



Approches moléculaires et cellulaires pour comprendre le phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé dans le but de produire efficacement des plantes haploïdes doublées

Julie Canonge

► To cite this version:

Julie Canonge. Approches moléculaires et cellulaires pour comprendre le phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé dans le but de produire efficacement des plantes haploïdes doublées. Biologie végétale. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS079 . tel-03605230

HAL Id: tel-03605230

<https://theses.hal.science/tel-03605230>

Submitted on 11 Mar 2022

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.

THESE DE DOCTORAT

SORBONNE UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE 227

Sciences de la Nature et de l'Homme : écologie et évolution

Présentée par **Julie Canonge**

Pour obtenir le grade de docteur

SPECIALITE : Biologie végétale intégrative

Approches cellulaires et moléculaires pour comprendre le phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé dans le but de produire efficacement des plantes haploïdes doublées

Dirigée par **Philippe Potin**, *Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins-UMR
8227 SU-CNRS Station Biologique de Roscoff*

Co-encadrée par **Manuelle Bodin**, *Entreprise Vegenov, Saint Pol de Léon*

Présentée et soutenue publiquement le 09 mars 2021 à Roscoff, devant un jury composé de :

Chèvre , Anne-Marie,	Directrice de Recherche INRAE (HDR),	Rapportrice
Pfannschmidt , Thomas,	Professeur (Hab.) Université de Hannover,	Rapporteur
Kloareg , Bernard,	Professeur Sorbonne Université,	Examineur
Girardeau , Pascal,	Chercheur entreprise SECOBRA,	Examineur
Potin , Philippe,	Directeur de Recherche CNRS (HDR),	Directeur de thèse
Bodin , Manuelle,	Docteur,	Co-encadrante
Philippot , Murielle,	Ingénieur d'études, Vegenov	Invitée

Remerciements

Je remercie **Manuelle Bodin** pour avoir encadrée ma thèse et m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire à Vegenov. Je te remercie également de m'avoir donné la chance de pouvoir réaliser cette thèse et de participer à des congrès internationaux. Je te suis reconnaissante pour la rigueur scientifique que tu m'as transmise pendant ces trois années et pour ta disponibilité.

Je remercie **Philippe Potin**, mon directeur de thèse. Je te remercie pour l'intérêt et l'enthousiasme que tu as porté à mes travaux de doctorat. Je tenais à te remercier pour tes précieux conseils, tes encouragements et ton soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie également **Serge Mabeau**, directeur de Vegenov, de m'avoir accueilli dans les meilleures conditions et d'avoir financé ma thèse. Je remercie **Catherine Boyen** pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'UMR 8227 à la Station Biologique de Roscoff.

Murielle Philippot, je tenais à te remercier pour ton enthousiasme débordant, tes conseils et ta disponibilité. Je te remercie de m'avoir initiée à la cytométrie en flux par impédance, qui a permis de la rédaction de ce bel article. Enfin, je voulais tout particulièrement te dire merci pour ton soutien, ton investissement et ton aide précieuse en cette fin de thèse mouvementée.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Biologie Cellulaire, **Mickaël Euzen, Cécile Madre, Sonia Letty, Estelle Cueff, Aurore Leroux, Mikaële Paugam, Émilie Argouach**, et les anciens membres **Jim Lefèbvre, William Mauguén** et **Audrey Le Gall**. Merci de m'avoir formée aux différents protocoles et procédures à Vegenov mais également pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée tout au long de ces années de thèse. Je vous remercie également pour votre dynamisme à toutes épreuves et votre bonne humeur.

Je remercie les membres de l'équipe de Biologie Moléculaire, **Céline Hamon, Charlotte Roby, Romain Grijol, Daniel Le Corre, Laëtitia Mest, Renaud Hardy** et **Victoire Jaulin** de m'avoir fait découvrir le monde de la biologie moléculaire. Merci de m'avoir adoptée au sein de votre équipe, pour votre bonne humeur et vos rires. Pour le temps passé à me former à la qPCR et à répondre à mes innombrables questions, un merci tout particulier à vous deux Charlotte et Romain. Je suis sûre que mes monologues sous la hotte d'extraction vont vous manquer !

Je suis reconnaissante envers **toutes les personnes de Vegenov** de m'avoir aussi chaleureusement accueillie. Grâce à vous j'ai passé de merveilleux moments ! Et à l'équipe du mercredi (dont **Pierre Queau** et **Emilie Hascoët** que je n'ai pas encore cité), merci pour ces soirées mémorables !

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à ma thèse au travers des comités de thèse : **Catherine Leblanc**, **Émilie Val** et **Pierre Barret**. Je remercie tout particulièrement Catherine Leblanc pour avoir suivi ma thèse durant ces trois années, pour son enthousiasme à chaque réunion et ses conseils scientifiques.

Je remercie **Thomas Pfannschmidt** et **Anne-Marie Chèvre** de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également **Bernard Kloareg** pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse, et **Pascal Giraudeau** d'être examinateur.

Je remercie **Maëla Kloareg** pour son aide précieuse dans l'analyse statistiques de mes résultats de thèse.

Je remercie **Vinciane Cappelaere** et **Pierre-Nicolas Boulc'h** qui m'ont aidée à réaliser certains de mes essais au travers de leurs stages.

Je remercie également mes anciens professeurs de l'Université de Strasbourg, et notamment **Rozenn Ménard**, **Pascaline Ullmann**, **Laurence Gondet** et **Yannis François** pour leur soutien, et m'avoir donné l'envie d'embarquer dans cette aventure qu'est le doctorat.

Je remercie **mes parents** et **ma sœur**, qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études et dans tout ce que j'entreprends. Je vous dédie cette thèse avec toute ma reconnaissance et mon amour.

Enfin, je tenais également à remercier tout particulièrement **Romain Grijol** pour son soutien sans faille, sa patience et son amour.

Approches cellulaires et moléculaires pour comprendre le phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé dans le but de produire efficacement des plantes haploïdes doublées

Résumé

Les haplométhodes, en permettant de produire rapidement des lignées homozygotes, représentent aujourd'hui un outil essentiel d'accélération des programmes de sélection variétale. Sous des conditions de stress spécifiques, les microspores sont détournées de la voie de développement gamétophytique et sont réorientées vers un développement de type sporophytique, permettant la production d'embryons. Néanmoins, chez les céréales et notamment chez le blé, la technique d'androgénèse est largement limitée par la régénération d'un taux important de plantules albinos. L'objectif de mes travaux de thèse est d'améliorer nos connaissances sur le phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé, au niveau cellulaire et moléculaire, afin de lever ce verrou. Le développement d'une nouvelle méthode d'analyse cellulaire a permis la caractérisation fine de populations de microspores en culture et s'est avérée être un outil puissant permettant la prédiction précoce des rendements embryonnaires chez le blé. Des études microscopiques et morphologiques, ont mis en évidence deux voies de développement aboutissant à la formation de structures de type embryon ou de type cal. Enfin, une étude novatrice basée sur une analyse d'expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes a été mise en place lors des étapes précoces du processus d'androgénèse. Un blocage précoce dans la biogénèse des chloroplastes au sein des structures multicellulaires et des pro-embryons dérivant de microspores a été mis en évidence et semble provoqué par une perturbation de la transcription au sein des plastides. De nouveaux marqueurs moléculaires représentés par les niveaux d'expression relatifs des gènes *rpoA*, *ARNr 16S* et *23S* ont été décrits et liés à la capacité à régénérer des plantules chlorophylliennes. Les différents outils de détection précoce du phénomène d'albinisme développés pourront venir en appui pour l'optimisation des protocoles d'androgénèse chez les céréales.

Mots clés : Microspores, Albinisme, *Triticum aestivum*, Cytométrie en flux par impédance, Marqueurs précoces de réactivité, Biogénèse des chloroplastes

Cellular and molecular approaches to understand the albinism phenomenon occurring in wheat androgenesis in order to efficiently produce doubled haploid plants

Abstract

Haplomethods, which allow rapid production of homozygous lines, are an essential tool to speed up plant breeding processes. Under specific stress conditions, the microspores switch from the gametophytic developmental pathway to sporophytic development, allowing embryo production. However, in cereals and especially in wheat, the androgenesis process is largely limited by the regeneration of a high rate of albino seedlings. The major objective of my thesis work is to improve our knowledge of the albinism phenomenon in wheat androgenesis, at the cellular and molecular level, in order to eliminate this bottleneck. The development of a new method of cell analysis has allowed the fine characterization of microspore populations in culture and has proven to be a powerful tool for the early prediction of embryo yields in wheat. Microscopic and morphological studies have highlighted two developmental pathways leading to the formation of embryo-like structure or callus-like structure. Finally, an innovative study based on the analysis of gene expression involved in the chloroplast biogenesis was carried out during the early stages of androgenesis. An early blockage in the chloroplast biogenesis within multicellular structures and microspore-derived proembryos has been demonstrated and appears to be caused by a disruption of the transcription within plastids. New molecular markers, described as the relative expression levels of the *rpoA*, *16S*, and *23S rRNA* genes are linked to the ability of green plantlet regeneration. The various tools for the early detection of the albinism phenomenon developed here will support future experiments to improve and optimize androgenesis protocols in cereals.

Key words: Microspores, Albinism, *Triticum aestivum*, Impedance Flow Cytometry, Early reactivity markers, Chloroplast biogenesis

Table des matières

Chapitre 1 – L’albinisme en androgénèse : état des lieux et avancées sur la compréhension de ce phénomène complexe	- 17 -
1. L’androgénèse : un outil biotechnologique dans les programmes de sélection variétale.....	- 19 -
2. 2. La culture de microspores isolées : un outil in vitro pour étudier de nombreux phénomènes biologiques	- 23 -
2.1. Un système modèle en biologie du développement	- 23 -
2.2. Embryogénèse des microspores et mécanismes de régulation sous-jacents.....	- 27 -
2.2.1. Adaptation des microspores au stress provoqué par le prétraitement	- 29 -
2.2.2. Arrêt du programme de développement gamétophytique	- 31 -
2.2.3. Réorientation du devenir des microspores vers un développement de type sporophytique	- 35 -
3. L’albinisme en androgénèse.....	- 41 -
3.1. Définition générale de l’albinisme	- 41 -
3.2. Etudes cytologiques et génétiques de l’albinisme en androgénèse.....	- 43 -
3.2.1. Le devenir des plastides au sein des microspores	- 43 -
3.2.2. Études cytologiques	- 47 -
3.2.3. Étude du génome plastidial et influence du génome nucléaire sur la régénération de plantules albinos	- 51 -
3.3. Hypothèses autour d’une mise en place précoce de l’albinisme en androgénèse chez le blé	- 55 -
4. Les chloroplastes : fonctions, plasticité, et régulation.....	- 57 -
4.1. Les différents types de plastides et leurs fonctions.....	- 57 -
4.2. La machinerie plastidiale.....	- 59 -
4.3. La différenciation des chloroplastes	- 63 -
4.3.1. Perception de la lumière et initiation de la photomorphogénèse	- 65 -
4.3.2. Induction de l’expression des gènes nucléaires liés à la biogénèse des chloroplastes et import des protéines au sein des plastides.....	- 67 -

4.3.3. Formation des thylakoïdes et mise en place des photosystèmes.	- 69 -
4.3.4. Régulation de la biogénèse des chloroplastes et de la photomorphogénèse...	- 73 -
5. Objectifs de la thèse.....	- 77 -
Références.....	- 83 -

Chapitre 2 – La mesure de l'impédance par cytométrie en flux (IFC) permet la prédiction précoce des rendements embryonnaires en culture de microspores isolées de blé.....

Abstract	- 127 -
Introduction.....	- 129 -
Material and Methods.....	- 135 -
1. Plant material and growing conditions	- 135 -
2. Tiller harvest, pretreatment and microspore culture	- 135 -
3. Sample preparation for IFC measurement.....	- 135 -
4. IFC analyses	- 137 -
5. Staining and microscopy	- 139 -
6. Statistical analyses	- 139 -
Results	- 141 -
1. IFC measures cell viability in microspore suspensions.	- 141 -
2. IFC detects different microspore developmental stages during pollen formation.-	- 141 -
3. IFC detects different microspore development stages during androgenesis.....	- 143 -
4. Impedance variations express morphological and intracellular changes occurring within the microspores during androgenesis.	- 145 -
4.1. IFC shows a decrease in microspore viability during the androgenesis process	- 145 -
4.2. Microscopic characterization of intracellular changes occurring in microspores during androgenesis.....	- 145 -
4.3. Early biological changes occurring within microspores explain impedance variations during androgenesis.	- 147 -
4.4. The percentage of viable cells in the P3 polygon measured by IFC provides an early prediction of embryo yield.....	- 149 -

Discussion.....	- 153 -
References.....	- 161 -

Chapitre 3 – Étude microscopique et morphologique des structures androgéniques de blé et caractérisation de leur capacité à régénérer des plantules chlorophylliennes

Introduction.....	- 177 -
Matériel et méthodes	- 185 -
1. Matériel végétal	- 185 -
2. Cultures de microspores isolées.	- 185 -
3. Caractérisation morphologique des structures androgéniques de blé	- 187 -
4. Analyses statistiques	- 189 -
Résultats.....	- 191 -
1. Les génotypes de blé étudiés présentent une réactivité contrastée.....	- 191 -
2. La caractérisation morphologique des structures androgéniques révèle deux voies principales de développement.....	- 193 -
3. Les trois génotypes de blé présentent des profils de production en structures androgéniques hétérogènes.	- 197 -
4. La capacité de régénération en plantules semble être liée au stade de développement des structures androgéniques.....	- 201 -
5. Les structures de type ELS contribuent majoritairement à la régénération en plantules chez le blé.....	- 205 -
Discussion.....	- 209 -
Références.....	- 223 -

Chapitre 4 –Études moléculaires de la biogénèse des chloroplastes au sein des cultures de microspores isolées de blé et identification des gènes dont l’expression est liée précocement à la régénération de plantules albinos .

Introduction.....	- 239 -
Matériel et méthodes	- 249 -

1. Matériel végétal	- 249 -
2. Culture de microspores isolées	- 249 -
3. Prélèvement des échantillons	- 251 -
4. Extraction d'ARN et RT-qPCR	- 251 -
5. Analyses statistiques	- 255 -
Résultats	- 257 -
1. Réactivité et potentiel androgénique des deux génotypes de blé étudiés	- 257 -
2. Caractérisation des profils d'expression génique des plantules de blé régénérées en androgénèse.....	- 257 -
2.1. Gènes liés à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des plastes	- 259 -
2.2. Gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, à la photomorphogénèse et à la photosynthèse.....	- 259 -
3. Effet du prétraitement sur les profils d'expression géniques des microspores de blé.....	- 261 -
4. Biogénèse et développement des plastes au cours du développement sporophytique des microspores de blé <i>in vitro</i>	- 265 -
4.1. Gènes liés à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des plastes	- 267 -
4.2. Gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, à la photomorphogénèse et à la photosynthèse.....	- 269 -
5. Mise en évidence de profils d'expression génique différents chez le génotype récalcitrant au cours de la culture des microspores isolées	- 271 -
Discussion.....	- 277 -
Annexe.....	- 299 -
Références.....	- 303 -

Chapitre 5 – Discussion	- 313 -
Lever les verrous de l'albinisme !.....	- 321 -
Les approches de caractérisation cellulaire à haut débit	- 321 -

Les études d'expression de gènes, et des protéines et métabolites associés dans la biogénèse ces chloroplastes	- 321 -
Les études des facteurs épigénétiques	- 327 -
L'apport du design expérimental	- 329 -
Références.....	- 331 -

Chapitre 1

L'albinisme en androgénèse :

**État des lieux et avancées sur la compréhension de ce
phénomène complexe.**

1. L'androgénèse : un outil biotechnologique dans les programmes de sélection variétale

Les biotechnologies font aujourd'hui partie intégrante des programmes de sélection variétale. Parmi elles, la production de plantes haploïdes doublées (HD) permet de réduire considérablement le coût et le temps nécessaires à l'obtention de lignées pures, en réduisant à une génération la fixation des génotypes, contre 7 à 8 générations habituellement. Les schémas de sélection utilisant des HD sont donc largement utilisés comme alternative aux méthodes classiques. Cinq techniques majeures permettent actuellement de générer des HD. L'élimination du génome d'un des parents peut être réalisée soit par croisement de 2 espèces incompatibles, soit par croisement intraspécifique, ou enfin grâce à la manipulation génétique du variant centromérique de l'histone H3 (CENH3) (Karimi-Ashtiyani et al., 2015; Ravi and Chan, 2010; Wang et al., 2019). La gynogénèse et l'androgénèse permettent la formation d'embryons haploïdes à partir du gamétophyte femelle et du gamétophyte mâle, respectivement (Bohanec, 2009; Seguí-Simarro, 2010). Ces techniques s'appuient sur la culture *in vitro* d'ovules non fécondés, d'ovaires ou encore de fleurs entières, et par culture d'anthers ou de microspores. Lorsque l'espèce végétale le permet, l'androgénèse reste la méthode privilégiée pour la production d'HD car elle demeure la méthode la moins chère et la plus rapide, générant une grande quantité d'HD. Cette technique est basée sur la réorientation du devenir des microspores, avec l'arrêt du développement gamétophytique aboutissant à la formation du pollen mature, vers un développement sporophytique permettant la production d'embryons haploïdes en culture *in vitro* (Touraev et al., 2001). La réorientation des microspores est induite grâce à l'application d'un stress adapté sur des microspores à un stade de développement précis, le plus souvent au stade uninucléé centré à tardif, voire binucléé précoce chez certaines espèces (Figures 1 et 2, tiré de Maraschin et al. 2006). La nature du stress appliqué dépend également de l'espèce, le plus souvent un choc thermique, osmotique ou la privation d'une source de carbone, mais d'autres types de traitements physicochimiques ou des combinaisons de stress ont également été rapportés (Shariatpanahi et al., 2006). La production d'HD présente de nombreux autres avantages.

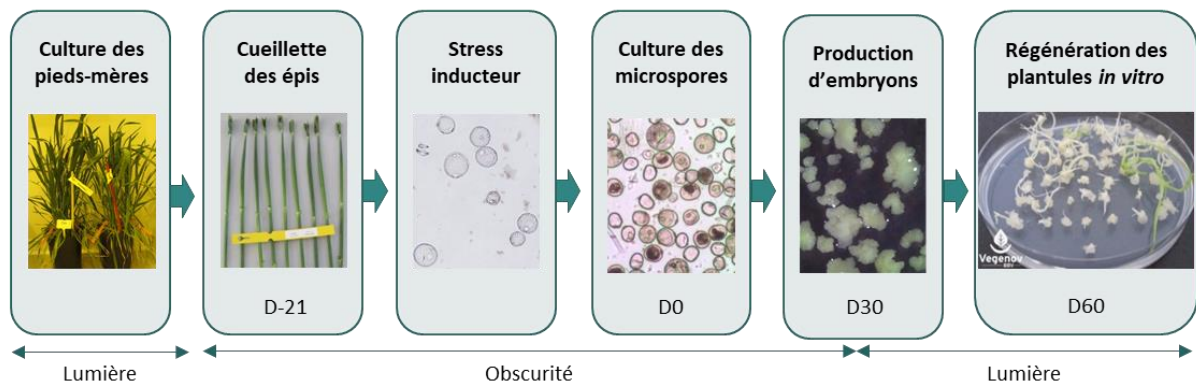


Figure 1 : Processus d'androgénèse par culture de microspores isolées chez le blé.

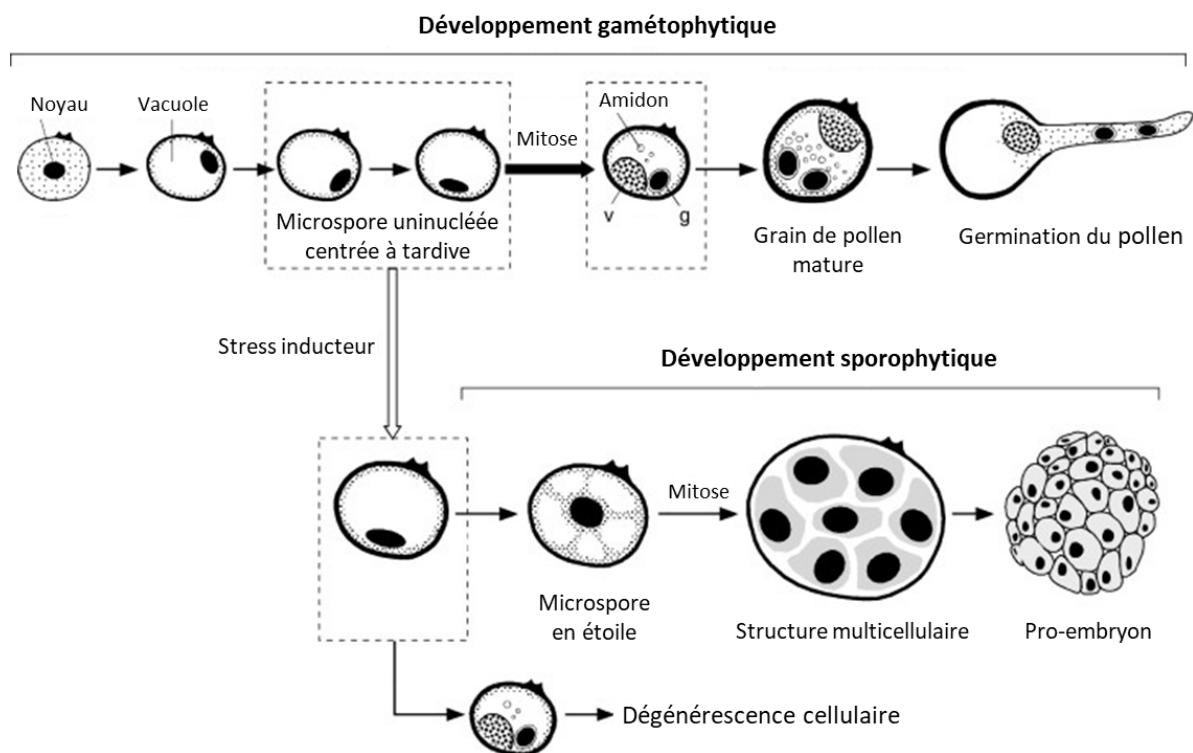


Figure 2 : Voies de développement gamétophytique et sporophytique des microspores. Le stress inducteur, ou prétraitement, est habituellement appliqué sur des microspores au stade de développement uninucléé centré à tardif chez les céréales. Il permet la réorientation des microspores vers un développement de type sporophytique. Les microspores de blé réorientées présentent une morphologie en étoile, due à la fragmentation de la vacuole. Les microspores réorientées se divisent activement et forment des structures multicellulaires, encore enclavées dans la paroi initiale d'exine. Après la libération de leur paroi initiale d'exine, ces structures forment des pro-embryons, puis des embryons qui régèneront ensuite des plantules *in vitro*. v : cellule végétative ; g : cellule générative ; p : paroi initiale d'exine. Adapté et modifié de Maraschin et al. (2006)

Elle permet notamment, grâce à l'homozygotie des individus obtenus, de révéler les mutations récessives. Les populations d'HD sont également très utiles pour la sélection assistée par marqueurs (SAM), particulièrement pour la cartographie génétique des QTLs (Quantitative Trait Loci) ou en génétique d'association (GWAS – genome-wide association), en sélection inversée ou encore pour estimer les fractions recombinantes (Dwivedi et al., 2015; Sanchez et al., 2018; Shariatpanahi and Ahmadi, 2016).

L'androgénèse est aujourd'hui couramment utilisée chez de nombreuses espèces pour la production d'HD, et certaines sont même devenues des espèces modèles pour étudier les aspects cellulaires intrinsèques à ce processus. La réussite de cette technique repose sur de nombreux facteurs, allant de la culture des pieds-mères, aux modalités de stress employées pour réorienter le développement des microspores, ou encore aux conditions de culture *in vitro*. Néanmoins certaines espèces sont qualifiées de récalcitrantes et ne répondent pas correctement à l'androgénèse (Seguí-Simarro, 2015). Parmi ces espèces, certaines ont pourtant un intérêt agronomique mondial comme le blé, l'orge, le maïs, l'avoine ou la tomate (Maluszynski et al., 2003). En androgénèse, différents facteurs limitent l'efficacité de la technique et plusieurs goulots d'étranglements majeurs peuvent être soulignés à des stades définis du processus : échec de la réorientation des microspores, mort cellulaire importante au cours de la culture *in vitro*, faible production d'embryons haploïdes, échec de la conversion des embryons en plantules, régénération d'une très forte proportion de plantules albinos. De plus, chez les céréales, la sensibilité ou la récalcitrance des microspores à l'androgénèse est principalement influencée par le génotype. Les génotypes de blé d'hiver peuvent ainsi produire jusqu'à 100% de plantules albinos, tandis que les génotypes de printemps présentent une récalcitrance beaucoup moins prononcée et peuvent régénérer une proportion de plus de 40% de plantules chlorophylliennes (Holme et al., 1999). Chez l'orge, ces tendances sont inversées et ce sont les génotypes d'orge de printemps qui régénèrent majoritairement des plantules albinos (Jacquard et al., 2009; Makowska et al., 2015). La complexité de la récalcitrance du blé en androgénèse s'illustre non seulement par la production quasi-exclusive de plantules albinos mais également par l'accumulation d'un ou plusieurs autres verrous selon le génotype étudié, limitant profondément l'utilisation de la technique en production.

La récalcitrance en androgénèse est donc non seulement multifactorielle et espèce-dépendante mais également génotype-dépendante. Malgré le grand nombre d'études publiées ces dernières années sur ce sujet, très peu d'éléments sont pour le moment connus pour expliquer et dépasser ce blocage.

2. 2. La culture de microspores isolées : un outil in vitro pour étudier de nombreux phénomènes biologiques

2.1. Un système modèle en biologie du développement

En plus d'être un outil de choix dans les programmes de sélection variétale, l'androgénèse par culture de microspores isolées est un système d'étude des mécanismes cellulaires chez les plantes très intéressant. Ce système fournit un modèle unique pour la compréhension de phénomènes biologiques précis et l'analyse de processus cellulaires tels que la reprogrammation des cellules, l'acquisition de la totipotence cellulaire (Reynolds, 1997), l'embryogénèse dès les stades les plus précoces (Testillano, 2018), et la morphogénèse.

Les microspores, cellules haploïdes originaires du gamétophyte mâle, sont capables de stopper leur développement gamétophyte initial sous l'effet de stimuli externes pour s'engager vers une voie de développement sporophytique. Or l'androgénèse est un processus complexe qui nécessite la reprogrammation des microspores, puis l'acquisition de la totipotence cellulaire, menant finalement à l'initiation de l'embryogénèse. Ces cellules subissent donc de nombreux bouleversements, y compris le remodelage de leur expression génique à l'échelle du génome entier (Testillano, 2019). La culture de microspores isolées est donc un bon système pour mettre en avant la reprogrammation et la totipotence cellulaire chez les plantes.

L'embryogénèse chez les microspores fournit aujourd'hui un nouveau système d'intérêt pour la compréhension et l'étude des aspects fondamentaux de l'embryogénèse des plantes. Ainsi, l'étude cytologique des cultures de microspores a permis d'analyser les phases précoces de l'embryogénèse, directement en microscopie, sans barrière physique telle que

la paroi de la graine ou l'endosperme. L'avantage de ce système est le suivi facilité, direct et continu du processus d'embryogénèse grâce à la culture en milieu liquide de cellules isolées. Chez le colza, espèce modèle des Dicotylédones pour l'androgénèse, des études cytologiques ont permis d'analyser l'établissement de la polarité au sein des microspores embryogènes, de caractériser chaque étape de l'embryogénèse des microspores, de rapprocher ces stades de développement de ceux observés lors de l'embryogénèse zygotique, et de déterminer le rôle du suspenseur dans le développement de l'embryon (Supena et al., 2008). L'induction de l'embryogénèse chez les microspores et la culture des embryons dérivant de microspores ne nécessitent pas l'application d'hormones exogènes dans le milieu de culture pour la plupart des espèces (Pérez Pérez et al., 2019), contrairement aux systèmes d'embryogénèse somatique (Fehér, 2015). La culture de microspores isolées est donc un système exceptionnel pour étudier et comprendre le rôle et les fonctions des hormones endogènes telles que les auxines et les cytokinines pendant l'initiation et la progression de l'embryogénèse. Ce système de culture a ainsi permis d'étudier le rôle du transport polaire de l'auxine dans le remodelage de l'embryon et les changements hormonaux se produisant lors de la phase de maturation chez le colza et aussi chez l'orge, qui est l'espèce modèle des Monocotylédones pour l'androgénèse (Hays et al., 2001; Pérez-Pérez et al., 2019; Soriano et al., 2014). Cependant, peu d'éléments sont pour l'heure connus sur les fonctions des cytokinines lors de l'embryogénèse, de leur biosynthèse à leurs activités et leur transport (Durán-Medina et al., 2017). De plus, des études moléculaires réalisées sur des cultures de microspores isolées ont mis en avant les gènes impliqués dans l'induction de l'embryogénèse (Maraschin et al., 2005), exprimés dans le développement précoce de l'embryon (Ahmadi et al., 2016; Malik et al., 2007) et impliqués dans la morphogénèse (Boutilier et al., 2002; Hosp et al., 2014). Ces dernières années, de nombreuses équipes de recherches ont porté un intérêt particulier à l'étude des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones, et leur influence sur l'induction et la régulation de l'embryogénèse, notamment au sein des cultures de microspores isolées (Niazian and Shariatpanahi, 2020; Testillano, 2018).

Enfin le système de culture de microspores isolées offre la possibilité d'étudier les stades plus avancées de l'embryogénèse, correspondant au début de la morphogénèse des embryons. Comme démontré précédemment, l'absence d'obstacle visuel permet de suivre facilement et directement le développement des embryons, et donc également la conversion

des embryons en plantules, dès l'ébauche des premiers primordia. Ce modèle d'étude permet de caractériser le développement et la différenciation des différents organes de la plantule ainsi que les mécanismes de régulation sous-jacents. Au niveau intracellulaire, il est possible d'analyser la différenciation des organites lors des phases précoces de la morphogénèse comme la différenciation des chloroplastes aboutissant à la mise en place de l'appareil photosynthétique. Des travaux ont d'ailleurs été menés sur la différenciation des proplastides au sein des microspores et embryons d'orge et ont permis de mettre en avant un développement similaire à celui observé chez le zygote (Careda et al., 1999a).

Malgré les différences morphologiques et développementales entre les embryons produits dans les cultures de microspores et les embryons zygotiques, la puissance de ce système de culture semble aujourd'hui dépasser l'étude de l'embryogénèse et montre une utilité croissante pour l'élucidation d'autres processus biologiques et les mécanismes de régulation sous-jacents.

2.2. Embryogénèse des microspores et mécanismes de régulation sous-jacents

Le point de départ de l'induction de l'embryogénèse chez les microspores est le stress, qui permet de modifier leur programme de développement pour mener à la formation d'embryons haploïdes. Cette réorientation du devenir des microspores repose sur trois phases primordiales : l'adaptation au stress, l'arrêt du programme de développement initial, et l'initiation de l'embryogénèse. Dès le début du processus d'androgénèse, les microspores doivent surmonter un certain nombre de bouleversements cellulaires nécessaires à l'initiation et à la progression de l'embryogénèse.

2.2.1. Adaptation des microspores au stress provoqué par le prétraitement

Le stress provoque chez les microspores des modifications dans l'expression de leur génome avec l'induction de gènes liés au stress et à son adaptation. Ces dernières années, des études moléculaires ont permis de mettre en avant la surexpression de deux grandes familles de protéines en réponse au stress dans les cultures de microspores. Les HSP (Heat Shock Protein) ont un rôle clé dans divers processus de développement et de résistance au stress. Elles participent au repliement et à l'assemblage des protéines, ainsi qu'à la prévention de l'agrégation des protéines pour aider à maintenir l'homéostasie cellulaire (Wang et al., 2004; Waters, 2013). HSP70 et HSP90, principales protéines chaperonnes de cette famille, sont fortement induites à la suite de l'application d'un stress de type carence nutritive ou thermique dans les cultures de microspores, chez le genre *Brassica* (Cordewener et al., 1995; Pechan et al., 1991; Seguí-Simarro et al., 2003), et le genre *Capsicum* (Barany et al., 2001), ainsi que chez le tabac (Zarsky et al., 1995) et l'orge (Bélanger et al., 2018). Cependant, aucune variation dans leurs niveaux d'expression n'a été détectée lorsqu'un prétraitement de nature différente a été appliqué (Zhao et al., 2003). L'expression de GST (Glutathione S-Transférase) rapportée dans les cultures de microspores d'orge est régulée à la hausse pendant les premières étapes de l'androgénèse (Maraschin et al., 2006; Vrinten et al., 1999). Les protéines HSP et GST ont également été mises en évidence lors de l'embryogénèse somatique initiée par les auxines (Kitamiya et al., 2000; Nagata et al., 1994; Thibaud-Nissen et al., 2003). La GST est impliquée dans divers processus de réponse au stress et notamment dans la protection contre le stress oxydatif (Garretón et al., 2002). Or le prétraitement appliqué aux microspores en androgénèse conduit à une augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species). Les ROS sont des molécules de signalisation permettant l'activation des réponses cellulaires au stress mais peuvent également causer des dommages cellulaires si leur niveau dépasse un certain seuil. L'équilibre entre la production de ROS et les mécanismes de défense contre ces ROS est déterminant pour l'homéostasie des cellules, devenant ainsi un facteur clé pour la réussite du processus d'androgénèse. Si les microspores réussissent à s'adapter au stress et à maintenir une certaine homéostasie cellulaire, elles pourront poursuivre leur développement en androgénèse. A l'inverse, des dommages cellulaires trop importants induisent la mort des cellules. Chez les plantes, la machinerie protéolytique régule à la fois

l'homéostasie et la mort cellulaire (van der Hoorn and Jones, 2004). Des études ont rapporté l'activation de protéases de type caspase-3-like et cathépsine au sein des cultures de microspores d'orge et de colza après le prétraitement, en lien avec l'augmentation des niveaux de mort cellulaire (Bárány et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2019; Rodriguez-Serrano et al., 2012). L'ajout de molécules piégeuses de ROS, c'est-à-dire des antioxydants comme l'acide ascorbique, d'inhibiteur de ROS tel que le chlorure de Manganèse II, ou d'inhibiteurs de protéases a permis de réduire considérablement les taux de mort cellulaire dans les populations de microspores de colza et d'orge (Bárány et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2019). Cependant, l'application d'inhibiteurs de monoxyde d'azote (NO) dans les cultures de microspores d'orge a entraîné une diminution de l'initiation de l'embryogénèse et un retard dans le développement des embryons (Rodriguez-Serrano et al., 2012). Ce résultat a mis en lumière le double rôle du NO en androgénèse, où il est impliqué dans les programmes de mort cellulaire mais aussi dans l'initiation de la division des microspores réorientées. Ces traitements pharmacologiques ouvrent donc de nouvelles perspectives pour optimiser la viabilité des microspores et leur adaptation au stress dès les phases les plus précoces du processus d'androgénèse, et améliorer ainsi le taux d'induction de l'embryogénèse au sein de la population.

2.2.2. Arrêt du programme de développement gamétophytique

En androgénèse, l'arrêt du programme de développement gamétophytique est primordial pour la réorientation des microspores. Ce phénomène implique un profond remodelage de l'architecture des cellules, notamment au niveau cytoplasmique. L'autophagie est la voie catabolique majeure permettant le recyclage du matériel cellulaire mais joue également un rôle important dans les mécanismes de réponse au stress et de mort cellulaire. Des études rapportent par ailleurs un lien entre les ROS et l'autophagie (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012; Testillano, 2019). Les dommages oxydatifs liés à la génération excessive de ROS chez *Arabidopsis* entraînent l'induction de l'autophagie (Bassham, 2007). Ces dernières années, un intérêt croissant s'est porté sur le mécanisme d'autophagie et son implication en androgénèse. Des travaux menés sur des microspores d'orge ont ainsi mis en évidence l'activation de l'autophagie à l'issue du prétraitement, en parallèle de l'augmentation de la

production de ROS et de la mort cellulaire (Bárány et al., 2018). Chez le colza, la production massive d'autophagosomes et de vacuoles autophagiques a été rapportée uniquement au sein des microspores embryogènes, et n'ont pas été observé chez les microspores de type pollen et non réorientées (Corral-Martínez et al., 2013). L'autophagie semble donc être le processus préférentiel pour le nettoyage cytoplasmique des microspores en androgénèse.

L'acquisition de la totipotence cellulaire par les microspores implique en outre un profond remodelage de l'expression génique, permettant l'arrêt et l'élimination de la machinerie gamétophytique et l'activation du nouveau programme de développement sporophytique. Ces changements dans l'expression génique des microspores sont caractérisés par le changement de l'organisation globale du génome et par le remodelage de la chromatine. Les mécanismes épigénétiques ont un rôle clé dans la régulation de différents processus biologiques chez les plantes, de leurs réponses au stress et aux variations environnementales, à l'embryogénèse somatique ou encore à l'organogénèse (Luo et al., 2012; Miguel and Marum, 2011; Reyes, 2006). Les marques épigénétiques contrôlant majoritairement l'organisation de la chromatine sont la méthylation de l'ADN, la méthylation et l'acétylation des histones. La méthylation de l'ADN affecte la conformation de la chromatine en la bloquant dans une forme active, chromatine ouverte, ou une forme inactive, chromatine fermée (Kouzarides, 2007). Récemment des études ont montré que la structure de la chromatine peut être liée aux transitions cellulaires dans différents systèmes de culture, et que la totipotence cellulaire est rattachée à un état de chromatine ouverte, augmentant l'accessibilité du génome à la machinerie transcriptionnelle (Grafi et al., 2011; Solís et al., 2015). La diminution du niveau de méthylation de l'ADN a été constatée chez les microspores de colza et d'orge après le prétraitement. Les microspores embryogènes et les pro-embryons précoces sont caractérisés par une faible méthylation de leur ADN avec une chromatine décondensée, signe de l'acquisition de la totipotence cellulaire (El-Tantawy et al., 2014; Solís et al., 2012). La seconde marque épigénétique majeure est la modification des histones, dont les plus connues sont la méthylation de la lysine de l'histone H3 en position 9 (H3K9) et l'acétylation des lysines de la queue N-terminale des histones H3 et H4. Ces modifications des histones font l'objet de plus en plus de travaux en lien avec différents processus biologiques chez les plantes, les algues et les animaux. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence deux principes clés : les méthylations H3K9 et H3K27, qualifiés de marques

répressives, mènent au silencing des gènes, et les méthylations H3K4 et H3K36, marques permissives, sont associées à une transcription active des gènes (Eberharther and Becker, 2002; Liu et al., 2010). Dans les cultures de microspores d'orge et de colza, l'application en début de culture d'inhibiteurs de méthylation de l'ADN et d'inhibiteurs de méthylation de l'histone H3K9 favorise l'initiation de l'embryogénèse (Berenguer et al., 2017). Les mêmes expériences menées en embryogénèse somatique chez *Arabidopsis* ont conduit aux mêmes résultats (Mozgová et al., 2017). Ces études ont cependant rapporté une altération du développement embryonnaire si ces inhibiteurs sont appliqués à des stades avancés de l'embryogénèse. Ainsi, l'initiation de l'embryogénèse implique une faible méthylation de l'ADN et des histones tandis que la progression du développement embryonnaire est caractérisée par une augmentation du niveau de méthylation de l'ADN des cellules. L'acétylation des résidus de lysine des histones H3 et H4 favorise un état de chromatine ouverte et est donc plutôt associée à une transcription active des gènes (Onder et al., 2012). Une des avancées majeures en androgénèse est l'utilisation de la trichostatine A (TSA), inhibiteur de l'acétylation des histones, qui a largement amélioré les taux d'induction des microspores, la production d'embryons et leur conversion en plantules chez le colza (Li et al., 2014a), l'orge (Pandey et al., 2017) et le chou de Chine (Zhang et al., 2016), sans compter l'amélioration des taux de régénération en plantules chlorophylliennes chez le blé (Jiang et al., 2017). L'acétylation des histones joue donc un rôle crucial dans la reprogrammation des microspores et est également liée à la totipotence dans plusieurs systèmes de cultures cellulaires. La reprogrammation des microspores, l'acquisition de la totipotence cellulaire et l'initiation de l'embryogénèse font donc appel à un remodelage structural complet de la cellule, tant au niveau nucléaire que cytoplasmique, avec l'arrêt du programme de développement gamétophytique, l'élimination des organites endommagés ou inutiles et la préparation des cellules à un nouveau devenir.

2.2.3. Réorientation du devenir des microspores vers un développement de type sporophytique

La troisième phase majeure au début du processus d'androgénèse est l'initiation du programme de développement sporophytique chez les microspores. Différents travaux ont montré l'importance des régulateurs de croissance dans le développement des embryons,

notamment en embryogénèse somatique, avec une implication des auxines et cytokinines plutôt dans les phases précoces de l'embryogénèse, et les acides gibbérellique et abscissique dans les phases plus tardives (Fehér, 2015). La modification du programme génétique des cellules et l'induction de l'embryogénèse sont en partie régulées par les hormones qui contrôlent l'expression de nombreux gènes. De plus, des études récentes ont montré que l'auxine (De-la-Peña et al., 2015) et la composition minérale des milieux de culture *in vitro*, comme la source d'azote (Leljak-Levanić et al., 2004), contribuaient à modifier la méthylation de l'ADN des cellules embryogéniques. Dans le cas de l'auxine, ces changements de méthylation de l'ADN sont associés à la régulation de certains gènes clés du processus d'embryogénèse chez les plantes, comme Babyboom (BBM), Wuschel (WUS), Leafy Cotyledon (LEC) (Nic-Can et al., 2013). La surexpression du gène BBM, un facteur de transcription de la famille AP2/ERF, a par ailleurs été mise en évidence dans les cultures de microspores de colza (Boutilier et al., 2002). L'expression de ce gène permet de favoriser l'induction de l'embryogénèse, et promeut la prolifération cellulaire et la morphogénèse. Une accumulation d'auxines endogènes a été rapportée dans les embryons précoces dérivant de microspores chez le colza et l'orge (Dubas et al., 2014; Rodríguez-Sanz et al., 2015; Soriano et al., 2014). Rodríguez -Sanz et al. (2015) ont par ailleurs montré une biosynthèse *de novo* d'auxines endogènes ainsi qu'une accumulation d'AIA (Acide Indole 3-Acétique) dans les pro-embryons de colza, révélant l'implication des auxines endogènes dans la reprogrammation des microspores et la formation d'embryons. L'AIA est la forme principale des auxines endogènes chez les plantes. Cette famille d'hormones végétales est impliquée dans la croissance des plantes, de la régulation de la division des cellules à leur différenciation (Leyser, 2018; Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016). Des études ont rapporté le rôle clé de l'AIA en embryogénèse, avec une stimulation de sa biosynthèse tout au long du développement de l'embryon zygotique (Möller and Weijers, 2009). Pérez-Pérez et al. (2019) ont ainsi démontré, grâce à l'application d'inhibiteurs de synthèse et d'antagonistes des auxines dans le milieu de culture de microspores d'orge, que l'activation de la biosynthèse d'auxine se fait en parallèle de l'initiation du développement sporophytique des microspores, et que cette synthèse est nécessaire à l'embryogénèse. De plus, l'inhibition du transport des auxines provoque une diminution considérable du développement des embryons dès les stades précoces. Le transport polaire de l'auxine au sein des microspores permet donc la progression du processus d'embryogénèse. D'autres inhibiteurs de la synthèse d'hormones végétales ont été décrit

comme ayant un effet favorable sur la réorientation des microspores et les rendements embryonnaires. Ainsi l'induction de l'embryogénèse peut également être renforcée par l'application d'inhibiteurs de la synthèse d'éthylène chez *Brassica napus* (Leroux et al., 2009).

L'auxine est également impliquée dans la régulation du remodelage de la paroi cellulaire chez *Arabidopsis*, en réduisant sa rigidité lors de l'organogénèse (Lewis et al., 2013). La structure, la composition et la dynamique des parois cellulaires influencent et régulent la forme des cellules et leur devenir, et à plus grande échelle le développement et la croissance de la plante (Somerville et al., 2004). Les Arabinogalactanes (AGP) et protéines associées sont des protéines structurales présentes dans la paroi cellulaire et la membrane plasmique des cellules végétales (Seifert and Roberts, 2007). Les AGP ont un rôle essentiel dans de nombreux processus de développement, y compris l'initiation de l'embryogénèse et le développement des embryons. Des études ont rapporté la surexpression des gènes liés aux AGP lors de l'initiation de l'embryogénèse somatique et lors de l'induction de l'embryogénèse chez les microspores de colza (El-Tantawy et al., 2013; Li et al., 2014b; Malik et al., 2007) avec une augmentation de la production de ces protéines lors du développement des embryons. Des changements drastiques dans l'architecture et l'ultrastructure de la paroi cellulaire des microspores ont lieu lors de l'induction de l'embryogénèse, y compris dans sa composition en AGP, et ce remodelage se poursuit lors du développement des embryons (Corral-Martínez et al., 2019). El-Tantawy et al. (2013) ont par ailleurs démontré la présence d'AGP dans des vésicules de sécrétion aux stades précoces du développement embryogénique des microspores. Ces AGP sont ensuite exportés au travers de la paroi cellulaire et sécrétés dans le milieu de culture. Or cette sécrétion d'AGP endogènes, tout comme la supplémentation des milieux de culture des microspores en AGP exogènes, ont fortement stimulé le développement des embryons dérivant de microspores chez le colza (Corral-Martínez et al., 2019), le maïs (Borderies, 2004), le blé (Letarte et al., 2006), et l'aubergine (Corral-Martínez and Seguí-Simarro, 2014). Des effets similaires ont été rapportés en embryogénèse somatique et zygotique (van Hengel et al., 2001; Poon et al., 2012). Borderies et al. (2004) avaient d'ailleurs proposé l'utilisation d'AGP exogènes pour stimuler le développement des microspores en androgénèse, notamment chez les espèces et génotypes récalcitrants ; résultats observés avec succès chez l'aubergine où les AGP ont favorisé l'embryogénèse directe à partir des microspores (Corral-Martínez and Seguí-Simarro, 2014).

Enfin, l'application dans le milieu de culture de polysaccharides extraits d'algues rouges, les carraghénanes, a permis d'améliorer les taux d'induction des microspores de brocoli et donc les rendements embryonnaires associés (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001).

Ces dernières années, l'intérêt pour la culture de microspores isolées comme système de culture modèle n'a fait que se renforcer. Ce système de culture a déjà montré ses nombreux avantages pour l'étude et la compréhension de phénomènes biologiques tels que la reprogrammation et l'acquisition de la totipotence cellulaire, l'embryogénèse et la morphogénèse. De récentes études ont pu mettre en évidence l'importance de certains mécanismes déterminant pour l'embryogénèse des microspores, comme la réponse au stress, l'autophagie, la régulation hormonale, les mécanismes épigénétiques, et le remodelage du cytoplasme, de la chromatine et des parois cellulaires. Ces avancées permettent d'améliorer notre compréhension des mécanismes clés impliqués dans le processus d'androgénèse. Malgré cela, la complexité du système et l'équilibre très fin des processus activés ou inhibés lors de l'androgénèse font que la mise au point de protocoles en fonction de l'espèce, et même du génotype, est très difficile. Enfin, beaucoup d'éléments et de facteurs déterminants n'ont pas encore été élucidés, y compris le verrou majeur en androgénèse chez les céréales : le taux important de régénération de plantules albinos.

3. L'albinisme en androgénèse

3.1. Définition générale de l'albinisme

L'albinisme est défini comme une absence de pigmentation des tissus, ce phénomène est souvent dû à des mutations, et existe de manière naturelle au sein des organismes photosynthétiques ou animaux. Il existe différents degrés d'albinisme, allant d'une perte partielle à complète des pigments. Chez les plantes, l'albinisme se traduit par une absence de chlorophylle, et peut affecter une partie de l'appareil aérien ou seulement une partie de la feuille elle-même (panachure). Ce second point fait que cette mutation peut être recherchée par les horticulteurs, notamment pour les espèces ornementales. Chez certaines espèces, dont le thé (Shin et al., 2018) et le chou frisé ornemental (Yan et al., 2020), l'albinisme peut

être induit par des températures froides, et de façon réversible lorsque la température augmente. Cependant des mutations plus importantes peuvent apparaître dès la germination de la plante, qui ne peut alors se développer que jusqu'à épuisement des réserves de la graine et meurt rapidement à cause de son incapacité à survivre de façon autotrophe.

Le cas de l'albinisme en androgénèse est un cas un peu particulier car les différents éléments nutritifs présents dans le milieu de culture *in vitro* permettent la croissance et le développement des plantules albinos, qui ne pourraient pas survivre en dehors de ce milieu artificiel. La production d'HD chez les céréales est largement impactée par la forte régénération de plantules albinos qui ne peuvent être acclimatées en dehors de la culture *in vitro* et donc ne sont pas utilisables par les sélectionneurs.

Chez les plantules albinos de céréales issues d'androgénèse, des travaux ont mis en évidence l'absence de chlorophylle a et b (Asakaviciute et al., 2006). Toutefois, un des précurseurs de la chlorophylle, le protochlorophyllide, est présent chez ces plantules albinos. La chlorophylle n'est pas le seul pigment à être absent ou fortement réduit chez les plantules albinos issues de l'androgénèse, on constate également des taux largement inférieurs de violaxanthine, de lutéine et de β -carotène chez ce phénotype (Kumari et al., 2009). La voie de biosynthèse de la chlorophylle n'est donc pas la seule voie impactée et la synthèse des autres pigments secondaires associés à la photosynthèse est également régulée négativement chez les plantules albinos.

3.2. Etudes cytologiques et génétiques de l'albinisme en androgénèse

3.2.1. Le devenir des plastides au sein des microspores

3.2.1.1. Voie gamétophytique

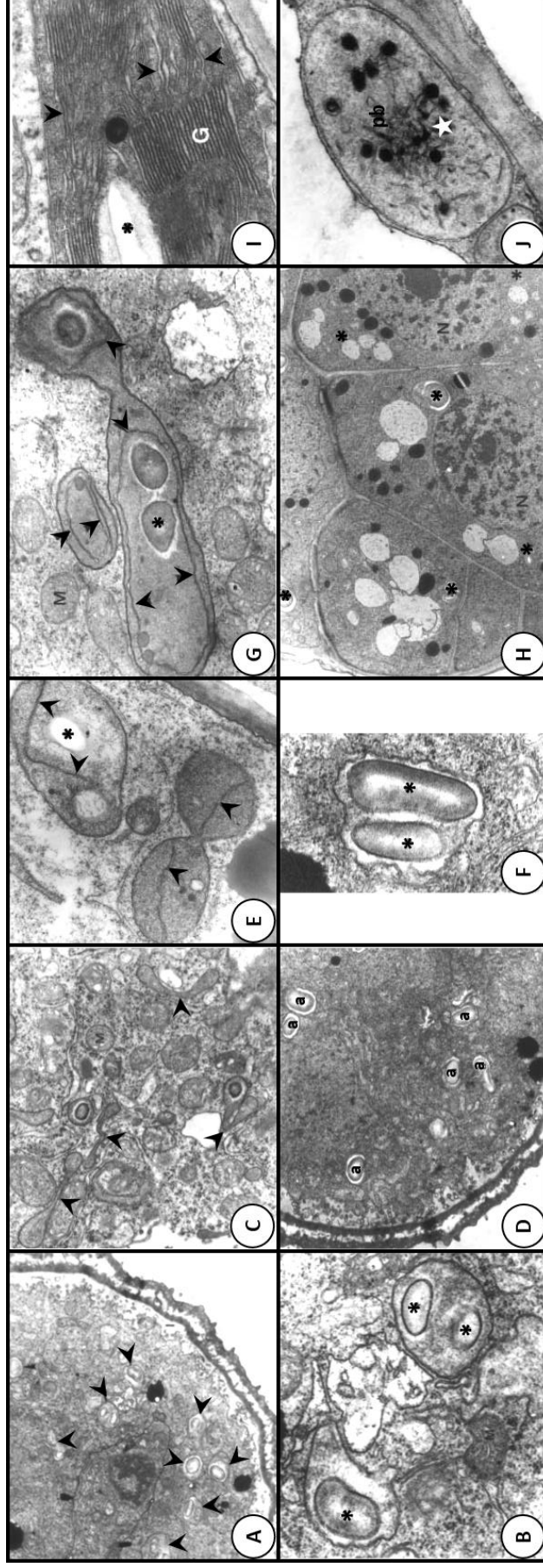
Les microspores possèdent 10 à 20 plastides de petite taille, incolores, indifférenciés, appelés proplastides. Ces proplastides n'ont aucune fonction métabolique au sein de ces cellules immatures et peuvent se différencier en n'importe quel type de plaste, selon le devenir de la

cellule (Jarvis and López-Juez, 2013). Lors du développement gamétophytique des microspores, les proplastes contenus dans la cellule végétative se différencient en amyloplast, permettant le stockage de l'amidon, indispensable pour la formation et la germination du tube pollinique, ou dégénèrent (Clément and Pacini, 2001; Mozgova et al., 2012). Lors du développement du pollen de ces espèces, l'ADN plastidial (ADNpt) est dégradé lors des mitoses des microspores, pendant la maturation du pollen et la croissance du tube pollinique (Careda et al., 1999b; Mogensen, 1996). Chez les céréales comme le blé et l'orge, l'hérédité cytoplasmique est maternelle. Chez les plantes issues de fécondation, les chloroplastes proviennent donc exclusivement de la mère (Kumari et al., 2009).

3.2.1.2. Voie sporophytique

En androgénèse, la régénération de plantules chlorophylliennes n'est possible que si les proplastes au sein des microspores sont correctement reprogrammés vers une différenciation en chloroplastes. Cependant, en androgénèse chez les céréales, tous les proplastes ne se différencient pas en chloroplastes au sein des microspores réorientées et certains montrent un développement similaire à celui observé lors du développement gamétophytique des microspores, c'est-à-dire une différenciation en amyloplast, tandis que d'autres dégénèrent. Cette absence de différenciation des proplastes en chloroplastes aboutit à la formation de plantules albinos.

Une récente étude sur les microspores de colza a mis en évidence un phénomène inhabituel et peu connu se produisant au sein des plastes (Parra-Vega et al., 2015). Il a été montré que les microspores réorientées vers l'embryogénèse possèdent des plastes atypiques, présentant des changements drastiques dans leur ultrastructure avec une réduction du nombre de thylakoïdes et du volume du stroma, des protusions et des compartiments internes remplis de cytoplasme. La présence de phosphatase acide a permis en outre de mettre en évidence une activité lytique au sein de ces plastes. Cette forme plastidiale est transitoire, car les microspores non embryogènes et les embryons dérivant de microspores, à un stade de développement plus avancé, présentent uniquement des plastes conventionnels (proplastes, amyloplast ou chloroplastes). Ainsi, sous certaines conditions spécifiques, telles que celles nécessaires au processus d'androgénèse, les plastes peuvent se différencier en plastes autophagiques, ou plastolysomes, capables de nettoyer et remodeler



Étude cytologiques du développement des plastides au cours du processus d'androgénèse au sein des microspores d'orge d'hiver (en haut) et d'orge de printemps (en bas) : à l'issue du prétraitement (A, B), après sept jours (C, D), douze jours (E, F) et vingt-et-un jours de culture *in vitro* (G, H), au sein des plantules chlorophylliennes (I) et albinos (J) régénérées.

(A ; B) Les proplastides (flèches) accumulent de l'amidon (astérisques) et aucun thylakoïde n'est visible. x 6000 (A) et x 38 000 (B)

Orge d'hiver : (C) Une forte densité de plastides (flèches) est observée au sein des structures multicellulaires d'orge d'hiver. x 20 000 ; (E) Les plastides se divisent activement, la quantité d'amidon diminue (astérisques) et on observe la formation et le développement des thylakoïdes après douze jours de culture *in vitro* chez l'orge d'hiver (flèches). x 22 000 ; (G) Après vingt-et-un jours de culture, les thylakoïdes se différencient (flèches) en parallèle de l'allongement des plastides et de la réduction de la quantité d'amidon. x 20 000 ; (I) Au sein des plantules chlorophylliennes régénérées *in vitro*, les plastides se sont différenciés en chloroplastes avec des thylakoïdes disposés en grana (flèches). On note également la présence d'amidon (astérisque). x 40 000

Orge de printemps : (D) Les structures multicellulaires du génotype d'orge de printemps possèdent uniquement des amyloplastides. x 7 500 ; (F) À douze jours de culture, on observe une accumulation d'amidon au sein des amyloplastides (astérisques). x 40 000 ; (H) À vingt-et-un jours de culture, on observe une faible densité de plastides qui sont toujours des amyloplastides (astérisques). x 4 600 ; (J) Chez les plantules albinos régénérées *in vitro* d'orge de printemps, les plastides contiennent uniquement des plastoglobules (étoile) et des corps prolamellaires (pb). x 15 000. Observations effectuées en microscopie électronique à transmission. Adapté et modifié de Caredda et al. 2000.

le cytoplasme des microspores, essentiel pour l'établissement du programme de développement sporophytique. Ces plastolysomes représentent environ 40 % de la population plastidiale totale et dégènèrent au cours de l'embryogénèse des microspores.

La régénération de plantules albinos est un phénomène très rare chez les espèces de Dicotylédones, contrairement aux céréales où des espèces comme le blé et l'orge peuvent parfois régénérer exclusivement des plantules albinos. Il apparaît donc nécessaire de modifier le devenir des plastes, de réorienter leur développement, comme c'est le cas pour les microspores lors du processus d'androgénèse, pour éviter les dommages et la dégradation de l'ADNpt, et ainsi régénérer des plantules chlorophylliennes.

3.2.2. Études cytologiques

De nombreuses études ont été menées sur les causes possibles de l'albinisme en androgénèse, et notamment sur l'intégrité chloroplastique aux niveaux morphologique, biochimique et génomique.

Différentes hypothèses ont été formulées sur la phase critique du devenir des plastes en androgénèse : certaines postulent que les premières étapes du développement des microspores seraient cruciales et que le stress inducteur appliqué aux microspores permettrait de stopper les dégradations de l'ADNpt. Ainsi les microspores ayant subi peu de dégâts au niveau de leurs plastes régénèreraient des plantules chlorophylliennes tandis que les autres produiraient des plantules albinos (Muñoz-Amatriaín et al., 2009; Sunderland and Huang, 1985; Wang et al., 1999). D'autres hypothèses, à l'inverse, indiquent que des étapes plus tardives du processus d'androgénèse seraient impliquées, notamment la phase de régénération des plantules (Mouritzen and Holm, 1994).

Une étude récente menée sur la différenciation des plastes lors de la microgamétogénèse de l'orge a démontré que la régénération de plantules albinos est déterminée non pas au stade de régénération des plantules mais avant même le début du processus d'androgénèse (Gajecka et al., 2020). En effet, les auteurs ont montré une activation précoce de la synthèse d'amidon dans les microspores *in planta*, à un stade antérieur ou équivalent au stade uninuclée centré, stade couramment utilisé pour les céréales en androgénèse, chez les génotypes qualifiés de récalcitrants pour la production de plantules

chlorophylliennes. Cette activation précoce de la synthèse d'amidon reflèterait le début de la différenciation des proplastes en amyloplastres chez ces microspores entraînant, lors de l'androgénèse, une faible régénération de plantules chlorophylliennes pour ces génotypes. Des études cytologiques menées par Caredda et son équipe (1999 ; 2000 ; 2004) ont montré des différences structurales et développementales des plastes au sein des microspores d'orge en androgénèse. Avant le prétraitement, dans les épis, les microspores contiennent des proplastres avec un unique grain d'amidon, un seul thylakoïde et qui sont dépourvus de corps prolamellaire (PLB). Le stress appliqué aux microspores provoque quelques modifications de la structure et de l'organisation des proplastres qui possèdent alors plusieurs grains d'amidon dans leur stroma et quelques prothylakoïdes (Figure 3 A et B, adapté de Caredda et al. 2000). Après une dizaine de jours de culture *in vitro*, les cellules, organisées en structures multicellulaires contiennent des proplastres allongés, possédant toujours de l'amidon, mais également de jeunes thylakoïdes (Figure 3 C à F). Ce n'est seulement qu'à partir de 21 jours de culture, lorsque les premières structures embryonnaires sont visibles, que l'on peut observer la différenciation des proplastres en chloroplastes (Figure 3G). Au cours de la culture, des anomalies de développement ont été mises en évidence au sein d'une partie des plastes, avec de fortes modifications structurales de leur enveloppe et de la membrane des thylakoïdes. Des plastes anormaux, indifférenciés, contenant des PLB, beaucoup de plastoglobules et des thylakoïdes non organisés ont été rapportés dans les structures androgéniques du génotype d'orge récalcitrant (Figure 3H). Les cellules des plantules albinos régénérées présentent des anomalies de développement des plastes, qui contiennent peu de membranes internes, une quantité importante de PLB et de plastoglobules (Figure 3J), alors que les plantules chlorophylliennes possèdent des chloroplastes fonctionnels (Figure 3I), contenant une quantité importante de membranes internes, des thylakoïdes organisés en grana et quelques grains d'amidon. Enfin, Caredda et al. (2004) ont révélé l'absence de chlorophylle lors de la régénération des embryons dérivant des microspores chez le génotype récalcitrant d'orge de printemps, contrairement aux embryons du génotype d'hiver qui accumulent rapidement de la chlorophylle après l'exposition à la lumière.

La régénération de plantules albinos est due à un échec de la reprogrammation du développement des plastes et les étapes précoces de l'androgénèse jouent probablement un

rôle crucial dans la capacité des plastes à se différencier en chloroplastes. Le prétraitement appliqué doit être capable de réorienter à la fois le noyau des microspores mais également les plastes. Or, pour certains génotypes, de blé ou d'orge, les microspores en culture régénèrent à la fois des plantules chlorophylliennes et des plantules albinos. Cela suggère que le prétraitement est capable de réorienter le devenir d'une partie seulement des proplastides au sein de la population de microspores. Cette reprogrammation est certainement influencée par de nombreux facteurs agissant de manière complexe, avec notamment l'influence du génome nucléaire sur l'expression du génome plastidial et avec l'interaction entre ces deux génomes.

3.2.3. Étude du génome plastidial et influence du génome nucléaire sur la régénération de plantules albinos

De nombreuses études ont porté sur la comparaison génomique de l'ADNpt des plantules androgéniques chlorophylliennes et albinos. Le génome plastidial est considéré comme hautement stable. Néanmoins chez les plantules albinos, des défauts importants dans la structure de l'ADNpt ont été mis en évidence, comme des délétions simples ou multiples de segments d'ADN allant de 10 à 100kbp (Harada et al., 1992). Ces délétions, principalement situées dans la région de copie unique du génome des plastides, peuvent altérer la conformation de l'ADNpt et donc induire de drastiques changements transcriptionnels, notamment pour les gènes codant les protéines des photosystèmes I et II situés dans cette région (Makowska and Oleszczuk, 2014). Ces délétions de l'ADNpt ont été suggérées de nombreuses fois comme cause principale de l'albinisme et ont été rapportées chez le blé (Day and Ellis, 1984, 1985; Mozgova et al., 2012), l'orge (Dunford and Walden, 1991; Mouritzen and Holm, 1994), le riz (Harada et al., 1991; Yamagishi, 2002), et le triticales (Mozgova et al., 2012). Chez le blé, environ 35% des plantules albinos issues de culture d'anthères possèdent des délétions de taille et localisation différentes (Harada et al., 1991; Zhao et al., 2017). Néanmoins, ces délétions ne sont pas détectées chez toutes les plantules albinos, et une autre étude a révélé des niveaux d'expression différents pour les gènes plastidiaux entre les plantules chlorophylliennes et albinos (Ankele et al., 2005). Ces délétions ne sont donc pas la cause principale de l'albinisme en androgénèse mais pourraient être la conséquence de nombreux stress subis par les microspores comme le stress inducteur ou la culture *in vitro* (Makowska and Oleszczuk, 2014).

Une étude moléculaire menée chez le blé a permis de révéler que les plantules albinos étaient dépourvues de ribosomes plastidiaux et avaient donc une transcription et une traduction modifiée au sein des plastes par rapport à celles des plantules chlorophylliennes. Une étude transcriptomique par puce à ADN chez des génotypes d'orge, présentant une génétique similaire mais une propension à régénérer des plantules albinos différentes en androgénèse, a montré l'expression différentielle de 213 gènes (Muñoz-Amatriaín et al., 2009). Les auteurs ont pu lier l'expression des gènes associés au développement des plastes à la régénération de plantules albinos. Cette étude confirme l'implication des gènes nucléaires dans le développement des chloroplastes au cours de l'androgénèse et leur influence sur la régénération de plantules albinos ou chlorophylliennes. Les études transcriptomiques génèrent une quantité colossale de données, dont la plupart n'a pu être traitée à ce jour, et la fonction de nombreux gènes différentiellement exprimés reste encore à identifier. Enfin, de nombreuses études se sont concentrées sur l'identification de QTL (Quantitative Trait Loci) associés à la régénération de plantules chlorophylliennes afin de tenter d'évaluer rapidement par marquage moléculaire l'aptitude, ou la récalcitrance, d'un génotype à produire des plantules chlorophylliennes en androgénèse. Chez le blé, l'analyse de QTL a montré la contribution de facteurs nucléaires pour la formation de plantules albinos, cartographiés sur les chromosomes 1BL, 2AL, 2BL, 5BL (Torp et al., 2001). De plus, différents QTLs associés à l'albinisme ont pu être identifiés chez l'orge (Chen et al., 2007; Muñoz-Amatriaín et al., 2008), le triticales (Krzewska et al., 2015) et le riz. La combinaison de plusieurs QTL permet d'expliquer une partie seulement de la fréquence de différenciation de plantules chlorophylliennes et souvent, les gènes sous-jacents à ces QTL ne sont pas connus.

Enfin, très récemment, une étude menée sur la différenciation des proplastides au cours de l'androgénèse a montré que l'altération de la machinerie traductionnelle des plastes a provoqué le blocage précoce de leur différenciation au sein des embryons d'orge, et a inhibé le processus de photomorphogénèse (Gajecka et al., 2021). De plus, les auteurs ont rapporté que les plastes, contenus dans les embryons du génotype récalcitrant, présentaient un plus faible nombre de copies du plastome et que sa réplication était en outre incomplète.

3.3. Hypothèses autour d'une mise en place précoce de l'albinisme en androgénèse chez le blé

Malgré les nombreux travaux de recherche et les efforts fournis par plusieurs équipes internationales, les causes de l'albinisme chez les céréales en androgénèse ne sont pas connues, et les hypothèses restent nombreuses. Les différentes études menées ont permis d'appréhender au mieux ce phénomène complexe, multifactoriel et génotype-dépendant. Mais, pour l'heure, aucune solution n'a été trouvée pour pallier à la forte proportion de plantules albinos régénérées chez le blé et permettre une production d'HD en routine pour les génotypes récalcitrants. L'adaptation des modalités de prétraitement et des conditions de culture *in vitro*, notamment la composition des milieux, pour chaque génotype semble bien fastidieuse si aucun élément de réponse supplémentaire ne vient appuyer ces recherches. Nous avons vu précédemment que les mutations et délétions dans l'ADNpt n'étaient pas la cause principale de l'albinisme et que la régénération de plantules albinos était due à l'absence de chloroplastes fonctionnels au sein de ces plantules. L'échec de la reprogrammation des proplastides en parallèle de la réorientation des microspores vers un développement sporophytique semble donc être une piste de recherche prometteuse pour la compréhension du phénomène d'albinisme en androgénèse. Cette hypothèse a été soutenue par la mise en évidence de proplastides, indifférenciés ou bloqués dans leur différenciation, et d'amyloplastides au sein des structures androgéniques et des plantules albinos d'orge (Gajeka et al., 2021). Ces éléments m'ont menée à diriger mes travaux de thèse vers l'hypothèse que le blocage dans la différenciation des proplastides en chloroplastes se produisait, lors de la culture de microspores de blé, de manière précoce. L'étude de la biogénèse des chloroplastes lors du développement normal de l'embryon et de la plante est un vaste domaine de recherche et, même si la plupart des mécanismes cellulaires et moléculaires ont été élucidés, des zones d'ombre subsistent.

L'analyse fine des mécanismes en jeu dans cette biogénèse et le transfert de ces connaissances au système d'androgénèse pourrait permettre d'apporter une compréhension essentielle pour identifier les déterminants de l'albinisme en androgénèse.

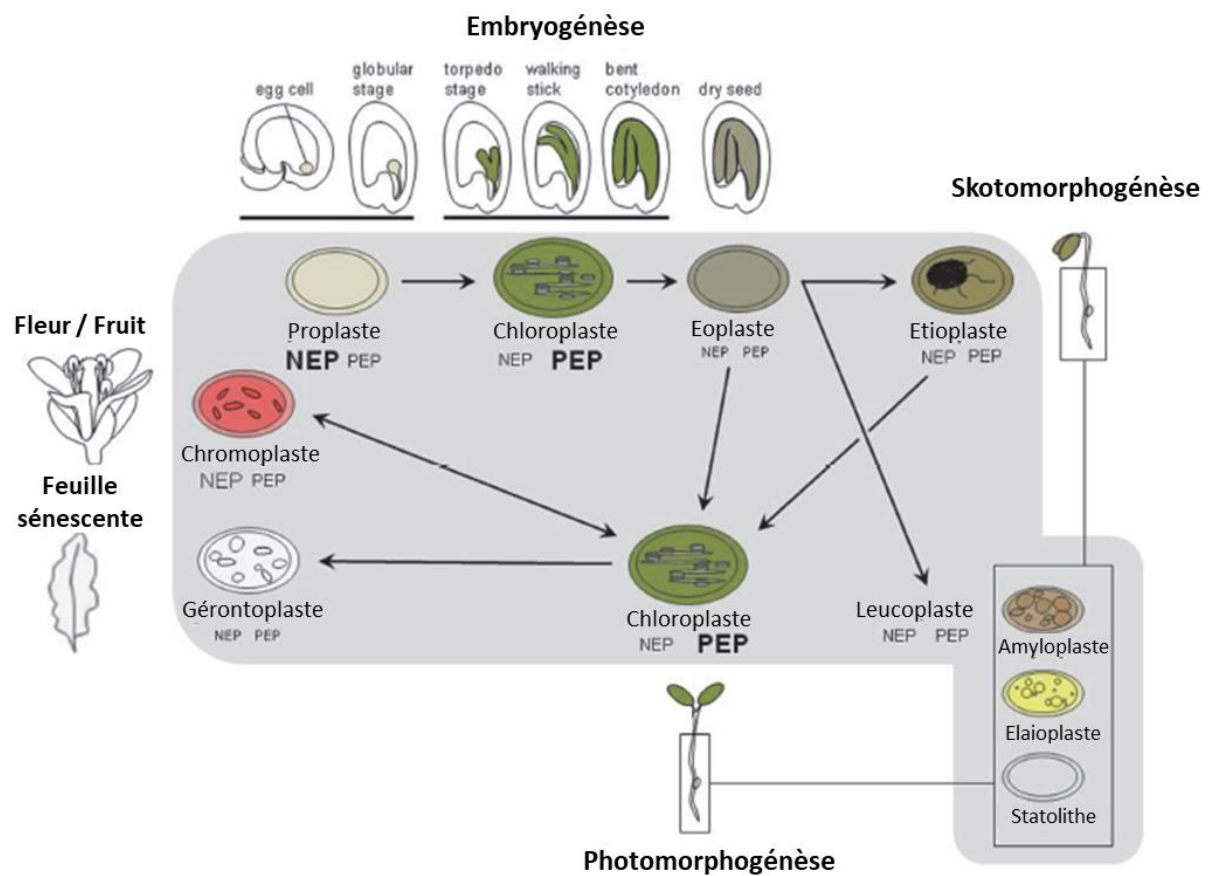


Figure 4 : Transitions entre les différents types de plastes au cours du cycle de vie d'une plante. Les étapes importantes du développement d'un Angiosperme, de la fécondation au développement des fleurs sont représentées en périphérie. Les étapes de l'embryogénèse illustrées sont celles d'un embryon de Monocotylédones (issu de Brunelle et al., 2017). La partie interne (fond gris) indique les principaux types de plastes se trouvant dans les tissus au stade de développement correspondant. Les flèches indiquent le type et les transitions possibles entre ces types de plastes. La machinerie transcriptionnelle des plastes est également représentée par les symboles NEP et PEP, correspondant aux ARN Polymérases codées par le noyau et par le plaste, respectivement. La taille des lettres représente le niveau d'activité relatif de chacune de ces deux types d'ARN polymérases, dans le type de plaste respectif. *Traduit et adapté de Liebers et al. 2017.*

4. Les chloroplastes : fonctions, plasticité, et régulation

4.1. Les différents types de plastes et leurs fonctions

Chez les plantes, il existe une large variété de plastes impliqués dans des fonctions essentielles au sein de la cellule (Figure 4, adaptée de Liebers et al., 2017). Parmi eux, les proplastides correspondent à la forme indifférenciée de plastides, se trouvant dans des types cellulaires très peu différenciés ainsi que chez les embryons zygotiques. Les proplastides peuvent se différencier en n'importe quel autre type de plastides, selon le tissu dans lequel ils se trouvent et le stade de développement de la plante (Figure 4). Les amyloplastides et les leucoplastides sont des plastides de réserve, permettant l'accumulation d'amidon et de lipides respectivement. Ils sont principalement présents dans les cellules des tissus et organes de réserve. Enfin, il existe deux types de plastides colorés, les chromoplastides, responsables de la couleur des fleurs et des fruits, et les chloroplastides, forme photosynthétique. Lors du vieillissement de la plante, les gérontoplastides sont formés à partir des chloroplastides dans les tissus en sénescence (Jarvis and López-Juez, 2013). La plupart de ces plastides sont issus de la différenciation des proplastides, mais cette différenciation peut être réversible et un plastide mature peut se dédifférencier d'un type de plastide à l'autre en réponse à des signaux environnementaux et/ou cellulaires (Møller et al., 2014).

Les chloroplastides sont la forme dominante de plastides. Ils se développent généralement à partir de proplastides, ou dans certaines conditions, notamment lors de la croissance de la plante à l'obscurité appelée skotomorphogénèse, à partir des étioplastides. Les chloroplastides sont des organites de 5 à 10 μm de diamètre localisés dans le cytoplasme des cellules. Leur ultrastructure est caractérisée par trois éléments essentiels : la double enveloppe, le stroma et les thylakoïdes. Les chloroplastides sont le siège de la photosynthèse et occupent également une place centrale dans le métabolisme de la plante. En effet, ils produisent des acides gras, des acides aminés aromatiques et non-aromatiques – essentiels pour la synthèse protéique et la synthèse de nombreux métabolites secondaires, des bases purines et pyrimidines, des isoprénoïdes comme les caroténoïdes et les stérols, et des tétrapyrroles comme l'hème et la chlorophylle (Tetlow et al., 2018).

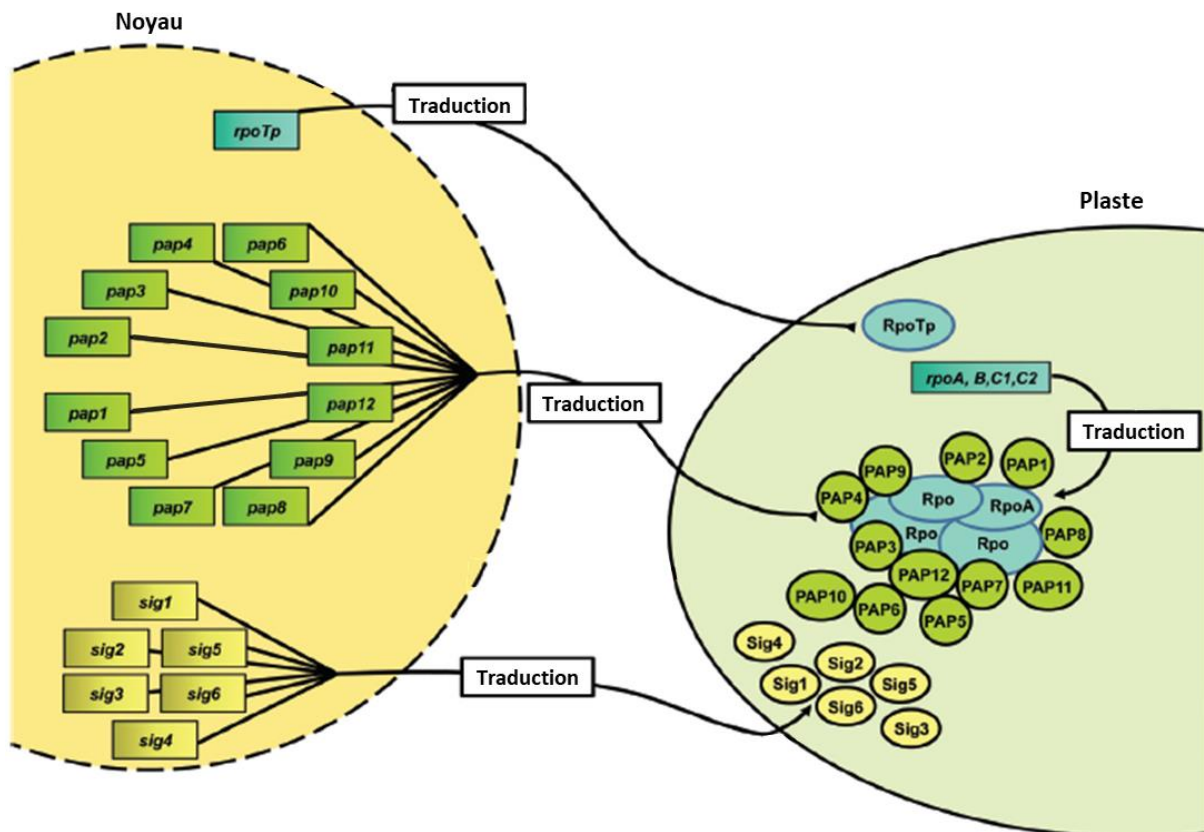


Figure 5 : Machinerie transcriptionnelle des plastides. Le gène nucléaire *rpoTp* code pour l'ARN Polymérase codée par le noyau (NEP). *rpoTp* est ensuite traduit dans le cytoplasme et importé dans le plaste où il transcrit les gènes plastidiaux sous promoteur NEP. La transcription des gènes plastidiaux se fait également par l'ARN Polymérase codée par le plaste (PEP). La PEP est composée de quatre sous-unités codée par les gènes plastidiaux *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*. La reconnaissance des promoteurs des gènes plastidiaux par la PEP et la formation d'un complexe protéique PEP stable nécessitent d'autres facteurs, les facteurs sigma et les PAP (PEP-Associated Protein) respectivement. Ces facteurs sont codés par le génome nucléaire, traduits dans le cytoplasme et importés dans le plaste. Les cases rectangulaires représentent des gènes, tandis que les ovales et les cercles correspondent aux composants protéiques. Les flèches noires indiquent le parcours d'un gène via ces transcrits et sa traduction vers le lieu d'action de la protéine correspondante. *Traduit et adapté de Pfannschmidt et al. 2015*

4.2. La machinerie plastidiale

Les plastes présentent un caractère semi-autonome avec une machinerie génétique propre. Le génome plastidial, ou plastome, est composé de 120 à 160 kPb codant pour 120 à 135 gènes (López-Juez, 2007). Il est considéré comme hautement polyploïde avec un nombre important de copies par plaste : en moyenne 20 copies du plastome par proplaste et environ 100 copies chez le chloroplaste, ce qui peut représenter jusqu'à 10 000 copies par cellule (Sugiura, 1992). Néanmoins, la majorité des protéines plastidiales sont codées par le génome nucléaire (Gray et al., 2003). Il est donc nécessaire d'avoir une régulation et une coordination étroites entre ces deux génomes pour assurer et maintenir les processus biologiques clés se déroulant dans les plastes.

L'expression des gènes plastidiaux s'effectuent grâce à deux ARN polymérases d'origines différentes (Börner et al., 2015). La NEP (Nuclear-Encoded Polymerase) est une polymérase de type phagique composée d'une seule sous-unité chez les Monocotylédones (rpoTp), et de deux sous-unités chez les Dicotylédones (rpoTp et rpoTmp). Les gènes sous promoteur NEP sont principalement des gènes de ménage impliqués dans les fonctions cellulaires essentielles, et codent également pour des composants clés de la machinerie génétique plastidiale (Figure 5, adaptée de Pfannschmidt et al., 2015).

La PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase) est constituée de quatre sous-unités codés par les gènes plastidiaux rpoA, rpoB, rpoC1 et rpoC2 (Figure 5). Son origine procaryotique oblige cette polymérase à interagir avec des facteurs supplémentaires, les facteurs sigma, afin d'être reconnue par le promoteur des gènes cibles et initier ainsi leur transcription (Cuitun-Coronado and Dodd, 2021). Six facteurs sigma (SIG1 à SIG6) ont été caractérisés : SIG1 représente le facteur sigma le plus abondant, plutôt accumulé pendant le développement des feuilles (Ortelt and Link, 2014), SIG3 et SIG4 sont responsables de la transcription de certaines sous-unités de l'ATP synthase et de la NADH déshydrogénase, respectivement, et SIG5 est notamment impliqué dans la transcription de gènes induite par le stress. SIG6 a une action précoce dans le développement des chloroplastes en agissant sur les promoteurs des gènes photosynthétiques (Loschelder et al., 2006; Pogson et al., 2015). Sa régulation transcriptionnelle, tout comme celle de SIG2, est dépendante du phytochrome, et donc de la lumière. SIG6 est ensuite remplacé par des facteurs sigma plus généraux comme SIG1 et SIG3. SIG2 joue un rôle primordial dans la transcription des ARNt (Woodson et al., 2013).

Chez l'orge, deux études récentes menées par Gajecka et son équipe (Gajecka et al., 2020, 2021) ont rapporté une surexpression de SIG2 dans les microspores d'orge au stade uninucléé centré chez les génotypes produisant majoritairement des plantules albinos en androgénèse, par rapport aux microspores provenant de génotypes régénérant des plantules chlorophylliennes.

Enfin, dans le chloroplaste, la formation et la stabilisation du complexe PEP requièrent des sous-unités supplémentaires codées par le noyau, appelées PAPs (Plastid-Associated Proteins). Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte 12 PAPs différentes (Figure 5), classées en 3 groupes, possédant des structures et fonctions variées (Liebers et al., 2018). La mutation ou l'inactivation d'une seule des PAPs provoque un phénotype albinos chez *Arabidopsis* (Pfannschmidt et al., 2015; Steiner et al., 2011). Ainsi l'expression de chacun des gènes codant pour les PAPs est requise lors des stades précoces de la biogénèse des chloroplastes, sans quoi, aucun chloroplaste fonctionnel n'est formé.

Les gènes plastidiaux peuvent être classés en trois catégories (Hajdukiewicz et al., 1997; Møller et al., 2014):

- Classe I : ceux possédant un promoteur PEP, principalement des gènes codant des composants de l'appareil photosynthétique ;
- Classe II : les gènes présentant à la fois des promoteurs NEP et PEP, ce sont plutôt des gènes de ménage, non liés à la photosynthèse ;
- Classe III : ceux présentant uniquement un promoteur NEP.

La plupart des gènes plastidiaux possèdent de multiples promoteurs leur permettant d'être transcrits aussi bien par la NEP que par la PEP. Cette diversité permet une transcription sélective et différentielle des gènes lors du développement et de la différenciation des chloroplastes (Figure 4). Ainsi les gènes sous promoteur NEP sont préférentiellement transcrits lors des étapes précoces de la biogénèse des chloroplastes, et codent notamment les sous-unités de la PEP, comme *rpoB*. Les étapes plus tardives du développement et de la maturation des chloroplastes s'accompagnent d'une inhibition de l'activité de la NEP et d'une transcription préférentiellement effectuée par la PEP (Figure 4). La PEP fournit alors un niveau élevé de transcription des gènes liés à la photosynthèse, nécessaire à l'assemblage des composants de la machinerie photosynthétique et donc à la formation de chloroplastes fonctionnels. Cette transition serait liée à une transcription importante du gène Glu-tRNA (glutamyl-tRNA), produit de transcription de la PEP avec SIG2, lors des phases précoces de la

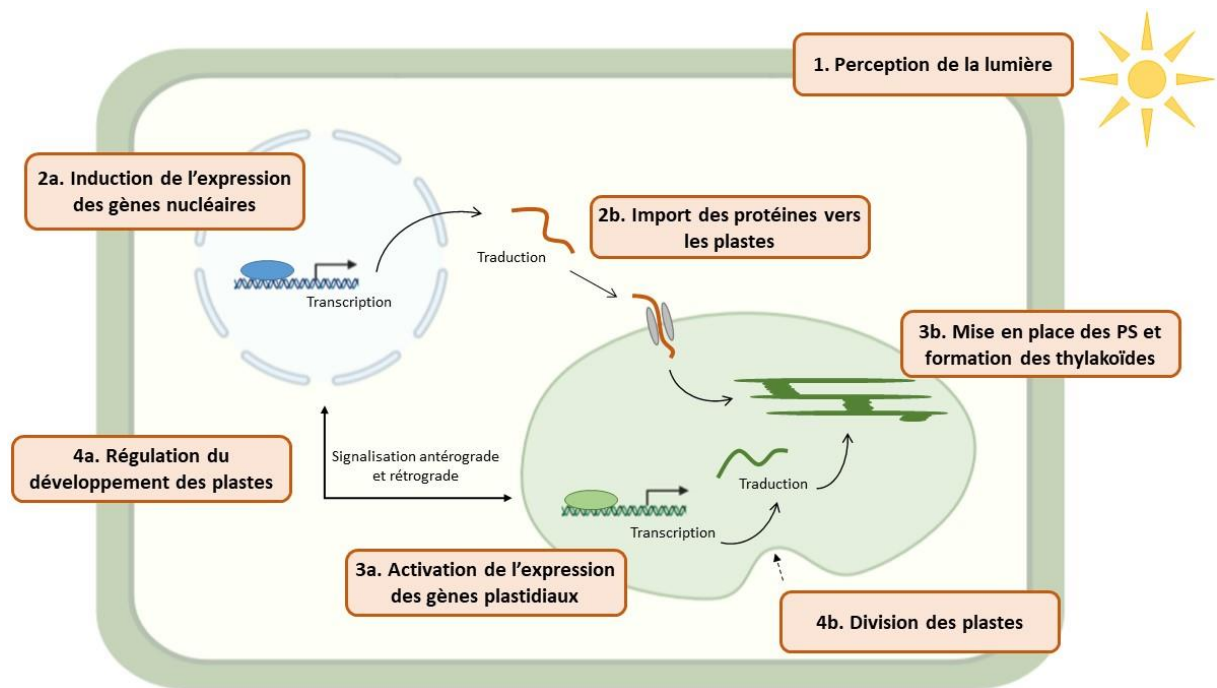


Figure 6 : Principales étapes de la différenciation des chloroplastes. Créé avec BioRender

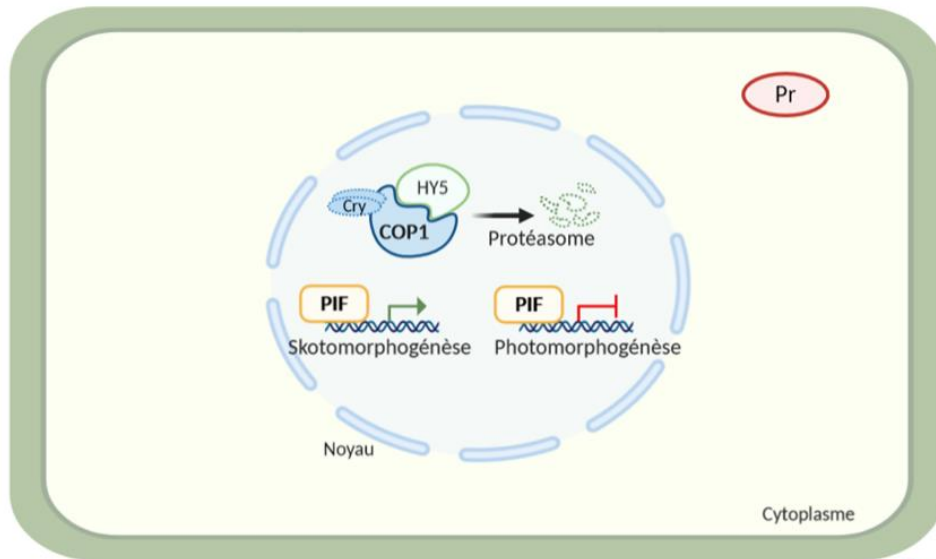
biogénèse des chloroplastes, qui se lie et inhibe l'activité de la NEP (Hanaoka et al., 2005; Kanamaru et al., 2001). Il faut cependant noter que l'activité de la PEP reste sous contrôle nucléaire, notamment grâce aux facteurs sigma codés par le noyau, et qu'une communication antérograde (noyau vers plaste) et rétrograde (plaste vers noyau) est primordiale pour l'activité et le maintien de tous les processus plastidiaux, de l'intégrité du plastome, à la transcription et traduction des gènes nécessaires à l'assemblage des complexes photosynthétiques lors de la formation des chloroplastes (Pfannschmidt, 2010).

4.3. La différenciation des chloroplastes

La formation des chloroplastes est un processus complexe, comprenant de multiples étapes pour aboutir à la formation de chloroplastes matures et fonctionnels (Figure 6). La différenciation des chloroplastes implique une reprogrammation massive de l'expression des gènes et nécessite différents processus tels que la biosynthèse et l'import de protéines, de lipides et de métabolites secondaires, requis pour la formation des thylakoïdes, la biosynthèse de chlorophylles et de caroténoïdes (López-Juez, 2007; Pogson et al., 2015).

Kusumi et al. (2010) propose de diviser la différenciation des chloroplastes en trois étapes cruciales au niveau génétique. La première étape correspond à l'activation de la réplication des plastes et de la synthèse de l'ADN des plastes. La deuxième étape est la mise en place de l'expression génique des plastes : la NEP codée par le génome nucléaire transcrit alors préférentiellement les gènes impliqués dans les mécanismes d'expression des gènes plastidiaux. L'activité transcriptionnelle et traductionnelle des plastes est très élevée à ce stade. Cette étape correspond à l'étape de « construction » des chloroplastes. Enfin, lors de la troisième étape, les gènes nucléaires et plastidiaux codant pour l'appareil photosynthétique sont fortement exprimés, conduisant à la synthèse et à l'assemblage de l'appareil photosynthétique et à l'activation de la compétence photosynthétique des chloroplastes. La transition développementale des proplastes en chloroplastes est donc régulée par des gènes à codage nucléaire ; l'assemblage fonctionnel de l'appareil photosynthétique nécessite donc la coordination étroite entre plastes et noyau (Gray et al., 2003).

A. Obscurité



B. Lumière

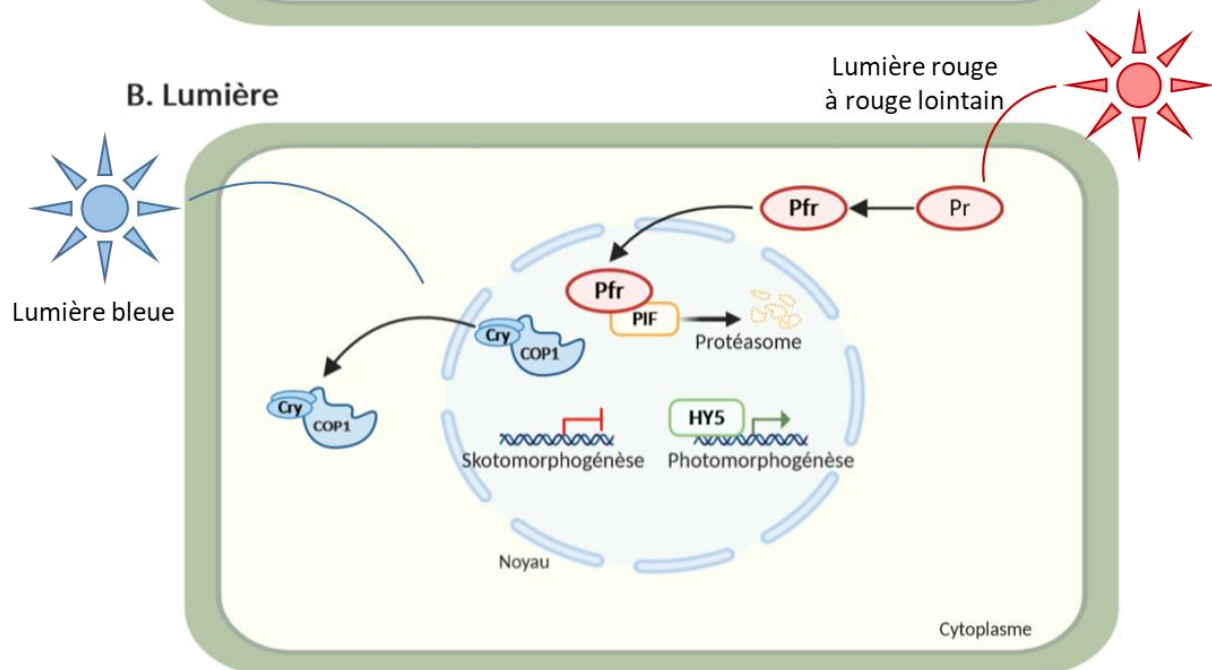


Figure 7 : Perception de la lumière et initiation de la photomorphogénèse. **A.** A l'obscurité, le programme de skotomorphogénèse, croissance de la plante à l'obscurité, est régulée positivement. Les dimères de Cry inactifs sont liés à COP1 dans le noyau. COP1 cible HY5 afin qu'il soit dégradé par le protéasome 26S. Dans le cytoplasme, les phytochromes sont sous forme inactive (Pr). **B.** Dès la perception des premiers signaux lumineux, le programme de photomorphogénèse, croissance de la plante à la lumière, s'initie. La lumière bleue permet l'activation des dimères de Cry qui sont alors transloqués du noyau vers le cytoplasme avec COP1. HY5 n'est alors plus réprimé et peut activer les gènes liés à la photomorphogénèse dans le noyau. La perception de la lumière rouge à rouge lointain permet la conversion des phytochromes de leur forme inactive Pr vers leur forme active Pfr. Ils sont transloqués dans le noyau où ils se lient à PIF qui est alors dégradé. Créé avec BioRender

4.3.1. Perception de la lumière et initiation de la photomorphogénèse

La différenciation des chloroplastes est dépendante de la lumière (Figure 6), sa perception est un point de contrôle fondamental pour l'activation de ce processus (Pogson et al., 2015). Les chloroplastes se différencient majoritairement à partir des proplast. Cependant, si l'intensité lumineuse perçue par les cellules est inférieure à un certain seuil, le développement des proplast est stoppé à un stade intermédiaire, entraînant la formation d'étioplastes (Solymosi and Schoefs, 2010). Ceux-ci sont caractérisés par un corps prolamellaire (PLB) : ensemble de structures membranaires paracristallines constituées de fragments de membranes pro-thylakoïdiennes, de lipides, de NADPH, de protochlorophyllide, précurseur de la chlorophylle, lié à son enzyme inactive, la protochlorophyllide oxydoréductase (POR) (Pogson and Albrecht-Borth, 2014; Rudowska et al., 2012). Les étioplastes fournissent donc le cadre structurel initial de l'appareil photosynthétique. Lorsque l'intensité lumineuse perçue est suffisante, la transition de la skotomorphogénèse vers la photomorphogénèse s'opère au sein des plantes ou plantules, entraînant de nombreux événements moléculaires coordonnés permettant la différenciation des étioplastes en chloroplastes. Il a été rapporté que les plantules albinos d'orge étaient dépourvues de chloroplaste fonctionnel mais présentaient des plastes avec un PLB caractéristique des étioplastes (Careda et al., 1999b; Sunderland and Huang, 1985).

La perception de la lumière et l'initiation du programme de photomorphogénèse sont médiés par deux familles de photorécepteurs principales : les phytochromes (PhyA et PhyB) pour la perception de la lumière rouge à rouge-lointain, et les cryptochromes (Cry1 et Cry2) pour la perception de la lumière bleue et UV-A (Hills et al., 2015). Deux voies de signalisation se trouvent en aval de ces photorécepteurs : la voie COP1-HY5 et la voie des PIFs (Figure 7).

COP1 est un répresseur majeur de la photomorphogénèse à l'obscurité (Figure 7A). Il fonctionne avec trois autres composants, DET1, COP3 et DDB1, pour cibler et réprimer la réponse et la signalisation lumineuse à l'obscurité (Osterlund et al., 2000). A l'inverse, HY5 est un régulateur majeur de la photomorphogénèse à la lumière et régule positivement l'expression de nombreux gènes, dont les PhANGS (Photosynthesis-Associated Nuclear Genes), en se liant à leur promoteur (Ang et al., 1998). À l'obscurité, le complexe COP1, lié à des dimères de Cry inactifs, est localisé dans le noyau où il cible HY5, et d'autres régulateurs positifs de la photomorphogénèse, afin qu'ils soient dégradés par le protéasome 26S (Wei et

al., 2008). La photo-activation de CRY1 permet sa relocalisation dans le cytoplasme des cellules, COP1 n'est donc plus présent dans le noyau. HY5 n'est alors plus ciblé pour dégradation et le niveau d'expression des gènes liés à la photomorphogénèse augmente considérablement (Figure 7B). Par ailleurs, COP1 et DET1 ont une fonction de suppression du développement des chloroplastes dans les tissus non photosynthétiques de la plante, et jouent donc un rôle de répression de la biogénèse des chloroplastes (Waters and Langdale, 2009).

La deuxième voie de signalisation lumineuse implique les phytochromes et les facteurs de transcription PIFs (Phytochrome-Interacting Factors), répresseurs de la photomorphogénèse à l'obscurité (Pham et al., 2018). Ils présentent un mécanisme de fonctionnement inverse à celui des cryptochromes et du complexe COP au niveau de leurs localisations à l'obscurité et à la lumière. À l'obscurité, PIFs régulent un certain nombre de gènes afin de promouvoir la skotomorphogénèse (Figure 7A). PIF1 et PIF3 contrôlent la biosynthèse de la chlorophylle en se liant directement aux promoteurs des gènes, réprimant ainsi leur expression (Stephenson et al., 2009; Yuan et al., 2017) et inhibent la formation du photosystème I (PSI). A la lumière, les phytochromes passent d'une forme inactive Pr à une forme active Pfr et sont transportés dans le noyau où ils se lient aux PIFs (Figure 7B), provoquant leur phosphorylation et donc leur dégradation par le protéasome (Quail, 2002; Shin et al., 2009).

Par ces différents mécanismes, et d'autres non décrits ici, la perception de la lumière entraîne un bouleversement dans l'expression de près d'un tiers des gènes nucléaires pour promouvoir la biogénèse des chloroplastes et leur différenciation en organites fonctionnels.

4.3.2. Induction de l'expression des gènes nucléaires liés à la biogénèse des chloroplastes et import des protéines au sein des plastes.

La biogénèse des chloroplastes repose sur différents processus cellulaires nécessitant un import massif de protéines au sein des plastes (Kakizaki et al., 2009). 90 % de ces protéines sont codées par le noyau, elles sont traduites dans le cytosol sous forme de précurseurs appelés pré-protéines, et importées dans le plaste. Il existe divers systèmes d'import de ces protéines vers le plaste. Elles peuvent être transportées via des vésicules de transport adressées aux plastes puis intégrées dans les membranes des thylakoïdes, permettant ainsi

leur formation et leur développement (Pogson et al., 2015). Deux protéines ont été décrites pour être impliquées dans la formation de ces vésicules de transport. Il s'agit de THF1 (Thylakoid Formation 1) et VIPP1 (Vesicle Including Plastid Protein 1) (Kroll et al., 2001; Pogson and Albrecht-Borth, 2014). Les mutants *vipp1* sont incapables de former des vésicules de transport tandis que les mutants *thf1* accumulent ces vésicules. Ces deux mutants d'*Arabidopsis* présentent des altérations dans la formation des thylakoïdes.

La voie majoritaire pour l'import de ces pré-protéines au sein des plastes est médiée par deux complexes multiprotéiques situés sur l'enveloppe externe et interne, les translocons TOC et TIC, respectivement (Soll and Schleiff, 2004). Le complexe TOC est composé d'au moins trois sous-unités, Toc159, Toc75 et Toc34. Les deux GTPases Toc159 et Toc34 travaillent conjointement comme récepteurs et sites d'accueil des polypeptides à importer à l'intérieur du plaste, tandis que Toc75 forme un canal cationique à travers l'enveloppe externe. L'absence d'un des composants du translocon affecte de façon critique la biogénèse des chloroplastes. Chez *Arabidopsis*, les mutants *ppi2* (mutation de Toc159) et *ppi1* (mutation knockout de l'isoforme de Toc34) montrent une absence d'accumulation de protéines photosynthétiques et/ou une déficience dans leur import au sein du plaste, se traduisant respectivement par un phénotype albinos et vert pâle (Bauer et al., 2000; Kubis et al., 2003). Le complexe TIC est formé d'au moins six sous-unités, dont Tic110 qui forme un canal cationique au travers de l'enveloppe interne. Peu d'éléments sont aujourd'hui connus sur le complexe protéique TIC mais les trois sous-unités Tic110, Tic40 et Hsp93 semblent représenter le complexe minimal fonctionnel. La réduction de l'expression de Tic110 entraîne une diminution importante de la formation des membranes thylakoïdiennes résultant en un phénotype vert pâle chez *Arabidopsis* (Inaba et al., 2003).

Il existe également d'autres voies pour l'import des protéines au sein des plastes : environ 10% des protéines seraient importées autrement que via le translocon Toc-Tic (Jarvis and López-Juez, 2013). Les protéines sont ensuite adressées aux thylakoïdes soit spontanément, soit via d'autres voies de transport (Lopez-Juez and Pyke, 2005; Soll and Schleiff, 2004).

4.3.3. Formation des thylakoïdes et mise en place des photosystèmes.

La formation des thylakoïdes est l'un des points centraux de la différenciation des chloroplastes et hautement dépendante de leur développement. Dans le stroma des

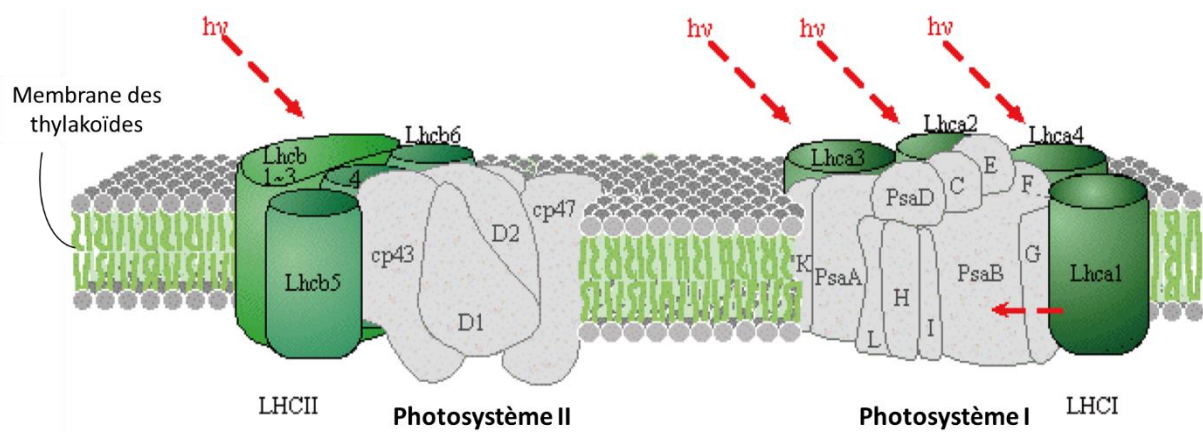


Figure 8 : Structure des photosystèmes. Chaque photosystème est composé d'un centre réactionnel (en gris) et entouré des complexes de capture de la lumière (en vert) codés par les gènes *Lhca* et *Lhcb* pour le photosystème I et II respectivement. Les flèches rouges et le symbole $h\nu$ représentent le flux de photons. Traduit et adapté de Shi et al. 2017.

chloroplastes matures, les membranes thylakoïdiennes sont disposées en réseaux de lamelles interconnectées appelé grana, liés les uns aux autres par des lamelles stromatiques non empilées (Adam et al., 2010). Lors de la différenciation des proplastides en chloroplastes, la formation des membranes des thylakoïdes et l'assemblage des complexes protéiques au sein de celles-ci se font de manière coordonnées. La formation des membranes thylakoïdiennes requiert des lipides spécifiques, les galactolipides (Jarvis et al., 2000), alors que les autres membranes cellulaires sont plutôt composées de phospholipides. Une carence en galactolipides aura donc de graves conséquences sur le développement et la différenciation des chloroplastes. La formation des lamelles et leur assemblage en grana implique l'incorporation de complexes protéiques, que sont le PSI, PSII, le complexe cytochrome b6/f et l'ATP synthase (Lopez-Juez and Pyke, 2005; Pogson et al., 2015). Lors de la transition étioplaste-chloroplaste, une étape supplémentaire de désassemblage du PLB est nécessaire pour la formation des thylakoïdes.

Les thylakoïdes sont la plateforme des réactions lumineuses de la photosynthèse, grâce à la présence du PSI et PSII au sein de leurs membranes (Figure 8, tiré de Shi et al., 2017). Ces photosystèmes sont composés d'un centre réactionnel (codé par les familles de gènes *Psa* et *Psb*) entouré de complexes de capture de la lumière (famille de gènes *Lhca* et *Lhcb*), permettant la collecte et le transfert de l'énergie lumineuse vers ces centres réactionnels (McAvoy et al., 2018). Les protéines des complexes de capture de la lumière sont codées par le génome nucléaire et représentent plus de 50% de la teneur en protéines de la membrane des thylakoïdes (Schünemann, 2004). Au niveau du PSII, les protéines *Lhcb* ne peuvent s'insérer dans les membranes des thylakoïdes qu'en présence de chlorophylle (Reinbothe et al., 2006). Un défaut dans l'expression des gènes liés à la biosynthèse de la chlorophylle engendre une diminution de l'expression des gènes *Lhcb* et réciproquement. *Lhcb1* est la principale protéine des grana des thylakoïdes et son expression, induite par la lumière, est réprimée par COP1 et DET1 à l'obscurité (Lopez-Juez and Pyke, 2005). Une étude transcriptomique menée par Zhao et son équipe (Zhao et al., 2017) a permis de mettre en évidence la sous-régulation de *Lhcb1* et *Lhcb4* chez les plantules albinos de blé issues d'androgénèse par rapport aux plantules chlorophylliennes. Chez l'orge, on a également rapporté un niveau d'expression de *psbD* fortement réduit voir indétectable chez les plantules albinos issues d'androgénèse (Dunford and Walden, 1991; Zhao et al., 2017). Or, chez le riz,

lors du développement des feuilles, on observe une accumulation de Lhcb1 et psbA lors de la biogénèse des chloroplastes (Kusumi et al., 2010).

Au sein des photosystèmes, FtsH2 permet le démontage et le renouvellement des protéines des centres réactionnels préservant ainsi l'intégrité et la fonction photosynthétique de ces systèmes. FtsH2 est donc nécessaire pour la formation de chloroplastes fonctionnels. Un homologue a d'ailleurs été identifié chez les microspores d'orge et pourrait jouer un rôle dans la biogénèse des chloroplastes lors du processus d'androgénèse (Maraschin et al., 2006; Yu et al., 2004).

La formation de photosystèmes fonctionnels et intègres est donc une étape cruciale dans la biogénèse et la différenciation des chloroplastes, dont l'assemblage incomplet conduit à un phénotype albinos.

4.3.4. Régulation de la biogénèse des chloroplastes et de la photomorphogénèse

La biogénèse des chloroplastes implique la synthèse conjointe de protéines, de lipides et de métabolites secondaires codés par des gènes nucléaires et plastidiaux. Les voies de signalisation inter-organites sont donc indispensables pour coordonner l'expression des deux génomes au niveau de la transcription, traduction, import et turn-over des protéines (Gray et al., 2003).

De récents travaux ont mis en avant le rôle clé des facteurs de transcription nucléaires GLK dans la régulation des gènes impliqués dans la formation des complexes protéiques des thylakoïdes et notamment les complexes de capture de la lumière (Waters et al., 2008). Les gènes GLK1 et GLK2 sont partiellement redondants et fonctionnellement équivalents, et sont impliqués dans la régulation du développement des chloroplastes en régulant positivement l'expression des PhANGs (Hills et al., 2015; Waters et al., 2008), y compris les gènes codant pour les protéines des complexes de capture de la lumière comme Lhcb1. GLK1 est d'ailleurs associé au développement normal des chloroplastes chez de nombreuses espèces comme *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* (Fitter et al., 2002), *Physcomitrella patens* (Yasumura et al., 2005), *Zea mays* (Rossini et al., 2001), et *Brassica napus* (Pan et al., 2017). Chez *Arabidopsis*, le double mutant *glk1glk2* présente un nombre réduit de thylakoïdes qui échouent à former des grana, entraînant la formation de chloroplastes non fonctionnels se

traduisant par un phénotype vert pâle. De plus, on observe chez ce double mutant une réduction de la transcription des gènes sous promoteur NEP, notamment les gènes associés à la biosynthèse de la chlorophylle, les gènes *Lhcb1* à *Lhcb6*, et une réduction de l'expression de *psaA*, provoquant une altération du PSI. Chez le blé, le mutant albinos mta présente une sous-régulation de ces deux gènes, *GLK1* et *GLK2* (Shi et al., 2017). Les gènes GLK agissent pour maintenir un appareil photosynthétique fonctionnel au sein des cellules (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2008) et leur absence affecte considérablement le développement et la différenciation des chloroplastes.

Au cours du développement de la plante, le nombre de plastes par cellule augmente significativement et doit correspondre à la dynamique de division et d'expansion cellulaire. Cela est particulièrement vrai lors de l'embryogénèse, mais également au cours du processus d'androgénèse, chez les microspores réorientées se divisant activement et dans les structures androgéniques (Careda et al., 1999b, 2000, 2004). Les plastes ne peuvent pas être synthétisés *de novo*, ils se multiplient par fission binaire (López-Juez, 2007). Leur division est médiée par des protéines de type tubuline, connues sous le nom de FtsZ, collaborant avec des protéines de type dynamine telle que ARC5 (Accumulation and Replication of Chloroplast 5) (Gao et al., 2003; Kuroiwa et al., 2002; Yang et al., 2008). La polymérisation de FtsZ permet de former une structure en anneau, aussi appelé anneau Z, au niveau de l'enveloppe interne du plaste. La protéine ARC6 permet le maintien et la stabilité de cet anneau Z. Les protéines PDV1, PDV2 et DRP5B vont moduler la division des plastes au niveau de leur enveloppe externe. Ces deux machineries sont hautement coordonnées : l'interaction entre ARC6, sur l'enveloppe interne, et de PDV2, au niveau de l'enveloppe externe, permet aux deux complexes de reconnaître le même site de division et ainsi d'obtenir deux plastes-fils de taille équivalente (Miyagishima et al., 2006). Le mutant *arc6* présente une réduction importante du nombre de chloroplastes par cellule, réduisant ainsi considérablement sa capacité photosynthétique (Pyke et al., 1994). Cette baisse d'activité de division plastidiale est probablement due à une instabilité du complexe FtsZ ou à une absence de reconnaissance du site de division par PDV2. Une étude a révélé que l'application de cytokinines exogènes dans le milieu de culture permet d'augmenter spécifiquement les niveaux d'expression et de traduction des protéines PDV2 chez *Arabidopsis* durant la germination et le développement des cotylédons (Okazaki et al., 2009). Cette régulation à la hausse de PDV2 provoque une augmentation significative des taux de division des plastes et par conséquent le nombre de chloroplastes dans les cotylédons.

La biogénèse des chloroplastes est un mécanisme biologique complexe, soumis à de nombreux signaux externes, comme la lumière, la température, le stress, mais également à des voies de régulation antérograde, du noyau vers le plaste, et rétrograde. Ce processus n'a pas encore été totalement élucidé lors du développement de l'embryon zygotique et de la croissance de la plante, des zones d'ombre persistent sur le rôle de chaque gène et leurs interactions. La répression ou la sous-régulation de nombreux gènes peut causer un phénotype albinos lors de l'embryogénèse et de la morphogénèse. Les causes de l'albinisme en androgénèse chez les céréales semblent donc bien plus complexes que les différentes hypothèses formulées jusqu'à présent sur l'influence du génome nucléaire et la présence de mutations et de délétions dans l'ADNpt. Les mécanismes de régulation et de communication bilatérale noyau-plaste ont une importance fondamentale dans cette biogénèse. De plus, une sous-régulation d'un gène ou groupe de gènes dès les phases les plus précoces de la biogénèse des chloroplastes peut entraîner une faible accumulation des divers éléments pré-requis à leur formation et assemblage, et donc aboutir à un échec de leur différenciation.

5. Objectifs de la thèse

L'objectif de ma thèse est d'améliorer la compréhension du phénomène d'albinisme chez les plantules de blé issues d'androgénèse, dans le but de disposer d'une technique de production d'HD de blé applicable en routine. L'utilisation de plusieurs génotypes de blé, présentant une récalcitrance à des étapes différentes du processus d'androgénèse et des fréquences de régénération de plantules chlorophylliennes contrastées, était primordial pour tenter d'identifier et de comprendre le blocage se produisant chez le blé, aboutissant à la formation de plantules albinos. Le blé de printemps Pavon est un génotype de référence, largement utilisé dans de nombreuses études en culture d'anthères ou de microspores (Labhani et al., 2005; Poersch-Bortolon et al., 2016). Il possède généralement de bons rendements de production en embryons haploïdes dont la majorité sont convertis en plantules avec succès. L'efficacité de la technique pour ce génotype est toutefois nuancée par la production d'une proportion non négligeable de plantules albinos. Les deux variétés de blés d'hiver utilisées dans mes travaux, Paledor et Premio, ont été choisies pour leurs types de

récalcitrance à l'androgénèse différents. Les deux génotypes régénèrent uniquement des plantules albinos. Cependant, alors que Paledor présente de bons rendements embryonnaires en culture de microspores, Premio est affecté par un blocage supplémentaire qui se manifeste par une très faible production d'embryons.

Mes recherches bibliographiques et les connaissances générales de la communauté scientifique sur l'androgénèse et le phénomène d'albinisme chez les céréales, présentés au **Chapitre 1**, m'ont menée à travailler sur les phases précoces de ce processus chez le blé. Mon hypothèse principale était qu'un blocage très précoce dans la différenciation des proplastides en chloroplastes se produisait au cours de la culture des microspores de blé. Je me suis donc concentrée sur les premières étapes du processus d'androgénèse, de l'isolement des microspores à la production de structures androgéniques, à trois échelles différentes : au niveau cellulaire, morphologique et moléculaire.

Dans le **chapitre 2**, je présente la mise au point, dans le système biologique que j'ai étudié, d'un nouvel outil d'analyse de populations cellulaires qui repose sur la mesure de l'impédance cellulaire par cytométrie en flux (IFC – Impedance Flow Cytometry). Cette technologie a été utilisée pour la première fois pour caractériser finement les cultures de microspores *in vitro* et leur développement, de l'isolement des microspores aux sept premiers jours de culture, dans le but d'obtenir de nouveaux indicateurs cellulaires en androgénèse.

Dans le **chapitre 3**, les phases plus tardives du processus d'androgénèse ont été étudiées. Je me suis focalisée sur la caractérisation morphologique et développementale des structures androgéniques produites à partir des cultures de microspores des trois génotypes de blé. Leurs capacités de régénération en plantules, chlorophylliennes ou non, ont également été analysées et comparées. L'objectif de ces travaux était d'associer des différences de développement des structures androgéniques âgées de 1 mois environ aux différences en production de plantules albinos ou chlorophylliennes, pour les trois génotypes de blé étudiés.

Dans le **chapitre 4**, une approche novatrice d'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au sein de cultures de microspores isolées est présentée pour la première fois chez le blé. Les étapes précoces du processus d'androgénèse ont été ciblées, de l'isolement des microspores à la production de pro-embryons. L'objectif de cette approche est d'identifier l'étape du processus d'androgénèse à laquelle se met en place le blocage dans la différenciation des chloroplastes, et les mécanismes affectés. Cette étude

a été menée en faisant la comparaison de l'expression de ces gènes chez deux génotypes présentant des fréquences de régénération de plantules chlorophylliennes contrastées.

Enfin, dans le **chapitre 5**, les principaux résultats de la thèse sont replacés dans le contexte de la compréhension du phénomène d'albinisme en androgénèse chez le blé. Nous y abordons également de futurs sujets et projets de recherche. Des applications sont envisagées pour diminuer l'impact de l'albinisme en androgénèse chez les céréales, et étudier la biogénèse des chloroplastes chez les espèces végétales en général.

Références

- Adam, Z., Charuvi, D., Tsabari, O., Knopf, R.R., and Reich, Z. (2010). Biogenesis of thylakoid networks in angiosperms: knowns and unknowns. *Plant Mol. Biol.* 76, 221–234.
- Ahmadi, B., Masoomi-Aladizgeh, F., Shariatpanahi, M.E., Azadi, P., and Keshavarz-Alizadeh, M. (2016). Molecular characterization and expression analysis of SERK1 and SERK2 in *Brassica napus* L.: implication for microspore embryogenesis and plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 35, 185–193.
- Ang, L.-H., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., and Deng, X.-W. (1998). Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development. *Mol. Cell* 1, 213–222.
- Ankele, E., Heberle-Bors, E., Pfosser, M.F., and Hofinger, B.J. (2005). Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiol. Plant.* 27, 651–665.
- Asakaviciute, R., Jacquard, C., and Clément, C. (2006). Study of chlorophyll a and b in etiolated and androgenic plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Stress Physiol. Biochem.* 2, 10–15.
- Barany, I., Testillano, P.S., Mityko, J., and Risueno, M.D. (2001). The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int. J. Dev. Biol.* 45, S39–S40.
- Bárány, I., Berenguer, E., Solís, M.-T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M.E., Crespo, J.L., Risueño, M.C., Díaz, I., and Testillano, P.S. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *J. Exp. Bot.* 69, 1387–1402.
- Bassham, D.C. (2007). Plant autophagy—more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 587–593.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., and Kessler, F. (2000). The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403, 203–207.

- Bélanger, S., Marchand, S., Jacques, P.-É., Meyers, B., and Belzile, F. (2018). Differential Expression Profiling of Microspores During the Early Stages of Isolated Microspore Culture Using the Responsive Barley Cultivar Gobernadora. *G3* 8, 1603–1614.
- Berenguer, E., Bárány, I., Solís, M.-T., Pérez-Pérez, Y., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2017). Inhibition of Histone H3K9 Methylation by BIX-01294 Promotes Stress-Induced Microspore Totipotency and Enhances Embryogenesis Initiation. *Front. Plant Sci.* 8.
- Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, A. Touraev, B.P. Forster, and S.M. Jain, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 35–46.
- Borderies, G. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 205–212.
- Börner, T., Aleynikova, A.Y., Zubo, Y.O., and Kusnetsov, V.V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 761–769.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A.A.M., Miki, B.L.A., et al. (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *Plant Cell* 14, 1737–1749.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., and Clément, C. (1999a). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208, 248–256.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., and Clément, C. (1999b). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208, 248–256.
- Caredda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R.S., and Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex. Plant Reprod.* 13, 95–104.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., Proult, I., and Clément, C. (2004). Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76, 35–43.

Chen, X.-W., Cistué, L., Muñoz-Amatriaín, M., Sanz, M., Romagosa, I., Castillo, A.-M., and Vallés, M.-P. (2007). Genetic markers for doubled haploid response in barley. *Euphytica* **158**, 287–294.

Clément, C., and Pacini, E. (2001). Anther plastids in angiosperms. *Bot. Rev.* **67**.

Cordewener, J.H.G., Hause, G., Görgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H.J.M., Van Lammeren, A.A.M., Van Lookeren Campagne, M.M., and Pechan, P. (1995). Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta* **196**, 747–755.

Corral-Martínez, P., and Seguí-Simarro, J.M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica* **195**, 369–382.

Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., and Seguí-Simarro, J.M. (2013). Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning. *J. Exp. Bot.* **64**, 3061–3075.

Corral-Martínez, P., Driouich, A., and Seguí-Simarro, J.M. (2019). Dynamic Changes in Arabinogalactan-Protein, Pectin, Xyloglucan and Xylan Composition of the Cell Wall During Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* **10**, 332.

Cuitun-Coronado, D., and Dodd, A.N. (2021). Plant Sigma Factors. In *ELS*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–9.

Day, A., and Ellis, T.H.N. (1984). Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* **39**, 359–368.

Day, A., and Ellis, T.H.N. (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* **9**, 671–678.

- De-la-Peña, C., Nic-Can, G.I., Galaz-Ávalos, R.M., Avilez-Montalvo, R., and Loyola-Vargas, V.M. (2015). The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6.
- Dubas, E., Moravčíková, J., Libantová, J., Matušíková, I., Benková, E., Žur, I., and Krzewska, M. (2014). The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic *B. napus* microspores and microspore-derived embryos. *Protoplasma* 251, 1077–1087.
- Dunford, R., and Walden, R.M. (1991). Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Curr. Genet.* 20, 339–347.
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., and Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the Move. *Front. Plant Sci.* 8.
- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D., and Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 33, 812–829.
- Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin: Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3, 224–229.
- El-Tantawy, A.-A., Solís, M.-T., Da Costa, M.L., Coimbra, S., Risueño, M.-C., and Testillano, P.S. (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reprod.* 26, 231–243.
- El-Tantawy, A.-A., Solís, M.-T., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2014). Changes in DNA Methylation Levels and Nuclear Distribution Patterns after Microspore Reprogramming to Embryogenesis in Barley. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 200–208.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1849, 385–402.
- Fitter, D.W., Martin, D.J., Copley, M.J., Scotland, R.W., and Langdale, J.A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J.* 31, 713–727.
- Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., Jelonek, J., Zbieszczek, J., and Szarejko, I. (2020). Plastid differentiation during microgametogenesis determines green plant regeneration in barley microspore culture. *Plant Sci.* 291, 110321.

- Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., Jelonek, J., Zbieszczak, J., and Szarejko, I. (2021). Changes in plastid biogenesis leading to the formation of albino regenerants in barley microspore culture. *BMC Plant Biol.* **21**, 22.
- Gao, H., Kadirjan-Kalbach, D., Froehlich, J.E., and Osteryoung, K.W. (2003). ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4328–4333.
- Garretón, V., Carpinelli, J., Jordana, X., and Holuigue, L. (2002). The as-1 Promoter Element Is an Oxidative Stress-Responsive Element and Salicylic Acid Activates It via Oxidative Species. *Plant Physiol.* **130**, 1516–1526.
- Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., and Morgenstern, Y. (2011). The Stem Cell State in Plant Development and in Response to Stress. *Front. Plant Sci.* **2**.
- Gray, J.C., Sullivan, J.A., Wang, J.-H., Jerome, C.A., and MacLean, D. (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **358**, 135–145.
- Hajdukiewicz, P.T., Allison, L.A., and Maliga, P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* **16**, 4041–4048.
- Hanaoka, M., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Takahashi, H., and Tanaka, K. (2005). Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep.* **6**, 545–550.
- Harada, T., Sato, T., Asaka, D., and Matsukawa, I. (1991). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet.* **81**, 157–161.
- Harada, T., Ishikawa, R., Niizeki, M., and Saito, K. (1992). Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastids for growth. *Mol. Gen. Genet. MGG* **233**, 145–150.
- Hays, D., Mandel, R., and Pharis, R. (2001). Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Growth Regul.* **35**, 47–58.

van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., and de Vries, S.C. (2001). N-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol.* **125**, 1880–1890.

Hills, A.C., Khan, S., and López-Juez, E. (2015). Chloroplast Biogenesis-Associated Nuclear Genes: Control by Plastid Signals Evolved Prior to Their Regulation as Part of Photomorphogenesis. *Front. Plant Sci.* **6**.

Holme, A. Olesen, N.J.P Hansen, and S.B. Andersen (1999). Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed.* **118**, 111–117.

van der Hoorn, R.A., and Jones, J.D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 400–407.

Hosp, J., Ribarits, A., Retzer, K., Jin, Y., Tashpulatov, A., Resch, T., Friedmann, C., Ankele, E., Voronin, V., Palme, K., et al. (2014). A tobacco homolog of DCN1 is involved in pollen development and embryogenesis. *Plant Cell Rep.* **33**, 1187–1202.

Inaba, T., Li, M., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F., and Schnell, D.J. (2003). atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 38617–38627.

Jacquard, C., Nolin, F., Hécart, C., Grauda, D., Rashal, I., Dhondt-Cordelier, S., Sangwan, R.S., Devaux, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., and Clément, C. (2009). Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep.* **28**, 1329–1339.

Jarvis, P., and López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 787–802.

Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C., and Chory, J. (2000). Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8175–8179.

Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Hucl, P., Randhawa, H., Marillia, E.-F., Foroud, N.A., Eudes, F., and Kathiria, P. (2017). Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep.* **36**, 1701–1706.

Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R., and Inaba, T. (2009). Coordination of Plastid Protein Import and Nuclear Gene Expression by Plastid-to-Nucleus Retrograde Signaling. *Plant Physiol.* **151**, 1339–1353.

Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K., and Takahashi, H. (2001). An Arabidopsis Sigma Factor (SIG2)-Dependent Expression of Plastid-Encoded tRNAs in Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034–1043.

Karimi-Ashtiyani, R., Ishii, T., Niessen, M., Stein, N., Heckmann, S., Gurushidze, M., Banaei-Moghaddam, A.M., Fuchs, J., Schubert, V., Koch, K., et al. (2015). Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 11211–11216.

Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., and Nagata, T. (2000). Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep.* **19**, 551–557.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705.

Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J., and Westhoff, P. (2001). VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4238–4242.

Krzewska, M., Czyżyło-Mysza, I., Dubas, E., Gołębiowska-Pikania, G., and Żur, I. (2015). Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green versus albino ratio determinants in triticale (×Triticosecale Wittm.) anther culture. *Euphytica* **206**, 263–278.

Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., Leister, D., and Jarvis, P. (2003). The Arabidopsis ppi1 mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell* **15**, 1859–1871.

Kumari, M., Clarke, H.J., Small, I., and Siddique, K.H.M. (2009). Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 393–409.

Kuroiwa, H., Mori, T., Takahara, M., Miyagishima, S., and Kuroiwa, T. (2002). Chloroplast division machinery as revealed by immunofluorescence and electron microscopy. *Planta* 215, 185–190.

Kusumi, K., Chono, Y., Shimada, H., Gotoh, E., Tsuyama, M., and Iba, K. (2010). Chloroplast biogenesis during the early stage of leaf development in rice. *Plant Biotechnol.* 27, 85–90.

Labban, Z., Richard, N., De Buyser, J., and Picard, E. (2005). Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées : importance des prétraitements. *C. R. Biol.* 328, 713–723.

Leljak-Levanić, D., Bauer, N., Mihaljević, S., and Jelaska, S. (2004). Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep.* 23, 120–127.

Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B., and Potin, P. (2001). Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Plant Sci.* 160, 1211–1220.

Leroux, B., Carmoy, N., Giraudet, D., Potin, P., Larher, F., and Bodin, M. (2009). Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. Rep.* 3, 347–353.

Letarte, J., Simion, E., Miner, M., and Kasha, K.J. (2006). Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep.* 24, 691–698.

Lewis, D.R., Olex, A.L., Lundy, S.R., Turkett, W.H., Fetrow, J.S., and Muday, G.K. (2013). A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 3329–3346.

Leyser, O. (2018). Auxin Signaling. *Plant Physiol.* 176, 465–479.

- Li, H., Soriano, M., Cordewener, J., Muiño, J.M., Riksen, T., Fukuoka, H., Angenent, G.C., and Boutilier, K. (2014a). The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Totipotency in the Male Gametophyte. *Plant Cell* 26, 195–209.
- Li, Q., Zhang, S., and Wang, J. (2014b). Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana*. *BMC Genomics* 15, 553.
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., and Pfannschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Front. Plant Sci.* 8.
- Liebers, M., Chevalier, F., Blanvillain, R., and Pfannschmidt, T. (2018). PAP genes are tissue- and cell-specific markers of chloroplast development. *Planta* 248, 629–646.
- Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X. (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 395–420.
- López-Juez, E. (2007). Plastid biogenesis, between light and shadows. *J. Exp. Bot.* 58, 11–26.
- Lopez-Juez, E., and Pyke, K.A. (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 557–577.
- Loschelder, H., Schweer, J., Link, B., and Link, G. (2006). Dual Temporal Role of Plastid Sigma Factor 6 in Arabidopsis Development. *Plant Physiol.* 142, 642–650.
- Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L., and Wu, K. (2012). Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 129–136.
- Makowska, K., and Oleszczuk, S. (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep.* 33, 385–392.
- Makowska, K., Oleszczuk, S., Zimny, A., Czaplicki, A., and Zimny, J. (2015). Androgenic capability among genotypes of winter and spring barley. *Plant Breed.* 134, 668–674.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R., and Krochko, J.E. (2007). Transcript Profiling and Identification of Molecular Markers for Early Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 144, 134–154.

Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., and Szarejko, I. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants (Dordrecht: Springer Netherlands).

Maraschin, S. de F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner, A., Spaink, H.P., and Wang, M. (2006). cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiol. Plant.* 127, 535–550.

Maraschin, S.F., de Priester, W., Spaink, H.P., and Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56, 1711–1726.

McAvoy, C.Z., Siegel, A., Piskiewicz, S., Miaou, E., Yu, M., Nguyen, T., Moradian, A., Sweredoski, M.J., Hess, S., and Shan, S. (2018). Two distinct sites of client protein interaction with the chaperone cpSRP43. *J. Biol. Chem.* 293, 8861–8873.

Miguel, C., and Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J. Exp. Bot.* 62, 3713–3725.

Miyagishima, S., Froehlich, J.E., and Osteryoung, K.W. (2006). PDV1 and PDV2 Mediate Recruitment of the Dynamin-Related Protein ARC5 to the Plastid Division Site. *Plant Cell* 18, 2517–2530.

Mogensen, H.L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am. J. Bot.* 83, 383–404.

Möller, B., and Weijers, D. (2009). Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.

Møller, S.G., Maple, J., and Gargano, D. (2014). Biogenesis of Chloroplasts. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation*, M.F. Hohmann-Marriott, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 435–449.

Mouritzen, P., and Holm, P.B. (1994). Chloroplast Genome Breakdown in Microspore Cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Occurs Primarily during Regeneration. *J. Plant Physiol.* 144, 586–593.

- Mozgova, G., Zaitseva, O., and Lemesh, V. (2012). Structural changes in chloroplast genome accompanying albinism in anther culture of wheat and triticale. *Cereal Res. Commun.* **40**, 467–475.
- Mozgová, I., Muñoz-Viana, R., and Hennig, L. (2017). PRC2 Represses Hormone-Induced Somatic Embryogenesis in Vegetative Tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* **13**, e1006562.
- Muñoz-Amatriaín, M., Castillo, A.M., Chen, X.W., Cistué, L., and Vallés, M.P. (2008). Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Mol. Breed.* **22**, 119–129.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Close, T.J., and Vallés, M.P. (2009). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct. Integr. Genomics* **9**, 311–323.
- Nagata, T., Ishida, S., Hasezawa, S., and Takahashi, Y. (1994). Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 321–327.
- Niazian, M., and Shariatpanahi, M.E. (2020). In vitro-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica* **216**, 69.
- Nic-Can, G.I., and Loyola-Vargas, V.M. (2016). The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, V.M. Loyola-Vargas, and N. Ochoa-Alejo, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 171–182.
- Nic-Can, G.I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V.M., Rojas-Herrera, R., and De-la-Peña, C. (2013). New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* **8**, e72160.
- Okazaki, K., Kabeya, Y., Suzuki, K., Mori, T., Ichikawa, T., Matsui, M., Nakanishi, H., and Miyagishima, S. (2009). The PLASTID DIVISION1 and 2 Components of the Chloroplast Division Machinery Determine the Rate of Chloroplast Division in Land Plant Cell Differentiation. *Plant Cell* **21**, 1769–1780.

Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Mancarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., et al. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**, 598–602.

Ortelt, J., and Link, G. (2014). Plastid Gene Transcription: Promoters and RNA Polymerases. In *Chloroplast Biotechnology: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, P. Maliga, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 47–72.

Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**, 462–466.

Pan, Y.L., Pan, Y., Qu, C.M., Su, C.G., Li, J.H., and Zhang, X.G. (2017). Identification and cloning of GOLDEN2-LIKE1 (GLK1), a transcription factor associated with chloroplast development in *Brassica napus* L. *Genet. Mol. Res. GMR* **16**.

Pandey, P., Daghma, D.S., Houben, A., Kumlehn, J., Melzer, M., and Rutten, T. (2017). Dynamics of post-translationally modified histones during barley pollen embryogenesis in the presence or absence of the epi-drug trichostatin A. *Plant Reprod.* **30**, 95–105.

Parra-Vega, V., Corral-Martínez, P., Rivas-Sendra, A., and Segura-Simarro, J.M. (2015). Formation and excretion of autophagic plastids (plastolysomes) in *Brassica napus* embryogenic microspores. *Front. Plant Sci.* **6**.

Pechan, P.M., Bartels, D., Brown, D.C.W., and Schell, J. (1991). Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta* **184**, 161–165.

Pérez Pérez, Y., El-Tantawy, A.A., González, M.S., Risueno, M.-C., and Testillano, P.S. (2019). Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. *Front. Plant Sci.* **10**.

Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2010). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*1[W]. *Plant Physiol.* **152**, 1874–1888.

Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D., and Crespo, J.L. (2012). Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae. *Plant Physiol.* **160**, 156–164.

Pérez-Pérez, Y., Bárány, I., Berenguer, E., Carneros, E., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signal. Behav.* *14*, 1559577.

Pfannschmidt, T. (2010). Plastidial retrograde signalling – a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci.* *15*, 427–435.

Pfannschmidt, T., Blanvillain, R., Merendino, L., Courtois, F., Chevalier, F., Liebers, M., Grübler, B., Hommel, E., and Lerbs-Mache, S. (2015). Plastid RNA polymerases: orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle. *J. Exp. Bot.* *66*, 6957–6973.

Pham, V.N., Kathare, P.K., and Huq, E. (2018). Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant Physiol.* *176*, 1025–1038.

Poersch-Bortolon, L.B., Scagliusi, S.M.M., Yamazaki-Lau, E., Bodanese-Zanettini, M.H., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and Embrapa Trigo, Brazil (2016). Androgenic response of Brazilian wheat genotypes to different pretreatments of spikes and to a gelling agent. *Pesqui. Agropecuária Bras.* *51*, 1839–1847.

Pogson, B.J., and Albrecht-Borth, V. (2014). An Overview of Chloroplast Biogenesis and Development. In *Plastid Biology*, pp. 115–128.

Pogson, B.J., Ganguly, D., and Albrecht-Borth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1847*, 1017–1024.

Poon, S., Heath, R.L., and Clarke, A.E. (2012). A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiol.* *160*, 684–695.

Pyke, K.A., Rutherford, S.M., Robertson, E.J., and Leech, R.M. (1994). *arc6*, A Fertile Arabidopsis Mutant with Only Two Mesophyll Cell Chloroplasts. *Plant Physiol.* *106*, 1169–1177.

Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 85–93.

Ravi, M., and Chan, S.W.L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464, 615–618.

Reinbothe, C., Bartsch, S., Eggink, L.L., Hooper, J.K., Brusslan, J., Andrade-Paz, R., Monnet, J., and Reinbothe, S. (2006). A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll a/b proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4777–4782.

Reyes, J.C. (2006). Chromatin modifiers that control plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 21–27.

Reynolds, T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33, 1–10.

Rodríguez-Sanz, H., Solís, M.-T., López, M.-F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2015). Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol.* 56, 1401–1417.

Rodriguez-Serrano, M., Barany, I., Prem, D., Coronado, M.-J., Risueno, M.C., and Testillano, P.S. (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Bot.* 63, 2007–2024.

Rossini, L., Cribb, L., Martin, D.J., and Langdale, J.A. (2001). The Maize Golden2 Gene Defines a Novel Class of Transcriptional Regulators in Plants. *Plant Cell* 13, 1231–1244.

Rudowska, Ł., Gieczewska, K., Mazur, R., Garstka, M., and Mostowska, A. (2012). Chloroplast biogenesis — Correlation between structure and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1817, 1380–1387.

Sanchez, D.L., Liu, S., Ibrahim, R., Blanco, M., and Lübberstedt, T. (2018). Genome-wide association studies of doubled haploid exotic introgression lines for root system architecture traits in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci.* 268, 30–38.

Schünemann, D. (2004). Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. *Curr. Genet.* 44, 295–304.

Seguí-Simarro, J.M. (2010). Androgenesis Revisited. *Bot. Rev.* 76, 377–404.

Seguí-Simarro, J.M. (2015). Editorial: Doubled Haploidy in Model and Recalcitrant Species. *Front. Plant Sci.* 6.

Seguí-Simarro, J.M., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J. Struct. Biol.* **142**, 379–391.

Seifert, G.J., and Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 137–161.

Shariatpanahi, M.E., and Ahmadi, B. (2016). Isolated Microspore Culture and Its Applications in Plant Breeding and Genetics. In *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*, M. Anis, and N. Ahmad, eds. (Singapore: Springer), pp. 487–507.

Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E., and Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* **127**, 519–534.

Shi, K., Gu, J., Guo, H., Zhao, L., Xie, Y., Xiong, H., Li, J., Zhao, S., Song, X., and Liu, L. (2017). Transcriptome and proteomic analyses reveal multiple differences associated with chloroplast development in the spaceflight-induced wheat albino mutant mta. *PLOS ONE* **12**, e0177992.

Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I.S., Bae, G., Lee, C.-H., Lee, D., and Choi, G. (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7660–7665.

Shin, Y.-H., Yang, R., Shi, Y.-L., Li, X.-M., Fu, Q.-Y., Lu, J.-L., Ye, J.-H., Wang, K.-R., Ma, S.-C., Zheng, X.-Q., et al. (2018). Light-sensitive Albino Tea Plants and Their Characterization. *HortScience* **53**, 144–147.

Solís, M.-T., Rodríguez-Serrano, M., Meijon, M., Canal, M.-J., Cifuentes, A., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2012). DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *J. Exp. Bot.* **63**, 6431–6444.

Solís, M.-T., El-Tantawy, A.-A., Cano, V., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2015). 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Front. Plant Sci.* **6**.

- Soll, J., and Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 198–208.
- Solymosi, K., and Schoefs, B. (2010). Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: The Dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth. Res.* 105, 143–166.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., et al. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211.
- Soriano, M., Li, H., Jacquard, C., Angenent, G.C., Krochko, J., Offringa, R., and Boutilier, K. (2014). Plasticity in Cell Division Patterns and Auxin Transport Dependency during in Vitro Embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Cell* 26, 2568–2581.
- Steiner, S., Schroter, Y., Pfalz, J., and Pfannschmidt, T. (2011). Identification of Essential Subunits in the Plastid-Encoded RNA Polymerase Complex Reveals Building Blocks for Proper Plastid Development. *PLANT Physiol.* 157, 1043–1055.
- Stephenson, P.G., Fankhauser, C., and Terry, M.J. (2009). PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7654–7659.
- Sugiura, M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19, 149–168.
- Sunderland, N., and Huang, B. (1985). Barley anther culture-The switch of programme and albinism. *Hereditas* 103, 27–40.
- Supena, E.D.J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., van Lammeren, A., Offringa, R., Boutilier, K., and Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *J. Exp. Bot.* 59, 803–814.
- Testillano, P.S. (2018). Stress-Induced Microspore Embryogenesis in Crop Plants: Cell Totipotency Acquisition and Embryo Development. In *Progress in Botany*, (Cham: Springer), pp. 1–15.
- Testillano, P.S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J. Exp. Bot.* 70, 2965–29789.

- Tetlow, I.J., Rawsthorne, S., Raines, C., and Emes, M.J. (2018). Plastid Metabolic Pathways. In Annual Plant Reviews Online, S.G. Moller, ed. (Oxford: Blackwell), pp. 60–109.
- Thibaud-Nissen, F., Shealy, R.T., Khanna, A., and Vodkin, L.O. (2003). Clustering of Microarray Data Reveals Transcript Patterns Associated with Somatic Embryogenesis in Soybean. *Plant Physiol.* *132*, 118–136.
- Torp, A.M., Hansen, A.L., and Andersen, S.B. (2001). Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Euphytica* *119*, 377–387.
- Touraev, A., Pfosser, M., and Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. In *Advances in Botanical Research*, (Academic Press), pp. 53–109.
- Vrinten, P.L., Nakamura, T., and Kasha, K.J. (1999). Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. *Plant Mol. Biol.* *41*, 455–463.
- Wang, H.M., Enns, J.L., Nelson, K.L., Brost, J.M., Orr, T.D., and Ferrie, A.M.R. (2019). Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* *139*, 589–599.
- Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, G.E., Oppedijk, B.J., van der Heijden, M.W., de Priester, W., and Schilperoort, R.A. (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol. Biol.* *39*, 489–501.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* *9*, 244–252.
- Waters, E.R. (2013). The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.* *64*, 391–403.
- Waters, M.T., and Langdale, J.A. (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J.* *28*, 2861–2873.
- Waters, M.T., Moylan, E.C., and Langdale, J.A. (2008). GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant J.* *56*, 432–444.
- Wei, N., Serino, G., and Deng, X.-W. (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 592–600.

- Woodson, J.D., Perez-Ruiz, J.M., Schmitz, R.J., Ecker, J.R., and Chory, J. (2013). Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J.* 73, 1–13.
- Yamagishi, M. (2002). Heterogeneous plastid genomes in anther culture-derived albino rice plants. *Euphytica* 123, 67–74.
- Yan, C., Peng, L., Zhang, L., and Qiu, Z. (2020). Fine mapping of a candidate gene for cool-temperature-induced albinism in ornamental kale. *BMC Plant Biol.* 20, 460.
- Yang, Y., Glynn, J.M., Olson, B.J., Schmitz, A.J., and Osteryoung, K.W. (2008). Plastid division: across time and space. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 577–584.
- Yasumura, Y., Moylan, E.C., and Langdale, J.A. (2005). A Conserved Transcription Factor Mediates Nuclear Control of Organelle Biogenesis in Anciently Diverged Land Plants. *Plant Cell* 17, 1894–1907.
- Yu, F., Park, S., and Rodermeil, S.R. (2004). The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864–876.
- Yuan, M., Zhao, Y.-Q., Zhang, Z.-W., Chen, Y.-E., Ding, C.-B., and Yuan, S. (2017). Light Regulates Transcription of Chlorophyll Biosynthetic Genes During Chloroplast Biogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 36, 35–54.
- Zarsky, V., Garrido, D., Eller, N., Tupy, J., Vicente, O., Schöffl, F., and Heberle-Bors, E. (1995). The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation*. *Plant Cell Environ.* 18, 139–147.
- Zhang, L., Zhang, Y., Gao, Y., Jiang, X., Zhang, M., Wu, H., Liu, Z., and Feng, H. (2016). Effects of histone deacetylase inhibitors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.). *Sci. Hortic.* 209, 61–66.
- Zhao, J., Newcomb, W., and Simmonds, D. (2003). Heat-Shock Proteins 70 kDa and 19 kDa are not Required for Induction of Embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. Topas Microspores. *Plant Cell Physiol.* 44, 1417–1421.
- Zhao, P., Wang, K., Zhang, W., Liu, H.Y., Du, L.P., Hu, H.R., and Ye, X.G. (2017). Comprehensive analysis of differently expressed genes and proteins in albino and green plantlets from a wheat anther culture. *Biol. Plant.* 61, 255–265.

Chapitre 2

**La mesure de l'impédance par cytométrie en flux (IFC)
permet la prédiction précoce des rendements
embryonnaires en cultures de microspores isolées
chez le blé.**

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de nos travaux menés sur la caractérisation de populations de microspores en développement durant les premières étapes du processus d'androgénèse. L'objectif est de développer un nouvel outil méthodologique permettant d'obtenir des données quantitatives sur les phases précoces du développement des microspores de blé. En effet, malgré les connaissances disponibles sur les événements cellulaires et moléculaires accompagnant le développement des microspores en embryons, il est difficile de prédire le comportement des populations de microspores au cours de la culture. La plupart des outils et marqueurs employés aujourd'hui utilisent généralement les techniques de coloration et la microscopie. La maîtrise de ces techniques reste toutefois dépendante des espèces, et les comptages cellulaires demeurent fastidieux, source à interprétation, et seul un faible nombre de microspores peut être analysé. Il me paraissait donc nécessaire de développer un nouveau marqueur précoce, permettant de caractériser finement le développement des microspores en androgénèse, qui serait fiable, rapide et automatisé. Nous proposons ici la mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse des populations de microspores en culture reposant sur l'impédance cellulaire en cytométrie en flux (IFC – Impedance Flow Cytometry). Cette technologie est utilisée en routine depuis quelques années en biologie végétale pour mesurer la viabilité et la qualité du pollen (Heidmann et al., 2016). L'IFC repose sur les propriétés diélectriques des cellules qui réagissent différemment en fonction de leur état et des fréquences de courant alternatif appliquées. Ces changements d'impédance permettent d'obtenir des informations sur la taille des cellules, la viabilité cellulaire en lien avec l'intégrité de la membrane, et le contenu cytoplasmique. Cet outil permet d'analyser rapidement des milliers de microspores en une seule mesure, et d'obtenir des résultats représentatifs de la population de microspores en culture. Les premiers stades de développement des microspores de blé au cours du processus d'androgénèse ont été étudiés, de l'isolement des cellules avant le prétraitement, jusqu'aux sept premiers jours de culture *in vitro*. Nos résultats ont permis la caractérisation fine des voies de développement possibles empruntées par les populations de microspores de blé en culture *in vitro* : le développement gamétophytique de certaines microspores aboutissant à la formation du pollen, le développement sporophytique des microspores réorientées, et la dégénérescence des cellules. Grâce à cette caractérisation cellulaire, j'ai pu valider trois nouveaux indicateurs précoces, fiables et robustes de la réactivité en androgénèse chez le blé. Tout d'abord, il est possible de mesurer en routine la viabilité de cultures cellulaires hétérogènes. Deuxièmement,

l'analyse de populations de microspores avant et après l'application d'un stress inducteur, quelle que soit sa nature, permet d'évaluer simplement et rapidement l'efficacité de ce stress sur la réorientation des microspores et l'induction de l'embryogénèse. Enfin, nous avons démontré qu'il est possible de prédire précocement les rendements embryonnaires, dès sept jours de culture *in vitro* chez le blé. Aucune étude à ce jour ne permettait de prédire, dès les étapes précoces de la culture de microspores, le rendement en embryons. Ces travaux ouvrent des possibilités de criblage à haut débit des cultures de microspores chez le blé, mais aussi après une phase de mise au point, chez les céréales, ou toute autre espèce végétale. L'utilisation de l'IFC en culture de microspores isolées peut efficacement venir en appui dans les essais d'optimisation des conditions et des milieux de culture *in vitro* pour les génotypes ou espèces présentant de faibles rendements de production en embryons haploïdes. De plus, suite à l'obtention de nos résultats, et au potentiel de cette technique nous envisageons une utilisation de l'IFC pour étudier d'autres problématiques. Un nouveau développement, comprenant des mises au point poussées, pourraient permettre de détecter des caractéristiques intracellulaires précoces propres à certaines populations de microspores, qui seraient affectées dans leur développement embryonnaire, et mèneraient à la formation de plantules albinos.

Ces travaux ont été publiés dans la revue Plant Science en 2020 et sont présentés ici en anglais :

Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures. Canonge J, Philippot M, Leblanc C, Potin P, Bodin M. Plant Sci. 300:110586. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110586

Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures.

Authors and addresses

Julie Canonge,^a Murielle Philippot,^{a*} Catherine Leblanc,^b Philippe Potin,^b Manuelle Bodin^a

^a Vegenov, Pen ar Prat, 29250 Saint-Pol-de-Léon, France

^b CNRS, Sorbonne Université Sciences, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29688 Roscoff, France

*** Corresponding author:**

E-mail address: philippot@vegenov.com

Number of tables :

Number of figures : 7

Abstract

Haplomethods are key biotechnological tools that make it possible to rapidly produce perfectly homozygous lines, speeding up plant breeding programs. Under specific stress conditions, microspores are reprogrammed toward sporophytic pathways, leading to embryo formation. Various endogenous and exogenous factors affect embryo yield in androgenesis, so the improvement of androgenesis efficiency requires the development of early, reliable and robust reactivity markers. During the last decade, numerous cytological, cellular and biochemical approaches were carried out to finely characterize microspore development and fate during androgenesis. However, the different available markers are often species-dependent, and their development and application are time-consuming and cumbersome. In this study, we show the suitable use of impedance flow cytometry (IFC) to develop new robust, reliable and strong markers of androgenesis reactivity in wheat, leading to: (i) routine monitoring of the viability of heterogeneous cell cultures; (ii) quick and simple evaluation of stress treatment efficiency; and (iii) early prediction of embryo yields from microspore suspensions. IFC can therefore provide the fine characterization of all of the microspore developmental pathways that occur in a cell suspension, for embryogenic microspores as well as pollen-like microspores. IFC technology has become a very useful tool to track and characterize wheat microspores in androgenesis, but can also be adapted to other species and other *in vitro* cell culture systems.

Keywords

Androgenesis, microscopy, microfluidics, viability, developmental stage, reactivity marker

Introduction

Plant breeding programs are currently integrating haplome methods in order to quickly obtain homozygous plants and to thus reduce the time required for commercial registration of new cultivars (Echávarri and Cistué, 2016). The production of doubled haploids (DH) has therefore become a key tool for the improvement of the breeding process. Since the first report of microspore-derived embryos from *Datura* anther culture in 1964 (Guha and Maheshwari, 1964), androgenesis has been applied to a wide range of plant species (Maluszynski et al., 2003). This technique is based on a microspore switch from the gametophytic pathway, resulting in mature pollen formation, towards the sporophytic pathway that leads to embryo production. This switch results from the application of a suitable stress on microspores at a precise developmental stage. Thus, all microspores, from the mid-uninucleate to the early binucleate stage, depending on the species, are potentially capable of forming embryos (Indrianto et al., 2001; Touraev et al., 1997), but only a minority of them actually acquire this embryogenic competence. In *Brassica*, a heat shock from 30 to 35°C is usually applied (Custers et al., 1994; Leroux et al., 2009), while a cold treatment or an osmotic shock is used for many cereals. In the wheat androgenesis process, the stressed microspores are then plated and require ovary co-culture to survive and develop in *in vitro* culture (Bruins et al., 1996; Hu and Kasha, 1997). Throughout the process, androgenesis efficiency is influenced by many factors such as the quality and physiology of donor plants (Touraev et al., 2001), genotype (Dwivedi et al., 2015), the developmental stage of microspores (Datta, 2005), stress-inducing pretreatment (Jähne and Lörz, 1995) and culture conditions (Kumari et al., 2009). The achievement of this technique lies in the success of embryogenesis induction as well as in the regeneration of doubled haploid plants. Consequently, DH protocol development and optimization can be difficult, time-consuming and expensive.

In addition to being an essential tool for breeders, androgenesis, in particular, is an interesting way to study embryogenesis without the interactions of seed tissues, allowing the exploration of the underlying plant development process (Olmedilla, 2010). Isolated microspore cultures allow an easy monitoring of microspores and their development, becoming a model to investigate embryogenesis, particularly in the early stages, in numerous

cellular and molecular studies (Pauls et al., 2006; Rivas-Sendra et al., 2019; Sánchez-Díaz et al., 2013; Testillano, 2019). During the androgenesis process, many cellular and structural changes are visible in wheat. First, an enlargement of certain cells is visible and cytoplasmic strands connecting both perinuclear and subcortical cytoplasms fragment the vacuole. The nucleus displays a central position. These so-called star-like microspores are a transient and characteristic stage that attest to the embryogenic potential of wheat microspores (Indrianto et al., 2001; Maraschin et al., 2005; Seguí-Simarro and Nuez, 2008; Touraev et al., 1996a) and can be found in other plant species such as rice (Raina and Irfan, 1998), rapeseed (Zaki and Dickinson, 1991) and tobacco (Touraev et al., 1996b, 1997). Despite this, it has been reported that star-like microspores do not always produce androgenic structures in barley microspore suspensions (Daghma et al., 2012; Maraschin et al., 2005; Soriano et al., 2013). Embryogenic microspores are also subjected to changes in the cytokinesis pattern, with their phragmoplast rearrangement allowing a first symmetrical division. This specific division is the first indicator of the onset of sporophytic development, in contrast with the first asymmetric division during pollen development (Bonet and Olmedilla, 2000; Indrianto et al., 2001; Leroux et al., 2009; Pauls et al., 2006; Seguí-Simarro and Nuez, 2008). However, various studies have reported that both symmetric and asymmetric first division could occur in embryogenic microspores, leading to embryo formation (Barnabás et al., 1999; Gonzalez and Jouve, 2005; Soriano et al., 2013; Tang et al., 2013), including in wheat anther cultures (Hassawi et al., 1990; Indrianto et al., 2001). In that case, wheat embryogenic microspore nuclei actively divide and form multinucleate structures, becoming an androgenic marker easily observable in microscopy. However, depending on the species and genotypes, multinucleate cells can be relatively poorly represented within cultures and therefore difficult to count. Androgenic microspores can also be characterized by the presence of a preprophasic band, absent in pollen, marking the position of the future cell wall (Gervais et al., 2000; Pauls et al., 2006). In *Brassica napus*, studies highlight that the intine thickness increase, the specific changes in the cell wall composition and the formation of the osmoprotective subintinal layer occur only in embryogenic microspores at different developmental stages (Bonet and Olmedilla, 2000; Corral-Martínez et al., 2019; Ribalta et al., 2012; Rivas-Sendra et al., 2019; Schulze and Pauls, 2002). These numerous morphological, structural and biochemical alterations can be used as markers to finely study the embryogenic development of microspores and to improve embryo

yields. To track and elucidate intracellular changes that occur during microspore embryogenesis, these approaches require various microscopic approaches and are sometimes coupled with sample fixation or monolayer microspore culture (Daghma et al., 2012, 2014; Indrianto et al., 2001). However, these methods remain cumbersome, time-consuming and complex to set up.

Impedance flow cytometry (IFC) is based on the analysis of the dielectric properties of cells by application of an alternating current. This technique uses microfluidic chips containing electrodes and a microchannel of various sizes, coupled to a Coulter system. The electrode geometry, the microchannel, the buffer conductivity and the application of alternating current at adjustable frequencies first determine the system impedance. When crossing the microchannel, cell suspension modifies the system impedance, reflecting the cells' intrinsic dielectric properties. Depending on the frequency used, ranging from 0.5 to 30 MHz, IFC provides different information levels, from cell size to intracellular properties, and cell viability (Cheung et al., 2010). Many studies have been carried out using IFC on microorganisms to determine cell viability and the size of yeast in bacteria suspensions (David et al., 2012; Gawad et al., 2001; Opitz et al., 2019), and to study tumor cell differentiation, apoptosis and necrosis (Collins et al., 2017; Crocetti et al., 2013; Gawad et al., 2001; Pierzchalski et al., 2012). IFC was recently introduced into plant biology research and is currently used for pollen viability analysis by breeders. This technology has also proven itself to be efficient to detect pollen developmental stages, from tetrad to mature trinucleate pollen in tobacco (Heidmann et al., 2016). Xu et al. (Xu et al., 2017) identified the QTL qPV11 implicated in the heat tolerance of tomato pollen using IFC to phenotype the pollen viability. Moreover, IFC also detected abnormal pollen development in the case of pollen sterility of potato (Heidmann and Di Berardino, 2017). Likewise, this technology assesses pollen quality by determining germination capacity and pollen viability for many species such as tomato, cucumber and sweet pepper. Heidmann et al. (Heidmann et al., 2016) recently demonstrated that the use of IFC as a predictive tool for tomato pollen germination is possible. This technology, non-invasive and label-free, thereby covers vast application fields in cell biology.

Using IFC analyses, we investigated the possibility to characterize the different developmental pathways occurring during wheat microspore *in vitro* culture. The goal was to develop a new marker to allow the early prediction of androgenic embryo yield in a quick, reliable and precise manner.

Material and Methods.

1. Plant material and growing conditions

Seeds of the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) genotype Pavon were germinated and cultivated in a growth chamber for two weeks (17°C night, 19°C day with a 16-h light period and 70% relative humidity).

Seedlings were then transferred to four-liter pots (TREF, EGO N°120), fertilized (Horti-Cote® Plus CRF 15-6-11) and grown in a growth chamber under controlled conditions until tillering (12°C night, 18°C day, with a 16-h light period and 60% relative humidity).

2. Tiller harvest, pretreatment and microspore culture

Tillers were harvested approximately eight weeks after the seedlings, when the majority of anthers contained mid- to late-uninucleate stage microspores. The microspore developmental stages were checked with DAPI staining (Vergne et al., 1987).

Tillers were placed in jars filled with sterile water and cold pre-treated at 4°C for 21 days in the dark, according to the method used by De Buyser et al. (De Buyser et al., 2002).

After pretreatment, spikes were sterilized and microspores were isolated and cultured according to Zheng et al. (*modified*) (Zheng et al.). Ovary co-culture was carried out with two ovaries/mL of microspore suspension (De Buyser et al., 2002). Cultures were incubated at 28°C in the dark for 30 days. The embryo yield was established at 30 days by counting the number of embryos per 10,000 microspores.

3. Sample preparation for IFC measurement

IFC analyses were done on samples collected 21 days before plating (D-21), just before plating (D0), and 1, 5 and 7 days after plating (D1, D5 and D7).

At D-21, microspore suspension was prepared from four freshly collected spikes to produce the baseline IFC data on microspores before androgenesis. Other samples were produced by collecting microspores from suspension cultures.

Samples were prepared immediately before IFC analysis: 1 mL of microspore suspension was filtered with a 70- μ m filter (pluriSelect), and 2 mL of IFC buffer were added to each sample (AF4, Amphasys). An aliquot of 200 μ L of each sample was used for microscopic observations.

To obtain non-viable controls that would allow a clear discrimination between viable and non-viable cells in IFC analysis, heat-treated samples were prepared and analyzed for each measurement. One mL of microspore suspension was heated at 90°C for 7 min with a thermoshaker (Grant-Bio). After cooling down to room temperature, the heat-treated samples were processed, as previously explained.

4. IFC analyses

Microspore suspensions were analyzed using the impedance flow cytometer device AmphaZ32 (Amphasys, Switzerland) at 0.5 and 12 MHz. Parameter settings were: trigger level: 0.1V; modulation: 5; amplifier: 5; demodulation: 0; and pump: 80 rpm. A 120- μ m channel chip was used. Data were analyzed with Amphasoft, version 2.1.5.0.

Integrated values of microspore impedance are represented in a graph with the phase angle in the x-axis and the amplitude in the y-axis. Various gatings such as vertical and polygons can be drawn to categorize each cell set, depending on these two parameters.

In the present study, we defined and analyzed different types of variables calculated by the software. Cell viability, expressed in percentage of viable cells, was calculated each day of analysis from seven independent microspore cultures. Polygons, referred to as P1, P2 and P3, were drawn manually using the gating tool. Each dot plot inside a polygon can be characterized by its phase angle median and amplitude median, automatically calculated by Amphasoft. These medians represent the central value of the dot plot in the polygon. In this study, the variables, referred to as “phase angle median” and “amplitude median”, correspond to means of medians from a minimum of five microspore suspensions with three technical replicates. The percentage of viable microspores out of the total number of cells was calculated for each polygon.

5. Staining and microscopy

Three different methods were used in visible light microscopy for microspore observations. Microspores were observed: (1) without staining; (2) with fluorescein diacetate (FDA) staining; or (3) with 4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) staining. An inverted microscope (Olympus CKX41) and a microscope equipped for fluorescence illumination (Olympus BH-2) were used. A solution of 100 μL of DAPI ($4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) or FDA ($41.10^{-3}\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970) were added to 200 μL of microspore samples prepared as explained above, and at least 200 microspores per sample were counted.

DAPI-stained microspores were classified as uninucleate, binucleate, trinucleate and multinucleate, and the percentage of each category was calculated. Cell viability was estimated using FDA staining, as a percentage of fluorescent microspores out of the total number of cells counted. The percentage of star-like microspores within the population was determined using light microscopy at D0 only.

6. Statistical analyses

Seven biological replicates of microspore suspension culture were performed in this study and technical triplicates were done for each IFC measurement.

For statistical analyses, we used R software, version 3.5.0, with the Rcmdr interface and the missMDA package in R (Josse and Husson, 2016) to replace missing entries with plausible values.

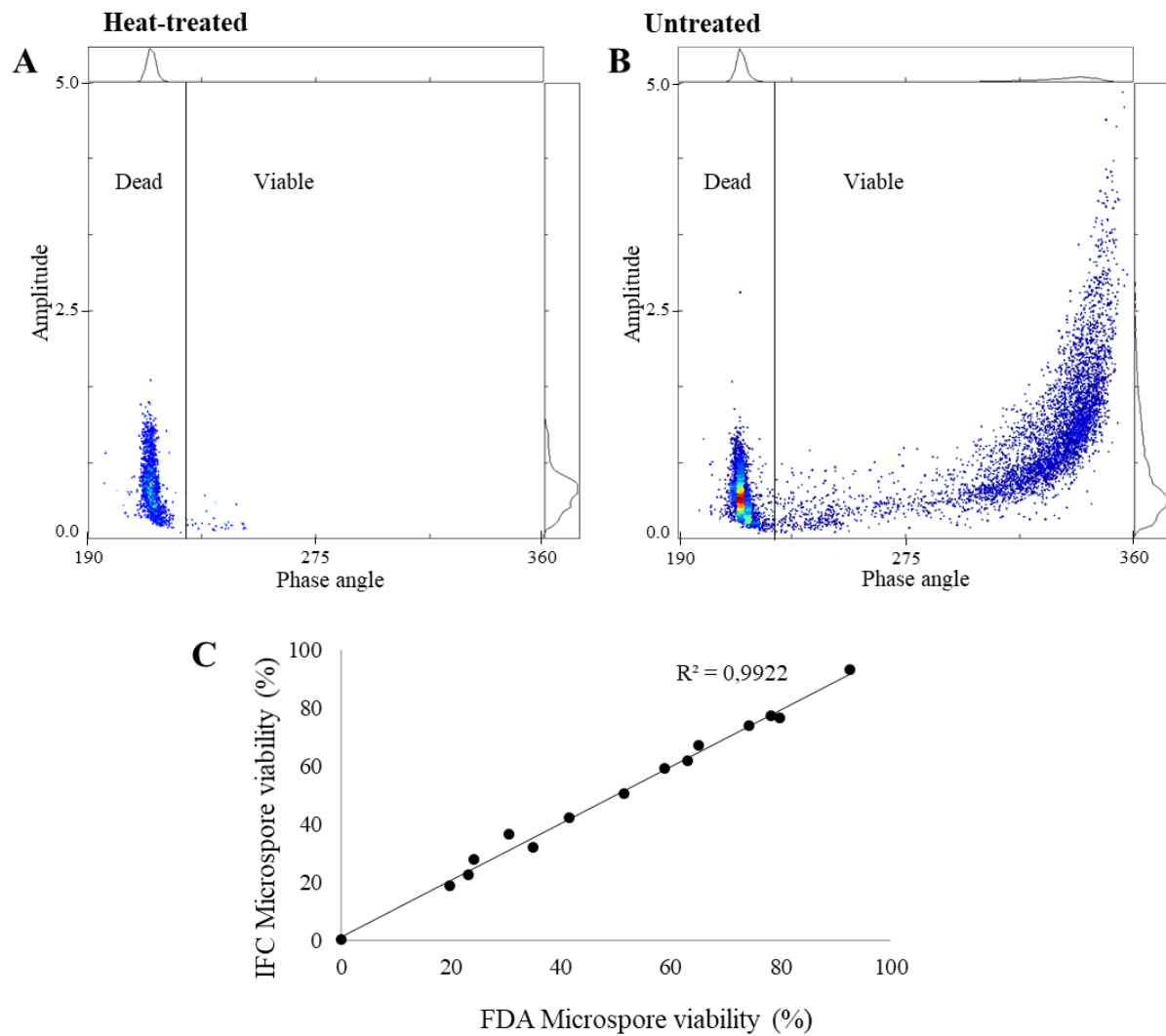


Figure 1: IFC discrimination of viable and dead cells in microspore suspensions. Amphasoft dot plots represent heat-treated (**A**) and untreated (**B**) microspore suspensions at D1 analyzed at 12 MHz. Vertical gating differentiates dead microspores (left) with a low phase angle, and viable microspores (right) with a high phase angle. (**C**) Correlation between IFC data at 12 MHz and viability measurement with FDA staining of 15 mixed samples of fresh and heat-treated microspores. (p -value<0.05; $r^2 = 0.9922$). Each point represents one sample analyzed by IFC and microscopy; no technical replicate was done.

Results

1. IFC measures cell viability in microspore suspensions.

Impedance flow cytometry (IFC) allows us to characterize cells according to their dielectric properties when they are subjected to alternating currents at different frequencies. In the first step, to discriminate viable and non-viable cells, microspores in culture medium were sampled, diluted in analysis buffer and analyzed by IFC at 12 MHz. These microspore populations were collected at different times, before and during cell culture, from D-21 to D7.

Aliquots of each sample were heat-treated to inactivate microspores and analyzed as negative controls. In the heat-treated samples, the non-viable microspore population was characterized by a homogenous IFC signal with a low phase angle and amplitude (Figure 1A). In the untreated samples, two discrete populations coexisted: one with a low phase angle and amplitude, and the other with a high phase angle and amplitude (Figure 1B). We therefore referred to the population with a low phase angle as the dead microspores and the population with a high phase angle as the viable ones.

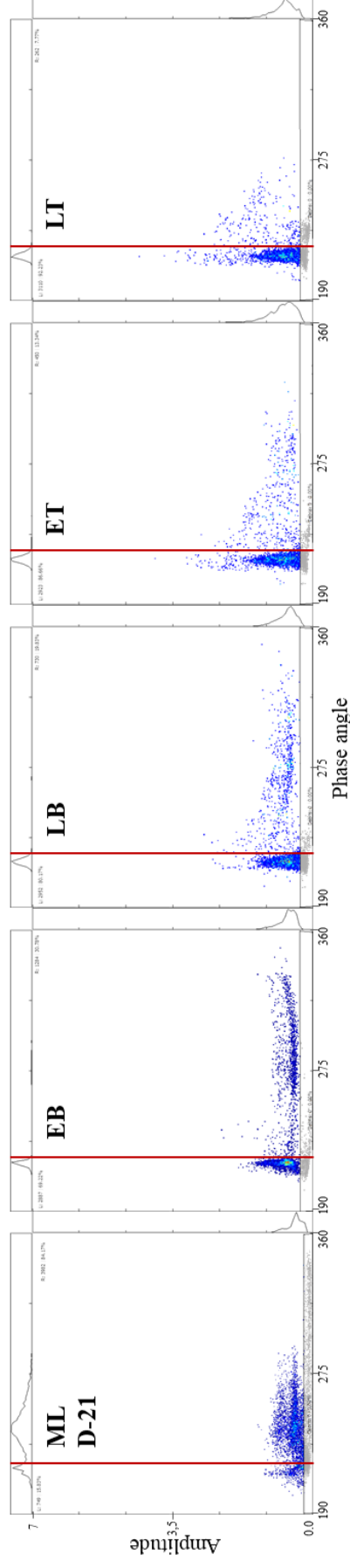
In the second part of the experiment, a series of cell population mixtures was prepared by mixing a fresh and heat-treated microspore suspension to obtain a range from 0% to 90% of viable microspores. The 15 resulting samples were analyzed with two types of cell viability measurements: IFC at 12 MHz and FDA staining. A strong correlation between these two sets of measurements was found with $r^2=0.99$ (Figure 1C).

These results demonstrate that IFC technology allows cell viability measurements of microspore suspensions in culture medium, from tiller harvesting until day 7 of *in vitro* culture.

2. IFC detects different microspore developmental stages during pollen formation.

IFC analyses were carried out on the gametophytic development of wheat pollen in order to identify their impedance characteristics. We collected microspores at different developmental stages, from mid-to-late uninucleate to mature trinucleate, from different sized tillers. Samples were prepared in the same conditions as previously described and the developmental stages were checked by microscopy before IFC measurement.

Gametophytic pathway



Sporophytic pathway

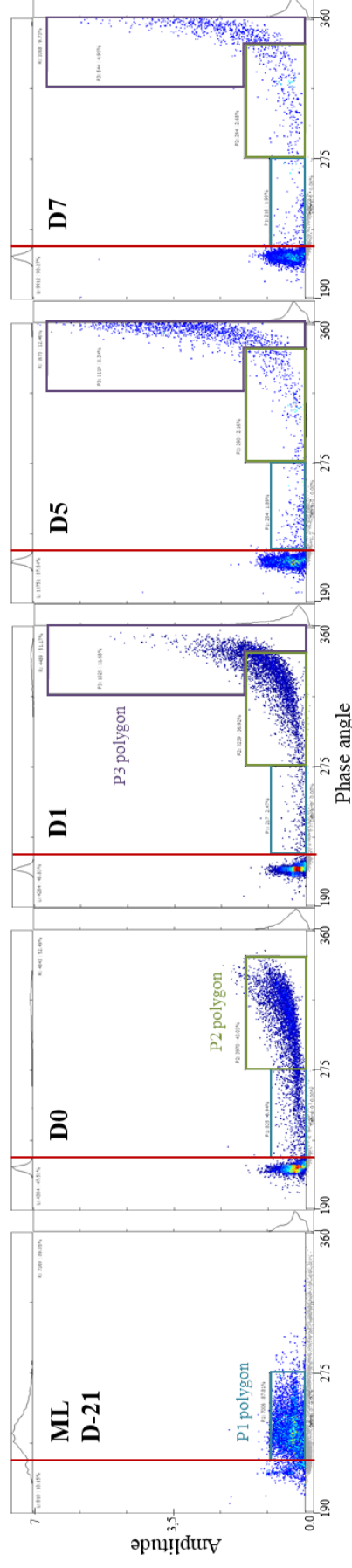


Figure 2: Major stages of gametophytic and sporophytic developmental pathways of Pavon microspores analyzed by IFC. Gametophytic pathway: ML: mid-to-late uninucleate; EB: early binucleate; LB: late uninucleate; ET: early trinucleate; LT: late trinucleate. Sporophytic pathway: microspore cultures at D-21, D0, D1, D5 and D7 are shown. Microspores at ML/D-21 represent the common stage between gametophytic and sporophytic development. For each graph, the vertical red line differentiates dead (left) and viable (right) microspores in the population. P1, P2 and P3 polygons are represented in blue, green and purple, respectively.

Early to late binucleate microspores (Figure 2 EB, LB) showed a significant increase in phase angle compared to uninucleate microspores (Figure 2 ML/D-21). Conversely, the final stages of gametophytic development displayed a decrease in phase angle (Figure 2 ET, LT). We also noticed an increase in the amplitude signal during pollen formation (Figure 2 ET, LT), which can be explained by the increase in microspore size, as observed in microscopy (Figure 3 A, B, C). The phase angle and amplitude variations appeared to reflect cellular and cytoplasmic changes occurring within microspores, such as meiosis events, cytoplasmic activity and cell size increase. IFC therefore made it possible to monitor microspore development into mature pollen.

3. IFC detects different microspore development stages during androgenesis.

Microspore suspensions were analyzed by IFC throughout the androgenesis process, highlighting significant impedance variations (Figure 2 D-21 to D7). To characterize these variations, three polygons were determined manually and in a non-overlapping manner with Amphasoft interface at three precise stages of the androgenesis process. These stages were: spike collecting (D-21), microspore isolation (D0), and after five days of *in vitro* culture (D5). For each polygon, phase angle and amplitude medians of all microspores present inside were averaged and used to characterize the corresponding microspore population.

The first identified polygon was called P1. It defined the viable microspore population present at the beginning of the androgenesis process at D-21. Phase angle and amplitude medians of viable cells present in this polygon P1 were 240 ± 8 and 0.6 ± 0.1 , respectively. After stress application for androgenesis induction (i.e., pretreatment), viable microspores exhibited impedance variations from D0 to D7. First, some microspores showed an increase in phase angle at D0. This population was specified by a P2 polygon with phase angle and amplitude medians of 315 ± 4 and 0.7 ± 0.1 , respectively. Secondly, throughout the culture, some of the viable microspores displayed a continuous increase in phase angle but also in amplitude. This cell population was characterized by a P3 polygon and by phase angle and amplitude medians of 354 ± 1 and 2.4 ± 0.4 , respectively.

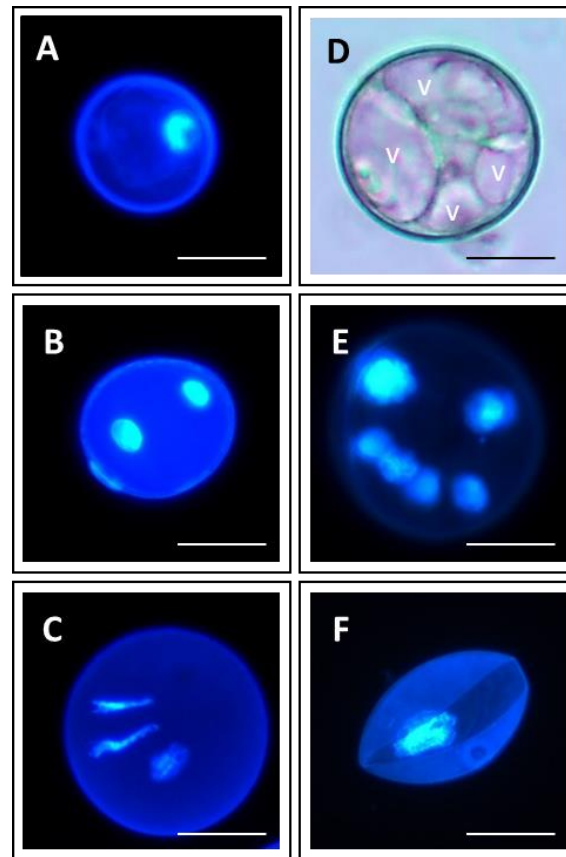


Figure 3: Developmental stages of gametophytic and sporophytic pathways of Pavon microspores observed in microscopy. (A) Uninucleate microspore; (B) Binucleate microspore; (C) Pollen grain; (D) Star-like microspore (v = vacuole); (E) Multinucleate microspore; (F) Plasmolyzed microspore. Microspores were observed with fluorescent DAPI staining of nuclei or using visible light microscopy. Bars = 20 μ m.

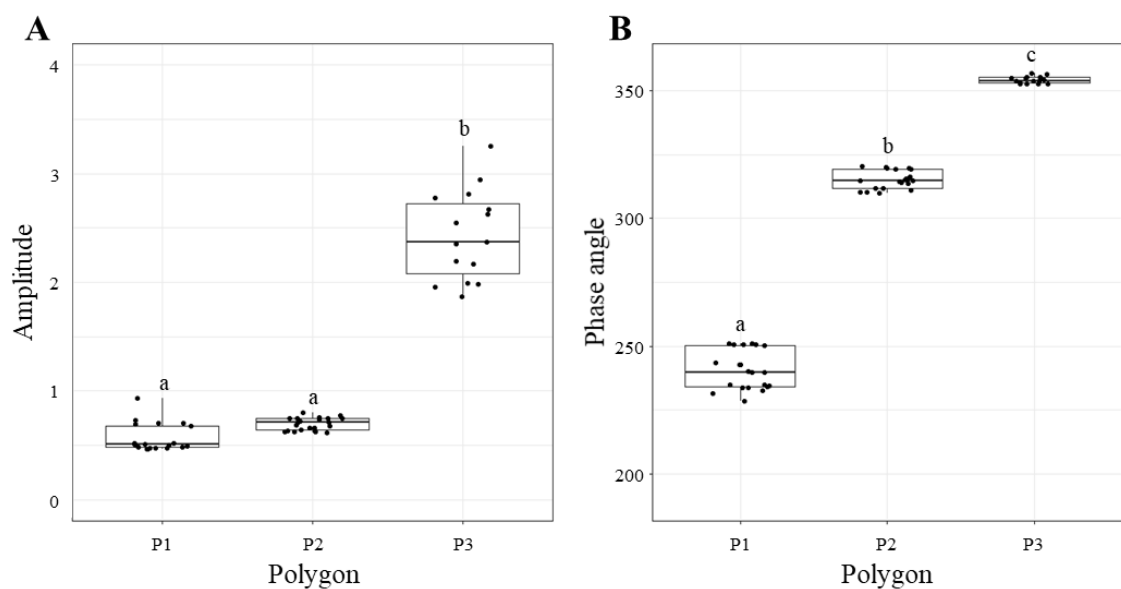


Figure 4: Amplitude and phase angle medians of the three polygons delimiting dot plots in IFC. Amplitude (A) and phase angle (B) medians of P1, P2 and P3 polygons were obtained from at least five microspore suspensions analyzed by IFC at 12 MHz at D-21, D0 and D5, respectively. Each point represents the median of the microspore population inside the polygon for one measurement. Within a graph, boxes with the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

The phase angle and amplitude medians presented above were calculated and determined the day at which the polygon was defined: at D-21, D0 and at D1 for polygons P1, P2 and P3, respectively. Statistical analysis revealed that the phase angle medians are significantly different for the three polygons, while only the P3 amplitude median is significantly different from the others (Figure 4 A and B). We thus assumed that these impedance phase angle and amplitude variations reflect intracellular changes occurring within microspores during androgenesis, and could therefore be associated with biological phenomena.

4. Impedance variations express morphological and intracellular changes occurring within the microspores during androgenesis.

4.1. IFC shows a decrease in microspore viability during the androgenesis process.

Microspore viability is an important parameter to monitor during the androgenesis process in order to control the quality of cell suspensions as well as the impact of the process factors. At the spike collecting stage (D-21), cell viability was 81.90% on average (Figure 5). Cell viability decreased by more than half during stress treatment under these experimental conditions (between D-21 and D0). After one day of *in vitro* culture (D1), no significant variation in cell viability was observed. In contrast, it significantly decreased after D1, reaching 10.4% at D7.

4.2. Microscopic characterization of intracellular changes occurring in microspores during androgenesis.

In addition to IFC measurements, microscopic studies were carried out on the wheat microspore developmental pathways during the androgenesis process (Figure 3).

At D-21, the microspores observed with DAPI staining were mainly at the mid- to late-uninucleate stage, the preferential developmental stage in wheat for androgenesis induction. Microscopic observations after stress treatment at D0 showed morphological changes within some microspores, and different types of development were visible. One part of the microspores did not seem to develop during pretreatment: these cells had a single nucleus

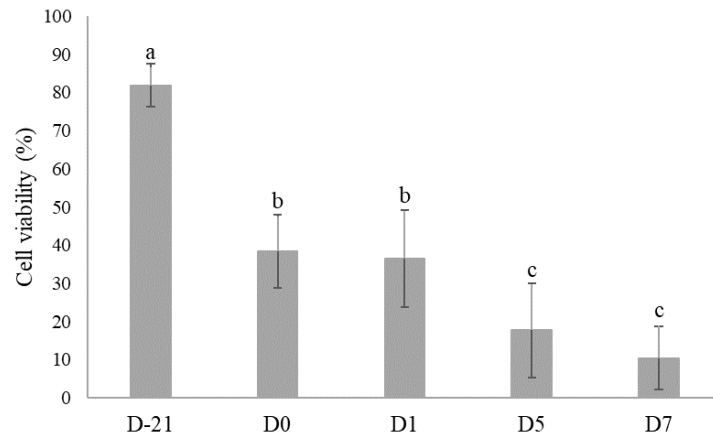


Figure 5: Evolution of microspore viability during the androgenesis process. Mean percentages of microspore viability from D-21 to D7 were analyzed by IFC at 12 MHZ from at least five biological replicates. Each point represents an average of technical triplicates. Standard deviations (shown by error bars) were determined for each day of analysis. Data with the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

A

		D-21	D0	D1	D5	D7
DAPI	Uninucleate	97.6 ^b	78.7 ^a	78.1 ^a	76.5 ^a	78.5 ^a
	Binucleate	2.4 ^a	21.1 ^b	20.2 ^b	20.8 ^b	19.5 ^b
	Trinucleate	0 ^a	0.2 ^{ab}	1.1 ^{ab}	1.3 ^b	1.0 ^{ab}
	Multinucleate	0 ^a	0 ^a	0.6 ^{ab}	1.4 ^b	1.0 ^{ab}
Visible	Star-like microspore	—	41.5	—	—	—
IFC	Non-viable microspore	18.4 ^a	60.2 ^b	62.5 ^b	82.6 ^c	89.6 ^c
	Viable microspore in P1	80.1 ^b	5.7 ^a	2.2 ^a	2.4 ^a	2.0 ^a
	Viable microspore in P2	1.1 ^a	33.8 ^b	25.2 ^b	8.4 ^a	5.2 ^a
	Viable microspore in P3	0 ^a	0.2 ^a	10.3 ^c	6.4 ^{bc}	3.1 ^{ab}

B

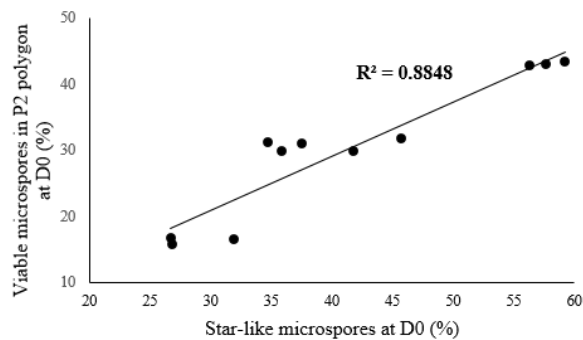


Figure 6: Comparison of microspore population descriptions throughout the androgenesis process obtained by microscopy and IFC analyses. (A) Percentages of cell types observed in microspore suspensions at different culture times, established by counting with DAPI staining and visible microscopy, and IFC analyses at 12 MHZ. Percentages were calculated from a minimum of five biological replicates. For IFC data, technical triplicates were performed and averaged for each day of analysis. For each category, data with the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$). (B) Correlation between star-like microspore proportions and the percentage of viable microspores in the P2 polygon at D0 using a linear regression analysis (p -value < 0.05 ; $y = 0.82x - 3.5$; $r^2 = 0.8848$). Four biological replicates were analyzed by both methods; each point represented a technical replicate.

and no vacuolization was visible (Figure 3 A). Another part of the microspores showed one or two nuclei in a surrounding position due to the presence of a large vacuole (Figure 3 B). A final microspore subpopulation exhibited a star-like morphology: significant vacuolization with cytoplasmic strands crossing through the vacuoles and connecting perinuclear and subcortical cytoplasms (Figure 3 D). Their nucleus was in a central position. During the first seven days of culture, two new types of microspores appeared: trinucleate microspores with three more or less elongated nuclei (Figure 3 C), and multinucleate microspores characterized by a nuclei number equal to or greater than four (Figure 3 E). Multinucleate microspores exhibited a gradual disappearance of vacuoles and the potential appearance of small vesicles within this cell type. Plasmolyzed cell (Figure 3 F) frequency increased throughout the culture, and less and less cells had intact nuclei visible in microscopy (data not shown).

Microspores were categorized according to their nuclei number and cytological characteristics, and the distribution of cells in each category was calculated and expressed in percentage in Figure 6 A. From D-21 to D0, the proportion of uninucleate microspores dropped to approximately 78%, while the proportion of binucleate cells was multiplied by approximately 10 compared to D-21. Uninucleate and binucleate microspore proportions then remained stable during the first seven days of *in vitro* culture. Trinucleate and multinucleate microspore proportions never exceeded 1.5%. These forms of cell development remained rare events. Star-like microspores, a transient form of cell development, represented 41.5% of the population at D0. They were only counted at D0, even if they were still visible during the first days of culture.

4.3. Early biological changes occurring within microspores explain impedance variations during androgenesis.

Data from IFC analyses were compared to microscopic observations to improve the understanding of impedance variations observed in microspores during the androgenesis process (Figure 6 A).

IFC measurements performed at D-21 showed that P1 polygons contained a large majority of the viable microspores, about 80% of the 81.90% viable cells. As observed using microscopy, cells were mostly uninucleate microspores. From D0 and throughout the culture, the percentage of viable microspores in the P1 polygon then decreased to reach 2%, whereas

microscopic examinations revealed that the proportion of uninucleate cells remained stable during *in vitro* culture.

The majority of viable microspores at D0, about 33%, were contained in the P2 polygon. This proportion gradually decreased during microspore culture. D0 is a precise and important step in androgenesis and marks the transition between stress treatment, allowing the microspore switch towards the sporophytic pathway and *in vitro* culture required for embryogenic structure development. Comparison of the percentage of viable microspores in the P2 polygon and star-like microspore proportion at D0 showed a significant correlation ($r^2=0.88$) between these two variables (Figure 6 B). The slope value of the correlation line is 0.82 and can be explained by the fact that no distinction is made between viable and non-viable microspores by light microscopy, unlike IFC analysis.

These results show that IFC can very precisely discriminate the different developing cell populations during the early stages of androgenesis. Moreover, IFC measurement at D0 is a potentially reliable predictor for microspore suspension reactivity.

4.4. The percentage of viable cells in the P3 polygon measured by IFC provides an early prediction of embryo yield.

To investigate microspore culture characterization by IFC, we studied the evolution of cells contained in polygon P3 from D1 to D7.

The highest proportion of viable microspores in the P3 polygon was reached at D1 (10%) but this proportion then dropped during culture as mortality increased (Figure 6 A). However, the phase angle and amplitude of the microspore population in the P3 polygon increased throughout microspore culture (Figure 2 D1 to D7).

Contrary to expectations, no correlation was found between the percentage of viable microspores in the P3 polygon and the proportion of multinucleate microspores (data not shown). By comparing the IFC data of wheat gametophytic and sporophytic developments (Figure 2), we showed that no viable microspore was present in the P3 polygon during pollen formation, regardless of the gametophytic developmental stage. These results allowed us to conclude that during the androgenesis process, the cells present in the P3 polygon did not correspond to microspores developing into pollen. As previously stated, multinucleate microspores remain a very rare event to be observed by microscopy. In contrast, with IFC

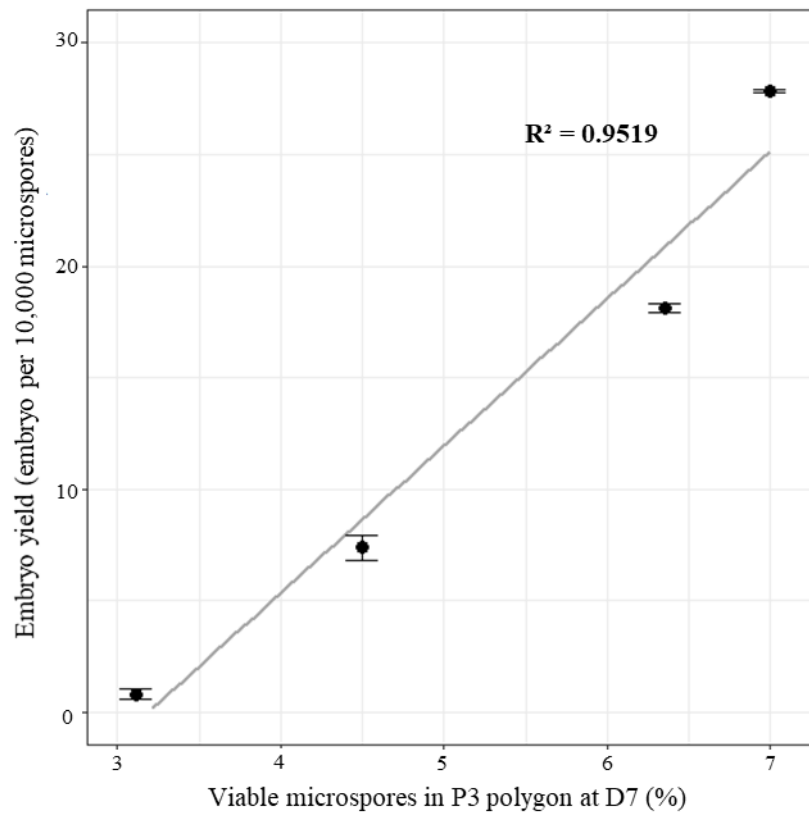


Figure 7: Early prediction of embryo yield for the Pavon genotype with IFC measurement. Application of a prediction model for the linear correlation between the percentage of viable microspores in the P3 polygon at D7 and the embryo yield. Four biological replicates were used to establish this mathematical model, with the average of technical triplicates for IFC measurements represented by error bars. The coefficients of this prediction model were obtained by adjusting the linear model using R software (linear equation: $y = 6.539x - 20.827$; $p\text{-value} < 0.05$).

analysis, an average of 8,283 cells per sample was counted and an average of about 293 microspores were present in the P3 polygon at D7. The absence of correlation could therefore be explained by technical constraints based on the low number of cells counted by microscopy, insufficient to characterize the real composition of microspore populations in culture. It was therefore crucial to implement another approach to characterize the microspore population in the P3 polygon.

We decided to set up a novel statistical approach to try to connect the microspores in the P3 polygon with the reactivity level of a microspore suspension. For this advanced approach, we used classic mathematical model methods: first, a generalized linear model to predict embryo production and, second, a linear model for embryo yield prediction. We decided to fix a minimal value for cell culture reactivity for the Pavon genotype at 0.3 embryos per 10,000 microspores. Only four of the seven biological replicates showed an acceptable level of reactivity and were used to further construct the mathematical procedure.

First, we investigated if embryo production, or lack of embryo production, could be predicted by IFC data. Statistical analysis (PCA) showed that the percentage of viable microspores in the P3 polygon at D7 was the best predictive variable for embryo production. Thus, if the percentage of viable microspores in the P3 polygon at D7 exceeds the threshold of 3.1%, the microspore suspension will produce embryos (data not shown).

Secondly, we established a mathematical model based on this same variable to predict embryo yield of a microspore suspension. In this linear model, if the percentage of viable microspores in the P3 polygon at D7 exceeds 3.1%, as previously stated, then the embryo production number by a microspore suspension can be predicted by the equation: $y = 6.539x - 20.827$, with y corresponding to the number of embryos per 10,000 microspores and x corresponding to the percentage of viable microspores in the P3 polygon at D7 (Figure 7). When applied to our four biological replicates, this mathematical model presented a high significance level ($r^2=0.95$ and $p\text{-value}=0.02$).

Discussion

The first research work using IFC analyses on plant cells was published in 2016 by Heidmann et al. (Heidmann et al., 2016). It reported viability measurement of pollen from different plant species at different stages of development, from tetrad to mature pollen. In our study, we demonstrated that microspore suspension viability can also be measured by IFC during the early stages of the androgenesis process. In addition, the sample preparation method described here for the first time allows microspore analysis in their own *in vitro* culture medium. This novel methodology preserves microspore viability during the sample preparation for IFC analysis and therefore eliminates the potential biases of damaged cells.

We easily monitored microspore viability evolution using IFC, from tiller harvesting to the first seven days of culture. The decrease in cell viability observed in our study is in agreement with other studies carried out on several isolated microspore culture systems (Pérez-Pérez et al., 2019; Reynolds, 1993; Rodriguez-Serrano et al., 2012). The first viability decline (from D-21 to D0) may be associated with stress treatment effects. The inductive stress applied to microspores induces several protection and stress-response processes such as heat shock protein expression, proteolytic machinery activation and autophagy (Seguí-Simarro et al., 2003; Testillano, 2019). Studies showed that in barley microspore cultures, autophagy is induced after pretreatment and could be responsible for stress-induced cell death within these microspores (Bárány et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2019; Rodriguez-Serrano et al., 2012). However, this stress is fundamental for the microspore switch towards the sporophytic pathway (Touraev et al., 1997). It is therefore necessary to adapt the stress conditions to allow a maximum of microspore reorientation, while preserving their integrity and viability. A second viability drop is observed during microspore culture, corresponding to the degeneration and death of non-responsive and non-embryogenic microspores (Soriano et al., 2013). Thanks to viability measurement by IFC, it is now possible to multiply stress condition tests and easily evaluate their impact on cell culture viability. IFC is therefore an advantageous tool for routinely monitoring cell viability.

During *in vitro* culture, microspores arrest their development, continue on a gametophytic pathway leading to pollen formation, or switch to a sporophytic program. Among the responsive microspores, some of them stop their development after only several divisions, whereas the others develop into androgenic structures (Soriano et al., 2013).

After pretreatment, the coexistence of various cell fates and types within the same microspore suspension makes it widely heterogeneous. The separation of these different structures during the early androgenic stages remains difficult at this time (Testillano, 2018, 2019). IFC allows quick and simple cell population description on heterogeneous populations of isolated microspores in culture without cell sorting.

In this paper, we highlighted amplitude and phase angle increases in microspore suspensions during the androgenesis process and connected these impedance variations to well-known cellular mechanisms described in microspore embryogenesis. Responsive microspores undergo considerable morphological changes as well as a significant cytological reorganization (Pauls et al., 2006). The embryogenic development of microspores can actually be divided into three phases: acquisition of embryogenic potential, multinucleate structure development and embryo formation (Maraschin et al., 2005). Our results can be linked to the two first phases. We show that the first intracellular changes occurring in androgenesis are reflected by the significant increase in the impedance phase angle of a proportion of viable microspores. At this stage, responsive microspores are subjected to profound modifications of their genetic machinery with the repression of genes related to a gametophytic program and, conversely, the initial overexpression of stress-resistant genes and genes associated with embryogenic development (Malik et al., 2007; Ribalta et al., 2012; Seguí-Simarro and Nuez, 2008). These microspores display a weak metabolic activity (Bonet and Olmedilla, 2000), as reflected by the presence of cytoplasmic regions devoid of organelles and the decrease in ribosome density (Corral-Martínez et al., 2013; Maraschin et al., 2005). We demonstrate in this paper that the acquisition of embryogenic potential, represented by star-like microspores in wheat, is highly correlated with the proportion of viable microspores present in the P2 polygon, in particular at D0. IFC quickly and precisely measures the stress efficiency on microspore populations. Two reactivity markers have been identified: cell viability and cell proportion in the P2 polygon, representing responsive microspores. IFC could therefore be considered as a reliable, robust and label-free marker of the stress efficiency for Pavon microspores and could be applied to other wheat genotypes or several plant species in androgenesis.

From D1 to D7, a second phase angle and an increase in amplitude were observed, corresponding to the second phase of embryogenic microspore development. These

microspores actively divide and their cytoplasm densifies even more with the disappearance of vacuoles and vesicle formation (Indrianto et al., 2001). The ribosome number considerably increases, just like the nuclei number, reflecting the high cellular activity of these microspores (Bonet and Olmedilla, 2000; Indrianto et al., 2001; Seguí-Simarro and Nuez, 2008; Testillano et al., 2005). Thus, cytoplasm conductivity and permittivity of these microspores considerably change, as shown by the IFC analyses from D1 to D7. Heidmann et al. (2016) showed, with the use of beads of different sizes, that the amplitude increases observed in IFC represented an increase in cell size. This data is in agreement with our IFC results: the responsive microspores presented a significant size increase during the first days of culture, as confirmed by our microscopic observations and by several studies as well (Daghma et al., 2014; Pauls et al., 2006). We can therefore hypothesize that these cytoplasmic rearrangements and this strong metabolic activity of embryogenic microspores are connected to the increase in the impedance phase angle and amplitude characteristics of the P3 polygon. More detailed studies could allow a finer characterization of the microspores contained in this polygon. Finally, we also highlighted a novel reactivity marker using the viable microspores detected in the P3 polygon by IFC technology to predict embryo yields in Pavon microspore suspensions. With an average of 13.5 embryos per 10,000 microspores, Pavon's embryo yields in our study fit with the other yields published for this genotype, which corroborate the reactivity threshold we set up (Labbani et al., 2005; Poersch-Bortolon et al., 2016). To our knowledge, this is the first time that embryo yields have been predicted early and reliably in androgenesis. The predictive mathematical model proposed for the Pavon genotype is highly significant and promising, and its robustness and precision will improve over time by adding more biological repetitions. Furthermore, additional studies are underway to adapt this model for embryo yield prediction to other wheat genotypes and other species in androgenesis.

In conclusion, cellular and intracellular events that occur in responsive and embryogenic microspores throughout *in vitro* culture can be studied by using IFC. This technology provides a new approach to track microspore fates during androgenesis but is also an early, reliable and robust marker for efficiency evaluation of stress treatment. Using it, we demonstrated, for the first time, the possibility of early prediction of embryo yields of wheat microspore suspensions during the first seven days of *in vitro* culture.

Acknowledgements

The authors thank S. Letty for providing technical assistance, as well as M. Kloareg of the Kuzulia Company for her help and support in statistical analyses.

Authors' contributions:

Julie Canonge: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing, Visualization. **Murielle Philippot:** Conceptualization, Validation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing. **Catherine Leblanc:** Conceptualization, Validation, Writing – Review and Editing. **Philippe Potin:** Conceptualization, Validation, Writing – Review and Editing, Supervision. **Manuelle Bodin:** Conceptualization, Validation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Funding

This work was supported by the European Regional Development Fund and by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation in the context of the CIFRE PhD thesis n°2017/0173 granted by ANRT, and by SECOBRA Recherches.

Declaration of Interests

The authors declare that they have no known financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

References

- Bárány, I., Berenguer, E., Solís, M.-T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M.E., Crespo, J.L., Risueño, M.C., Díaz, I., and Testillano, P.S. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *J. Exp. Bot.* *69*, 1387–1402.
- Barnabás, B., Obert, B., and Kovács, G. (1999). Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep.* *18*, 858–862.
- Bonet, F.J., and Olmedilla, A. (2000). Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. *Protoplasma* *211*, 94–102.
- Bruins, M.B.M., Rakoczy-Trojanowska, M., and Snijders, C.H.A. (1996). Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.): the effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. *Cereal Res. Commun.* *24*, 401–408.
- Cheung, K.C., Berardino, M.D., Schade-Kampmann, G., Hebeisen, M., Pierzchalski, A., Bocsi, J., Mittag, A., and Tárnok, A. (2010). Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry A* *77A*, 648–666.
- Collins, A.R., Annangi, B., Rubio, L., Marcos, R., Dorn, M., Merker, C., Estrela-Lopis, I., Cimpan, M.R., Ibrahim, M., Cimpan, E., et al. (2017). High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials. *WIREs - Nanomedicine Nanobiotechnology* *9*, e1413.
- Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., and Seguí-Simarro, J.M. (2013). Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning. *J. Exp. Bot.* *64*, 3061–3075.
- Corral-Martínez, P., Driouich, A., and Seguí-Simarro, J.M. (2019). Dynamic Changes in Arabinogalactan-Protein, Pectin, Xyloglucan and Xylan Composition of the Cell Wall During Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* *10*, 332.

Crocetti, S., Beyer, C., Schade, G., Egli, M., Fröhlich, J., and Franco-Obregón, A. (2013). Low Intensity and Frequency Pulsed Electromagnetic Fields Selectively Impair Breast Cancer Cell Viability. *PLoS ONE* 8, e72944.

Custers, J.B.M., Cordewener, J.H.G., Nöllen, Y., Dons, H.J.M., and Van Lockeren Campagne, M.M. (1994). Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 13, 267–271.

Daghma, D.E.S., Kumlehn, J., Hensel, G., Rutten, T., and Melze, M. (2012). Time-lapse imaging of the initiation of pollen embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 63, 6017–6021.

Daghma, D.E.S., Hensel, G., Rutten, T., Melze, M., and Kumlehn, J. (2014). Cellular dynamics during early barley pollen embryogenesis revealed by time-lapse imaging. *Frontiers Plant Sci.* 5, 17–30.

Datta, S.K. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.* 89, 1870–1878.

David, F., Hebeisen, M., Schade, G., Franco-Lara, E., and Berardino, M.D. (2012). Viability and membrane potential analysis of *Bacillus megaterium* cells by impedance flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 483–492.

De Buyser, J., Touraine, P., J'aïti, F., Haïcour, R., and Picard, E. (2002). Haplodiploïdisation par culture de microspores isolées de blé in vitro. In *Biotechnologies Végétales : Techniques de Laboratoire*, (Paris: Lavoisier), pp. 257–273.

Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D., and Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol. Adv.* 33, 812–829.

Echávarri, B., and Cistué, L. (2016). Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 125, 11–22.

Gawad, S., Schild, L., and Renaud, Ph. (2001). Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab. Chip* 1, 76–82.

Gervais, C., Newcomb, W., and Simmonds, D.H. (2000). Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma* 213, 194–202.

Gonzalez, J.M., and Jouve, N. (2005). Microspore development during in vitro androgenesis in triticale. *Biol. Plant.* 49, 23–28.

Guha, S., and Maheshwari, S.C. (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497.

Hassawi, D.S., Sears, R.G., and Liang, G.H. (1990). Microspore development in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cytologia (Tokyo)* 55, 475–478.

Heidmann, I., and Di Berardino, M. (2017). Impedance Flow Cytometry as a Tool to Analyze Microspore and Pollen Quality. In *Plant Germline Development: Methods and Protocols*, A. Schmidt, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 339–354.

Heidmann, I., Schade-Kampmann, G., Lambalk, J., Ottiger, M., and Di Berardino, M. (2016). Impedance Flow Cytometry: A Novel Technique in Pollen Analysis. *PLOS ONE* 11, e0165531.

Heslop-Harrison, J., and Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.* 45, 115–120.

Hu, T., and Kasha, K.J. (1997). Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Rep.* 16, 520–525.

Indrianto, A., Barinova, I., and Herberle-Bors, E. (2001). Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212, 163–174.

Jähne, A., and Lörz, H. (1995). Cereal microspore culture. *Plant Sci.* 109, 1–12.

- Josse, J., and Husson, F. (2016). missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *J. Stat. Softw.* 70, 1–31.
- Kumari, M., Clarke, H.J., Small, I., and Siddique, K.H.M. (2009). Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 393–409.
- Labbani, Z., Richard, N., De Buyser, J., and Picard, E. (2005). Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées : importance des prétraitements. *C. R. Biol.* 328, 713–723.
- Leroux, B., Carmoy, N., Giraudet, D., Potin, P., Larher, F., and Bodin, M. (2009). Inhibition of ethylene biosynthesis enhances embryogenesis of cultured microspores of *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. Rep.* 3, 347–353.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R., and Krochko, J.E. (2007). Transcript Profiling and Identification of Molecular Markers for Early Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 144, 134–154.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., and Szarejko, I. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Maraschin, S.F., Vennik, M., Lamers, G.E.M., Spaijk, H.P., and Wang, M. (2005). Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta* 220, 531–540.
- Olmedilla, A. (2010). Microspore Embryogenesis (New York: Springer).
- Opitz, C., Schade, G., Kaufmann, S., Di Berardino, M., Ottiger, M., and Grzesiek, S. (2019). Rapid determination of general cell status, cell viability, and optimal harvest time in eukaryotic cell cultures by impedance flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 8619–8629.
- Pauls, K.P., Chan, J., Woronuk, G., Schulze, D., and Brazolot, J. (2006). When microspores decide to become embryos - Cellular and molecular changes. *Can. J. Bot.* 84, 668–678.

- Pérez-Pérez, Y., Bárány, I., Berenguer, E., Carneros, E., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signal. Behav.* *14*, 1559577.
- Pierzchalski, A., Hebeisen, M., Mittag, A., Bocsi, J., Berardino, M.D., and Tarnok, A. (2012). Label-free hybridoma cell culture quality control by a chip-based impedance flow cytometer. *Lab. Chip* *12*, 4533–4543.
- Poersch-Bortolon, L.B., Scagliusi, S.M.M., Yamazaki-Lau, E., Bodanese-Zanettini, M.H., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and Embrapa Trigo, Brazil (2016). Androgenic response of Brazilian wheat genotypes to different pretreatments of spikes and to a gelling agent. *Pesqui. Agropecuária Bras.* *51*, 1839–1847.
- Raina, S.K., and Irfan, S.T. (1998). High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Rep.* *17*, 957–962.
- Reynolds, T.L. (1993). A Cytological Analysis of Microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) During Normal Ontogeny and Induced Embryogenic Development. *Am. J. Bot.* *80*, 569–576.
- Ribalta, F.M., Croser, J.S., and Ochatt, S.J. (2012). Flow cytometry enables identification of sporophytic eliciting stress treatments in gametic cells. *J. Plant Physiol.* *169*, 104–110.
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Porcel, R., Camacho-Fernández, C., Calabuig-Serna, A., and Seguí-Simarro, J.M. (2019). Embryogenic competence of microspores is associated with their ability to form a callosic, osmoprotective subintinal layer. *J. Exp. Bot.* *70*, 1267–1281.
- Rodríguez-Serrano, M., Barany, I., Prem, D., Coronado, M.-J., Risueno, M.C., and Testillano, P.S. (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Bot.* *63*, 2007–2024.
- Sánchez-Díaz, R.A., Castillo, A.M., and Vallés, M.P. (2013). Microspore embryogenesis in wheat: new marker genes for early, middle and late stages of embryo development. *Plant Reprod.* *26*, 287–296.

Schulze, D., and Pauls, K.P. (2002). Flow cytometric analysis of cellulose tracks development of embryogenic Brassica cells in microspore cultures. *New Phytol.* **154**, 249–254.

Seguí-Simarro, J.M., and Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol. Plant.* **134**, 1–12.

Seguí-Simarro, J.M., Testillano, P.S., and Risueño, M.C. (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J. Struct. Biol.* **142**, 379–391.

Soriano, M., Hui, L., and Boutilier, K. (2013). Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.* **26**, 181–196.

Tang, X., Liu, Y., He, Y., Ma, L., and Sun, M.-X. (2013). Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical–basal axis of the embryo. *J. Exp. Bot.* **64**, 215–228.

Testillano, P.S. (2018). Stress-Induced Microspore Embryogenesis in Crop Plants: Cell Totipotency Acquisition and Embryo Development. In *Progress in Botany*, (Cham: Springer), pp. 1–15.

Testillano, P.S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J. Exp. Bot.* **70**, 2965–29789.

Testillano, P.S., González-Melendi, P., Coronado, M.J., Seguí-Simarro, J.M., Moreno-Risueño, M.A., and Risueño, M.C. (2005). Differentiating plant cells switched to proliferation remodel the functional organization of nuclear domains. *Cytogenet. Genome Res.* **109**, 166–174.

Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., and Herberle-Bors, E. (1996a). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex. Plant Reprod.* **9**, 209–215.

Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. (1996b). Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* **200**.

- Touraev, A., Vicente, O., and Herberle-Bors, E. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* 2, 297–302.
- Touraev, A., Pfosser, M., and Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. In *Advances in Botanical Research*, (Academic Press), pp. 53–109.
- Vergne, P., Delvallee, I., and Dumas, C. (1987). Rapid Assessment of Microspore and Pollen Development Stage in Wheat and Maize Using Dapi and Membrane Permeabilization. *Stain Technol.* 62, 299–304.
- Xu, J., Driedonks, N., Rutten, M.J.M., Vriezen, W.H., de Boer, G.-J., and Rieu, I. (2017). Mapping quantitative trait loci for heat tolerance of reproductive traits in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mol. Breed.* 37, 37–58.
- Zaki, M.A.M., and Dickinson, H.G. (1991). Microspore-derived embryos in Brassica: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.* 4, 48–55.
- Zheng, M.Y., Liu, W., Weng, Y., Polle, E., and Konzak, C.F. Production of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.) through microspore embryogenesis triggered by inducer chemicals. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, pp. 83–94.

Chapitre 3

Étude microscopique et morphologique des structures androgéniques de blé et caractérisation de leur capacité à régénérer des plantules chlorophylliennes.

Introduction

Dans le phylum des *Embryophyta*, l'embryogénèse a lieu majoritairement après fécondation *in planta*, par fusion des gamètes mâle et femelle. Le zygote unicellulaire ainsi obtenu subit alors de nombreuses divisions cellulaires et emprunte des voies de développement et de différenciation spécifiques aboutissant à la formation d'un embryon, capable de donner naissance à une plantule. Néanmoins le phénomène de totipotence observé chez les cellules végétales leur permet de produire des embryons à partir d'autres cellules que le zygote, et ce notamment grâce à la culture *in vitro* (Su et al., 2020). Ainsi l'embryogénèse somatique est induite à partir de tous types de cellules ou tissus végétatifs et permet de produire des embryons de même niveau de ploïdie et de même fonds génétique que la plante donneuse (George et al., 2007; Zimmerman, 1993). À l'inverse, l'androgénèse (Seguí-Simarro, 2010) et la gynogénèse (Bohanec, 2009) permettent la formation d'embryons, sans fécondation, à partir du gamétophyte mâle ou femelle, respectivement. Les embryons issus de cette technique d'embryogénèse gamétophytique sont initialement haploïdes, chacun présentant une ségrégation aléatoire des caractères de la plante donneuse.

L'embryogénèse zygotique a fait l'objet de nombreuses études, *in vitro* et *in planta*, permettant l'élucidation du schéma développemental chez de nombreuses espèces de Dicotylédones, comme *Arabidopsis thaliana* (Kurczyńska et al., 2007) et *Brassica napus* (Hause et al., 1994), et de Monocotylédones telles que *Zea mays* (Clark and Sheridan, 1986), *Hordeum vulgare* (Nonohay et al., 1999) et *Triticum aestivum* (Delporte et al., 2014). Chez les Monocotylédones, l'embryogénèse zygotique peut être divisée en 9 stades principaux, comme l'illustre la figure 1. Le zygote initial est asymétrique et se divise activement, générant un pro-embryon de forme ovoïde, composé de 12 à 14 cellules (Figure 1 – Stade pro-embryon). Les cellules apicales de l'embryon sont caractérisées par un cytoplasme dense, alors qu'au pôle basal, les cellules du suspenseur possèdent de grandes vacuoles (Seldimirova et al., 2017). Cette polarité apicale-basale des cellules correspond au premier patron de développement : la mise en place de l'axe embryon-suspenseur. Des structures de type suspenseur ont également été observées lors de l'embryogénèse somatique et gamétophytique chez différentes espèces de Dicotylédones comme le colza (Supena et al., 2008) et le café (Quiroz-Figueroa et al., 2006). On observe ensuite un allongement important

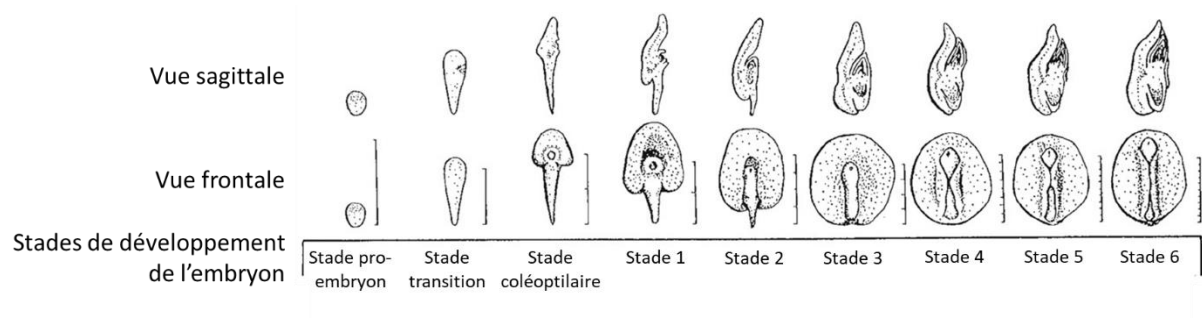


Figure 1 : Embryogénèse chez le maïs. Le zygote se développe en pro-embryon, également appelé stade globulaire, composé de deux régions distinctes : l'embryon et le suspenseur. Au cours de la phase de transition, l'embryon s'allonge de manière importante, et une région méristématique se différencie au sein de celui-ci. Au stade coléoptilaire, le scutellum initie son développement autour de l'embryon, et le coléoptile entoure le méristème apical caulinaire. Les apex foliaires et racinaires se différencient. Le premier primordium foliaire apparaît au stade 1, à la base du méristème apical caulinaire. Aux stade 2 à 6, le suspenseur a totalement dégénéré. Le scutellum entoure maintenant totalement l'embryon. L'embryon est mature et formé des organes caractéristiques que sont le scutellum, le coléoptile renfermant les primordia foliaires et le coléorhize. (Figure de Brunelle et al., 2017 traduite et modifiée).

de l'embryon, marquant le début de la phase de transition (Figure 1 – Stade transition). Les méristèmes commencent à se former et le protoderme se différencie à ce stade de façon non uniforme. Le scutellum, cotylédon modifié correspondant à un organe de réserve situé entre l'embryon et l'albumen, se développe autour de l'embryon. Enfin, à la fin du stade de transition, le coléoptile initie à son tour son développement et vient recouvrir le méristème apical caulinaire. Cette gaine protectrice des premières feuilles est spécifique aux Graminées et joue un rôle dans le phénomène de phototropisme lors de la germination. Le suspenseur est encore visible. Du stade coléoptilaire au stade 1 (Figure 1), l'embryon se différencie, on observe alors la mise en place du deuxième patron de développement : l'axe tige-racine. Le scutellum continue à se développer autour de l'embryon et les premiers primordia foliaires se différencient également. À ce stade, l'embryon mesure environ 1mm. Le suspenseur débute sa dégénérescence par autolyse de ses cellules (Seldimirova et al., 2017). Lors des stades suivants (Figure 1 – Stades 2 à 6), l'embryon forme de nouveaux primordia foliaires et racinaires. Le scutellum se développe de façon importante et entoure alors complètement l'embryon. Ces stades de développement correspondent également à la phase de maturation de l'embryon pendant laquelle il accumule des réserves de type amylacé. L'embryon mature des Monocotylédones est composé de 5 à 6 ébauches foliaires et est entouré d'albumen.

Différentes études comparatives ont permis de mettre en avant les similarités et les différences entre l'embryogénèse *in vitro* – par culture d'embryons immatures (Kumlehn et al., 1998, 1999; Leljak-Levanić et al., 2015) ou par androgénèse (Pulido et al., 2005; Testillano et al., 2002) – à l'embryogénèse zygotique *in planta*. De manière générale, l'embryogénèse *in vitro* présente de nombreuses homologues avec l'embryogénèse *in planta*, les stades de développement globulaire, transition, coléoptilaire, stades 1 à 6 sont similaires (Méndez-Hernández et al., 2019; Zhao et al., 2017). Néanmoins, on observe un développement général et un établissement de la polarité plus lents en embryogénèse *in vitro* (Bakos et al., 2009). Ainsi chez le blé, il faut en moyenne 14 jours pour obtenir des embryons morphologiquement complets *in planta*, 20 jours en culture d'embryons *in vitro*, et 28 à 35 jours en androgénèse. De plus, les divisions des structures multicellulaires embryogéniques sont souvent orientées au hasard en androgénèse, contrairement au développement zygotique, mais celles-ci retrouvent ensuite une morphologie et une structure cellulaire proches de celles de l'embryon zygotique (Seguí-Simarro and Nuez, 2008).

L'embryogénèse des microspores n'est pas le seul type de développement observable en androgénèse. En effet, chez de nombreuses espèces comme le colza (Rivas-Sendra et al., 2017), le maïs (Góralski et al., 2005), l'orge (Piccirilli and Arcioni, 1991), l'avoine (Kiviharju et al., 1998), le seigle (Ma et al., 2004a) et le blé (Konieczny et al., 2003; Rybczynski et al., 1991), parmi les microspores réorientées vers la voie sporophytique, certaines vont former des structures de type embryon (ELS – embryo-like structure) alors que d'autres produiront des structures de type cal (CLS – callus-like structure). Les capacités de conversion de ces deux types de structures en plantules sont variables selon les espèces. Ainsi chez le maïs, les CLS ne produisent que très rarement voire jamais de plantule, et dégénèrent relativement tôt au cours de la culture *in vitro* (Massonneau et al., 2005). À l'inverse, chez les Cucurbitacées et l'aubergine, la formation de CLS au cours de la culture de microspores demeure la voie majoritaire ou unique pour la génération d'HD (Gémes Juhász and Jakše, 2005; Rivas-Sendra et al., 2020a; Song et al., 2007). Cette voie de callogénèse observée en androgénèse chez ces espèces pourrait être la conséquence de l'absence de certains signaux de régulation essentiels à la formation d'embryons. Lors de l'embryogénèse zygotique, ces signaux proviennent de tissus spécifiques tels que l'endosperme et les tissus de la graine. Il a été montré dans les cultures de microspores isolées de maïs que les CLS exprimaient des gènes spécifiques de l'endosperme, et que ce type de structures pourrait donc avoir un rôle de stimulation et de maintien du développement embryonnaire des ELS (Massonneau et al., 2005). Les conditions de culture *in vitro* des microspores sont également un élément critique pour la production d'embryons en androgénèse. Des conditions de culture non optimales peuvent entraîner la production préférentielle de CLS voire l'arrêt du développement embryonnaire de certaines microspores et leur passage à un statut de cal prolifératif (Seguí-Simarro, 2010), alors que l'optimisation des différents paramètres de culture, comme la composition du milieu de culture, permet d'améliorer la qualité des embryons produits ainsi que leur capacité de régénération (Kim et al., 2008; Supena and Custers, 2011).

Chez le blé, les études menées sur le développement des microspores en androgénèse se sont souvent focalisées sur les premières phases du développement embryogénique (Bonet and Olmedilla, 2000; Indrianto et al., 2001; Seldimirova et al., 2016), c'est-à-dire de la réorientation des microspores vers la voie sporophytique, grâce à l'application d'un stress inducteur, à la formation et à la libération de structures multicellulaires. Très peu d'études

ont été menées sur les étapes plus tardives du développement des structures androgéniques produites chez le blé (Rybczynski et al., 1991) et peu d'éléments sont connus sur leur capacité de conversion en plantules. De plus, le problème majeur observé en androgénèse chez les céréales, et notamment chez le blé, est la régénération d'une proportion importante de plantules albinos, allant jusqu'à 100% chez certains génotypes. Ces plantules sont dépourvues de système photosynthétique fonctionnel dû à l'absence totale ou partielle de chlorophylle, rendant impossible leur survie en dehors de la culture *in vitro* (Kumari et al., 2009). À l'heure actuelle, les causes et les facteurs induisant la conversion des embryons en plantules chlorophylliennes ou à l'inverse en plantules albinos ne sont toujours pas connus. En outre, des anomalies développementales, telles que des aberrations histologiques, des échecs de différenciation ou une absence de polarisation de l'embryon, sont souvent observées en culture de microspores, tout comme en culture d'embryons *in vitro*. Ces anomalies sont directement liées au système de culture *in vitro* (Bakos et al., 2009). Les défauts de développement influencent directement et négativement la capacité de régénération en plantules de ces structures androgéniques, impactant l'efficacité de la technique d'androgénèse en production. Enfin, quelle que soit l'espèce, peu d'études (Castillo et al., 2000; Fadel and Wenzel, 1990; Olsen, 1987; Rivas-Sendra et al., 2017) se sont intéressées au potentiel embryogénique des structures produites en culture de microspores, ni à leur capacité de régénération en plantule chlorophyllienne.

Nous proposons donc de caractériser les différentes structures androgéniques produites en culture de microspores isolées au travers de l'étude de trois génotypes de blé. Dans un premier temps, l'étude morphologique des structures androgéniques permettra de les qualifier et de catégoriser ces structures selon leur type de développement, leur taille et leur aspect. Ensuite, la capacité de conversion en plantules et le potentiel de régénération en plantules chlorophylliennes seront étudiés pour chacune des catégories précédemment définies. L'objectif est d'améliorer nos connaissances sur les structures androgéniques produites chez le blé en culture de microspores afin d'améliorer l'efficacité de la technique lors d'expérimentations ultérieures.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Trois génotypes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ont été étudiés : deux génotypes de blé d'hiver, Paledor et Premio, et un génotype de blé de printemps, Pavon.

Les semis ont été réalisés en chambre de culture en conditions contrôlées selon les paramètres suivants : une température de 19°C jour et de 17°C nuit, une photopériode de 16 h et une humidité relative de 70 %. Une semaine après le semis, les jeunes plants de blé d'hiver ont été vernalisés 56 jours à 4°C avec une photopériode de 12 h. Ils ont ensuite été cultivés jusqu'à épiaison dans les conditions décrites dans le chapitre 2 pour le génotype Pavon.

2. Cultures de microspores isolées.

Les épis ont été cueillis lorsque la majorité des microspores était au stade uninucléé centré à tardif. Le stade de développement des microspores a préalablement été vérifié en microscopie par coloration DAPI (Canonge et al., 2020).

Les épis ont ensuite été placés dans des pots contenant de l'eau stérile à 4°C pendant 21 jours à l'obscurité. L'eau a été régulièrement renouvelée pour éviter les contaminations. À l'issue de ce prétraitement, les épis ont été stérilisés et broyés afin de libérer les microspores qui ont été mises en culture selon la méthode décrite dans le chapitre 2.

Après 30 ± 3 jours de culture *in vitro*, les structures androgéniques ont été repiquées sur un milieu de régénération (Murashige and Skoog, 1962) et cultivées à 25°C avec une photopériode de 16 h. Le rendement en structures androgéniques produites pour chaque culture de microspores est exprimé pour 10 000 microspores.

Après deux mois de culture sur milieu de régénération, les plantules chlorophylliennes et albinos ont été dénombrées afin de calculer les différents taux de régénération. Ainsi le taux de régénération en plantules chlorophylliennes correspond au nombre de plantules chlorophylliennes régénérées par rapport au nombre de structures androgéniques repiquées. Le taux de régénération totale en plantules et le taux de régénération en plantules albinos sont exprimés de la même façon.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont été générés à partir d'un dispositif expérimental comprenant quatre répétitions biologiques pour les cultures de microspores de Pavon et Paledor, et sept répétitions biologiques pour le génotype Premio.

3. Caractérisation morphologique des structures androgéniques de blé

Les cultures de microspores isolées ont été observées régulièrement tout au long du processus d'androgénèse. Ces observations, effectuées tous les 2 à 4 jours, ont été réalisées stérilement grâce à l'utilisation d'un microscope inversé (Olympus CKX41).

À l'issue du prétraitement, le taux d'induction des microspores a été calculé, et correspond au nombre de microspores en étoile par rapport à la population totale de microspores.

Différentes structures multicellulaires ont été observées de 21 jours à 30 jours de culture afin de caractériser leur morphologie et la voie de développement empruntée. Ces observations ont permis de définir les catégories morphologiques de structures androgéniques produites chez le blé présentées dans la partie « Résultats ».

Après 30 jours de culture *in vitro*, au moment du repiquage, plusieurs structures de chaque catégorie ont été prélevées et colorées au DAPI afin de visualiser les noyaux des cellules, les différents types cellulaires et l'architecture des tissus. Pour cela, les structures androgéniques ont été incubées pendant 3 heures dans un mélange de milieu de culture et de DAPI (4 mg/L – 10 % v/v) avant observation au microscope à fluorescence (Olympus BH-2). Les observations des structures androgéniques à différents stades de développement effectuées en microscopie à fluorescence par coloration au DAPI et présentées en Figure 3 ont été réalisées par superposition de 15 à 20 images capturées sur différents niveaux de champs (caméra Lumenera – Infinity 3).

Les repiquages ont été réalisés sous loupe binoculaire (Nikon SMZ745). Les structures de même morphologie ont été regroupées dans une même boîte de Pétri (Sarstedt – diamètre 90 mm), à raison de 50 structures par boîte maximum. La proportion de structures androgéniques produites pour chacune de ces catégories a pu être calculée pour chaque culture de microspores.

4. Analyses statistiques

Pour les cultures de microspores des génotypes Pavon et Paledor, 4 répétitions biologiques ont été effectuées, tandis que 7 répétitions biologiques ont été réalisées pour Premio en raison de la faible proportion de structures androgéniques produites chez ce génotype. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R, version 4.0.3, interface R Commander. Les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par le test DSH de Tukey ($p < 0,05$).

Tableau 1 : Réactivité des trois géotypes de blé étudiés.

Pour chacun des géotypes, la réactivité des microspores mises en culture est définie par les cinq indicateurs suivants. Le taux d'induction correspond au nombre de microspores en étoile par rapport à la population totale de microspores, et est exprimé en pourcentage. Le rendement en structures androgéniques est exprimé en nombre de structures produites pour 10 000 microspores. Les taux de régénération totale en plantules, en plantules chlorophylliennes et en plantules albinos, correspondent au nombre de plantules régénérées par rapport au nombre de structures androgéniques en culture. Les lettres indiquent une différence significative entre les trois géotypes pour un même indicateur (Test de Tukey – $p < 0,05$).

	Pavon	Paledor	Premio
Taux induction	35,9 ^a ± 2,4	38,5 ^a ± 3,6	49,2 ^b ± 6,6
Rendement en structures androgéniques	7,1 ^a ± 2,8	2,3 ^a ± 0,5	0,4 ^b ± 0,1
Taux de régénération totale en plantules	54,8 ^a ± 4,0	12,6 ^b ± 5,4	0,7 ^c ± 0,7
En plantules chlorophylliennes	17,9 ^a ± 3,3	0,0 ^b	0,0 ^b
En plantules albinos	36,9 ^a ± 4,7	12,6 ^b ± 5,4	0,7 ^b ± 0,7

Résultats

1. Les génotypes de blé étudiés présentent une réactivité contrastée.

En androgénèse, l'application d'un stress inducteur permet de réorienter le développement des microspores vers une voie sporophytique, pouvant mener théoriquement à la production de milliers de plantules haploïdes. Cependant, différents événements et blocages se produisant au niveau des cellules durant la culture *in vitro* réduisent considérablement ce rendement en pratique. Ainsi, même si la plupart des microspores sont réorientées, une majorité d'entre elles meurent, et une autre partie poursuit son développement en pollen. Parmi les microspores réorientées, seulement une minorité se divise activement et se développe en structures androgéniques. De la même manière, ces structures possèdent un potentiel de régénération en plantules limité : certaines produisent avec succès une plantule tandis que les autres dégènèrent. Enfin, chez les céréales, et notamment chez le blé, une forte proportion de plantules albinos est produite en androgénèse, accentuant les limites de la technique en production. Dans cette étude, la réactivité des génotypes de blé est caractérisée selon quatre paramètres : (1) le pourcentage de microspores induites après le prétraitement, (2) le rendement en structures androgéniques, (3) le taux de régénération totale en plantules et, (4) le taux de régénération en plantules chlorophylliennes.

Le pourcentage de microspores induites a été calculé à l'issue du prétraitement, il correspond au pourcentage de microspores en étoile par rapport à la population totale. L'utilisation de ce paramètre en tant qu'indicateur de la réorientation des microspores a été démontré dans le chapitre 2. Le pourcentage de microspores induites de Pavon est de 35,9 % (Tableau 1). Après 30 ± 3 jours de culture *in vitro*, le nombre de structures androgéniques produites a été compté, permettant de calculer le rendement pour 10 000 microspores. Chez Pavon, on observe un bon rendement de production en structures androgéniques, soit 7 structures produites pour 10 000 microspores mises en culture en moyenne. 54,8 % de ces structures androgéniques ont régénéré une ou plusieurs plantules, dont 17,9 % de plantules chlorophylliennes.



Figure 2 : Libération d'une structure multicellulaire de sa paroi initiale : burst de l'exine. **A.** Structure multicellulaire entourée par la paroi initiale d'exine ; **B.** Rupture de la paroi d'exine et début de la libération de la structure multicellulaire en dehors de la paroi initiale ; **C.** Structure multicellulaire totalement dégagée de la paroi d'exine (p) ; **D.** Structure androgénique précoce. Observations réalisées en microscopie visible.

Le génotype Paledor présente un pourcentage d'induction similaire à celui observé chez Pavon (Tableau 1). Néanmoins, il a produit trois fois moins de structures androgéniques par rapport à ce génotype, soit 2,3 structures produites pour 10 000 microspores, sans que cette différence ne soit significative. Chez Paledor, 12,6 % des structures androgéniques régénèrent des plantules mais aucune n'est chlorophyllienne.

Le pourcentage d'induction du génotype Premio est significativement supérieur à ceux des deux autres génotypes, avec 49,2 % de microspores induites à l'issue du prétraitement (Tableau 1). Cependant, Premio a produit très peu de structures androgéniques au cours de la culture des microspores, avec moins de 1 structure produite pour 10 000 microspores. Parmi ces structures, une seule a régénéré une plantule (0,07 %), qui était albinos.

Ces quatre paramètres nous permettent de qualifier les trois génotypes de blés étudiés en fonction de leur réactivité générale en androgénèse. Pour le génotype de blé de printemps Pavon, le rendement en structures androgéniques est élevé et de bons taux de régénération totale en plantules et en plantules chlorophylliennes sont obtenus. Malgré une induction des microspores similaire ou supérieure à Pavon, les deux génotypes de blé d'hiver, Paledor et Premio, présentent une faible production de structures androgéniques, et une absence de régénération de plantules chlorophylliennes. Chez Premio, le rendement en structures androgéniques est très faible. Ces faibles réactivités reflètent la récalcitrance des génotypes de blé d'hiver en androgénèse.

2. La caractérisation morphologique des structures androgéniques révèle deux voies principales de développement.

Au cours de la culture *in vitro*, les microspores réorientées vers la voie de développement sporophytique se divisent activement. Elles forment des structures multicellulaires (Figure 2A), enclavées dans un premier temps dans la paroi d'exine. Ces structures sont ensuite libérées de la paroi initiale après 14 à 21 jours de culture *in vitro* (Figures 2B et 2C), puis leur taille augmente de manière importante ($\approx 150 \mu\text{m}$). Les structures ne présentent aucune architecture ou organisation particulière à ce stade de développement (Figure 2D).

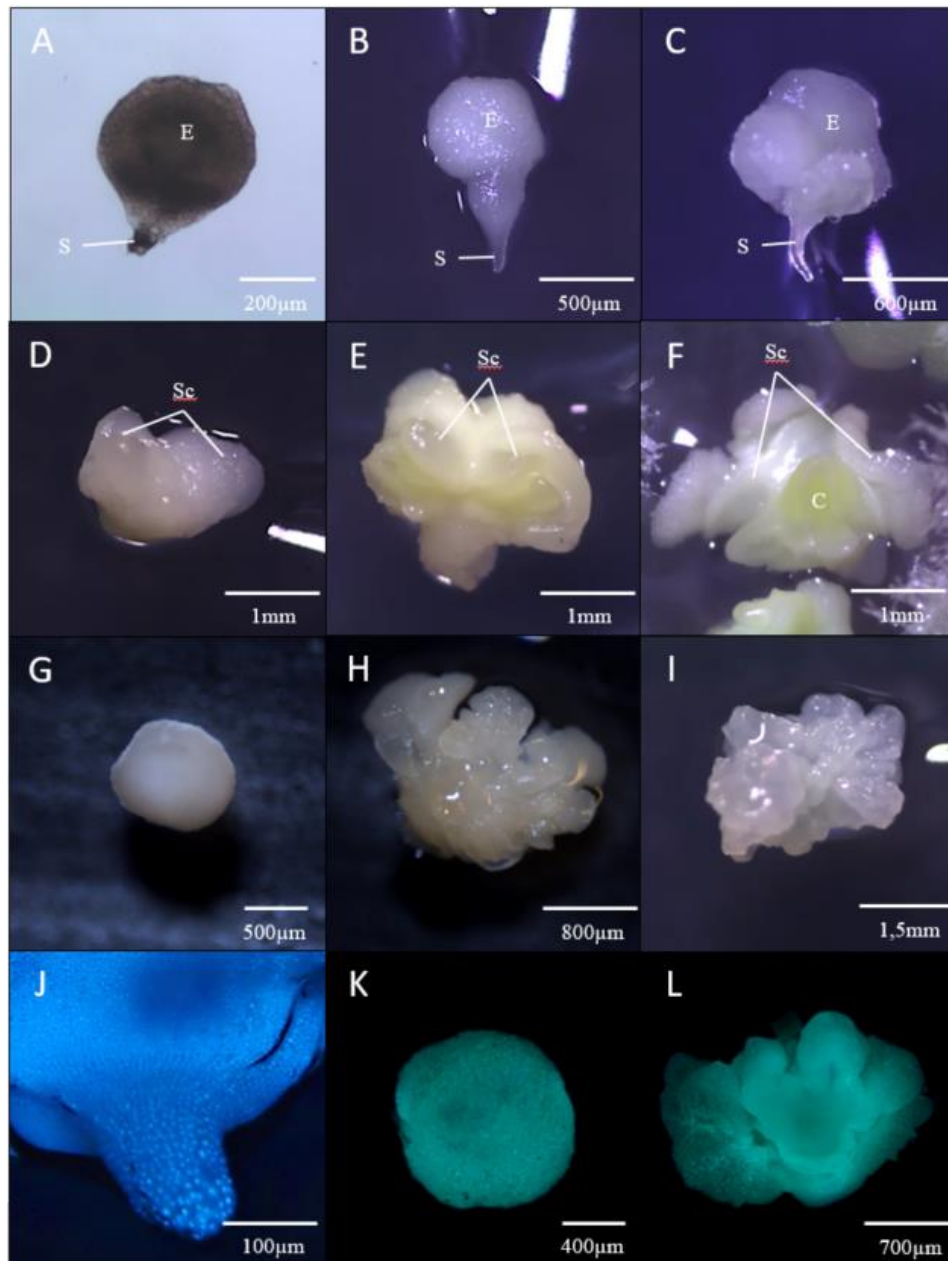


Figure 3 : Structures androgéniques observées en culture de microspores isolées de blé.

Observations à la loupe binoculaire des structures androgéniques présentant un développement de type embryogénèse (A à F) ou de type callogénèse (G à I) : **A.** Début de polarisation de la structure androgénique avec émergence d'un organe de type suspenseur (S) à l'opposé de la partie embryonnaire (E) ; **B.** Structure androgénique au stade transition, ayant acquis une polarité embryon-suspenseur marquée ; **C.** Croissance accrue de la partie embryonnaire, correspondant au stade 1 du développement zygotique ; **D.** Apparition et mise en place des scutellum (Sc) qui entourent complètement l'embryon initial ; **E.** Développement et croissance des scutellum ; **F.** Apparition du coléoptile (C) au centre de la structure androgénique, cet organe est facilement repérable grâce à sa coloration naturelle jaune à vert clair ; **G.** Structure androgénique de forme ronde, compacte et homogène d'une taille d'environ 1mm ; **H** et **I.** Structures androgéniques présentant une ramification importante selon différents pôles de croissance aléatoires.

Observations en microscopie par coloration au DAPI (J à L) : **J.** Organe de type suspenseur composé de cellules présentant une vacuolisation importante ; **K.** Structure androgénique composée d'un seul type cellulaire homogène ; **L.** Structure androgénique ramifiée présentant divers pôles de croissance composés d'un seul type de cellules.

À 21 jours de culture *in vitro*, les structures androgéniques atteignent une taille variant de 200 à 500 μm . À ce stade, les structures observées présentent deux types de morphologie différentes. La première classe morphologique est caractérisée par une forme ovoïde, les cellules du pôle basal présentent une vacuolisation importante, non visible dans les cellules du pôle apical (Figure 3A). Ce type cellulaire, observable sur la Figure 3J, semble correspondre aux cellules composant l'organe suspenseur de l'embryon zygotique *in vivo*. La polarité apicale-basale correspond au 1^{er} patron de développement embryon-suspenseur. Au cours de la culture *in vitro*, un développement important du pôle apical et une élongation du pôle basal ont lieu (Figure 3B). De telles structures sont semblables au zygote au stade transition (Figure 1). Par la suite, le pôle apical poursuit son développement contrairement au pôle basal. Le ratio embryon-suspenseur est de 2/3 pour la partie embryonnaire (Figure 3C). Ce stade de développement est assimilable au stade 1 du développement zygotique (Figure 1). La partie correspondant au suspenseur dégénère progressivement tandis que la partie embryonnaire connaît une croissance renforcée avec l'apparition de 2 à 3 pôles de développement en périphérie (Figures 3D et 3E). Ces pôles adoptent une organisation cellulaire précise, leurs cellules présentent un espace intercellulaire très réduit, et enveloppent finalement la partie embryonnaire initiale. Ces pôles de croissance sont facilement observables et caractérisables à la loupe binoculaire par leur aspect lisse et brillant. Ils sont comparables au scutellum observé lors du développement zygotique *in vivo*, qui entoure lui-aussi l'embryon initial. Ces structures ont une taille généralement comprise entre 1 et 3 mm. Enfin, un organe apparenté au coléoptile se développe au centre des structures les plus développées (Figure 3F). Lors de l'étape de régénération des plantules, on peut observer l'émergence du premier primordium foliaire à partir de cet organe (non illustré).

Dans la seconde classe de structures androgéniques caractérisées, aucune polarisation n'est visible au cours du développement. Leurs cellules ont toutes une morphologie similaire et aucune vacuolisation n'est observée (Figure 3K). Certaines de ces structures sont de forme ronde, homogène et compacte, et présentent une taille moyenne de 1 mm (Figure 3G). Les autres présentent des ramifications plus ou moins importantes, correspondant à différents axes de croissance de type prolifératif (Figure 3H et 3I). Grâce aux observations en microscopie par coloration au DAPI, nous avons pu mettre en évidence l'absence d'organisation structurée des cellules dans les pôles de croissance ainsi que l'absence de cellules différenciées

Tableau 2 : Établissement des 10 catégories définissant les structures androgéniques de blé en fonction de leur morphologie.

Type de développement	Taille	Morphologie - Organe visible		Catégorisation finale
CLS	1mm	Rond	→	Rond – 1mm
	2mm	Ramifié		Ramifié – 1mm
				Ramifié – 2mm
3mm		Ramifié – 3mm		
ELS	1mm	Stade transition		Transition – 1mm
		Stade 1		Stade 1 – 1mm
		Scutellum		Scutellum – 1mm
	2mm			Scutellum– 2mm
	3mm	Coléoptile		Scutellum – 3mm
				Coléoptile– 3mm

(Figures 3K et 3L). Ces différentes caractéristiques nous permettent donc d'assimiler cette seconde voie de développement à un développement de type callogénèse.

Lors de la culture *in vitro* des microspores de blé, nous avons détecté grâce aux observations en microscopie des anomalies de développement au sein des ELS et CLS produits. Des ELS-jumeaux et des ELS présentant des organes multiples ont été observés au sein des cultures des trois génotypes de blé étudiés, ainsi que des structures filamenteuses. Ces structures présentant des anomalies de développement n'ont pas été prises en compte pour la suite de l'étude et le calcul des rendements de chaque génotype.

Deux voies de développement ont donc été observées à partir des microspores de blé. La première présente les caractéristiques d'un développement embryogénique avec un premier axe de polarité embryon-suspenseur qui se met en place à partir de 21 jours de culture, puis le développement de différents organes : suspenseur, scutellum et coléoptile, également observés chez le zygote. Les microspores induites empruntant cette voie de développement mènent à la production de structures de type embryon ou ELS. La seconde voie de développement ne présente aucune caractéristique embryogénique et aboutit à la production de structures sans organisation ni architecture précisément définies. Ces structures suivent un développement de type callogénèse et sont donc qualifiées de CLS ou structures de type cal.

3. Les trois génotypes de blé présentent des profils de production en structures androgéniques hétérogènes.

Après 30 ± 3 jours de culture, au moment de la subculture sur milieu de régénération, les structures androgéniques ont été caractérisées en fonction de 3 paramètres : le type de développement observé (ELS vs CLS), la taille, et la forme générale de la structure – ou la présence d'organe caractéristique dans le cas des ELS (Tableau 2). Les structures androgéniques de blé ont ainsi été réparties en 10 catégories morphologiques présentées dans le tableau 2. Les 6 catégories d'ELS correspondent à l'évolution du développement de l'embryon, du stade de transition, au développement de scutellum, jusqu'à l'émergence du coléoptile.

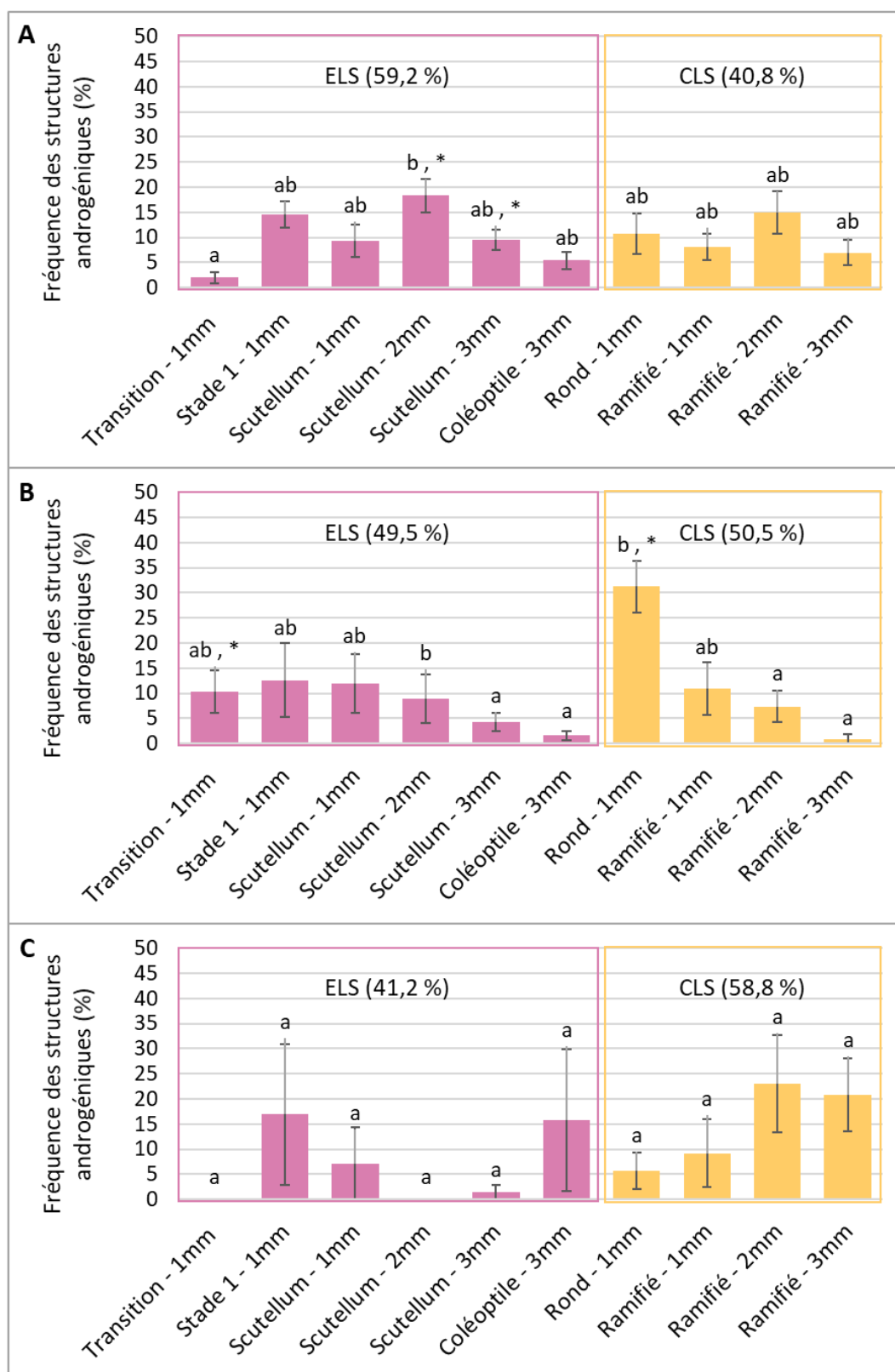


Figure 4 : Fréquence des structures androgéniques au sein des dix catégories établies pour les génotypes Paven (A), Paledor (B) et Premio (C). Pour chaque génotype, les fréquences moyennes des deux types de développement, ELS et CLS, sont mentionnées entre parenthèse. Pour un même génotype, les pourcentages présentant la même lettre ne sont pas significativement différents. Pour une même catégorie de structures androgéniques, les pourcentages présentant un astérisque sont significativement différents des autres génotypes. (Test de Tukey, $p < 0,05$)

Le génotype de blé de printemps Pavon est le seul génotype à avoir produit significativement plus d'ELS (59,2 %) par rapport aux CLS (40,8 %). Parmi les structures de type embryonnaire, les ELS de type scutellum de 2 mm sont la catégorie la plus représentée, soit environ 18 % de la population totale (Figure 4A). À l'inverse, le stade transition est la catégorie la moins représentée avec moins de 2 % des structures produites, signe du stade de développement assez avancé des ELS produits par Pavon après 30 jours de culture *in vitro*.

Les structures androgéniques de petite taille représentent la majorité des structures produites chez Paledor, tout type de développement confondu (Figure 4B). Parmi ces structures d'environ 1 mm, les CLS ronds sont très majoritairement produits et représentent environ 30 % de la population totale. À l'inverse, les ELS de type coléoptile et les CLS de type ramifiés de 3 mm sont les structures les moins produites dans les cultures de microspores de Paledor, avec des proportions inférieures à 2 % et 1 % respectivement

Pour le génotype Premio, nous avons observé une très forte hétérogénéité au niveau des proportions de chaque catégorie de structures androgéniques produites entre les différentes répétitions biologiques de culture de microspores. Cette hétérogénéité se traduit par des écart-types importants, représentés par les barres d'erreur dans la figure 4C. En moyenne, les différentes catégories de structures androgéniques ont donc été produites en proportions relativement équivalentes, aucune différence significative n'a pu être mise en avant. Aucun ELS au stade transition ou de type scutellum de 2 mm n'a été obtenu pour ce génotype après 30 jours de culture (Figure 4C). Cependant, ces deux catégories d'ELS ont bien été observées dans au moins une des cultures de microspores de ce génotype, mais à une date postérieure.

En comparant les proportions de structures androgéniques produites entre les trois génotypes, nous avons pu mettre en évidence des différences significatives. Pavon produit des ELS de type scutellum 2 et 3 mm en proportions plus importantes, tandis que Paledor produit significativement plus de CLS rond de 1mm, par rapport aux deux autres génotypes (Figure 4).

Les 10 catégories morphologiques de structures androgéniques définies précédemment ont toutes été observées au sein des cultures de microspores des trois génotypes étudiés. Cependant, ces trois génotypes présentent des profils hétérogènes au

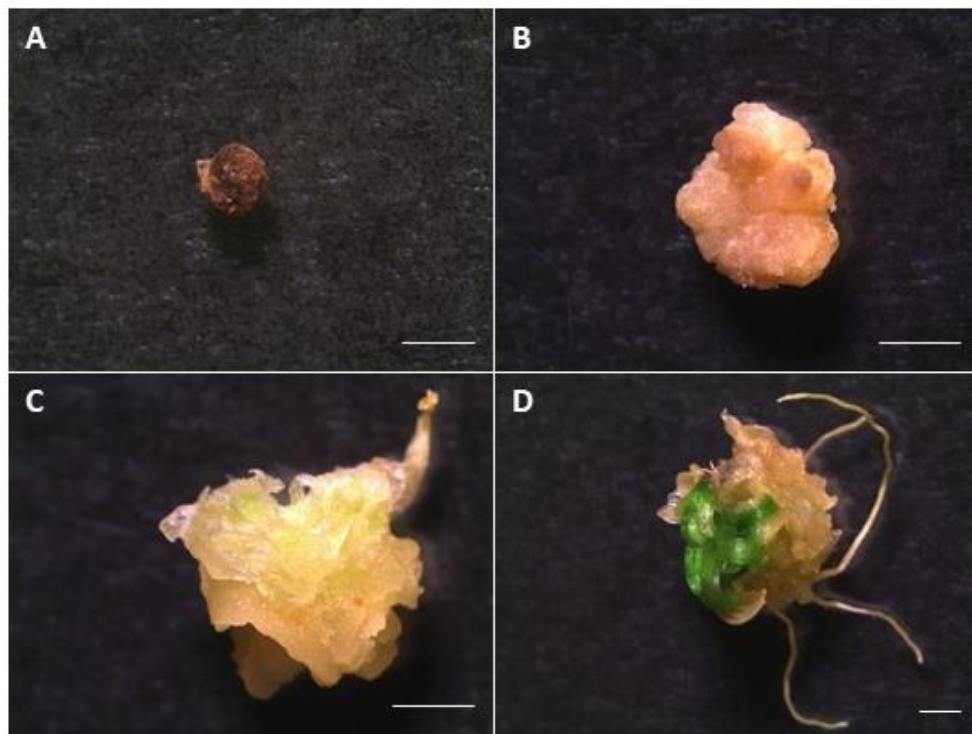


Figure 5 : Anomalies de développement des structures androgéniques observées lors de la subculture sur le milieu de régénération. **(A)** Nécrose d'un ELS au stade 1 ; **(B)** Structure de type CLS ayant poursuivi un développement de type callogénèse puis dégénéré au cours de la subculture; **(C)** Développement de type callogénèse d'une structure de type ELS ; **(D)** Arrêt précoce du développement d'une structure de type ELS lors de la différenciation des premières ébauches foliaires et racinaires. Barre = 1 mm

niveau des proportions produites pour chacune de ces catégories. Le type de structures androgéniques majoritairement produit varie d'un génotype à l'autre, tant au niveau du type de développement observé qu'au niveau de la taille ou du stade. Ces différences sont très marquées entre les trois génotypes étudiés, mais également entre les deux génotypes de blé d'hiver, alors que les mêmes modalités de prétraitement et les mêmes conditions de culture *in vitro* ont été appliquées. Cela peut être dû à une réponse différente des génotypes face au stress, aux conditions de culture, ou aux propriétés intrinsèques du génotype lui-même.

4. La capacité de régénération en plantules semble être liée au stade de développement des structures androgéniques.

La capacité de conversion en plantules a été étudiée pour chacune des 10 catégories de structures androgéniques et comparée entre les génotypes. Pour les trois génotypes de blé étudiés, une proportion non négligeable de structures androgéniques n'a régénéré aucune plantule. Parmi ces ELS et CLS, certains ont montré des signes de dégénérescence suivie d'une nécrose des tissus lors de la subculture sur milieu de régénération (Figure 5A). Des aberrations de développement ont également été observées. Plusieurs CLS ont conservé un état indifférencié et poursuivi un développement de type callogénèse (Figure 5B). Certains ELS, notamment chez le génotype Premio, se sont dédifférenciés pour former des cals après transfert sur milieu de régénération (Figure 5C). Certains ELS et CLS ont entamé une conversion en plantule, avec la différenciation des premières ébauches foliaires, mais leur développement s'est arrêté précocement, ne permettant pas la régénération d'une plantule complète (Figure 5D). Enfin, certains ELS ont développé un système racinaire sur le milieu de régénération mais aucun appareil aérien ne s'est différencié. Toutes ces anomalies de développement entrent dans la catégorie « absence de régénération » pour le traitement des données.

Pour le génotype Premio, les taux de régénération obtenus sont très faibles (0,07 %), ce génotype n'a donc pas été étudié dans cette partie. Le génotype de blé de printemps est le seul à avoir généré des plantules chlorophylliennes, Pavon et Paledor seront donc comparés sur la base de leurs taux de régénération totale en plantules.

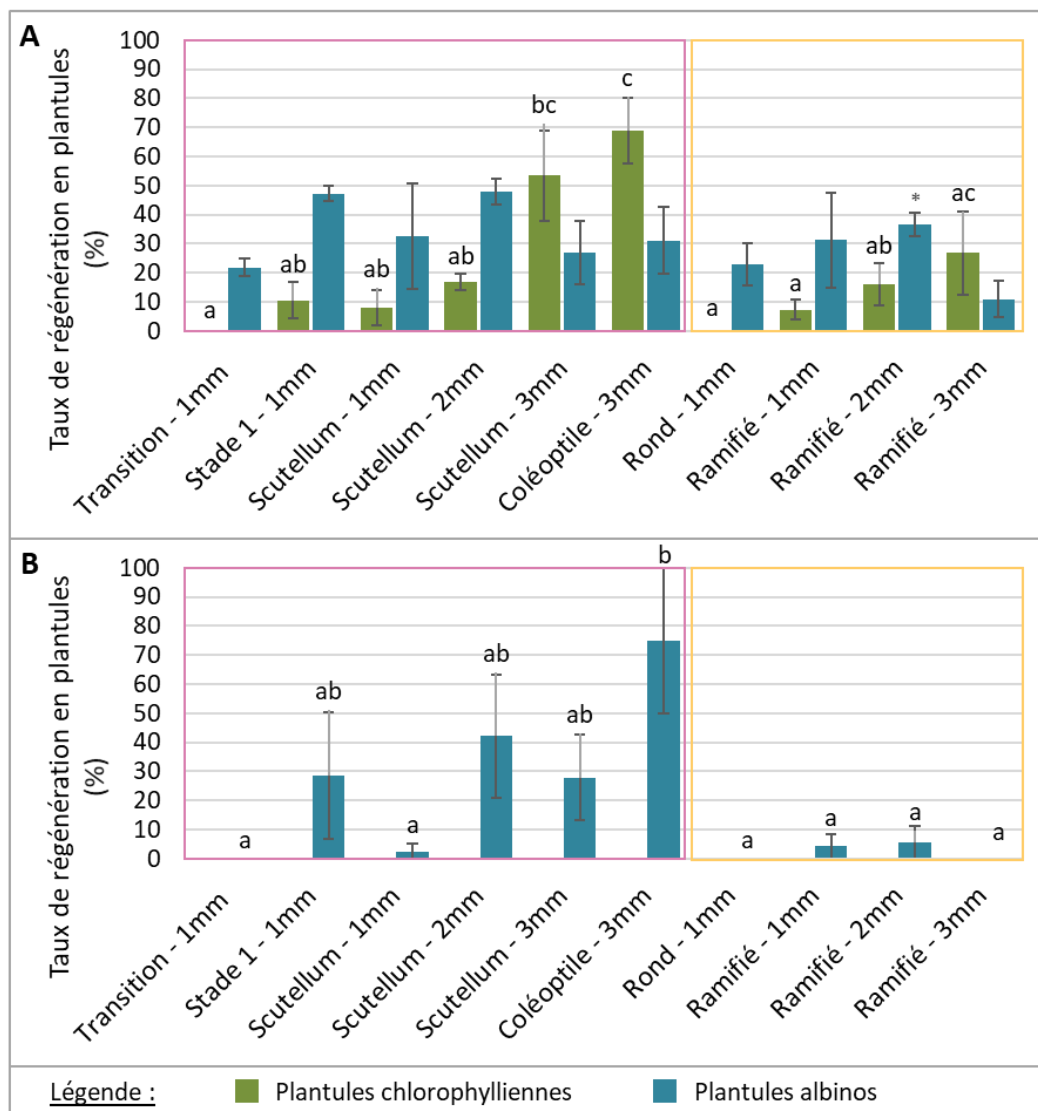


Figure 6 : Taux de régénération en plantules des 10 catégories de structures androgéniques observées pour les génotypes Pavon (A) et Paledor (B). Les cadres de couleur matérialisent les catégories de structures androgéniques appartenant au ELS (rose) ou CLS (jaune). Pour un même génotype, les pourcentages présentant la même lettre ne sont pas significativement différents. Pour une même catégorie de structures androgéniques, les pourcentages présentant un astérisque sont significativement différents des autres génotypes (Test de Tukey, $p < 0,05$).

De façon générale, les structures de type ELS de grande taille (3 mm) sont celles qui présentent les meilleurs taux de régénération totale en plantules pour les deux génotypes (Figures 6A et 6B). Plus précisément, 75 % des structures au stade coléoptile ont régénéré une plantule chez Paledor (Figure 6B). Ce taux est significativement inférieur à celui du génotype Pavon, dont les ELS au stade coléoptile ont régénéré 100 % de plantules, avec presque 70 % de chlorophylliennes (Figure 6A). Les ELS de type scutellum 2 et 3 mm possèdent un taux de régénération totale en plantules plus élevé chez le génotype Pavon par rapport à Paledor. Or, lorsqu'on s'intéresse uniquement à la régénération en plantules albinos, les taux sont similaires entre les deux génotypes, avec environ 45 % de plantules albinos régénérées pour les ELS de type scutellum 2 mm et 27 % pour les ELS de type scutellum 3mm. Ces différences significatives sont donc liées à la récalcitrance de Paledor, qui ne produit aucune plantule chlorophyllienne, contrairement au génotype de blé de printemps Pavon.

Les CLS de type ramifié de 3 mm de Paledor n'ont régénéré aucune plantule, contrairement au génotype Pavon (Figures 6A et 6B). Mais cette catégorie est très faiblement représentée chez Paledor : moins de 1 % de la population, et n'a été observée que sur une seule répétition biologique, ce qui ne nous permet pas de conclure quant à la régénération de ce type de structure, pour ce génotype. Enfin, chez le génotype Paledor, les structures de petite taille et/ou présentant le stade de développement le moins avancé, n'ont pas la capacité de régénérer une plantule (Figure 6B). Ces mêmes structures ont uniquement produit des plantules albinos chez Pavon, elles ne possèdent donc pas la capacité d'être converties en plantules chlorophylliennes.

Au sein des structures présentant un développement de type embryogénique, plus l'ELS est à un stade de développement avancé, plus il semble posséder une capacité élevée de régénération totale en plantules, et de régénération chlorophyllienne pour le génotype Pavon. L'inverse semble également vrai.

En conclusion, les structures de type ELS de 3 mm, et notamment le stade coléoptile, possèdent la meilleure capacité de régénération totale en plantules pour les deux génotypes, mais également en plantules chlorophylliennes pour Pavon. À l'inverse les structures de petite taille ont une capacité de conversion en plantule très faible voire inexistante. Il semble donc préférable de prioriser la subculture sur milieu de régénération des structures androgéniques de taille supérieure ou égale à 2 mm, et d'adapter les conditions de prétraitement et/ou de

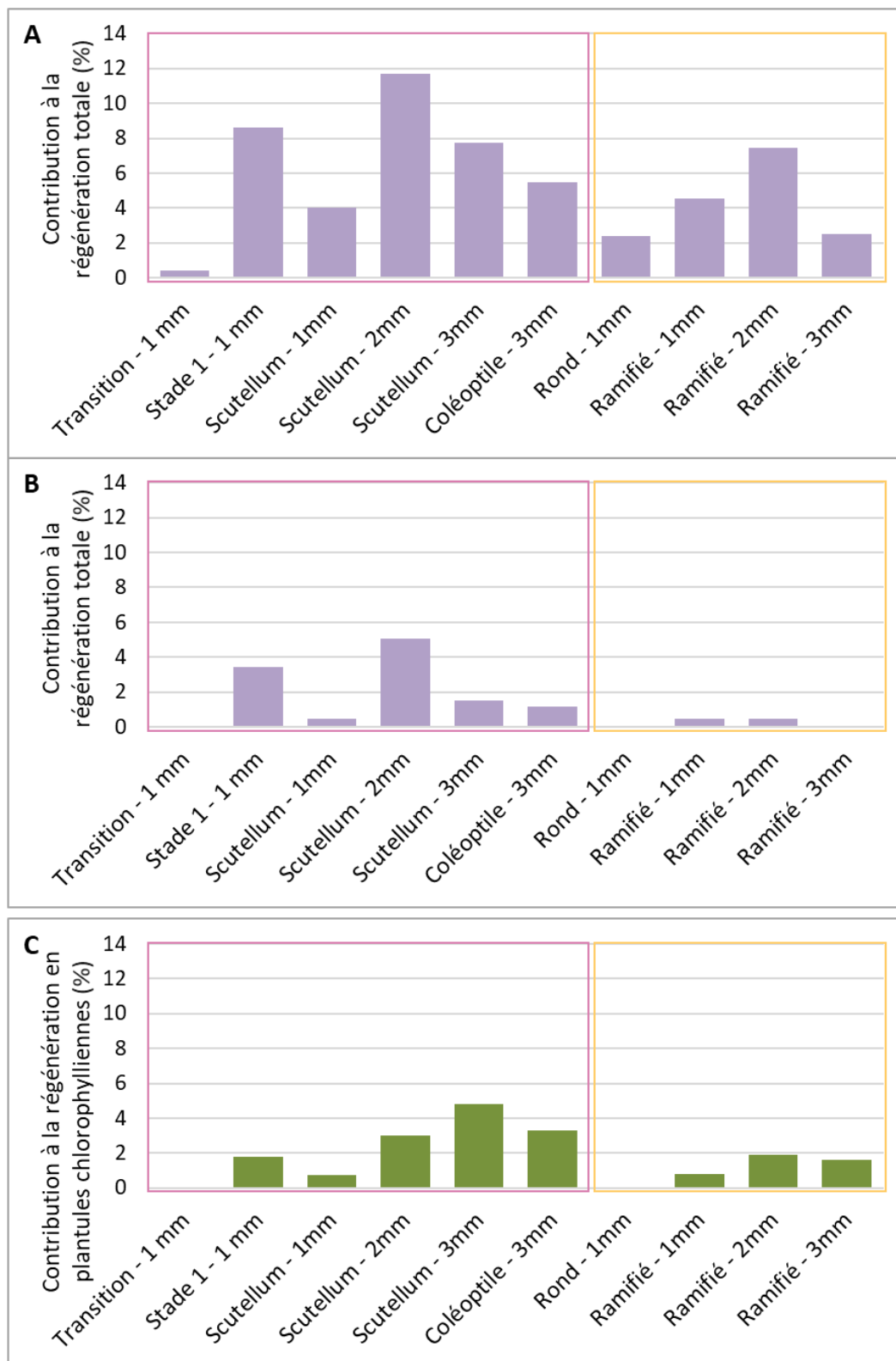


Figure 7 : Contribution des structures androgéniques à la régénération en plantules. (A et B) Contribution des différentes catégories de structures androgéniques à la régénération totale en plantules pour les génotypes Pavon (A) et Paledor (B) ; (C) Contribution des différentes catégories de structures androgéniques à la régénération en plantules chlorophylliennes pour le génotype Pavon. Les histogrammes violets correspondent aux plantules totales, les histogrammes verts aux plantules chlorophylliennes. Les cadres rose et jaune symbolisent les structures de type ELS ou CLS, respectivement.

culture *in vitro* pour favoriser la production de ce type de structures pour améliorer les rendements en androgénèse chez le blé.

5. Les structures de type ELS contribuent majoritairement à la régénération en plantules chez le blé

Nous présentons ici l'impact combiné des deux paramètres étudiés précédemment sur le rendement en plantules régénérées par la technique de culture de microspores isolées chez le blé. Par cette approche, nous tentons d'identifier de façon précoce les structures les plus productives, tant en terme de fréquence d'obtention, qu'en terme de régénération en plantules.

Au total, environ 55 % des structures androgéniques de Pavon et 13 % des structures de Paledor ont régénéré des plantules (Tableau 1). Parmi toutes les structures androgéniques produites, les structures de type ELS contribuent de manière majoritaire à la régénération totale en plantules pour les deux génotypes. En effet, 69 % des plantules de Pavon et 93 % des plantules de Paledor proviennent d'une structure de type ELS. Pour ces deux génotypes, les trois catégories de structures contribuant le plus à la régénération totale en plantules sont identiques, à savoir les ELS « Stade 1 », « Scutellum 2 mm » et « Scutellum 3 mm ». Même si nous avons vu précédemment que les ELS de type coléoptile régénèrent très souvent des plantules, leur faible représentation dans l'ensemble des structures androgéniques produites n'en fait pas la structure la plus productrice de plantules, au global.

Les structures androgéniques de taille inférieure à 2 mm (les CLS de type rond et ramifié 1 mm et les ELS au stade transition, stade 1 et de type scutellum 1 mm) sont les structures ayant la capacité de régénération la plus faible pour les deux génotypes Pavon et Paledor (Figure 7). Lorsque l'on croise leurs fréquences au sein de la population totale à leurs taux de régénération totale en plantules, on s'aperçoit qu'elles contribuent tout de même à 19,9 % de la régénération totale en plantules chez Pavon et 4,4 % chez Paledor. Si on ne conserve pas les structures androgéniques d'une taille inférieure à 2mm lors de la subculture sur le milieu de régénération, cela représenterait une perte de 109 plantules pour le génotype Pavon et de 6 plantules pour le génotype Paledor, pour 1000 structures androgéniques.

Contrairement aux génotypes de blé d'hiver le génotype de blé de printemps Pavon a produit des plantules chlorophylliennes. Pour ce génotype, 17,88 % des structures androgéniques ont généré des plantules chlorophylliennes. Les structures androgéniques de type ELS sont les structures contribuant le plus à cette régénération : plus de 75 % des plantules chlorophylliennes régénérées proviennent d'un ELS. Les trois catégories contribuant de façon majoritaire à cette régénération sont les ELS « Scutellum 3 mm », « Coléoptile » et « Scutellum 2 mm », qui régénèrent, respectivement, 4,8 %, 3,3 % et 3% sur les 17,88 % de plantules chlorophylliennes produites chez le génotype Pavon. Chez le génotype de printemps, des plantules chlorophylliennes sont régénérées à la fois à partir des ELS et des CLS, en proportion non négligeable (environ 4% sur les 17,9% de plantules chlorophylliennes régénérées). Cela indique que le processus de régénération de plantules chlorophyllienne ou albinos est complexe, et ne peut pas être associé à un type de développement dans les cultures de microspores de blé.

La synthèse des données de production des catégories de structures androgéniques avec leurs taux de régénération respectifs a permis de mettre en évidence les catégories les plus intéressantes au sein de la population totale pour la production de plantules, à savoir les ELS au stade 1, les ELS de type scutellum de 2 et 3 mm et les ELS au stade coléoptile. Néanmoins, il n'est à l'heure actuelle pas possible de déterminer par avance, au sein de ces catégories, quelles sont les structures qui régénéreront des plantules chlorophylliennes. La production de ces types de structures doit donc être favorisée chez le blé, en optimisant les conditions de prétraitement et de culture *in vitro*, pour améliorer les rendements globaux en androgénèse.

Discussion

Au-delà d'une méthode de production de plantes HD, la culture de microspores isolées constitue un modèle d'intérêt pour l'observation cytologique directe des stades de l'embryogénèse. En effet chez de nombreuses espèces modèles (Maraschin et al., 2005; Seldimirova et al., 2017; Testillano et al., 2002), le processus de développement des microspores en androgénèse a montré de nombreuses similarités avec le développement du zygote *in planta*, et permet en outre de s'affranchir des barrières physiques telles que la graine et l'endosperme. Cependant, le développement embryogénique des microspores n'est pas la seule voie de développement observée *in vitro* chez bon nombre d'espèces. Ainsi au sein des cultures de microspores isolées de colza (Rivas-Sendra et al., 2017), de maïs (Massonneau et al., 2005), d'orge (Castillo et al., 2000) et de seigle (Ma et al., 2004b), des structures de type cals sont également produites à partir des microspores.

Chez le blé, les études se sont souvent focalisées sur les phases précoces du développement des microspores en androgénèse (Bonet and Olmedilla, 2000; Indrianto et al., 2001) plutôt que sur le type de structures androgéniques produites. Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence deux voies de développement majeures dans les cultures de microspores isolées de blé, permettant la production d'ELS d'une part, et de CLS d'autre part. Chez le blé, les premiers signes de polarisation des structures multicellulaires se traduisent, avant le burst de l'exine, par des différences de taille de cellules (Bonet and Olmedilla, 2000). Après la rupture de la paroi initiale, cette polarisation est marquée par une forte vacuolisation des cellules au pôle basal, ainsi que par des différences spatiales d'accumulation de l'amidon (Indrianto et al., 2001). Nous avons pu mettre en évidence la mise en place du premier patron de développement chez les ELS dès 21 jours de culture, avec la polarité embryon-suspenseur. Le développement d'une structure de type suspenseur a déjà été rapporté dans les cultures de microspores de différentes espèces de Brassicacées (Shumilina et al., 2020; Supena et al., 2008; Yeung, 2002), chez le maïs (Góralski et al., 2005) et le blé (Indrianto et al., 2001; Rybczynski et al., 1991). Différentes morphologies peuvent être observées, allant d'une petite excroissance au pôle basal de l'embryon à un suspenseur bien développé, similaire à celui du zygote (Yeung, 2002). Le suspenseur du zygote permet un positionnement correct au sein de la graine, ainsi que le transport des hormones et nutriments vers l'embryon. Le rôle du suspenseur chez les ELS dérivant de microspores n'a pas encore été élucidé mais sa présence

permettrait une structuration des ELS plus précoce et plus proche de celle du zygote (Soriano et al., 2013; Supena et al., 2008). Nous avons observé la dégénérescence de la structure de type suspenseur au cours du développement des ELS, de la même façon que lors de l'embryogénèse *in planta*. La différenciation et la croissance des ELS observés dans nos cultures de microspores sont similaires à celles décrites par Rybczynski et al. (1991). Leur étude a permis de mettre en évidence le développement embryogénique des microspores de blé, avec la formation d'épiderme et d'une structure de type suspenseur, l'initiation du développement du méristème apical, puis la différenciation du scutellum, l'élongation du coléoptile et l'apparition des premières ébauches foliaires et racinaires. La présence de scutellum chez les ELS dérivant de microspores a également été décrite dans d'autres travaux sur le développement embryogénique des microspores de blé (Seldimirova et al., 2017) et d'orge (Maraschin et al., 2003). Le développement des ELS dans nos cultures de microspores de blé est donc très proche de celui du zygote, et nous avons pu mettre en évidence des stades de développement similaires. En parallèle, des structures de type CLS se sont développées à partir des microspores des trois génotypes de blé étudiés ici. Ces structures ne possèdent aucune polarité, ni organisation cellulaire particulière et montrent une croissance de type prolifératif. Chez l'avoine, la production d'ELS ou de CLS en culture d'anthers semble être dépendante du génotype (Kiviharju et al., 1998). L'étude de 38 génotypes différents cultivés dans les mêmes conditions a révélé la production d'ELS chez 7 d'entre eux, tandis que les autres ont produits des CLS. Les résultats de notre étude semblent montrer que, chez le blé, le génotype n'influence pas aussi nettement le développement des structures androgéniques. En effet, les trois génotypes de blé étudiés ici ont produits des ELS et des CLS de façon concomitante, même si Pavon est le seul génotype à avoir produit significativement plus d'ELS.

En androgénèse, la question fondamentale est de déterminer si les structures dérivant de microspores sont capables d'être converties en plantules. Dans cette étude, nous avons montré que les deux types de développement observés dans les cultures de microspores de blé, ELS et CLS, possèdent la capacité de régénérer une plantule. Néanmoins, cette capacité est beaucoup plus faible chez les CLS, mais pas absente. Les ELS présentant les stades de développement les plus avancés régénèrent significativement plus de plantules pour les génotypes étudiés. Ces résultats permettent de mettre en place des pistes d'amélioration plus ciblées du protocole d'androgénèse chez le blé. Ainsi une première piste serait, pour le

laboratoire de production, d'optimiser le temps passé aux subcultures des structures androgéniques en se concentrant uniquement sur les structures présentant des caractéristiques embryogéniques et d'une taille égale ou supérieure à 2 mm, facilement observable à la loupe binoculaire. Chez le génotype de blé d'hiver Paledor, la majorité des structures androgéniques possédaient une taille d'environ 1 mm et présentaient un stade de développement plus précoce que le génotype Pavon au bout de 30 jours de culture. Il semble que le développement des microspores en structures androgéniques du génotype Paledor est plus lent que celui des microspores du génotype de blé de printemps. Or nous avons démontré que les structures de petite taille ont une faible capacité de régénération en plantule mais sont produites en grande quantité, leur contribution à la régénération globale n'est donc pas négligeable. Une deuxième piste d'amélioration consisterait donc à adapter le timing de subculture sur milieu de régénération en fonction du génotype, et donc, dans le cas de Paledor, à repousser de quelques jours cette étape pour que les structures androgéniques présentent un développement plus avancé et une taille supérieure. Des essais complémentaires ont été menés sur le timing de la subculture sur le milieu de régénération. Un premier transfert des structures androgéniques de taille supérieure à 2 mm a été réalisé à 30 ± 3 jours de culture et a été suivi d'un second transfert, incluant les structures androgéniques au développement plus lent, 7 à 10 jours plus tard. Les résultats ont montré une chute du taux de régénération importante d'environ 50 % pour les structures provenant du second transfert. Cette diminution importante de la capacité des structures androgéniques à régénérer des plantules pourrait être provoquée par le relargage dans le milieu de culture de molécules toxiques issues des ovaires en co-culture ou provenant des structures elles-mêmes. Peu d'éléments sont connus à ce sujet. Notre protocole inclut déjà un renouvellement partiel du milieu de culture, par ajout de milieu frais dans les contenants au bout de 21 jours de culture. Les molécules toxiques accumulées ne sont pas éliminées, elles sont par contre diluées. Un remplacement complet du milieu pourrait être envisagé, mais serait techniquement difficile à mettre en place, et risquerait de déséquilibrer la composition en d'autres molécules essentielles. Prolonger la culture des structures androgéniques de blé en milieu liquide risquerait donc d'être délétère pour la régénération de plantules et n'est finalement pas une bonne option pour améliorer la régénération de ce génotype.

Ces dernières années, beaucoup d'études ont été menées sur l'influence de la composition du milieu de culture pour améliorer la réactivité des espèces et génotypes en androgénèse (Asif et al., 2014; Niazian and Shariatpanahi, 2020; Patel et al., 2004; Testillano, 2019). La balance phytohormonale, notamment entre les deux hormones antagonistes auxine et cytokinine, est un élément clé pour la morphogénèse des plantes dès les stades précoces (Kruglova et al., 2018). De nombreuses études ont par ailleurs rapporté le rôle essentiel des phytohormones exogènes, et notamment l'auxine, dans le déclenchement de l'embryogénèse somatique et le développement de ces embryons *in vitro* (Fehér, 2015; Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016; Smertenko and Bozhkov, 2014). Contrairement à la culture d'anthers, l'initiation de l'embryogénèse en culture de microspores ne nécessite pas l'apport d'hormones exogènes chez la plupart des espèces (Pérez Pérez et al., 2019; Zur et al., 2015). Néanmoins, chez des espèces encore récalcitrantes comme le blé, l'apport de phytohormones dans le milieu de culture et/ou la co-culture d'ovaires sont indispensables à l'induction de l'embryogénèse des microspores et à la production de structures androgéniques (Gorbunova et al., 2001; Lantos et al., 2009; Zheng et al., 2002). Esteves et al. (2014) ont également montré chez l'orge que l'apport de cytokinines exogènes, méta-topoline et thidiazuron, stimulaient fortement la conversion des embryons en plantules et la régénération de plantules chlorophylliennes respectivement. Les phytohormones ne sont néanmoins pas le seul constituant clé des milieux de culture *in vitro* affectant la réactivité des microspores en androgénèse. Des études menées chez l'aubergine ont montré que des conditions de culture non adaptées pouvaient induire ou augmenter significativement la production de CLS dans les cultures de microspores (Corral-Martínez and Seguí-Simarro, 2012, 2014; Seguí-Simarro, 2010). Chez cette espèce, seuls des CLS sont produits en culture de microspores et permettent la régénération de plantules HD. L'ajout de gomme arabique dans le milieu de culture a favorisé le développement d'ELS, mais ceux-ci présentaient des aberrations morphologiques au niveau des méristèmes apicaux (Corral-Martínez and Seguí-Simarro, 2014; Rivas-Sendra et al., 2020b). La gomme arabique est connue pour contenir des arabinogalactanes (AGPs) et des protéines dérivées, molécules impliquées dans la croissance et la différenciation des embryons de maïs en androgénèse (Borderies, 2004). L'ajout de gomme arabique dans le milieu d'induction en culture de microspores de blé a augmenté significativement le nombre d'embryons produits ainsi que la régénération en plantules chlorophylliennes, tout en

diminuant fortement la mortalité des microspores au cours des premiers jours de culture (Letarte et al., 2006). Néanmoins, aucun facteur externe qui a été introduit dans les milieux de culture *in vitro* n'a permis de surmonter totalement le problème de l'albinisme.

Les structures androgéniques produites en culture de microspores isolées présentent les mêmes caractéristiques morphologiques pour les trois génotypes de blé étudiés ici. Malgré cela, nous avons mis en évidence des taux de régénération en plantules chlorophylliennes et albinos très contrastés entre les trois génotypes pour une même catégorie de structure androgénique. De plus, nous avons démontré qu'une même catégorie de structure est capable de régénérer à la fois des plantules chlorophylliennes et des plantules albinos, sans que nous puissions les distinguer au moment de la subculture. La récalcitrance du génotype Paledor à régénérer des plantules chlorophylliennes pourrait donc être provoquée par des modifications ou des anomalies au niveau intracellulaire, cytoplasmique ou génétique, qui n'altèrent ni la morphologie, ni le développement des structures androgéniques produites par ce génotype.

En embryogénèse *in vitro*, par culture d'embryons immatures ou par androgénèse, le problème récurrent est la faible conversion des embryons en plantules, souvent causée par des anomalies et aberrations développementales. Ces défauts de développement affectent fréquemment l'intégrité du méristème apical caulinaire lors des phases moyennes à tardives de l'embryogénèse *in vitro*. Or l'intégrité des différents méristèmes demeure le facteur le plus important pour la régénération de plantules à partir d'embryons ou d'ELS. Dans beaucoup de systèmes de culture *in vitro*, les cellules méristématiques peuvent dégénérer ou se différencier en cellules parenchymateuses et perdre ainsi leur identité méristématique. Cette dégénérescence est initiée par la vacuolisation des cellules et par la formation d'espaces intercellulaires au niveau des méristèmes, entraînant leur désorganisation. Chez les embryons immatures de colza, l'ajout d'un inhibiteur de synthèse de glutathion, le BSO (Buthionine sulfoximine), dans le milieu de culture a montré des effets positifs sur la structure des méristèmes apicaux caulinaires, améliorant ainsi la qualité des embryons obtenus (Stasolla et al., 2008). À l'inverse, une concentration trop élevée en sucre métabolisable dans le milieu de culture peut avoir des effets néfastes sur l'intégrité des méristèmes et le développement de certains organes comme le scutellum (Bakos et al., 2009; Ferrie and Keller, 2007; Supena et

l., 2008). Dans cette étude, certaines anomalies de développement ont été observées au sein des cultures de microspores des trois génotypes de blé, la plus forte fréquence ayant été observée chez le génotype Premio. Certains ELS comportaient une morphologie d'embryon-jumeau ou présentaient des organes multiples. Ce type d'anomalies a déjà été rapporté dans des cultures d'embryons de blé (Bakos et al., 2009; Kumlehn et al., 1998). Dans notre cas, les ELS-jumeaux ou multiples ont permis la régénération d'une ou plusieurs plantules par structure. Les structures filamenteuses n'ont, quant à elles, jamais pu être converties en plantules. Les différentes anomalies décrites dans cette étude sont survenues à la fois lors de la culture en milieu d'induction liquide, et lors de la subculture sur milieu de régénération. Ces différentes anomalies de développement observées chez les ELS et les CLS de blé pourraient être provoquées par des conditions de culture non optimales, celles-ci influençant négativement leur développement, leur intégrité et leur capacité de conversion en plantules.

Une particularité intéressante en androgénèse est que toutes les microspores sont initialement exposées aux mêmes modalités de stress et aux mêmes conditions de culture *in vitro*, mais pourtant, elles n'adoptent pas toutes la même voie de développement. L'optimisation des conditions de culture *in vitro*, de manière spécifique pour chaque génotype, pourraient permettre d'améliorer les rendements en androgénèse chez le blé. Les données acquises durant notre étude apportent une connaissance plus approfondie des phases moyennes à tardives du développement des micropores en androgénèse. Deux types de développement coexistent en culture de microspores de blé, comme cela avait déjà été rapporté chez d'autres espèces, mais contrairement à certaines d'entre elles, ces deux types de structures androgéniques ont la capacité de régénérer une plantule. De plus, nous avons mis en évidence, par une catégorisation développementale et morphologique des différentes structures produites en androgénèse chez le blé, qu'une même catégorie de structures androgéniques peut régénérer à la fois des plantules albinos et des plantules chlorophylliennes. Or, les structures androgéniques produites par le génotype Paledor ne présentent aucune différence d'aspect, de forme ou de morphologie par rapport à celles produites par le génotype Pavon, et qui régénèrent uniquement des plantules albinos. La récalcitrance du génotype de blé d'hiver Paledor pourrait donc être provoquée par des anomalies ou des modifications cellulaires, génétiques ou épigénétiques mais qui n'affectent pas le phénotype et la morphologie des structures androgéniques produites. Nos résultats

confirment l'hypothèse d'un blocage précoce au cours du processus d'androgénèse chez le blé aboutissant à la formation de plantules albinos. Ce blocage semble survenir avant la formation des structures androgéniques à partir des cultures de microspores, ce qui nous permet d'affiner la fenêtre de temps pour nos prochains travaux de recherche menés sur les cultures de microspores isolées de blé. De plus, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives sur une caractérisation plus poussée des structures androgéniques de blé, notamment au niveau moléculaire et génétique, pour tenter d'expliquer leurs capacités de régénération en plantules si contrastées.

Références

- Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., and Spaner, D. (2014). Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 50, 121–126.
- Bakos, F., Szabó, L., Olmedilla, A., and Barnabás, B. (2009). Histological comparison between wheat embryos developing in vitro from isolated zygotes and those developing in vivo. *Sex Plant Reprod* 22, 15–25.
- Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, A. Touraev, B.P. Forster, and S.M. Jain, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 35–46.
- Bonet, F., and Olmedilla, A. (2000). Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. *Protoplasma* 211, 94–102.
- Borderies, G. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* 83, 205–212.
- Brunelle, D.C., Clark, J.K., and Sheridan, W.F. (2017). Genetic Screening for EMS-Induced Maize Embryo-Specific Mutants Altered in Embryo Morphogenesis. *G3* 7, 3559–3570.
- Canonge, J., Philippot, M., Leblanc, C., Potin, P., and Bodin, M. (2020). Impedance flow cytometry allows the early prediction of embryo yields in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore cultures. *Plant Science* 300, 110586.
- Castillo, A.M., Vallés, M.P., and Cistué, L. (2000). Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113, 1–8.
- Clark, J.K., and Sheridan, W.F. (1986). Developmental profiles of the maize embryo-lethal mutants dek22 and dek23. *The Journal of Heredity* 83–92.
- Corral-Martínez, P., and Seguí-Simarro, J.M. (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica* 187, 47–61.
- Corral-Martínez, P., and Seguí-Simarro, J.M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica* 195, 369–382.
- Delporte, F., Pretova, A., du Jardin, P., and Watillon, B. (2014). Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma* 251, 1455–1470.

Esteves, P., Clermont, I., Marchand, S., and Belzile, F. (2014). Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. *Plant Cell Rep* 33, 871–879.

Fadel, F., and Wenzel, G. (1990). Medium-genotype-interaction on androgenetic haploid production in wheat. *Plant Breeding* 105, 278–282.

Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849, 385–402.

Ferrie, A.M.R., and Keller, W.A. (2007). Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the Brassicaceae. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 43, 348–355.

Gémes Juhász, A., and Jakše, M. (2005). Haploids in the Improvement of Miscellaneous Crop Species (Cucurbitaceae, Liliaceae, Asparagaceae, Chenopodiaceae, Araceae and Umbelliferae). In *Haploids in Crop Improvement II*, C.E. Don Palmer, W.A. Keller, and K.J. Kasha, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 259–276.

George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.-J.D. (2007). Somatic Embryogenesis. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, E.F. George, M.A. Hall, and G.-J.D. Klerk, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 335–354.

Góralski, G., Rozier, F., Matthys-Rochon, E., and Przywara, L. (2005). CYTOLOGICAL FEATURES OF VARIOUS MICROSPORE DERIVATIVES APPEARING DURING CULTURE OF ISOLATED MAIZE MICROSPORES. 9.

Gorbunova, V.Yu., Kruglova, N.N., and Abramov, S.N. (2001). The Induction of Androgenesis in vitro in Spring Soft Wheat. Balance of Exogenous and Endogenous Phytohormones. *Biology Bulletin* 28, 25–30.

Hause, B., Veenendaal, W.L.H. van, Hause, G., and Lammeren, A.A.M. van (1994). Expression of Polarity during early Development of Microspore-derived and Zygotic Embryos of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Botanica Acta* 107, 407–415.

Indrianto, A., Barinova, I., and Herberle-Bors, E. (2001). Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212, 163–174.

Kim, M., Jang, I.-C., Kim, J.-A., Park, E.-J., Yoon, M., and Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27, 425–434.

Kiviharju, E., Puolimatka, M., Saastamoinen, M., Hovinen, S., and Pehu, E. (1998). The effect of genotype on anther culture response of cultivated and wild oats. *Agricultural and Food Science* 7, 409–422.

Konieczny, R., Czaplicki, A.Z., Golczyk, H., and Przywara, L. (2003). Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73, 177–187.

- Kruglova, N.N., Titova, G.E., and Seldimirova, O.A. (2018). Callusogenesis as an in vitro Morphogenesis Pathway in Cereals. *Russ J Dev Biol* 49, 245–259.
- Kumari, M., Clarke, H.J., Small, I., and Siddique, K.H.M. (2009). Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 393–409.
- Kumlehn, J., Lörz, H., and Kranz, E. (1998). Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta* 205, 327–333.
- Kumlehn, J., Lörz, H., and Kranz, E. (1999). Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study early embryogenesis. *Protoplasma* 208, 156–162.
- Kurczyńska, E.U., Gaj, M.D., Ujczak, A., and Mazur, E. (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 226, 619–628.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., and Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 97, 285–293.
- Leljak-Levanić, D., Mihaljević, S., and Bauer, N. (2015). Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. *Acta Physiol Plant* 37, 127.
- Letarte, J., Simion, E., Miner, M., and Kasha, K.J. (2006). Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep* 24, 691–698.
- Ma, R., Guo, Y.-D., and Pulli, S. (2004a). Comparison of Anther and Microspore Culture in the Embryogenesis and Regeneration of Rye (*Secale cereale*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76, 147–157.
- Ma, R., Guo, Y.-D., and Pulli, S. (2004b). Comparison of Anther and Microspore Culture in the Embryogenesis and Regeneration of Rye (*Secale cereale*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76, 147–157.
- Maraschin, S. de F., Lamers, G.E.M., Sylvia de Pater, B., Spaink, H.P., and Wang, M. (2003). 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 54, 1033–1043.
- Maraschin, S.F., de Priester, W., Spaink, H.P., and Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* 56, 1711–1726.
- Massonneau, A., Coronado, M.-J., Audran, A., Bagniewska, A., Mòl, R., Testillano, P.S., Goralski, G., Dumas, C., Risueño, M.-C., and Matthys-Rochon, E. (2005). Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *European Journal of Cell Biology* 84, 663–675.

- Méndez-Hernández, H.A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R.N., Juárez-Gómez, Y.L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., and Loyola-Vargas, V.M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Front. Plant Sci.* *10*.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* *15*, 473–497.
- Niazian, M., and Shariatpanahi, M.E. (2020). In vitro-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica* *216*, 69.
- Nic-Can, G.I., and Loyola-Vargas, V.M. (2016). The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, V.M. Loyola-Vargas, and N. Ochoa-Alejo, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 171–182.
- Nonohay, J.S., Mariath, J.E.A., and Winge, H. (1999). Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. *Plant Cell Reports* *18*, 929–934.
- Olsen, F.L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum Vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications* *52*, 393–404.
- Patel, M., Darvey, N.L., Marshall, D.R., and Berry, J.O. (2004). Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. *Euphytica* *140*, 197–204.
- Pérez Pérez, Y., El-Tantawy, A.A., González, M.S., Risueno, M.-C., and Testillano, P.S. (2019). Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. *Front. Plant Sci.* *10*.
- Piccirilli, M., and Arcioni, S. (1991). Haploid plants regenerated via anther culture in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Kock). *Plant Cell Reports* *10*, 273–276.
- Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Vallés, M.P., Barnabas, B., and Olmedilla, A. (2005). Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *Journal of Structural Biology* *149*, 170–181.
- Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M., and Loyola-Vargas, V.M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* *86*, 285.
- Rivas-Sendra, A., Calabuig-Serna, A., and Seguí-Simarro, J.M. (2017). Dynamics of Calcium during In vitro Microspore Embryogenesis and In vivo Microspore Development in *Brassica napus* and *Solanum melongena*. *Front. Plant Sci.* *8*, 1177.

- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C., Porcel, R., and Seguí-Simarro, J.M. (2020a). Effects of growth conditions of donor plants and in vitro culture environment in the viability and the embryogenic response of microspores of different eggplant genotypes. *Euphytica* 216, 167.
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C., Porcel, R., and Seguí-Simarro, J.M. (2020b). Effects of growth conditions of donor plants and in vitro culture environment in the viability and the embryogenic response of microspores of different eggplant genotypes. *Euphytica* 216, 167.
- Rybczynski, J., Simonson, R.L., and Baenziger, P.S. (1991). Evidence for microspore embryogenesis in wheat anther culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 27, 168–174.
- Seguí-Simarro, J.M. (2010). Androgenesis Revisited. *Bot. Rev.* 76, 377–404.
- Seguí-Simarro, J.M., and Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 134, 1–12.
- Seldimirova, O.A., Titova, G.E., and Kruglova, N.N. (2016). A Complex morpho-histological approach to the in vitro study of morphogenic structures in a wheat anther culture. *Biology Bulletin* 43, 121–126.
- Seldimirova, O.A., Kruglova, N.N., Titova, G.E., and Batygina, T.B. (2017). Comparative ultrastructural analysis of the in vitro microspore embryoids and in vivo zygotic embryos of wheat as a basis for understanding of cytophysiological aspects of their development. *Russ J Dev Biol* 48, 185–197.
- Shumilina, D., Korniyukhin, D., Domblides, E., Soldatenko, A., and Artemyeva, A. (2020). Effects of Genotype and Culture Conditions on Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in *Brassica Rapa* ssp. *Rapa* L. *Plants* 9, 278.
- Smertenko, A., and Bozhkov, P.V. (2014). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *Journal of Experimental Botany* 65, 1343–1360.
- Song, H., Lou, Q.-F., Luo, X.-D., Wolukau, J.N., Diao, W.-P., Qian, C.-T., and Chen, J.-F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90, 245–254.
- Soriano, M., Hui, L., and Boutilier, K. (2013). Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction* 26, 181–196.
- Stasolla, C., Belmonte, M.F., Tahir, M., Elhiti, M., Khamiss, K., Joosen, R., Maliepaard, C., Sharpe, A., Gjetvaj, B., and Boutilier, K. (2008). Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta* 228, 255.
- Su, Y.H., Tang, L.P., Zhao, X.Y., and Zhang, X.S. (2020). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology* *n/a*, 1–16.

Supena, E.D.J., and Custers, J.B.M. (2011). Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 130, 769–774.

Supena, E.D.J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., van Lammeren, A., Offringa, R., Boutilier, K., and Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of Experimental Botany* 59, 803–814.

Testillano, P.S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J Exp Bot* 70, 2965–29789.

Testillano, P.S., Ramirez, C., Domenech, J., Coronado, M.-J., Vergne, P., Matthys-Rochon, E., and Risueno, M.C. (2002). Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 1035–1047.

Yeung, E.C. (2002). The canola microspore-derived embryo as a model system to study developmental processes in plants. *J. Plant Biol.* 45, 119–133.

Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., and Sun, M.-X. (2017). Does Early Embryogenesis in Eudicots and Monocots Involve the Same Mechanism and Molecular Players? *Plant Physiology* 173, 130–142.

Zheng, M.Y., Weng, V., Liu, W., and Konzak, C.F. (2002). The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 20, 802–807.

Zimmerman, J. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell* 5, 1411–1423.

Zur, I., Dubas, E., Krzewska, M., and Janowiak, F. (2015). Current insights into hormonal regulation of microspore embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 6.

Chapitre 4

**Études moléculaires de la biogénèse des chloroplastes
au sein des cultures de microspores isolées de blé et
identification de gènes dont l'expression est liée
précocement à la régénération de plantules albinos**

Introduction

Grâce à l'utilisation de la culture de microspores isolées, il est théoriquement possible, à partir d'une seule inflorescence, de produire des milliers de plantules haploïdes doublées (HD). Cette technique permet aux sélectionneurs d'accélérer significativement leur cycle de sélection, et d'exploiter facilement des mutations récessives possédant des traits agronomiques potentiellement valorisables. Néanmoins, selon les espèces végétales, des verrous à la production de plantules HD en routine subsistent. Chez les Solanacées, comme la tomate et l'aubergine, beaucoup de cals sont générés en culture de microspores isolées et les embryons produits avortent précocement, le plus souvent au stade globulaire. Chez les céréales, dont le blé, l'orge et le riz, le blocage majeur en androgénèse est la forte proportion de plantules albinos régénérées (Kumari et al., 2009; Makowska and Oleszczuk, 2014). Ces plantules sont dépourvues, totalement ou partiellement, de chlorophylle et ses pigments associés, les caroténoïdes. Leur incapacité à se développer de façon autotrophe, en dehors de la culture *in vitro* et l'irréversibilité de ce processus, font de la production d'HD chez les céréales une méthode à usage limité pour les sélectionneurs. Au cours des trente dernières années, des travaux de recherche ont tenté d'appréhender les causes du phénomène d'albinisme en androgénèse chez les céréales mais aucune solution concrète n'a été trouvée pour pallier cette importante régénération de plantules albinos.

Au cours de ma thèse, j'ai souhaité explorer l'hypothèse d'un échec précoce de la différenciation des proplastés en chloroplastes au cours du processus d'androgénèse. Ce blocage dans la différenciation des plastés provoquerait alors l'absence de chloroplastes fonctionnels, aboutissant à la formation de plantules albinos. Il est donc nécessaire d'étudier les étapes précoces du processus d'androgénèse en utilisant une approche ciblée sur le développement des plastés au sein de ces microspores. Plusieurs travaux ont déjà été menés pour suivre, en microscopie électronique, le développement des plastés et caractériser ainsi les différentes morphologies et ultrastructures, aboutissant à la régénération de plantules albinos (Careda et al., 1999, 2000, 2004). Ces travaux ont permis de mettre en évidence des plastés présentant des anomalies de développement, des plastés indifférenciés et des plastés présentant une structure proche des étioplastés dans les cultures de microspores d'un génotype d'orge récalcitrant. De plus, les travaux menés par Careda et son équipe ont rapporté que la formation des thylakoïdes se produisait au sein des microspores d'orge aux

alentours du 21^{ème} jour de culture *in vitro*, après un prétraitement de 28 jours à 4°C. La différenciation des proplastides en chloroplastes s'initie donc précocement au cours de la culture des microspores, et le blocage de cette différenciation, aboutissant à la formation de plantules albinos, pourrait donc subvenir de façon encore plus précoce dans le processus d'androgénèse.

L'étude du développement des microspores en androgénèse s'est largement développée ces dix dernières années et les cultures de microspores isolées sont devenues un modèle puissant pour étudier l'expression des gènes impliqués dans divers processus biologiques, dont l'embryogénèse et les différentes voies de régulation sous-jacentes (Soriano et al., 2013). L'évolution constante des technologies de biologie moléculaire ont permis la mise au point de techniques efficaces pour extraire des quantités d'ARN suffisantes à partir de cultures *in vitro* de cellules isolées, qui sont des populations très hétérogènes. Ceci a permis la réalisation de travaux basés sur l'expression de gènes ciblés par PCR quantitative (qPCR), sur des approches de transcriptomique à l'aide de puces ou filtres à ADN, ou récemment sur le séquençage d'ARN ou RNAseq (Corral-Martínez et al., 2020; Seifert et al., 2016).

La plupart des approches moléculaires mises en place pour étudier le phénomène d'albinisme en androgénèse chez les céréales avaient été réalisées sur les plantules régénérées *in vitro*. Les résultats obtenus chez le blé ont permis de dresser les profils d'expression génique des plantules albinos avec 1892 gènes différentiellement exprimés par rapport aux plantules chlorophylliennes (Zhao et al., 2017). Des approches menées par le biais de puces à ADN puis par la technologie de séquençage haut débit RNAseq ont depuis été effectuées chez les microspores de blé et d'orge à des étapes précoces du processus d'androgénèse : sur les microspores avant et après le prétraitement, et après 4 jours de culture *in vitro*. Ces études ont généré une quantité importante de données avec 213 gènes différentiellement exprimés chez l'orge (Muñoz-Amatriaín et al., 2009) et plus de 6000 chez le blé (Seifert et al., 2016), la quantité de données générées étant directement liée à l'approche utilisée (respectivement puce à ADN et RNAseq). Ces études moléculaires à haut débit n'ont pas encore pu apporter des réponses précises sur les causes de l'albinisme en androgénèse chez les céréales, car les données générées sont nombreuses et difficilement interprétables, et l'identité et la fonction de nombreux gènes ne sont pas encore connues. Un autre type d'approche moléculaire doit donc être mise en place pour apporter des éléments concrets et essentiels à notre compréhension de ce phénomène.

Pour vérifier l'hypothèse d'un blocage précoce de la différenciation des proplastés en chloroplastes au cours du processus d'androgénèse chez le blé, j'ai donc décidé de mettre au point une approche innovante basée sur l'analyse du niveau d'expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes. Cette étude se focalise sur les étapes précoces de l'androgénèse, et a été menée depuis les microspores fraîchement isolées, avant l'application du prétraitement, jusqu'aux pro-embryons visibles à 21 jours de culture *in vitro*. Ces travaux de thèse, menés de 2019 à 2020, coïncident avec l'étude parue très récemment chez l'orge (Gajicka et al., 2021). Ces auteurs ont étudié le développement des plastés au sein des microspores en androgénèse avec des observations en microscopie électronique couplées à l'évaluation du niveau d'expression de gènes candidats. Cependant, l'étude menée chez l'orge s'est concentrée sur les étapes plus tardives du processus d'androgénèse, c'est-à-dire la conversion des structures androgéniques en plantules (après 43 à 55 jours de culture). Un certain nombre de gènes sont communs aux deux études.

Dans mes travaux, vingt gènes candidats ont été ciblés pour étudier la biogénèse des chloroplastes au sein des microspores de blé, dont les rôles et fonctions sont décrits ci-dessous et dans le tableau 1. Deux autres gènes candidats, non impliqués dans ce processus, ont également été étudiés. Le gène *BBM* (*BABY BOOM*) est connu pour être impliqué dans l'induction de l'embryogénèse par la voie des auxines et est aujourd'hui couramment utilisé comme gène candidat en embryogénèse somatique et en androgénèse. Le gène *GBSSI* (Granule-Bound Starch Synthase I) code pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'amidon de réserve. Chez l'orge, l'utilisation de ce gène a été proposée comme marqueur du potentiel d'un génotype à régénérer des plantules chlorophylliennes en androgénèse (Gajicka et al., 2020).

Les plastés possèdent leur propre génome qui contient approximativement 130 gènes codant pour des sous-unités d'ARN polymérase, des ARN et protéines ribosomiques, et des ARN de transfert (ARNt) (Bock, 2007). La transcription des gènes plastidiaux est effectuée par deux ARN polymérases (Börner et al., 2015), l'une codée par le génome nucléaire (NEP – Nuclear-Encoded Polymerase) et l'autre codée par le génome plastidial (PEP – Plastid-Encoded Polymerase). Chez les Monocotylédones, la NEP est formée d'une seule sous-unité codée par le gène nucléaire *rpoTp*, tandis que la PEP est composée de quatre sous-unités, codées respectivement par les gènes plastidiaux *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*. L'action de la PEP nécessite d'autres facteurs impliqués dans la reconnaissance spécifique des promoteurs mais

Tableau 1 : Gènes candidats retenus dans l'étude du développement des plastes au sein des microspores en androgénèse chez le blé. Synthèse des processus impliqués, du génome d'origine et de la fonction principale des protéines issues de la transcription et traduction de ces gènes.

Processus	Génome	Gène	Protéine	Fonction principale
Embryogénèse	Nucléaire	BBM	Facteur de transcription Babyboom	Activation des gènes impliqués dans l'embryogénèse
Biosynthèse amidon de réserve	Nucléaire	GBSSI	Granule-Bound Starch Synthase I	Enzyme de la voie de biosynthèse de l'amidon de réserve
Machinerie transcriptionnelle des plastes	Plastidial	rpoA	Sous-unité de l'ARN polymérase PEP	Transcription des gènes plastidiaux
	Nucléaire	rpoTp	ARN polymérase NEP	Transcription des gènes plastidiaux
	Nucléaire	SIG2	Facteur de transcription sigma 2	Reconnaissance des promoteurs des gènes plastidiaux transcrits par la PEP
	Nucléaire	SIG6	Facteur de transcription sigma 6	
Machinerie traductionnelle des plastes	Plastidial	ARNr 16S	Sous-unité 16S de l'ARNr plastidial	Traduction des gènes plastidiaux
	Plastidial	ARNr 23S	Sous-unité 23S de l'ARNr plastidial	Traduction des gènes plastidiaux
Photosystème I	Plastidial	psaA	Apoprotéine A1 du PSI	Protéine composant le PSI
Photosystème II	Plastidial	psbD	Protéine D2 du PSII	Centre réactionnel du PSII
	Nucléaire	Lhcb1	Protéine du complexe de capture de la lumière	Protéine principale du complexe de capture de la lumière
Biosynthèse de la chlorophylle	Nucléaire	HEMA	Glutamyl-tRNA reductase	Première enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle
	Nucléaire	CHLH	Sous-unité de la magnesium chelatase	Enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle
	Nucléaire	PORA	Protochlorophyllide oxydoreductase	Dernière enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle
Photomorphogénèse	Nucléaire	GLK1	Facteur de transcription Golden-2like 1	Régulation de l'expression des PhANGs
	Nucléaire	GLK2	Facteur de transcription Golden-2like 2	
	Nucléaire	COP1	Constitutive Photomorphogenesis 1	Inhibiteur, à l'obscurité, des gènes liés à la photomorphogénèse
	Nucléaire	HY5	Long Hypocotyl 5	Régulateur positif de la photomorphogénèse à la lumière
Import des protéines vers les plastes	Nucléaire	Toc34	Sous-unité du translocon de l'enveloppe externe du plaste	Import de protéines cytosoliques à l'intérieur des plastes
	Nucléaire	Tic110	Sous-unité du translocon de l'enveloppe interne du plaste	
Division des plastes	Nucléaire	FtsZ	Protéine FtsZ	Division des plastes
Formation thylakoïdes et recyclage protéines des PS	Nucléaire	FtsH2	Protéine FtsH2	Renouvellement et recyclage des protéines des PS

également dans la formation et la stabilisation du complexe protéique PEP. Ces facteurs sont les facteurs sigma et les protéines PAP (PEP-Associated Proteins) respectivement, tous deux codés par le noyau des cellules (Cuitun-Coronado and Dodd, 2021; Liebers et al., 2018). Parmi les facteurs sigma, SIG2 et SIG6 ont été décrits comme ayant une action précoce dans la biogénèse des chloroplastes (Pogson et al., 2015), et SIG2 est également impliqué dans la transcription des ARNt (Woodson et al., 2013). Lors des étapes précoces de la biogénèse des chloroplastes, les gènes plastidiaux sont préférentiellement transcrits par la NEP (Møller et al., 2014). Ces gènes sont principalement des gènes de ménage. Parmi ces gènes sous promoteur NEP, on retrouve également les gènes *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*, codant des sous-unités de la PEP (Liebers et al., 2017). Ces trois gènes sont situés sur le même opéron, tandis que le gène *rpoA*, codant également une sous-unité de la PEP, fait partie d'un autre cluster comprenant des gènes codant pour des protéines ribosomiques (Börner et al., 2015). Lors du développement et de la maturation des chloroplastes, une transition s'effectue au niveau de la transcription des gènes plastidiaux, qui sont alors préférentiellement transcrit par la PEP. Cette transcription PEP-dépendante est requise pour obtenir un niveau de transcription élevé des gènes plastidiaux, nécessaire à l'assemblage efficace des chloroplastes. Cette transition est possible grâce à l'action de SIG2 et de la PEP qui vont initier la transcription de Glu-tRNA et produire un niveau élevé de transcrits. Glu-tRNA inhibe alors l'activité de la NEP en s'y liant (Hanaoka et al., 2005; Kanamaru et al., 2001). Cet ARNt est également un composant essentiel de la traduction se produisant dans les plastes, tout comme les ARN ribosomiques plastidiaux 16S et 23S.

La chlorophylle joue un rôle clé dans la différenciation des chloroplastes, notamment en tant que composant essentiel dans l'assemblage des photosystèmes. Sa voie de biosynthèse est aujourd'hui totalement élucidée, les enzymes impliquées sont toutes codées par des gènes nucléaires (Waters and Langdale, 2009). Les gènes nucléaires *HEMA*, *CHLH* et *PORA* codent pour des enzymes agissant à différentes étapes de la voie de biosynthèse de ce pigment photosynthétique (Shi et al., 2017; Wu et al., 2018). L'enzyme PORA (Protochlorophyllide OxydoReductase A) permet la transformation du protochlorophyllide en chlorophyllide, dernière étape de la biosynthèse de la chlorophylle. Chez les Angiospermes, l'activité de l'enzyme PORA est dépendante de la lumière (Yuan et al., 2017) mais, à l'obscurité, elle peut être accumulée sous une forme inactive, couplée au protochlorophyllide,

dans les étioplastes. La lumière joue donc un rôle essentiel dans la biogénèse des chloroplastes, et sa perception déclenche une cascade de réactions permettant l'expression de facteurs de transcription nucléaires, tels que HY5, GLK1 et GLK2, induisant à leur tour l'expression de gènes nucléaires associés à la photosynthèse, ou PhANG (Photosynthetic-Associated Genes), et d'autres gènes nucléaires liés à la biosynthèse de la chlorophylle (Kindgren et al., 2012; Waters et al., 2009). Les gènes codant les protéines des complexes de capture de la lumière sont un exemple de PhANG. Parmi eux, le gène *Lhcb1* code la principale protéine de ces complexes présents au sein du photosystème II (Lopez-Juez and Pyke, 2005). L'assemblage des photosystèmes I et II, sièges des réactions lumineuses de la photosynthèse, requiert différentes protéines et la présence de chlorophylle, et se fait de manière coordonnée avec la formation des thylakoïdes (Adam et al., 2010; Pogson et al., 2015). Le gène *FtsH2* est également impliqué dans la formation des thylakoïdes, et permet en outre de renouveler et recycler les protéines des photosystèmes (Yu et al., 2004a). La formation de photosystèmes fonctionnels et intègres, assemblés dans les membranes des thylakoïdes, est donc une étape cruciale dans la biogénèse et la différenciation des chloroplastes.

Ce chapitre présente donc une étude novatrice du développement des plastes au sein des microspores de blé au cours du processus d'androgénèse basée sur une analyse d'expression de gènes spécifiquement impliqués dans la biogénèse des chloroplastes. Cette analyse se concentre sur les étapes précoces de l'androgénèse, de l'isolement des microspores jusqu'au 21^{ème} jour de culture *in vitro*, et a également été réalisée sur des plantules chlorophylliennes et albinos. Cette étude a été menée sur deux génotypes de blé ayant une réactivité contrastée en androgénèse, l'un produisant des plantules chlorophylliennes, l'autre non. Nous pourrions ainsi tenter de cerner les étapes clés de la mise en place du blocage conduisant à la formation de plantules albinos, ainsi que les gènes impliqués. Ces différences d'expression génique pourraient devenir des marqueurs intéressants et précoces du processus d'androgénèse chez les céréales.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Deux génotypes de blé ont été étudiés : le génotype de blé de printemps Pavon, régénérant à la fois des plantules chlorophylliennes et albinos, et le génotype de blé d'hiver Paledor produisant uniquement des plantules albinos.

Ils ont été cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 3.

2. Culture de microspores isolées

Les modalités de prétraitement appliquées lors de cette étude sont les mêmes que celles exposées dans le chapitre 3.

Au moment de la mise en culture des microspores, la réalisation d'un gradient maltose 23 % a été ajoutée au protocole habituel (décrit dans le chapitre 2) dans le but d'éliminer au maximum les microspores non réorientées présentes à l'issue du prétraitement. Ce gradient a permis d'enrichir les cultures de microspores en microspores réorientées et viables, et a ainsi limité le niveau d'hétérogénéité des cellules dans les cultures. Lors de la mise au point de cette étape, la fraction contenant les microspores non réorientées ou mortes a été mise en culture afin de confirmer l'efficacité du gradient et l'absence de microspores capables de produire des structures androgéniques. Après 30 jours de culture *in vitro*, aucune structure androgénique n'a été produite à partir de cette fraction du gradient.

Quatre réplicats biologiques ont été effectués pour les cultures de microspores des deux génotypes de blé étudiés, chaque réplicat étant composé d'au moins 18 boîtes de Pétri, chacune contenant 50 000 microspores en culture.

Les structures androgéniques produites à partir des cultures de microspores isolées ont été repiquées après 35 jours de culture *in vitro* sur un milieu de régénération solide (voir Chapitre 3). Ces structures ont été cultivées à 25°C, avec une photopériode de 16 heures pendant 28 jours. À l'issue de ces 3 semaines, les plantules régénérées ont été comptées pour calculer les rendements en plantules totales, en plantules chlorophylliennes et en plantules albinos. Ces rendements sont exprimés pour 10 000 microspores.

3. Prélèvement des échantillons

Les échantillons issus de culture de microspores ayant servi aux extractions d'ARN, décrites ci-dessous, ont été prélevés à partir des quatre réplicats biologiques pour chacun des deux génotypes. Ces prélèvements ont été effectués à différentes étapes du processus d'androgénèse : au moment de la cueillette des épis (D-21), après le prétraitement (D0), et à 7, 14 et 21 jours de culture (D7, D14 et D21).

Pour chaque date de prélèvement, le contenu de trois boîtes de Pétri a été utilisé, correspondant à environ 150 000 microspores initialement mises en culture.

Les plantules régénérées ont également été prélevées et analysées en fonction de leur phénotype, chlorophyllien ou albinos, 63 jours après le début de la culture *in vitro* des microspores. Six morceaux de feuilles d'environ 2 cm de long ont été prélevés pour chaque échantillon.

Tous les échantillons prélevés ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis transférés dans un congélateur à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

4. Extraction d'ARN et RT-qPCR

Tous les échantillons, microspores et plantules, ont été broyés avant l'extraction des ARN, à raison de 2 x 3 minutes de broyage à 30 MHz en utilisant un broyeur à billes (TissueLyser II – Qiagen). Les échantillons de plantules ont été broyés congelés, tandis que 100 µL de tampon de lyse (provenant du kit d'extraction des ARN mirVana – Thermo Fisher Scientific) ont été ajoutés aux échantillons de microspores, qui n'étaient donc plus congelés au moment du broyage. L'extraction des ARN totaux à partir des échantillons de microspores a été effectuée en utilisant le kit mirVana (Thermo Fisher Scientific) et en suivant les préconisations du fournisseur. Les échantillons d'ARN ont ensuite été traités avec 2 x 0,5 µL de rDNase (2 unités / µL) à 37°C pendant 2 x 30 minutes (DNA-free kit – Invitrogen). Le kit Nucleospin RNA Plus (Macherey Nagel) a été utilisé pour l'extraction des ARN totaux des plantules, combiné à un traitement DNase sur colonne au cours de l'extraction des ARN, selon les instructions prescrites par le fournisseur (rDNase set – Macherey Nagel).

Les ARN ont été dosés par fluorimétrie avec le kit RNA HS Assay et le Qubit 3 (Invitrogen), et tous les échantillons ont été normalisés à une concentration de 50 ng/ µL.

Cinq cents nanogrammes d'échantillons ont été utilisés pour la reverse transcription dans un volume réactionnel total de 20µL (SuperScript II – Invitrogen). Pour la PCR quantitative (qPCR), des quantités différentes d'ADNc ont été utilisées en fonction des différentes étapes du processus d'androgénèse : 2,5 ng d'ADNc par réaction pour les échantillons prélevés à D7, D14 et D21, et 5 ng d'ADNc par réaction pour les échantillons prélevés à D-21, D0 et pour les plantules. Les amorces des gènes sont issues de la littérature ou ont été dessinées avec le logiciel Primer3 (Untergasser et al., 2012) à partir des séquences décrites dans la base de données « Nucléotide » du NCBI (National Center of Biotechnology Information). Les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau en annexe 1. Les amplifications par qPCR ont été réalisées dans un volume réactionnel final de 7,5 µL, contenant 3,75 µL de Takyon (ROX Probe 2X MasterMix dTTP blue – Eurogentec), 200µM de chaque amorce, et 2,5 ou 5 ng d'ADNc. Tous les échantillons ont été distribués en triplicat technique. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un LightCycler 480 III (Roche) avec les conditions de réactions suivantes : dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, suivi par 45 cycles d'amplification en deux étapes, 94°C pendant 10 secondes puis 60°C pendant 1 minute. Une acquisition de la fluorescence est effectuée après chaque fin de cycle. La courbe de fusion est réalisée avec une première étape à 95°C pendant 30 secondes, suivi d'une minute à 40°C et 1 seconde à 60°C. L'acquisition de la fluorescence se fait de 60 à 95°C, en continu, à raison de 5 acquisitions par degré.

Les niveaux d'expression relatifs des gènes étudiés ont été calculés en utilisant la méthode $\Delta\Delta Cq$ (Livak and Schmittgen, 2001). Trois gènes de référence, *18S rRNA*, *CDC* et *EF-1 α* (Tableau S1), ont été utilisés pour normaliser l'expression des 22 gènes candidats étudiés. La stabilité de l'expression des gènes de référence a été validée grâce au calcul de la valeur de M, qui doit être inférieure à 1,5 (Vandesompele et al., 2002). Les échantillons du génotype Pavon ont toujours été utilisés comme calibrateurs du niveau d'expression relatif. Lorsque plusieurs étapes du processus d'androgénèse sont comparées, l'étape la plus précoce est utilisée comme calibrateur afin de suivre l'évolution dans le temps de l'expression des gènes candidats.

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.6.3). Les différences significatives entre les échantillons ont été estimées de deux manières : (i) en comparant les deux génotypes pour une même date de prélèvement, et (ii) en comparant des dates de prélèvement différentes pour un même génotype. Deux comparaisons inter-dates ont pu être effectuées : D-21 et D0, puis D7, D14 et D21. Les niveaux d'expression des gènes candidats ont également été comparés entre les plantules chlorophylliennes et les plantules albinos de Pavon et Paledor à D63. Ces comparaisons et analyses ont été effectuées de cette façon car les échantillons étaient de natures différentes (microspores versus plantules), tout comme la quantité d'ADNc utilisée pour les réactions de qPCR, ou encore le kit d'extraction des ARN. Les différences significatives d'expression ($p < 0,05$) ont été déterminées par l'analyse de la variance ou par le test t de Student.

A

Rendements exprimés pour 10 000 microspores	Pavon	Paledor
Structures androgéniques	18,7* $\pm$ 2,4	8,2 $\pm$ 0,7
Plantules totales	8,5* $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 1,7
Plantules chlorophylliennes	1,6* $\pm$ 0,7	0,0
Plantules albinos	6,9 $\pm$ 1,6	3,6 $\pm$ 1,7

B

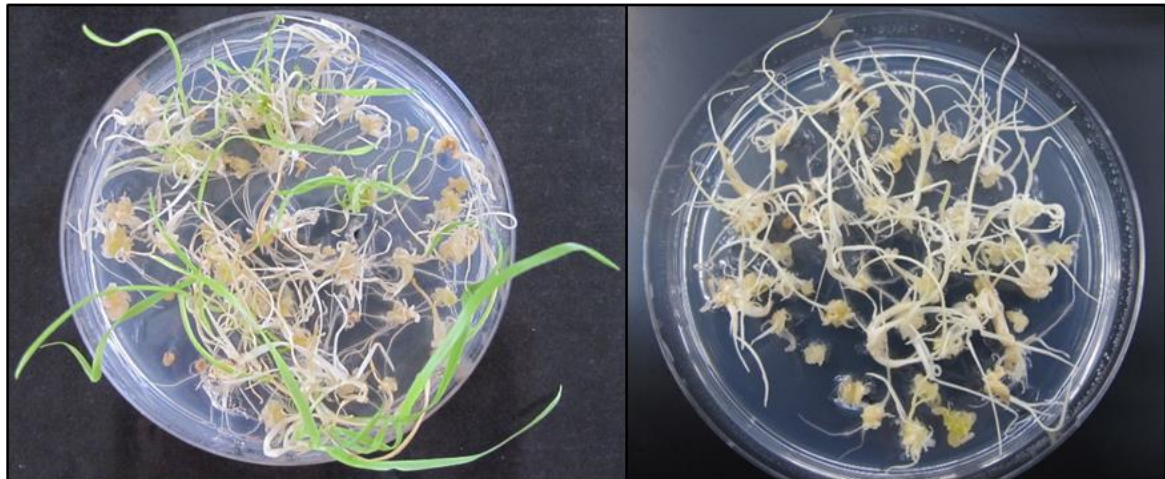


Figure 1 : Rendements en androgénèse de deux génotypes de blé, Pavon et Paledor, et exemple de plantules obtenues à l'issue du processus. **(A)** Réactivité des génotypes de blé Pavon et Paledor. Pour chaque génotype, les rendements ont été calculés à partir de 4 répétitions biologiques. Les astérisques représentent une différence significative entre les deux génotypes (Test de Tukey – $p < 0,05$). **(B)** Plantules régénérées à partir des cultures de microspores isolées, à gauche pour le génotype Pavon, et à droite pour le génotype Paledor.

Résultats

1. Réactivité et potentiel androgénique des deux génotypes de blé étudiés

Les deux génotypes Pavon et Paledor ont montré de bons rendements de production en structures androgéniques avec, respectivement, 18,7 et 8,2 structures androgéniques produites pour 10 000 microspores en culture (Figure 1A). Ce rendement est significativement plus élevé pour le génotype de blé de printemps Pavon.

Ces deux génotypes de blé diffèrent également au niveau de leurs rendements en plantules, et plus précisément au niveau du phénotype de plantules régénérées (Figure 1B). Pavon présente un rendement en plantules totales supérieur à celui de Paledor, avec 8,5 plantules régénérées pour 10 000 microspores contre 3,6 pour Paledor (Figure 1A). De plus, Pavon a produit 1,6 plantules chlorophylliennes pour 10 000 microspores alors que le génotype Paledor n'a régénéré que des plantules albinos. Le génotype de blé de printemps Pavon a également régénéré des plantules albinos, en proportion supérieure aux plantules chlorophylliennes.

2. Caractérisation des profils d'expression génique des plantules de blé régénérées en androgénèse

Le niveau d'expression des 20 gènes impliqués dans différents processus de la biogénèse des chloroplastes et leur différenciation en organites fonctionnels, a été étudiée dans les plantules régénérées *in vitro* des deux génotypes de blé. La comparaison des profils d'expression a été réalisée entre les plantules chlorophylliennes et albinos régénérées par les deux génotypes (Figure 2). Les profils d'expression des plantules albinos des génotypes Pavon et Paledor varient de la même façon pour tous les gènes analysés, aucune différence significative n'a été révélée.

Nous présentons ci-dessous la comparaison des profils d'expression des plantules albinos à ceux des plantules chlorophylliennes de Pavon, qui révèle la sous-expression de 8 gènes et la surexpression d'un gène, sur les 20 gènes étudiés.

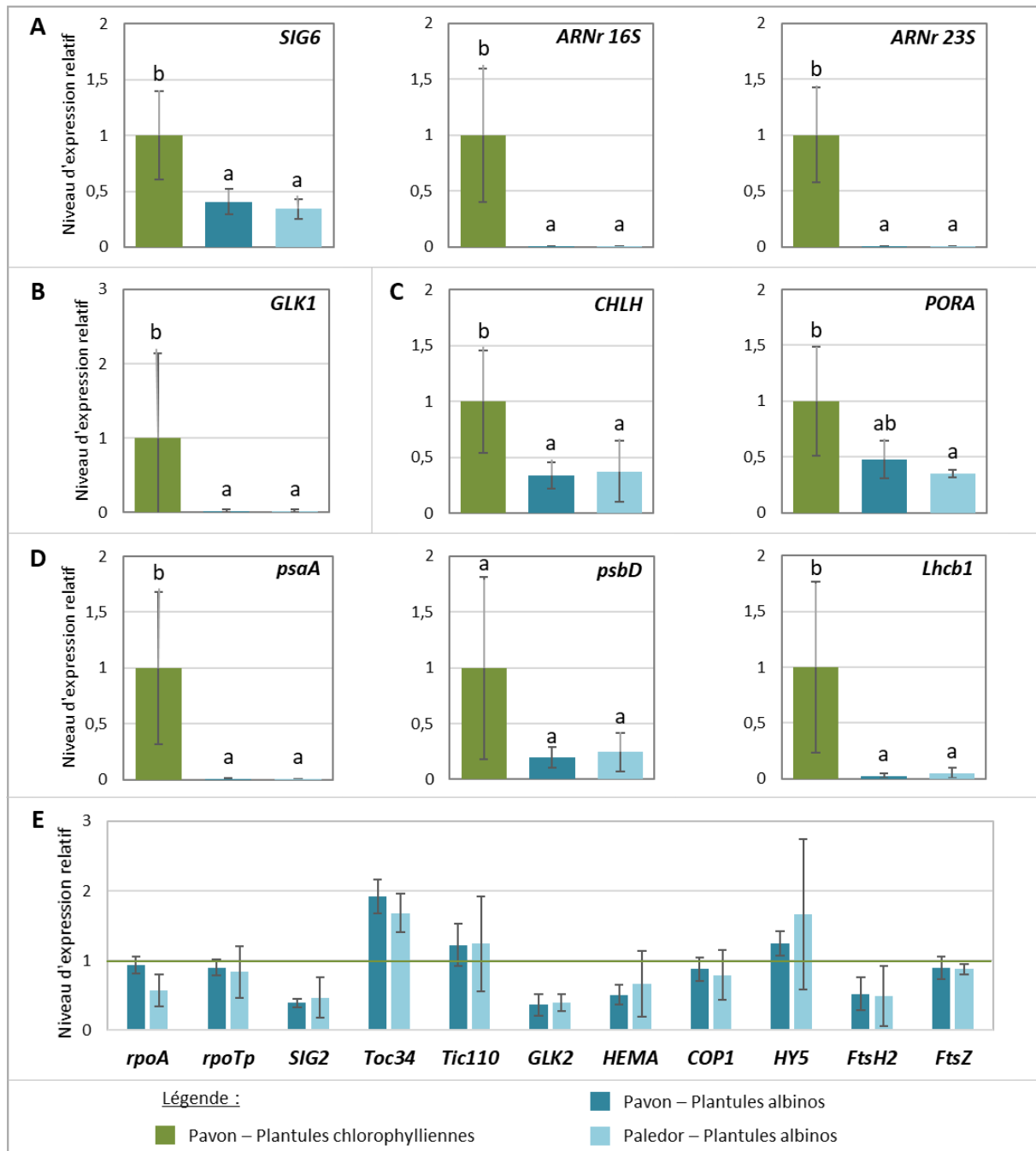


Figure 2 : Profils d'expression des gènes des plantules chlorophylliennes et albinos régénérées en androgénèse pour les génotypes de blé Pavon et Paledor. (A-D) Niveaux d'expression relatifs moyens des gènes codant pour : A. la machinerie transcriptionnelle (*SIG6*) et traductionnelle (*ARNr 16S* et *23S*) des plastes ; B. *GLK1* ; C. les enzymes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle ; D. les sous-unités des photosystèmes I et II, et *Lhcb1*, codant la protéine principale du complexe de capture de la lumière ; E. Profils d'expression des gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, et à la régulation de leur développement dans les plantules albinos de Pavon et Paledor, comparés au profil d'expression des plantules chlorophylliennes de Pavon (niveau d'expression symbolisé par la ligne verte). Le niveau d'expression relatif a été normalisé avec celui des plantules chlorophylliennes de Pavon. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression provenant d'au moins trois répétitions biologiques pour chaque génotype. Pour un même gène, les niveaux d'expression relatifs présentant la même lettre ne sont pas significativement différents (Test t de Student – $p < 0,05$).

2.1. Gènes liés à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des plastes

Les gènes *rpoA* et *rpoTp* codent respectivement des sous-unités des ARN polymérases PEP et NEP. Aucune différence d'expression de ces deux gènes n'a été observée entre les deux phénotypes de plantules régénérées (Figure 2E). Les gènes codant les facteurs SIG2 et SIG6, liés à l'activité de transcription de la PEP, montrent une légère sous-expression chez les plantules albinos, avec pour SIG6, une expression significativement plus faible d'un facteur 2,5 par rapport aux plantules chlorophylliennes de Pavon (Figures 2A et 2E). L'analyse de l'expression des gènes codant les sous-unités ribosomiques plastidiales 16S et 23S révèle une sous-expression importante chez les plantules albinos, avec une expression respectivement 800 fois et 400 fois plus faible (Figure 2A).

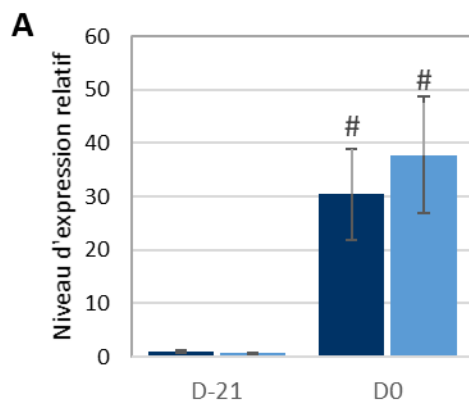
Ces résultats suggèrent une activité traductionnelle fortement impactée au sein des plastes des plantules albinos.

2.2. Gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, à la photomorphogénèse et à la photosynthèse.

La comparaison des niveaux d'expression des gènes liés à la biogénèse des chloroplastes et à la régulation de leur développement a été réalisée entre les deux phénotypes de plantules régénérées.

Seul le gène *Toc34* est surexprimé chez les plantules albinos par rapport aux plantules chlorophylliennes de Pavon (Figure 2E). Ce gène code une sous-unité du translocon TOC de l'enveloppe externe des plastes. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'expression du gène codant la sous-unité Tic110 du translocon de l'enveloppe interne.

Les gènes *GLK1* et *GLK2* codent pour des facteurs de transcription et sont des régulateurs clés de l'expression des gènes nucléaires liés à la photosynthèse ou impliqués dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle. Le gène *GLK1* est 50 fois moins exprimé chez les plantules albinos de Pavon et Paledor par rapport aux plantules chlorophylliennes (Figure 2B), tandis que le gène *GLK2* ne montre pas de variation d'expression significative entre les deux types de plantules (Figure 2E). On observe également, chez les plantules albinos, la sous-expression des gènes *CHLH* et *PORA*, impliqués dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle (Figure 2C).



Légende :

■ Pavon
■ Paledor

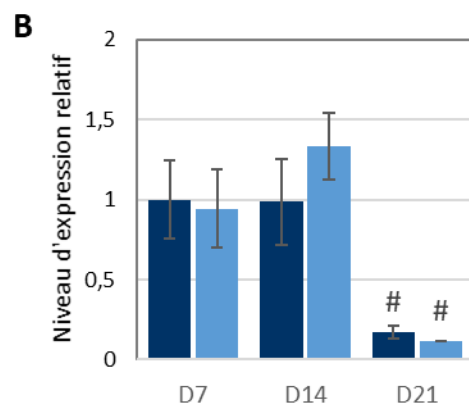


Figure 3 : Évolution de l'expression du gène *GBSSI*, lié à la biosynthèse de l'amidon de réserve, au cours du développement des microspores de blé en androgénèse. **A.** Niveaux d'expression relatif de *GBSSI* chez les microspores non stressées (D-21) et les microspores à l'issue du prétraitement (D0) ; **B.** Évolution des niveaux d'expression relatif de *GBSSI* chez les microspores au cours de la culture *in vitro*. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression ($n \geq 3$). Les dièses indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype (Analyse de la variance – $p < 0,05$).

Il n'est pas surprenant d'observer une sous-expression des gènes liés à cette voie de biosynthèse chez les plantules albinos, plantules dépourvues de chlorophylle. Enfin, les gènes *psaA* et *Lhcb1* sont également sous-exprimés chez les plantules albinos par rapport aux plantules chlorophylliennes (Figure 2D). Ces deux gènes codent, respectivement, une sous-unité du photosystème I et la protéine principale du complexe de capture de la lumière, présent dans le photosystème II. La sous-expression de ces différents gènes liés à la photosynthèse pourrait être causée par la sous-expression de *GLK1*. Ces expressions différentielles entre plantules chlorophylliennes et albinos sont probablement la conséquence de l'échec de différenciation des chloroplastes.

3. Effet du prétraitement sur les profils d'expression géniques des microspores de blé.

Au début du processus d'androgénèse, les microspores de Pavon et de Paledor ont été collectées dans les épis au même stade de développement, le stade uninucléé centré à tardif. Les mêmes modalités de prétraitement ont été appliquées, soit un stress hypothermique de 21 jours à 4°C à l'obscurité. L'expression des 20 gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, et d'un gène impliqué dans la synthèse de l'amidon de réserve a été analysée avant (D-21) et après le prétraitement (D0), chez les deux génotypes.

Le gène *GBSSI*, impliqué dans la biosynthèse de l'amidon de réserve, montre une expression 30 à 40 fois plus élevée dans les microspores chez Pavon et Paledor à l'issue du prétraitement (Figure 3A). Cette forte augmentation de son niveau d'expression peut être le signe d'un mécanisme d'accumulation de l'amidon au sein des plastes, premier signe de la différenciation des proplastides en amyloplastides. Cependant, nous ne connaissons pas l'évolution de l'expression de ce gène lors du développement normal du pollen chez le blé, et ne possédons donc pas d'outil de comparaison fiable pour conclure sur cette surexpression de *GBSSI* chez les microspores à l'issue du prétraitement par rapport aux microspores non stressées. Au cours de la culture *in vitro* des microspores, une chute significative du niveau d'expression de *GBSSI* est observée à D21 (Figure 3B) et suggère une accumulation plus faible, voire un arrêt de l'accumulation d'amidon de réserve au sein des plastes à ce stade du processus d'androgénèse.

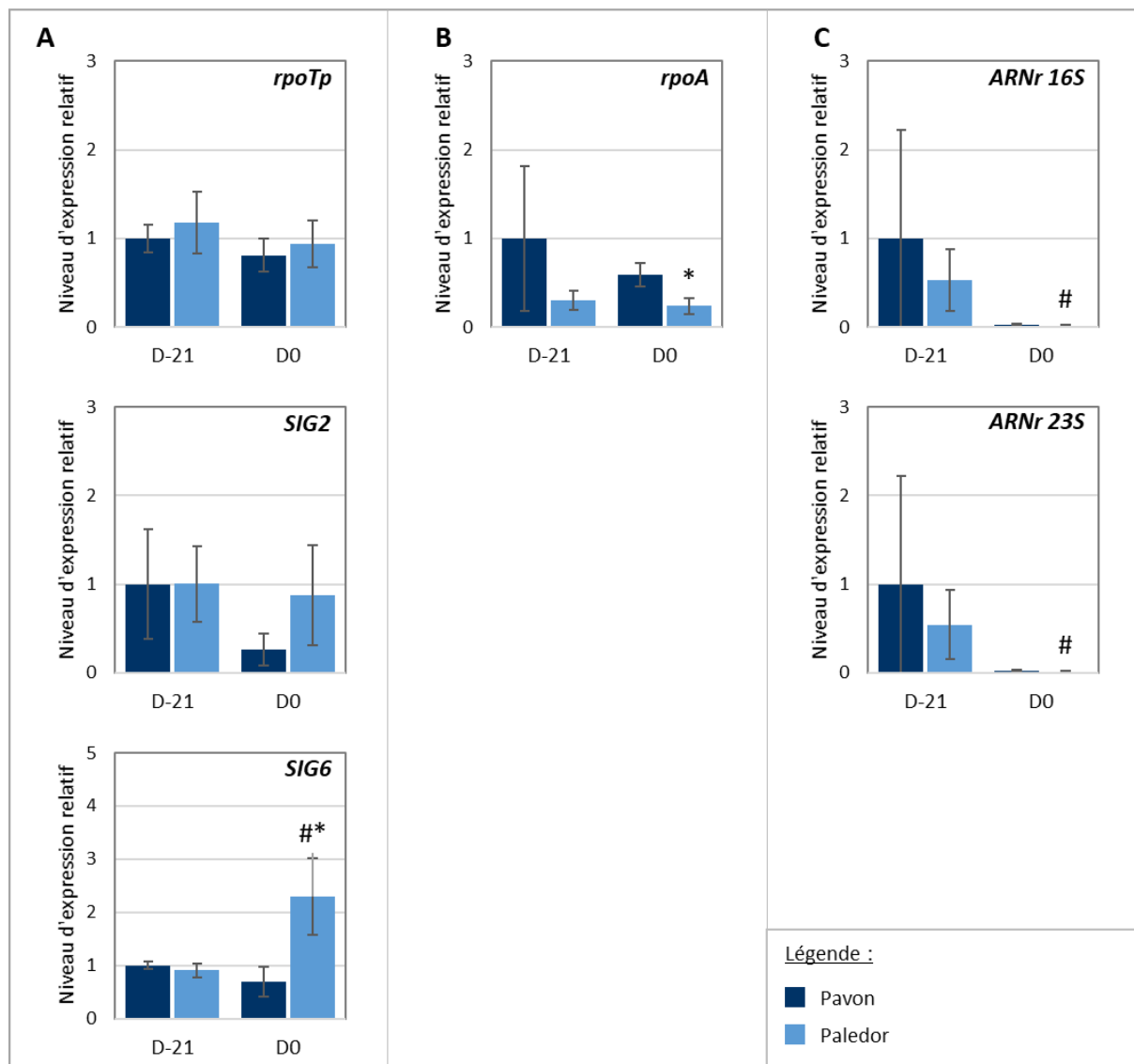


Figure 4 : Effet du prétraitement sur les profils d'expression de gènes impliqués dans la transcription et traduction plastidiales au sein des microspores de Pavon et Paledor. A, B. Niveaux d'expression relatifs des gènes codés par le noyau (A) et codé par le plaste (B) impliqués dans la machinerie transcriptionnelle des plastes. **C.** Niveaux d'expression relatif des gènes plastidiaux codant les sous-unités 16S et 23S des ARN ribosomiques, impliqués dans la machinerie traductionnelle des plastes. Le niveau d'expression relatif a été normalisé avec les microspores de Pavon avant le prétraitement (D-21). Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression ($n \geq 3$). Les astérisques indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif entre les deux génotypes à une même date de prélèvement. Les dièses indiquent une différence significative de l'expression par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype. (Analyse de la variance et Test t de Student – $p < 0,05$).

L'expression de *GBSSI* n'a pas été détectée dans les plantules *in vitro*, albinos ou chlorophylliennes.

L'effet du prétraitement sur les profils d'expression des 20 gènes candidats a été analysé au sein des microspores de Pavon et Paledor. La comparaison des niveaux d'expression de ces gènes entre D-21 et D0 des expressions différentielles suite au prétraitement, et entre les deux génotypes (Figures 4 et 5).

Au niveau de la machinerie transcriptionnelle des plastes, l'expression de la majorité des gènes reste stable après le prétraitement (Figures 4A et 4B). Nous notons toutefois des variations inter-génotype, avec, à D0, chez Paledor une sous-expression de *rpoA* et une surexpression de *S/G6* par rapport à Pavon. Les gènes codant les ANRr 16S et 23S sont largement sous-exprimés chez les deux génotypes à l'issue du prétraitement (Figure 4C). La machinerie traductionnelle des plastes semble donc peu active dans les microspores après le prétraitement.

La plupart des gènes liés à la biogénèse des chloroplastes et à la photosynthèse sont sous-exprimés chez les microspores à D0 (Figures 5B et 5C). Nous notons cependant une augmentation du niveau d'expression du gène *FtsZ* chez les microspores des deux génotypes à D0 (Figure 5D). Après l'application du stress inducteur, une partie des microspores est réorientée vers la voie de développement sporophytique. Ces microspores vont ensuite se diviser activement au cours de la culture et produire des structures multicellulaires. L'augmentation du niveau d'expression du gène *FtsZ* pourrait refléter une préparation des plastes à la division, afin de conserver une même densité de plastes par cellule au sein des microspores réorientées.

L'expression de trois gènes liés à la différenciation des chloroplastes, *Lhcb1*, *GLK1* et *GLK2*, n'a pas été détectée au sein des microspores à D0, mais leur expression a pu être quantifiée à D-21. Leur expression n'a pas non plus été détectée au cours de la culture des microspores *in vitro*, mais uniquement au stade de régénération des plantules (Figure 2). L'expression des gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle au sein des microspores à D-21 est inattendue puisque ce type de microspores

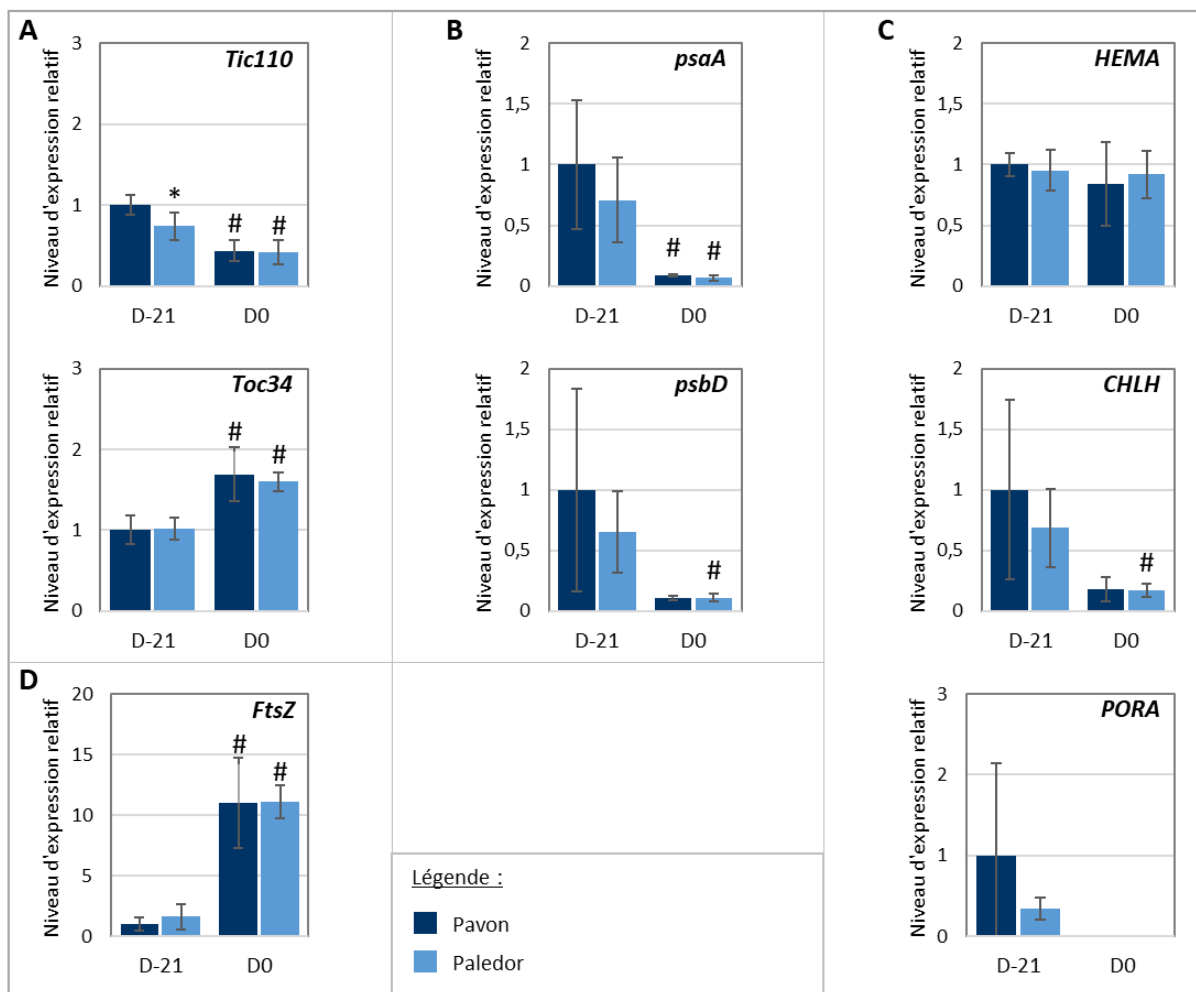


Figure 5 : Effet du prétraitement sur les profils d'expression de gènes impliqués dans le développement des plastides au sein des microspores de Pavon et Paledor. Niveaux d'expression relatifs des gènes codant pour (A) deux sous-unités des translocons de l'enveloppe interne et externe des plastides ; (B) des sous-unités des photosystèmes I et II ; (C) des enzymes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle ; (D) d'un gène impliqué dans la division plastidiale. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression ($n \geq 3$). Les astérisques indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif entre les deux génotypes à une même date de prélèvement. Les dièses indiquent une différence significative de l'expression par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype. (Analyse de la variance et Test t de Student – $p < 0,05$).

possède uniquement des proplastides. Ce niveau d'expression observé peut, soit refléter un niveau d'expression basal, soit être lié à des transferts de molécules à partir des tissus maternels vers les microspores.

La réorientation des microspores, grâce au stress inducteur, repose sur trois grandes phases : l'adaptation au stress, l'arrêt du programme de développement gamétophytique initial, et l'initiation du développement sporophytique. Cela implique donc des changements importants dans l'expression génique des microspores, avec une régulation négative de l'expression des gènes non essentiels à ce stade du processus d'androgénèse, ce que nous avons pu, en partie, mettre en évidence ici.

4. Biogénèse et développement des plastides au cours du développement sporophytique des microspores de blé *in vitro*

À D0, étape du processus d'androgénèse marquant la fin du prétraitement et l'entrée des microspores en culture *in vitro*, la population de microspores présente un niveau d'hétérogénéité plus important qu'à D-21, où la majorité des microspores non stressées étaient au stade uninucléé centré à tardif (Figures 6A et 6B). Les microspores peuvent être classées en trois groupes selon les changements morphologiques observés à D0, révélant la voie de développement empruntée. Le premier groupe de microspores possède une morphologie en étoile, morphologie déjà décrite dans les chapitres précédents, marqueur de leur réorientation vers la voie de développement sporophytique. Les microspores du deuxième groupe continuent leur développement gamétophytique, aboutissant à la formation du pollen. Et enfin, le troisième groupe rassemble la majorité des microspores, celles ne présentant aucun changement morphologique ou présentant des signes de dégénérescence, avec une plasmolyse des cellules plus ou moins avancée. Pendant les sept premiers jours de culture, les microspores non réorientées meurent rapidement. Parallèlement, l'hétérogénéité de la population de microspores réorientées augmente d'un niveau et plusieurs types de développement sont observés (Figure 6B). Une partie seulement des microspores poursuit son développement vers l'embryogénèse et se divise activement, aboutissant à la formation de structures multicellulaires à D7, toujours enfermées dans la paroi initiale d'exine. Parmi elles, certaines microspores montrent un développement plus lent

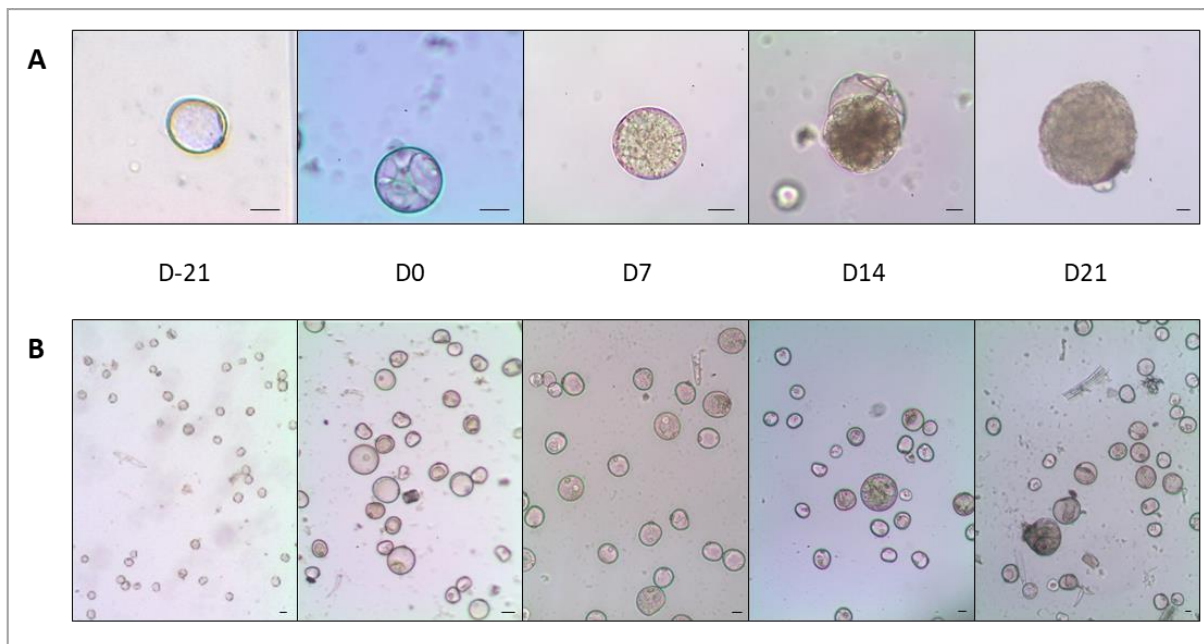


Figure 6 : Développement sporophytique des microspores de blé en culture *in vitro*. **A.** Observations microscopiques du développement de microspores de blé en androgénèse, avant le prétraitement (D-21), à l'issue du prétraitement (D0), et au cours de la culture *in vitro* (D7 à D21), jusqu'à la formation de structure androgénétique (D21). **B.** Mise en avant de l'hétérogénéité croissante des suspensions de microspores au cours du processus d'androgénèse. Barre = 20 μm.

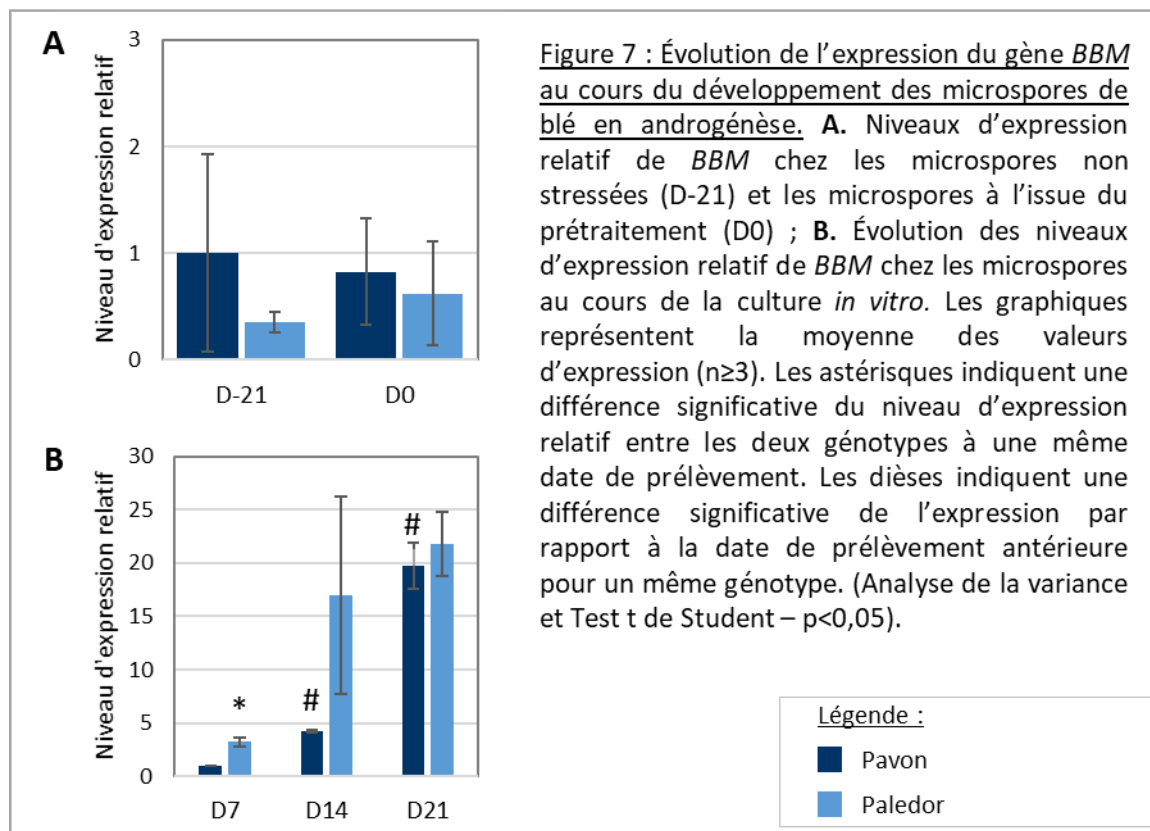


Figure 7 : Évolution de l'expression du gène *BBM* au cours du développement des microspores de blé en androgénèse. **A.** Niveaux d'expression relatif de *BBM* chez les microspores non stressées (D-21) et les microspores à l'issue du prétraitement (D0) ; **B.** Évolution des niveaux d'expression relatif de *BBM* chez les microspores au cours de la culture *in vitro*. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression (n ≥ 3). Les astérisques indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif entre les deux génotypes à une même date de prélèvement. Les dièses indiquent une différence significative de l'expression par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype. (Analyse de la variance et Test t de Student – p < 0,05).

ou dégénèrent précocement. La rupture de la paroi d'exine initiale et la libération des structures multicellulaires se produit entre D14 et D21. Leur libération aboutit à une forte augmentation de leur taille et à la formation de structures plus complexes avec une polarisation visible pour certaines d'entre elles (voir Chapitre 3). Ces structures sont visibles à l'œil nu dès 21 jours de culture et sont souvent qualifiées de pro-embryons à ce stade. Elles poursuivent ensuite leur croissance pour former des structures androgéniques macroscopiques qui sont repiquées à D35 sur milieu de régénération afin d'être converties en plantules.

Le gène *BBM* est aujourd'hui classiquement utilisé comme marqueur de l'induction de l'embryogénèse, en embryogénèse somatique et en androgénèse. Le gène *BBM* montre une expression stable entre D-21 et D0 pour les deux génotypes (Figure 7A), puis nous observons une forte augmentation de son niveau d'expression au cours de la culture des microspores, jusqu'à D21 (Figure 7B). L'augmentation de l'expression de *BBM* observée dans nos échantillons valide notre modèle d'analyse de l'expression de gènes à partir de microspores de blé isolées, et prouve que les cultures utilisées lors de cette étude contenaient bien des populations de microspores réorientées vers un développement embryogénique.

4.1. Gènes liés à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des plastides

Au cours du développement *in vitro* des microspores, l'expression du gène *rpoTp* reste stable tandis que nous observons une augmentation significative de l'expression de *rpoA* de D7 à D21 (Figures 8A et 8B). Or, entre D-21 et D0, le niveau d'expression relatif du gène *rpoTp* était comparable à celui de *rpoA* (Figures 4A et 4B). Cette augmentation significative de l'expression du gène *rpoA*, codant une sous-unité de la PEP, suggère une transition de la transcription des gènes plastidiaux, majoritairement menée par la NEP au sein des proplastides, vers une transcription dépendante de la PEP. En parallèle, une forte augmentation du niveau d'expression de *SIG2* se produit entre D14 et D21 (Figure 8A). Or le facteur *SIG2* est connu pour être impliqué dans cette transition, ce qui appuie notre hypothèse. Le niveau d'expression du facteur *SIG6* reste globalement stable de D7 à D21, tout comme celui des *ARNr 16S* et *23S* (Figure 8C).

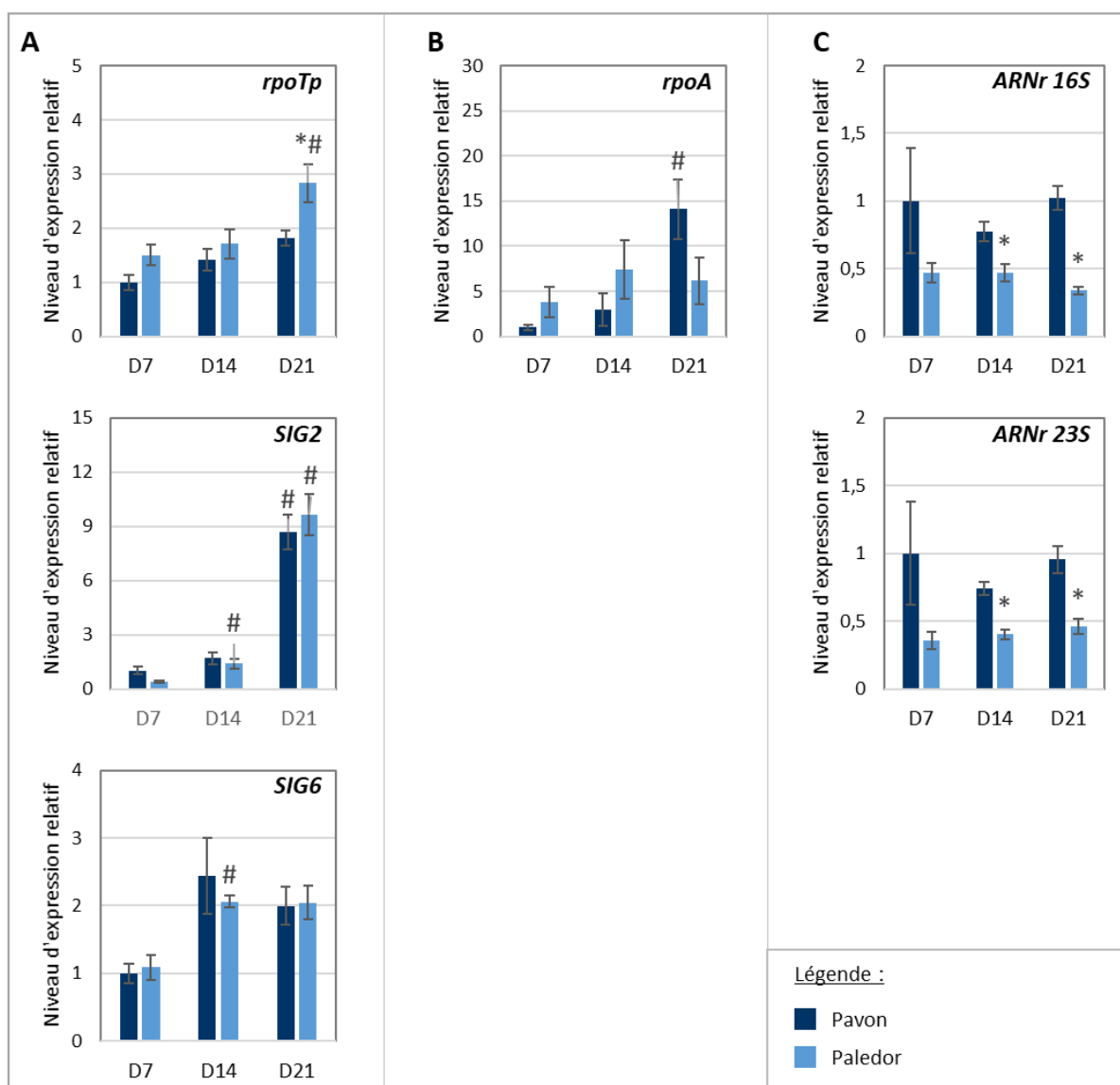


Figure 8 : Évolution de l'expression des gènes impliqués dans la machinerie transcriptionnelle et plastidiale des plastes au cours de la culture des microspores de blé. A et B. Niveaux d'expression relatif des gènes liés à la transcription plastidiale, codés par le génome nucléaire (A) ou par le génome plastidial (B) ; **C.** Niveaux d'expression relatif des gènes liés à la traduction plastidiale. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression ($n \geq 3$). Les astérisques indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif entre les deux génotypes à une même date de prélèvement. Les dièses indiquent une différence significative de l'expression par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype. (Analyse de la variance et Test t de Student – $p < 0,05$).

4.2. Gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, à la photomorphogénèse et à la photosynthèse.

À ce stade du processus d'androgénèse, les microspores sont cultivées à l'obscurité. Comme nous l'attendions, l'expression de *HY5*, régulateur positif de la photomorphogénèse à la lumière, est sous- régulée (Figure 9A). Aucune augmentation de l'expression de *COP1*, répresseur de *HY5* à l'obscurité, n'a été cependant détectée au cours de la culture des microspores. Mais *HY5* peut également être réprimé par d'autres gènes, comme *DET1*, *COP3* ou *DBD1*, dont l'expression n'a pas été étudiée ici.

Les gènes *psaA* et *psbD*, codant respectivement des sous-unités des PSI et PSII, montrent une augmentation significative de leurs niveaux d'expression entre D7 et D14 (Figure 9B). Leurs niveaux d'expression restent ensuite stables entre D14 et D21. De plus, nous observons une augmentation de l'expression des gènes liés à la voie de biosynthèse de la chlorophylle, dont *HEMA*, codant la première enzyme de cette voie de biosynthèse (Figure 9C). Le gène *CHLH* est détecté pour la première fois au cours de la culture *in vitro* des microspores à D21 et le gène *PORA* à D14 (Figure 9C). Prises ensemble, ces données pourraient indiquer un début de mise en place des premiers éléments des photosystèmes. Ces résultats suggèrent donc l'initiation de la transition proplaste-chloroplaste, ou la différenciation des amyloplastes en chloroplastes. La chute significative du niveau d'expression du gène *GBSSI* observée à D21 (Figure 3B) appuie également cette hypothèse. Nous formulons donc l'hypothèse suivante : entre D7 et D21, en culture de microspores, l'expression différentielle de plusieurs gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes reflète une initiation précoce de la mise en place des photosystèmes. Cette étape nécessite l'accumulation très précoce d'un certain nombre de métabolites, qui permettront par la suite un assemblage rapide et fonctionnel des photosystèmes, dès la perception des premiers signaux lumineux. Cette hypothèse serait à vérifier par des études et analyses complémentaires, notamment aux niveaux des protéines et en microscopie.

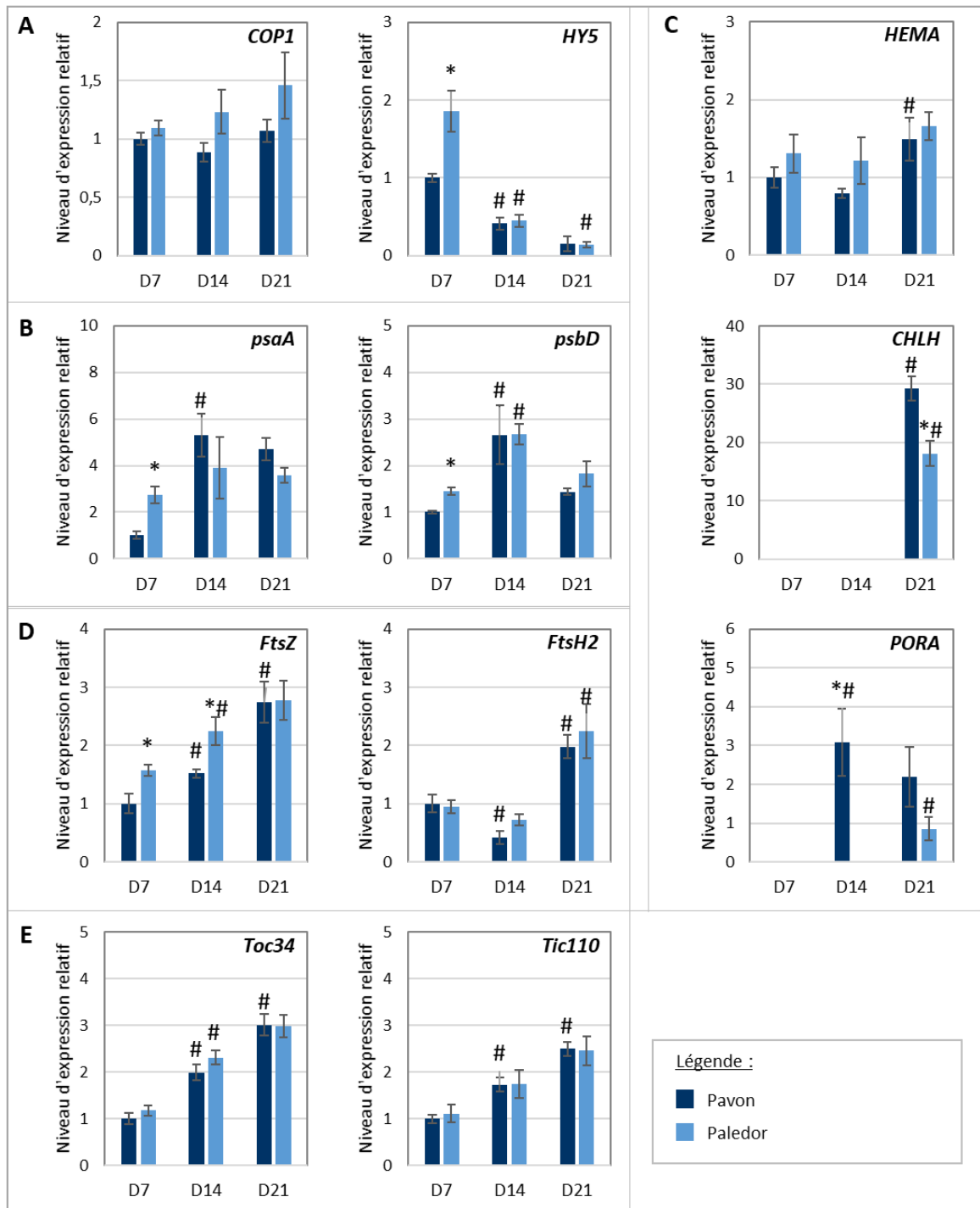


Figure 9 : Évolution des profils d'expression de gènes liés à la biogénèse des chloroplastes, à la régulation de leur développement, et à la photomorphogénèse chez les microspores de Pavon et Paledor au cours de la culture *in vitro*. Niveaux d'expression relatifs des gènes codant pour **A.** Des régulateurs de la photomorphogénèse à l'obscurité (*COP1*) et à la lumière (*HY5*) ; **B.** Des sous-unités des photosystèmes I et II ; **C.** Des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle ; **D.** *FtsZ* impliqué dans la division plastidiale, et *FtsH2* lié à la formation des thylakoïdes et au renouvellement des protéines des photosystèmes ; **E.** Des sous-unités des translocons des enveloppes externe et interne des plastes. Les graphiques représentent la moyenne des valeurs d'expression ($n \geq 3$). Les astérisques indiquent une différence significative du niveau d'expression relatif entre les deux génotypes à une même date de prélèvement. Les dièses indiquent une différence significative de l'expression par rapport à la date de prélèvement antérieure pour un même génotype. (Analyse de la variance et Test t de Student – $p < 0,05$).

Nous avons observé précédemment une augmentation de l'expression du gène *FtsZ*, impliqué dans le mécanisme de division des plastes, à l'issue du prétraitement. Son expression continue d'augmenter de façon significative au cours de la culture des microspores (Figure 9D). Cette variation de l'expression du gène *FtsZ* de D7 à D21 semble indiquer une forte activité de division des plastes au sein des microspores, liée à la nécessité de conserver une même densité de plaste par cellule, ou d'augmenter cette densité au cours de la formation et du développement des structures multicellulaires. L'augmentation de l'expression des gènes *Toc34* et *Tic110* à partir de D14 (Figure 9E) pourrait être en lien avec cette activité de division des plastes ou pourrait également refléter un import plus important de protéines cytosoliques au sein des plastes. Nous observons d'ailleurs une expression plus élevée du gène *FtsH2* à D21 (Figure 9D). Ce gène est impliqué dans la formation des thylakoïdes, le renouvellement et le recyclage des protéines des photosystèmes.

Au cours de la culture des microspores *in vitro*, parallèlement à la formation des structures multicellulaires et des premières structures androgéniques après la rupture de l'exine, les plastes semblent également se développer et montrer une activité de division plus importante, probablement pour conserver ou augmenter la densité de plastes par cellule. De plus, les données générées semblent mettre en avant, entre D7 et D21, les premiers signes de l'initiation de la différenciation des proplastes en chloroplastes, avec la transition d'une transcription NEP-dépendante vers une transcription dépendante de la PEP, et la plus forte expression de gènes codant pour des métabolites requis pour la mise en place des membranes des thylakoïdes et la formation des photosystèmes.

5. Mise en évidence de profils d'expression génique différents chez le génotype récalcitrant au cours de la culture des microspores isolées

L'utilisation de deux génotypes présentant des caractéristiques de régénération en plantules différentes permet d'étudier les différences d'expression génique, qui pourraient être liées, pour le génotype de blé de printemps Pavon, à la régénération de plantules chlorophylliennes et albinos, et, pour le génotype de blé d'hiver Paledor, à la production de plantules albinos uniquement.

La première différence significative au niveau de l'expression des gènes étudiés est l'absence d'augmentation du niveau d'expression du gène *rpoA* chez Paledor, contrairement à Pavon (Figure 8B). A l'inverse, chez Paledor, nous observons une augmentation significative de l'expression du gène *rpoTp* au cours de la culture (Figure 8A). L'absence d'augmentation du niveau d'expression du gène *rpoA*, codant une sous-unité de la PEP, suggère une plus faible activité de la PEP au sein des plastides de Paledor par rapport à Pavon. Le facteur SIG2 présente un profil d'expression similaire pour les deux génotypes, avec une augmentation de son niveau d'expression au cours de la culture (Figure 8A). La transition vers une transcription PEP-dépendante ne semble donc pas se mettre en place au sein des microspores en culture de Paledor, contrairement à ce que nous avons pu mettre en évidence pour le génotype Pavon.

Les gènes codant les sous-unités 16S et 23S des ARNr sont sous-exprimés chez Paledor par rapport à Pavon reflétant potentiellement une activité de traduction plus faible au sein des plastides du génotype récalcitrant durant les étapes précoces de l'androgénèse (Figure 8C). Un niveau de transcription élevé de ces ARNr plastidiaux étant seulement obtenu par une transcription dépendante de la PEP, le profil de sous-expression de ces deux gènes chez Paledor conforte notre hypothèse d'une transition vers une transcription PEP-dépendante altérée au sein des micropores du génotype récalcitrant durant les 21 premiers jours de culture.

À D7, nous avons relevé une surexpression des gènes *psaA* et *psbD* chez Paledor par rapport à Pavon (Figure 9B). L'expression de ces deux gènes retrouve ensuite un niveau similaire à celle du génotype de blé de printemps. Ceci suggère que la transcription des gènes liés aux PS n'est pas bloquée chez le génotype produisant uniquement des plantules albinos à ce stade du processus d'androgénèse. Il faut toutefois noter que nous analysons ici des données du niveau d'expression de gènes par PCR quantitative, et que la détection de l'expression et la surexpression de ces gènes n'impliquent pas forcément une traduction plus élevée des protéines. L'expression des gènes *PORA* et *CHLH* est détectée pour la première fois au cours de la culture des microspores de Paledor à D21, de façon plus tardive que chez Pavon (Figure 9C). De plus, le gène *CHLH* est sous-exprimé chez Paledor par rapport à Pavon.

Ces résultats confortent notre hypothèse d'une absence de transition vers une transcription PEP-dépendante des gènes plastidiaux chez Paledor, contrairement à ce qu'il semble se produire au sein des plastides de Pavon au cours de la culture des microspores. Cet

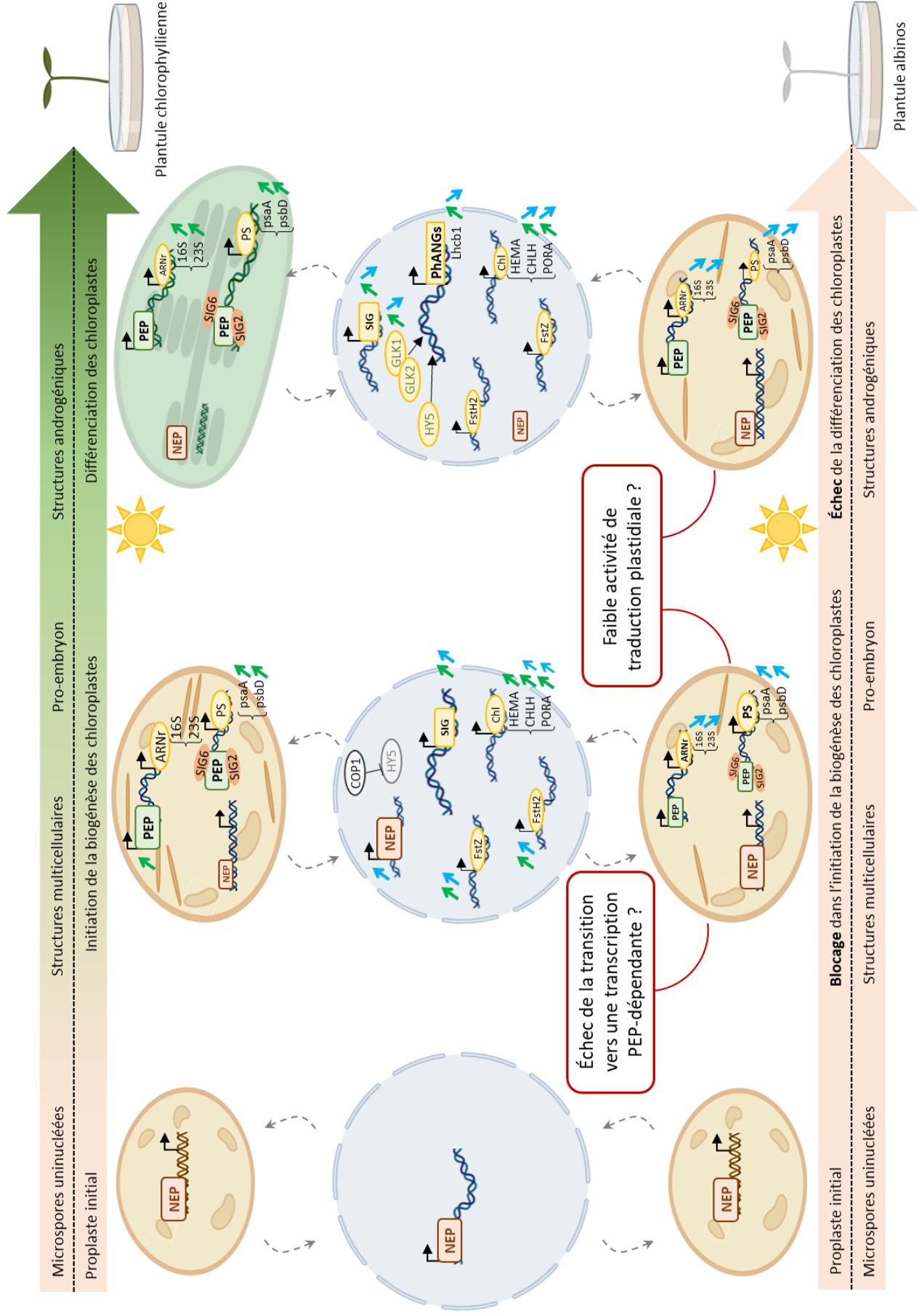
échec pourrait donc entraîner un arrêt de la différenciation des chloroplastes à un stade précoce de leur biogénèse. Toutefois, les gènes liés aux photosystèmes et à la biosynthèse de la chlorophylle présentent des profils d'expression similaires entre les deux génotypes, avec cependant une augmentation du niveau d'expression plus tardive chez Paledor. Cela nous mène à penser que le développement des plastes pourrait être plus lent ou plus tardif chez le génotype de blé d'hiver. Nous avons précédemment démontré que le développement des microspores et des structures androgéniques de Paledor était globalement plus lent que celui de Pavon dans nos conditions de culture (Chapitre 3). La transition vers une transcription PEP-dépendante pourrait donc soit échouer, soit se faire de manière plus tardive chez le génotype de blé d'hiver. Dans les deux cas, cela impacterait l'expression des gènes liés à la biogénèse des chloroplastes et à la photomorphogénèse, bloquant ainsi leur différenciation de façon très précoce au cours du processus d'androgénèse, bien avant la régénération des plantules.

Ces résultats démontrent que des événements précoces se produisent dans le développement des plastes entre le 7^{ème} et 21^{ème} jour de culture des microspores. L'hypothèse d'un blocage précoce de la différenciation des proplastes en chloroplastes au cours du processus d'androgénèse se confirme donc.

Discussion

Les causes et mécanismes conduisant à la formation de plantules albinos en androgénèse chez les céréales restent, encore aujourd’hui, largement inconnus. De nombreux efforts ont été effectués ces vingt dernières années pour tenter d’appréhender au mieux ce problème majeur et proposer des solutions. Mais à ce jour, aucune ne permet de lever le verrou de l’albinisme.

L’approche moléculaire par l’analyse de l’expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au sein de populations de microspores a été mise en place pour la première fois chez le blé dans cette étude, au cours des phases précoces du processus d’androgénèse. Jusqu’à présent, les travaux ont été menés sur la comparaison au niveau des plantules chlorophylliennes et albinos, ou en transcriptomique globale par des techniques de séquençage à haut débit, comme le RNAseq (Zhao et al., 2017). Avant d’étudier les phases précoces de l’androgénèse, nous avons, nous aussi, analysé les profils d’expression d’une vingtaine de gènes sélectionnés pour leur rôle connu dans l’activité des plastides dans des plantules de blé régénérées *in vitro*. Dans un premier temps, l’étude comparative des plantules albinos régénérées en androgénèse à partir de deux génotypes de blé à la réactivité contrastée nous a permis de mettre en évidence des profils d’expression similaires. Les plantules albinos de Pavon et Paledor régénérées *in vitro* présentaient le même niveau d’expression relatif pour tous les gènes étudiés. Cela pourrait suggérer qu’un même blocage mène à la régénération de plantules albinos pour les deux génotypes, mais affecte le génotype Pavon de façon moins importante que le génotype récalcitrant Paledor. Mais ces profils d’expression génique pourraient également être la conséquence de boucles de régulation et de rétroaction provoquant la répression de gènes différents, se traduisant, au stade plantule, par un profil d’expression identique pour les gènes étudiés ici. Dans un second temps, la comparaison des profils d’expression des plantules albinos des deux génotypes de blé par rapport aux plantules chlorophylliennes de Pavon, nous a permis de mettre en évidence d’importantes sous-expression de gènes impliqués à différents niveaux de la biogénèse et de la différenciation des chloroplastes, et de la régulation de leur développement (Figure 10).



◀ Figure 10 : Expression différentielle des gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au cours de l'androgénèse. La partie haute du schéma correspond à une biogénèse et différenciation de chloroplastes fonctionnels, aboutissant à la formation de plantules chlorophylliennes. La partie basse du schéma représente l'échec de la biogénèse des chloroplastes se déroulant au sein des structures multicellulaires et pro-embryons dérivant de microspores, menant à la régénération de plantules albinos. Les différences de niveau d'expression des gènes étudiés entre les deux génotypes sont représentées par des flèches bleues pour Paledor et des flèches vertes pour Pavon. Les flèches en pointillé gris symbolisent la signalisation antérograde et rétrograde entre le noyau et le plaste.

Ces résultats sont en accord avec les données générées dans les études menées en RNAseq, où les auteurs ont montré une expression différentielle des gènes liés à l'appareil photosynthétique, notamment des gènes codant des composants des membranes des thylakoïdes et de l'enveloppe du chloroplaste, et des gènes liés à la voie de biosynthèse de la chlorophylle chez les plantules albinos d'orge et de blé par rapport aux plantules chlorophylliennes régénérées *in vitro* (Muñoz-Amatriaín et al., 2009; Zhao et al., 2017). Dans notre étude, la plupart de ces gènes nucléaires, comme *Lhcb1*, *CHLH* et *PORA*, sont sous-exprimés par rapport aux plantules chlorophylliennes de Pavon, et la sous-régulation de leur transcription pourrait être provoquée par la sous-expression du gène *GLK1*. Des profils d'expression similaires ont été rapportés chez les plantules albinos d'orge (Gajecka et al., 2021). Les facteurs de transcription GLK régulent l'expression des *PhANGs*, gènes nucléaires liés à la photosynthèse, lors de la photomorphogénèse chez les plantes et sont requis pour le développement des chloroplastes (Chen et al., 2016; Waters et al., 2009). De plus, la régulation des facteurs de transcription GLK fournit également un signal antérograde, du noyau vers le plaste, afin d'indiquer aux plastes l'induction de la photomorphogénèse (Oh and Montgomery, 2014). *GLK1* et *GLK2* sont partiellement redondants et fonctionnellement équivalents. Dans cette étude, le niveau d'expression du gène *GLK2* s'est révélé similaire entre les plantules chlorophylliennes et albinos de blé. Malgré cela, *GLK2* ne semble pas compenser la sous-expression de *GLK1*, ce qui entraîne la sous-régulation de la transcription des *PhANGs* et autres gènes impliqués dans la biosynthèse de la chlorophylle. Chez *Arabidopsis*, le double mutant *glk1glk2* présente un phénotype vert pâle (Fitter et al., 2002). Les plastes du mutant montrent une réduction du nombre de thylakoïdes, avec un échec des membranes à former des grana. Le double mutant *glk1glk2* présente également des niveaux réduits de transcrits et protéines, notamment pour les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle, comme *CHLH* et *PORA*, et les gènes codant les complexes de capture de la

lumière (LHC), dont *Lhcb1*. L'abondance réduite des thylakoïdes serait d'ailleurs liée à la réduction des niveaux d'expressions des LHC et de la faible production de chlorophylle, tous deux nécessaires à l'assemblage des membranes thylakoïdiennes (Waters et al., 2009). Néanmoins, nos résultats montrent que de nombreux gènes liés à la photosynthèse et codés par le plaste sont encore exprimés chez les plantules albinos de Pavon et Paledor, signe que leur transcription est toujours active chez ces plantules, malgré l'absence de chloroplastes fonctionnels. La présence de transcrits au sein de ces plantules ne signifie pas pour autant qu'ils sont ensuite traduits en protéines. La très faible expression des gènes codant les sous-unités ribosomiques plastidiales 16S et 23S suggère une activité traductionnelle au sein des plastides très faible voire inexistante pour les plantules albinos. Cette sous-expression des gènes codant les ARNr 16S et 23S a déjà été décrite chez les plantules albinos de blé. Elle serait due à la réduction du nombre de copies de l'ADN plastidial, notamment au niveau des régions codant pour les gènes *rbcl*, *psbD*, et les deux sous-unités ribosomiques 16S et 23S (Day and Ellis, 1985; Harada et al., 1991). L'étude de l'expression de ces différents gènes au sein des plantules ne nous permet donc pas d'identifier la ou les causes du blocage de la différenciation des proplastides en chloroplastes mais nous permet d'avoir une vue d'ensemble des conséquences sur les profils d'expression génique des plantules albinos.

Au cours de la culture *in vitro* des microspores de blé, nous avons étudié l'expression du gène *BBM*, gène marqueur fiable de l'induction de l'embryogénèse bien connu et largement utilisé en embryogénèse somatique et en androgénèse (Boutillier et al., 2002; Jha and Kumar, 2018; Nic-Can et al., 2013). La détection et l'augmentation de son expression au cours de la culture des microspores de blé ont confirmé le développement embryogénique de nos cultures cellulaires, que nous avons observé en microscopie et rapporté dans le chapitre 3. De plus, cette variation d'expression est en accord avec celle rapportée par Bilichak et al. (2018) dans leurs cultures de microspores de blé. Ces résultats nous ont donc permis de valider notre méthode d'analyse d'expression de gènes au sein des cultures de microspores de blé *in vitro*.

De nombreuses expressions différentielles entre les deux génotypes de blé étudiés ont pu être mises en avant tout au long du processus d'androgénèse. Malgré l'hétérogénéité et la complexité des populations de microspores de blé en culture, et le fait que nous ne puissions pas différencier ni trier les microspores qui vont régénérer des plantules chlorophylliennes de

celles qui produiront des plantules albinos, nous pouvons détecter des variations fines d'expression de gènes candidats, ce qui finit de valider notre modèle d'étude. Il est très probable que l'utilisation d'un génotype régénérant une proportion plus importante de plantules chlorophylliennes permettrait d'accroître le niveau de significativité de ces expressions différentielles voire même d'en souligner de nouvelles.

Dans une récente étude, l'expression du gène *GBSSI* a été rapportée comme un marqueur fiable de la biosynthèse et de l'accumulation de l'amidon dans les microspores d'orge (Gajecka et al., 2020). Les auteurs ont criblé 10 génotypes d'orge, présentant différents taux de régénération en plantules albinos et ont ensuite pu montrer une activation précoce de ce gène chez les microspores issues des génotypes produisant majoritairement des plantules albinos. Les auteurs proposent donc le gène *GBSSI* comme marqueur précoce du potentiel androgénique des génotypes d'orge, reflétant sa capacité à régénérer des plantules chlorophylliennes. De plus, ils ont montré dans une autre étude que l'expression du gène *GBSSI* diminue rapidement au cours de la culture des microspores d'orge (Gajecka et al., 2021). Dans nos travaux, chez le blé, l'expression du gène *GBSSI* chez les microspores au cours du processus d'androgénèse varie de façon opposée à celle décrite chez l'orge. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation importante de son expression à l'issue du prétraitement, et de façon similaire pour les deux génotypes de blé étudiés. Pour ces deux raisons, ce gène ne semble donc pas être un marqueur de l'albinisme adapté en androgénèse chez le blé. L'augmentation de l'expression de *GBSSI* au cours du développement *in vitro* des microspores suggère une accumulation de l'amidon au sein des plastides, qui semblent donc se différencier en amyloplast. Une telle différenciation des proplastides au sein des microspores réorientées a déjà été mise en évidence par des études microscopiques chez l'orge (Careda et al., 1999, 2000). La forte diminution de son expression aux alentours du 21^{ème} jour de culture *in vitro* chez les microspores des deux génotypes de blé, et l'absence de détection de ce gène chez les plantules chlorophylliennes et albinos, suggèrent une diminution puis un arrêt de l'accumulation de l'amidon chez les microspores, avec potentiellement une dédifférenciation des amyloplastides en un autre type de plastides.

La biogénèse des chloroplastes est régie par différents mécanismes de signalisation et régulation permettant la coordination des génomes nucléaire et plastidial (Gray et al., 2003). Les premiers points de contrôle de cette biogénèse sont une transcription et une traduction actives, efficaces et appropriées au sein des plastides (Jarvis and López-Juez, 2013; Møller et al.,

2014). La transcription plastidiale est médiée par deux ARN polymérases (Börner et al., 2015), l'une codée par le noyau (NEP), et l'autre codée par le plaste (PEP). Elles permettent toutes deux la transcription des gènes codés par le génome plastidial. Lors des étapes précoces de la biogénèse des chloroplastes, cette transcription est majoritairement effectuée par la NEP (Møller et al., 2014). Les gènes transcrits sont principalement des gènes de ménage, et les gènes *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*, codant trois des quatre sous-unités de la PEP (Pfannschmidt et al., 2015). Au cours de la biogénèse des chloroplastes, une transition s'effectue au niveau de la nature de l'ARN polymérase majoritairement impliquée dans la transcription des gènes plastidiaux. La transcription plastidiale devient alors préférentiellement médiée par la PEP, polymérase codée par le génome plastidial (Börner et al., 2015). Cette transition vers une transcription PEP-dépendante est essentielle pour la biogénèse des chloroplastes. En effet, seule une transcription dépendante de la PEP permet d'obtenir un niveau de transcription élevé au sein des plastes en vue de l'élaboration de la machinerie photosynthétique et donc de leur différenciation (Cahoon et al., 2004). Au cours de la culture *in vitro* des microspores, une augmentation significative de l'expression du gène *rpoA* a été mise en évidence dans nos travaux chez le génotype de blé de printemps, tandis que le niveau d'expression de la NEP restait stable. Le gène *rpoA* code pour la sous-unité α de la PEP et fait partie d'un cluster de gènes sous promoteur PEP (Börner et al., 2015). Ce gène est préférentiellement transcrit par la PEP elle-même (Finster et al., 2013). L'augmentation de son niveau d'expression reflète donc une activité croissante de la PEP au sein des microspores de Pavon, entre D7 et D21. De plus, nous avons observé en parallèle l'augmentation de l'expression du gène *SIG2*. Ce facteur nucléaire est impliqué dans la transition vers la transcription PEP-dépendante en favorisant la transcription du gène codant le Glu-tRNA. Cet ARNt va ensuite se lier à la NEP et inhiber son activité (Hanaoka et al., 2005; Kanamaru et al., 2001). La transition vers une transcription des gènes plastidiaux dépendante de la PEP semble donc se mettre en place au cours de la culture des microspores de Pavon et pourrait être le premier signe de la biogénèse des chloroplastes au sein des microspores. À l'inverse, chez le génotype Paledor, aucune augmentation de la transcription du gène *rpoA* n'a été observée mais nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de l'expression du gène *rpoTp*, sous-unité de la NEP, à D21. Chez *Arabidopsis*, une faible activité de la PEP entraîne une augmentation de l'activité de la NEP (Woodson et al., 2013), ce qui pourrait également être le cas pour les microspores de Paledor. De plus, une mutation knockout de la PEP provoque un phénotype albinos et une absence de

photosynthèse (Allison et al., 1996; Legen et al., 2002) alors que la mutation knockout de la NEP entraîne seulement un retard de développement des chloroplastes (Baba et al., 2004; Hricová et al., 2006). La transition vers une transcription PEP-dépendante pourrait donc ne pas se produire au sein des cultures de microspores de Paledor, provoquant la régénération de plantules albinos uniquement (Figure 10). Des résultats similaires ont été rapportés chez l'orge en androgénèse, où les auteurs rapportent que la régénération de plantules albinos chez le génotype récalcitrant était due à l'échec de la transition vers une transcription dépendante de la PEP (Gajecka et al., 2021). Cette absence de transition est associée à l'altération de la différenciation des chloroplastes et à l'incapacité du génotype à régénérer des plantules chlorophylliennes. Les auteurs ont rapporté une mise en place de cette transition assez tardive au cours du processus d'androgénèse chez l'orge : entre 43 et 56 jours de culture *in vitro*, lors de la conversion des embryons en plantules. Nos résultats sont différents et suggèrent que, chez le blé, cette transition vers une transcription PEP-dépendante s'effectue de manière bien plus précoce pendant la culture des microspores, entre D7 et D21. À ce stade de la culture, les microspores réorientées se sont développées en structures multicellulaires, qui sont ensuite libérées de la paroi initiale d'exine après 14 à 21 jours de culture⁴, et forment alors des pro-embryons. Ces résultats confortent donc notre hypothèse initiale d'un blocage précoce de la différenciation des proplastides en chloroplastes au sein des microspores.

Différents résultats générés dans cette étude nous ont permis de formuler l'hypothèse d'une mise en place précoce des premiers éléments nécessaires à la biogénèse des chloroplastes au cours du processus d'androgénèse. En effet, nous pensons que la formation et le développement des chloroplastes nécessitent, dans un premier temps et de façon indépendante de la lumière, l'importation, la production et l'accumulation au sein des plastides indifférenciés de transcrits, de protéines et de métabolites requis pour la formation des membranes des thylakoïdes et de leurs complexes protéiques. Cette accumulation permettrait ensuite, lors de la perception des premiers signaux lumineux, une différenciation rapide et efficace en chloroplastes fonctionnels. Au cours du processus d'androgénèse, l'augmentation significative des niveaux d'expression des gènes plastidiaux *psaA* et *psbD*, et des gènes nucléaires *FstZ*, *FtsH2*, *CHLH* et *PORA* se produisant dans les populations de microspores de Pavon et Paledor entre D7 et D21, conforte cette hypothèse (Figure 10). L'expression croissante des gènes *psaA* et *psbD* codant des sous-unités des photosystèmes I

et Il pourrait être liée au début de la mise en place des complexes protéiques et photosynthétiques au sein des plastes. L'augmentation concomitante du niveau d'expression du gène *FtsH2* appuie ce résultat, *FtsH2* étant impliqué dans la formation des thylakoïdes, dans le recyclage et le renouvellement des protéines des photosystèmes (Maraschin et al., 2006; Yu et al., 2004b). De plus, l'augmentation de l'expression des gènes codant les sous-unités Toc34 et Tic110 suggère une augmentation de l'activité d'import des protéines cytosoliques au sein des plastes. Des analyses complémentaires, notamment en protéomique, permettraient de valider l'augmentation de cette activité ainsi que le type de protéines importées. La mutation knockout d'une ou plusieurs sous-unités du translocon Toc ou Tic entraîne, chez *Arabidopsis*, un blocage dans la différenciation des chloroplastes provoquant un phénotype albinos (Jarvis, 2008). Les gènes *PORA* et *CHLH*, impliqués dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle, sont détectés pour la première fois, chez le génotype Pavon, à partir de 14 et 21 jours de culture respectivement. Chez les Angiospermes, l'enzyme PORA n'est active qu'en présence de lumière et est impliquée dans la dernière étape de cette voie de biosynthèse (Yuan et al., 2017). L'expression de ces gènes suggèrent une accumulation de transcrits précurseurs de la chlorophylle au sein des plastes des microspores, qui permettraient une synthèse rapide de chlorophylle en réponse à la lumière. La chlorophylle est nécessaire pour l'assemblage des photosystèmes (Waters and Langdale, 2009), où elle est liée aux protéines de la famille des LHC (Light Harvesting Complex). Le transcrit du gène *Lhcb1*, codant la principale protéine de cette famille, n'a pas été détecté au sein des microspores en culture, qui sont, à ce stade, cultivées à l'obscurité et ne contiennent donc pas de chlorophylle. L'expression croissante des différents gènes *psaA*, *psbD*, *FtsH2*, *CHLH* et *PORA*, confirme donc une initiation précoce de la biogénèse des chloroplastes avec une accumulation de transcrits, et peut-être des protéines associées, au sein des structures multicellulaires et des pro-embryons de blé, comme nous le suggérons. Cette étape précoce de la biogénèse permet de rassembler et d'accumuler tous les éléments qui seront ensuite nécessaires à la formation des thylakoïdes et des complexes photosynthétiques permettant la différenciation de chloroplastes fonctionnels. De plus, ces résultats sont confortés par les données de microscopie électronique rapportées chez l'orge en androgénèse, où des ébauches de thylakoïdes ont pu être observées après 12 à 21 jours de culture *in vitro* au sein des microspores (Careda et al., 1999, 2000, 2004). Les auteurs ont présenté ces ébauches comme des structures juvéniles de thylakoïdes (Careda et al., 1999). Dans notre étude, le génotype

récalcitrant Paledor, qui ne régénère que des plantules albinos, a montré, tout comme le génotype de printemps Pavon, une augmentation de l'expression des gènes *psaA*, *psbD*, *FtsH2*, *CHLH* et *PORA*. Cependant, l'activation de la transcription des gènes codant les enzymes CHLH et PORA s'est faite de manière plus tardive chez le génotype récalcitrant où nous avons détecté pour la première fois leur expression à D21, alors que cette détection s'est effectuée, chez Pavon, à D21 et D14 respectivement. Une accumulation de transcrits et de protéines semblent donc avoir lieu au sein des plastes de Paledor mais de manière plus tardive au cours de la culture *in vitro* des microspores, par rapport au génotype Pavon. Le stade d'activation de la transcription des gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au cours du processus d'androgénèse semble donc être le point crucial permettant ensuite la réussite de leur différenciation en organites fonctionnels. Les profils d'expression de ces gènes ont montré, chez Paledor, un niveau d'expression relatif parfois supérieur à celui de Pavon. Le niveau d'expression de ces gènes est donc moins important que l'étape du processus à laquelle leur transcription est activée.

L'approche moléculaire mise en place dans cette étude nous permet de mettre en avant des variations d'expression de gènes et de comparer les niveaux d'expression entre les deux génotypes de blé étudiés. Nous ne possédons aucune information sur la traduction de ces transcrits en protéines. Néanmoins, l'étude de l'expression des gènes codant les sous-unités ribosomiques plastidiales 16S et 23S nous donne de précieuses informations sur la potentielle activité traductionnelle au sein des plastes des microspores et plantules de blé *in vitro*. Ces deux sous-unités forment le ribosome 70S et sont essentielles à la traduction dans les plastes. L'absence ou la sous-expression de ces sous-unités provoque la déplétion des ribosomes et par conséquent une absence de traduction des gènes plastidiaux (Tiller and Bock, 2014). Or cette traduction est requise pour la biogénèse et la différenciation des chloroplastes. Ces deux gènes sont sous-exprimés chez les structures multicellulaires et les pro-embryons de Paledor au cours de la culture *in vitro* ce qui suggère une activité de traduction plus faible chez ce génotype (Figure 10). L'absence ou la sous-expression des gènes codant les ARN ribosomiques plastidiaux 16S et 23S a été rapportée chez d'autres mutants albinos (Hess et al., 1994; Zubko and Day, 2002). Parmi eux, le mutant *albostrian* de l'orge, qui possèdent des feuilles blanches, est dépourvu de ribosomes plastidiaux, ce qui provoque une accumulation très réduite en protéines liées à la photosynthèse au sein des plastes. La sous-régulation des ARN ribosomiques 16S et 23S semblent donc être un élément majeur dans la

régénération de plantules albinos. Leur faible expression chez le génotype récalcitrant Paledor sous-entend une faible activité traductionnelle, qui pourrait provoquer une faible accumulation de certaines protéines essentielles chez ce génotype. Lors des étapes plus tardives du processus d'androgénèse, notamment lors de la subculture des structures androgéniques sur milieu de régénération, marquant l'initiation de leur conversion en plantules, les plastes de Paledor ne contiendraient pas tous les éléments nécessaires à la différenciation des chloroplastes. Lors de l'exposition à la lumière, l'absence de certaines de ces protéines essentielles au sein des plastes provoquerait alors l'absence de formation de chloroplastes fonctionnels, se traduisant par la régénération de plantules albinos. Une seconde hypothèse serait que les plastes de Paledor contiennent tous ces éléments, mais en quantité insuffisante pour induire la différenciation et la maturation de chloroplastes fonctionnels.

Nous ne connaissons pas pour le moment le ou les facteurs provoquant la sous-régulation des gènes codant les ARN ribosomiques plastidiaux au cours du développement des microspores en androgénèse. Cependant, il est intéressant de noter que les gènes codant les protéines ribosomiques et le gène *rpoA* font partie du même cluster de gènes plastidiaux, et sont sous promoteur PEP. Leur sous-régulation au sein des microspores en culture de Paledor pourrait être liée à l'absence d'une transcription PEP-dépendante. En androgénèse, très peu de plantules albinos sont régénérées chez les Dicotylédones. Cette proportion de plantules albinos est si faible qu'elle n'est en aucun cas un point de blocage dans la technique, contrairement aux Monocotylédones où les plantules albinos représentent souvent plus de la majorité des plantules régénérées *in vitro*. Les Monocotylédones possèdent un seul gène, *rpoTp*, codant pour la NEP, tandis que chez les Dicotylédones, il existe un second gène codant la NEP, le gène *rpoTnp* (Liere et al., 2011). Chez les Dicotylédones, l'ARN polymérase codée par le gène *rpoTp* serait plutôt associé à la transcription plastidiale, tandis que l'ARN polymérase codée par le gène *rpoTnp* est plutôt responsable de la transcription dans les mitochondries (Kühn et al., 2009). Des travaux ont également rapporté l'implication de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoTnp* dans la transcription du gène codant l'ARNr 16S dans les plastes (Courtois et al., 2007). Ce second gène *rpoTnp* pourrait donc pallier une potentielle sous-régulation de l'expression du gène *rpoTp* dans les microspores en androgénèse chez les Dicotylédones, et ainsi permettre la régénération de plantules chlorophylliennes.

La différenciation des chloroplastes et la régulation de leur développement sont soumis à des mécanismes complexes de communication entre le noyau et le plaste (Pogson et al., 2015). En effet, cette communication permet la coordination étroite de l'expression des génomes nucléaire et plastidial, essentielle pour l'assemblage de chloroplastes fonctionnels (Gray et al., 2003). Le génome nucléaire codant pour 90 % des protéines présentes dans les plastes, il exerce un contrôle sur la plupart des processus se déroulant au sein des plastes, y compris l'expression du génome plastidial par le biais de la NEP, des facteurs sigma et des protéines PAP. Cependant, il existe également un signal rétrograde, du plaste vers le noyau, qui régule l'expression des gènes nucléaire liés à la photosynthèse (Pfannschmidt, 2010). La signalisation rétrograde permet alors d'assurer la production d'un niveau adapté de transcrits et de protéines, codés par le génome nucléaire et importés dans les plastes. Ces dernières années, de nombreuses études se sont portées sur la compréhension de cette signalisation rétrograde qui reste, aujourd'hui, en partie non élucidée. Dans cette étude, nous avons pu mettre en avant une augmentation de l'expression de certains gènes clés impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au sein des cultures de microspores de blé, et nous avons aussi montré une expression différentielle de ces gènes entre le génotype Pavon, régénérant des plantules chlorophylliennes, et le génotype récalcitrant Paledor. La régulation de l'expression de ces gènes pourrait également faire partie de la signalisation antérograde et rétrograde, et être liées à des boucles de rétroactions, essentielles à la biogénèse des chloroplastes. Par exemple, les facteurs sigma sont impliqués dans la signalisation antérograde mais ils fournissent également un signal rétrograde lors de la biogénèse des chloroplastes, permettant la régulation transcriptionnelle des gènes nucléaires (Woodson et al., 2013). Leur surexpression au sein des structures multicellulaires puis des pro-embryons dérivant des microspores réorientées de blé pourrait donc également être assimilée à un signal rétrograde permettant l'augmentation de la transcription des gènes nucléaires liés à la biogénèse des chloroplastes. Les niveaux d'expression des gènes impliqués dans cette biogénèse ont un rôle essentiel dans ces boucles de rétroaction, en activant ou inhibant la transcription d'autres gènes. Une communication antérograde et rétrograde altérée pourrait donc induire une répression de certaines boucles de rétroaction et de régulation, menant à la régénération de plantules albinos. L'étude de ces interactions seraient très intéressantes dans le contexte de l'albinisme en androgénèse chez le blé mais nécessiterait de nombreuses études complémentaires et complexes.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer l'implication des gènes impliqués dans la biogénèse et la différenciation des chloroplastes et la régulation de leur développement par l'analyse de l'expression génique des microspores de blé au cours du processus d'androgénèse (Figure 10). Cette approche ciblée nous a permis de mettre en évidence des expressions différentielles de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes dès la formation de structures multicellulaires à partir des microspores réorientées chez deux génotypes de blé possédant des taux de régénération en plantules chlorophylliennes contrastés. Tous les gènes étudiés ont été détectés chez les deux génotypes de blé mais leurs niveaux d'expression relatifs et/ou l'étape du processus d'androgénèse à laquelle leur transcription a été activée différaient. Ces résultats confortent notre hypothèse initiale d'un blocage précoce dans la différenciation des proplaste en chloroplastes au sein des microspores de blé. La transition vers une transcription dépendante de la PEP au sein des microspores de Pavon au début de la culture *in vitro* semble être liée à la régénération de plantules chlorophylliennes. L'absence de cette transition chez les microspores de Paledor pourrait provoquer une faible accumulation de transcrits au sein des plastes, ce qui engendrerait par la suite un blocage dans la différenciation des proplastides en chloroplastes, et donc la régénération de plantules albinos. L'augmentation de l'expression du gène *rpoA* au sein des structures multicellulaires dérivant des microspores de blé cultivées *in vitro* semble donc être un bon marqueur de la régénération de plantules chlorophylliennes en androgénèse. Les faibles niveaux d'expression des gènes codant les ARNr 16S et 23S détectés dans les cultures de microspores du génotype récalcitrant et dans les plantules albinos de blé semblent également étroitement liés à la régénération de plantules albinos. Nous proposons donc l'utilisation des gènes codant les ARNr 16S et 23S comme gènes marqueurs du blocage précoce de la biogénèse des chloroplastes au sein des microspores de blé, directement liés à la régénération de plantules albinos en androgénèse. L'analyse de leur expression au cours des 21 premiers jours de culture et la comparaison de leur niveau d'expression à un génotype de référence, régénérant des plantules chlorophylliennes, permettraient d'évaluer précocement la capacité d'un génotype à régénérer des plantules chlorophylliennes.

Pour conclure, la cause de l'albinisme en androgénèse chez le blé semble donc être liée à l'étape d'activation de la transcription des gènes impliqués précocement dans la biogénèse des chloroplastes au sein des microspores plutôt qu'aux niveaux de transcription de ces gènes.

Annexe

Tableau Annexe1 : Liste des amorces des gènes utilisés pour les analyses par RT-qPCR

Gène	N° accession	Amorces (5'→3')		Taille amplicon (bp)	Référence
BBM	TRIAE_CS42_6AL_TGAC V1_472489_AA1522720	F	TGGCTTCTATGGCCTACC	75	(Bilichak et al., 2018)
		R	TATGAAGGCTGATGATGACC		
GBSSI	AF286320	F	GGTTCAAGTCGTCCTTCGACT	71	Cette étude
		R	CATCCAGTTGATCTTGCGCC		
rpoA	X15595	F	ATGCTGTATCCATGCCTGTTC	116	Cette étude
		R	AGGGGTTAGACTTCCATTAGATCC		
rpoTp	AJ507396	F	CGAGTCCTGTTGGTCTTCCA	102	Cette étude
		R	CATCACCTCCCCTCGTAA		
SIG2	AJ132658	F	CTGGCCGACAACTCGAAAAC	88	Cette étude
		R	CCTCCAATGCGTACTTTGCG		
SIG6	AK334927	F	CTGGACAAGCTGAAAGCGGA	99	Cette étude
		R	AACCGAGAATGAATGAGGCG		
ARNr 16S	AJ239003	F	TGATTGGGCGTAAAGCGTCT	90	Cette étude
		R	CTTGGTAGTTTCCACCGCCT		
ARNr 23S	AB042240	F	GTCGGCTTGAGTAACGAAAA	103	(Gajecka et al., 2021)
		R	ATCTTAGGCCCTGACTCACC		
psaA	AB042240	F	TCGCAAGGAAAGCGAAAACC	215	Cette étude
		R	ACTAGCTTAACGTGGGGAGG		
psbD	Traes_3DL_9DC 1B5230803167	F	ACTGGTTACGAAGGGACCGT	88	(Wu et al., 2018)
		R	AACCAACCCCTAAAGCGAA		
Lhcb1	HM362991	F	GTTGCGCTTCTTCGTGCAG	84	Cette étude
		R	TTGTTGACGGGGTCGGAGA		
HEMA	AB678198	F	TGTTACAAGCACCGCATCTG	139	(Wang et al., 2018)
		R	GATACACAGGCACCGACATTCC		
CHLH	BT009033	F	TTTGATGCAGGGAAGTCGCA	142	(Wu et al., 2018)
		R	CTTGCTGTTGGTGGGAAGCTGA		
PORA	X76532	F	GTGACCAAGGGGTTCTGTGC	142	Cette étude
		R	CCTCCTGTGAGAGCTGGTTC		
GLK1	EF105406	F	TGCTCCGTTCAAGTAACCG	110	Cette étude
		R	AGGCTGACCAAGAGAGAGGT		
GLK2	TRAES3BF0625 00050CFD_t1	F	GGGGTTGTTGTCGTCGGAAG	120	Cette étude
		R	ACCACGGCGGAAGAATCGT		
COP1	AK332611	F	AACTGAGCTGCCTTAGCTGG	108	Cette étude
		R	CCATTACACTCTGGCGGGTT		
HY5	MH886741	F	AGAACCAGATGCTCCGACAG	70	Cette étude
		R	TATTGACCCTCACTTGCCCC		
Toc34	KX533926	F	CTCAAATGGGAGCCAGTCCA	105	Cette étude
		R	TACTGCACGGCAAGGATGAG		
Tic110	BF484090	F	AAACAAGGGACCGTGATGCT	94	Cette étude
		R	AAGGCTGATGCGTCTCCAAA		
FtsZ	CJ506346	F	CACCTGTGGAAGCTGGATGT	84	Cette étude
		R	GGCAGGATGAAGCAGAAGGT		
FtsH2	KX037456	F	CTGCGCACAGCCAGCA	112	Cette étude
		R	CCTCCTCTTCGACAGCAA		

Tableau Annexe1 (Suite) : Liste des amorces des gènes utilisés pour les analyses par RT-qPCR

Gène	N° accession	Amorces (5'→3')		Taille amplicon (bp)	Référence
18S rRNA	AY049040	F	AGTAAGCGCGAGTCATCAGCT	80	(Long et al., 2010)
		R	CATTCAATCGGTAGGAGCGAC		
CDC	/	F	CAAATACGCCATCAGGGAGAACATC	227	(Paolacci et al., 2009)
		R	CGCTGCCGAAACCACGAGAC		
EF-1α	/	F	CAGATTGGCAACGGCTACG	227	(Crismani et al., 2006)
		R	CGGACAGCAAAACGACCAAG		

Références

- Adam, Z., Charuvi, D., Tsabari, O., Knopf, R.R., and Reich, Z. (2010). Biogenesis of thylakoid networks in angiosperms: knowns and unknowns. *Plant Mol. Biol.* 76, 221–234.
- Allison, L.A., Simon, L.D., and Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* 15, 2802–2809.
- Baba, K., Schmidt, J., Espinosa-Ruiz, A., Villarejo, A., Shiina, T., Gardeström, P., Sane, A.P., and Bhalerao, R.P. (2004). Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT*;2 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 38, 38–48.
- Bilichak, A., Luu, J., Jiang, F., and Eudes, F. (2018). Identification of BABY BOOM homolog in bread wheat. *Agri Gene* 7, 43–51.
- Bock, R. (2007). Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In *Cell and Molecular Biology of Plastids*, R. Bock, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 29–63.
- Börner, T., Aleynikova, A.Y., Zubo, Y.O., and Kusnetsov, V.V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 761–769.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A.A.M., Miki, B.L.A., et al. (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *Plant Cell* 14, 1737–1749.
- Cahoon, A.B., Harris, F.M., and Stern, D.B. (2004). Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO Rep.* 5, 801–806.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., and Clément, C. (1999). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208, 248–256.
- Caredda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R.S., and Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sex. Plant Reprod.* 13, 95–104.
- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., Proult, I., and Clément, C. (2004). Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76, 35–43.
- Chen, M., Ji, M., Wen, B., Liu, L., Li, S., Chen, X., Gao, D., and Li, L. (2016). GOLDEN 2-LIKE Transcription Factors of Plants. *Front. Plant Sci.* 7.
- Corral-Martínez, P., Siemons, C., Horstman, A., Angenent, G.C., de Ruijter, N., and Boutilier, K. (2020). Live Imaging of embryogenic structures in *Brassica napus* microspore embryo cultures highlights the developmental plasticity of induced totipotent cells. *Plant Reprod.* 33, 143–158.
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R., and Lerbs-Mache, S. (2007). Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145, 712–721.

Crismani, W., Baumann, U., Sutton, T., Shirley, N., Webster, T., Spangenberg, G., Langridge, P., and Able, J.A. (2006). Microarray expression analysis of meiosis and microsporogenesis in hexaploid bread wheat. *BMC Genomics* 7, 267.

Cuitun-Coronado, D., and Dodd, A.N. (2021). Plant Sigma Factors. In *ELS*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–9.

Day, A., and Ellis, T.H.N. (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9, 671–678.

Finster, S., Eggert, E., Zoschke, R., Weihe, A., and Schmitz-Linneweber, C. (2013). Light-dependent, plastome-wide association of the plastid-encoded RNA polymerase with chloroplast DNA. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 76, 849–860.

Fitter, D.W., Martin, D.J., Copley, M.J., Scotland, R.W., and Langdale, J.A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J.* 31, 713–727.

Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., Jelonek, J., Zbieszczek, J., and Szarejko, I. (2020). Plastid differentiation during microgametogenesis determines green plant regeneration in barley microspore culture. *Plant Sci.* 291, 110321.

Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., Jelonek, J., Zbieszczek, J., and Szarejko, I. (2021). Changes in plastid biogenesis leading to the formation of albino regenerants in barley microspore culture. *BMC Plant Biol.* 21, 22.

Gray, J.C., Sullivan, J.A., Wang, J.-H., Jerome, C.A., and MacLean, D. (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 135–145.

Hanaoka, M., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Takahashi, H., and Tanaka, K. (2005). Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep.* 6, 545–550.

Harada, T., Sato, T., Asaka, D., and Matsukawa, I. (1991). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 81, 157–161.

Hess, W.R., Hoch, B., Zeltz, P., Hübschmann, T., Kössel, H., and Börner, T. (1994). Inefficient rpl2 splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell* 6, 1455–1465.

Hricová, A., Quesada, V., and Micol, J.L. (2006). The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 942–956.

Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179, 257–285.

Jarvis, P., and López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 787–802.

Jha, P., and Kumar, V. (2018). BABY BOOM (BBM): a candidate transcription factor gene in plant biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 40, 1467–1475.

- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K., and Takahashi, H. (2001). An Arabidopsis Sigma Factor (SIG2)-Dependent Expression of Plastid-Encoded tRNAs in Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034–1043.
- Kindgren, P., Norén, L., Barajas López, J. de D., Shaikhali, J., and Strand, Å. (2012). Interplay between HEAT SHOCK PROTEIN 90 and HY5 Controls PhANG Expression in Response to the GUN5 Plastid Signal. *Mol. Plant* **5**, 901–913.
- Kühn, K., Richter, U., Meyer, E.H., Delannoy, E., Falcon de Longevialle, A., O'Toole, N., Börner, T., Millar, A.H., Small, I.D., and Whelan, J. (2009). Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Performs Gene-Specific Transcription in Mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **21**, 2762–2779.
- Kumari, M., Clarke, H.J., Small, I., and Siddique, K.H.M. (2009). Albinism in Plants: A Major Bottleneck in Wide Hybridization, Androgenesis and Doubled Haploid Culture. *Crit. Rev. Plant Sci.* **28**, 393–409.
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R.G., and Maier, R.M. (2002). Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **31**, 171–188.
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., and Pfannschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Liebers, M., Chevalier, F., Blanvillain, R., and Pfannschmidt, T. (2018). PAP genes are tissue- and cell-specific markers of chloroplast development. *Planta* **248**, 629–646.
- Liere, K., Weihe, A., and Börner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J. Plant Physiol.* **168**, 1345–1360.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Long, X.-Y., Wang, J.-R., Ouellet, T., Rocheleau, H., Wei, Y.-M., Pu, Z.-E., Jiang, Q.-T., Lan, X.-J., and Zheng, Y.-L. (2010). Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol. Biol.* **74**, 307–311.
- Lopez-Juez, E., and Pyke, K.A. (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 557–577.
- Makowska, K., and Oleszczuk, S. (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep.* **33**, 385–392.
- Maraschin, S. de F., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner, A., Spaink, H.P., and Wang, M. (2006). cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiol. Plant.* **127**, 535–550.

Møller, S.G., Maple, J., and Gargano, D. (2014). Biogenesis of Chloroplasts. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation*, M.F. Hohmann-Marriott, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 435–449.

Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Close, T.J., and Vallés, M.P. (2009). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct. Integr. Genomics* 9, 311–323.

Nic-Can, G.I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V.M., Rojas-Herrera, R., and De-la-Peña, C. (2013). New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8, e72160.

Oh, S., and Montgomery, B.L. (2014). Phytochrome-dependent coordinate control of distinct aspects of nuclear and plastid gene expression during anterograde signaling and photomorphogenesis. *Front. Plant Sci.* 5.

Paolacci, A.R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., and Ciaffi, M. (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol. Biol.* 10, 11.

Pfannschmidt, T. (2010). Plastidial retrograde signalling – a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci.* 15, 427–435.

Pfannschmidt, T., Blanvillain, R., Merendino, L., Courtois, F., Chevalier, F., Liebers, M., Grüber, B., Hommel, E., and Lerbs-Mache, S. (2015). Plastid RNA polymerases: orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle. *J. Exp. Bot.* 66, 6957–6973.

Pogson, B.J., Ganguly, D., and Albrecht-Borth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1847, 1017–1024.

Seifert, F., Bössow, S., Kumlehn, J., Gnad, H., and Scholten, S. (2016). Analysis of wheat microspore embryogenesis induction by transcriptome and small RNA sequencing using the highly responsive cultivar “Svilena.” *BMC Plant Biol.* 16.

Shi, K., Gu, J., Guo, H., Zhao, L., Xie, Y., Xiong, H., Li, J., Zhao, S., Song, X., and Liu, L. (2017). Transcriptome and proteomic analyses reveal multiple differences associated with chloroplast development in the spaceflight-induced wheat albino mutant mta. *PLOS ONE* 12, e0177992.

Soriano, M., Hui, L., and Boutilier, K. (2013). Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.* 26, 181–196.

Tiller, N., and Bock, R. (2014). The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development. *Mol. Plant* 7, 1105–1120.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1.
- Wang, Y., Zheng, W., Zheng, W., Zhu, J., Liu, Z., Qin, J., and Li, H. (2018). Physiological and transcriptomic analyses of a yellow-green mutant with high photosynthetic efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct. Integr. Genomics* 18, 175–194.
- Waters, M.T., and Langdale, J.A. (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J.* 28, 2861–2873.
- Waters, M.T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R.G., Saunders, N.J., and Langdale, J.A. (2009). GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 1109–1128.
- Woodson, J.D., Perez-Ruiz, J.M., Schmitz, R.J., Ecker, J.R., and Chory, J. (2013). Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J.* 73, 1–13.
- Wu, H., Shi, N., An, X., Liu, C., Fu, H., Cao, L., Feng, Y., Sun, D., and Zhang, L. (2018). Candidate Genes for Yellow Leaf Color in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Major Related Metabolic Pathways according to Transcriptome Profiling. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1594.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2004a). The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864–876.
- Yu, F., Park, S., and Rodermel, S.R. (2004b). The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J.* 37, 864–876.
- Yuan, M., Zhao, Y.-Q., Zhang, Z.-W., Chen, Y.-E., Ding, C.-B., and Yuan, S. (2017). Light Regulates Transcription of Chlorophyll Biosynthetic Genes During Chloroplast Biogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 36, 35–54.
- Zhao, P., Wang, K., Zhang, W., Liu, H.Y., Du, L.P., Hu, H.R., and Ye, X.G. (2017). Comprehensive analysis of differently expressed genes and proteins in albino and green plantlets from a wheat anther culture. *Biol. Plant.* 61, 255–265.
- Zubko, M., and Day, A. (2002). Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *Mol. Genet. Genomics* 267, 27–37.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Le phénomène d'albinisme en androgénèse est complexe et multifactoriel, touchant spécifiquement les Monocotylédones plutôt que les Dicotylédones. Chez les céréales, la forte proportion de plantules albinos régénérées en culture de microspores isolées est un véritable frein à la production d'HD. La complexité de ce phénomène fait, qu'aujourd'hui, nous ne disposons pas de technique totalement efficace pour produire en routine des HD pour tous les génotypes de blé. Les hypothèses de recherche formulées au cours de ma thèse m'ont amenée à étudier les phases précoces du processus d'androgénèse pour tenter d'appréhender les causes de ce phénomène, et d'identifier les étapes clés du développement des microspores auxquelles le blocage survient. À l'aide d'études cytologiques et grâce au développement d'une nouvelle méthode d'analyse des populations de microspores en culture par la technique de l'IFC, il m'a été possible de caractériser finement le développement des microspores de blé en culture et l'évolution de populations cellulaires hétérogènes. L'adaptation et l'utilisation de la technologie de l'IFC aux cultures de microspores isolées a permis de développer trois nouveaux indicateurs de la réactivité des cellules en culture. Ces indicateurs sont utilisables en routine, pour mener des essais haut débit portant sur l'optimisation de l'androgénèse. Ils permettent (i) de suivre l'évolution de la viabilité des cellules, (ii) d'évaluer l'efficacité du stress inducteur ou du prétraitement, (iii) de prédire précocement les rendements embryonnaires. L'approche moléculaire par l'analyse d'expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes a été mise en place pour la première fois chez les cultures de microspores isolées de blé dans ces travaux de thèse. Les résultats générés suggèrent que le blocage dans la biogénèse des chloroplastes chez les microspores de blé est lié à une absence de transition vers une transcription dépendante de la PEP. L'activité de cette ARN polymérase plastidiale augmente lors de la maturation des chloroplastes, et une sous-régulation de son expression a des répercussions importantes sur leur différenciation. Une sous-régulation de la transcription des gènes codant les ARN ribosomiques plastidiaux, a également été mise en évidence et pourrait être une conséquence de l'absence de transcription PEP-dépendante. La régénération de plantules albinos semble donc être liée à une perturbation du timing d'activation de la transcription de certains gènes essentiels impliqués dans la voie de biogénèse des chloroplastes au cours du développement des structures pro-embryonnaires dérivant des microspores. Enfin, j'ai également étudié les étapes plus avancées du processus d'androgénèse, notamment par la caractérisation des structures androgéniques produites et l'analyse de leur capacité de régénération en plantules

chlorophylliennes et albinos. Deux types de développement majeurs ont pu être mis en avant, les structures de type embryon et les structures de type cal, toutes deux ayant la capacité de régénérer des plantules chlorophylliennes et des plantules albinos. Nous pouvons conclure de cette étude des structures androgéniques que le déterminisme du processus de régénération de plantules chlorophylliennes ou albinos est complexe, et qu'il ne peut pas être associé à un type de développement.

Les études multi-approches et multidisciplinaires menées au cours de ma thèse ont révélé que la période située entre quatorze et vingt-et-un jours après le début de la culture *in vitro* était cruciale pour le développement des microspores et l'initiation de la biogénèse des chloroplastes au sein de ces cellules. À ce stade du processus d'androgénèse, les structures multicellulaires dérivant des microspores sont libérées de la paroi initiale d'exine et forment des pro-embryons. Ces nouveaux résultats ont permis d'avancer dans la compréhension du phénomène d'albinisme observé en androgénèse chez le blé et ouvrent de nouvelles perspectives d'études, d'analyses et d'optimisation du processus.

Bien avant le début de mes travaux de thèse, de nombreux essais ont été menés au sein de l'entreprise d'accueil, Vegenov, pour tenter de lever le verrou de l'albinisme en androgénèse chez le blé. Les recherches bibliographiques ont montré que l'efficacité de l'androgénèse peut être améliorée par la modifications de facteurs externes (Olmedilla, 2010). Dans le contexte de l'albinisme, les expérimentations au laboratoire se sont majoritairement concentrées sur deux étapes clés du processus, les modalités de prétraitement et la composition du milieu de culture *in vitro*. Six à huit génotypes de blé de printemps et d'hiver ont été utilisés pour les essais cités ci-dessous. Ainsi, des prétraitements de nature chimique, osmotique et thermique variés ont été testés au laboratoire. Les résultats obtenus ont permis une amélioration des rendements en androgénèse mais ils n'ont pas résolu le problème de la régénération de plantules albinos. L'utilisation de régulateurs de croissance non traditionnels et alternatifs dans le milieu de culture *in vitro*, comme le thidiazuron ou la méta-topoline, a également été explorée. Des essais faisant varier la composition en microéléments, ou portant sur l'osmolarité du milieu de culture ont également été menés. Tous ces essais étaient inspirés de données bibliographiques (Esteves and Belzile, 2014; Jacquard et al., 2009). Néanmoins, aucune de ces expérimentations n'a offert de solution adaptée pour lever le verrou de l'albinisme en androgénèse chez le blé d'hiver. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai

également réalisé d'autres essais portant sur différents aspects de l'amélioration du protocole d'androgénèse utilisé à Vegenov. L'influence de la culture des pieds-mères de blé, et notamment le type et l'apport d'engrais utilisé, a tout d'abord été analysée et a permis de simplifier la méthode de fertilisation, sans pour autant faire varier les rendements en androgénèse. Le stade de développement des microspores au moment de la cueillette des épis est un facteur important pour la réussite des protocoles d'androgénèse. L'hypothèse d'une reprogrammation des microspores à un stade de développement plus précoce que celui habituellement utilisé m'a menée à effectuer des essais sur un large panel de stades de développement, allant du stade uninucléé précoce à binucléé tardif. Très peu d'embryons haploïdes ont été produits en dehors des microspores prélevées au stade uninucléé centré à tardif, habituellement utilisé chez le blé et l'orge, et les taux de régénération en plantules chlorophylliennes n'ont pas été améliorés. La préservation des épis au sein de leur gaine protectrice tout au long du prétraitement à 4°C a permis d'améliorer sensiblement la viabilité des microspores et donc les rendements en androgénèse. Enfin, l'hypothèse d'un blocage précoce dans la différenciation des proplastés en chloroplastes m'a menée à réfléchir sur l'influence de la lumière au cours du processus d'androgénèse. En effet, nous savons que la lumière est indispensable à l'induction de la différenciation des chloroplastes, et cependant, les 50 à 55 premiers jours du processus d'androgénèse se déroulent à l'obscurité. Très peu d'éléments ont été rapportés dans la littérature sur l'influence de la lumière en androgénèse. Des recherches bibliographiques sur l'impact de la lumière, de la photopériode et du type de spectre ont été menées en parallèle de discussion avec des chercheurs spécialistes de ce domaine. Cela m'a permis de réaliser un essai explorant trois pistes différentes : la réduction de la durée de la phase d'obscurité du processus d'androgénèse, l'ajout d'une photopériode courte pour limiter les dommages photo-oxydatifs cellulaires et le rôle clé des longueurs d'onde bleue et rouge dans le déclenchement de la différenciation des chloroplastes. Les premiers résultats obtenus ne montrent aucun effet négatif de la lumière sur la viabilité des microspores, leur réorientation, les rendements embryonnaires ou la régénération de plantules. Mais le très grand nombre de combinaisons expérimentales pouvant être testées rend cet axe de recherche fastidieux sans l'appui d'autres outils ou marqueurs pour restreindre les choix ou obtenir des réponses rapides.

Lever les verrous de l'albinisme !

Malgré les efforts importants de tentative d'optimisation, aucun résultat obtenu n'a permis de lever le verrou de l'albinisme en androgénèse chez le blé. Ces recherches, effectuées de manière empirique, ne sont pas assez efficaces et trop coûteuses en temps. En effet, le processus d'androgénèse chez le blé dure 80 à 110 jours, auxquels il faut ajouter le temps de culture des pieds-mères. Cette durée est incompatible avec le besoin de tester un très grand nombre de facteurs dans le but de débloquent le verrou de l'albinisme. La méthode, tout comme les moyens de recherche, devaient être modifiés. Le développement de marqueurs précoces durant ma thèse et la compréhension nouvelle des étapes clés de la mise en place de l'albinisme ouvrent maintenant des perspectives réelles d'optimisation du processus d'androgénèse chez le blé, et de compréhension de plus en plus fine du phénomène d'albinisme.

Les approches de caractérisation cellulaire à haut débit

Grâce à l'utilisation de l'IFC d'une part, et l'approche moléculaire mise en place d'autre part, nous avons montré que le développement embryogénique des microspores de blé était déjà déterminé à sept jours de culture, et que la propension des microspores à régénérer une plantule chlorophyllienne ou albinos se jouait entre sept et vingt-et-un jours de culture *in vitro*. Des mises au points plus poussées sur l'utilisation de l'IFC pourraient permettre d'aller plus loin dans la caractérisation des microspores. L'objectif serait de pouvoir détecter des caractéristiques intracellulaires précoces des microspores issues d'un génotype régénérant majoritairement des plantules chlorophylliennes, et des développements différents ou anormaux au sein des microspores issues d'un génotype produisant uniquement des plantules albinos.

Les études d'expression de gènes, et des protéines et métabolites associés dans la biogénèse des chloroplastes

L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse des chloroplastes au cours du développement des microspores, en structures multicellulaires, puis en pro-embryons a permis d'affiner nos connaissances sur l'étape du processus et les mécanismes qui entraînent le blocage dans la différenciation des proplastides en chloroplastes. Ces

nouveaux résultats ouvrent plusieurs perspectives qui permettront d'approfondir encore nos connaissances de ce phénomène. Dans un premier temps, les dates de prélèvement et d'analyses pourraient être affinées pour gagner en précision sur l'étape clé de ce blocage. En prenant en compte les résultats en microscopie électronique de Caredda et son équipe ainsi que nos résultats sur l'augmentation des niveaux d'expression relatifs de certains gènes clés comme *rpoA*, *SIG2*, et les gènes liés à la photosynthèse comme *psaA*, *psbD*, *CHLH* et *PORA*, nous proposons d'analyser quotidiennement les variations d'expression génique des microspores entre D14 et D21, pour les deux génotypes étudiés durant la thèse. Au niveau des mécanismes moléculaires en jeu, la piste de l'absence de transition vers une transcription PEP-dépendante au sein des microspores du génotype récalcitrant pourrait être vérifiée en analysant l'expression de gènes plastidiaux supplémentaires comme *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*. Ces gènes codent pour les trois autres sous-unités de la PEP, et sont préférentiellement transcrits par la NEP. Si une augmentation de leurs expressions est observée en parallèle de l'augmentation de l'expression du gène *rpoTp* et de l'absence de variation de l'expression de *rpoA*, préférentiellement transcrit par la PEP elle-même, cela confirmera alors notre hypothèse d'une absence de transition de la transcription au sein des microspores de ce génotype. La vérification de ces pistes nécessite des analyses et approches complémentaires. Afin de vérifier que les activations et augmentations de la transcription observée dans nos analyses sont bien liées à une augmentation consécutive de la traduction des protéines, l'approche de l'analyse des protéines doit être envisagée. Il faut cependant noter que les approches globales en protéomique nécessitent une quantité importante de matériel végétal, dont nous ne disposons pas en culture de microspores isolées. Néanmoins, des approches de protéomique plus ciblées peuvent être menées. Il est possible de vérifier la présence et la localisation de protéines, abondantes comme par exemple la RubisCo, ou plus spécifiques notamment les protéines codées par les gènes marqueurs identifiés dans le chapitre 4. Les protéines d'intérêt peuvent alors être ciblées spécifiquement par des anticorps couplés à des fluorochromes. De la même façon, nous pouvons vérifier la mise en place des thylakoïdes au sein des microspores entre D7 et D21 en ciblant les galactolipides, composant spécifiquement les membranes thylakoïdiennes par rapport aux autres membranes de la cellule. La microscopie électronique par transmission peut également être couplée à cette approche pour obtenir de précieuses informations sur le développement des plastes au cours du processus d'androgénèse. Enfin, une approche métabolomique peut également être

envisagée, mais là encore, la quantité de matériel végétal nécessaire pose problème. Il sera indispensable d'être précis sur les métabolites recherchés au risque de générer une quantité massive de données. De plus, ce type d'approche nécessite une extraction ciblée et dépendante du type de métabolites recherchés. Une piste pertinente en métabolomique serait la détection des précurseurs de la chlorophylle, comme le protochlorophyllide. Les résultats de l'approche moléculaire ont montré une activation précoce de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la chlorophylle, on s'attend donc à trouver les métabolites correspondants au sein des microspores entre D14 et D21, avant l'exposition à la lumière. Ces différentes approches, en microscopie, protéomique et métabolomique, sont descriptives, mais l'obtention de ces informations est essentielle pour prouver que l'activation de la transcription des différents gènes clés étudiés est bien suivie de la traduction de protéines. Ceci nous permettrait ainsi de valider nos différentes hypothèses. A l'inverse, une absence de détection des protéines ciblées pourrait mettre en évidence un blocage dans la traduction voire la répression ou la dégradation des transcrits par le biais de boucles de rétroactions.

La biogénèse et la différenciation des chloroplastes sont des thématiques de recherche largement étudiées car pas encore totalement élucidées, utilisant l'embryogénèse et la germination *in vitro* comme modèles d'études. L'androgénèse, et plus précisément, la culture de microspores isolées, est aujourd'hui un outil bien connu et caractérisé, notamment chez les espèces modèles de Dicotylédones comme le colza, où le développement embryogénique des microspores a été largement étudié. La culture de microspores chez ces espèces modèles donne accès aux stades très précoces de l'embryogénèse, et donc de la biogénèse des chloroplastes, sans barrière physique des tissus maternels et de la graine. La biogénèse des chloroplastes débute bien avant la germination de la graine et la détection des premiers signaux lumineux. La mise en place et l'accumulation des précurseurs essentiels sont nécessaires pour avoir une différenciation rapide des plastes en chloroplastes fonctionnels et limiter ainsi les dommages photo-oxydatifs cellulaires, lors de la germination. Nous proposons donc d'utiliser les microspores embryogéniques comme modèle pour étudier ces phases précoces de la biogénèse des chloroplastes et les mécanismes moléculaires sous-jacents. De plus, pour les recherches très spécifiques et pointues dans le domaine de la biogénèse des chloroplastes, des analyses en cellule unique par RNAseq sont possibles chez le colza et

donneraient ainsi accès à de précieuses informations sur le transcriptome de la cellule à un instant t. Une étude comparative de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des chloroplastes, chez le blé et le colza par exemple, pourrait nous donner de précieuses informations sur les différences fondamentales existants entre les Monocotylédones et les Dicotylédones.

Les études des facteurs épigénétiques

Les facteurs épigénétiques sont de plus en plus étudiés pour leur rôle important dans l'embryogénèse sporophytique (El-Tantawy et al., 2014; Li et al., 2016; Solís et al., 2012). Ils semblent aussi avoir une place importante dans le phénomène de l'albinisme en androgénèse chez le blé et autres céréales. Mais peu d'éléments sont pour le moment connus dans ce vaste domaine de recherche. Ces facteurs épigénétiques sont fortement influencés par les facteurs environnementaux. Les modalités de prétraitement, les conditions de culture et la composition des milieux de culture pourraient donc impacter à différents niveaux la méthylation de l'ADN des microspores, ou les méthylations et acétylations des histones. Même si l'étude des marques épigénétiques semble difficile à mettre en place à Vegenov, nous pourrions explorer le domaine des modifications épigénétiques en androgénèse en testant l'application d'activateur ou d'inhibiteur de méthylation ou acétylation des histones comme la Trichostatine A (TSA). Il a été démontré que l'application de TSA dans le milieu de culture des microspores de colza permet d'augmenter de façon significative la proportion de cellules réorientées vers la voie de développement sporophytique (Li et al., 2014). De plus, une étude récente en androgénèse chez le blé a mis en évidence une augmentation des rendements embryonnaires et des taux de régénération de plantules chlorophylliennes grâce à l'application de TSA dans le milieu de culture *in vitro* (Jiang et al., 2017). Les mécanismes moléculaires induisant l'activation ou non de la transcription de gènes à un instant précis pourraient également être liés aux facteurs épigénétiques. L'évaluation de la méthylation de l'ADN et de certaines marques épigénétiques au sein des microspores pourrait donc être étudiée en parallèle de l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la biogenèse des chloroplastes.

L'apport du design expérimental

Enfin, la recherche empirique des conditions favorables à la régénération de plantules chlorophylliennes en androgénèse pour tous les génotypes de blé semble bien fastidieuse si elle n'est pas couplée à de nouvelles technologies et outils permettant de simplifier et améliorer la prise de décisions dans la multitude de facteurs à tester. Le design expérimental (DOE – Design of Experiments) est une méthode mathématique de planification expérimentale permettant de restreindre de façon optimisée le nombre de modalités à tester, qui a été récemment appliquée avec succès à la culture *in vitro* (Niedz and Evens, 2016). Nous proposons de combiner les marqueurs développés au cours de la thèse à cette approche de design expérimental pour accélérer l'optimisation des modalités de prétraitement et des conditions de culture. Cette approche permettrait en effet de tester à haut débit de nombreux facteurs, d'analyser leurs impacts principaux et leurs interactions, pour finalement lever le verrou de l'albinisme en androgénèse chez le blé.

Références

- Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., Proult, I., and Clément, C. (2004). Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76, 35–43.
- El-Tantawy, A.-A., Solís, M.-T., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2014). Changes in DNA Methylation Levels and Nuclear Distribution Patterns after Microspore Reprogramming to Embryogenesis in Barley. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 200–208.
- Esteves, P., and Belzile, F. (2014). Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: I-optimization of key physical factors. *Plant Cell Rep.* 33, 993–1001.
- Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., Jelonek, J., Zbieszczak, J., and Szarejko, I. (2020). Plastid differentiation during microgametogenesis determines green plant regeneration in barley microspore culture. *Plant Sci.* 291, 110321.
- Jacquard, C., Nolin, F., Hécart, C., Grauda, D., Rashal, I., Dhondt-Cordelier, S., Sangwan, R.S., Devaux, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., and Clément, C. (2009). Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep.* 28, 1329–1339.
- Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Hucl, P., Randhawa, H., Marillia, E.-F., Foroud, N.A., Eudes, F., and Kathiria, P. (2017). Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep.* 36, 1701–1706.
- Li, H., Soriano, M., Cordewener, J., Muiño, J.M., Riksen, T., Fukuoka, H., Angenent, G.C., and Boutilier, K. (2014). The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Totipotency in the Male Gametophyte. *Plant Cell* 26, 195–209.
- Li, J., Huang, Q., Sun, M., Zhang, T., Li, H., Chen, B., Xu, K., Gao, G., Li, F., Yan, G., et al. (2016). Global DNA methylation variations after short-term heat shock treatment in cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Sci. Rep.* 6, 38401.
- Niedz, R.P., and Evens, T.J. (2016). Design of experiments (DOE)—history, concepts, and relevance to in vitro culture. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 1–16.

Olmedilla, A. (2010). *Microspore Embryogenesis* (New York: Springer).

Solís, M.-T., Rodríguez-Serrano, M., Meijon, M., Canal, M.-J., Cifuentes, A., Risueño, M.C., and Testillano, P.S. (2012). DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 63, 6431–6444.