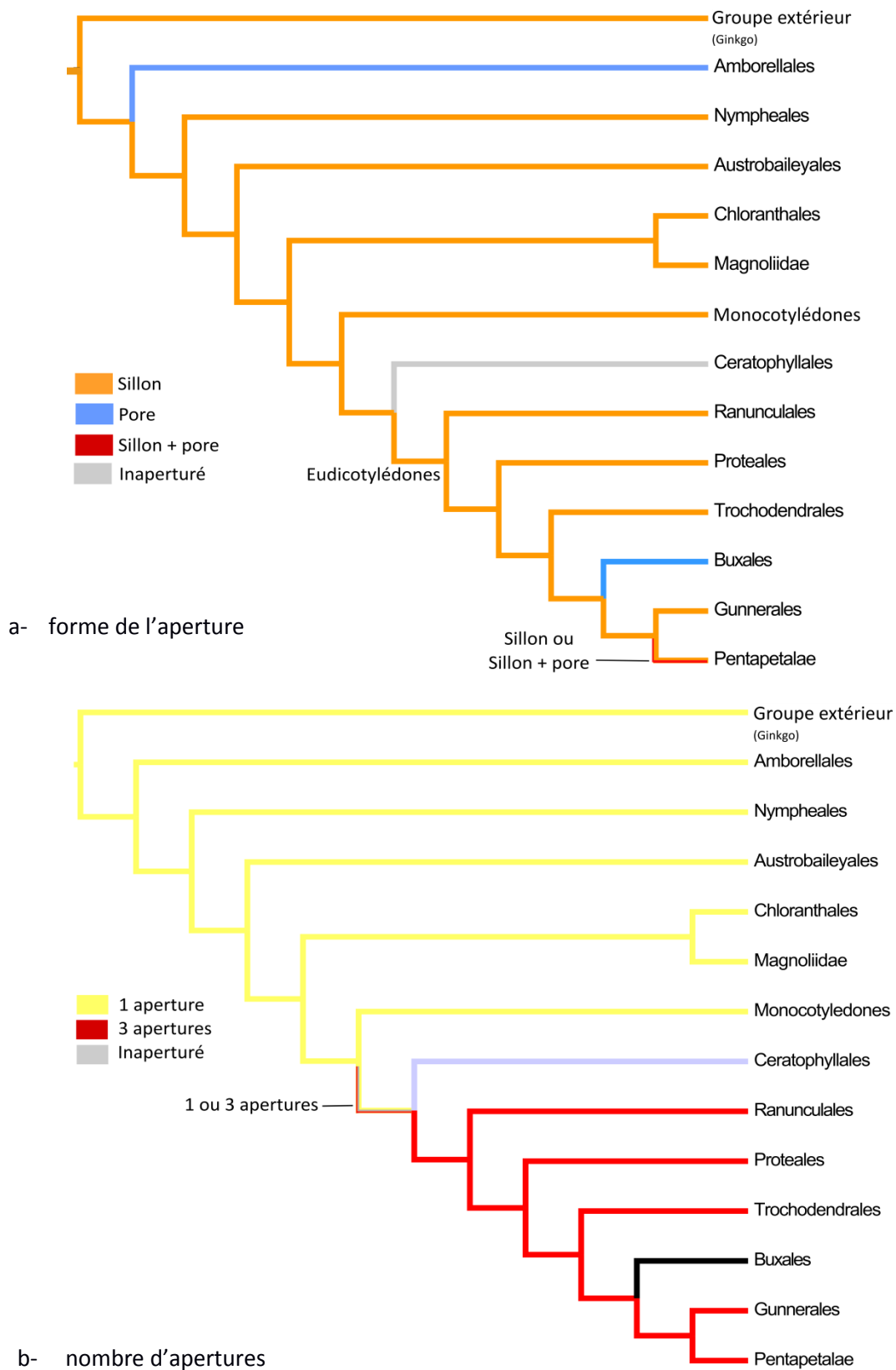


Figure 10 : reconstruction en parcimonie de l'évolution du type apertural chez les angiospermes ; a : forme de l'aperture, b : nombre d'apertures.

- **Base de l'arbre : grade ANA, Chloranthales et Magnoliidées**

Concernant le type apertural, nous voyons que l'état ancestral chez les angiospermes correspond à un pollen avec une seule ouverture en forme de sillon (pollen monosulqué), ce qui est en accord avec les études précédentes. *Amborella trichopoda*, l'espèce divergeant en premier chez les angiospermes, possède un ulcus (c'est-à-dire un pore en position distale), tandis que les autres taxons de la base de l'arbre ont plutôt un pollen présentant un sillon. Il n'est cependant pas très surprenant que les ouvertures soient modifiées chez *Amborella*, dans la mesure où la divergence avec le reste des angiospermes est ancienne (vraisemblablement autour de 139 millions d'années, voir Magallón et al., 2015), et permet donc la modification de certains caractères au cours de cette longue durée.

La plupart des espèces du grade ANA et du clade comprenant les Chloranthales et les Magnoliidées produisent du pollen monosulqué (figure 11). Il existe cependant des variations. La forme de l'ouverture est moins variable que le nombre, néanmoins certaines espèces de ce groupe présentent un pollen poré (voir figure 11-a ; c'est le cas de *Lactoris*, *Drimys* ou *Sarcandra*) ou même un pollen colpore, ce qui très rare en dehors des Eudicotylédones (*Sassafras albidum* : voir figure 11-a). Une partie des espèces du clade des Laurales sont dépourvues d'ouvertures, et les pollens inaperturés sont apparus indépendamment chez d'autres espèces (*Aristolochia* et *Asarum*). Concernant le nombre d'ouvertures (figure 11-b), nous pouvons remarquer qu'il varie par rapport au type ancestral à une ouverture chez les Austrobaileyales : l'espèce représentant ici les Trimeniacées (*Trimenia moorei*) possède un pollen à deux ouvertures, et le nombre d'ouvertures varie de 4 à 8 chez les Schisandracées (représentées par *Illicium*, *Kadsura* et *Schisandra*). De même, certaines Chloranthacées et certaines Laurales peuvent présenter un pollen possédant deux ouvertures ou davantage.

Nous voyons qu'au niveau de cette partie de l'arbre, les pollens monosulqués dominent, même si des variations sur le nombre et la forme des ouvertures existent. Ces variations concernent des espèces isolées (*Aristolochia* et *Asarum* par exemple) ou des groupes plus étendus (Laurales et Schisandracées par exemple).

Figure 11 pages suivantes : reconstructions en parcimonie de l'évolution de la forme (a) et du nombre d'ouvertures (b) chez les angiospermes divergeant à la base de l'arbre (le ginkgo servant ici de groupe extérieur). Les formes des ouvertures sont détaillées en introduction (voir par exemple figure 5), sauf les ouvertures circulaires, qui forment une sorte d'anneau entourant le grain de pollen. Ce type apertural est rare. Les noms des principaux clades sont indiqués à gauche des nœuds correspondants (en haut ou en bas selon la place disponible). Les ambiguïtés sont indiquées par des branches présentant simultanément deux couleurs.

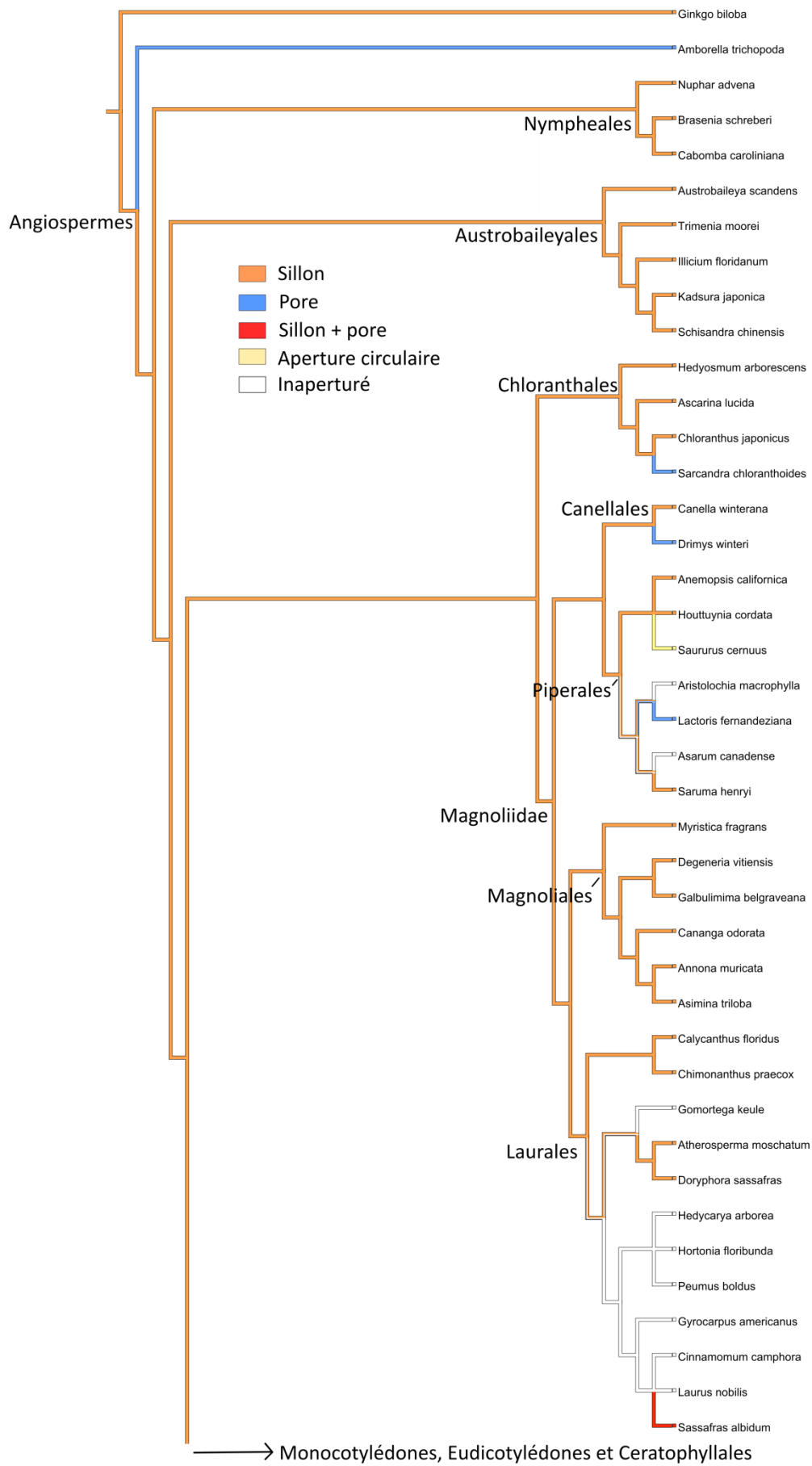


Figure 11 - a

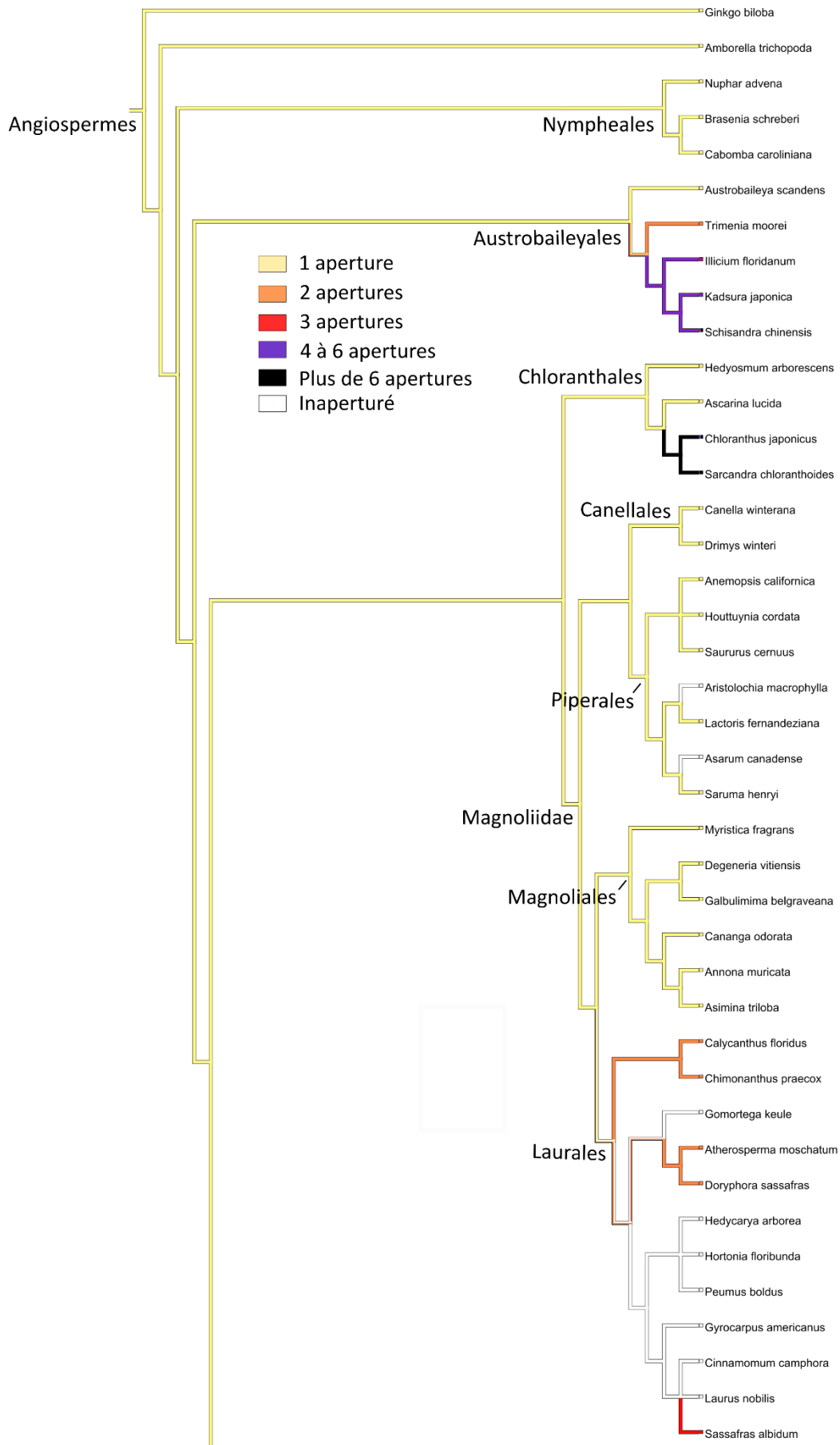


Figure 11 - b

→ Monocotylédones, Eudicotylédones et Ceratophyllales

- **Monocotylédones**

Chez les Monocotylédones, l'état ancestral correspond à un pollen monosulqué, et ce type apertural est le plus répandu au sein du groupe (figure 12). Les variations observées concernent à la fois la forme et le nombre d'ouvertures. Les pollens inaperturés sont apparus au moins trois fois de manière indépendante, chez les Asparagales, les Liliales et les Zingibérales (figure 12-a). Certaines espèces possèdent un pollen à deux ou trois ouvertures, et une espèce présente un pollen avec de multiples ouvertures (figure 12-b). Le nombre d'ouverture a augmenté au moins six fois de manière indépendante, mais seule une espèce possède un nombre élevé d'ouvertures (il s'agit d'*Alisma plantago-aquatica*). Concernant la forme de l'ouverture, nous voyons que même si le type dominant est le sillon, il existe de nombreuses acquisitions indépendantes d'une ouverture en forme de pore : au moins sept apparitions selon nos données (figure 12-a). Cette morphologie est très répandue dans le clade des Poales, pour lequel elle pourrait constituer une synapomorphie, même si il y a ensuite des transformations au sein de cet ordre (par exemple chez *Mayaca fluvialis*).

- **Eudicotylédones**

D'après nos données, il apparaît que le pollen tricolpé (pollen avec trois ouvertures équatoriales en forme de sillons) est une synapomorphie du clade des Eudicotylédones (figure 10), ce qui est en accord avec la littérature sur le sujet. Nous pouvons cependant noter que le groupe frère des Eudicotylédones, c'est-à-dire l'ordre des Cératophyllales (qui comprend en tout six espèces du genre *Ceratophyllum*) représenté ici par *Ceratophyllum demersum* possède un pollen inaperturé. Or, les espèces aquatiques dispersant leur pollen directement dans l'eau sont connues pour produire un pollen inaperturé, et c'est le cas des espèces du genre *Ceratophyllum* ; il n'est donc pas impossible que le pollen tricolpé soit une synapomorphie du clade comprenant les Cératophyllales et les Eudicotylédones, et que le pollen soit devenu secondairement inaperturé chez *Ceratophyllum*, mais la parcimonie ne peut pas trancher ici.

De manière générale, nous voyons qu'une écrasante majorité d'espèces d'Eudicotylédones produisent un pollen à trois ouvertures, en forme de sillon (colpus) ou de sillon possédant un pore en son centre (colporus ; voir figure 10 et figures 13 à 15). Il existe certes des variations mais, sur les espèces représentées ici, elles ne concernent jamais de grand clade, les modifications par rapport au type tricolpé ou tricolporé se situant plutôt en position apicale sur l'arbre.

Concernant les Eudicotylédones qui divergent à la base, c'est-à-dire les Ranunculales, les Protéales, les Trochodendrales, les Buxales et les Gunnérales, nous voyons que la majorité des espèces produisent du pollen à trois ouvertures, même si on peut voir ponctuellement une augmentation ou, plus rarement, une diminution du nombre d'ouvertures (figure 13-b). Les ouvertures ont une forme de sillon, ou plus rarement une forme de pore ou de colporus (figure 13-a). Il a été avancé qu'une ouverture en forme de colporus pourrait être une synapomorphie des Pentapétales, un clade comprenant la plupart des Eudicotylédones (dont les espèces produisent des fleurs ayant cinq sépales et cinq pétales). Comme il y a une ambiguïté dans cette zone de l'arbre, notre reconstruction ne permet pas de savoir précisément où se situe la transformation ; il est possible que les méthodes probabilistes, ainsi qu'un meilleur échantillonnage, nous aident à résoudre ce problème.

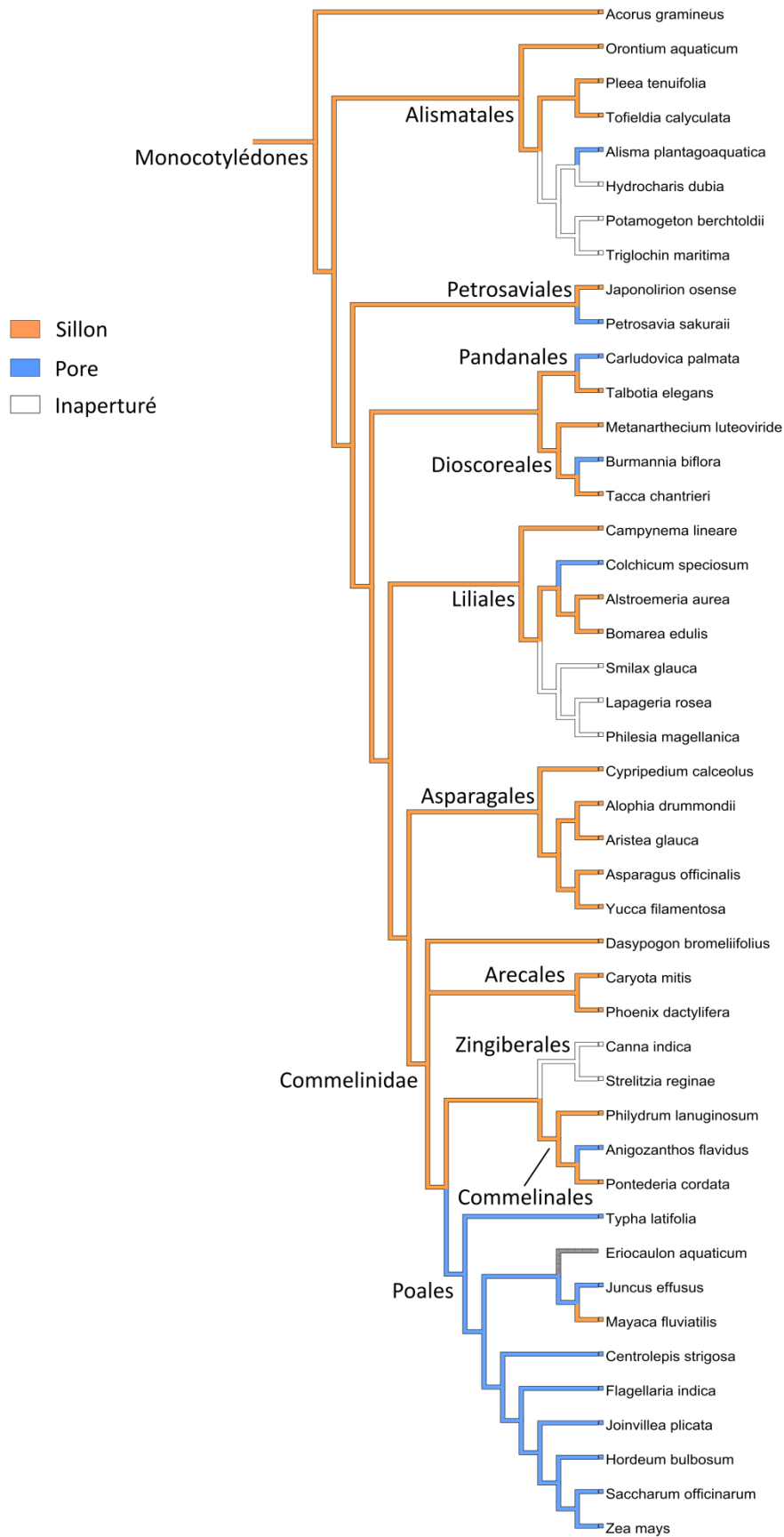


Figure 12-a : reconstruction en parcimonie de l'évolution de la forme des ouvertures chez les Monocotylédones. La forme de l'ouverture est indéterminée pour *Eriocaulon aquaticum*.

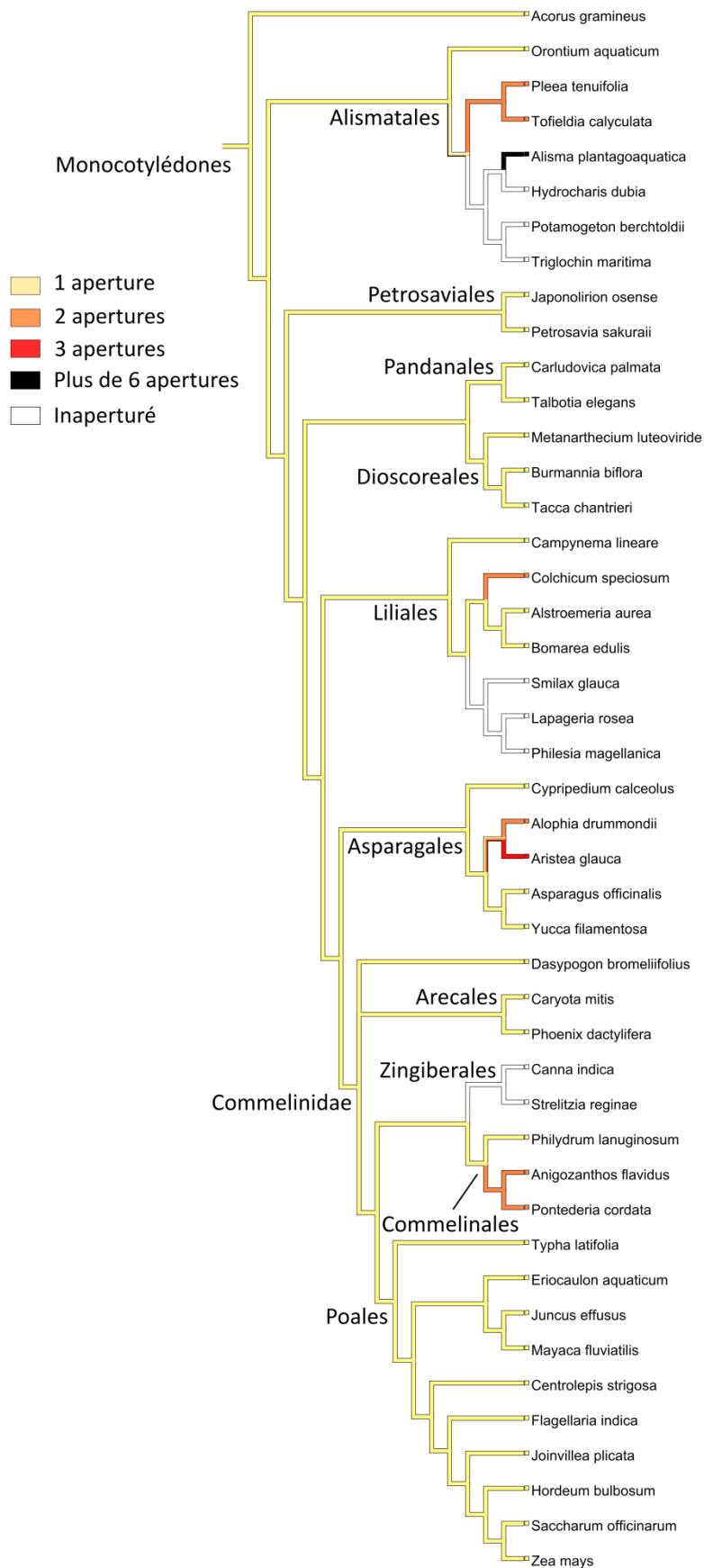


Figure 12-b : reconstruction en parcimonie de l'évolution du nombre d'apertures chez les Monocotylédones.



Figure 13-a : reconstruction en parcimonie de l'évolution de la forme des apertures chez les Cératophyllales et les ordres formant la base des Eudicotylédones. Il y a une ambiguïté dans la branche conduisant aux Pentapétales, la forme pouvant être un sillon ou un colporus.

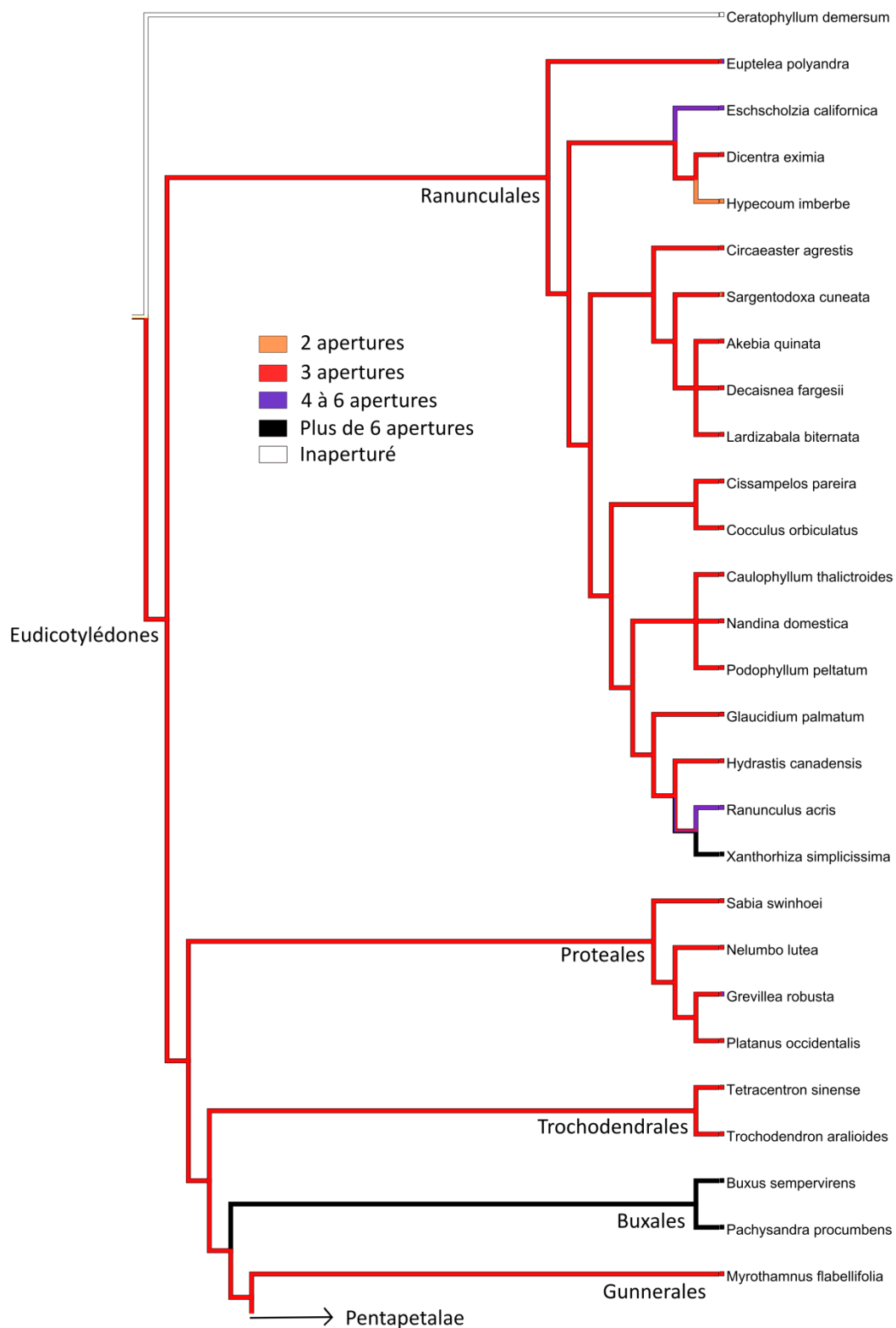


Figure 13-b : reconstruction en parcimonie de l'évolution du nombre d'apertures chez les Cératophyllales et les ordres formant la base des Eudicotylédones. Il y a une ambiguïté à la base de ce clade, le nombre d'apertures pouvant être de zéro, un ou trois.

Chez les Rosidées et leurs groupes frères (Dilléniales et Saxifragales), le colporus est la forme la plus répandue, et pourrait être une synapomorphie du clade comprenant les Rosidées et les Saxifragales (figure 14-a). Il existe cependant un certain nombre d'espèces présentant un pollen poré (au moins treize transitions), ou un pollen présentant un sillon simple (au moins huit transitions), comme c'est le cas chez les Brassicacées, qui comprennent la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les pollens inaperturés sont plus rares dans ce groupe, ils sont présents chez deux espèces éloignées, où ils sont apparus de manière indépendante. Quant au nombre d'ouvertures, nous voyons que la grande majorité des espèces produisent du pollen triaperturé, même si certaines espèces produisent du pollen avec un nombre intermédiaire (quatre à six) ou un nombre élevé d'ouvertures (plus de six ; voir figure 14-b). On recense au moins vingt augmentations indépendantes du nombre d'ouvertures. Plus rarement, le nombre d'ouvertures passe de deux à trois, c'est le cas pour cinq espèces (avec cinq transitions indépendantes).

Enfin, chez les Asteridées et les groupes proches (Santalales, Berberidopsidales et Caryophyllales), le pattern observé est assez semblable à celui des Rosidées. Le colporus est la forme dominante, même si les pores et les sillons simples sont assez fréquents (figure 15-a). Il est possible que le colporus soit un caractère dérivé chez les Asteridées, mais l'ambiguïté se situant à la base des Pentapetalae ne permet pas de trancher sur ce point. Les Berberidopsidales, les Caryophyllales et les Lamiales se caractérisent par des morphologies aperturales différentes : les pollens présentant des pores ou des sillons sont majoritaires par rapport aux pollens présentant un colporus. Les Cornales, les Ericales et les Campanulidées possèdent, dans leur majorité, des pollens colporés. Certaines espèces présentent un nombre d'ouvertures intermédiaire ou élevé (vingt-et-une augmentations indépendantes), notamment chez les Caryophyllales (figure 15-b). Une seule espèce présente deux ouvertures, et on recense une seule espèce inaperturée. Le nombre d'ouvertures est globalement moins variable que la forme, les espèces étant principalement triaperturées.

Figure 14 pages suivantes : reconstruction en parcimonie de l'évolution de la forme (a) et du nombre d'ouvertures (b) chez les Rosidées et les ordres proches.

Figure 15 pages suivantes : reconstruction en parcimonie de l'évolution de la forme (a) et du nombre d'ouvertures (b) chez les Asteridées et les ordres proches.

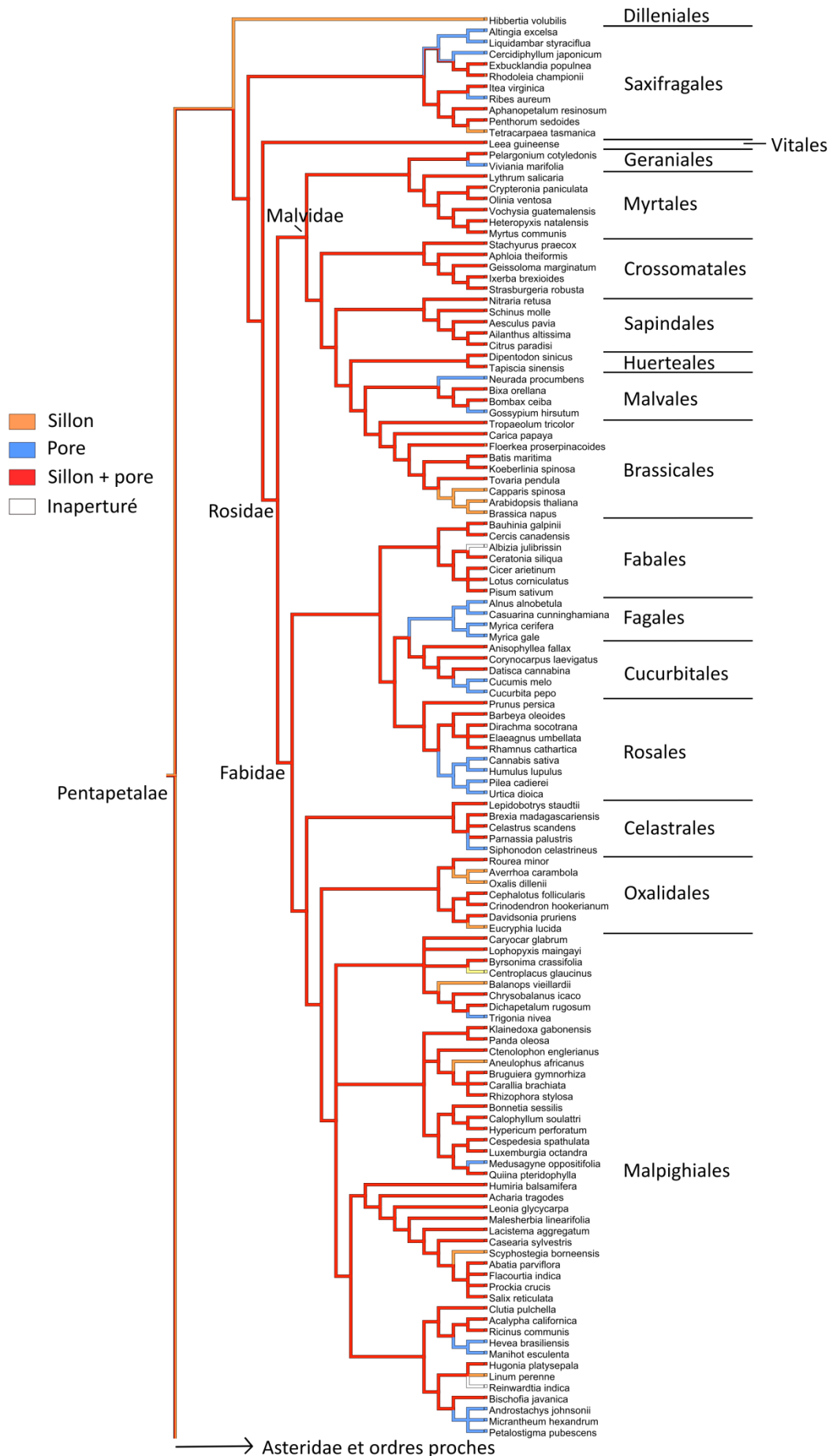


Figure 14 - a

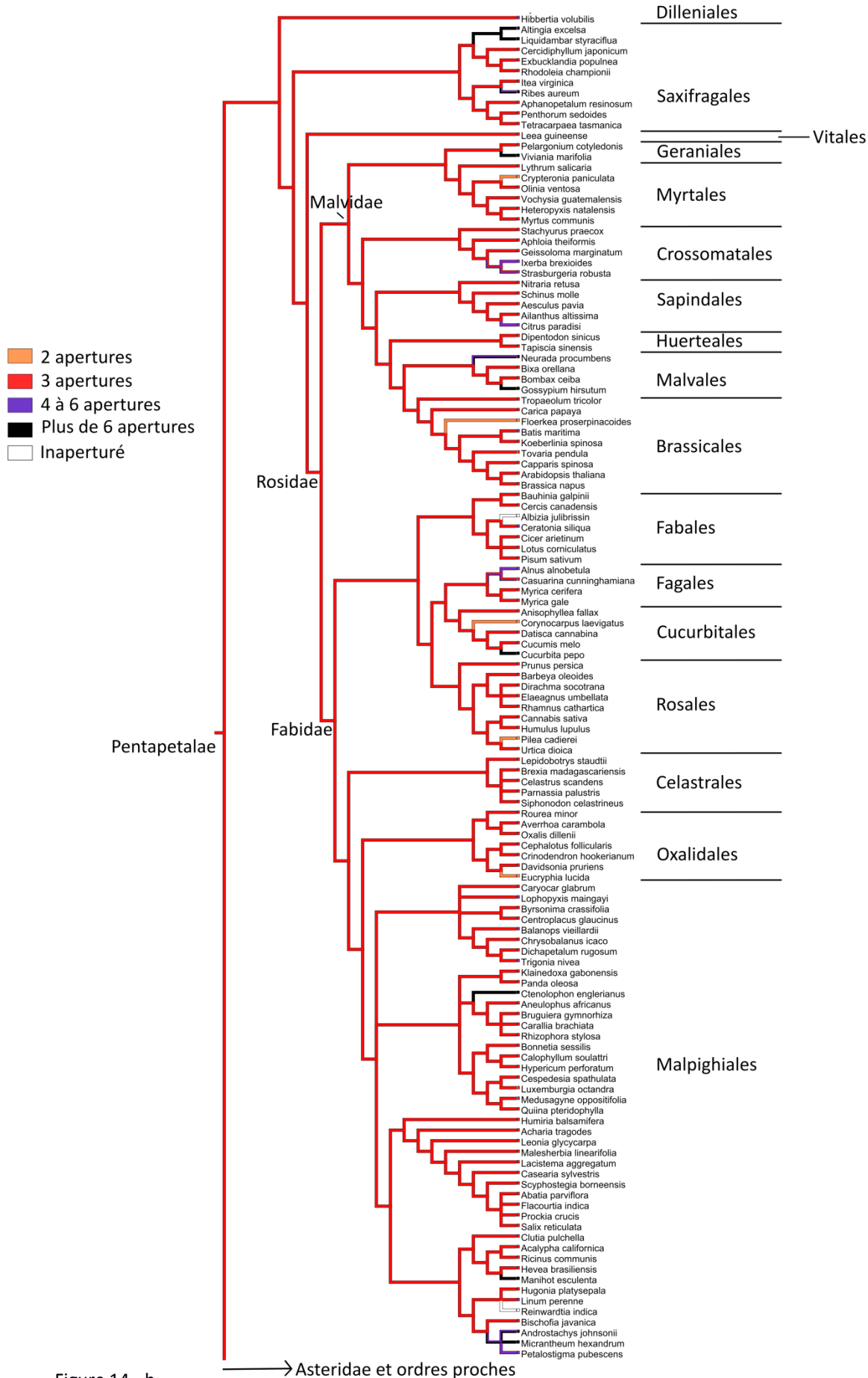


Figure 14 - b

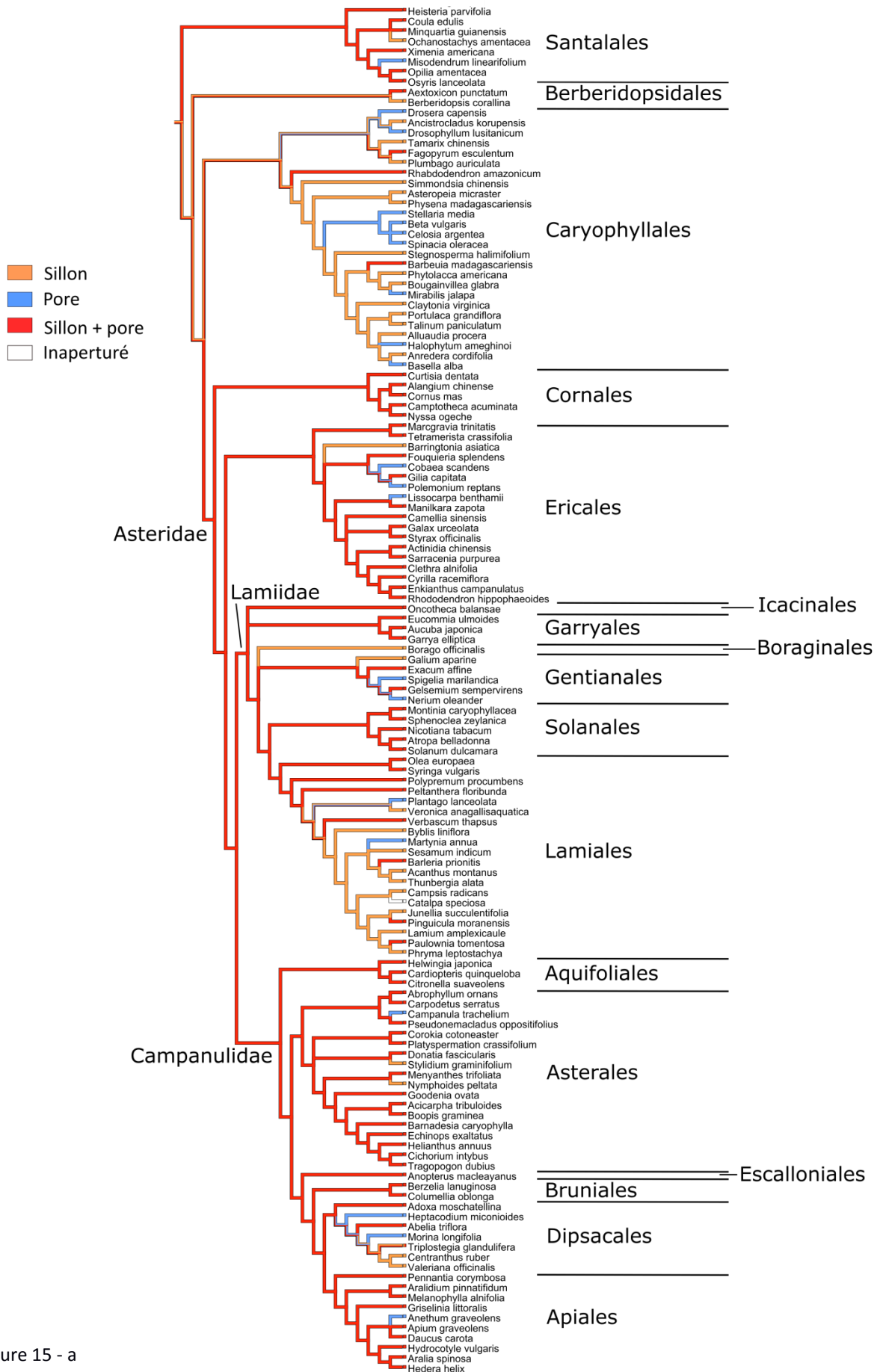


Figure 15 - a

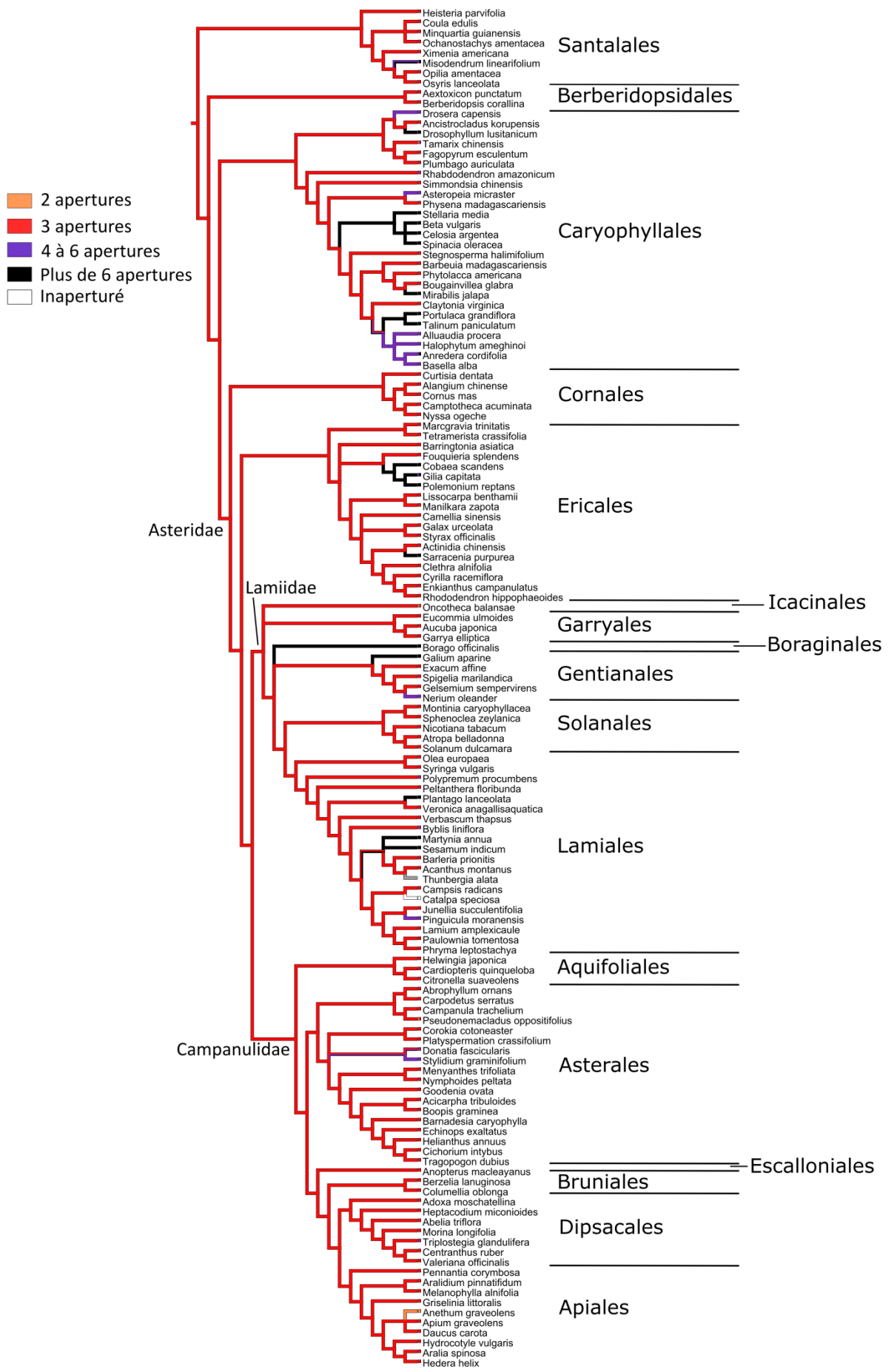


Figure 15 - b

4°/ Conclusions sur l'évolution du type apertural chez les angiospermes

Les résultats obtenus au cours de cette analyse ne sont pas très différents des résultats obtenus lors des études précédentes : on retrouve un état ancestral monosulqué, présent à la base de l'arbre (grade ANA, Chloranthales et Magnoliidées) et chez les Monocotylédones, le pollen tricolpé étant une synapomorphie des Eudicotylédones, où il est très largement répandu. Néanmoins, notre étude est la première de cette envergure en termes d'étendue taxonomique : les études précédentes, y compris celles publiées récemment, ne prennent jamais en compte un nombre aussi élevé d'espèces. Si nos résultats ne font que confirmer ce qui a déjà été mis en évidence auparavant, nous voyons que ces conclusions, obtenues en parcimonie, sont solides.

Si les pollens monosulqués et tricolpés sont les deux types dominants observés chez les angiospermes, nous avons néanmoins pu mettre en évidence une certaine variabilité du type apertural. Les pollens inaperturés sont apparus à de nombreuses reprises, de manière indépendante, ce qui avait déjà été montré auparavant mais sans cadre phylogénétique explicite (Furness and Rudall, 1999; Furness, 2007). Ici, nous pouvons localiser précisément sur l'arbre les transitions vers un pollen inaperturé. De même, les pollens présentant un nombre d'aperture élevé (deux ou plus à la base de l'arbre et chez les Monocotylédones, et plus de trois chez les Eudicotylédones) sont apparus de nombreuses fois de manière indépendante (cet aspect sera en partie développé dans la suite du manuscrit). Il existe donc de nombreuses réversions et de nombreuses convergences au niveau du type apertural. Notre reconstruction permet également de voir qu'au niveau du nombre d'ouvertures, il n'y a généralement pas d'état de transition entre un pollen monoaperturé ou triaperturé vers un pollen présentant de nombreuses ouvertures.

Il nous reste maintenant à augmenter l'échantillonnage, pour avoir un maximum d'espèces parmi les 792 de l'arbre d'origine, afin d'avoir des résultats plus robustes, et de diminuer le nombre d'ambiguïtés. Une autre piste d'amélioration consiste à utiliser les méthodes probabilistes (maximum de vraisemblance et inférence bayésienne) pour analyser les données, qui pourront notamment permettre de résoudre certaines ambiguïtés, et de prendre en compte le facteur temporel dans les reconstructions. Ce type d'étude a été entrepris pour étudier l'évolution de la morphologie florale chez les angiospermes, et les résultats obtenus en parcimonie et avec les méthodes probabilistes peuvent être différents. Un bref résumé de ce travail, auquel j'ai contribué lors de l'école d'été eFlower Summer School (2013), est donné en annexe 1.

Dans cette première partie sur l'évolution du type apertural, nous avons vu que deux types principaux (monosulqué et tricolporé) dominent chez les angiospermes. Des variations, portant aussi bien sur le nombre d'ouvertures que sur leur forme, sont présentes dans toutes les zones de l'arbre, mais ces variations ont généralement une faible étendue taxonomique : à quelques exceptions près, ce sont des espèces ou de petits groupes d'espèces qui sont concernés. Nous avons voulu étudier plus en détail la distribution taxonomique de ces variations ainsi que leur évolution. Nous nous sommes pour cela intéressés à des pollens particuliers, présentant un nombre élevé d'ouvertures réparties sur toute leur surface : on qualifie ces pollens de pantoporés. Nous nous sommes intéressés à leur développement, pour voir comment cette morphologie pouvait être produite, et nous avons étudié leur distribution, pour voir si cette morphologie apparaissait fréquemment ou non, et pour

essayer de voir si les espèces produisant ce type de pollen avaient certaines particularités biologiques. Les résultats sont détaillés dans la troisième partie du manuscrit.

Concernant la position hégémonique des pollens monosulqués et triaperturés, nous pouvons nous demander si cette situation, que l'on peut qualifier de stase évolutive, résulte de processus sélectifs, ou de contraintes développementales. Est-ce que ces configurations sont particulièrement avantageuses, ce qui expliquerait que les variants restent relativement rares, et ne soient presque jamais fixés à grande échelle taxonomique ? Ou est-ce que la microsporogenèse a été verrouillée, à un moment donné, au cours de l'histoire évolutive du groupe, limitant le nombre de morphologies pouvant être produites au cours du développement ? Nous apportons des éléments de réponse à cette question dans la partie suivante du manuscrit, pour le cas des Eudicotylédones.

II- La dominance des pollens tricolpés chez les Eudicotylédones

1°/ La microsporogenèse des Eudicotylédones est sous sélection stabilisante

Ce travail a été publié dans un article, présenté en annexe 2.

Les pollens à trois ouvertures (colpus ou colporus) sont de loin les plus répandus parmi les Eudicotylédones. Ceci peut surprendre dans la mesure où les Eudicotylédones sont un groupe assez ancien : le plus vieux pollen est daté de 125 millions d'années (Doyle and Hotton, 1991), et des estimations sur l'âge du groupe donnent même un âge compris entre 136 et 130 millions d'années (Magallón et al., 2015). Les taxons de ce groupe ont donc eu tout le temps nécessaire pour générer de nouveaux types aperturaux. De plus, les Eudicotylédones présentent un très grand niveau de diversité morphologique au niveau des sporophytes, concernant le port (herbacées, arbustes et arbres, lianes), la taille, la forme des feuilles, la morphologie florale... Le fait que le type apertural soit autant conservé à cette échelle taxonomique est à première vue étonnant. On peut alors parler de stase évolutive.

- **Stase évolutive : contraintes ou sélection ?**

Une stase évolutive peut être due à des contraintes développementales, dans le cas où les mécanismes développementaux sont verrouillés, et sont dans l'incapacité de produire d'autres morphologies (Charlesworth et al., 1982; Maynard Smith et al., 1985; Burt, 2001). Ce type de facteur est donc une contrainte interne au système étudié. Dans le cas du grain de pollen, cela correspondrait ici au cas où la microsporogenèse est, d'une façon ou d'une autre, fixée de manière quasi-irréversible chez les Eudicotylédones. Une stase évolutive peut également résulter d'une forte sélection stabilisante (Charlesworth et al., 1982; Burt, 2001). Dans ce cas, la production de nouveaux morphes est possible, mais ils sont rapidement éliminés car désavantagés par rapport au type dominant. Ce type de facteur est externe au système, et peut éventuellement disparaître si les conditions environnementales changent, de manière à faire disparaître ou à atténuer l'avantage sélectif du morphe dominant. On peut noter que les deux mécanismes, contraintes développementales et forte sélection stabilisante, ne sont pas exclusifs.

Comment, en pratique, trancher entre ces deux hypothèses ? Une expérience hypothétique a été proposée par Alberch en 1982 (figure 16 page suivante). L'idée de base est la suivante : après avoir montré que le caractère en question est constant dans une lignée, on retire les pressions de sélections (la question du « comment » étant pour l'instant laissée en suspens). On observe alors, pendant plusieurs générations, l'évolution du caractère d'intérêt (figure 16-b). Si ce caractère présente alors des variations, on en conclut que la stase est principalement due à la sélection, puisque l'absence de sélection permet l'apparition de nouveaux états de caractère. Si ce caractère reste constant, même en l'absence de sélection, on en conclut que la stase est due à des contraintes développementales : les mécanismes ontogéniques sont dans l'incapacité de produire de nouveaux phénotypes.

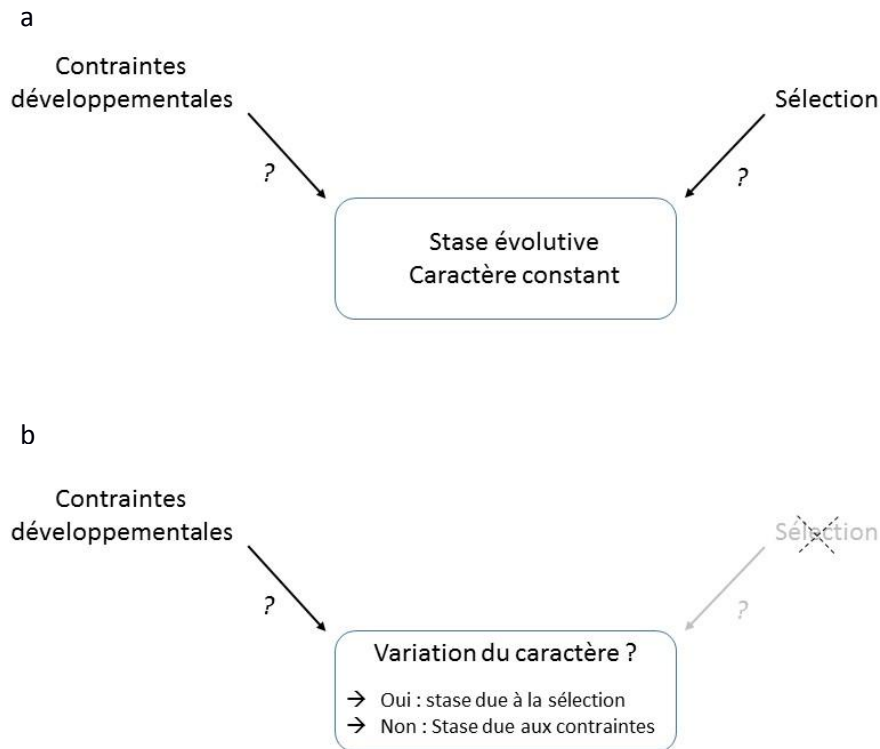


Figure 16 : principe de l'expérience d'Alberch. a : la stase portant sur le caractère d'intérêt peut être due soit à des contraintes développementales, soit à la sélection. b : l'étude de cas particuliers où les pressions de sélection disparaissent peuvent indiquer l'origine de la stase, en fonction de la variation du caractère.

- **Application au cas des Eudicotylédones**

Ce type de raisonnement peut s'appliquer au pollen des Eudicotylédones, mais de manière indirecte. Il est en effet difficile d'imaginer des circonstances dans lesquelles le type apertural du pollen est libéré de toute forme de sélection (à part éventuellement des lignées pratiquant l'autofécondation quasi exclusive depuis un temps suffisamment long). Les apertures sont fortement impliquées dans la survie du gamétophyte, et dans la fécondation, puisqu'elles permettent la germination du tube pollinique. Le succès reproducteur de l'individu est donc lié à ces structures, il devient dès lors difficile de concevoir des cas où le type apertural n'est pas soumis à sélection.

Cependant, la stase évolutive chez les Eudicotylédones concerne non seulement le type apertural, mais aussi la séquence développementale permettant de produire du pollen tricolpé ou tricolporé : la très grande majorité des Eudicotylédones présentent une microsporogénèse avec une cytokinèse simultanée, une croissance centripète des paroi callosiques qui séparent les microspores, et possèdent des tétrades tétraédriques (Furness and Rudall, 2004). La microsporogénèse est beaucoup moins variable chez les Eudicotylédones que chez les autres angiospermes (Sannier et al., 2006; Penet et al., 2007; Toghranegar et al., 2013). La séquence développementale détaillée plus haut conduit à la formation d'un pollen à trois apertures, via le mécanisme des derniers points de contact (Wodehouse, 1935; Ressayre et al., 2002).

Le mode potentiel de sélection sur la microsporogénèse est ici indirect : comme les trois caractères énoncés plus haut définissent la position et le nombre des apertures, et que les apertures sont un élément clé de la valeur sélective de l'individu, la sélection sur le développement s'opère de manière indirecte via la sélection sur le type apertural (figure 17-a). Or, si le type apertural est toujours soumis à la sélection naturelle, il existe des cas où les trois caractères cités ci-dessus ne déterminent pas le type apertural : si il y a un découplage entre ces trois étapes de la microsporogénèse et la détermination du type apertural, ces trois caractères ne sont plus soumis à la sélection exercée sur le type apertural (figure 17-b). En d'autres termes, si ces caractères varient, cela n'a aucune conséquence sur le nombre et la forme des apertures, puisque les apertures sont déterminées par d'autres mécanismes. Nous avons donc là un cas qui permet d'étudier la stase portant sur la microsporogénèse.

Il existe plusieurs cas où le mécanisme des derniers points de contact entre les microspores est inopérant pour déterminer la forme et le nombre des apertures. Les deux exemples utilisés ici correspondent aux pollens inaperturés, c'est à dire dépourvus d'apertures, et aux pollens pantoporés, qui présentent un grand nombre d'apertures circulaires réparties sur toute la surface. En l'absence d'apertures, la position des derniers points de contacts n'a évidemment aucune influence sur le type apertural. De même, chez les pollens pantoporés, les apertures sont trop nombreuses pour correspondre aux derniers points de contact, et leur répartition sur l'ensemble de la paroi n'est pas compatible avec ce mécanisme. Nous verrons dans le chapitre III qu'un autre mécanisme de détermination des apertures pourrait intervenir chez ces espèces.

Figure 17 page suivante : application de l'expérience d'Alberch chez les Eudicotylédones. a – Chez les espèces triaperturés, les trois caractères de la microsporogénèse (cytociénèse, mode de formation de la callose et forme des tétrades) déterminent le type apertural (flèche noire). La microsporogénèse est potentiellement soumise à des contraintes développementales (flèche rouge du haut), et aux pressions de sélection via la sélection sur le type apertural (flèche rouge du bas). b – Chez les espèces où les trois caractères de la microsporogénèse cités plus haut ne déterminent plus le type apertural (pollens pantoporés et pollens inaperturés, croix bleue de droite), la sélection indirecte qui s'exerçait sur la microsporogénèse est supprimée (croix bleue de gauche). La microsporogénèse est uniquement affectée par des contraintes développementales, potentiellement. La variation des caractères de la microsporogénèse nous renseignent alors sur le mécanisme de maintien de la stase.

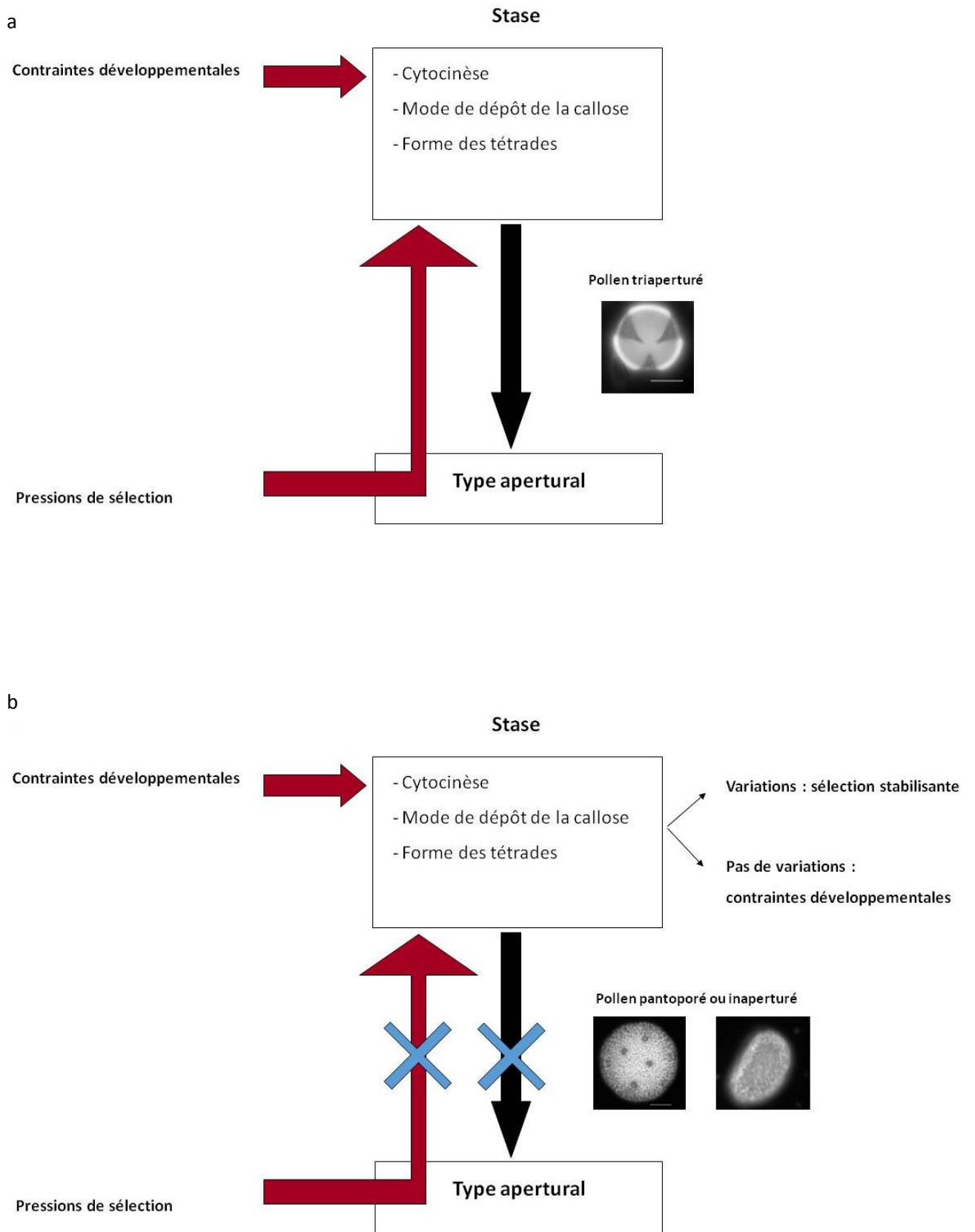


Figure 17

L'idée est donc d'étudier la microsporogénèse (cytocinèse, mode de formation de la callose et forme des tétrades) chez des espèces produisant du pollen inaperturé ou pantoporé, ainsi que chez un témoin représenté par une espèce proche phylogénétiquement (en pratique une espèce de la même famille). Si ces caractères, en l'absence de sélection exercée indirectement sur eux, se mettent à varier, on peut conclure que la stase sur la microsporogénèse est due à une sélection stabilisante. Si ces trois caractères restent constants, la stase est due à des contraintes développementales qui limitent fortement la variation de ces trois caractères chez les Eudicotylédones, contraignant ainsi la forme du pollen (figure 17-b).

Une étude menée chez les Euphorbiacées (Matamoro-Vidal et al., 2012) a montré que ces trois caractères varient significativement chez des espèces produisant du pollen inaperturé ou pantoporé, ce qui tend à supporter l'hypothèse de la sélection stabilisante sur le développement, au moins chez cette famille. Sur la base de ces résultats, une étude à plus large échelle taxonomique a été menée chez les Eudicotylédones. Cette étude concerne 81 espèces (environ la moitié avec un pollen triaperturé, et la moitié avec un pollen inaperturé ou pantoporé), réparties dans les principaux clades de ce groupe. Cette stratégie d'échantillonnage permet d'étudier le relâchement des pressions de sélection sur la microsporogénèse dans 18 clades indépendants. Pour chaque espèce, la séquence développementale a été déterminée, soit par l'observation directe, soit à l'aide de données bibliographiques. Les résultats sont résumés sur la figure 18. On peut voir que les espèces triaperturées (non surlignées) ont une séquence développementale très conservée, tandis que les espèces inaperturées et pantoporées (surlignées en gris) présentent des variations (signalées en gras), notamment au niveau de la forme des tétrades, et dans une moindre mesure au niveau du mode de formation de la callose. Le type de cytocinèse reste par contre assez constant. Des tests statistiques montrent que cette variation est significative par rapport aux espèces triaperturées.

Figure 18 (page suivante) : variation des caractères de la microsporogénèse chez des Eudicotylédones produisant du pollen inaperturé ou pantoporé. 80 espèces ont été utilisées, et les variations par rapport à la microsporogénèse standard des Eudicotylédones (tétrades tétraédriques, dépôt de la callose centripète plan, cytocinèse simultanée) sont indiquées en gras. Les abréviations utilisées sont les suivantes : CpP pour centripète plan, CpT pour centripète tétrade, CfP pour centrifuge plan, Sim pour simultanée, Succ pour successive ; Heteromorphic signifie que l'on peut observer plusieurs états de caractère, par exemple des tétrades tétraédriques et des tétrades rhomboïdales.

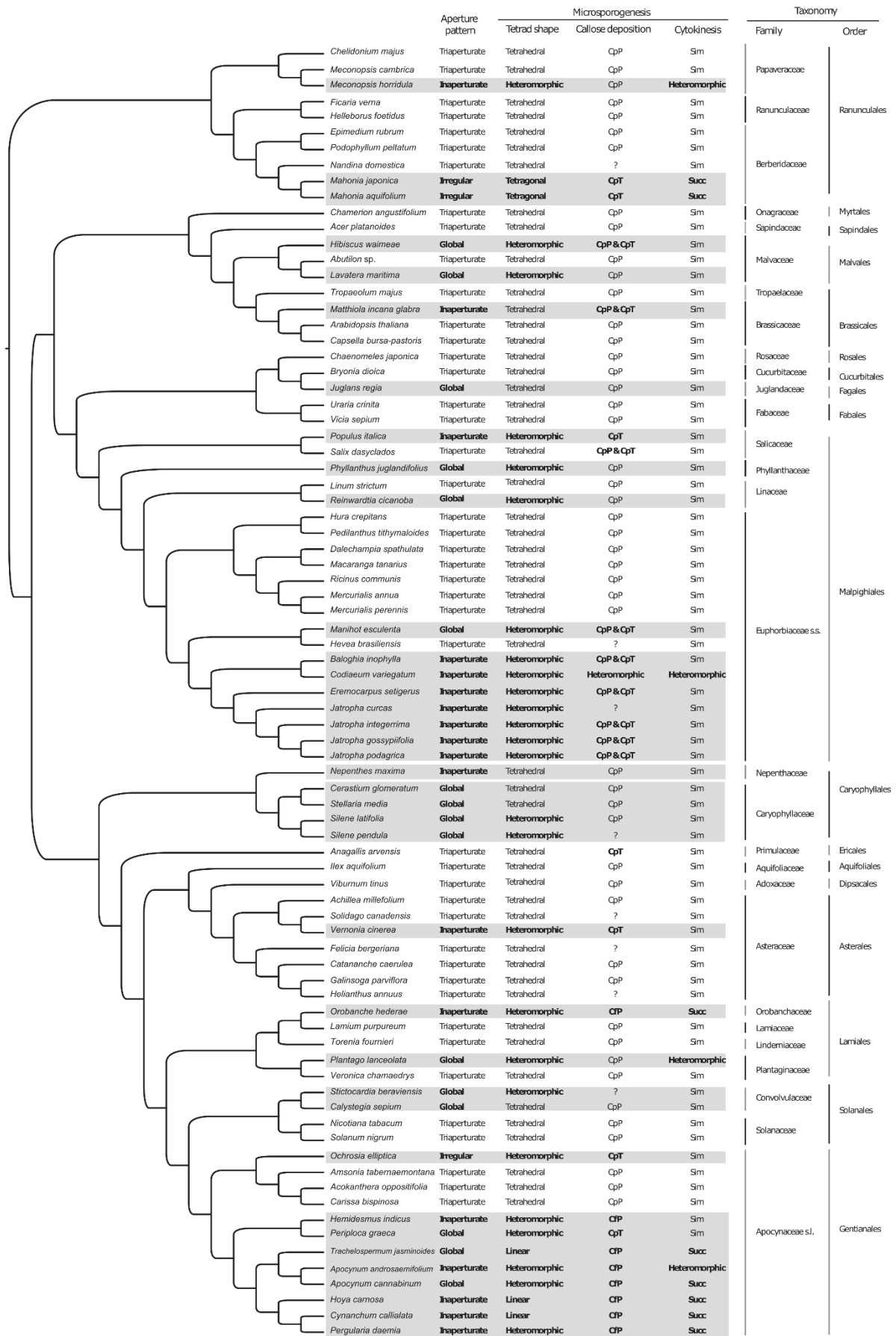


Figure 18

Ces résultats montrent donc que la stase sur la microsporogénèse est principalement due à une sélection stabilisante, portant sur la détermination du type apertural. On peut alors penser que la stase sur le pollen chez les Eudicotylédones est elle même due à des pressions de sélection limitant l'apparition de nouveaux types aperturaux, même si cette démonstration est indirecte. Certains auteurs ont suggéré que l'acquisition du pollen tricolpé chez les Eudicotylédones pourrait être une innovation clé, expliquant le succès évolutif de ce groupe, qui comprend les trois quarts d'espèces de plantes à fleurs, et que l'on retrouve dans tous les milieux terrestres (Furness and Rudall, 2004). Ces résultats sur la stase de la microsporogénèse tendent à conforter cette hypothèse.

Des résultats similaires ont été obtenus concernant la morphologie florale chez les Malpighiacées, une famille d'Eudicotylédones très diversifiée, comprenant environ 1300 espèces (Davis et al., 2014). La plupart des fleurs appartenant à cette famille ont une symétrie bilatérale, et sont pollinisées par des Hyménoptères spécialisés, qui ont besoin des lipides produits par les fleurs pour la construction de leur nid et l'alimentation de leurs larves. L'interaction est très spécifique, et les fleurs ont une allure caractéristique. Néanmoins, certains clades au sein des Malpighiacées ont changé de pollinisateur au cours de l'histoire évolutive du groupe, et chez ces espèces les fleurs ont une allure différente, et perdent notamment la symétrie bilatérale. Ces résultats indiquent que la morphologie florale particulière du groupe, qui constitue une stase évolutive, est maintenue par la sélection naturelle, via l'interaction avec le pollinisateur spécialisé. Les contraintes développementales ne jouent pas, là encore, de rôle majeur.

2°/ Effet du type apertural sur la résistance du grain de pollen à un stress osmotique chez *Arabidopsis*

Ce travail est présenté plus en détail en annexe 3 (article soumis dans American Journal of Botany).

Si la stase portant sur le type apertural tricolpé est effectivement due à une sélection stabilisante, on peut se demander quels avantages peut présenter ce type de pollen. Les apertures permettent notamment la réalisation des échanges avec l'environnement (déshydratation/hydratation, respiration...), la germination du tube pollinique, et l'accommodation des variations de volume ou harmomégaie (Edlund et al., 2004). On pourrait penser qu'un nombre plus élevé d'apertures (comparé au pollen monosulqué des autres angiospermes) serait en mesure de conférer un avantage compétitif une fois que les grains de pollen sont sur le stigmate : les pollens pourraient se réhydrater plus vite, et germer plus rapidement. De plus, la répartition des apertures au niveau du plan équatorial (et s'étirant jusqu'aux pôles) pourrait favoriser le fait que le grain de pollen se retrouve plus facilement, sur le stigmate, dans une position propice aux échanges et à la germination, contrairement aux espèces monosulquées pour lesquelles la surface des apertures est généralement moindre, et localisée sur un seul sillon. Il n'en demeure pas moins que certains groupes de Monocotylédones et d'angiospermes divergeant à la base ont eux aussi connu un grand succès évolutif (Asparagales chez les Monocotylédones, Piperales chez les Magnoliidées par exemple).

Nous avons choisi d'étudier le rôle que pouvaient avoir les apertures dans l'accommodation des variations de volume. Comme nous l'avons expliqué plus haut, le volume du grain de pollen varie fortement au cours de son existence. Avant libération au niveau des anthères, les grains de pollen

subissent une phase de déshydratation, et perdent généralement 15 à 35 % d'eau cytoplasmique (Heslop-Harrison, 1979a; Nepi et al., 2001). Après dispersion, sur un stigmate compatible, les grains de pollen se réhydratent avant de produire le tube pollinique. Les pressions exercées au niveau de la paroi sont fortes, et le grain de pollen doit être en mesure de résister face à ces variations de volume.

- **Utilisation de mutants aperturaux d'*Arabidopsis thaliana***

Nous avons utilisé pour notre étude des mutants d'*Arabidopsis thaliana*, présentant différents types aperturaux (figure 19), issus de travaux d'autres équipes portant sur la formation de l'exine et des ouvertures (Dobritsa et al., 2011) et sur l'apomixie (D'Erfurth et al., 2009). Nous nous sommes servis de mutants possédant zéro (*inp1-1* : figure 19-2), quatre (*lsq6* : figure 19-3) ou quatre à huit (*osd1-1* : figure 19-4) ouvertures, ainsi que de deux types sauvages possédant un pollen tricolpé (*col* et *wt* : figure 19-1). Les mutants *lsq6* et *osd1-1* produisent plusieurs types de pollens (respectivement des pollens possédant trois ou quatre ouvertures, et des pollens possédant de quatre à huit ouvertures), mais chez *lsq6* le type majoritaire présente quatre ouvertures. Nous avons eu besoin de deux types sauvages différents car le mutant à huit ouvertures n'est pas dans le même fond génétique que les autres mutants, ce qui pourrait avoir une influence sur les résultats. L'utilisation de mutants possède l'avantage de pouvoir comparer les performances d'individus différant principalement par le nombre (et éventuellement la répartition) des ouvertures : le fond génétique est le même, à la mutation près, et les autres caractéristiques de la paroi du pollen (épaisseur, structure de l'exine...) sont semblables. Il y a seulement une légère différence de taille entre certains mutants, mais à part ça les grains de pollen diffèrent principalement au niveau du type apertural. Cette approche nous permet de comparer d'une part les pollens à zéro (*inp1-1*), trois (*col*) et quatre (*lsq6*) ouvertures dans le fond génétique Columbia (Dobritsa et al., 2011), et d'autre part les pollens à trois (*wt*) et quatre à huit (*osd1-1*) ouvertures, qui sont dans le fond génétique Nooséen (D'Erfurth et al., 2009).

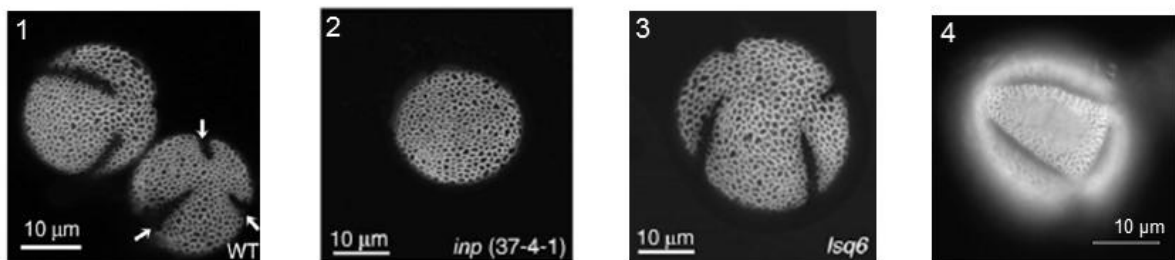


Figure 19 : type sauvage et mutants utilisés pour les expériences. 1 : Type sauvage triaperturé, ici dans le fond génétique Columbia (le type sauvage Nooséen ayant la même morphologie). 2 : mutant *inp1-1* sans ouvertures. 3 : mutant *lsq6* avec 4 ouvertures. 4 : mutant *osd1-1* avec 8 ouvertures, celles-ci formant les arêtes d'un tétraèdre (elles ne sont pas toutes visibles sur la photo). Les photos 1, 2 et 3 sont issues d'un article d'Anna Dobritsa (Dobritsa 2011), qui nous a aimablement autorisés à les reproduire dans ce manuscrit.

Nous avons étudié la résistance de la paroi face à un stress osmotique, qui induit donc un stress mécanique par entrée d'eau dans le grain de pollen. Nous avons placé les grains de pollen dans des solutions d'osmolarité variable, l'osmolarité étant liée à la concentration en mannitol utilisée (0.2 M,

0.45 M et 0.7 M). Le mannitol présente l'avantage d'être un sucre non métabolisable, il joue donc uniquement sur l'osmolarité. Une faible osmolarité (0.2 M) correspond par exemple à une goutte de pluie sur le stigmate, et une forte osmolarité (0.7 M) vise à reproduire les sécrétions stigmatiques précédant la germination. Une concentration intermédiaire (0.45 M) a également été utilisée. Après 2 heures dans une de ces solutions entre lame et lamelle, les grains de pollen sont observés au microscope. Pour chaque lame, une centaine de grains sont comptés, pour lesquels on détermine si le cytoplasme a explosé (figure 20-2), si la paroi s'est rompue (figure 20-3), ou si le grain de pollen ne présente aucune lésion apparente (figure 20-1), auquel cas on considère qu'il est vivant et potentiellement apte à germer. Chaque condition (mutant plus concentration) est répétée une quinzaine de fois. Les résultats sont présentés ci-dessous et en annexe 3.



Figure 20 : Effet d'un stress osmotique sur le pollen d'*Arabidopsis thaliana*. 1 : grain de pollen intact. 2 : rupture de la membrane plasmique. 3 : rupture de la paroi. Barre d'échelle : 10 μ m.

- **Effet de l'osmolarité sur la survie des grains de pollen**

Au cours des expériences, nous avons constaté que la grande majorité des grains étaient intacts, ou présentant un cytoplasme explosé. Le cas de figure où la paroi est rompue est extrêmement rare. C'est la raison pour laquelle les graphiques montrent la proportion de pollens intacts, qui est une estimation du taux de survie. Les figures 21 et 22 ci-dessous montrent l'influence de la concentration en mannitol sur le pourcentage de grains de pollen intacts et on voit que, quelle que soit la lignée, le taux de survie est maximal pour une forte osmolarité, et diminue ensuite avec l'osmolarité. En d'autres termes, le cytoplasme est davantage susceptible d'exploser quand la concentration du milieu est faible. Les tests statistiques montrent que les différences sont significatives. On peut interpréter ce résultat en faisant l'hypothèse suivante : les grains de pollen, quand ils sont mis en contact avec la solution, sont à l'état déshydraté, l'osmolarité intracellulaire est très forte. La différence d'osmolarité entre le grain de pollen et la solution est d'autant plus forte que la concentration du milieu est faible, ce qui aurait pour effet une plus grande entrée d'eau à faible concentration qu'à forte concentration, et donc un taux de cytoplasmes éclatés plus élevé.

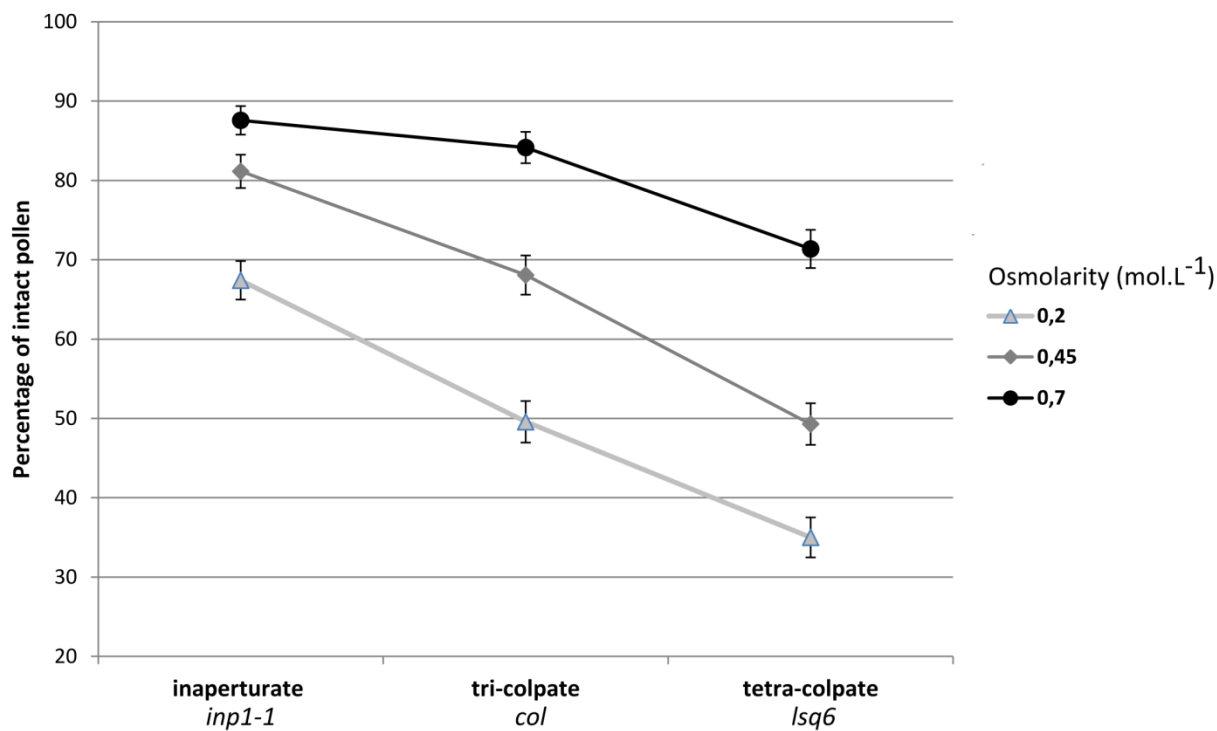


Figure 21 : Effet de l'osmolarité et du nombre d'apertures dans le fond génétique Columbia. Les individus étudiés produisent du pollen sans apertures, à trois apertures ou à quatre apertures.

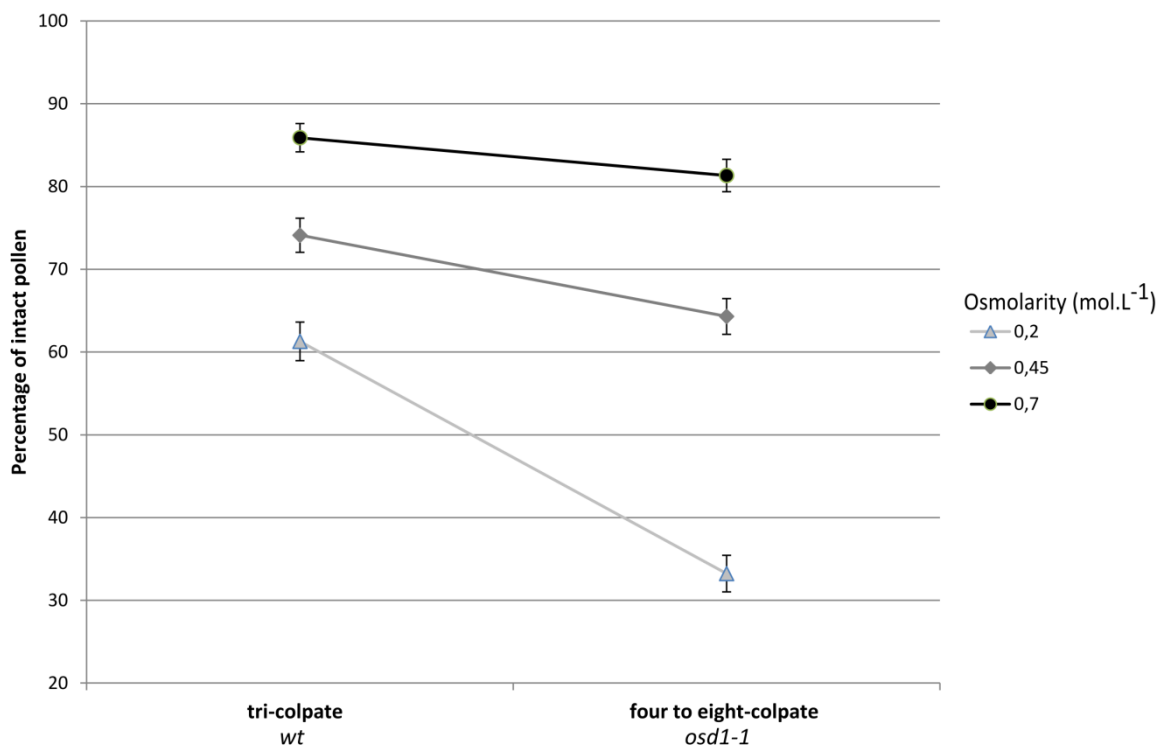


Figure 22 : Effet de l'osmolarité et du nombre d'apertures dans le fond génétique Nooséen. Les individus étudiés produisent du pollen à trois apertures, ou des pollens présentant de quatre à huit apertures.

- **Effet du nombre d'ouvertures sur la survie des grains de pollen**

La comparaison des proportions de pollens intacts en fonction du nombre d'ouvertures montre qu'un nombre d'ouvertures plus élevé est associé à un taux de survie plus faible, quelle que soit la concentration en mannitol utilisée (figures 21 et 22). Le taux de grains de pollen intacts est négativement corrélé au nombre d'ouvertures. Les tests statistiques indiquent des différences significatives. Étant donné que c'est le cytoplasme qui est fragile, et non la paroi, on peut penser qu'une augmentation du nombre d'ouvertures peut être associée à une entrée d'eau plus brutale, et donc une probabilité de rupture du cytoplasme plus grande. On peut aussi supposer qu'un nombre d'ouvertures élevé augmente le nombre de sites où la membrane plasmique est susceptible de se rompre. Le nombre d'ouvertures ne semble pas avoir d'effet direct sur la paroi, mais influence la résistance à un stress osmotique à travers son effet sur la rupture de la membrane plasmique.

- **Pressions de sélection et compromis affectant le type apertural**

Nous avons mis en évidence l'effet du type apertural sur la résistance à un stress osmotique. Cependant, les ouvertures sont impliquées dans d'autres fonctions physiologiques, ce qui peut conduire à des pressions de sélection contradictoires. Les ouvertures sont notamment le site privilégié des échanges, et de la germination du tube pollinique. On peut supposer que, contrairement au cas du stress osmotique, un nombre d'ouvertures plus élevé peut être favorable : il est possible que le grain de pollen se réhydrate plus vite, et germe plus rapidement.

Un exemple de compromis a été mis en évidence chez une espèce de violette, *Viola diversifolia* (Dajoz et al., 1991, 1993). Cette espèce présente l'avantage d'être hétéromorphe, c'est-à-dire que les individus produisent deux types de pollens différents, ici un pollen à trois ouvertures et un pollen à quatre ouvertures. Des travaux sur cette espèce ont montré que les pollens à trois ouvertures germent moins rapidement que les pollens à quatre ouvertures, mais ont une durée de vie plus longue. Le fait de produire deux types de grains de pollen est avantageux d'un point de vue évolutif. Des travaux de modélisation en théorie des jeux montrent que l'hétéromorphisme, dans ce cas, est une stratégie évolutivement stable (Till-Bottraud et al., 2001). De plus, il est intéressant de remarquer que les proportions respectives des morphes varient avec l'altitude dans le cas d'une espèce proche, *Viola calcarata*, qui produit du pollen à quatre et cinq ouvertures (Till-Bottraud et al., 1999). Le pollen à quatre ouvertures germe moins rapidement, mais a une plus grande longévité. À faible altitude, où les pollinisateurs sont relativement abondants, la proportion de pollen à cinq ouvertures est plus élevée qu'à haute altitude, où les pollinisateurs sont plus rares (et où il est avantageux d'avoir un pollen qui survit plus longtemps).

Face aux pressions de sélection contradictoires qui s'exercent sur le type apertural, certaines espèces ont développé des stratégies originales. Un certain nombre d'angiospermes dispersent en effet le pollen dans un état partiellement hydraté (Nepi et al., 2001; Franchi et al., 2002), contrairement à la majorité des espèces chez lesquelles une phase de déshydratation poussée précède l'ouverture des anthères. L'étude des espèces dispersant un pollen partiellement hydraté a révélé que ces grains de pollen particuliers germent très rapidement sur le stigmate (en quelques minutes, alors qu'il faut généralement plusieurs heures), mais ont une durée de vie raccourcie (Nepi and Pacini, 1993; Nepi et al., 2001; Franchi et al., 2002). L'examen de la morphologie pollinique chez ces espèces montre que

les grains de pollen présentent, la plupart du temps, des ouvertures en forme de pores, plus ou moins nombreux (Franchi et al., 2002).

Au vu de ces différents résultats, on peut supposer que les pollens triaperturés représentent un compromis entre plusieurs pressions de sélection : un nombre réduit d'ouvertures pourrait être associé à une durée de vie plus longue, et à une meilleure résistance face à un stress osmotique, mais il est possible qu'un nombre trop faible limite la compétitivité du grain de pollen en terme de germination. Un certain nombre d'espèces d'angiospermes produisent au moins deux types de pollens différents (Mignot et al., 1994), ce qui permet de faire face à différents contextes environnementaux.

Nous avons vu dans ce chapitre que la prédominance des grains de pollen triaperturés chez les Eudicotylédones était vraisemblablement due à une sélection stabilisante, qui limite la propagation de types aperturaux différents pouvant apparaître au cours de l'évolution. Cette sélection stabilisante favorisant les pollens à trois ouvertures est probablement le résultat de pressions de sélection contradictoires s'exerçant sur le type apertural. Ces pressions de sélection sont liées à la survie, à la longévité et à la capacité de germination du grain de pollen. Néanmoins, nous avons vu dans le premier chapitre que d'autres types aperturaux étaient présents chez les Eudicotylédones. De la même façon, si les pollens monosulqués dominent chez les Monocotylédones et les angiospermes divergeant à la base, d'autres morphologies polliniques sont présentes. Nous allons étudier un de ces cas particuliers, à savoir les pollens possédant de multiples ouvertures en forme de pores, pour regarder comment ils se répartissent au sein de l'arbre des angiospermes, et pour voir s'ils sont associés à des conditions biologiques particulières (concernant le type d'habitat, le mode de reproduction...).

III- Etude d'un type apertural particulier : les pollens pantoporés

Nous avons vu dans le premier chapitre que deux types aperturaux dominaient chez les angiospermes : les pollens monosulqués, présentant un sillon distal, se rencontrent chez la majorité des angiospermes divergeant à la base (grade ANA, Magnoliidées et Chloranthacées) ainsi que chez la plupart des Monocotylédones. Le type monosulqué correspond à l'état ancestral chez les angiospermes. Les pollens tricolpés, à trois apertures, sont caractéristiques du clade des Eudicotylédones, un groupe comprenant environ 75% des espèces d'angiospermes. C'est une synapomorphie du groupe, qui constitue jusqu'à présent la seule synapomorphie morphologique de ce grand clade.

Nous avons également vu qu'en dehors de ces deux types dominants, les types aperturaux présentaient une grande diversité chez les plantes à fleurs, que ce soit au niveau du nombre ou de la forme des apertures (figure 5 et figures 11 à 15). Ces types aperturaux, qui peuvent dériver d'un des deux types prédominants, se retrouvent plutôt en position phylogénétique apicale, et leur extension systématique est variable en fonction des groupes. Nous allons maintenant étudier plus en détail l'évolution et la distribution systématique d'un type apertural particulier, pour voir si ce type de morphologie est restreint aux branches terminales de l'arbre, et si les espèces concernées présentent des particularités.

1°/ Répartition taxonomique des pollens pantoporés

Ce travail fait l'objet d'un article qui a été soumis, et qui est présenté en annexe 4.

Afin d'étudier plus précisément la distribution de la diversité des types aperturaux, nous avons choisi de nous focaliser sur l'exemple des pollens pantoporés (figure 23), c'est-à-dire des grains de pollen présentant plusieurs apertures en forme de pores (de six à plus d'une centaine) réparties sur toute la surface du grain de pollen (Erdtman, 1952; Hesse et al., 2009). Le choix de ce type particulier a été fait en raison de critères morphologiques et développementaux. En effet, ce type apertural est assez différent des types dominants (monosulqué et tricolpé), dans la mesure où les apertures sont réparties sur toute la surface de la paroi. Même si la répartition des apertures peut être plus ou moins uniforme en fonction des espèces, cette répartition confère, d'une certaine manière, un caractère isotrope au grain de pollen : il n'y a pas de localisation privilégiée des apertures. Cette distribution pourrait avoir des conséquences sur la physiologie du grain de pollen. De plus, la forme particulière des apertures pourrait avoir certaines propriétés mécaniques, en limitant les capacités de déformation du grain de pollen, comme cela a été suggéré par des travaux de modélisation (Katifori et al., 2010).

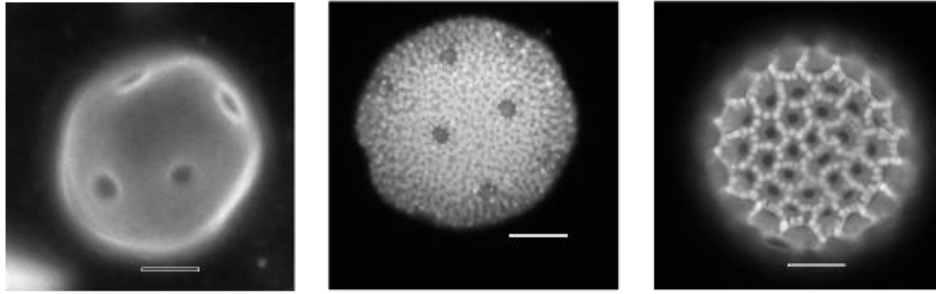


Figure 23 : exemples de pollens pantoporés. De gauche à droite : *Whitfieldia elongata* (Acanthacées), *Saponaria officinalis* (Caryophyllacées), *Tribulus terrestris* (Zygophyllacées). Barre d'échelle : 10 μm .

- **Inventaire des espèces pantoporées**

Afin d'étudier la distribution systématique des pollens pantoporés, nous avons dans un premier temps cherché à répertorier un maximum d'espèces présentant cette morphologie. Nous avons extrait de PalDat (PalDat, 2015), une base de données palynologique en ligne, toutes les espèces pantoporées. Nous avons ensuite consulté l'ouvrage de référence de Gunnar Erdtman (Erdtman, 1952), un pionnier de la palynologie qui a notamment compilé ses nombreuses observations dans un livre où il décrit les morphologies polliniques pour un très grand nombre de familles d'angiospermes. Nous avons extrait de ce livre toutes les espèces pour laquelle la description ou l'illustration correspondait à la définition du type apertural pantoporé (si un genre est décrit comme tel mais sans qu'une espèce en particulier soit nommée, la description n'est pas prise en compte ; ce cas de figure est cependant rare). Nous avons complété les informations fournies par ces deux sources principales en consultant des articles scientifiques sur le sujet, notamment des références traitant de familles particulières où les descriptions sont détaillées. L'intégralité des sources est disponible en annexe 4.

Une fois les espèces pantoporées listées, nous avons complété notre jeu de données par des espèces représentatives des plantes à fleurs. Pour chaque espèce, le type apertural (pantoporé ou non pantoporé) est renseigné. Chaque ordre d'angiosperme (soixante-et-un au total), ainsi que chaque famille comprenant plus de cent espèces, sont représentés par au moins une espèce. Si un type apertural domine au sein d'une famille, nous choisissons une espèce présentant ce type apertural. Concernant les familles présentant au moins une espèce pantoporée, nous ajoutons au moins une espèce présentant un type apertural différent, soit le type apertural dominant chez cette famille (si un tel type existe), soit en prenant une autre espèce non pantoporée. Pour les quelques familles entièrement pantoporées, nous choisissons au moins une espèce au niveau de la famille la plus proche dans l'arbre des angiospermes. Cette stratégie d'échantillonnage permet de réduire considérablement le biais en faveur des espèces pantoporées, et de produire des reconstructions réalistes.

Les reconstructions sont faites en parcimonie uniquement, l'ensemble des séquences pour toutes les espèces n'étant pas disponibles (ce qui empêche les approches basées sur des modèles, comme les reconstructions en maximum de vraisemblance). L'arbre phylogénétique utilisé est basé sur APG III (et les mises à jour régulières disponibles sur APG Website : Stevens, 2015). Quand une famille est polymorphe (c'est à dire qu'elle présente des espèces pantoporées et non pantoporées), une phylogénie récente a été utilisée pour préciser les relations entre les différentes espèces, si une telle

phylogénie existe (voir annexe 4), afin de réduire le nombre de polytomies ayant un effet sur le nombre d'origines des pollens pantoporés.

- **Mise en évidence de nombreuses origines indépendantes**

Les résultats détaillés sont disponibles en annexe 4. Dans la figure 24 ci-dessous, les espèces pantoporées correspondent aux branches colorées en rouge, tandis que les espèces non pantoporées sont en noirs. Nous pouvons voir sur cet arbre que les espèces pantoporées sont présentes chez tous les grands groupes d'angiospermes : quelques espèces se situent à la base de l'arbre, dans le grade ANA (au sein des Trimeniacées, chez les Austrobaileyales) et chez les Chloranthacées ; le grand clade des Magnoliidées ne semble pas posséder d'espèce pantoporée cependant. Un certain nombre de familles chez les Monocotylédones présentent ce type de morphologie, sept au total, chez les Alismatales, les Poales, les Zingibérales, les Dioscoréales et les Commelinales. Certains taxons de grande taille, comme l'ordre des Asparagales (36 000 espèces, qui comprend notamment les orchidées), ne possèdent pas à notre connaissance ce type de morphologie. Chez les Eudicotylédones, quarante-trois familles possèdent au moins une espèce pantoporée, et six familles sont entièrement pantoporées d'après nos données, même si ce sont plutôt des familles de taille modeste. Comme dans le reste de l'arbre, la répartition n'est pas uniforme, certains clades comme celui des Campanulidées, qui comprend notamment les Asteracées (la plus grande famille d'angiospermes), semblent dépourvus de ce type de pollen, tandis que chez certains groupes comme les Caryophyllales, cette morphologie est fréquente.

Même si notre inventaire n'est certes pas exhaustif, la reconstruction en parcimonie sur notre jeu de données met en évidence soixante-trois origines différentes pour le type apertural pantoporé chez les angiospermes. Ce chiffre n'est probablement pas exact, mais permet d'avoir un ordre de grandeur. Ce type de morphologie est donc apparu un grand nombre de fois, et est hautement convergent à l'échelle des angiospermes. On peut aussi remarquer que ce type est assez dispersé au sein de l'arbre, c'est à dire que ce sont des espèces ou de petits groupes d'espèces isolés qui sont concernés, plutôt que des grands clades. Les clades présentant des espèces pantoporés sont plutôt des clades apicaux, pour lesquels l'origine de cette morphologie dans l'arbre n'est pas très profonde. Les pollens pantoporés ne sont que rarement fixés à large échelle taxonomique. Les familles entièrement pantoporées sont de petite taille, et les grands clades pantoporés sont rares (citons cependant les Malvoidées, une partie des Thymelaeacées, une partie des Caryophyllacées comme contre-exemples). Ce type de répartition suggère une apparition facile d'un point de vue évolutif, combinée à une difficulté de persister sur le long terme.

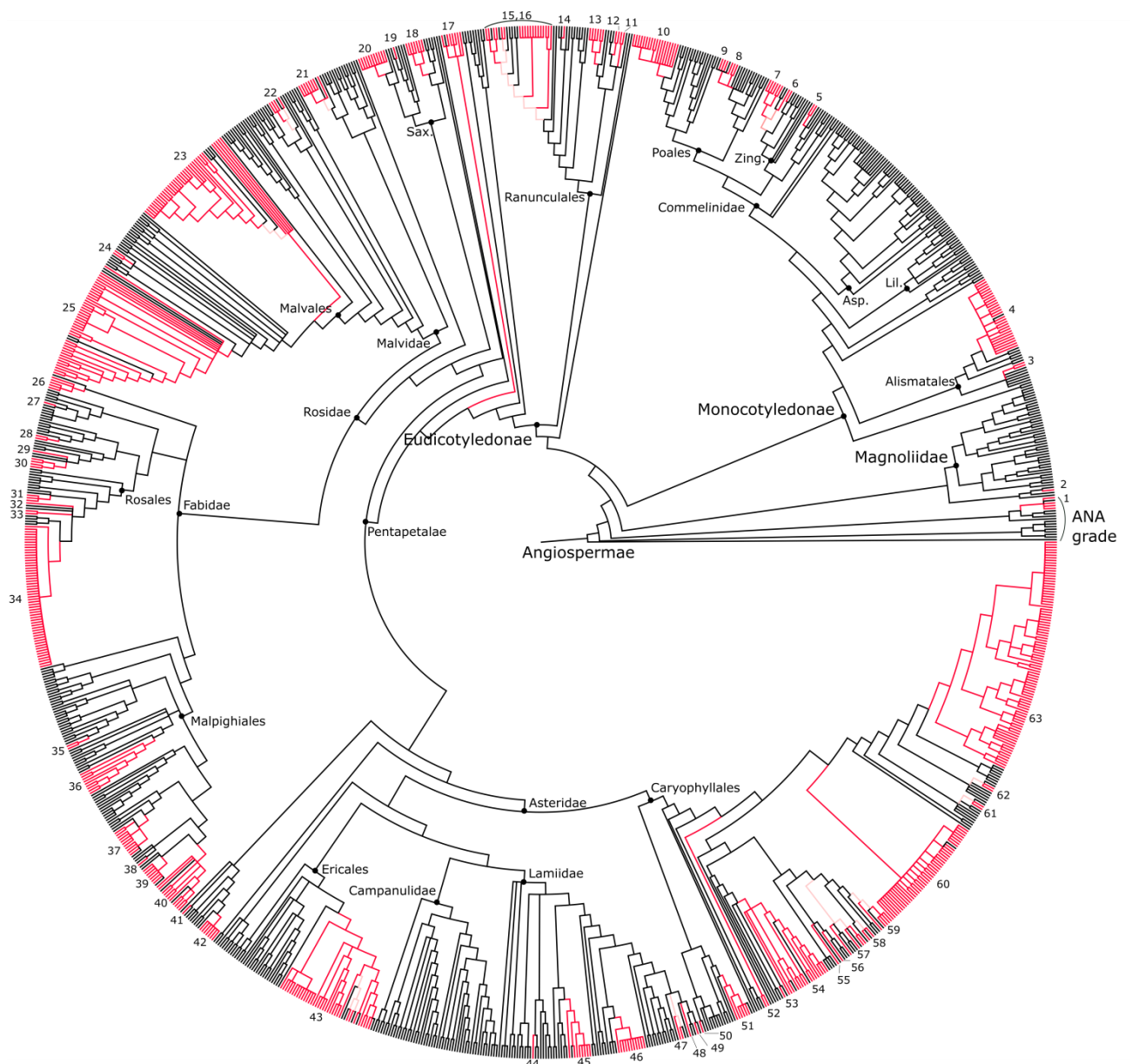


Figure 24 : distribution des pollens pantoporés chez les angiospermes (arbre de 1236 espèces dans 330 familles). Les espèces en noir ne sont pas pantoporées, les espèces en rouge sont pantoporées. Les ambiguïtés sont représentées en rose sur les branches. Les nombres en noir correspondent aux différentes origines (voir annexe 4 pour plus de détails). Les abréviations utilisées sont les suivantes : Lil. pour Liliales, Asp. pour Asparagales, Zing. pour Zingibérales, Sax. pour Saxifragales.

2°/ Un mécanisme de sélection interphylétique ?

Il semble donc (même si cette hypothèse demande à être testée) que ces pollens soient avantagés sur le court terme, mais désavantagés sur le long terme. Des études menées par d'autres équipes permettent de proposer des hypothèses sur ces deux pressions de sélections contradictoires. Des travaux sur le degré d'hydratation des grains de pollen à maturité ont montré que certains pollens pantoporés sont peu déshydratés à l'anthèse, par rapport à d'autres espèces : la plupart des grains

de pollen perdent 15 à 35% d'eau cytoplasmique avant leur libération, tandis qu'un grand nombre d'espèces pantoporées en perdent moins de 10% (Nepi and Pacini, 1993; Nepi et al., 2001; Franchi et al., 2002). Ces données sont en accord avec une étude théorique qui prédit que des ouvertures en forme de pores limitent le degré de déformation supporté par le grain de pollen lors de la phase de déshydratation avant l'anthèse (Katifori et al., 2010). Ces pollens germent rapidement quand ils arrivent sur un stigmate compatible (Nepi and Pacini, 1993; Nepi et al., 2001; Franchi et al., 2002), ce qui est probablement lié au fait qu'un état de déshydratation limitée est associé à un métabolisme plus actif que dans le cas d'un pollen déshydraté (et donc une mobilisation plus rapide des ressources cellulaires nécessaires à la germination). Ces pollens ont cependant une durée de vie assez faible en général, de l'ordre de quelques heures, contrairement aux pollens déshydratés qui peuvent survivre plusieurs jours. De fait, les plantes dispersant des pollens partiellement déshydratés (comprenant un grand nombre d'espèces pantoporées, ainsi que d'autres pollens ayant des ouvertures en forme de pores) font appel à une stratégie de reproduction particulière : les grains de pollens germent rapidement, ce qui donne un avantage compétitif immédiat, mais sont dotés d'une faible longévité. Il est donc possible que l'avantage à court terme soit lié à une germination plus rapide, tandis que le désavantage à long terme soit le résultat d'une faible longévité (et donc d'une plus grande sensibilité aux phénomènes aléatoires, tels que les conditions météorologiques, la disponibilité des pollinisateurs etc.). Ce type de sélection, la sélection interphylétique, a été mise en évidence dans d'autres cas, comme la reproduction sexuée chez les Eucaryotes (de Vienne et al., 2013), ou le maintien de l'auto-incompatibilité chez les Solanacées (Goldberg et al., 2010). Il est possible que le type apertural soit un autre exemple de sélection entre lignées chez les plantes.

Ces résultats sur les pollens pantoporés mettent en évidence le fait que, même si les pollens tricolpés et monosulqués dominent chez les angiospermes, des types aperturaux singuliers peuvent apparaître, et dans le cas des pollens pantoporés il est possible que cette morphologie soit associée à une stratégie de reproduction particulière. De tels liens entre morphologie pollinique et adaptation ont déjà été suggérés, dans certains cas particuliers. Par exemple, les espèces dispersant le pollen en milieu aquatique comme les angiospermes marines (Zoosteracées, Posidoniacées) ou *Ceratophyllum* présentent un pollen avec une exine très amincie, ce qui est interprété comme une adaptation à la dispersion en milieu aquatique (Pettitt and Jermy, 1974; Furness and Rudall, 1999). Le pollen est dispersé à un état hydraté, et la fonction mécanique de l'exine perd de son importance. Cette couche tend donc à disparaître chez ces espèces.

3°/ Microsporogenèse chez les espèces pantoporées

Un article sur cette étude a été soumis, et est présenté en annexe 5.

Comme nous l'avons évoqué au début de ce chapitre, les pollens pantoporés sont également intéressants d'un point de vue développemental. Chez la plupart des espèces, la position des ouvertures est définie par celle des derniers points de contacts entre les microspores (Wodehouse, 1935). Or, chez les pollens pantoporés, les ouvertures sont trop nombreuses pour correspondre à ces derniers points de contacts. De plus, leur répartition rend impossible ce mécanisme de positionnement des ouvertures. Il est donc possible que la microsporogenèse présente des particularités chez ces pollens, c'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser à leur développement au sein de l'anthère.

- **Des dépôts additionnels de callose corrélés à la position des apertures**

Nous avons donc collecté des boutons floraux chez des espèces produisant du pollen pantopore afin d'étudier la microsporogénèse chez ces espèces. Les récoltes ont été faites sur le campus d'Orsay et dans des jardins botaniques (Arboretum de Chèvreloup, Jardin de l'École de Botanique au Muséum National d'Histoire Naturelle, Royal Botanic Gardens à Kew). Nous avons essayé de récolter des espèces réparties dans tout l'arbre des angiospermes, même si certains taxons n'ont pu être récoltés (angiospermes divergeant à la base de l'arbre par exemple). Il est également plus facile d'étudier la microsporogénèse chez des espèces pour lesquelles le prélèvement d'un grand nombre de boutons floraux est possible, ce qui correspond en général aux espèces récoltées dans la nature. Les différents stades de développement sont brefs, donc le fait d'avoir du matériel en abondance rend les observations plus faciles. A l'inverse, certaines espèces récoltées en jardin botanique pour lesquelles un très faible nombre de boutons floraux étaient disponibles n'ont pu être étudiées correctement.

Nous avons pu faire des observations complètes sur quinze espèces, parmi lesquelles six Monocotylédones, et neuf Eudicotylédones. Pour chacune des espèces, nous avons prélevé les anthères dans les boutons floraux, que nous avons montées entre lame et lamelle dans du bleu d'aniline. Les différentes étapes de la microsporogénèse ont ensuite été observées au microscope à épifluorescence, qui permet de visualiser la callose. Les résultats obtenus sont, en partie, résumés en annexe 5, et dans les figures ci-dessous.

Chez les Monocotylédones étudiées, la cytocinèse est successive, et le mode de formation de la callose est centrifuge (voir annexe 5 et tableau 1). La forme des tétrades varie en fonction des espèces. On retrouve dans tous les cas des tétrades tétraédriques (qui est la forme la plus répandue chez les Monocotylédones) et des tétrades tétraédriques décussées, qui sont moins fréquentes. Les proportions des deux types de tétrades sont variables, mais on retrouve une part non négligeable de tétrades décussées dans tous les cas, et éventuellement d'autres formes plus rares (voir tableau 1 ci-dessous). Le type de cytocinèse et le mode de formation de la callose sont donc les mêmes que chez les espèces monosulquées, mais la forme des tétrades est plus variable. Chez les Eudicotylédones que nous avons pu observer, la cytocinèse est simultanée, et le mode de formation est centripète. On peut seulement citer comme exception le plantain lancéolé (*Plantago lanceolata*) et le daphné des alpes (*Daphne alpina*), chez qui une petite partie des cellules mères se divise de manière successive. La forme des tétrades, comme chez les Monocotylédones, est plus variable. Si on retrouve dans tous les cas des tétrades tétraédriques, qui est la forme la plus répandue chez les Eudicotylédones, on observe chez certaines espèces des formes plus atypiques, comme des tétrades rhomboïdales (qui peuvent représenter la majorité des tétrades, comme c'est le cas chez le plantain lancéolé, le daphné des alpes et *Whitfieldia elongata* : voir tableau 1 ci-dessous).

| Espèce | Cytocinèse | Formation de la callose | Tétrades | DA de callose |
|--|--|-------------------------|----------------------------------|---------------|
| <i>Alisma plantago-aquatica</i> (Alismatacées, Monocot.) | Successive | Centrifuge | Tg (47%) – TgD (43%) – Ir (10%) | Oui |
| <i>Anthurium crystallinum</i> (Aracées, Monocot.) | Successive | Centrifuge | Tg (54%) – TgD (32%) – Ir (14%) | Oui |
| <i>Costus lucanusianus</i> (Costacées, Monocot.) | Successive | Centrifuge | Tg (69%) – TgD (31%) | Oui |
| <i>Cheilocostus speciosus</i> (Costacées, Monocot.) | Successive | Centrifuge | Tg (67.5%) – TgD (32.5%) | Oui |
| <i>Hedychium coronarium</i> (Zingiberacées, Monocot.) | Successive | ND | ND | Oui |
| <i>Tapeinochilos ananassae</i> (Costacées, Monocot.) | Successive | Centrifuge | Tg (79%) – TgD (21%) | Oui |
| <i>Juglans regia</i> (Juglandacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Td (100%) | Oui |
| <i>Saponaria officinalis</i> (Caryophyllacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Td (96%) – Rh (4%) | Oui |
| <i>Silene pendula</i> (Caryophyllacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Td (81%) – Rh (19%) | Oui |
| <i>Stellaria media</i> (Caryophyllacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Td (98%) – Rh (2%) | Oui |
| <i>Plantago lanceolata</i> (Plantaginacées, Eudicot.) | Simultanée, et successive dans de rares cas | Centripète | Rh (73%) – Th (24%) – Ir (3%) | Non |
| <i>Calystegia sepium</i> (Convolvulacées, | Simultanée | Centripète | Th (5%) – Rh (5%) | Non |

| | | | | |
|---|--|------------|----------------------------------|-----|
| Eudicot.) | | | | |
| <i>Whitfieldia elongata</i> (Acanthacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Rh (65%) – Th (35%) | Non |
| <i>Daphne alpina</i> (Thymelaeacées, Eudicot.) | Simultanée, et successive dans de rares cas | Centripète | Rh (64%) – Th (35%) – Ir (1%) | Non |
| <i>Malva moschata</i> (Malvacées, Eudicot.) | Simultanée | Centripète | Th (76%) – Rh (24%) | Non |

Tableau 1 : Microsporogénèse chez des angiospermes produisant du pollen pantoporé. DA est l'abréviation de dépôts additionnels. Pour les tétrades, Td correspond à tétraédrique, Tg à tétragonal, TgD à tétragonal décussé, Rh à rhomboïdal, Ir à des formes irrégulières rares (linéaires, en T, en Z...). Les comptages ont été faits sur un échantillon de 100 tétrades minimum, sauf pour *Cheilocostus speciosus* où 80 tétrades ont été comptées. Pour *Hedychium coronarium*, nous n'avons pas pu observer le mode de dépôt de la callose, et les tétrades étaient trop peu nombreuses pour déterminer de manière fiable leur forme majoritaire.

Nous voyons que le type de cytokinèse et le mode de formation de la callose sont les mêmes chez les espèces pantoporées et les espèces proches non pantoporées. La forme des tétrades est en revanche plus variable. Cela peut s'interpréter comme un relâchement des pressions de sélection exercées sur la microsporogénèse, dans le cas où la position des ouvertures n'est pas déterminée par la forme des tétrades (voir chapitre 1). Cependant, une autre différence marquante entre espèces pantoporées et non pantoporées est observable au stade tétrade : chez une dizaine d'espèces parmi les quinze espèces étudiées (voir tableau 1), nous avons trouvé des dépôts additionnels de callose, sous la forme de spots ou de points, répartis sur toute la surface de la paroi (figure 25). Ces spots de callose sont corrélés à la position des futures ouvertures. Des dépôts semblables avaient auparavant été décrits chez deux espèces (*Ipomoea purpurea* dans Waterkeyn and Bienfait, 1970 et *Portea silveirae* dans Albert et al., 2014), mais leur éventuelle présence chez d'autres angiospermes n'avait pas été évaluée. On les retrouve ici chez une dizaine d'espèces d'angiospermes, qui ne sont pas proches phylogénétiquement.

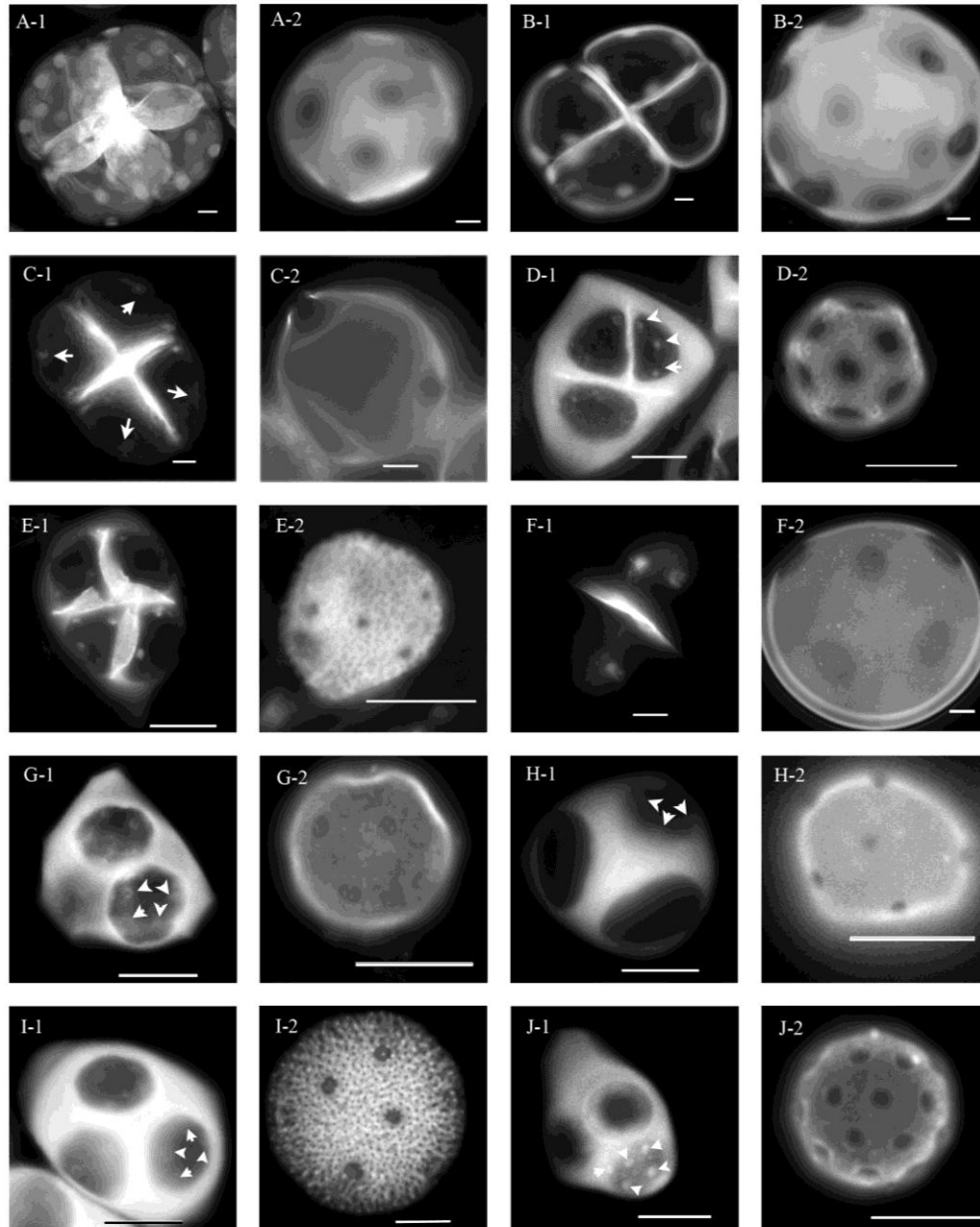


Figure 25 : dépôts additionnels de callose chez les espèces pantoporées au stade tétrade (1), et grain de pollen correspondant (2). (A) *Costus lucanusianus*, (B) *Cheilocostus speciosus*, (C) *Tapeinochilos ananassae*, (D) *Alisma plantago-aquatica*, (E) *Anthurium crystallinum*, (F) *Hedychium coronarium*, (G) *Stellaria media*, (H) *Juglans regia*, (I) *Saponaria officinalis*, (J) *Silene pendula*. Les spots de callose sont indiqués par des flèches chez certaines espèces. Barre d'échelle : 10 μ m.

On peut cependant noter que ces dépôts additionnels n'ont pas été trouvés chez toutes les espèces pantoporées prélevées. Il est possible que ceci soit dû au fait que ces dépôts sont observables pendant une durée très brève. Il est donc nécessaire d'avoir du matériel au bon stade, en quantité suffisante, ce qui est difficile notamment pour les prélèvements effectués dans les jardins botaniques. De plus, certaines espèces (par exemple de nombreuses Malvacées) possèdent un grand nombre de pores de petite taille : même si les ouvertures étaient dans ce cas associées à des dépôts additionnels de callose, il est probable que ceux-ci seraient difficilement visibles en épifluorescence.

Il est également possible, évidemment, que ces dépôts ne soient pas présents chez toutes les espèces pantoporées, et que différents mécanismes soient mis en jeu dans la détermination du type apertural pantoporé.

Le fait que ces dépôts additionnels soient présents chez des espèces éloignées indique que ces dépôts sont apparus plusieurs fois de manière indépendante. Il est possible (même si il faudrait faire une étude plus détaillée) que les dépôts soient homologues à l'échelle d'une même famille (*Silene*, *Saponaria* et *Stellaria* chez les Caryophyllacées et *Costus*, *Cheilocostus* et *Tapeinochilos* chez les Costacées). Cependant, si on se place à l'échelle des angiospermes, les taxons étudiés sont assez éloignés dans l'arbre phylogénétique. Chez les Monocotylédones trois ordres différents ont été échantillonnés, et les différentes familles d'Eudicotylédones ne sont pas étroitement apparentées, ce qui suggère que ces dépôts sont des convergences. Nous pouvons avancer que ces dépôts additionnels de callose associés aux apertures sont apparus de nombreuses fois chez les angiospermes.

- **Hypothèses sur l'implication de la callose dans la formation des apertures**

On peut dès lors se poser la question du lien entre les dépôts additionnels de callose et la formation des apertures. Ces dépôts, corrélés à la position des apertures, ont été mis en évidence chez un certain nombre d'espèces pantoporées, mais aussi chez des espèces présentant d'autres types aperturaux. Il peut s'agir de types aperturaux atypiques, comme chez *Typha latifolia* (monoporé), *Hohenbergia stellata* (tétraporé), *Calycanthus floridus* (disulqué ; voir Albert et al., 2011 pour ces trois espèces) et *Grevillea rosmarinifolia* (triporé : voir Albert and Nadot, 2010). Ces dépôts additionnels ont également été trouvés chez des espèces possédant des types aperturaux plus répandus, chez qui le mécanisme impliquant les derniers points de contact entre les microspores peut tout à fait fonctionner. Chez les Eudicotylédones des dépôts additionnels de callose corrélés à la position des apertures existent chez la vesce des haies (pollen tricolporé), la consoude officinale (pollen 9-colporé) et le myosotis des marais (pollen hexacolporé ; voir annexe 6). Ces dépôts sont aussi présents chez plusieurs espèces de Monocotylédones produisant un pollen monosulqué (Toghranegar et al., 2013), chez certaines Broméliacées (Albert et al., 2014). Ils ont également été décrits chez des angiospermes divergeant à la base, et chez des Eudicotylédones (article soumis présenté en annexe 6).

Il semble donc que ces dépôts ne soient pas rares chez les angiospermes, et on les trouve même chez des espèces produisant du pollen monosulqué et du pollen tricolpé. Même si il est possible qu'il n'y ait pas de lien causal entre les dépôts additionnels de callose et la formation des apertures (c'est à dire qu'il s'agisse d'une simple corrélation), nous pouvons tout de même émettre des hypothèses sur le rôle potentiel de ces dépôts dans la formation des apertures. Si la formation de l'exine a été l'objet de nombreuses études (Blackmore et al., 2007; Ariizumi and Toriyama, 2011), notamment grâce à l'obtention de mutants chez *Arabidopsis*, le mécanisme moléculaire de formation des apertures n'a pas été autant étudié. Chez une espèce de Carophyllacées (*Silene pendula*, qui présente un pollen pantoporé), des citernes de réticulum endoplasmique plaquées contre la paroi au niveau des futures apertures au stade tétrade ont été décrites (Heslop-Harrison, 1963). On a trouvé par la suite d'autres cas avec du réticulum au niveau des futures apertures (Echlin and Godwin, 1968; Dickinson and Heslop-Harrison, 1971). Le réticulum endoplasmique est classiquement décrit comme étant impliqué

dans la formation des apertures, mais le rôle qu'il pourrait jouer n'a pas été éclairci. Le fait qu'on trouve chez la même espèce, *Silene pendula*, à la fois du réticulum et des dépôts additionnels de callose montre que ces deux structures ne sont pas exclusives l'une de l'autre : il est possible qu'elles interagissent dans la formation des apertures.

Récemment, une expérience de mutagenèse chez *Arabidopsis* (Dobritsa et al., 2011), qui produit du pollen tricolpé, a permis de produire un grand nombre de mutants, en particulier des mutants ayant un nombre d'apertures anormalement élevé (mutants *lsq* et *isp*), et un mutant sans ouverture (Dobritsa et al., 2011; Dobritsa and Coerper, 2012). L'étude approfondie de ce mutant a mis en évidence l'implication d'une protéine, INP1, dont la fonction précise reste encore inconnue (Dobritsa and Coerper, 2012). Une mutation dans le gène correspondant entraîne la production de grains de pollen sans ouvertures, et un niveau d'expression plus faible est associé à des sillons plus courts. Cette protéine se localise le long de trois sillons, qui correspondent à la position des futures ouvertures. Cette protéine est donc certes impliquée dans leur formation, mais son mode d'action demeure pour le jour mystérieux.

Une autre piste consiste à s'intéresser à la formation de l'exine à partir d'une matrice présente au stade tétrade, la primexine (figure 26). La primexine est constituée de polysaccharides, et comporte notamment des structures appelées probaculae (figure 26), sur lesquelles vont être déposées des monomères impliqués plus tard dans la formation de sporopollénine, principal constituant de l'exine (Suzuki et al., 2008; Ariizumi and Toriyama, 2011). Il est possible que les dépôts additionnels de callose au stade tétrade inhibent la fixation de ces monomères sur les probaculae, et par conséquent définissent la position des apertures.

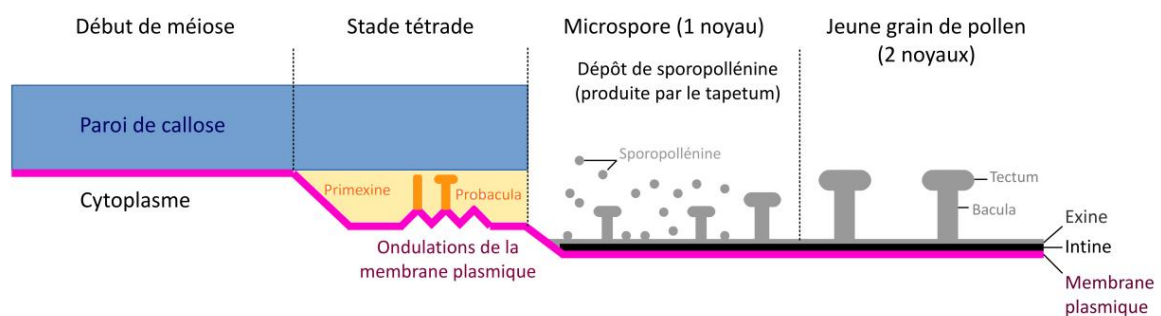


Figure 26 (modifiée d'après Ariizumi 2011) : modèle de formation de la paroi pollinique au cours de la microsporogénèse et de la maturation des microspores. Avant d'entrer en méiose, la cellule mère diploïde s'entoure d'une paroi de callose, qui va persister pendant la microsporogénèse, et disparaître avant la libération des microspores haploïdes. La primexine est déposée au stade tétrade, et des probaculae se forment au niveau des crêtes générées par les ondulations de la membrane plasmique. Ces probaculae, après libération des microspores et digestion de la callose par des callases, servent de support pour la polymérisation de la sporopollénine.

Conclusion

L'étude du type apertural du pollen chez les angiospermes nous a permis de dégager des résultats sur l'évolution des formes, dans ce cas particulier. La reconstruction de l'évolution du type apertural à grande échelle nous montre que les types aperturaux sont diversifiés chez les angiospermes, mais que cette diversité est structurée : deux types principaux dominant, les pollens monosulqués à la base de l'arbre et chez les Monocotylédones, et les pollens tricolpés (ou tricolporés) chez les Eudicotylédones. Les variations par rapport à ces deux types principaux se situent plutôt en position apicale sur l'arbre, et ont une faible étendue taxonomique. Ceci suggère une apparition récente au cours de l'histoire des angiospermes. On peut quelquefois interpréter ces types aperturaux atypiques en fonction des particularités biologiques de l'espèce à laquelle ils appartiennent (pollens inaperturés chez les plantes aquatiques : Pettitt and Jermy, 1974; Furness and Rudall, 1999), mais ce cas de figure reste assez rare. Les variations par rapport aux pollens monosulqués et tricolpés ne sont généralement pas immédiatement interprétables. En nous focalisant sur un type de variant particulier (les pollens avec de multiples ouvertures circulaires, ou pollens pantoporés), nous avons vu que ce pattern de répartition était d'autant plus visible : ce type de morphologie apparaît de manière récurrente, dans tous les groupes, mais n'est que très rarement fixé à large échelle. Il est possible que ce type de pollen soit associé à un mode de reproduction particulier (le pollen peu déshydraté ayant une très courte durée de vie, mais germant très rapidement), même si ces hypothèses demandent à être confirmées.

Dans le cas du pollen tricolpé, nous avons pu montrer que la dominance de ce type apertural chez les Eudicotylédones était vraisemblablement due à une sélection stabilisante plutôt qu'à des contraintes développementales. Il a été montré dans certains cas que le type apertural correspond à un compromis évolutif, les ouvertures étant impliquées dans plusieurs processus affectant la survie et le succès reproductif du pollen (Dajoz et al., 1991; Till-Bottraud et al., 1999). Nous pouvons faire l'hypothèse que le nombre de trois ouvertures constitue une configuration favorable. Chez les violettes, un nombre élevé d'ouvertures est plus favorable en terme de germination, mais diminue la longévité du grain de pollen ; chez *Arabidopsis*, un nombre d'ouvertures élevé réduit la survie face à un stress osmotique. Il est donc possible qu'un pollen à trois ouvertures constitue un certain optimum en termes de survie et de reproduction. Chez certaines espèces, les individus produisent plusieurs types de grains de pollen, certains germant plus vite mais vivant moins longtemps (et inversement), ce qui permet de combiner plusieurs stratégies de reproduction et d'augmenter la valeur sélective de l'individu. Ce phénomène, l'hétéromorphisme, a été modélisé en théorie des jeux, et il a été montré qu'il constitue une stratégie évolutivement stable (Till-Bottraud et al., 2001). Ceci pourrait expliquer le fait que près de nombreuses espèces d'Eudicotylédones soient hétéromorphes au niveau du pollen (Mignot et al., 1994).

Nous avons montré que la stase portant sur le développement du pollen chez les Eudicotylédones était due à une sélection stabilisante, ce qui indique que la dominance du pollen tricolpé est vraisemblablement due à des processus sélectifs plutôt qu'à des contraintes développementales. L'étude du développement de l'autre grand clade d'angiospermes, les Monocotylédones, pourrait indiquer que la dominance du pollen monosulqué dans ce groupe serait également due à la

sélection. L'étude des stases évolutives a commencé avec l'examen attentif du registre fossile, qui offre de nombreux exemples de ce phénomène. Depuis, l'utilisation de méthodes comparatives et expérimentales sur des organismes actuels a permis de discuter les causes de ce phénomène, et de comparer l'influence de la sélection et des contraintes. Le rôle des contraintes développementales dans les phénomènes macroévolutifs a été pointé du doigt par S. J. Gould et R. C. Lewontin dans leur célèbre métaphore des pendentifs de Saint Marc (Gould and Lewontin, 1979), pour critiquer la vision adaptationniste de l'évolution. Si la sélection et les processus adaptatifs jouent un rôle important dans l'évolution, les contraintes influencent également la production de nouvelles formes ; néanmoins, nous n'avons pas pu ici mettre en évidence l'implication de telles contraintes dans le cas du pollen. L'étude de la microsporogénèse, ou méiose mâle des angiospermes, donne cependant ici un résultat intéressant. Nous avons vu que, dans la majorité des cas, la position des ouvertures est déterminée par les derniers points de contacts entre les microspores, et ces derniers points de contacts dépendent de certaines caractéristiques du développement. Dans certains cas cependant, il semblerait que la position des ouvertures soit déterminée par des dépôts additionnels de callose, qui permettent alors de s'affranchir du mécanisme impliquant les derniers points de contacts entre les microspores. Ce mécanisme alternatif permet de produire de nouvelles formes, qui ne sont pas forcément réalisables via le mécanisme des derniers points de contacts, et de garder une certaine flexibilité évolutive par rapport à la détermination des ouvertures.

Nous avons pu voir au cours de cette étude que le pollen était un bon exemple pour étudier l'évolution des formes chez les êtres vivants. Dans ce cas particulier, les processus sélectifs semblent jouer un rôle important pour expliquer les formes observées, ainsi que la structuration de leur diversité. Le développement est flexible, et permet de générer un certain nombre de morphologies, la sélection naturelle faisant ensuite le tri parmi ces formes. L'étude de l'évolution des formes est riche d'enseignements, tant sur le plan théorique que sur le plan pratique, et le grain de pollen constitue un bon modèle pour ce type d'étude.

Glossaire

Aperture : zone de la paroi dépourvue d'exine, où se font les échanges avec l'environnement, et où germe le tube pollinique. Les apertures peuvent avoir diverses formes : sillon, pore, ou sillon avec un pore au centre.

Colporus : colpus présentant un pore, ou endoaperture, en son centre. Cette forme d'aperture est toujours en position équatoriale.

Colpus : aperture en forme de sillon, située en position équatoriale dans la tétrade.

Exine : couche externe de la double paroi du pollen, constituée principalement de sporopollénine.

Inaperturé : pollen sans apertures.

Intine : couche interne de la double paroi du pollen, de nature pecto-cellulosique.

Microsporogénèse : méiose mâle des angiospermes, permettant de produire quatre microspores haploïdes à partir d'une cellule mère diploïde. Ces microspores haploïdes se différencient ensuite en grains de pollen.

Monosulqué : pollen possédant un sillon distal.

Pantoaperturé : le terme « panto » signifie que les apertures sont disposées sur toute la surface du grain de pollen, de manière plus ou moins régulière. Ainsi, le terme **pantocolpé** désigne un grain de pollen présentant un réseau de sillons sur toute sa surface, et le terme **pantoporé** désigne un grain de pollen présentant de multiples pores répartis sur toute la paroi.

Spiraperturé : sillon ou ensemble de sillons définissant des apertures irrégulières sur la paroi, plus ou moins en forme de spirale.

Sulcus : aperture en forme de sillon, située en position distale dans la tétrade.

Tricolpé/tricolporé : pollen possédant trois sillons équatoriaux (tricolpé) ou trois sillons équatoriaux avec un pore central (tricolporé).

Bibliographie

- ALBERCH, P. 1982. Developmental constraints in evolutionary processes. *In* B. JT [ed.], *Evolution and development*, 313–332. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- ALBERT, B., AND S. NADOT. 2010. Aperture ontogeny in the Proteaceae *Grevillea rosmarinifolia*. *In* B. Kaiser [ed.], *Pollen: structure, types and effects.*, 349–354. Novapublisher.
- ALBERT, B., C. RAQUIN, M. PRIGENT, S. NADOT, F. BRISSET, M. YANG, AND A. RESSAYRE. 2011. Successive microsporogenesis affects pollen aperture pattern in the tam mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 107: 1421–1426.
- ALBERT, B., A. RESSAYRE, AND S. NADOT. 2011. Correlation between pollen aperture pattern and callose deposition in late tetrad stage in three species producing atypical pollen grains. *American Journal of Botany* 98: 189–196.
- ALBERT, B., Z. TOGHRANEGAR, AND S. NADOT. 2014. Diversity and evolution of microsporogenesis in Bromeliaceae. *Bot. J. Linnean Soc.* 176: 36–45.
- ARIIZUMI, T., AND K. TORIYAMA. 2011. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual review of plant biology* 62: 437–460.
- BLACKMORE, S., A.H. WORTLEY, J.J. SKVARLA, AND J.R. ROWLEY. 2007. Pollen wall development in flowering plants: Tansley review. *New Phytologist* 174: 483–498.
- BURT, D.B. 2001. Evolutionary stasis, constraint and other terminology describing evolutionary patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 509–517.
- CHARLESWORTH, B., R. LANDE, AND M. SLATKIN. 1982. A Neo-Darwinian Commentary on Macroevolution. *Evolution* 36: 474–498.
- D'ERFURTH, I., S. JOLIVET, N. FROGER, O. CATRICE, M. NOVATCHKOVA, AND R. MERCIER. 2009. Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biology* 7: .
- DAJOZ, I., I. TILLBOTTRAUD, AND P.H. GOUYON. 1993. Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution* 47: 1080–1093.
- DAJOZ, I., I. TILL-BOTTRAUD, AND P.H. GOUYON. 1991. Evolution of pollen morphology. *Science* 253: 66–68.
- DAVIS, C.C., H. SCHAEFER, Z. XI, D. A BAUM, M.J. DONOGHUE, AND L.J. HARMON. 2014. Long-term morphological stasis maintained by a plant-pollinator mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 5914–9.
- DICKINSON, H.G., AND J. HESLOP-HARRISON. 1971. The mode of growth of the inner layer of the pollen-grain exine in *Lilium*. *Cytobios* 4: 233–243.
- DOBRI TSA, A. A., A. GEANCONTERI, J. SHRESTHA, A. CARLSON, N. KOOYERS, D. COERPER, E. URBANCZYK-WOCHNIAK, ET AL. 2011. A Large-Scale Genetic Screen in *Arabidopsis* to Identify Genes Involved in Pollen Exine Production. *Plant Physiology* 157: 947–970.

- DOBRIKSA, A. A., AND D. COERPER. 2012. The novel plant protein INAPERTURATE POLLEN1 marks distinct cellular domains and controls formation of apertures in the Arabidopsis pollen exine. *The Plant cell* 24: 4452–64.
- DONOGHUE, M.J., AND J. A. DOYLE. 1989. Phylogenetic studies of seed plants and angiosperms based on morphological characters. *The hierarchy of life: molecules and morphology in phylogenetic analysis* 181–193.
- DOYLE, J. A. 2005. Early evolution of angiosperm pollen as inferred from molecular and morphological phylogenetic analyses. *Grana* 44: 227–251.
- DOYLE, J.A., AND C. HOTTON. 1991. Diversification of early Angiosperms pollen in a cladistic context. In S. Blackmore, and S. H. Barnes [eds.], *Pollen and Spores: Patterns of Diversification*, 169–195. Oxford.
- ECHLIN, P., AND H. GODWIN. 1968. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. II. Pollen grain development through the callose special wall stage. *Journal of cell science* 3: 175–186.
- EDLUND, A.F., R. SWANSON, AND D. PREUSS. 2004. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *The Plant cell* 16: S84–S97.
- ERDTMAN, G. 1952. *Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms (an introduction to palynology)*. Almqvist and Wiksell, Stockholm.
- FRANCHI, G.G., M. NEPI, A. DAFNI, AND E. PACINI. 2002. Partially hydrated pollen: Taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* 234: 211–227.
- FRASER, W.T., A.C. SCOTT, A.E.S. FORBES, I.J. GLASSPOOL, R.E. PLOTNICK, F. KENIG, AND B.H. LOMAX. 2012. Evolutionary stasis of sporopollenin biochemistry revealed by unaltered Pennsylvanian spores. *New Phytologist* 196: 397–401.
- FURNESS, C. A., AND P.J. RUDALL. 1999. Inaperturate Pollen in Monocotyledons. *International Journal of Plant Sciences* 160: 395–414.
- FURNESS, C. A. 2007. Why does some pollen lack apertures? A review of inaperturate pollen in eudicots. *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 28–48.
- FURNESS, C. A., AND P.J. RUDALL. 2004. Pollen aperture evolution - A crucial factor for eudicot success? *Trends in Plant Science* 9: 154–158.
- GOLDBERG, E.E., J.R. KOHN, R. LANDE, AND K.A. ROBERTSON. 2010. Species selection maintains self-incompatibility. 330: 493–496.
- GOULD, S.J., AND R.C. LEWONTIN. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)* 205: 581–598.
- HALBRITTER, H. 2005a. *Bryonia dioica*. In: *PalDat (2005-06-01) - a palynological database. Published on the Internet*. Available at: https://www.paldat.org/pub/Bryonia_dioica/107519 [Accessed February 10, 2015].

- HALBRITTER, H. 2005b. *Butomus umbellatus*. In: *PalDat (2005-06-01) - a palynological database. Published on the Internet*. Available at: https://www.paldat.org/pub/Butomus_umbellatus/100480 [Accessed February 10, 2015].
- HESLOP-HARRISON, J. 1979a. An Interpretation of the Hydrodynamics of Pollen. *American Journal of Botany* 66: 737.
- HESLOP-HARRISON, J. 1963. An Ultrastructural Study of Pollen Wall Ontogeny in *Silene Pendula*. *Grana Palynologica* 4: 7–24.
- HESLOP-HARRISON, J. 1979b. Pollen walls as adaptive systems. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66: 813–829.
- HESSE, M., M. WEBER, R. BUCHNER, A. FROSCHE-RADIVO, AND S. ULRICH. 2009. *Pollen Terminology - An illustrated handbook*. Springer.
- KATIFORI, E., S. ALBEN, E. CERDA, D.R. NELSON, AND J. DUMAIS. 2010. Foldable structures and the natural design of pollen grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 7635–7639.
- LU, L., A.H. WORTLEY, D. LI, H. WANG, AND S. BLACKMORE. 2015. Evolution of Angiosperm Pollen. 2. The Basal Angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 100(3): 227–269.
- MADDISON, W.P., AND D. MADDISON. 2011. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.75. Available at: <http://mesquiteproject.org>.
- MAGALLÓN, S., G. SANDRA, AND L. LUNA. 2015. A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *New Phytologist*.
- MATAMORO-VIDAL, A., C. A. FURNESS, P.H. GOUYON, K.J. WURDACK, AND B. ALBERT. 2012. Evolutionary stasis in Euphorbiaceae pollen: Selection and constraints. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 1077–1096.
- MAYNARD SMITH, J., R. BURIAN, S. KAUFFMAN, A. ALBERCH, J. CAMPBELL, B. GOODWIN, R. LANDE, ET AL. 1985. Developmental Constraints and Evolution: A Perspective from the Mountain Lake Conference on Development and Evolution. *The Quarterly Review of Biology* 65: 265–287.
- MIGNOT, A., C. HOSS, I. DAJOZ, C. LEURET, J.-P. HENRY, J.-M. DREUILLAUX, E. HEBERLE-BORS, AND I. TILL-BOTTRAUD. 1994. Pollen aperture polymorphism in the Angiosperms: importance, possible causes and consequences. *Acta Botanica Gallica* 141: 109–122.
- NEPI, M., G.G. FRANCHI, AND E. PACINI. 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216: 171–180.
- NEPI, M., AND E. PACINI. 1993. Pollination, Pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 527–536.
- PALDAT. 2015. PalDat. *Society for the Promotion of Palynological Research in Austria*. Available at: <http://www.paldat.org/> [Accessed January 1, 2015].
- PAYNE, W.W. 1972. Observations of Harmomegathy in Pollen of Anthophyta. *Grana* 12: 93–98.

- PENET, L., M. LAURIN, P.H. GOUYON, AND S. NADOT. 2007. Constraints and selection: Insights from microsporogenesis in Asparagales. *Evolution and Development* 9: 460–471.
- PETTITT, J.M., AND A. C. JERMY. 1974. Pollen in hydrophilous angiosperms. *Micron (1969)* 5: 377–405.
- PIERCE, N.B., AND M.G. SIMPSON. 2009. Polyaperturate pollen types and ratios of heteromorphism in the monocot genus *Conostylis* (Haemodoraceae). *Australian Systematic Botany* 22: 16–30.
- RESSAYRE, A., B. GODELLE, C. RAQUIN, AND P.H. GOUYON. 2002. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. *Journal of Experimental Zoology* 294: 122–135.
- SANNIER, J., S. NADOT, A. FORCHIONI, M. HARLEY, AND B. ALBERT. 2006. Variations in the microsporogenesis of monosulcate palm pollen. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 93–102.
- STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Available at: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- SUZUKI, T., K. MASAOKA, M. NISHI, K. NAKAMURA, AND S. ISHIGURO. 2008. Identification of kaonashi mutants showing abnormal pollen exine structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 1465–1477.
- TILL-BOTTRAUD, I., P.H. GOUYON, D.L. VENABLE, AND B. GODELLE. 2001. The number of competitors providing pollen on a stigma strongly influences intraspecific variation in number of pollen apertures. *Evolutionary Ecology Research* 3: 231–253.
- TILL-BOTTRAUD, I., M. VINCENT, I. DAJOZ, AND A. MIGNOT. 1999. Pollen aperture heteromorphism. Variation in pollen-type proportions along altitudinal transects in *Viola calcarata*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la Vie* 322: 579–589.
- TOGHANEGAR, Z., S. NADOT, AND B. ALBERT. 2013. Variation of microsporogenesis in monocots producing monosulcate pollen grains. *Annals of Botany* 112: 135–139.
- DE VIENNE, D.M., T. GIRAUD, AND P.H. GOUYON. 2013. Lineage Selection and the Maintenance of Sex. *PLoS ONE* 8: e66906. doi:10.1371/journal.pone.0066906.
- WALKER, J.W., AND J.A. DOYLE. 1975. The bases of angiosperm phylogeny, palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 664–723.
- WATERKEYN, L., AND A. BIENFAIT. 1970. On a Possible Function of the Callosic Special Wall in *Ipomoea Purpurea* (L) Roth. *Grana* 10: 13–20.
- WODEHOUSE, R.P. 1935. Pollen grains: their structure, identification and significance, in science and medicine. Hafner Publishing CO, New York.
- WORTLEY, A.H., H. WANG, L. LU, D. LI, AND S. BLACKMORE. 2015. Evolution of Angiosperm Pollen. 1. Introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 100 (3) : 177-226.