



HAL
open science

Vers une meilleure compréhension de l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie chez *Arabidopsis suecica*

Floriane Chéron

► To cite this version:

Floriane Chéron. Vers une meilleure compréhension de l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie chez *Arabidopsis suecica*. Biologie moléculaire. Université Clermont Auvergne, 2024. Français. ⟨NNT : 2024UCFA0090⟩. ⟨tel-05351659⟩

HAL Id: tel-05351659

<https://theses.hal.science/tel-05351659v1>

Submitted on 6 Nov 2025

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License

Université Clermont Auvergne

École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie,
Environnement

THÈSE

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université Clermont Auvergne

Spécialité : Génétique et Biologie Moléculaire

Unité de Recherche : Institut Génétique Reproduction et Développement

Présentée et soutenue publiquement le **29 Octobre 2024** par :

Floriane CHÉRON

Vers une meilleure compréhension de l'adaptation
méiotique à l'allopolyploïdie chez *Arabidopsis suecica*

Présidente du jury :

- Pr Emilie BRASSET, iGReD (Clermont-Ferrand)

Rapporteurs :

- Dr Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN, INRAE (Rennes)
- Pr Christian PARISOD, Université de Fribourg (Suisse)

Examineurs :

- Dr Chloé GIRARD, I2BC (Gif-sur-Yvette)
- Dr Charles WHITE, iGReD (Clermont-Ferrand)

Membre invité :

- Dr Pierre SOURDILLE, INRAE (Clermont-Ferrand)

Directrice de thèse :

- Dr Heidi SERRA, iGReD (Clermont-Ferrand)

Remerciements

Les résultats de cette thèse n'auraient pas été possibles sans le soutien, les conseils et l'aide de nombreuses personnes, que je tiens à remercier ici vivement.

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Heïdi, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet de recherche passionnant qu'est l'étude de l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie. Ce sujet de recherche a parfois été difficile à expliquer à mes amis et ma famille, et encore plus lorsque je leur présentais *Arabidopsis suecica* ... Dès mon arrivée en thèse, Heïdi avait soigneusement planifié le déroulement de ma thèse et grâce à ses conseils avisés, j'ai pu réaliser de nombreuses expériences qui ont abouti à des résultats captivants. Bien que j'aurais aimé explorer davantage certaines pistes si j'en avais eu la possibilité. Dans un cadre de travail bienveillant, elle m'a généreusement partagé ses connaissances en méthodologie de recherche et en communication. Elle m'a également donné la liberté d'organiser mon travail selon mes préférences ce qui, après avoir établi un planning très chargé par moi-même, m'a permis de comprendre qu'un chercheur ne peut malheureusement pas explorer toutes les pistes de recherche seul. Elle m'a aussi encouragé à participer à des nombreuses conférences scientifiques, dont l'EMBO Meiosis 2023 que j'ai particulièrement appréciée.

Je remercie également Miguel et Olivier pour m'avoir permis de découvrir la recherche sur la méiose d'*Arabidopsis thaliana* lors de mes stages de Master 1 et Master 2, ainsi que pour leur soutien durant ma thèse. Mes remerciements vont également à Charles et Maria pour leurs encouragements et leurs conseils tout au long de ces années. Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe de recherche RecLab qui m'ont soutenu : Valentine, Etienne, Sébastien, Jérémy, Michel, Nathalie, Yennifer. Un merci spécial à Claire pour son aide précieuse dans l'analyse de la génération 5 des plantes néosynthétiques d'*A. suecica*, ce qui m'a permis de me libérer du temps et de me concentrer dans la rédaction de cette thèse.

Je suis également reconnaissante aux doctorants avec qui j'ai partagé un bureau parfois peu confortable : Sarah, Guillaume, Valentine, Léa, Gilles et Etienne. D'ailleurs, Valentine et Léa m'ont aidé à décompresser pendant la rédaction de ma thèse en regardant les Jeux Olympiques chaque midi cet été.

Pour poursuivre, je souhaite exprimer ma gratitude à Andrew Lloyd et Eric Jenczewski, membres de mon comité de thèse, pour leurs conseils avisés et leur soutien constant. Je remercie également les membres du jury de thèse, composé de Mathieu Rousseau-Gueutin, Christian Parisod, Chloé Girard, Emilie Brassat et Pierre Sourdille, pour avoir accepté d'évaluer mon

travail de thèse. Un grand merci à Christophe Lambing et James Higgins pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans leurs laboratoires respectifs en Angleterre afin d'apprendre la technique d'immunomarquage de la protéine MLH1. Enfin, je souhaite remercier Yoan pour son aide précieuse dans l'analyse de mon RNA-seq ainsi que la plateforme CLIC pour la mise à disposition de leur microscope confocal toujours fonctionnel.

Je remercie également mes parents, ma famille, mes amis et plus particulièrement, mon mari Alan qui m'a soutenu et encouragé tout au long ces années de thèse pour réaliser mon rêve de devenir docteure. Il a supporté mon stress et mes doutes, et a écouté patiemment mes présentations pendant mes entraînements, bien que je ne sois toujours pas certaine qu'il comprenne vraiment ce qu'est l'allopolyploïdie. Je tiens également à rendre hommage à mon chien Tokyo, le meilleur collègue pour écrire une thèse, qui m'a toujours rappelé de prendre des pauses pour aller faire une promenade. De plus, je suis reconnaissante envers mon cheval Dream, car, pour ceux qui ne sont pas cavaliers, les chevaux perçoivent le stress des humains, ce qui peut leur être très inconfortable. Ainsi, lorsque j'allais le voir, je me devais de décompresser et d'oublier mes tracas de recherche pour pouvoir passer un bon moment avec lui. Malgré tout, il m'est parfois arrivé de ne pas réussir à évacuer toute la pression liée à ma thèse, et dans ces moments-là, je ne pouvais pas l'approcher dans le pré ! Ainsi, Dream est devenu un véritable « psychologue » pour moi, m'aidant à faire face à l'immense pression d'une thèse.

Enfin, une spéciale dédicace à la plus talentueuse des correctrices qu'est ma petite sœur Manon. Manon a pris le temps de corriger et/ou d'ajouter tous les petits « ée » et « s » sur mon manuscrit pour l'embellir.

À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, je vous dis un immense merci.

Résumé

L'allopolypléidie, un processus où des espèces hybrides possèdent des ensembles complets de chromosomes issus de différentes espèces, joue un rôle crucial dans l'évolution et la spéciation des plantes. Cependant, les allopolypléïdes nouvellement formés doivent surmonter des défis complexes liés à l'instabilité génétique, épigénétique et méiotique, principalement en raison de la recombinaison méiotique entre chromosomes homéologues (similaires mais non identiques). Cette situation peut entraîner des erreurs de ségrégation, de l'aneuploïdie et une fertilité réduite. En revanche, les allopolypléïdes évolués sont hautement fertiles et se comportent comme de vrais diploïdes pendant la méiose, favorisant la formation de crossing-overs entre chromosomes homologues tout en inhibant ceux entre chromosomes homéologues. Ainsi, les allopolypléïdes de première génération subissent une forte pression sélective pour limiter ou éviter les crossing-overs entre chromosomes homéologues.

Pour explorer les mécanismes sous-jacents à la stabilisation de la méiose après l'allopolypléïdisation, nous avons étudié l'adaptation méiotique chez *Arabidopsis suecica*, une plante issue de l'hybridation entre *A. thaliana* et *A. arenosa*. Dans cette étude, nous avons examiné la fertilité et le comportement méiotique de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* issues d'un unique croisement sur les quatre premières générations après l'hybridation. Les résultats ont révélé des altérations significatives au début de la méiose, avec des interactions anormales entre centromères homéologues pendant le stade zygotène et une recombinaison homéologue fréquente associée à une réduction de la recombinaison homologue, suggérant fortement que la fidélité du choix du partenaire de recombinaison est perturbée pendant la première méiose des plantes néoallopolypléïdes d'*A. suecica*. De plus, cette étude a montré une considérable variabilité de la fertilité, du comportement méiotique et du niveau de recombinaison homéologue entre des plantes néosynthétiques sœurs de première génération. Après 4 générations, nous avons identifié quatre voies distinctes d'évolution de la stabilité méiotique chez ces plantes néoallopolypléïdes.

Ces travaux ont également mis en évidence le rôle des protéines MSH, en particulier MSH7, qui semble être impliqué dans la régulation de la recombinaison homéologue. La mutation du gène *MSH7* chez *A. suecica* entraîne une légère diminution du nombre de crossing-overs et une augmentation des cellules méiotiques au stade métaphase I avec des univalents et des multivalents, suggérant que MSH7 pourrait aider à discriminer les chromosomes homologues des homéologues, stabilisant ainsi la méiose allopolypléïde.

Une analyse transcriptomique de méiocytes mâles de plantes néosynthétiques et évoluées a révélé une sous-expression de gènes clés, tels qu'ASY4 et SCEP2, qui sont essentiels pour la formation du complexe synaptonémal, une structure nécessaire à l'appariement correct des chromosomes pendant la méiose. Les anomalies dans l'expression de ces gènes, combinées à la sous-expression des protéines ZMM impliquées dans la formation des crossing-overs de classe I telles que MSH5 et HEI10, pourraient être à l'origine de l'instabilité méiotique observée dans les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*.

En conclusion, mes travaux de thèse soulignent l'importance des mécanismes moléculaires dans la stabilisation méiotique des plantes allopolyploïdes, et révèlent le rôle potentiel des protéines MSH7, ASY4, SCEP2, MSH5 et HEI10 dans la régulation de la recombinaison méiotique. Ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles recherches pour approfondir notre compréhension de l'adaptation et de la stabilité méiotique des plantes allopolyploïdes.

Abstract

Allopolyploidy, a process in which hybrid species possess complete sets of chromosomes from different species, plays a crucial role in plant evolution and speciation. However, newly formed allopolyploids must overcome complex challenges related to genetic, epigenetic, and meiotic instability, primarily due to meiotic recombination between homeologous chromosomes (similar but not identical). This situation can lead to segregation errors, aneuploidy, and reduced fertility. In contrast, evolved allopolyploids are highly fertile and behave as true diploids during meiosis, promoting crossing-over between homologous chromosomes while inhibiting those between homeologous chromosomes. Consequently, first generation allopolyploids undergo strong selection pressure to limit or avoid crossovers between homeologous chromosomes.

To explore the mechanisms underlying meiotic stabilization following allopolyploidy, we investigated meiotic adaptation in *Arabidopsis suecica*, a plant derived from the hybridization of *A. thaliana* and *A. arenosa*. This study examined fertility and meiotic behavior of neo-synthetic *A. suecica* plants from a single cross over the first four generations post-hybridization. The results revealed significant alterations early in meiosis, including abnormal interactions between homeologous centromeres during the zygotene stage and frequent homeologous recombination associated with reduced homologous recombination. These findings strongly suggest that the fidelity of recombination partner choice is disrupted during the first meiosis of neo-allopolyploid *A. suecica* plants. Furthermore, this study demonstrated considerable variability in fertility, meiotic behavior, and levels of homeologous recombination among first-generation neo-synthetic sibling plants. After four generations, we identified four distinct pathways of meiotic stability evolution in these neo-allopolyploid plants.

This study also highlighted the role of MSH proteins, particularly MSH7, which appears to be involved in the regulation of homeologous recombination. Mutation of the *MSH7* gene in *A. suecica* leads to a slight decrease in the number of crossing-overs and an increase in meiotic cells at metaphase I with univalents and multivalents, suggesting that MSH7 may help discriminate between homologous and homeologous chromosomes, thereby stabilizing allopolyploid meiosis.

Transcriptomic analysis of male meiocytes of both neo-synthetic and evolved plants revealed downregulation of key genes, such as *ASY4* and *SCEP2*, which are essential for the formation of the synaptonemal complex, a structure necessary for correct chromosome pairing during meiosis. The anomalies in the expression of these genes, combined with the

downregulation of ZMM proteins involved in the formation of class I crossing-overs, such as MSH5 and HEI10, may contribute to the meiotic instability observed in neo-synthetic *A. suecica* plants.

In conclusion, my thesis emphasizes the importance of molecular mechanisms in the meiotic stabilization of allopolyploid plants and highlights the potential roles of MSH7, ASY4, SCEP2, MSH5, and HEI10 proteins in regulating meiotic recombination. These findings pave the way for further research to deepen our understanding of adaptation and meiotic stability in allopolyploid plants.

Liste des abréviations

aa	acide aminé
Aa	<i>Arabidopsis arenosa</i>
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AESP	Extra Spindle Poles
ARN	Acide Ribonucléique
As	<i>Arabidopsis suecica</i>
AsAa	Sous-génome <i>A. arenosa</i> d' <i>A. suecica</i>
AsAt	Sous-génome <i>A. thaliana</i> d' <i>A. suecica</i>
ASY	Asynaptic
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CDB	Cassure double-brin
CO	Crossing-over
COM1	Conserved Telomere Maintenance Component 1
DFO	DSB Formation
EXO1	Exonucléase 1
FANCD2	Fanconi Anemia D2
FANCM	Fanconi Anemia complementation group M
FAS1	Fasciata 1
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FIGL1	Fidgetin-like 1
FLIP	Fidgetin-like-1 Interacting Protein
HEI10	Human Enhancer of Invasion 10
MRE11	Meiotic Recombination 11
MLH1	MutL-Homolog 1
MSH	MutS-Homolog
MUS81	MMS and UV Sensitive 81
MTOPVIB	Meiotic Topoisomerase VIB-like
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NCO	Non crossing-over
PCNA	Proliferating Cellular Nuclear Antigen
PDS5	Precocious Dissociation of sisters 5
PANS1	Patronus 1
PMS1	Postmeiotic Segregation 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRD	Putative Recombination Initiation Defect
RMI1	RECQ Mediated Instability 1
RECQ4	RECQ Helicase 4
RPA	Replication Protein A
SCC	Sister-Chromatid Cohesion
SGS1	Suppressor of Gene Silencing 1
SHOC1	Shortage In Chiasmata 1
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
SPO11	Sporulation 11
SWI1	Switch 1
TAF4B	TBP-Associated Factor 4

TOP3
ZIP
ZMM

Topoisomerase 3
Zinc Transporteur Precursor
Zip-Mer-Msh

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique	1
I. La polyplœidie et ses avantages	1
1) Origine	1
2) Avantages de la polyplœidie	5
II. Les challenges liés à la polyplœidisation	6
1) Les changements structuraux au niveau du génome	6
i. Détection des échanges homéologues chez les allopolyploïdes	7
ii. Les échanges homéologues au niveau moléculaire	8
iii. Les conséquences des réarrangements du génome	10
2) Les changements épigénétiques liés à l'allopolyploïdie	11
i. Rôle dans la dominance nucléolaire	12
ii. Rôle dans la dominance tissulaire	12
iii. Rôle dans la dominance du génome	14
iv. Les avantages évolutifs	14
3) La dérégulation des éléments transposables	15
i. La réactivation des éléments transposables déclenchée par la polyplœidisation	15
ii. Les conséquences de la dérégulation des éléments transposables	16
iii. Les avantages évolutifs	17
4) Auto-incompatibilité en première génération	18
i. Définition du système d'auto-incompatibilité	18
ii. Transition vers l'auto-compatibilité chez les Brassicacées	22
5) Problèmes méiotiques en première génération	23
i. Anomalies méiotiques	23
ii. Conséquence des problèmes méiotiques liés à la polyplœidisation : l'aneuploïdie	25
iii. Conséquence des problèmes méiotiques liés à la polyplœidisation : Réduction de la fertilité	28
iv. Contribution des progéniteurs diploïdes aux anomalies méiotiques présents chez les néopolyploïdes	29
III. Les solutions	30
1) La méiose des plantes diploïdes	30
i. Introduction générale de la progression méiotique	30
1. Prophase I	32
2. Métaphase I	35
3. Anaphase I	35
4. Télophase I	37
5. Méiose II	37
ii. Formation des cassures double brin de l'ADN	37
iii. Étape de résection	38
iv. Étape d'invasion	38
v. Résolution des cassures	39
vi. La régulation de la recombinaison méiotique	42
1. L'assurance du crossing-over ou CO obligatoire	42
2. L'homéostasie du nombre de crossing-over	42
3. L'interférence du crossing-over	43
vii. La distribution de la recombinaison méiotique	44
1. À l'échelle chromosomique	44
2. À l'échelle locale	45
viii. L'impact de la diversité des séquences sur la recombinaison méiotique	45
2) Recombinaison méiotique chez les plantes autopolyploïdes	48
i. Rappel sur les problèmes méiotiques des autopolyploïdes	48
ii. Les solutions évolutives de stabilisation de la méiose chez les autopolyploïdes	51
1. Diminution du taux de crossing-over	51
2. Renforcement de l'interférence	52
3. Bases génétiques de l'adaptation méiotique à l'autopolyploïdie	53

a. Les éléments axiaux ASY1 et ASY3 -----	53 -
b. La cohésine REC8-----	55 -
c. Les protéines de la voie ZMM -----	56 -
d. Autres candidats intéressants-----	57 -
3) Recombinaison méiotique chez les plantes allopolyploïdes -----	58 -
i. Rappel sur les problèmes méiotiques des allopolyploïdes -----	58 -
ii. Les régulateurs de la recombinaison homéologue chez le blé tendre -----	59 -
1. Le locus <i>Ph1</i> -----	59 -
a. Le gène <i>ZIP4</i> -----	62 -
b. Le gène <i>ASY1</i> -----	63 -
2. Le locus <i>Ph2</i> -----	64 -
a. Le gène <i>MSH7-3D</i> -----	65 -
3. Le locus <i>Ph3</i> -----	65 -
iii. Les régulateurs de la recombinaison méiotique chez <i>Brassica napus</i> -----	65 -
1. Le locus <i>PrBn</i> -----	66 -
2. Le locus <i>BnaPh1</i> -----	67 -
3. Le gène <i>MSH4</i> -----	67 -
4. D'autres gènes candidats-----	68 -
IV. <i>Arabidopsis suecica</i> : une plante modèle pour étudier l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie -----	68 -
1) Origine -----	68 -
2) Les challenges liés à la polyploïdisation-----	70 -
3) Le locus <i>BYS</i> -----	71 -
V. Les objectifs de la thèse-----	71 -
CHAPITRE 2 : Quand les deux sous-génomés d'<i>Arabidopsis suecica</i> se rencontrent pour la première fois ... -----	75 -
I. Introduction, Matériel et méthodes, Résultats et Discussion : -----	75 -
II. Expériences additionnelles -----	94 -
1) Hypothèses initiales-----	94 -
2) Matériels et méthodes -----	94 -
i. Marquage EdU et analyse cytologique -----	94 -
ii. Immunomarquage des protéine RAD51 et DMC1 -----	95 -
3) Résultats -----	96 -
i. La plante néoallopolyploïde ne montre aucun changement majeur de la cinétique de la méiose --	96 -
ii. Des essais d'immunomarquage non concluants sur <i>Arabidopsis suecica</i> -----	97 -
III. Résumé -----	98 -
CHAPITRE 3 : Étude de l'évolution de la stabilité méiotique de plantes néosynthétisées d'<i>Arabidopsis suecica</i> dans les premières générations-----	101 -
I. Hypothèses initiales -----	101 -
II. Matériels et méthodes-----	102 -
1) Matériel végétal et conditions de croissance -----	102 -
2) Analyse de la viabilité des grains de pollen -----	103 -
3) Étalements des chromosomes méiotiques-----	103 -
III. Résultats -----	104 -
1) La fertilité des plantes synthétiques d' <i>A. suecica</i> reste réduite malgré une augmentation de la viabilité des grains de pollen au cours des générations-----	104 -
2) Une variabilité dans l'évolution de la stabilité méiotique est observée chez les différentes lignées d' <i>A. suecica</i> néosynthétiques -----	106 -
3) Il n'y a pas de corrélation directe entre la viabilité des grains de pollen et la stabilité méiotique chez les plantes néoallopolyploïdes d' <i>A. suecica</i> -----	109 -

IV. Résumé -----	111 -
CHAPITRE 4 : Analyse de l'expression des gènes méiotiques dans les plantes néosynthétisées d'<i>Arabidopsis suecica</i> -----	113 -
I. Hypothèses initiales -----	113 -
II. Matériels et méthodes -----	113 -
1) Matériel végétal pour le séquençage d'ARN -----	113 -
2) Extraction et séquençage des ARN -----	113 -
3) Analyse bioinformatique des ARN messagers -----	115 -
III. Résultats -----	115 -
1) La proportion de gènes exprimés en méiose est similaire entre les plantes naturelles et néosynthétiques d' <i>A. suecica</i> -----	115 -
2) Comparaison globale des transcriptomes de plantes naturelle et néosynthétiques d' <i>A. suecica</i> ---	118 -
3) Des gènes méiotiques connus sont sous-exprimés dans les plantes néosynthétiques d' <i>A. suecica</i> --	121 -
IV. Résumé -----	124 -
CHAPITRE 5 : Rôle des protéines MSH dans la recombinaison méiotique chez <i>A. suecica</i> -	127 -
I. Hypothèses initiales -----	127 -
II. Matériels et méthodes -----	128 -
1) Analyse des séquences des gènes <i>MSH</i> d' <i>A. suecica</i> -----	128 -
2) Conditions de croissance -----	128 -
3) Conception des mutants <i>msh</i> -----	128 -
i. Création des séquences codants les ARN guides-----	128 -
ii. Clonage -----	129 -
1. Clonage de la séquence codant les ARN guides -----	129 -
2. Clonage du fragment d'intérêt dans le plasmide d'expression de la plante -----	132 -
iii. Transformation des plantes d' <i>A. suecica</i> par les bactéries <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -----	132 -
iv. Sélections et caractérisations des transformants-----	133 -
4) Analyse de la viabilité des grains de pollen -----	134 -
5) Étalements de chromosomes méiotiques -----	134 -
6) Immunolocalisation de la protéine MLH1 -----	134 -
III. Résultats -----	135 -
1) Analyse des séquences de gènes <i>MSH</i> d' <i>Arabidopsis suecica</i> -----	135 -
2) La fertilité n'est pas impactée par la mutation du gène <i>msh7</i> chez les plantes d' <i>A. thaliana</i> -----	137 -
3) La fertilité des plantes d' <i>A. suecica</i> n'est pas affectée par la mutation des gènes <i>msh7</i> -----	139 -
4) La mutation du gène <i>msh7</i> semble affecter la stabilité méiotique d' <i>A. suecica</i> -----	142 -
5) Analyse de l'expression des gènes <i>MSH</i> dans les plantes néosynthétiques d' <i>A. suecica</i> -----	144 -
IV. Résumé -----	146 -
CHAPITRE 6 : Discussion générale -----	149 -
I. La régulation de l'appariement, de la synapse et de la recombinaison méiotique chez <i>Arabidopsis suecica</i> -----	150 -
II. D'autres causes potentielles méiotiques pourraient être à l'origine de l'instabilité observée chez les plantes néosynthétiques d'<i>A. suecica</i> -----	156 -
III. En plus d'une méiose instable, d'autres problèmes pourraient affecter la fertilité des plantes néosynthétiques d'<i>A. suecica</i> -----	157 -
IV. Des changements épigénétiques pourraient influencer l'évolution de la stabilité méiotique dans les premières générations des plantes néosynthétiques d'<i>A. suecica</i> -----	159 -

V. Des échanges homéologues pourraient affecter l'évolution de la stabilité méiotique dans les premières générations des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* ----- 160 -

CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique

I. La polyploïdie et ses avantages

Il y a plus d'un siècle, l'un des moteurs de la diversité et de la spéciation a été découvert : la polyploïdie (aussi communément appelée duplication de l'ensemble du génome) (Otto & Whitton, 2000; Soltis *et al.*, 2009; Storme & Geelen, 2013a). La polyploïdie est prédominante chez les angiospermes, avec plus de 180 événements putatifs identifiés phylogénétiquement et une fréquence de polyploïdisation estimée entre 30 et 70% (Jiao *et al.*, 2011; Soltis *et al.*, 2015; Leebens-Mack *et al.*, 2019; Deb *et al.*, 2023a). Selon l'étude de Jiao *et al.*, 2011, tous les angiospermes auraient endossé au moins un cycle de duplication de l'ensemble du génome durant leur évolution qui, pour certains, auraient été suivi d'un retour à l'état diploïde (Soltis *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2011; Wendel, 2015; Soltis & Soltis, 2016; Mandáková & Lysak, 2018; Leebens-Mack *et al.*, 2019; Deb *et al.*, 2023a). Il est d'ailleurs suggéré que la plante modèle *Arabidopsis thaliana* aurait subi deux ou trois cycles de duplication du génome avant de revenir à un état diploïde (Vision *et al.*, 2000; Blanc *et al.*, 2003; Bowers *et al.*, 2003). Il est donc maintenant nécessaire de reconsidérer la définition de la polyploïdie qu'avait énoncé Vern Grant en 1981 comme « la formation d'un nombre élevé de chromosomes... par l'ajout de jeux de chromosomes entiers supplémentaires présents dans un ou plusieurs organismes ancestraux. En bref, la polyploïdie est la présence de trois ensembles de chromosomes ou plus dans un organisme » (Grant, 1981; Soltis *et al.*, 2004a).

1) Origine

Les plantes polyploïdes peuvent être définies selon un gradient de similarité de séquences (**Figure 1**) (Ramsey & Schemske, 1998; Deb *et al.*, 2023a). Les autopolyploïdes naissent au sein d'une même espèce par la duplication du génome et possèdent plus de deux génomes identiques, tandis que les allopolyploïdes proviennent de l'hybridation entre deux espèces progénitrices ayant une histoire évolutive différente et donc une divergence de séquences plus importante entre les sous-génomes (**Figure 1**) (Ramsey & Schemske, 1998, 2002; Comai, 2005; Tayalé & Parisod, 2013; Gonzalo, 2022a; Deb *et al.*, 2023a). Les allopolyploïdes possèdent des chromosomes homéologues qui partagent un ancêtre commun mais présentent des séquences divergentes, avec des régions synténiques où l'ordre des gènes a été conservé au cours de l'évolution (Ramsey & Schemske, 2002; Comai, 2005; Tayalé & Parisod, 2013; Deb *et al.*,

2023a). Une troisième classe de polyploïdes peut être définie entre les deux extrémités de ce gradient, les allopolyploïdes segmentaires qui contiennent des segments autopolyploïdes mais également allopolyploïdes issues de l'hybridation d'espèces progénitrices dont les génomes sont partiellement divergents (**Figure 1**) (Ramsey & Schemske, 2002; Comai, 2005; Tayalé & Parisod, 2013; Sattler *et al.*, 2016; Gonzalo, 2022a; Deb *et al.*, 2023a).

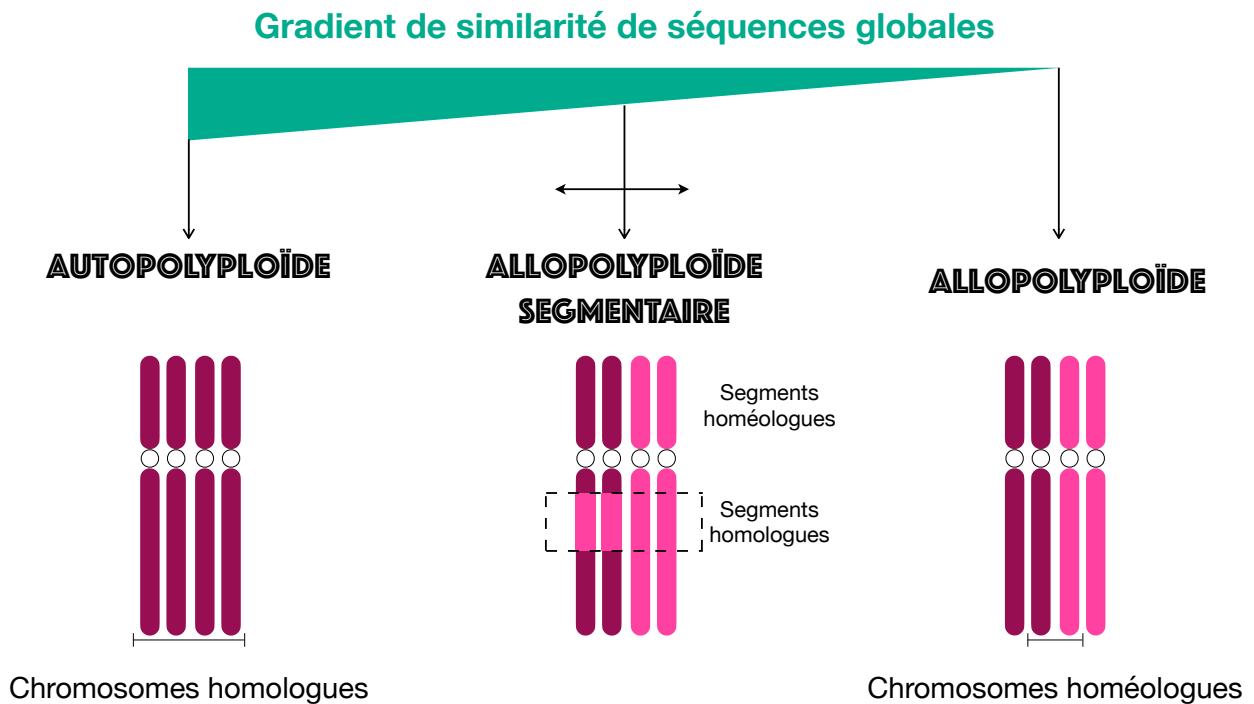


Figure 1 : Les différents types de polyploïdie

Avec une grande similarité de séquences, les autopolyploïdes possèdent deux (ou plus) paires de chromosomes homologues identiques. À l'inverse, les allopolyploïdes conservent une diversité de séquences plus conséquente entre les différents sous-génomes / chromosomes homéologues. Entre les deux extrémités de ce gradient de similarité de séquences globales, les allopolyploïdes segmentaires possèdent un mélange des séquences homologues et homéologues et peuvent donc avoir une similarité de séquences variable.

Lors de la méiose, les chromosomes des plantes autopolyploïdes tendent à avoir une ségrégation polysomique c'est-à-dire que les chromosomes n'ont pas de préférence de partenaire de recombinaison alors que les plantes allopolyploïdes s'orientent vers une ségrégation disomique avec pour préférence un partenaire de recombinaison dont la séquence est plus similaire (Bomblies, 2023). Dans le cas des allopolyploïdes segmentaires, une partie

des séquences du génome tend vers une ségrégation polysomique et l'autre, vers une ségrégation disomique (Leal-Bertioli *et al.*, 2018; Mason & Wendel, 2020; Bomblies, 2023).

La naissance de plantes polyploïdes peut survenir suite à la duplication du génome somatique en raison de la non-disjonction des chromosomes pendant la mitose, au cours des stades zygotique, embryonnaire ou méristématique, ce qui peut mener à la formation d'une descendance polyploïde (**Figure 2A**) (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2004a; Tayalé & Parisod, 2013; Yirga, 2021). Cependant, ce mécanisme semble moins courant dans la nature par rapport à la naissance de polyploïdes créés par la fusion de deux gamètes non réduits (**Figure 2C**) (Thompson & Lumaret, 1992; Bretagnolle & Thompson, 1995; Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2004a; Tayalé & Parisod, 2013; Geelen, 2022). Des aberrations méiotiques comme des problèmes d'appariement ou de non-disjonction des chromosomes en première ou deuxième division peuvent conduire à la formation de gamètes non réduits (Yirga, 2021; Deb *et al.*, 2023a). Dans la nature, les gamètes non réduits sont produits à une fréquence qui varie entre 0,1 à 2% mais cette fréquence peut être augmentée en réponse à différents stress environnementaux comme les températures basses ou élevées, le manque d'eau ou de nutriments et les dommages physiques (Ramsey & Schemske, 1998; Otto, 2007; Mason *et al.*, 2011; Pécrix *et al.*, 2011; Storme & Geelen, 2013a; Tayalé & Parisod, 2013; Vanneste *et al.*, 2014; Kreiner *et al.*, 2017; Peer *et al.*, 2017; Pelé *et al.*, 2018; Geelen, 2022). D'ailleurs, une vague de duplication de l'ensemble du génome chez les angiospermes semble coïncider avec l'extinction massive qui marque le passage du Crétacé au Paléogène ce qui aurait permis la survie de ce clade il y a 66 millions d'années et sa diversification (Soltis *et al.*, 2015). Les plantes polyploïdes peuvent également être créées par le biais d'un pont « triploïde » avec la fusion d'un gamète non réduit diploïde et un gamète réduit haploïde (**Figure 2B**) (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2004a; Tayalé & Parisod, 2013; Svačina *et al.*, 2020a). La combinaison de gamètes non réduits produits par la plante triploïde et de gamètes réduits produits par une plante diploïde conduira à la formation de plantes tétraploïdes (**Figure 2B**). De plus, lorsque différentes espèces progénitrices sont autopolyploïdes, la fusion de leurs gamètes réduits diploïdes entraîne la formation de plantes allopolyploïdes (**Figure 2D**) (Pelé *et al.*, 2018; Svačina *et al.*, 2020a). Ainsi, étant donné la faible probabilité de rencontre entre deux gamètes non réduits, il est suggéré que la voie des intermédiaires triploïdes constitue le principal chemin vers la polyploïdisation, car les plantes triploïdes naturelles peuvent ne pas être totalement stériles (deWet, 1979; Ramsey & Schemske, 1998; Husband, 2000; Husband *et al.*, 2002; Husband, 2004; Soltis *et al.*, 2004a; Svačina *et al.*, 2020a).

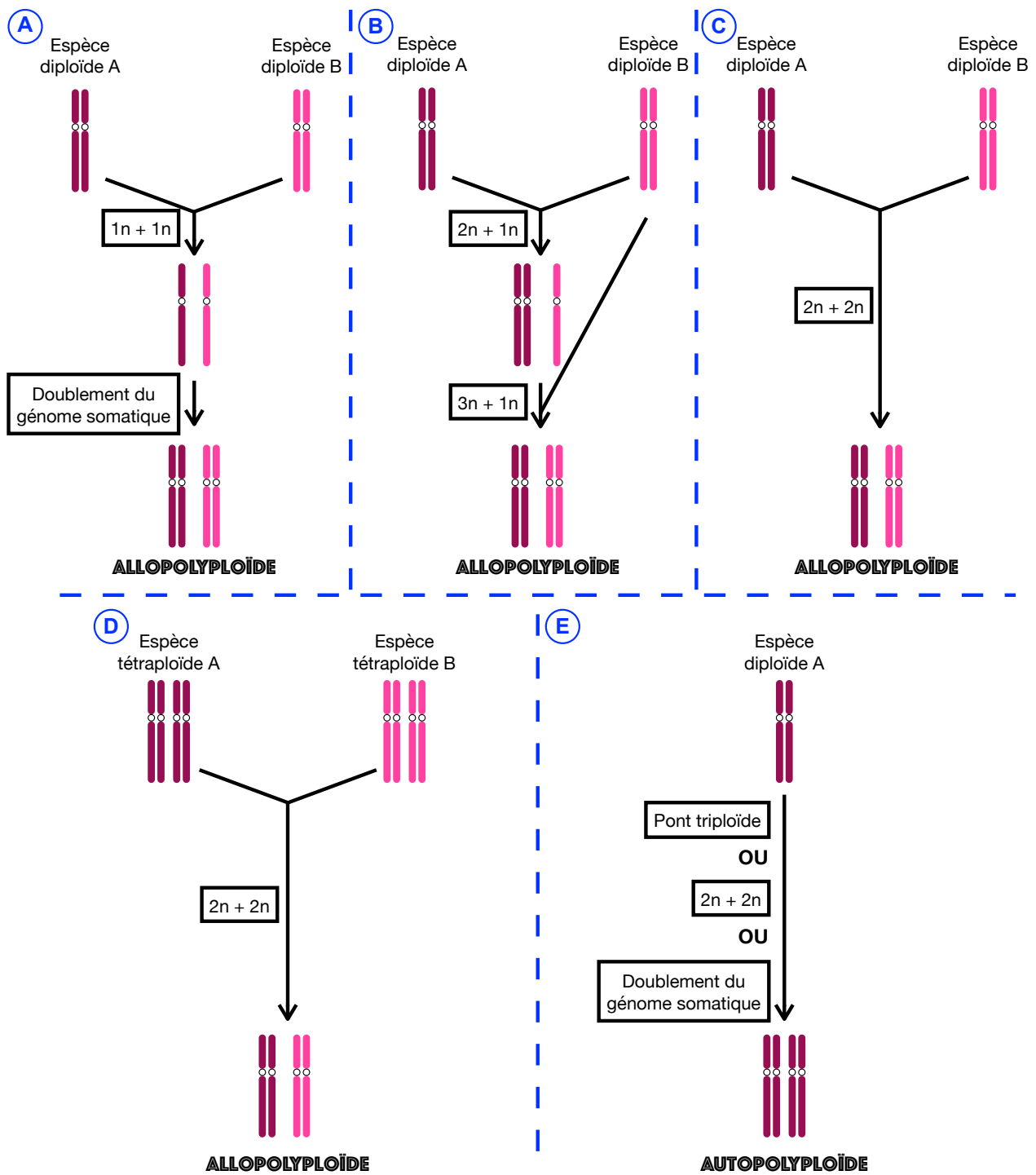


Figure 2 : Les différentes voies possibles de la formation de polyploïdes

(A) Duplication du génome somatique : Deux gamètes réduits ($1n$) de deux espèces diploïdes apparentées A et B peuvent fusionner pour donner un hybride AB. Le doublement du génome somatique de cet hybride AB permet alors la formation d'un allopolyploïde AABB.

- (B) Pont triploïde : La fusion entre un gamète non réduit ($2n$) de l'espèce A et un gamète réduit ($1n$) de l'espèce B mène à la création d'une espèce triploïde AAB. Par la suite, la réunion d'un gamète non réduit ($3n$) du parent AAB et d'un gamète réduit du parent B aboutit à la conception d'un allopolyploïde AABB.
- (C) Fusion de gamètes non réduits : Deux gamètes non réduits ($2n$) des parents A et B peuvent se rencontrer pour donner naissance à un allopolyploïde AABB.
- (D) Fusion de gamètes réduits : Deux gamètes réduits ($2n$) de progéniteurs autopolyploïdes apparentés A et B peuvent se réunir pour concevoir un allopolyploïde AABB.
- (E) De la même manière que pour les allopolyploïdes, les autopolyploïdes peuvent être créés par un pont triploïde, la fusion de deux gamètes non réduits ($2n$) ou par la duplication du génome somatique.

Au laboratoire, des plantes polyploïdes chimériques peuvent être produites au stade plantule (trempage des racines ou injection dans les méristèmes) par doublement du génome somatique à l'aide d'agents antimitotiques comme la colchicine (BLAKESLEE & AVERY, 1937; Compton *et al.*, 1996; Planchais *et al.*, 2000; Ramsey & Schemske, 2002; Sattler *et al.*, 2016; Yirga, 2021). Ces agents inhibent la polymérisation des microtubules, entraînant un défaut de migration des chromosomes lors de l'anaphase (BLAKESLEE & AVERY, 1937; Compton *et al.*, 1996; Planchais *et al.*, 2000; Ramsey & Schemske, 2002; Sattler *et al.*, 2016; Yirga, 2021). Des chocs thermiques peuvent également être utilisés pour dupliquer le génome somatique. Concernant la formation de gamètes non réduits, elle peut être induit par des agents anti-tubulines, de l'oxyde nitreux, des chocs thermiques ou des transferts de gènes responsables de la formation de gamètes non réduits (Dewitte *et al.*, 2012; Younis *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2016). L'analyse de la polyploïdie des plantes peut ensuite être analysée par cytométrie en flux et/ou par le comptage des chloroplastes dans les cellules de garde (Brummer *et al.*, 1999; Heping *et al.*, 2008; Yirga, 2021).

2) Avantages de la polyploïdie

La polyploïdie constitue un bouclier contre l'impact des mutations délétères masqué par les autres copies supplémentaires des gènes sauvages (Soltis & Soltis, 2000; Comai, 2005; Udall & Wendel, 2006; Ha *et al.*, 2009; Sattler *et al.*, 2016; Bomblies, 2020; Svačina *et al.*, 2020a). Elle permet également de diversifier les copies supplémentaires de gènes qui, par mutation, peuvent acquérir de nouvelles fonctions ce qui va permettre d'augmenter l'hétérozygotie et de

produire des protéines non formées par les progéniteurs (Soltis *et al.*, 2004a; Adams & Wendel, 2005; Comai, 2005; Udall & Wendel, 2006; Bomblies & Madlung, 2014; Sattler *et al.*, 2016). Les nouvelles caractéristiques biochimiques de ces protéines, résultant de la polyploïdisation, peuvent stimuler une augmentation de la biomasse, du développement et de la fertilité par rapport aux progéniteurs, tout en renforçant la résilience face au stress comme les carences en nutriments, les chocs thermiques, les stress hydriques et les infections par des pathogènes (Chen, 2010; Sattler *et al.*, 2016; Svačina *et al.*, 2020a). Cette diversité génétique apporte également un avantage écologique puisqu'elle augmente la capacité des polyploïdes à coloniser de nouvelles niches comme des habitats extrêmes inexploités par leurs progéniteurs diploïdes (Levin, 1983; Lumaret *et al.*, 1987; Barrett *et al.*, 1989; Soltis *et al.*, 2004b; Svačina *et al.*, 2020b). Au niveau génomique, la présence d'un ensemble chromosomique supplémentaire représente un avantage significatif en permettant de supporter d'importants réarrangements génomiques qui auraient normalement des conséquences fatales chez les progéniteurs diploïdes (Svačina *et al.*, 2020b).

Ces différents avantages font de la polyploïdie un prestigieux avantage sélectif sur les plans moléculaire et physiologique. Cependant, les plantes polyploïdes nouvellement formées doivent surmonter des défis d'instabilité génétique, épigénétique et méiotique avant de s'adapter et de s'établir en se diversifiant pour concurrencer leurs progéniteurs diploïdes (Ramsey & Schemske, 2002; Comai, 2005).

II. Les challenges liés à la polyploïdisation

1) Les changements structuraux au niveau du génome

La polyploïdisation peut entraîner rapidement la formation de réarrangements dans le génome par recombinaison illégitime entre éléments répétés comme les éléments transposables ou entre chromosomes homéologues pour les espèces allopolyploïdes (**Figure 3**) (Gaeta & Pires, 2010; Gonzalo, 2022b; Deb *et al.*, 2023b).

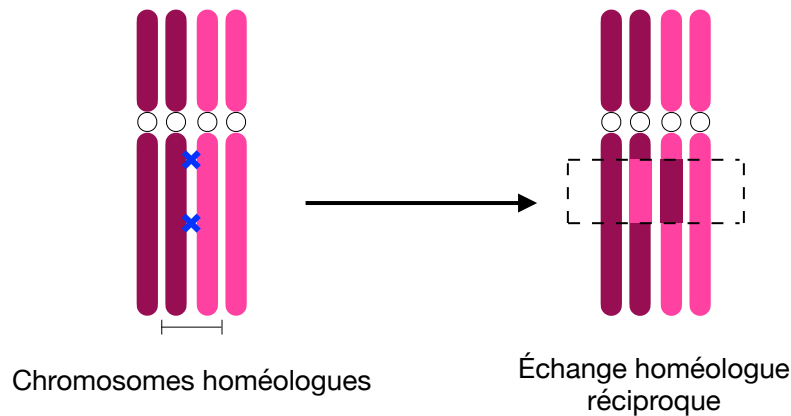


Figure 3 : Illustration de la formation d'un échange homéologue

Les chromosomes homéologues des allopolyploïdes peuvent recombiner entre eux (indiqué par les croix bleues à gauche) ce qui entraîne la formation d'un échange homéologue réciproque entre ces chromosomes (droite, encadré en noir hachuré : échange entre les chromosomes rose et violet).

i. Détection des échanges homéologues chez les allopolyploïdes

Les échanges entre chromosomes homéologues sont fréquents chez les plantes allopolyploïdes nouvellement synthétisées en raison de leur instabilité méiotique (Voir Partie II 5) Problèmes méiotiques en première génération). En effet, les échanges homéologues (EH) sont détectés dans les espèces d'Arachide (Bertioli *et al.*, 2019; Zhuang *et al.*, 2019), de Café (Lashermes *et al.*, 2014, 2016; Scalabrin *et al.*, 2024), de *Brassica* (Song *et al.*, 1995; Gaeta *et al.*, 2007; Szadkowski *et al.*, 2010, 2011; Chalhoub *et al.*, 2014; Stein *et al.*, 2017; Hurgobin *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2021), de Quinoa (Jarvis *et al.*, 2017), de *Tragopogon miscellus* (Chester *et al.*, 2012), de Tabac (Chen *et al.*, 2018), de Coton (Salmon *et al.*, 2010) et de Blé (Liu *et al.*, 2020). Cependant, ces études ne représentent qu'une faible partie des taxons végétaux allopolyploïdes.

Les EH peuvent à la fois être fixés sur plusieurs générations mais également être propre à un individu, une lignée spécifique par formation d'échanges homéologues *de novo*. Par exemple, chez des lignées synthétiques d'Arachide issues du croisement entre des parents tétraploïdes *Arachis ipaënsis* x *Arachis correntina* dont le génome a été doublé à la colchicine, l'étude de Chu *et al.*, 2021 montre à l'aide de la puce à SNP Axiom Arachis 48 K qu'en première génération (F1), des EH uniques dans les différentes plantes analysées sont observés. Dans la génération suivante, les échanges homéologues de chaque lignée sont transmis par ségrégation disomique et d'autres EH *de novo* sont observés. De même, les études d'analyse d'échanges homéologues chez la plante *T. miscellus* et le colza *B. napus* ont montré que les taux

de EH peuvent varier entre des individus au sein d'une même lignée mais également entre les différentes lignées synthétisées (Chester *et al.*, 2012; Higgins *et al.*, 2018). De plus, les analyses cytogénétiques mettent en avant une réduction de la formation de nouveaux échanges homéologues au cours des générations, à mesure que la méiose devient plus stable. C'est le cas pour la plante *Brassica napus* resynthétisée, dans l'étude de Xiong *et al.*, 2020, il est observé un taux moyen de réarrangements entre les chromosomes homéologues A2 et C2 qui diminue de 8% en première génération à 1% en onzième génération. De même, dans l'étude de Carvalho *et al.*, 2021, dans les différentes lignées de *B. napus* synthétiques, une augmentation des échanges homéologues a été mise en évidence (à l'aide de la puce SNP Brassica 60K) de la génération 1 à la génération 4 ce qui a été rapidement suivi d'une diminution des EH *de novo* jusqu'en génération 9.

L'analyse de 1462 plantes synthétiques de génération 12 de blé AADD issues du croisement entre *Triticum urartu* (AA) et *Aegilops tauchii* (génomme DD) montre un taux moyen d'échanges homéologues d'environ 0,1 par méiose. Cependant, ce taux est supposé inférieur au taux réel car l'identification de petits EH par cytologie est quasiment impossible (Gou *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Par ailleurs, des données de séquençage du génome entier de riz allotétraploïde nouvellement synthétisé montre un taux d'EH par méiose de 17,4 en quatrième génération et de 19,0 en cinquième génération. Il est supposé que ce taux pourrait diminuer dans les générations suivantes, une fois que le génome aurait atteint un certain seuil d'homozygoté (Wu *et al.*, 2020). Cependant, pour certaines espèces, l'instabilité génomique induit par la formation d'échanges homéologues peut perdurer sur de nombreuses générations comme après 40 générations chez la plante *Tragopogon miscellus* (Chester *et al.*, 2012) ou chez la plante *B. napus* cultivée (Chalhoub *et al.*, 2014; Samans *et al.*, 2017; Mason *et al.*, 2018). Néanmoins, ces échanges homéologues peuvent être tolérés chez les plantes allopolyploïdes naturelles et cultivées et nous verrons dans la sous-partie iii quels peuvent être leur contribution pour l'évolution de ces espèces.

ii. Les échanges homéologues au niveau moléculaire

Au niveau chromosomique, les échanges homéologues sont fréquemment retrouvés au niveau des régions synténiques où le degré de similarité de séquences est plus important entre les chromosomes de sous-génommes différents (Chalhoub *et al.*, 2014; Lashermes *et al.*, 2014, 2016; Samans *et al.*, 2017; Higgins *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). C'est le cas de la plante *Brassica napus* qui est issue de l'hybridation entre *B. oleracea* (CC) et *B. rapa*

(AA) il y a environ 7500 ans où les événements d'EH sont retrouvés principalement entre les chromosomes A1/C1, A2/C2 et A9/C9 (Chalhoub *et al.*, 2014; Samans *et al.*, 2017; Higgins *et al.*, 2018; Lloyd *et al.*, 2018). De même, les EH ont été montrés comme plus fréquents entre les groupes 2 et 3 des chromosomes du blé allotétraploïde et les espèces de *Tragopogon* présentent une préférence de formation d'EH dans les régions synténiques (Chester *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013, 2020). De plus, il peut également y avoir des échanges homéologues qui sont centralisés vers un sous-génome en particulier c'est-à-dire qu'un sous-génome va remplacer plus fréquemment l'autre sous-génome. En effet, chez la plante *Brassica napus*, il a été observé que les segments du génome A remplacent plus souvent les segments du génome C (Chalhoub *et al.*, 2014; Samans *et al.*, 2017). Cette dominance de sous-génome pour les EH n'est pas commune à toutes les espèces, elle peut varier en fonction de l'origine de leurs chromosomes (Cheng *et al.*, 2012; Murat *et al.*, 2014; Bird *et al.*, 2018; Alger & Edger, 2020).

Les échanges homéologues se produisent essentiellement au niveau des régions subtélomériques et rarement dans les régions centromériques et télomériques comme chez l'Arachide, la banane, le riz tétraploïde synthétique et la plante *Arabidopsis suecica* (Xiong *et al.*, 2011, 2020; Nicolas *et al.*, 2012; Jarvis *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Burns *et al.*, 2021). Cependant, des événements d'EH ont été identifiés au niveau des séquences centromériques comme chez *Brassica napus* où 129 événements d'EH *de novo* ont été rapportés avec 25 d'entre eux qui étaient colocalisés au sein des centromères (Higgins *et al.*, 2018). À l'inverse des échanges homologues qui se produisent principalement dans les régions promotrices et terminatrices des gènes chez les plantes, les régions exoniques de grandes similarités entre des sous-génomés différents sont les régions les plus enrichies en échanges homéologues (Choi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Les séquences de jonction d'EH sont enrichies en motifs comme les répétitions CCN (décrits chez le blé et le riz allotétraploïde synthétique), CTT ou encore des motifs riches en A (mis en évidence chez *B. napus* et le riz) (Choi & Henderson, 2015; Darrier *et al.*, 2017; Deb *et al.*, 2023a). Ces motifs sont positivement corrélés avec des points chauds de recombinaison homologue et l'euchromatine (Zhang *et al.*, 2020; Deb *et al.*, 2023a). De plus, chez le riz allotétraploïde nouvellement synthétisé en génération 2 et 4, il a été décrit une corrélation positive entre le taux d'échanges homéologues et la présence d'éléments transposables MITEs qui sont localisés préférentiellement dans des régions géniques non codantes (régions régulatrices en amont ou intron) (Li *et al.*, 2023).

iii. Les conséquences des réarrangements du génome

Le résultat de ces échanges homéologues comprend de grands remaniements du génome tels que des délétions, des insertions et/ou des inversions de séquences d'ADN, des translocations de fragments chromosomiques réciproques ou non réciproques entre chromosomes homéologues et la duplication ou la réduction de séquences répétées (**Figure 4**) (Tayalé & Parisod, 2013; Mason & Wendel, 2020). Ces événements conduisent également à une désorganisation du génome chez la progéniture en homogénéisant les deux (ou plus) sous-génomes ou en éliminant la contribution génétique d'un parent (Lloyd & Bomblies, 2016)

Bien qu'ils puissent être préjudiciables, les échanges homéologues formés dans les néopolyploïdes permettent la sélection de nouveaux modèles d'expression génique, de nouveaux gènes et de nouvelles protéines. Ils contribuent à la création de nouveaux phénotypes tel qu'une diversité des couleurs de fleurs chez les Arachides, des temps de floraison différents chez les *Brassica*, la résistance à des pathogènes ou à la salinité, le rendement en graines ou encore l'angle des branches qui joue un rôle essentiel dans la formation de l'architecture du couvert végétal (Pires *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Chalhoub *et al.*, 2014; Schiessl *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017, 2024; Bertioli *et al.*, 2019; Raman *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

Par conséquent, la recombinaison illégitime représente une étape évolutive importante pour la spéciation et l'adaptation des polyploïdes nouvellement formés.

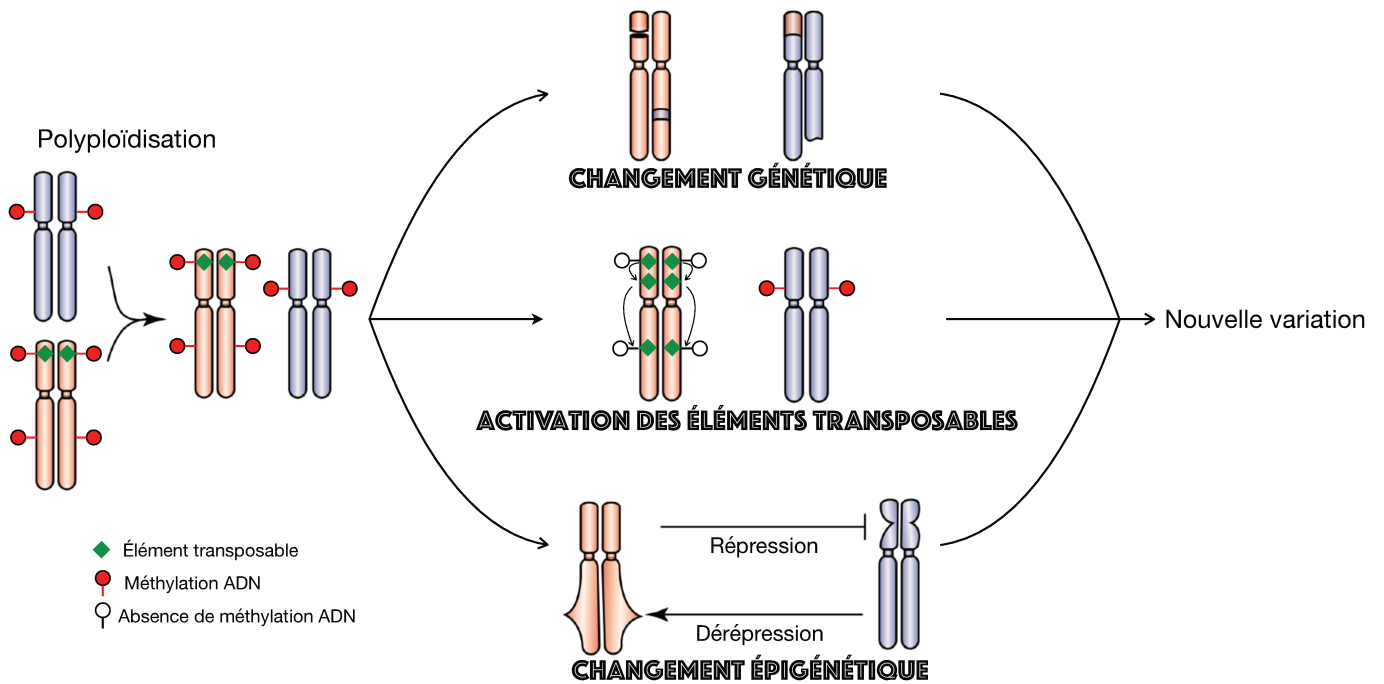


Figure 4 : Illustration des modifications génomiques fréquemment observés après la polyploïdisation

La polyploïdisation, représentée ici par la coexistence dans un même noyau de chromosomes de deux génomes différents (bleu et rouge), peut entraîner la formation de changement génétique tel que des insertions, des délétions, des inversions de séquences d'ADN, des translocations de fragments chromosomiques réciproques ou non réciproques entre chromosomes homologues. La polyploïdisation peut également provoquer l'activation/la duplication d'éléments transposables, qui étaient réduits au silence chez les parents par la méthylation de l'ADN et/ou des modifications épigénétiques remodelant la chromatine. Ces changements épigénétiques causés par l'interaction des génomes peuvent réprimer ou activer l'expression génique. Tous ces changements peuvent engendrer de nouveaux schémas d'expression génique, de nouveaux gènes et de nouvelles protéines. Adapté de Osborn *et al.*, 2003.

2) Les changements épigénétiques liés à l'allopolyploïdie

Très peu d'études sur les changements épigénétiques dans les plantes néosynthétisées ont été réalisées. Cependant, il a été montré que ces changements pouvaient avoir de grandes répercussions sur la transcription des gènes (**Figure 4**). Dans cette sous-partie, je décrirai les impacts connus de ces modifications épigénétiques ainsi que leurs avantages sélectifs/évolutifs qu'ils confèrent aux plantes polyploïdes.

i. Rôle dans la dominance nucléolaire

Lorsque deux noyaux fusionnent entre eux lors de l'hybridation, l'organisme peut « désigner » un sous-génome préférentiel pour la transcription des ARN ribosomiaux via l'inhibition épigénétique des gènes des ARN ribosomiaux de l'autre sous-génome (Chen, 2013). C'est le cas des plantes *Arabidopsis suecica* naturelles et néosynthétisées (à partir de la deuxième génération) formées par l'hybridation entre *A. thaliana* et *A. arenosa* pour lesquelles on observe un silencing des ARN ribosomiaux hérités du parent *A. thaliana* (Chen *et al.*, 1998; Chen, 2013). Cependant, l'étude de Burns *et al.*, 2021 décrit qu'une majorité des accessions d'*A. suecica* exprime les deux allèles d'ARNr 45S alors que 5 accessions expriment exclusivement l'ARNr 45S d'*A. arenosa*. Une dominance nucléolaire du sous-génome A est également décrite chez la plante *B. napus* (Chen & Pikaard, 1997a). Chez ces plantes, l'inactivation transcriptionnelle des ARN ribosomiaux serait liée à la méthylation de l'ADN (cytosine) et à la désacétylation des histones H3K9 coordonnées avec la méthylation H3K9me2 (Chen & Pikaard, 1997b; Chen *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 2004; Song & Chen, 2015; Ding & Chen, 2018). Chez le blé tétraploïde synthétique, la méthylation de l'ADN dans les séquences d'ADN CHG et CHH (où H représente A, T ou C) ainsi que la méthylation des histones H3K27me3 et H3K9me2 permettent l'élimination asymétrique des séquences codant les ARN ribosomiaux des génomes A et D en 7^{ème} génération (Guo & Han, 2014). Ceci est concordant avec ce qui est connu dans la nature où le blé hexaploïde montre une perte des ARNr des génomes A et D au cours de l'évolution (Guo & Han, 2014).

ii. Rôle dans la dominance tissulaire

Cependant, cette dominance nucléolaire est réversible et régulée au cours du développement de la plante notamment dans les tissus reproducteurs (inflorescences) (**Figure 5**) (Chen, 2007; Song & Chen, 2015). En effet, chez les plantes *A. suecica*, *Tragopogon miscellus* et le coton *Gossypium hirsutum*, la dominance d'un sous-génome est différenciellement exprimée entre les tissus foliaires et reproducteurs (Adams *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006b; Chaudhary *et al.*, 2009; Song & Chen, 2015; Zhang *et al.*, 2015a). Chez le coton, pour un tissu ou un stade de développement donné, il est montré que le biais d'expression spécifique du sous-génome A ou D est compris entre 20 et 40% (Zhang *et al.*, 2015a). De même, dans les plantes néosynthétisées de coton, il existe un biais d'expression du génome A dans les tissus végétatifs alors que dans les tissus reproducteurs, la dominance est celle du génome D

(comme chez les plantes naturelles) (Chaudhary *et al.*, 2009). Cependant, ce fractionnement d'expression d'un sous-génome dans les tissus n'est pas aussi prononcé dans les plantes néosynthétisées F1 de *Tragopogon miscellus* par rapport aux plantes évoluées (Buggs *et al.*, 2011).

Actuellement, les mécanismes épigénétiques précis permettant la dominance tissu spécifique d'un sous-génome sont très peu décrits aussi bien chez les plantes néosynthétisées que chez les plantes naturelles. Néanmoins, l'étude de Ziegler *et al.*, 2023 montre que dans les graines de *B. napus*, la méthylation de l'ADN et l'expression des petits ARN interférents (siRNA) qui réduisent au silence les éléments transposables sont plus abondants dans le sous-génome C ce qui indique une plus forte contribution du sous-génome A tout au long du développement de la graine.

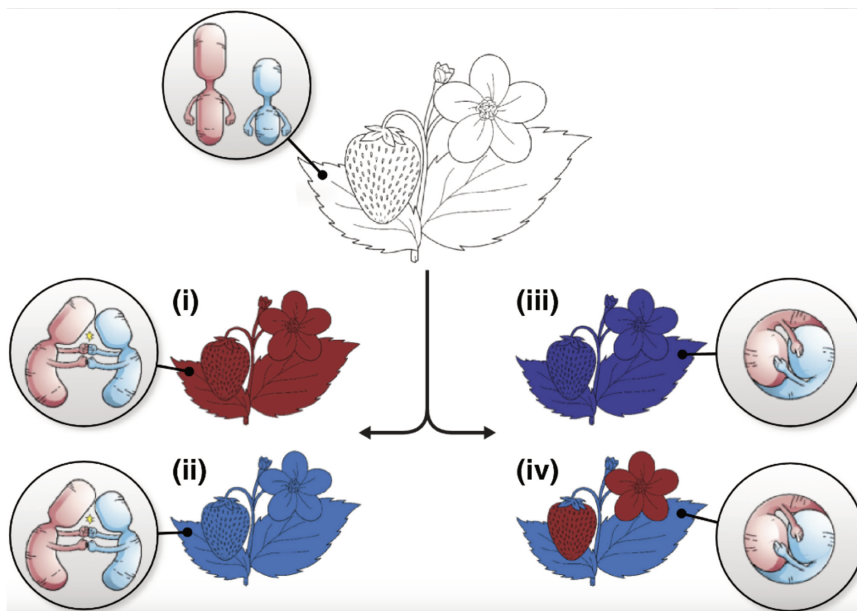


Figure 5 : Exemples d'unité ou de dominance entre sous-génomes

À la suite de l'hybridation entre deux espèces apparentées, l'allopolyploïde créé pourra avoir, à l'échelle de son génome, un sous-génome dominant par rapport à l'autre, contribuant ainsi au phénotype global (i et ii) ; ou bien deux sous-génomes pourront participer de manière égale au phénotype global (iii). À l'échelle tissulaire, une différence de dominance entre les sous-génomes pourra se manifester entre les tissus végétatifs et reproducteurs (iv). D'après Bird *et al.*, 2018.

iii. Rôle dans la dominance du génome

La dominance d'un sous-génome à l'échelle du génome est établie lors de l'hybridation et est suggérée dépendante de la différence de composition en éléments transposables et en méthylation d'ADN entre les progéniteurs (**Figure 5**) (Hollister & Gaut, 2009; Freeling *et al.*, 2012; Edger *et al.*, 2017; Bird *et al.*, 2018, 2021; Hu *et al.*, 2023). L'étude de Edger *et al.*, 2017 montre chez la plante néosynthétique *Mimulus peregrinus* de première génération qu'il existe une déméthylation des cytosines (sites CHH) dans les régions des éléments transposables des deux sous-génomes (par rapport aux parents) et un rétablissement de cette méthylation dans les générations suivantes qui ne se fait pas de manière uniforme avec le sous-génome dominant qui a des niveaux plus faibles de méthylation CHH et d'éléments transposables. De plus, il est supposé que l'expression génique du sous-génome dominant soit inversement corrélée à la méthylation de l'ADN et l'expression des siRNA de l'autre sous-génome (Li *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015; Edger *et al.*, 2017; Bird *et al.*, 2018). L'étude récente de Bird *et al.*, 2021 montre de manière reproductible qu'avec 6 lignées différentes de *B. napus* resynthétisées analysées pendant 10 générations, il est systématiquement retrouvé la même dominance du sous-génome *B. rapa* (AA) par rapport au sous-génome *B. oleracea* (CC) qui montre des niveaux de méthylation CG, CHG et CHH et un nombre d'éléments transposables LTR plus importants.

iv. Les avantages évolutifs

Après la polyploïdisation, les changements épigénétiques permettent aux plantes de s'adapter à certains stress. Par exemple, chez le riz tétraploïde soumis à un stress salin, on observe une hypométhylation de l'ADN qui active l'expression de nombreux gènes de réponse au stress qui sont généralement associés à des éléments transposables proximaux (Wang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024). Ensuite, une hyperméthylation est induite pour réprimer ces éléments transposables (Wang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024). Ils peuvent également favoriser le développement des polyploïdes par rapport à leurs progéniteurs comme par exemple modifier la période de floraison comme c'est le cas chez la plante *Arabidopsis suecica* qui fleurit plus tard par rapport aux progéniteurs. La variation de la période de floraison est contrôlée par deux loci à action épistatique *FRIGIDA* (*FRI*) et *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). *FRI* régule positivement l'expression de *FLC* qui inhibe la floraison. Le gène *FRI* d'*A. thaliana* est non fonctionnel alors que celui d'*A. arenosa* est fonctionnel. Chez *A. suecica*, *AaFRI* agit sur *AtFLC* et *AaFLC* médié par les modifications d'histones H3K9ac et H3K4me2 et rend ces allopolyploïdes dépendants de la vernalisation pour fleurir (Michaels & Amasino, 1999;

Sheldon *et al.*, 1999; Johanson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006a,b; Nah & Chen, 2010; Madlung & Wendel, 2013). On peut aussi citer la modification d'expression des gènes de l'horloge circadienne chez les plantes resynthétisées d'*A. suecica* (de générations 7 et 8) qui sont les médiateurs de la vigueur des polyploïdes. Dans l'étude de Ni *et al.*, 2009, il est rapporté que les gènes répresseurs de l'horloge tels que *CCA1* et *LHY* sont régulés à la baisse lors de la journée avec des niveaux plus faibles d'acétylation H3K9 et de méthylation H3K4 dans leurs promoteurs ce qui favorise l'expression des gènes de la voie de la photosynthèse et du métabolisme des hydrates de carbone. Ainsi, une quantité plus importante de sucres et d'amidon est accumulée pendant la journée pour être dégradée pendant la nuit et permettre une croissance plus rapide du polyploïde par rapport à ses progéniteurs.

A l'échelle du génome, les modifications épigénétiques pourraient également favoriser la conservation de gènes en multiples copies contre la dégradation mutationnelle. Ainsi, elles jouent un rôle crucial dans l'adaptation et la sélection des nouveaux polyploïdes en permettant l'activation épigénétique de ces gènes selon les variations environnementales (Madlung & Wendel, 2013).

3) La dérégulation des éléments transposables

i. La réactivation des éléments transposables déclenchée par la polyploïdisation

Les éléments transposables sont des segments d'ADN qui se déplacent dans le génome via des intermédiaires ADN pour les transposons ou ARN pour les rétrotransposons (Wicker *et al.*, 2007; Parisod *et al.*, 2010a). Ils représentent une grande proportion des génomes végétaux, entre 14 % pour *Arabidopsis thaliana* et 85% pour le maïs (*Zea mays*) (Initiative, 2000; Schnable *et al.*, 2009). Bien qu'ils soient réduits au silence dans les espèces progénitrices diploïdes, les éléments transposables (ET) peuvent être réactivés lors de la polyploïdisation suite à un relâchement du contrôle épigénétique (**Figure 4**) (Vicient & Casacuberta, 2017). Comme expliqué précédemment, après la polyploïdisation, des changements épigénétiques se produisent comme la modification de la méthylation de l'ADN au niveau des éléments transposables ce qui induit la réactivation de leur expression dans les premières générations suivies, après quelques générations, d'une restauration de ces niveaux de méthylation et de marques épigénétiques de l'hétérochromatine (Parisod *et al.*, 2012; Yaakov & Kashkush, 2012; Zhang *et al.*, 2015b; Vicient & Casacuberta, 2017). Par exemple, chez le maïs, environ 300

gènes voient leur expression modifiée en lien avec des régions géniques différentiellement méthylées associées aux ET (Eichten *et al.*, 2013).

ii. Les conséquences de la dérégulation des éléments transposables

Ces éléments transposables peuvent être transposés dans tout le génome du polyploïde nouvellement formé ce qui a pour conséquence une augmentation du nombre de copies de ces ET (McClintock, 1984; Springer *et al.*, 2016; Vicient & Casacuberta, 2017). De même, le nombre d'ET de la famille MITEs (Stowaway-like) augmente après l'allopolypléidisation chez le blé et les espèces *Brassica* (Sarilar *et al.*, 2011; Yaakov & Kashkush, 2012). Cependant, la dérégulation des ET ne s'accompagne pas toujours de transpositions des ET comme chez l'allopolypléide *Spartina anglica* ou chez des plantes *B. napus* nouvellement synthétisées (Parisod *et al.*, 2009; Sarilar *et al.*, 2013).

D'autre part, la dérégulation des éléments transposables peut favoriser une recombinaison illégitime entre ET lors de la première méiose et par conséquent réduire le nombre de copies d'ET, produire de larges réarrangements chromosomiques pouvant conduire à des pertes de séquences génomiques, des duplications, des inversions ou des translocations (Ma *et al.*, 2004; Vicient *et al.*, 2005; Bennetzen & Wang, 2014). Chez *Arabidopsis thaliana*, après la divergence entre les Rosacées et les Brassicacées, des duplications segmentaires ont été produites à partir de différents ET (Hughes *et al.*, 2003). De même, chez diverses espèces de blé polyploïde, différents événements de recombinaison illégitime sont à l'origine de la suppression du locus *Ha* qui contrôle la dureté du grain (Chantret *et al.*, 2005).

Par conséquent, les éléments transposables contribuent majoritairement à la restructuration du génome des polyploïdes nouvellement formés par recombinaison illégitime et/ou transposition.

La réactivation des éléments transposables peut également conduire au processus d'exaptation, c'est-à-dire des changements de fonction de gènes via l'insertion d'ET dans des introns, exons et/ou promoteurs, contribuant ainsi à la diversité fonctionnelle et l'adaptation du génome (Planesas *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). C'est le cas du transporteur de glucose 1 chez le blé hexaploïde où une perte d'expression est induite après l'insertion d'un rétrotransposon dans sa région codante (Wendel, 2000; Soltis *et al.*, 2004a). Ces insertions peuvent conduire à des changements d'épissage, de modèle d'expression génique, de séquence protéique et/ou de fonctionnalité de la protéine produite (Huang *et al.*, 2015; Vicient & Casacuberta, 2017). Les ET peuvent également contenir des promoteurs (promoteurs internes qui facilitent leur

expression), enhancers ou encore des sites de liaison à des facteurs de transcription (TFBS) qui dérègle l'ensemble de l'expression des gènes voisins (Rebollo *et al.*, 2012; Lisch, 2013; Hénaff *et al.*, 2014; Feliner *et al.*, 2020). De plus, comme décrit précédemment, les éléments transposables sont sources d'instabilité chromosomique et sont fortement réprimés par méthylation ADN au niveau et à proximité de leur site d'insertion ce qui peut amener un silencing des gènes voisins et donc à une modification d'expression de ces mêmes gènes (Kim & Zilberman, 2014; Baidouri *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Feliner *et al.*, 2020).

iii. Les avantages évolutifs

La réactivation des éléments transposables lors de la polyploïdisation est un moteur de la diversification du génome. De par leur nature, les polyploïdes contiennent des copies de tous les gènes ce qui permet de tamponner la moitié des modifications des séquences codantes ou régulatrices pour concevoir de nouvelles fonctions / nouveaux phénotypes (Vicent & Casacuberta, 2017; Fuentes *et al.*, 2019; Feliner *et al.*, 2020). Ainsi, une fraction des insertions des éléments transposables peut permettre d'explorer une trajectoire évolutive chez certains polyploïdes nouvellement synthétisés et permettre l'adaptation, l'isolement reproductif et l'établissement de ces espèces (Parisod *et al.*, 2010a). Par exemple, l'accumulation d'ET dans les régions centromériques peut aider les centromères à mieux résister aux tensions induites par les microtubules lors des divisions cellulaires comme la méiose et peut contribuer à l'évolution et la spécification des centromères (Freeling *et al.*, 2015; Lermontova *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). De par l'accumulation d'ET dans les régions péricentromériques, la recombinaison méiotique est fortement réduite chez l'espèce *Arabis alpinea* par rapport à *A. thaliana* (Willing *et al.*, 2015). Cela permettrait aux gènes situés dans ces régions à faible taux de recombinaison d'évoluer de manière indépendante, favorisant ainsi l'apparition de nouvelles fonctions géniques spécifiques à l'espèce sans perturber les gènes essentiels situés dans d'autres parties du génome (Vicent & Casacuberta, 2017).

Comme discuté dans la partie II.2.iv., les éléments transposables sont souvent insérés à proximité des gènes de réponse à des stress environnementaux ce qui peut faire naître de nouveaux modèles de séquences codantes ou d'expression génique pour faciliter l'adaptation au stress des espèces polyploïdes (Quadrana *et al.*, 2019; Mhiri *et al.*, 2022). C'est le cas pour les stress biotiques comme la résistance au mildiou chez le blé et abiotiques comme des températures extrêmes, le sel et la sécheresse chez le maïs (Lv *et al.*, 2019; Poretti *et al.*, 2020).

D'ailleurs, chez le maïs, 33% des gènes exprimés lors de stress comportent un ET dans leur promoteur (Makarevitch *et al.*, 2015)

4) Auto-incompatibilité en première génération

Le succès reproducteur des espèces polyploïdes est souvent dépendant d'une transition vers l'autofécondation (Okamoto *et al.*, 2007; Tsuchimatsu *et al.*, 2012; Kitashiba & Nasrallah, 2014; Novikova *et al.*, 2017, 2023; Bachmann *et al.*, 2021). En effet, au début de leur établissement, les espèces néopolyploïdes se retrouvent en faible densité de population par rapport à leurs progéniteurs diploïdes ce qui diminue fortement les opportunités de reproduction entre plantes néopolyploïdes (Levin, 1975, 2012).

i. Définition du système d'auto-incompatibilité

Une grande partie des fleurs des Angiospermes sont autogames et possèdent des fleurs hermaphrodites, permettant aux plantes de s'autoféconder avec leurs deux types de gamètes. Cependant, la reconnaissance du soi/ non soi s'opère au niveau d'interactions entre une protéine du pistil (femelle) et une autre du pollen (mâle) et est génétiquement contrôlée par le locus polymorphe *S* (Takayama & Isogai, 2005; Novikova *et al.*, 2023). Ce locus comprend au moins deux gènes multialléliques associés à une région où la recombinaison est inhibée : les gènes déterminants femelle et mâle (Claessen *et al.*, 2019). La suppression de la recombinaison est essentielle à la co-évolution d'haplotypes *S* et au maintien de l'unité de ce système d'auto-incompatibilité (Roalson & McCubbin, 2003; Guo *et al.*, 2011; Goubet *et al.*, 2012; Claessen *et al.*, 2019; Novikova *et al.*, 2023).

Chez les Brassicacées, l'auto-incompatibilité est dite sporophytique (auto-incompatibilité déterminée par le génotype des cellules de la plante génitrice) puisqu'elle dépend de la production des protéines SCR par les cellules nourricières du pollen, les cellules du tapetum et la production des protéines SRK par les cellules papillaires du pistil (**Figures 6 et 7**) (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Novikova *et al.*, 2023). En effet, la protéine SCR est ensuite intégrée à l'enveloppe du pollen pour servir de ligand au récepteur S kinase SRK localisé à la surface du stigmate de la fleur (Stein *et al.*, 1991; Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000, 2001; Takayama & Isogai, 2005; Nasrallah, 2018). Ceci induira une cascade de signalisations au sein des cellules papillaires du stigmate qui déterminera si oui ou non le pollen est compatible (pour plus de détails voir les revues de Takayama & Isogai, 2005 et de Goring *et al.*, 2023). Lorsque le pollen est reconnu compatible, il est réhydraté par les cellules papillaires du stigmate pour permettre sa germination dans le pistil et atteindre l'ovule

pour la fécondation (**Figures 6 et 7**) (Goring *et al.*, 2023). L'inhibition de l'hydratation et de la croissance du tube pollinique est produite lorsque le pollen et le pistil expriment le même haplotype *S* (Schopfer *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Kusaba *et al.*, 2001; Macgregor *et al.*, 2022). Les espèces allogames ont entre 10 et 35 haplotypes différents qui ségrégent, néanmoins, un haplotype unique a plus de chance de se propager chez les espèces auto-incompatibles qu'un allèle commun (Castric & Vekemans, 2004; Novikova *et al.*, 2023). Par exemple, chez *Brassica rapa*, il existe 48 haplotypes *S* et chez *Brassica oleracea*, 50 haplotypes tandis que *B. napus* n'a que 7 allèles *S* (Okamoto *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2023). Chez les espèces d'*Arabidopsis*, plus de 10 haplotypes *S* peuvent ségréger au sein d'une même population (Castric & Vekemans, 2004; Castric *et al.*, 2008).

Chez les Solanacées, Rosacées, Planta-ginacées et Rutacées, l'auto-incompatibilité est dite gamétophytique dépendant du génotype du pollen (Franklin-Tong & Franklin, 2003; Claessen *et al.*, 2019). Les déterminants du locus *S* codent pour le côté femelle, une ribonucléase S-RNase et pour le côté mâle, une protéine F-box, SLF (Takayama & Isogai, 2005). Ce système d'auto-incompatibilité est très différent de celui des Brassicacées puisqu'ici les mécanismes de signalisation d'auto-incompatibilité sont induits non pas quand il y a une reconnaissance du soi (même haplotype *S*) mais lorsqu'il y a reconnaissance du non-soi (différents haplotypes *S*) (**Figures 6 et 7**) (Kubo *et al.*, 2010; Fujii *et al.*, 2016; Goring *et al.*, 2023). En effet, lors du début de la germination du tube pollinique dans le pistil (environ un tiers de la longueur du pistil), l'interaction entre la S-RNase (sécritée par la matrice extracellulaire dans la partie supérieure du pistil et absorbée de manière non spécifique par le tube pollinique) et la protéine SLF se produit lorsque l'interaction est compatible (différents haplotypes *S* ; non-soi) ce qui inhibe l'action de la S-RNase et bloque la dégradation de l'ARN et des protéines du pollen permettant la croissance du pollen compatible (**Figures 6 et 7**) (Kubo *et al.*, 2010; Fujii *et al.*, 2016). Inversement, lors de la reconnaissance du soi, aucune interaction entre la protéine S-RNase et la protéine SFB ne se produit ce qui a pour conséquence, l'échec de la croissance du tube pollinique via l'action de S-RNase (**Figures 6 et 7**) (Sassa *et al.*, 1992, 1996; Kubo *et al.*, 2010; Claessen *et al.*, 2019; Goring *et al.*, 2023).

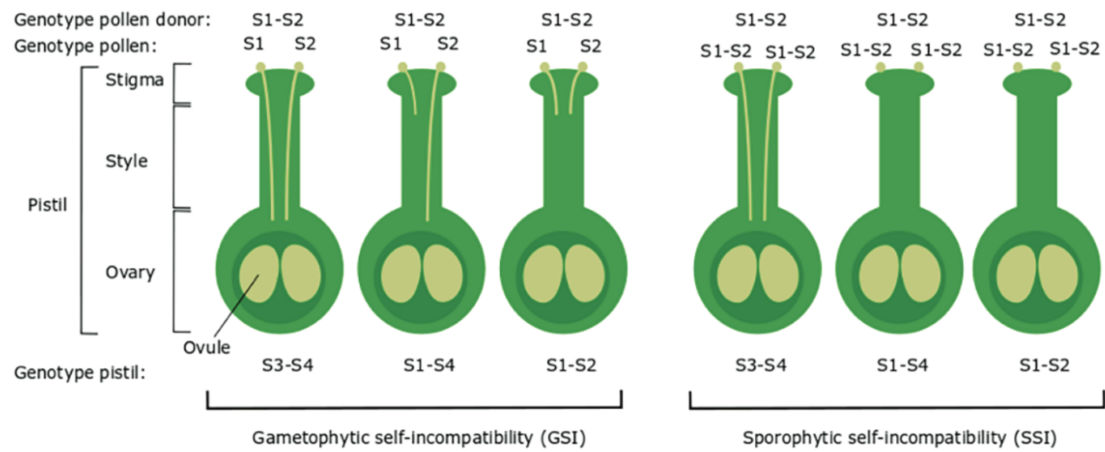


Figure 6 : Les systèmes d'auto-incompatibilité

Dans le système d'auto-incompatibilité gamétophytique, le pollen porte l'un des deux haplotypes *S* du parent (ici S1 ou S2). Si l'haplotype *S* du pollen diffère de celui du pistil, le pollen peut germer et atteindre l'ovule ; sinon, il sera rejeté après avoir traversé environ un tiers du style.

Dans le système d'auto-incompatibilité sporophytique, l'haplotype *S* du pollen est déterminé par les deux haplotypes *S* du parent (ici S1 et S2). Si l'haplotype *S* du donneur pollen est identique à au moins un haplotypes *S* du pistil, le pollen est rejeté et ne germe pas. Au contraire, si les haplotypes du pollen et du pistil sont différents, la fécondation peut se produire.

D'après Claessen *et al.*, 2019.

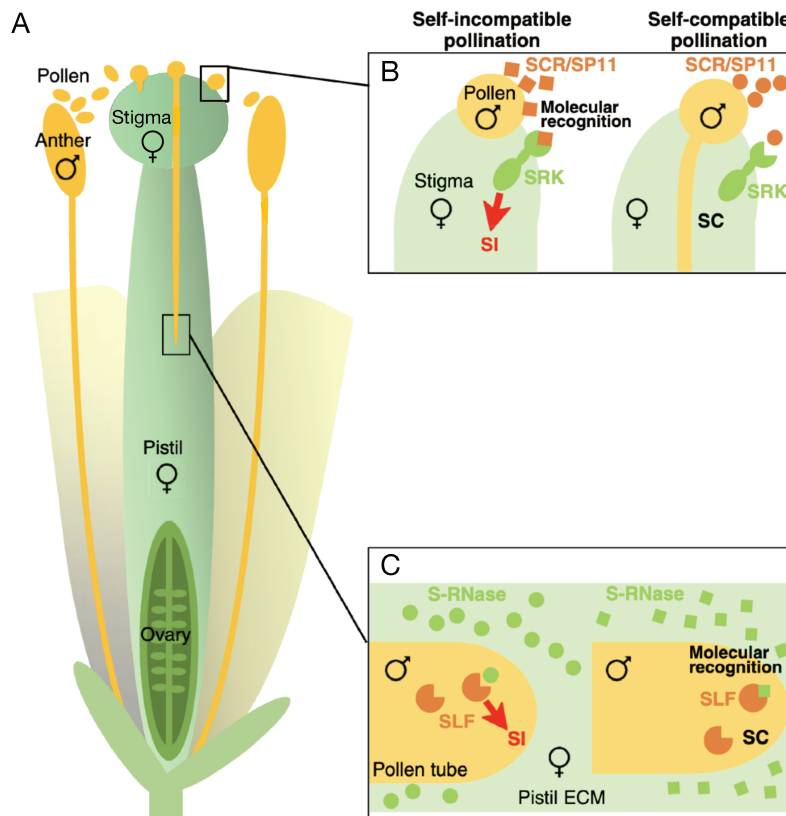


Figure 7 : Illustration des systèmes d’auto-incompatibilité des Brassicacées, Solanacées, Rosacées, Planta-ginacées et Rutacées

Les grains de pollen produits par les anthères se lient au stigmate du pistil dans l’objectif de fertiliser l’ovule contenu dans l’ovaire (A). Chez les Brassicacées, qui utilisent un système de reconnaissance du soi, le mécanisme d’auto-incompatibilité se déroule à la surface du stigmate, précisément à la membrane plasmique des cellules papillaires. Cela implique l’interaction entre le récepteur kinase SRK, localisé à la surface du stigmate, et son ligand, la protéine SCR intégrée à l’enveloppe du pollen (B). En cas d’auto-incompatibilité, lorsque les haplotypes *S* sont identiques, le récepteur et le ligand interagissent ensemble ce qui inhibe la germination du pollen (B, à gauche). Au contraire, lorsque les haplotypes des déterminants mâles et femelles sont différents, la germination et la fécondation peuvent se produire (B, à droite). Chez les Solanacées, Rosacées, Planta-ginacées et Rutacées, qui utilisent un système de reconnaissance du non soi, les mécanismes d’auto-incompatibilité se produisent à l’intérieur du tube pollinique entre la S-RNase sécrétée par la matrice extracellulaire du pistil (déterminant femelle) et la protéine SLF (déterminant mâle). Lorsque l’interaction est compatible entre la S-RNase et la protéine SLF (différents haplotypes *S* ; non-soi), une inhibition de l’action de la S-RNase se produit, bloquant la dégradation de l’ARN et des protéines du pollen, ce qui permet la croissance du pollen compatible. Inversement, lors de la reconnaissance du soi, aucune interaction entre la protéine S-RNase et la protéine SFB ne se produit, ce qui entraîne l’échec de la croissance du tube pollinique via l’action de S-RNase. Les déterminants mâles et femelles sont indiqués respectivement en orange et vert. Adapté de Goring *et al.*, 2023.

ii. Transition vers l'auto-compatibilité chez les Brassicacées

Il est fréquemment observé que les espèces allogames (auto-incompatibles) peuvent posséder deux haplotypes *S* différents avec un locus *S* d'une lignée parental dominant par rapport à l'autre (Hatakeyama *et al.*, 2001; Kusaba *et al.*, 2002; Prigoda *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2007) même si des codominances sont observées (Bateman, 1954; Prigoda *et al.*, 2005; Llaurens *et al.*, 2008). De même, un haplotype *S* dégradé/ muté d'un parent peut dominer sur l'haplotype *S* de l'autre parent ce qui peut conduire à la perte de fonction de la protéine SCR et/ou SRK favorisant la transition vers l'auto-compatibilité (Goring *et al.*, 1993; Nasrallah *et al.*, 1994; Uyenoyama *et al.*, 2001; Tsuchimatsu *et al.*, 2010; Shimizu & Tsuchimatsu, 2014).

Chez les Brassicacées, les études sur la dominance de la protéine SCR sont bien plus avancées que celles sur la dominance de la protéine SRK. D'ailleurs, on sait que bon nombre d'allèles *SRK* sont codominants chez les Brassicacées (Hatakeyama *et al.*, 2001; Kusaba *et al.*, 2002; Prigoda *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2007). Pour la protéine SCR, un seul allèle dominant est généralement exprimé via la production de microARN qui inactive l'expression en trans de l'allèle *SCR* récessif par méthylation du promoteur (Kusaba *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2006; Schoen & Busch, 2009; Tarutani *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2014; Fujii & Takayama, 2018). D'ailleurs, comme la dominance n'est pas lié à l'auto-incompatibilité dans ce système, chez un individu hétérozygote, lorsqu'un haplotype *S* dominant est muté et perd sa fonction d'auto-incompatibilité, il peut rester dominant et inhiber l'autre allèle *S* récessif et fonctionnel (Novikova *et al.*, 2023). Ainsi, l'espèce devient auto-compatible.

Des exemples d'haplotype *S* avec mutation et perte de fonction d'auto-incompatibilité ont été identifiés chez les allopolyploïdes comme *A. suecica* (Novikova *et al.*, 2017), *Brassica napus* (Okamoto *et al.*, 2007; Kitashiba & Nasrallah, 2014), *A. kamchatica* (Kolesnikova *et al.*, 2023) et les espèces de *Capsella* (Bachmann *et al.*, 2019, 2021; Duan *et al.*, 2024). Chez la plante *A. suecica*, il est supposé que la transition vers l'auto-compatibilité a été immédiate après l'hybridation entre *A. thaliana* avec un haplotype *S* dominant mais non fonctionnel (haplogroupe *S*A avec une inversion de 213pb dans le gène *SCR*) et *A. arenosa* avec un allèle *S* fonctionnel mais récessif (**Figure 8**) (Tsuchimatsu *et al.*, 2010; Novikova *et al.*, 2017, 2023). Des précurseurs de microARN (mir867) sont exprimés par l'allèle *S* d'*A. thaliana* et cible le premier exon du gène *SCR* de l'allèle *S* d'*A. arenosa* (**Figure 8**) (Durand *et al.*, 2014; Novikova *et al.*, 2017, 2023).

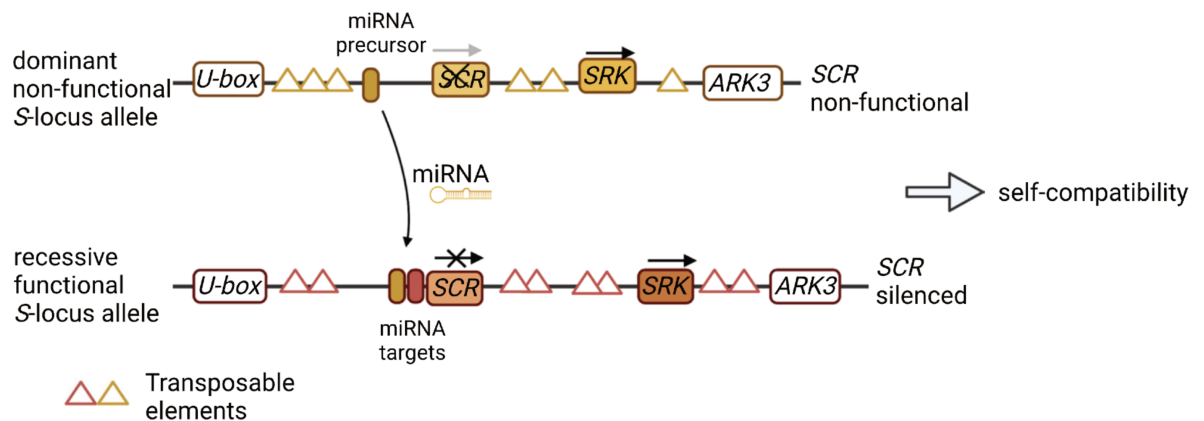


Figure 8 : Transition vers l'auto-incompatibilité chez la plante *A. suecica*

L'allèle *S* dominant et non fonctionnel d'*A. thaliana* (gène *SCR* muté) produit des précurseurs de microARN et réduit au silence l'expression du gène *SCR* sur l'allèle *S* récessif d'*A. arenosa*. D'après Novikova *et al.*, 2023.

Chez des allopolyploïdes *B. napus* resynthétisés, les croisements entre les deux espèces progénitrices *B. rapa* et *B. oleracea* n'ont pas conduit à la création de plantes auto-compatibles comme c'est le cas chez la plante naturelle (Beschorner *et al.*, 1995; Novikova *et al.*, 2023).

Par conséquent, pour les recherches agronomiques, il est nécessaire d'identifier plus en détails les combinaisons d'haplotype *S* possibles lors de l'hybridation pour s'assurer de la transition vers un système auto-compatible et contribuer à l'établissement des polypléïdes.

5) Problèmes méiotiques en première génération

i. Anomalies méiotiques

Un autre challenge important lié à la polyploïdisation est la ségrégation fidèle des chromosomes pendant la méiose, la division cellulaire spécialisée qui est à la base de la formation des gamètes pour la reproduction sexuée (Comai, 2005; Cifuentes *et al.*, 2010b; Grandont *et al.*, 2013; Lloyd & Bomblies, 2016). En effet, aussi bien les néo-autopolyploïdes que les allopolyploïdes nouvellement formés montrent en début de méiose, des appariements complexes impliquant plus de deux chromosomes apparentés (homéologues chez les allopolyploïdes et homologues pour les autopolyploïdes), ainsi que des chromosomes non appariés. Ces configurations chromosomiques, respectivement appelées multivalents et univalents en métaphase I, sont source d'instabilité méiotique puisqu'elles peuvent conduire à une mauvaise ségrégation des chromosomes si elles persistent jusqu'en métaphase I (**Figure 9**) (McCollum, 1958; Ramsey & Schemske, 2002; Szadkowski *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2011;

Yant *et al.*, 2013; Henry *et al.*, 2014; Bomblies *et al.*, 2016; Morgan *et al.*, 2021b). De plus, chez les espèces allopolyploïdes nouvellement formées, deux chromosomes homéologues peuvent également s'apparier, se synapser et recombiner ensemble lors de la prophase I, formant ainsi un bivalent allosyndétique observable en métaphase I. Des espèces naturelles évoluées peuvent aussi former des multivalents à des taux variables comme la pomme de terre autopolyploïde, le colza allopolyploïde, l'Arachide allopolyploïde (Husted, 1936; Sheidai *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2020; Lv *et al.*, 2024). L'enquête de Ramsey & Schemske, 2002 qui analyse 171 études rapporte qu'il existerait une fréquence moyenne de multivalents plus élevée en diacinese et en métaphase I de 28,8% chez les néoautopolyploïdes (qui varie de 2 à 69%) par rapport à 8,3% chez les néoallopolyploïdes (qui varie de 0 à 52%).

Chez les allopolyploïdes, la présence de multivalents peut correspondre dans la génération suivante à la formation d'échanges homéologues au niveau de région de synténie (voir la partie II.1.i.). Chez les plantes néosynthétiques *B. napus* de première génération, 10 à 12,5% des cellules mères de pollens (PMCs) présentent des multivalents et 18,75 à 37,5% des PMCs des bivalents entre les chromosomes homéologues des sous-génomes A et C (Szadkowski *et al.*, 2010). De même, dans l'étude de Carvalho *et al.*, 2021, quatre lignées de plantes *B. napus* issues d'événements d'allopolyploïdisation différents montrent une première méiose avec un pourcentage relativement élevé de cellules avec 19 bivalents correctement liés (de 71,6 à 80%). Cependant, dans les générations suivantes, le pourcentage de cellules avec des 19 bivalents diminue significativement alors que celui avec des multivalents augmente avec un taux qui varie de 27,3 à 29,7%. Il est supposé que les réarrangements homéologues fixés favorisent la formation de nouveaux multivalents via l'appariement de chromosomes homéologues dans les générations suivantes.

Cependant, il existe des espèces nouvellement formées qui présentent une excellente stabilité méiotique dès les premières générations comme le trèfle blanc et le chou frisé *Brassica oleracea*, un génotype de *Brassica* allohexaploïde formé par l'hybridation entre *B. carinata* et *B. rapa* bien que les autres lignées soient instables (Tian *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2016; Griffiths *et al.*, 2019).

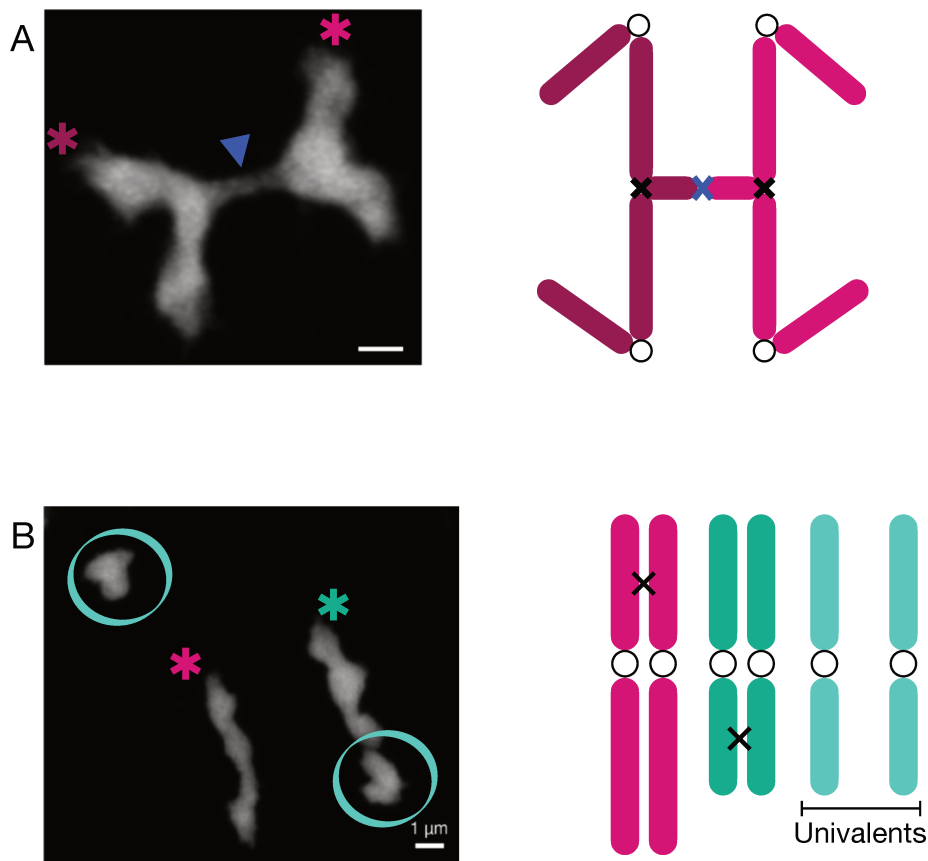


Figure 9 : Exemples des anomalies méiotiques observées chez la plante néosynthétique d'*A. suecica*

- (A) Image microscopique des chromosomes méiotiques d'un méiocyte mâle au stade métaphase I de la plante néosynthétique d'*A. suecica* montrant un multivalent. Deux paires de chromosomes homéologues (en violet et rose) sont connectées par un chiasma (représenté par la croix bleu), formant ainsi un tétravalent. Les croix noires représentent les chiasmata entre les deux paires de chromosomes homéologues (en violet et rose).
- (B) Image microscopique des chromosomes méiotiques d'un méiocyte mâle au stade métaphase I de la plante néosynthétique d'*A. suecica* montrant deux univalents. Deux chromosomes non liés par un chiasma forment deux univalents (représentés ici en bleu clair).

ii. Conséquence des problèmes méiotiques liés à la polyploïdisation : l'aneuploïdie

Comme décrit précédemment, la formation d'univalents et de multivalents peut complexifier la ségrégation des chromosomes lors de la méiose. Par exemple, la formation d'un tétravalent peut entraîner la ségrégation de 3 chromosomes dans un pôle de la cellule et d'un autre chromosome vers l'autre pôle, au lieu de la ségrégation attendue de 2 chromosomes par pôle (**Figure 10**) (Lv *et al.*, 2024). Cependant, dans certains cas, la ségrégation d'un

quadrivalent peut être fidèle (Bomblies *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2024). En effet, dans le cas de la formation de tétravalent en forme d'anneaux ou de chaînes et en l'absence de réarrangement génomique, chaque chromosome est lié à 2 autres chromosomes par le biais d'un crossing-over résolu. Chaque complexe centromères/kinétochores est alors orienté vers les pôles opposés de la cellule, facilitant ainsi une ségrégation parfaite des chromosomes deux par deux pendant la méiose (Bomblies *et al.*, 2016). Ce processus est d'autant plus critique lors de la création d'univalents et de trivalents qui se divisent principalement de manière inégale pendant l'anaphase I participant ainsi à la formation de gamètes aneuploïdes (Pelé *et al.*, 2018).

L'aneuploïdie est définie comme l'état d'une cellule ou d'un individu possédant un nombre anormal de chromosomes supérieur ou inférieur au multiple exact du nombre de chromosomes de base n (Ramsey & Schemske, 2002). Cette anomalie chromosomique/génétique est fréquente chez les Angiospermes (Grant, 1981; Ramsey & Schemske, 2002).

La descendance des néopolyploïdes contient un taux élevé d'aneuploïdes numériques, de pseudo-euploïdes (euploïdes génétiquement déséquilibrés, autrement appelés aneuploïdes compensés ou aneuploïdes cachés) avec une perte ou gain de chromosomes ou séquences homéologues pouvant entraîner d'importantes variabilités/altérations phénotypiques (Ramsey & Schemske, 2002; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2016). D'après l'enquête bibliographique de Ramsey & Schemske, 2002 de 26 études, chez les néo-auto- et néoallopolyploïdes, la formation de pollens aneuploïdes avec un chromosome en plus $n+1$ représente en moyenne 13,2 % des cytotypes et les pollens aneuploïdes $n-1$, 16,4% des cytotypes alors que la formation des pollens euploïdes représente en moyenne 62,5% des cytotypes. Les pollens hypoeuploïdes avec un ou plusieurs chromosomes en moins à la normale sont significativement plus élevés que les pollens hypereuploïdes. Ramsey & Schemske, 2002 suggère que ce serait lié à la génération d'univalents en retard (chromosomes en retard) qui ne finissent pas par s'intégrer dans un gamète à la fin de la méiose.

Chez les autopolyploïdes, la fréquence moyenne des bivalents (63,7%) correspond étroitement à la fréquence des gamètes euploïdes (64%) alors que chez les allopolyploïdes, ces fréquences ne sont pas corrélées (Ramsey & Schemske, 2002). En effet, la fréquence de bivalents (82,3%) est bien plus grande que celle de la fréquence moyenne des gamètes euploïdes (56,9%) suggérant ainsi une sous-estimation de la fréquence de vrais bivalents puisque la formation de bivalents allosyndétiques peut également conduire à une mauvaise ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase I (Ramsey & Schemske, 2002).

L'aneuploïdie est significativement plus fréquente en moyenne dans les gamétophytes (37,5%) que dans la descendance des néopolyploïdes (31,4% en moyenne) (Ramsey & Schemske, 2002). Dans la descendance, il n'y a pas de différence de fréquence moyenne d'hypo- et d'hypereuploïdes dans les cytotypes de sporophytes (Ramsey & Schemske, 2002). Chez le blé néo-allohexaploïde, des aneuploïdes complètes (avec perte d'un ou plusieurs chromosomes entiers) sont observés dans 16 lignées ainsi que des pseudo-euploïdes dans lesquelles un chromosome a été perdu et est remplacé par un gain d'un autre chromosome (Zhang *et al.*, 2013). Cette étude a montré que l'aneuploïdie se produisait à des fréquences très variables selon les lignées : de 20 à 100% (Zhang *et al.*, 2013). Dans les premières générations de plantes *B. napus* resynthétisées issues d'autopollinisation manuelle pendant 10 générations, parmi 50 lignées différentes, une proportion significative d'individus aneuploïdes a été décrite, augmentant de manière significative à travers des générations successives jusqu'à atteindre 95% à la dixième génération (Xiong *et al.*, 2011). Cependant, lorsque les plantes néosynthétisées *B. napus* sont laissées en pollinisation libre, l'étude de Rousseau-Guetin *et al.*, 2016 montre que le taux d'aneuploïdie numérique est plus faible en troisième génération (inférieur à 10%) par rapport aux plantes issues d'autofécondation contrôlée. Cela suggère une sélection des individus présentant le karyotype le plus stable, ayant potentiellement éliminé certains réarrangements délétères.

Par ailleurs, la sélection successive de plantes euploïdes à travers les générations permet dans l'étude de Carvalho *et al.*, 2021 de diminuer les pourcentages de plantes *B. napus* néosynthétisées aneuploïdes de 11,27 en génération 1 et 11,46% en génération 3 à un pourcentage qui oscille de 0 à 2,94% de la génération 4 à la génération 8, respectivement. Cependant, chez le blé néosynthétisé, cette sélection consécutive d'individus euploïdes sur plusieurs générations n'a pas permis de stabiliser le karyotype ce qui suggère qu'il existe des processus moléculaires supplémentaires importants quant à la stabilisation du génome (Zhang *et al.*, 2013).

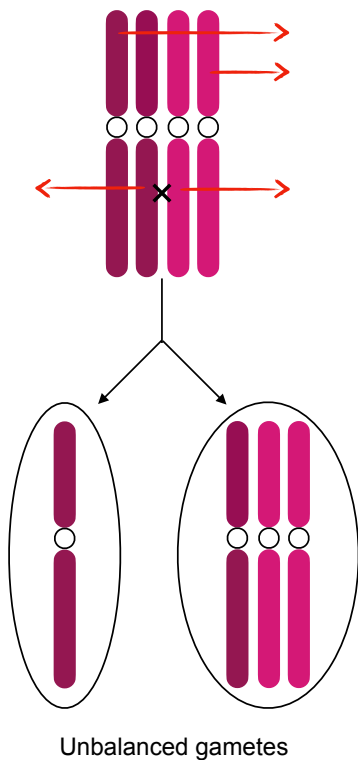


Figure 10 : Illustration de la formation de gamètes aneuploïdes

Lorsqu'un chiasma est créé entre deux chromosomes homéologues (croix noire), ces chromosomes ségrégent en anaphase I vers des pôles opposés de la cellule, tandis que les chromosomes restants peuvent se diriger vers le même pôle, ce qui conduit à la formation des gamètes déséquilibrés.

iii. Conséquence des problèmes méiotiques liés à la polyploïdisation : Réduction de la fertilité

Des études montrent que la réduction de la fertilité des néopolyploïdes est corrélée avec l'apparition d'anomalies méiotiques liée à la formation d'univalents et de trivalents et par conséquent, à la création de gamètes aneuploïdes ou pseudo-euploïdes (Ramsey & Schemske, 2002). En effet, des études sur des autotétraploïdes montrent qu'une meilleure fertilité est en corrélation avec une augmentation des quadrivalents ce qui suggère que la formation d'uni- et de trivalents sont la principale cause de la baisse de la fécondité, probablement car ils n'ont pas la capacité de ségréger de manière appropriée (Crowley & Rees, 1968; Abraham *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2021). De ce fait, les néopolyploïdes qu'ils soient auto- ou allopolyploïdes présentent une fertilité significativement diminuée (mesurée par la proportion de grains de pollen viables et la production de graines) par rapport à leurs parents diploïdes (moyenne du pollen 71,5% contre 91,4% ; moyenne des graines 27% contre 68,1%) (Ramsey & Schemske, 2002). Chez le blé néopolyploïde, il a été décrit une diminution significative de la production de graines pour les plantes aneuploïdes avec deux chromosomes en plus ou en moins et pour les plantes pseudo-euploïdes par rapport aux plantes euploïdes (Zhang *et al.*, 2013). De même,

les plantes aneuploïdes de *Brassica napus* nouvellement synthétisées montrent une réduction significative de la viabilité des grains de pollen et du rendement en graines par rapport aux plantes euploïdes (Xiong *et al.*, 2011).

Cependant, ceci peut être momentané puisqu'une amélioration de la fertilité (en termes de viabilité des grains de pollen et de production de graines) peut être observée au cours des générations dans les lignées néopolyploïdes sélectionnées pour leur fertilité (Ramsey & Schemske, 2002). Cela est probablement dû à la contre-sélection des anomalies méiotiques qui génèrent des gamètes aneuploïdes ou pseudo-euploïdes (Ramsey & Schemske, 2002; Bomblies *et al.*, 2015). C'est le cas de la plante nouvellement formée *Brassica campestris* qui en 19 générations de sélection montre une augmentation moyenne de 53,7% de fertilité de graines par génération, passant de 1,5 graines par silique à la génération 1 à 16,8 en génération 19. (Swaminathan & Sulbha, 1959; Ramsey & Schemske, 2002).

Néanmoins, il est important de noter que d'autres facteurs géniques peuvent impacter la fertilité via l'auto-incompatibilité (voir Partie II.4), le développement du pollen (comme la germination du pollen), des ovules, des embryons ou encore de l'endosperme (Ramsey & Schemske, 2002).

iv. Contribution des progéniteurs diploïdes aux anomalies méiotiques présents chez les néopolyploïdes

Différentes études suggèrent que la contribution génétique des parents pourrait jouer un rôle sur la stabilité méiotique des espèces polyploïdes nouvellement formées. En effet, chez *B. napus*, le degré d'échanges homéologues et de fertilité varient considérablement en fonction des génotypes des parents (Attia & Röbbelen, 1986; Szadkowski *et al.*, 2010; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2021). Ainsi, comme l'a si bien présenté Shimizu, 2022, l'adaptation et l'évolution des néopolyploïdes peuvent suivre le « principe d'Anna Karénine » qui décrit que « toutes les familles heureuses se ressemblent, mais chaque famille malheureuse l'est à sa façon » puisque tous les individus « heureux » héritent d'adaptations parentales sans mutations prédominantes et tous les individus « malheureux » endurent de multiples mutations qui parfois peuvent mener à l'extinction de ces lignées.

À ce jour, nous n'avons pas d'éléments solides pouvant démontrer si la fertilité élevée des lignées naturelles polyploïdes résulte principalement d'une sélection continue de plantes présentant une meilleure fertilité et stabilité génomique, ou si d'autres mécanismes

moléculaires hérités des progéniteurs ou encore, d'autres processus moléculaires adaptatifs sélectionnés au cours des premières générations des néopolyploïdes, sont également impliqués.

Pour conclure, l'adaptation, la sélection, et l'établissement des espèces polyploïdes nécessitent toute une série d'événements favorables pour contrecarrer les challenges liés à la polyploïdisation.

III. Les solutions

Dans cette partie, je vais dans un premier temps définir et décrire dans le détail la méiose de la plante modèle diploïde *Arabidopsis thaliana* pour pouvoir, dans un deuxième temps, orienter mon analyse bibliographique sur la méiose des plantes polyploïdes et plus particulièrement sur les solutions qu'ont trouvé les plantes autopolyploïdes et allopolyploïdes pour restaurer leur stabilité méiotique. Une grande partie de mon analyse bibliographique sera concentrée sur la méiose mâle, pour laquelle les informations disponibles sont plus abondantes en raison de la facilité d'analyse cytologique.

1) La méiose des plantes diploïdes

i. Introduction générale de la progression méiotique

La reproduction sexuée des plantes repose sur la méiose et la fécondation. La méiose consiste à diviser par deux divisions successives le nombre de jeux de chromosomes, puis la fécondation rétablit le niveau de ploïdie original. Chaque division comprend quatre phases principales : la prophase (divisée en cinq sous-phases : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse), la métaphase, l'anaphase et la télophase, désignées respectivement par I ou II selon la division méiotique (**Figure 11**).

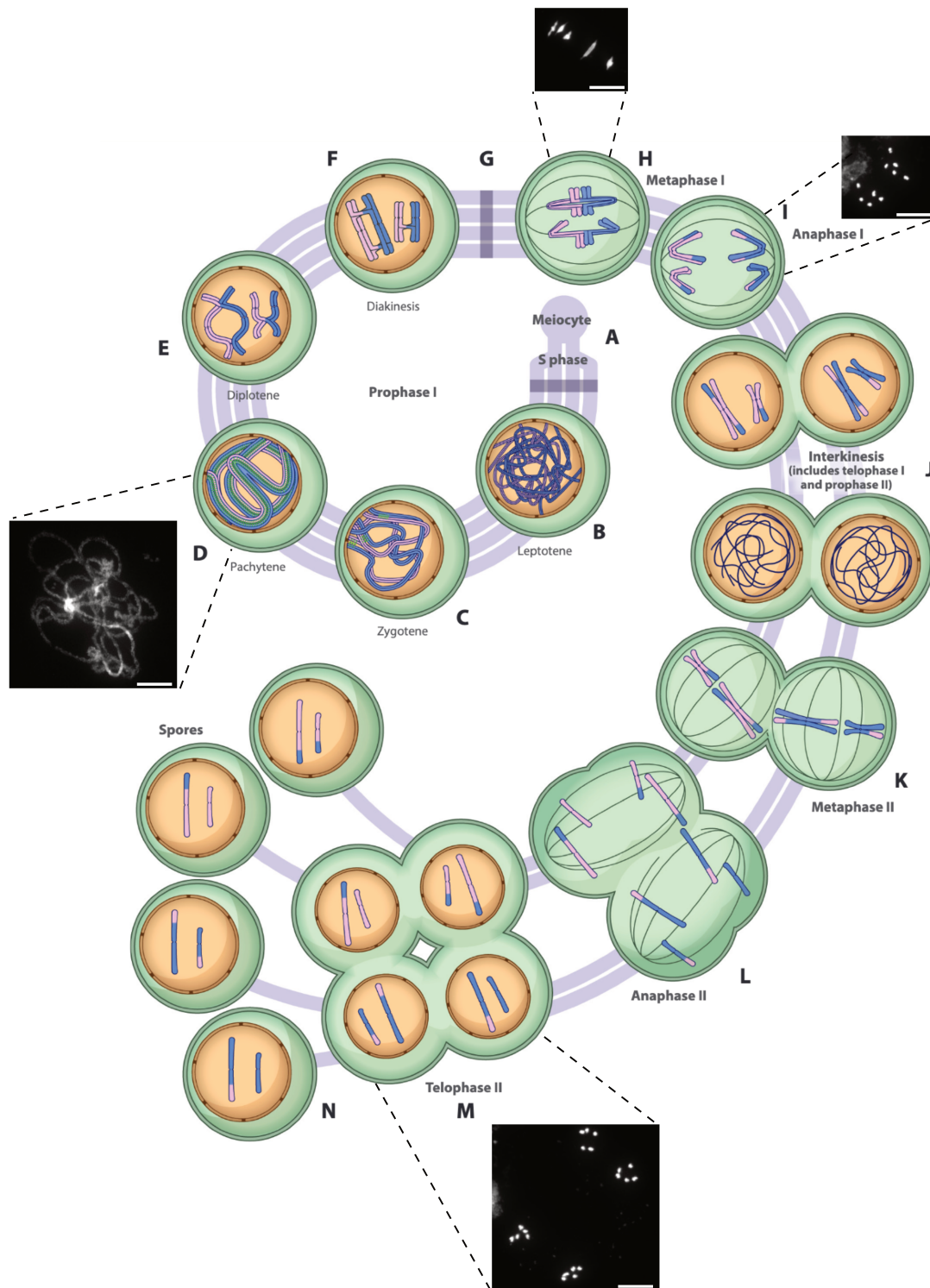


Figure 11 : Illustration représentant les différentes étapes de la méiose mâle.

Les chromosomes homologues sont représentés en bleu et rose, la membrane nucléaire en beige et la paroi cellulaire en vert. Les lignes en vert foncé représentent les microtubules du fuseau méiotique. Les images microscopiques issues d'étalements de méiocytes mâle d'*Arabidopsis thaliana* montrant les stades pachytène, métaphase I, anaphase I et télophase II sont présentées avec une barre d'échelle de 10

µm. Les chromosomes homologues s'apparient et se séparent lors de la méiose I tandis que les chromatides sœurs se séparent lors de la méiose II.

- (A) La phase de réplication de l'ADN permet la création des chromatides sœurs
- (B) Au stade leptotène, les cassures double brin sont formées, les axes chromosomiques se forment et la recombinaison méiotique commence.
- (C) Au stade zygotène, la polymérisation du complexe synaptonémal commence.
- (D) Au stade pachytène, la synapse est complète.
- (E) Au stade diplotène, le complexe synaptonémal se désassemble et les chromosomes homologues sont connectés par des chiasmata résultant des crossing-overs.
- (F) Au stade diacinèse, les chromosomes se condensent pour former les bivalents.
- (G) L'enveloppe nucléaire se désagrège, marquant la fin de la prophase I.
- (H) Au stade métaphase I, les bivalents sont alignés sur la plaque métaphasique par le fuseau.
- (I) Au stade anaphase I, la libération de la cohésion des bras chromosomiques entre les chromatides sœurs permet la migration des chromosomes homologues vers les deux pôles de la cellule.
- (J) Lors de l'intercinèse, deux noyaux se forment et les chromosomes se décondensent brièvement. Cette étape inclut la télophase I et la prophase II.
- (K) Au stade métaphase II, deux fuseaux se forment pour aligner les chromosomes sur deux plaques métaphasiques.
- (L) Au stade anaphase II, les chromatides sœurs se séparent après libération de la cohésion centromérique.
- (M) Au stade télophase II, quatre noyaux se forment.
- (N) Après cytokinèse, quatre spores haploïdes sont libérées.

Adapté de Mercier *et al.*, 2015.

1. Prophase I

Après la réplication de l'ADN, qui donne naissance aux chromatides sœurs, la prophase I et plus précisément le stade leptotène commence par une condensation de l'ADN en filaments fins observables au microscope (**Figure 11 A et B**) (Ross *et al.*, 1996). À ce stade, les chromatides sœurs s'organisent en une structure de boucles de chromatine dont les bases sont liées aux éléments axiaux du chromosome par la polymérisation de complexes de « protéines à enroulement » (« coiled-coil proteins ») telles que ASY1, ASY3 et ASY4 ainsi que des complexes de cohésines REC8, formant ainsi un axe cohésif (**Figures 12 et 15**) (Mercier *et al.*, 2015; Kim & Choi, 2019; Lloyd, 2022; Morgan *et al.*, 2022c). Ensuite, des cassures d'ADN double brins (CDB) sont formées sur ces boucles de chromatine, initiant la recombinaison méiotique (Kim & Choi, 2019).

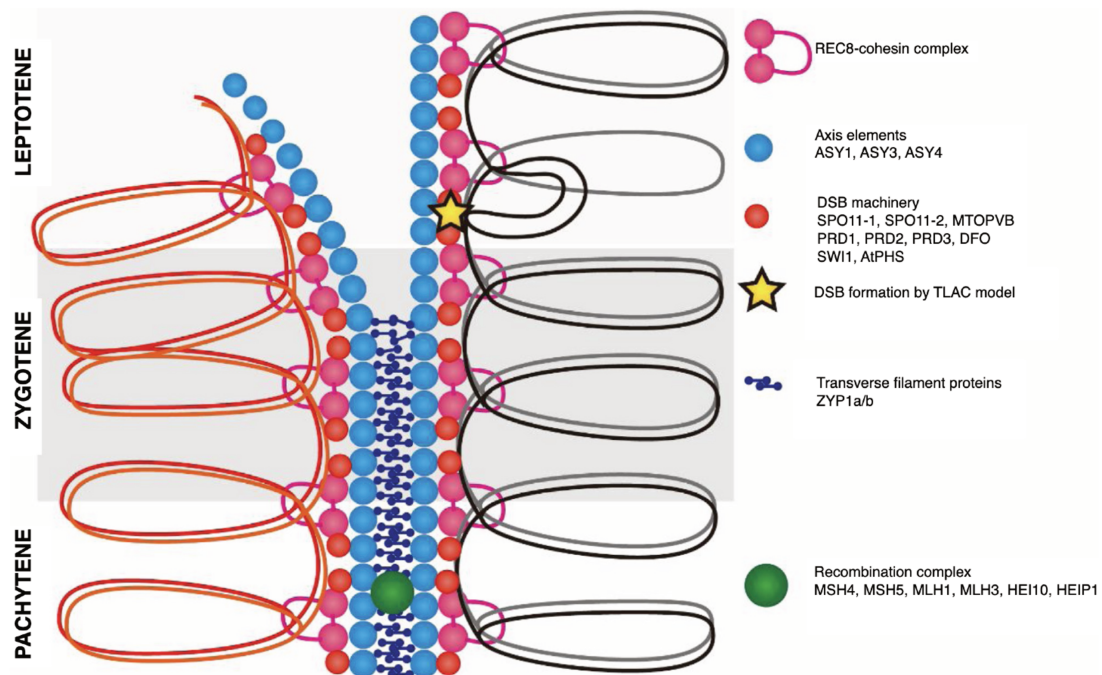


Figure 12 : Illustration représentant les étapes clés de la prophase I, mettant en avant la formation de complexe synaptonémal et des crossing-overs.

Au stade leptotène, les chromatides sœurs forment ensemble une série de boucles chromatiniennes dont les bases sont liées aux éléments axiaux, incluant de REC8 (en rose) et des protéines à enroulement ASY1/3/4 (en bleu). Les cassures double brin se forment sur la chromatine en boucle (en rouge et étoile jaune).

Du stade zygotène jusqu'au stade pachytène, les deux axes chromosomiques homologues s'associent via les filaments transversaux composés de ZYP1 (en bleu foncé).

Au stade pachytène, des complexes de recombinaison interviennent pour réparer la cassure (en vert).

D'après Kim & Choi, 2019.

Par ailleurs, les premières interactions entre chromosomes homologues se produisent dans des régions chromosomiques spécifiques telles que les télomères, les centromères ou des centres d'appariement spécifiques (**Figure 13**) (DaInes & White, 2015; Zickler & Kleckner, 2015; Zhang & Han, 2017; Wang *et al.*, 2024). Ces interactions initiales sont supposées entraîner des mouvements chromosomiques essentiels pour faciliter la recherche d'homologie nécessaire à la réparation des CDB et favoriser l'appariement (alignement) des chromosomes homologues au stade zygotène. Ensuite, ces contacts sont stabilisés par la réparation des cassures à travers l'invasion d'une molécule d'ADN double brin de séquence homologue, servant de modèle pour réparer la cassure (chromatide sœur ou chromosome homologue), et

par la formation du complexe synaptonémal. Ce complexe synaptonémal, une structure tripartite, s'établit du stade zygotène au stade pachytène, agissant comme une fermeture éclair pour « rassembler » les chromosomes homologues (**Figures 12 et 15**) (Kim & Choi, 2019; Morgan *et al.*, 2022c). Les deux axes chromosomiques des chromosomes homologues s'associent grâce à des interactions entre les éléments axiaux, positionnés parallèlement et reliés par des filaments transversaux composés de protéines ZYP1 situées dans la région centrale (**Figure 12**) (Kim & Choi, 2019; Morgan *et al.*, 2022c). Les chromosomes continuent ainsi de se condenser et on peut observer au microscope de grandes fibres épaisses au stade pachytène (**Figure 11D**).

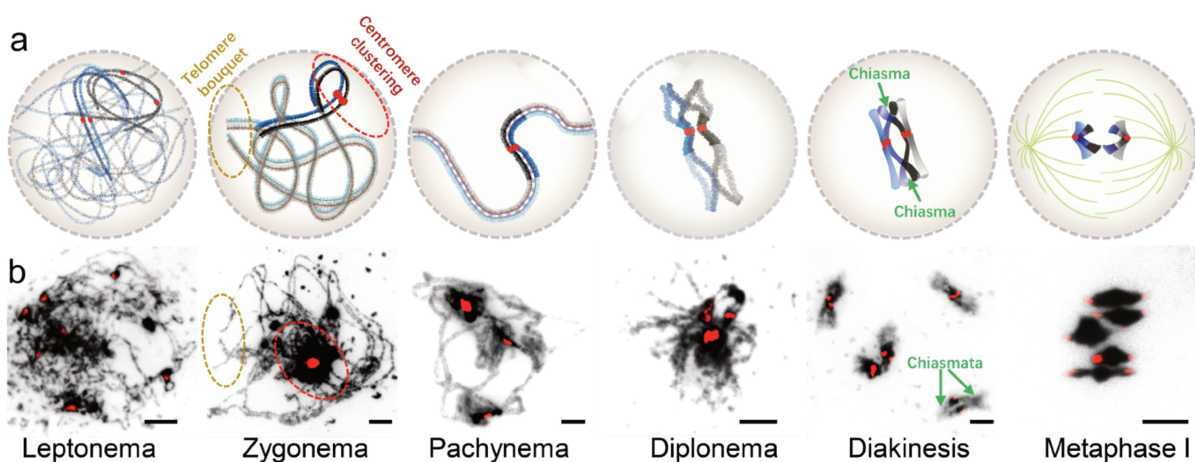


Figure 13 : Des interactions entre des régions chromosomiques se forment en prophase I

(A) Illustrations montrant les processus d'interactions entre les télomères et les centromères chez *A. thaliana*.

(B) Images microscopiques d'étalements de chromosomes méiotiques dont l'ADN et les centromères sont marqués au DAPI (en noir) et des sondes marquant l'ADN répétées de 180 pb des centromères par analyse FISH (en rouge). Barre d'échelle : 5 μ m.

D'après Wang *et al.*, 2024.

Les CDB sont réparées à la fin du stade pachytène, avec au moins une cassure sur chaque paire de chromosomes homologues réparée par un crossing-over. Ce processus entraîne un échange réciproque de fragments chromosomiques entre les chromosomes maternels et paternels créant ainsi de nouvelles combinaisons d'allèles. La recombinaison méiotique permet ainsi l'établissement de contacts physiques essentiels pour une ségrégation fidèle des chromosomes homologues lors de l'anaphase I. De plus, elle contribue à accroître la diversité génétique de la génération suivante et constitue le moteur premier de l'évolution des génomes

et de l'adaptation des espèces à leur environnement (Hunter, 2015; Mercier *et al.*, 2015; Wang & Copenhaver, 2018).

Au stade diplotène, le complexe synaptonémal se désassemble permettant aux chromosomes homologues de se séparer sauf à l'endroit où un crossing-over s'est formé, nommé chiasma (**Figure 11 E**) (Mercier *et al.*, 2015; Wang & Copenhaver, 2018; Zou *et al.*, 2024). Au niveau du chiasma, les chromatides sœurs restent attachées par des cohésines, maintenant un lien physique entre les deux chromosomes (**Figure 14**) (Clift & Marston, 2011).

Enfin, au cours du stade diacinèse, les chromosomes subissent une condensation supplémentaire grâce à des condensines pour donner des bivalents courts qui sont reliés par un ou plusieurs chiasmata et par des cohésines entre chromatides sœurs (**Figure 11 F**). L'enveloppe nucléaire se désagrège avant le stade métaphase I (Mercier *et al.*, 2015; Wang & Copenhaver, 2018; Prusicki *et al.*, 2019).

2. Métaphase I

En métaphase I, le fuseau de kinétochores sœurs s'attachent aux microtubules émanant du même pôle du fuseau pour aligner les bivalents sur la plaque métaphasique (Mercier *et al.*, 2015). Le nombre de chiasma peut être déterminé en analysant microscopiquement la forme des bivalents en métaphase I (**Figure 11 H**) (Ross *et al.*, 1996)

3. Anaphase I

En anaphase I, l'activation du complexe promoteur d'anaphase (APC) libère la séparase AESP qui était précédemment retenue par la sécurine PANS1 (Liu & Makaroff, 2006; Clift & Marston, 2011; Cromer *et al.*, 2019). La séparase clive alors les anneaux de cohésine REC8 sur les bras chromosomiques des chromatides sœurs relâchant ainsi le lien physique entre les deux chromosomes homologues en anaphase I (**Figure 14**). Cela permet la migration des chromosomes homologues vers les pôles opposés de la cellule, orchestrée par le raccourcissement des microtubules attachés aux kinétochores (**Figure 11 I**) (Clift & Marston, 2011). Cependant, la cohésine au niveau des centromères reste protégée grâce à la présence de la protéine SHUGOSHIN qui recrute PP2A aux centromères, rendant REC8 résistant à l'action de la séparase (Clift & Marston, 2011; Zamariola *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2018). Cette phase est importante puisqu'elle permet une ségrégation fidèle des chromosomes en méiose I (**Figure 14**) (Clift & Marston, 2011).

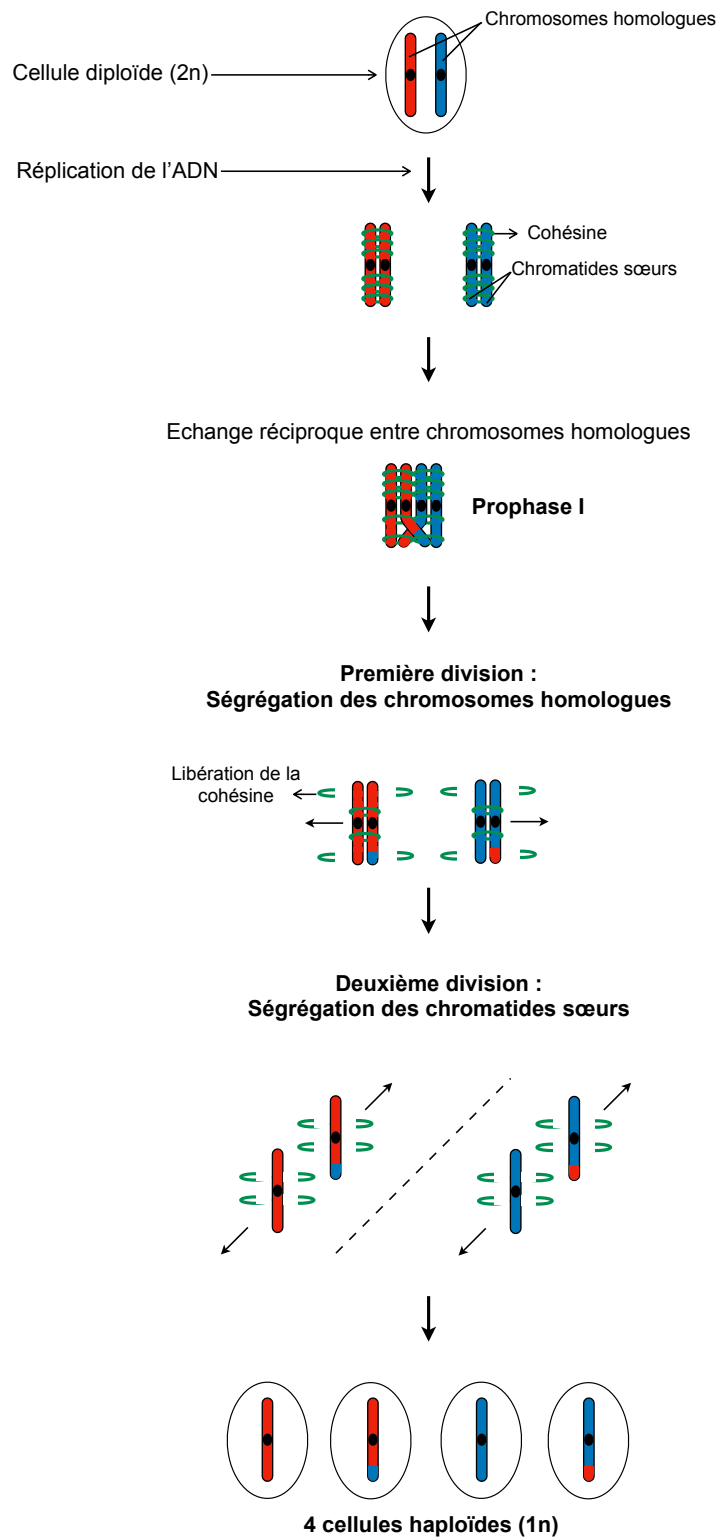


Figure 14 : Illustration de la fonction des cohésines pendant la méiose

Au cours de la méiose, les chromosomes homologues (en rouge et en bleu) sont répliqués pour générer des chromatides sœurs qui sont maintenues ensemble par des cohésines (en vert). En anaphase I, la séparase clive les anneaux de cohésines sur les bras chromosomiques des chromatides sœurs permettant

la migration des chromosomes homologues vers les pôles opposés de la cellule. En anaphase II, la cohésine centromérique est libérée permettant aux chromatides sœurs de ségréger de part et d'autre de la cellule pour donner naissance à quatre cellules haploïdes génétiquement différentes.

4. Télaphase I

Après l'arrivée des deux ensembles de chromosomes aux deux pôles de la cellule, la chromatine se décondense à nouveau et deux noyaux se forment dans un cytoplasme partagé (**Figure 11 J**) (Mercier *et al.*, 2015). Ce stade est appelé le stade dyade pour lequel les chromosomes n'atteignent pas d'état d'interphase avant le début de la deuxième division méiotique (Ross *et al.*, 1996). Les organites qui sont exclus du fuseau se retrouvent regroupés sur une bande distincte entre les deux noyaux haploïdes (Ross *et al.*, 1996).

5. Méiose II

Au cours de la prophase II, les chromosomes constitués de deux chromatides reliées au niveau des centromères se condensent à nouveau jusqu'à atteindre le degré maximal de condensation en métaphase II (Ross *et al.*, 1996; Mercier *et al.*, 2015). L'enveloppe nucléaire se désagrège et les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique grâce au fuseau de deuxième division méiotique (**Figure 11 K**) (Ross *et al.*, 1996; Mercier *et al.*, 2015). Lors de l'anaphase II, la cohésine centromérique est libérée permettant aux chromatides sœurs de migrer de part et d'autre de la cellule sous l'effet du raccourcissement des microtubules (**Figures 11 L et 14**). Ainsi, en télaphase II, quatre cellules haploïdes sont formées et séparées par une barrière des organites en forme de croix (**Figure 11 M**) (Ross *et al.*, 1996). Le cytoplasme est finalement divisé par cytokinèse pour libérer les microspores haploïdes (**Figure 11 N**) (Storme & Geelen, 2013b). Initialement regroupées en tétrade, quatre microspores distinctes subissent ensuite deux divisions mitotiques et un programme de différenciation spécifique afin de donner naissance à quatre grains de pollen matures (Wilson & Zhang, 2009).

ii. Formation des cassures double brin de l'ADN

Comme discuté précédemment, au début du stade leptotène, plusieurs centaines de CDB sont induites par le complexe SPO11 dans les cellules méiotiques (**Figure 15**) (Mercier *et al.*, 2015; Rafiei & Ronceret, 2023). Le nombre de CDB est variable entre espèces : par exemple, il y en a entre 150 et 250 chez *Arabidopsis thaliana* et chez le blé hexaploïde de 400 à 1500 CDB (Lloyd, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023). Le complexe SPO11 est composé des protéines SPO11-1, SPO11-2, MTOPVIB, PRD1, PRD2, PRD3 et DFO et est hautement conservé chez

les eucaryotes (Kim & Choi, 2019; Lloyd, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023). Ce complexe possède une fonction catalytique associée à une activité d'endonucléase de type ADN topoisomérase VI (Mercier *et al.*, 2015; Lloyd, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023).

Les points chauds, régions d'ADN où les CDB sont plus susceptibles de se produire, sont caractérisés par une chromatine ouverte avec des régions chromosomiques pauvres en nucléosomes à proximité des sites d'initiation de la transcription (pour plus de détails voir la revue de Dluzewska *et al.*, 2018). Chez *Arabidopsis thaliana*, la taille des points chauds est d'environ 0,8 kb (Choi *et al.*, 2018; Dluzewska *et al.*, 2018).

iii. Étape de résection

Une fois les CDB formées, leurs extrémités 5' subissent une étape de résection grâce aux activités endonucléase et exonucléase de MRE11, générant des extrémités 3' d'ADN simple brin (sb) et entraînant la libération des oligonucléotides liés à SPO11 (Puizina *et al.*, 2004; Rafiei & Ronceret, 2023). Ce processus nécessite la formation d'un complexe entre MRE11 et les protéines RAD50, NBS1 et COM1 (Mercier *et al.*, 2015; Rafiei & Ronceret, 2023). Les brins d'ADN sb sont ensuite recouverts par le complexe RPA pour les protéger des nucléases, prévenir la formation de structures secondaires et faciliter la polymérisation des recombinaisons RAD51 et DMC1 (DaInes *et al.*, 2022; Lloyd, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023).

iv. Étape d'invasion

Pour réparer la cassure, la formation d'un nucléofilament (ADN-protéine) est nécessaire pour catalyser la recherche d'homologie et l'invasion d'une molécule d'ADN double brin de séquence homologue qui sera utilisée comme matrice pour réparer la cassure, processus appelé invasion à une seule extrémité (single-end invasion, SEI) (**Figure 15**) (Emmenecker *et al.*, 2023). Cette étape d'invasion de brin est catalysée par des recombinaisons (protéines qui facilitent les interactions ADN-ADN) de la famille RecA (recombinaison archétype qui a été isolée chez la bactérie *Escherichia coli*) (Brown & Bishop, 2014). La plupart des eucaryotes possèdent deux orthologues structurels et fonctionnels de la famille RecA : RAD51 (RADiation sensitive 51) et DMC1 (Disrupted meiotic cDNA 1) (Lin *et al.*, 2006; Wang & Copenhaver, 2018). Les études biochimiques sur ces protéines ont montré qu'elles présentent des propriétés biochimiques similaires (Brown & Bishop, 2014; Emmenecker *et al.*, 2023). Elles possèdent une faible activité ATPase, sont toutes les deux capables de se polymériser sur l'ADN sb pour former un nucléofilament et de catalyser la recherche d'homologie et l'invasion d'une molécule d'ADN double brin par le biais de deux sites distincts de liaison à l'ADN (Brown & Bishop, 2014;

Petiot *et al.*, 2024). D'ailleurs, il est suggéré que le site I de liaison à l'ADN joue un rôle important dans la régulation de la tolérance des mésappariements de l'ADN, comme chez *C.elegans* où DMC1 peut stabiliser des jonctions d'ADN hétéroduplex contenant des triplets de bases avec des mésappariements (Steinfeld *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021). Cependant, alors que RAD51 est impliquée dans la recombinaison somatique et méiotique, DMC1 est exprimée et active uniquement durant la méiose (Mercier *et al.*, 2015). Il a été démontré que DMC1 est la recombinase clé de la recombinaison méiotique et que RAD51 serait seulement un facteur accessoire (Cloud *et al.*, 2012; DaInes *et al.*, 2013; Hinch *et al.*, 2020). Ainsi, la formation du filament mixte RAD51/DMC1 est nécessaire à la réparation et la formation de CO entre chromosomes homologues (**Figure 15**) (DaInes *et al.*, 2022). En accord avec ce rôle des recombinases, l'absence de l'une d'entre elles suffit à induire de graves défauts de recombinaison et conduit à la stérilité chez la plante *Arabidopsis thaliana* (DaInes *et al.*, 2013). Le dépôt, la stabilité ainsi que l'activation de l'une et/ou l'autre de ces recombinases sur l'extrémité 3' sb sont étroitement contrôlés par différentes protéines. Selon leur action, ces protéines peuvent avoir une action pro- et/ou anti-recombinaison et ainsi maintenir de manière optimale la stabilité génomique. À titre d'exemple, chez la plante *Arabidopsis thaliana*, l'assemblage du filament RAD51 est stimulé par les médiateurs de RAD51 tels que la protéine BRCA2 et les cinq paralogues de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3) (Wang & Copenhaver, 2018; Rafiei & Ronceret, 2023). En opposition, il existe des facteurs favorisant le démantèlement de RAD51 sur l'ADN sb tels que les hélicases (**Figure 15**) (Wang & Copenhaver, 2018; Rafiei & Ronceret, 2023).

v. Résolution des cassures

Après cette étape d'invasion, une boucle de déplacement (boucle D) se forme par l'extension du brin envahisseur à travers la synthèse d'ADN dirigée par des ADN polymérases, utilisant le brin matrice complémentaire comme modèle (**Figure 15**) (Ziolkowski, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023; Zou *et al.*, 2024). Les intermédiaires de recombinaison ainsi créés sont traités par différentes voies de réparation dont la résolution peut conduire à des événements de non crossing-over (NCO) et/ou de crossing-over (CO) (**Figure 15**) (Lloyd, 2022). Contrairement aux CO, qui impliquent un échange réciproque de grands fragments d'ADN entre deux molécules d'ADN, les NCO sont associés à un transfert non-réciproque d'une information de génétique d'une molécule d'ADN à une autre. La majorité des intermédiaires de recombinaison sont résolus en NCO plutôt qu'en CO (Mercier *et al.*, 2015). Les invasions à une seule extrémité sont supposées faciliter l'alignement entre chromosomes homologues (Pinzón *et al.*, 2021). De

plus, les sites de recombinaison où la chromatide sœur est utilisée comme matrice pour réparer la cassure sont supposés former des événements de NCO (Rafiei & Ronceret, 2023).

La formation de CO nécessite l'hybridation de la seconde extrémité simple brin de la cassure pour former la jonction double de Holliday (**Figure 15**) (Zou *et al.*, 2024). Cette jonction peut être résolue en NCO ou en CO. Chez la plupart des eucaryotes, il existe deux voies de formation des CO : la classe I et la classe II (**Figure 15**) (Mercier *et al.*, 2015). La première voie est majoritaire, représentant entre 85 et 90% des CO formés chez *Arabidopsis thaliana*. Elle implique les protéines de la voie ZMM qui se lient aux intermédiaires de recombinaison formés : ZIP4, MER3, HEI10, PTD, SHOC1/ZIP2, MSH4, MSH5 ainsi que les protéines MLH1 et MLH3 (**Figure 15**) (Rafiei & Ronceret, 2023). Les protéines MSH5, ZIP4, MER3, HEI10 forment de multiples foyers aux stades leptotène et zygotène dont le nombre diminue du stade pachytène tardif jusqu'au stade diacynèse pour finalement ne laisser qu'un nombre limité de foci co-localisant avec les protéines HEI10 et MLH1 et mûrissant en CO (**Figure 15**) (Mercier *et al.*, 2015; Lloyd, 2022). La fréquence des CO est fortement réduite dans le cas des mutations *Atzip4*, *Athei10*, *Atshoc1*, *Atmsh4* et *Atmsh5* mais 15% de CO demeurent présents, ce sont les CO qui appartiennent à la classe II des CO (Higgins *et al.*, 2004; Chelysheva *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008b; Macaisne *et al.*, 2008, 2011; Chelysheva *et al.*, 2012). Cette deuxième voie mineure (souvent considéré comme un mécanisme de réparation de secours) implique la protéine MUS81, la seule protéine caractérisée à ce jour pour les CO de classe II (**Figure 15**) (Rafiei & Ronceret, 2023). Un double mutant *Atmsh4 Atmus81* diminue d'environ un tiers les CO résiduels chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Higgins *et al.*, 2008a). Ceci suggère que d'autres protéines agissent en parallèle de MUS81 dans la voie des CO de classe II (Dluzewska *et al.*, 2018). C'est le cas de la protéine FANCD2 qui contribue à la formation des CO de classe II en parallèle de MUS81 (**Figure 15**) (Kurzbauer *et al.*, 2018).

Les deux classes de CO s'opposent également par la distribution des CO formés. En effet, alors que les CO de classe I sont soumis à l'interférence, phénomène désignant la faible probabilité de survenue d'un deuxième CO adjacent au premier ; les CO de classes II ne sont pas soumis à l'interférence et semblent distribués aléatoirement (Berchowitz & Copenhaver, 2010; Rafiei & Ronceret, 2023). De ce fait, l'interférence est augmentée dans un mutant *Atmus81* alors qu'elle est réduite dans des mutants *Atzmm* (Mercier *et al.*, 2015; Dluzewska *et al.*, 2018). Concernant l'autre voie de CO de classe II guidée par FANCD2, elle contribue également à la formation de CO non-interférents (Li *et al.*, 2021; Pinzón *et al.*, 2021).

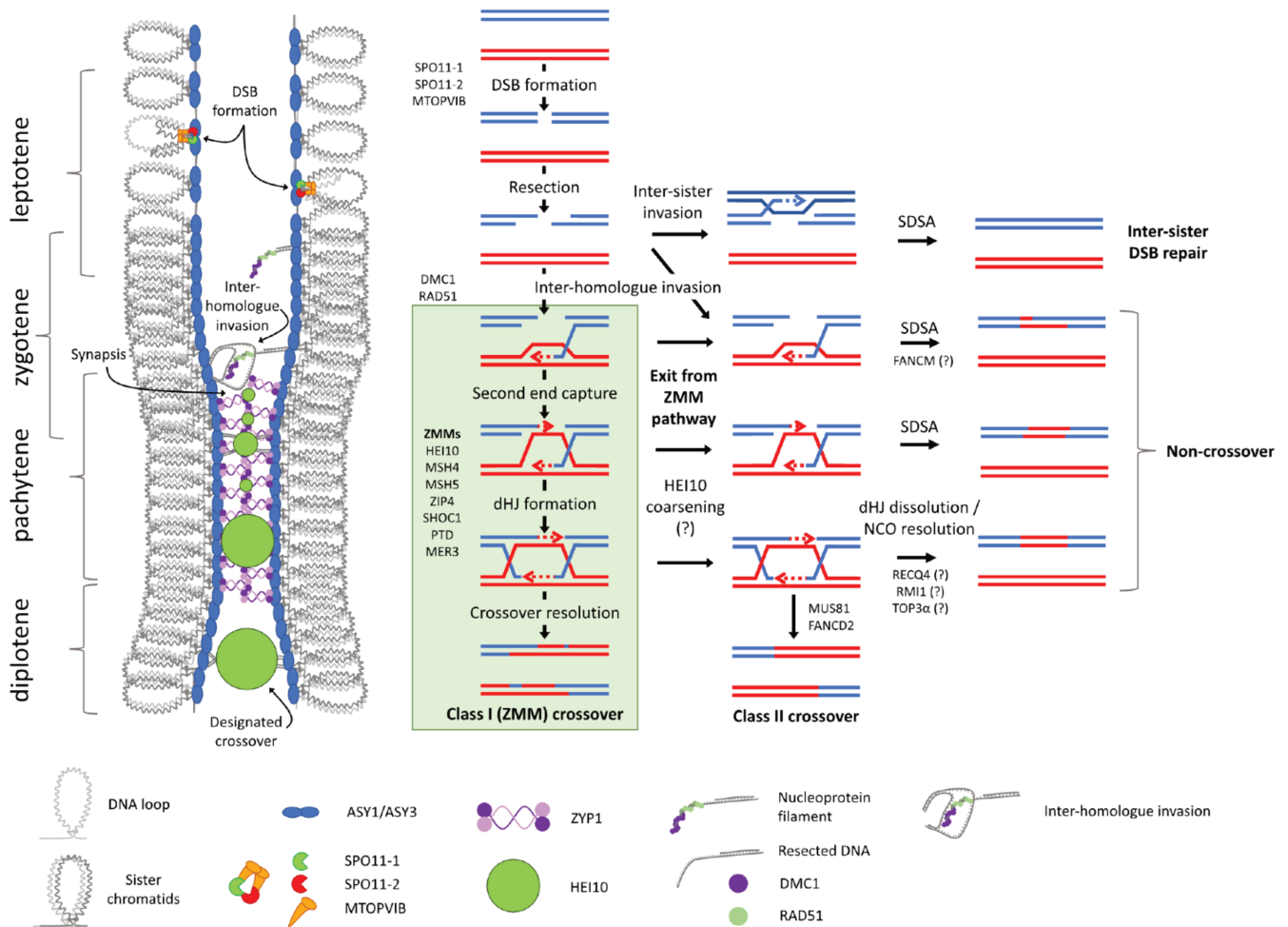


Figure 15 : Modèle de la recombinaison méiotique chez les plantes

La méiose commence par la formation de boucles chromatiniennes dont les bases structurées autour d'un axe protéique (incorporant ASY1/3/4 et REC8) et l'induction programmée de cassures double brin de l'ADN par le complexe SPO11 (incluant SPO11-1/2 et MTOPVIB). Après la formation des CDB, les extrémités d'ADN subissent une résection et sont réparées par hybridation avec une molécule d'ADN double brin homologue, médiées par DMC1 et RAD51. Puis, les axes chromosomiques homologues s'associent par la polymérisation de filaments transversaux composés de ZYP1 pour former le complexe synaptonémal. Ces molécules jointes sont ensuite traitées par diverses voies pour former des CO ou des NCO. Les CDB peuvent également être réparée par la chromatide sœur. Bien que de nombreuses CDB soient induites en début de méiose, seule une petite fraction devient des CO. De nombreux intermédiaires de recombinaison entrent initialement dans la voie de CO de classe I (ZMM), associées aux protéines ZMM telles que HEI10. Cependant, la majorité des intermédiaires perdent leur association avec HEI10 au cours du stade pachytène, seuls quelques intermédiaires destinés à devenir des CO de classe I subsistent. Ces CO de classe I représentent entre 85 et 90% des CO formés chez *A. thaliana*. Les autres intermédiaires de recombinaison qui ne sont pas destinés à devenir des CO de classe I peuvent être désassemblés par des hélicases (FANCM, RECQ4) et les protéines associées, favorisant la

formation de NCO par la voie SDSA (Synthesis-dependent strand annealing, SDSA) ou la dissolution des jonctions doubles de Holliday (dHJ). D'autres intermédiaires peuvent également être résolus en tant que CO de classe II via des voies impliquant MUS81 et FANCD2.

D'après Lloyd, 2022.

vi. La régulation de la recombinaison méiotique

1. L'assurance du crossing-over ou CO obligatoire

Le crossing-over obligatoire est essentiel pour assurer la ségrégation fidèle des chromosomes homologues lors de la méiose (Rafiei & Ronceret, 2023). En effet, le nombre de CO est étroitement contrôlé pour assurer au moins un CO par paire de chromosomes (bivalents) et ne dépasse rarement trois par bivalent (Mercier *et al.*, 2015; Dluzewska *et al.*, 2018). Cette caractéristique est conservée chez de nombreuses espèces, comme rapporté dans l'étude de Fernandes *et al.*, 2018, où 80% de bivalents montrent moins de 3 CO parmi près de 50 eucaryotes appartenant à différents règnes. Il est crucial que chaque bivalent ait au moins un CO puisque des chromosomes homologues non liés par un chiasma au cours de la méiose peuvent ségréger de manière aléatoire, entraînant formation de gamètes aneuploïdes (Dluzewska *et al.*, 2018). Les raisons empêchant une fréquence élevée de recombinaison restent sujettes à discussion mais il est supposé que cela pourrait rompre l'association d'allèles bénéfiques ce qui aurait des conséquences délétères sur la descendance (Otto & Lenormand, 2002).

2. L'homéostasie du nombre de crossing-over

L'homéostasie du nombre de CO désigne le processus par lequel le nombre de CO reste stable malgré les variations du nombre de CDB générées (Martini *et al.*, 2006; Rosu *et al.*, 2011; Cole *et al.*, 2012; Yokoo *et al.*, 2012). À titre d'exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, dans le mutant *fasI*, une augmentation d'environ 40 à 50% du nombre de CDB est observée alors que le nombre de CO reste inchangé (Varas *et al.*, 2015). Cependant, dans un mutant hypomorphe *spoII*, une réduction de 40% des CDB entraîne une réduction mais plus faible du nombre de CO de classe I (17%) (Xue *et al.*, 2018). En revanche, chez le maïs, l'étude de Sidhu *et al.*, 2015 montre qu'après avoir respecté la règle du CO obligatoire, le nombre de CO augmente proportionnellement avec le nombre de CDB. Ainsi, il semble que chez les plantes, cette homéostasie dépende d'un certain seuil bien que la quantification des CDB reste cytologiquement difficile à réaliser (Dluzewska *et al.*, 2018).

3. L'interférence du crossing-over

Le phénomène d'interférence, le processus par lequel un CO interfère la présence d'un autre CO à proximité, influe sur le nombre et la distribution des CO sur une grande proportion de la longueur du chromosome (Girard *et al.*, 2023; Morgan *et al.*, 2024). En effet, un chromosome avec un CO au milieu aura tendance à être unique sur l'ensemble du chromosome alors que deux CO sur un même chromosome auront tendance à être situés à chaque extrémité du chromosome (Girard *et al.*, 2023).

Ce phénomène peut s'expliquer par le modèle d'interférence par grossissement (« coarsening model ») récemment proposé (Girard *et al.*, 2023; Morgan *et al.*, 2024). Ce modèle est fondé sur la structure du complexe synaptonémal qui permet la diffusion linéaire et l'accumulation du facteur procrossover HEI10 utilisé comme moteur de la désignation du CO de classe I le long du chromosome (dans une seule dimension) (**Figure 15**) (Girard *et al.*, 2023; Rafiei & Ronceret, 2023; Morgan *et al.*, 2024). Ce n'est qu'à partir d'un certain seuil d'accumulation de la protéine HEI10 que les intermédiaires de recombinaison sont résolus en CO de classe I avec un espace interférent entre eux (Morgan *et al.*, 2021a, 2024). HEI10 appartient à la famille d'ubiquitine ligase E3 contenant un domaine RING-finger (Muyt *et al.*, 2014). Durant la méiose d'*Arabidopsis thaliana*, l'immunolocalisation de la protéine HEI10 montre une diminution progressive du nombre de foyers HEI10 le long du complexe synaptonémal du stade zygotène au stade diacinèse. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation de l'agrégation des foyers HEI10 plus grands et brillants, phénomène connu sous le nom de « grossissement » (Girard *et al.*, 2023; Rafiei & Ronceret, 2023; Morgan *et al.*, 2024). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les foci HEI10 peuvent grossir, s'agréger en foyers et se distribuer restent peu connus (Rafiei & Ronceret, 2023). Ces agrégats importants de molécules HEI10 ont tendance à se former à distance des uns des autres créant de l'interférence (Girard *et al.*, 2023; Morgan *et al.*, 2024). La surexpression de HEI10 montre une augmentation des CO alors que l'interférence diminue. En absence du complexe synaptonémal chez le mutant *zyp1*, les foyers HEI10 sont toujours formés mais l'interférence est perdue et le nombre de CO augmente ce qui suggère que la diffusion de HEI10 ne se produit plus en une seule dimension sur le complexe synaptonémal mais en trois dimensions dans le nucléoplasme (Ziolkowski *et al.*, 2017; Capilla-Pérez *et al.*, 2021; France *et al.*, 2021; Morgan *et al.*, 2021a; Durand *et al.*, 2022; Fozard *et al.*, 2023). Dans le mutant *zyp1*, les CO sont distribués de manière aléatoire le long du chromosome mais également entre chromosomes ce qui conduit à la formation d'univalents en métaphase I suggérant que la protéine ZYP1 est

importante pour l'interférence et l'assurance du CO obligatoire (Capilla-Pérez *et al.*, 2021; France *et al.*, 2021). De même, ASY1 participe à l'assurance et à l'interférence des CO, son effet peut être due à l'absence de polymérisation de ZYP1 dans le mutant *asy1* (Lambing *et al.*, 2020a; Pochon *et al.*, 2022). Le complexe synaptonémal est donc étroitement lié au processus de recombinaison homologue pendant la méiose, il existe d'ailleurs une corrélation positive entre la longueur du complexe synaptonémal et le taux de CO (Dluzewska *et al.*, 2018; Rafiei & Ronceret, 2023).

Un autre modèle pouvant expliquer le phénomène d'interférence est le modèle « beam-film » ou modèle d'interférence médié par le stress qui suggère une redistribution de la contrainte mécanique dissipée au niveau du site de désignation du CO de classe I (Kleckner *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014; Otto & Payseur, 2019). Dans ce système, toutes contraintes mécaniques se redistribuent vers l'extérieur de l'événement CO désigné, empêchant ainsi d'autres intermédiaires de recombinaison à proximité de se résoudre en CO (Girard *et al.*, 2023). Ainsi, la structure des chromosomes méiotiques semble capable d'emmagasiner et de transduire du stress mécanique (Girard *et al.*, 2023).

Ces deux modèles pourraient coexister avec d'autres modèles d'interférence (Girard *et al.*, 2023; Rafiei & Ronceret, 2023). En effet, le modèle de grossissement des foyers HEI10 pourrait être influencé par des stress mécaniques (Girard *et al.*, 2023; Rafiei & Ronceret, 2023). Il est également possible que certains mécanismes pourraient agir à des distances courtes comme le modèle « beam-film » alors que d'autres comme le modèle de grossissement des foyers HEI10 pourraient fonctionner à l'échelle du chromosome entier (Girard *et al.*, 2023).

vii. La distribution de la recombinaison méiotique

1. À l'échelle chromosomique

Chez les plantes, la répartition de la recombinaison méiotique à l'échelle chromosomique est hétérogène. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, la majorité des événements se produisent dans moins d'un quart du génome (Mercier *et al.*, 2015). Le taux de CO varie selon les différentes régions chromosomiques, avec une corrélation positive avec la densité de gènes et la distance des centromères (Dluzewska *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2024). La densité de gènes est plus élevée dans les régions télomériques et plus faible dans les régions centromériques, concentrant les événements de recombinaison principalement dans les extrémités distales des bras chromosomiques, c'est-à-dire régions subtélomériques et télomériques (Lloyd, 2022; Zou *et al.*, 2024). La suppression des CO dans les régions

centromériques est une caractéristique commune aux eucaryotes, évitant ainsi des défauts de ségrégation en méiose en protégeant la cohésion des chromatides et la formation du fuseau méiotique (Dluzewska *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2024).

Chez les espèces de grandes cultures comme l'orge, le maïs et le blé qui possèdent des génomes plus grands, on observe une fréquence élevée de CO dans les régions subtélomériques alors que les CO sont rares voire absents dans les régions centromériques et péri-centromériques (Dluzewska *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2024).

De plus, la formation de CO est inhibée au niveau de l'hétérochromatine et favorisée dans les régions euchromatiques qui sont associées à une chromatine ouverte, un faible niveau de méthylation de l'ADN et des marques chromatiniennes actives (Dluzewska *et al.*, 2018; Lloyd, 2022; Wang *et al.*, 2024).

2. À l'échelle locale

À l'échelle du gène, les CO se produisent majoritairement aux deux extrémités du gène, aux sites d'initiation et de terminaison de la transcription avec des taux de méthylation d'ADN inférieure à la moyenne, une faible occupation en nucléosomes et une faible teneur en nucléotides GC (Dluzewska *et al.*, 2018; Lloyd, 2022; Zou *et al.*, 2024). Ces régions sont associées à des marques chromatiniennes qui favorisent la transcription par l'ARN polymérase II tel que les marques H3K4me3 et H2A.Z (Mercier *et al.*, 2015). Les points chauds de recombinaison ont en effet tendance à survenir à proximité des gènes au niveau des motifs d'ADN riches en A, CCN et CCT chez *Arabidopsis thaliana* (Mercier *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2024).

viii. L'impact de la diversité des séquences sur la recombinaison méiotique

Pour maintenir la fidélité de la recombinaison homologue, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il a été démontré que les mésappariements formés dans les intermédiaires de recombinaison sont détectés par le système de réparation des mésappariements (MMR ; Mismatch Repair Pathway). Ce système peut soit corriger les mésappariements, soit les éliminer en rejetant le brin envahisseur, jouant ainsi un rôle d'anti recombinaison (Spies & Fishel, 2015; Chakraborty & Alani, 2016; Tham *et al.*, 2016). Dans ce système, trois complexes hétérodimériques peuvent se former et se lier à l'ADN: le complexe MSH2-MSH3, qui reconnaît les boucles d'insertion/délétion de 2 à 16 nucléotides et les liaisons transversales entre brins ; le complexe MSH2-MSH6, qui détecte les mésappariements d'une seule base ainsi que les petites boucles d'insertion/délétion de 1 à 2 nucléotides, et enfin, le

complexe MSH2-MSH7, présent uniquement chez les plantes, reconnaît les mésappariements d'une seule base tels que G/G, A/A, G/A, C/A et dans une moindre mesure, G/T (Hays, 1997; Wu *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2009; Gómez & Spampinato, 2013).

Chaque complexe forme une structure semblable à une pince coulissante qui se déplace le long de l'ADN en échangeant de l'ADP contre de l'ATP (Spies & Fishel, 2015; Chakraborty & Alani, 2016). Ce processus induit un changement de conformation du complexe MSH, qui s'éloigne du mésappariement pour recruter les protéines nécessaires à la correction ou au rejet du brin envahisseur (Spies & Fishel, 2015; Chakraborty & Alani, 2016).

Dans le cadre de la correction des mésappariements, les protéines MLH1-PMS1, EXO1 et PCNA sont recrutées pour exciser le brin d'ADN contenant le mésappariement dans le sens 5'-3', puis les ADN polymérase resynthétisent l'ADN excisé (**Figure 16**) (Spies & Fishel, 2015; Chakraborty & Alani, 2016).

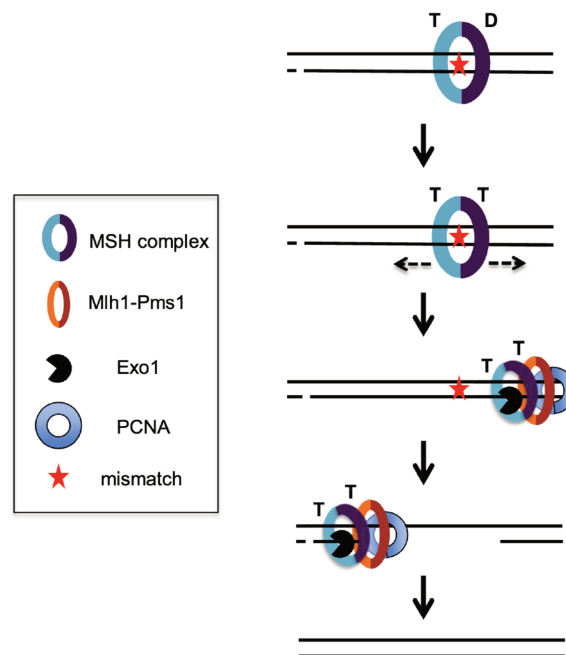


Figure 16 : La correction des mésappariements par le système MMR chez *S. cerevisiae*

Le complexe MSH se lie au mésappariement provoquant un échange d'ADP contre de l'ATP. Les deux sous-unités du complexe MSH se lient à l'ATP induisant un changement de conformation pour former une pince coulissante. Cette pince s'éloigne du mésappariement afin de recruter les protéines, Mlh1, Pms1, Exo1 et PCNA qui excisent le brin naissant contenant le mésappariement dans le sens 5'-3' puis les ADN polymérase resynthétisent l'ADN excisé.

D'après Chakraborty & Alani, 2016.

Dans le cadre du rejet du brin envahisseur, les complexes MSH, et plus particulièrement, les complexes Msh2-Msh6 ou Msh2-Msh3 chez la levure *S. cerevisiae*, recrutent le complexe hélicase-topoisomérase Sgs1-Top3-Rmi1 (STR) pour dérouler la molécule d'ADN hétéroduplex (**Figure 17**) (Spies & Fishel, 2015; Chakraborty & Alani, 2016).

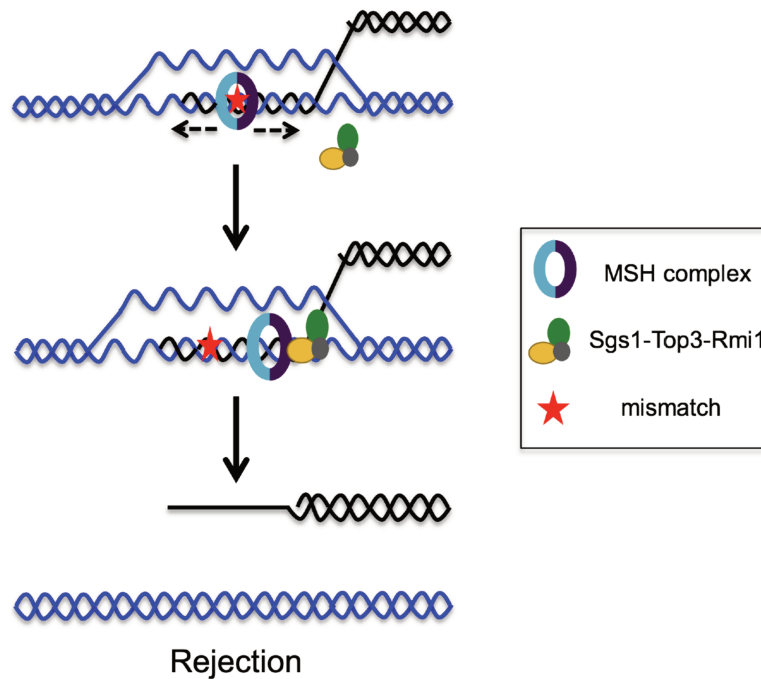


Figure 17 : Modèle du rejet du brin envahisseur pendant la recombinaison méiotique chez *S. cerevisiae*

Le complexe MSH identifie un mésappariement dans un intermédiaire de recombinaison contenant des séquences d'ADN divergentes. Après l'échange d'ADP contre de l'ATP, le complexe se transforme en pince coulissante, recrutant l'hélicase Sgs1 et ses co-facteurs Top3 et Rmi1 à la jonction entre l'ADN simple brin et l'ADN double brin. Ce complexe permet alors le déroulement de l'ADN hétéroduplex pour permettre une nouvelle recherche d'homologie.

D'après Chakraborty & Alani, 2016.

Par conséquent, des niveaux élevés de divergence de séquence inhibent la recombinaison méiotique comme c'est le cas chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, chez des hybrides blé-seigle ainsi que chez des hybrides interspécifiques de tomate et d'orge (Dluzewska *et al.*, 2018; Lloyd, 2022).

Cependant, chez *Arabidopsis thaliana* et chez le blé, on observe une augmentation du taux de CO dans des régions présentant une densité élevée de polymorphismes nucléotidiques (SNP ; Single Nuclear Polymorphism) (Rowan *et al.*, 2019; Blackwell *et al.*, 2020; Tock *et al.*,

2021). En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, lorsque la densité de SNP est supérieure à 0 mais inférieure ou égale à 0,5%, le taux de CO augmente par rapport à une région où la densité de SNP est nulle. En revanche, lorsque la densité de SNP est supérieure 0,5%, la proportion de CO diminue (Blackwell *et al.*, 2020).

Dans l'étude de Dluzewska *et al.*, 2023, il a été démontré que MSH2 joue un rôle important dans le contrôle de la formation des CO dans les régions polymorphes. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, MSH2 inhibe la formation de CO de classe II et inversement, favorise la formation de CO de classe I dans des loci polymorphes (Dluzewska *et al.*, 2023). Il est d'ailleurs observé une augmentation des CO dépendants de MSH2 à la jonction entre les régions hétérozygotes et homozygotes (Dluzewska *et al.*, 2023). Ainsi, il est supposé que les CO de classe I auraient un rôle dans la création et la maintenance de la diversité génétique alors que les CO de classe II joueraient un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome puisqu'ils permettraient d'éliminer en toute sécurité les intermédiaires de recombinaison néfastes (Dluzewska *et al.*, 2023).

2) Recombinaison méiotique chez les plantes autopolyploïdes

i. Rappel sur les problèmes méiotiques des autopolyploïdes

Pour rappel, chez les autopolyploïdes, les chromosomes n'ont pas de partenaire de recombinaison privilégié, ils peuvent recombiner avec tous les chromosomes homologues présents. Les autopolyploïdes ont donc tendance à avoir une ségrégation polysomique où plus de 2 allèles de chaque locus ségrégent en méiose (**Figure 18**) (Grandont *et al.*, 2013; Bomblies, 2023). Il a d'ailleurs été décrit dans les populations d'autotétraploïdes une hétérozygotie plus élevée (Ronfort *et al.*, 1998; Ronfort, 1999; Parisod *et al.*, 2010b). Pour autant, les autopolyploïdes évolués sont cytologiquement « diploïdisés » (mais pas génétiquement) c'est-à-dire qu'ils forment principalement des bivalents en métaphase I même si les associations entre plusieurs chromosomes restent possibles (**Figure 18**) (Kollmann, 1972; Krebs & Hancock, 1989; Wolf *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2010; Hollister *et al.*, 2012; Yant *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Bomblies *et al.*, 2015).

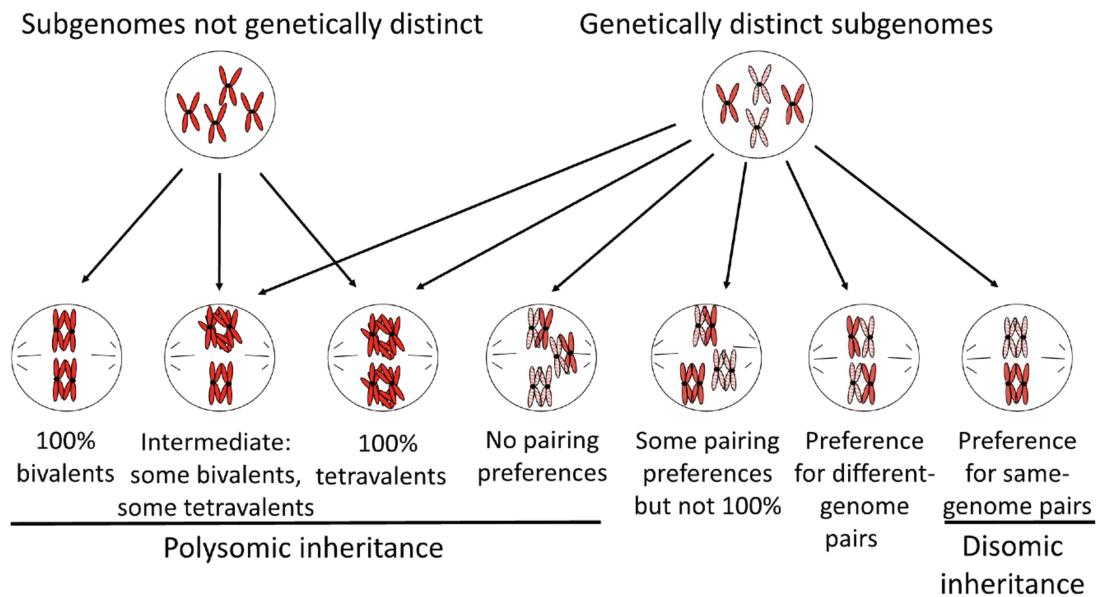


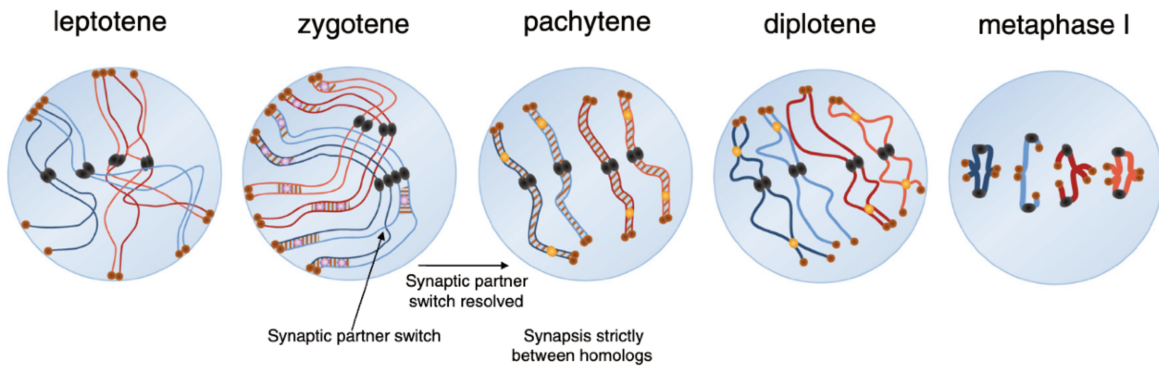
Figure 18 : Modèles de ségrégation polysomique et disomique des polyploïdes

Lors de la méiose, les chromosomes des plantes autopolyploïdes tendent à avoir une ségrégation polysomique c'est-à-dire que les chromosomes n'ont pas de préférence de partenaire de recombinaison alors que les plantes allopolyploïdes évoluées (stable méiotiquement) s'orientent vers une ségrégation disomique avec pour préférence un partenaire de recombinaison dont la séquence est plus similaire. D'après Lv *et al.*, 2024.

Cependant, en début de prophase I (stade zygotène/pachytène), chez de nombreuses espèces, il a été montré un alignement parallèle de tous les chromosomes homologues notamment chez la plante modèle autotétraploïde *Arabidopsis arenosa* (Lloyd & Bomblies, 2016). Les chromosomes homologues commencent ensuite à s'apparier deux par deux grâce à la formation du complexe synaptonémal pour former des bivalents (**Figure 19**) (Lloyd & Bomblies, 2016). De plus, un chromosome spécifique peut former en même temps un complexe synaptonémal avec plusieurs chromosomes homologues ce qui entraîne la formation de synapse dite « commutateurs de partenaires d'appariement » (Pairing partner switch) ou autrement appelé multivalents synaptiques (**Figure 19**) (Jones & Vincent, 1994; Jones *et al.*, 1996; Grandont *et al.*, 2013; Lloyd & Bomblies, 2016; Bomblies, 2023). Chez les autopolyploïdes évolués, ces associations synaptiques multiples sont majoritairement résolues avant la métaphase I pour former des bivalents avec un assortiment aléatoire en paire d'homologues (**Figure 19**) (Hobolth, 1981; Loidl & Jones, 1986; White *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1990; Jones & Vincent, 1994; Khazanehdari *et al.*, 1995; Stack & Roelofs, 1996; Abraham *et al.*, 2013; Zickler & Kleckner, 2015; Morgan *et al.*, 2021b). Il est supposé que cela peut se produire par

la suppression de portions du complexe synaptonémal, le désassemblage des intermédiaires de recombinaison ou par la suppression et/ou la redistribution de la recombinaison (Jones & Vincent, 1994; Jones *et al.*, 1996; Lloyd & Bomblies, 2016; Bomblies, 2023).

Allopolyploid



Autopolyploid

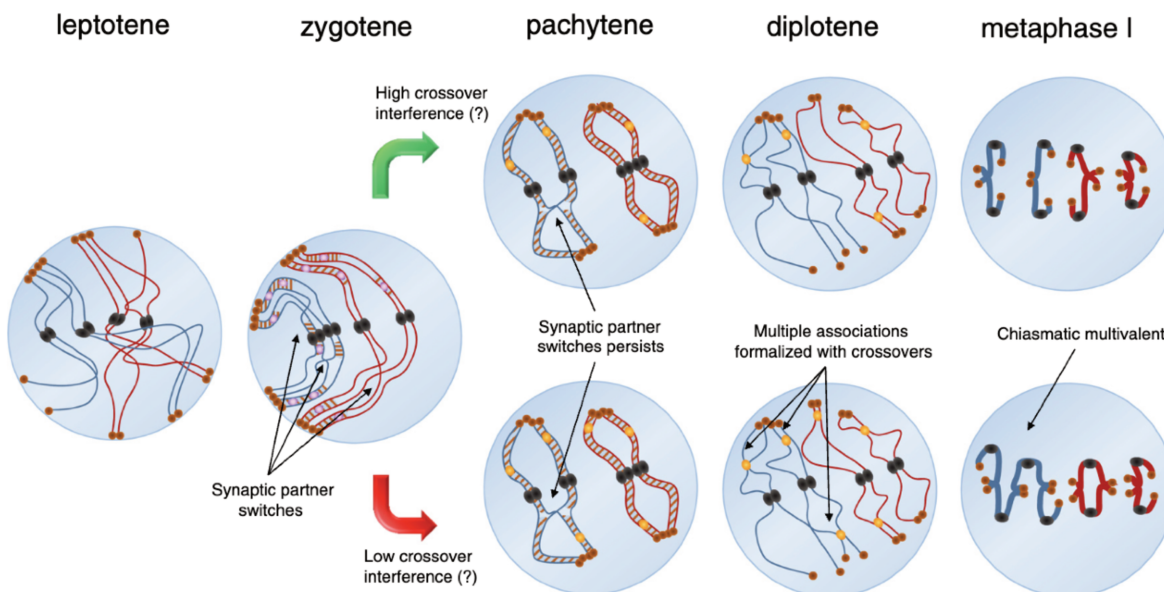


Figure 19 : Modèle de la méiose des autopolyploïdes et allopolyploïdes

Au stade leptotène, les chromosomes s'alignent et s'associent via les centromères (point noirs) et les télomères (points marrons). Des associations pré-synaptiques entre chromosomes non-homologues/homéologues pour les allopolyploïdes, ou entre plus de 2 chromosomes homologues pour les autopolyploïdes peuvent se former sur de petites portions de chromosomes.

Pendant le stade zygotène, le complexe synaptonémal commence à se former, et ces associations pré-synaptiques peuvent évoluer en multivalents synaptiques (synaptic partner switches). Des nodules de recombinaison apparaissent (rond rose).

À la fin du stade zygotène/début du pachytène, ces multivalents synaptiques sont dissouts et la synapse se forme exclusivement entre chromosomes homologues, où des nodules de recombinaison, précurseurs de chiasma, sont localisés (rond jaune). Chez les autoploïdes, il a été observé que lorsque l'interférence est élevée (flèche verte), le nombre de chiasma est limité à un par paire de chromosomes et les multivalents synaptiques sont corrigés. En revanche, lorsque l'interférence est faible (flèche rouge), les multivalents synaptiques peuvent persister et former de véritables multivalents en métaphase I.

En diplotène, le complexe synaptonémal est dissout et à la métaphase I, les chromosomes homologues restent liés par un ou plusieurs chiasma(ta). D'après Lloyd & Bomblies, 2016.

Contrairement aux autoploïdes évolués, chez les néo-autoploïdes, ces multivalents synaptiques peuvent être maintenus, favorisant la création de chiasma en métaphase I et en conséquence, formés des multivalents et/ou des enchevêtrements (**Figure 19**) (Bomblies *et al.*, 2016; Pelé *et al.*, 2018).

Ainsi, la plupart des ploïdes naturels/évolués ont développé des solutions pour empêcher la formation d'anomalies méiotiques et produisent majoritairement ou uniquement des bivalents en métaphase I (Grandont *et al.*, 2014; Bomblies *et al.*, 2016; Bomblies, 2023).

ii. Les solutions évolutives de stabilisation de la méiose chez les autoploïdes

1. Diminution du taux de crossing-over

Les néo-tétraploïdes présentent une corrélation positive entre les fréquences de quadrivalents en métaphase I et la fréquence des CO comme chez la plante médicinale *Hyoscyamus muticus* (Bomblies, 2023). De plus, il existe une corrélation positive entre une faible fréquence de chiasmata chez les parents diploïdes et une augmentation de la fertilité chez les néo-ploïdes formés comme observé chez la plante *Hyoscyamus muticus* et le seigle (Hazarika & Rees, 1967; Lavania, 1986; Srivastava *et al.*, 1992). Ainsi, il est supposé que la réduction du nombre de CO pourrait empêcher les multivalents synaptiques observés au stade pachytène de se transformer en de vrais multivalents en métaphase I (Bomblies, 2023).

Les recherches récentes menées sur la plante *Arabidopsis arenosa*, présente à la fois sous forme diploïde et autotétraploïde méiotiquement stable (estimé à environ 30 000 générations), montrent une réduction du taux global de CO chez les autotétraploïdes évolués par rapport aux parents diploïdes et également, par rapport aux plantes autotétraploïdes nouvellement synthétisées (Yant *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2021b). C'est également le cas chez d'autres espèces autotétraploïdes comme *Physaria vitulifera* ou *Solanum tuberosum* où la

fréquence de CO chez les parents diploïdes prépare l'adaptation de la stabilité méiotique chez les polyploïdes nouvellement formés (Mulligan & Gerald, 1967; Bomblies *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2020). En effet, les progéniteurs diploïdes avec des taux de CO plus élevés donnent naissance à des néopolyploïdes avec des taux de multivalents plus élevés. Ainsi, certains génotypes sont susceptibles de créer des lignées polyploïdes plus ou moins stables que d'autres (Bomblies & Madlung, 2014; Bomblies *et al.*, 2015; Lloyd & Bomblies, 2016). De plus, lorsqu'un autotétraploïde est nouvellement synthétisé, on observe après plusieurs générations de sélection, une diminution de la fréquence des multivalents associée à une réduction du taux de CO (Morrison & RAJHATHY, 1960; Weiss & Maluszynska, 2001; Santos *et al.*, 2003; Pecinka *et al.*, 2011).

Chez de nombreuses espèces, la fréquence de CO est réduite au minimum possible, soit à 1 CO par paire de bivalents comme chez *Lotus corniculatus*, *A. arenosa* et *Physaria vitulifera* (Mulligan & Gerald, 1967; Davies *et al.*, 1990; Yant *et al.*, 2013; Bomblies *et al.*, 2016).

Ces données suggèrent donc que la réduction de la fréquence du CO limite la prévalence de multivalents favorisant ainsi une ségrégation méiotique de type diploïde, suggérant des preuves d'une forte sélection sur les gènes affectant la formation de crossing-over (Lloyd & Bomblies, 2016; Blasio *et al.*, 2022).

2. Renforcement de l'interférence

Il est intéressant de noter que malgré une diminution du taux de CO, la fréquence d'univalents (chromosomes homologues non liés par un CO) n'augmente pas comme le voudrait le hasard. Au contraire, le nombre et la distribution du CO obligatoire sont étroitement contrôlés par une augmentation de l'interférence du crossing-over (**Figure 19**) (Lloyd & Bomblies, 2016). En effet, l'interférence du crossing-over, mesurée par immunolocalisation des foci de la protéine HEI10, est plus forte dans les autotétraploïdes évolués d'*A. arenosa* que dans les plantes nouvellement synthétisées (Morgan *et al.*, 2021b). Par ailleurs, chez *A. arenosa*, le tétraploïde évolué a une longueur d'axe/ complexe synaptonémal plus courte que chez le néopolyploïde (Morgan *et al.*, 2021b; Bomblies, 2023). Or, il est connu que la longueur du complexe synaptonémal est corrélée à la fréquence de recombinaison (Kleckner *et al.*, 2003). Ainsi, la diminution du nombre de CO peut être due au raccourcissement du complexe synaptonémal permettant à l'interférence d'être renforcée sur une distance suffisamment longue pour garantir qu'aucun chromosome ne soit connecté avec plus d'un partenaire homologue et plus précisément, que les CO se forment près des extrémités des chromosomes (Bomblies *et al.*, 2016).

Cependant, les mécanismes moléculaires régulant l'interférence restent encore incompris, il est supposé qu'elle serait propagée le long des axes chromosomiques (Morgan *et al.*, 2024).

3. Bases génétiques de l'adaptation méiotique à l'autopolyploïdie

Très peu de mécanismes moléculaires qui contrôlent l'établissement et la stabilisation méiotique autotétraploïde sont connus. Parmi les plantes autopolyploïdes, seule la plante *Arabidopsis arenosa* a été analysée en détail. En effet, plusieurs études génomiques de sélection comparant des populations naturelles d'*A. arenosa* autotétraploïdes et diploïdes méiotiquement stables ont permis d'identifier certains gènes candidats potentiellement impliqués dans la stabilisation de la méiose dans la lignée tétraploïde, suggérant ainsi une adaptation multigénique (Hollister *et al.*, 2012; Yant *et al.*, 2013). Ces gènes codent pour des protéines clés dans les processus méiotiques tels que la cohésion, la formation des axes chromosomiques, la formation du complexe synaptonémal et la recombinaison homologue (Bomblies *et al.*, 2015). Toutes ces protéines présentent de multiples polymorphismes d'acides aminés, différenciant les allèles diploïdes des allèles autotétraploïdes dont les mutations semblent être apparues *de novo* (Hollister *et al.*, 2012; Yant *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2015; Bohutínská *et al.*, 2021b,a).

a. Les éléments axiaux ASY1 et ASY3

Des signatures de sélection ont été identifiées dans les gènes codant pour les protéines de l'axe ASY1 et ASY3. L'étude de Morgan *et al.*, 2020 s'est intéressée aux effets des gènes *Asy1* et *Asy3* chez l'autotétraploïde *Arabidopsis arenosa* en se concentrant sur les allèles dérivés des autotétraploïdes T et des allèles dit ancestraux des plantes diploïdes D. Pour rappel, les protéines ASY1 et ASY3 sont essentielles à la formation des axes chromosomiques méiotiques (voir partie III. 1) i. 1.). Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants *asy1* et *asy3* ont une formation du complexe synaptonémal altérée, un faible taux de CO, une fréquence élevée d'univalents et sont presque stériles (Sanchez-Moran *et al.*, 2007; Ferdous *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis arenosa*, les allèles dérivés T *Asy1* et *Asy3* sont associés à des changements dans la méiose, notamment une réduction de la longueur de l'axe chromosomique ainsi qu'une réduction du nombre de multivalents synaptiques pendant la prophase I et par conséquent, une diminution de la fréquence des multivalents en métaphase I.

Les allèles dérivés *Asy1* et *Asy3* ont principalement des effets additifs ce qui n'est pas surprenant puisqu'il est connu que ASY1 et ASY3 interagissent directement ensemble, avec

ASY1 chez les plantes autotétraploïdes qui a un effet général plus fort que ASY3 (Armstrong *et al.*, 2002; Ferdous *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2020, 2022a). Pour ASY1, un seul changement d'acide aminé dans le domaine protéique HORMA a été identifié avec une haute fréquence dans les plantes tétraploïdes alors qu'il est présent à une très faible fréquence chez les plantes *A. arenosa* diploïdes (Hollister *et al.*, 2012). D'ailleurs, en présence de l'allèle *Asy1-T*, la diminution de la longueur pourrait encourager la réorganisation de l'axe de manière à ce que le placement des CO (en les positionnant du même côté par rapport aux sites « commutateurs de partenaire d'appariement » avec un niveau accru d'interférence) soit plus sécurisé pour former des bivalents (**Figure 20**) (Bomblies *et al.*, 2016; Bomblies, 2023).

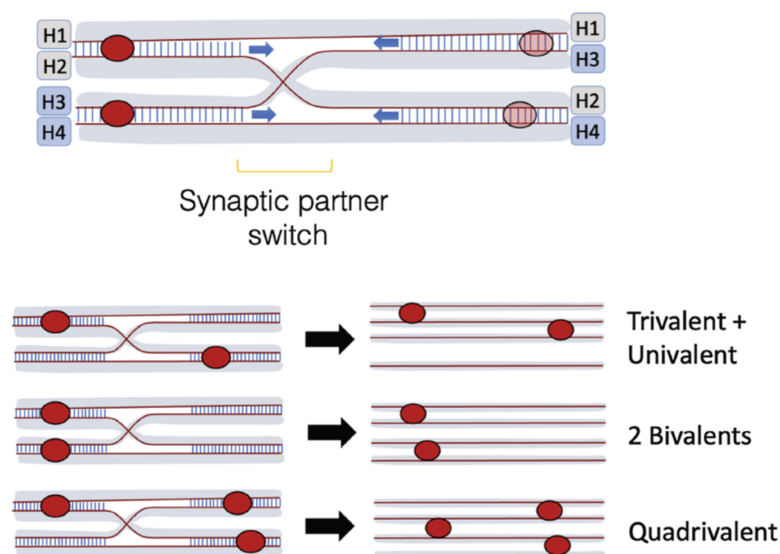


Figure 20 : Modèle du multivalent synaptique et résultats par rapport à la position des crossovers chez les polyploïdes

Les multivalents synaptiques se forment lorsque l'appariement et la synapse commencent à différents sites à différents sites des extrémités chromosomiques vers l'intérieur des chromosomes, avec différents partenaires (H1-4 pour chromosomes homologues 1-4). Ces structures sont souvent entourées de régions d'asynapsis. La synapse peut débiter à partir de crossovers en développement (cercles rouges pleins à gauche) ou à partir de sites d'initiation synaptique qui ne développent pas de véritables crossovers (cercles transparents à droite).

Si deux CO se forment sur des côtés opposés d'un multivalent synaptique, trois chromosomes resteront liés, formant ainsi un trivalent en métaphase I alors que le quatrième chromosome formera un univalent. Si deux CO sont créés sur le même côté du multivalent synaptique, deux bivalents se formeront en métaphase I.

Par contre, si 3 CO se forment, un quadrivalent sera observé en métaphase I. D'après Bomblies, 2023.

De plus, il a été décrit une tendance à encore plus de présence de bivalents en forme de bâtonnet en métaphase suggérant une relocalisation des CO au niveau des régions subtélomériques ou une condensation accrue de la chromatine (Morgan *et al.*, 2020). Cependant, il n'a pas été trouvé de différence du taux de CO entre les allèles dérivés et les ancestraux (Morgan *et al.*, 2020).

Dans l'étude de Seear *et al.*, 2020, une analyse génomique de l'influence du gène *Asy3* chez les autoploïdes et plus précisément, chez les lignées d'*Arabidopsis lyrata* et les hybrides *A. lyrata* x *A. arenosa* montre qu'*Asy3* stabilise la méiose mâle autotétraploïde (Seear *et al.*, 2020). En effet, un nouvel allèle *Asy3* a été découvert chez les *A. lyrata* tétraploïdes comprenant une duplication en tandem (TD). Chez les autotétraploïdes *A. lyrata*, il est observé un plus faible taux de multivalents, une réduction du taux de CO avec une diminution des CO localisés dans les régions proximales et interstitielles par rapport aux plantes diploïdes (Seear *et al.*, 2020). Par conséquent, il est supposé que la protéine ASY3 TD agit sur l'éloignement des CO (Ferdous *et al.*, 2012; Chambon *et al.*, 2018).

b. La cohésine REC8

La sous-unité de cohésine spécifique de la méiose, REC8, montre également une signature de sélection dans la lignée tétraploïde méiotiquement stable d'*Arabidopsis arenosa*.

Une étude suggère que REC8 aurait pu être sélectionnée initialement au début de la stabilisation des lignées tétraploïdes dans les *A. arenosa* les plus anciennes et aurait pu être un acteur de première ligne dans l'adaptation précoce des lignées polyploïdes ; probablement antérieurement à la sélection de ASY1 et ASY3 (Bohutínská *et al.*, 2021b). Ceci est soutenu par le fait que la pression sélective serait plus importante pour résoudre les problèmes associés aux univalents que ceux associés aux multivalents (Morgan *et al.*, 2022b). En effet, même si les multivalents sont associés à des problèmes de ségrégation, la probabilité que la ségrégation ne soit pas fidèle reste plus faible (en fonction des configurations des multivalents) qu'avec la ségrégation d'univalents (Bomblies *et al.*, 2016; Morgan *et al.*, 2022a,b).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine REC8 est connue pour affecter l'assemblage des axes, la longueur du complexe synaptonémal et la fréquence de recombinaison (Bai *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2003; Chelysheva *et al.*, 2005; Lambing *et al.*, 2020b; Morgan *et al.*, 2022a). De plus, REC8 permet d'interagir/recruter les composants de l'axe sur le chromosome (Sakuno & Hiraoka, 2022). En effet, un allèle dérivé (autotétraploïde évolué) de *REC8* est associé à un taux de formation d'univalents significativement plus faible en métaphase I mais n'a aucun effet sur la fréquence de multivalents et le taux de CO (Morgan *et al.*, 2022b).

L'étude de Morgan *et al.*, 2022b a étudié l'interaction génétique de l'allèle dérivé de *REC8* avec les allèles dérivés de *ASY1* et *ASY3*. Des lignées homozygotes pour les allèles D ou T ont été générées à partir de la lignée d'*A. arenosa* tétraploïde KOWA, hétérozygote pour les allèles T et D de *REC8*. Ces lignées ont ensuite été croisées avec les plantes portant les allèles T et D de *ASY1* et *ASY3* provenant de l'accession autotétraploïde TGB d'*A. arenosa*. Il a été montré que les allèles dérivés des plantes tétraploïdes de *REC8*, *ASY1* et *ASY3* exercent des effets distincts sur la stabilisation de la méiose (Morgan *et al.*, 2022b). Curieusement, les plantes avec les allèles dérivés des 3 protéines montrent une plus grande fréquence d'univalents par rapport aux allèles diploïdes mais un faible taux de multivalents ce qui conduirait à une augmentation de la stabilité méiotique (Morgan *et al.*, 2022b). Les plantes avec les allèles dérivés pour *REC8* et avec les allèles dérivés *REC8/ASY1/ASY3* montrent moins de multivalents synaptiques et une longueur réduite du complexe synaptonémal par rapport aux allèles diploïdes (Morgan *et al.*, 2022b). Ainsi, il est suggéré que dans le cas de la longueur du complexe synaptonémal, les 3 gènes auraient des effets additifs (Morgan *et al.*, 2022b). De plus, dans les plantes avec les allèles dérivés *REC8*, la distance entre les doubles CO est plus courte et par conséquent, l'interférence diminue dans ces plantes. Cependant, dans les plantes avec les allèles dérivés *REC8/ASY1/ASY3*, les doubles CO sont plus espacés démontrant que l'augmentation de l'interférence serait médiée par les protéines de l'axe chromosomique (Morgan *et al.*, 2022b).

Ainsi, les allèles dérivés *ASY1* et *ASY3* auraient été sélectionnés plus tard après *REC8* pour réduire le taux de multivalents et renforcer l'interférence des crossing-over (provoquant une augmentation partielle des univalents) (Morgan *et al.*, 2022b).

Ces résultats suggèrent donc que l'adaptation multigénique de la méiose d'*Arabidopsis arenosa* est un processus non linéaire avec un modèle évolutif en plusieurs étapes (Morgan *et al.*, 2022b).

c. Les protéines de la voie ZMM

Les protéines ZMM ont aussi été identifiées comme gènes candidats pour la stabilisation méiotique chez *A. arenosa*. Cependant, aucune étude fonctionnelle de ces protéines n'a encore été réalisée chez *A. arenosa* mais quelques études montrent le rôle de ces protéines dans la stabilisation de la méiose de la plante *Arabidopsis thaliana* autotétraploïde (doublée chimiquement avec de la colchicine) (Gonzalo *et al.*, 2023; Parra-Nunez *et al.*, 2023).

En effet, l'étude de Gonzalo *et al.*, 2023 analyse l'impact de la double mutation des protéines HEI10 et TAF4B sur la méiose des autotétraploïdes nouvellement synthétisées. Ces mutations sont connues pour diminuer quantitativement le taux de CO chez la plante *A.*

thaliana. Pour rappel, HEI10 est une protéine connue pour favoriser la formation de CO de classe I de manière dose-dépendante et TAF4B qui code une sous-unité du facteur de transcription de l'ARN polymérase II régule l'expression des gènes méiotiques centraux (Falender *et al.*, 2005; Chelysheva *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Grive *et al.*, 2016; Ziolkowski *et al.*, 2017; Lawrence *et al.*, 2019). Dans cette étude, il est décrit, comme initialement supposé, une diminution de la fréquence des CO associée à une réduction du taux de multivalents (Gonzalo *et al.*, 2023). Cependant, ceci est également associé à une augmentation légère du taux d'univalents démontrant que la diminution du taux de multivalents ne permet pas de restaurer la stabilité méiotique et la fertilité de ces plantes (Gonzalo *et al.*, 2023). Ainsi, cette étude suggère que chez les autotétraploïdes, le chemin évolutif vers la stabilisation de la méiose implique deux éléments : une réduction du nombre de multivalents et le renforcement de l'interférence du crossing-over pour qu'il y a un biais en faveur de la formation de bivalents (Gonzalo *et al.*, 2023).

De plus, l'étude de Parra-Nunez *et al.*, 2023 a analysée l'effet de mutations d'autres protéines ZMM sur la méiose des plantes *A. thaliana* autotétraploïdes doublées à la colchicine. Dans cette étude, les mutants de l'axe chromosomique, *asy1*, des CO de classe I, *zip4*, *msh5*, *mer3*, *hei10*, *mlh3* et des CO de classe II, *mus81* ont été analysés (Parra-Nunez *et al.*, 2023). Contrairement au mutant *mus81*, les mutants de CO de classe I présentent une diminution du nombre de chiasma par cellule, une diminution du taux de multivalents et une augmentation du taux d'univalents démontrant également que d'autres processus évolutifs ont été mis en place pour stabiliser la méiose des plantes autopolyploïdes (Parra-Nunez *et al.*, 2023).

d. Autres candidats intéressants

D'autres gènes candidats ont également été identifiés dans les études génomiques de sélection des lignées d'*A. arenosa* mais n'ont pas encore été testés fonctionnellement. C'est le cas des régulateurs de cohésine PDS5, SCC2, SCC3 et SWI1 et l'élément central du complexe synaptonémal ZYP1 (Bomblies, 2023). De plus, une étude récente indique que l'absence du complexe SMC5/6 (Structural Maintenance of Chromosomes) entraîne des défauts méiotiques plus importants chez *A. thaliana* dans les néo-autotétraploïdes que dans les plantes diploïdes (Yang *et al.*, 2021).

Ainsi, la modification des axes chromosomiques méiotiques, du complexe synaptonémal et des remodeleurs de la chromatine pourrait jouer un rôle fondamental plus large dans l'évolution de la stabilisation des plantes autopolyploïdes (Morgan *et al.*, 2020).

3) Recombinaison méiotique chez les plantes allopolyploïdes

i. Rappel sur les problèmes méiotiques des allopolyploïdes

Comme présenté dans la partie II. 5., les allopolyploïdes et les autopolyploïdes sont confrontés à des défis méiotiques différents concernant la ségrégation des chromosomes durant la méiose. En effet, chez les allopolyploïdes qui possèdent un héritage disomique, le partenaire de recombinaison préférentiel est le chromosome homologue le plus étroitement apparenté plutôt que le chromosome homéologue (ancestralement homologue provenant de génomes différents) (**Figure 18**) (Sears, 1976; Pecinka *et al.*, 2011; Grandont *et al.*, 2014; Lloyd & Bomblies, 2016; Bomblies, 2023). Cependant, les chromosomes homéologues peuvent présenter des similitudes génétiques permettant une compétition avec les chromosomes homologues pour la reconnaissance, l'alignement, l'assemblage du complexe synaptonémal et la formation des crossing-overs (Soares *et al.*, 2021). En effet, les chromosomes homologues et homéologues des allopolyploïdes s'alignent en début de prophase I pouvant former des multivalents synaptiques au stade zygotène (**Figure 19**) (Hobolth, 1981; Gillies, 1985; Loidl *et al.*, 1990; Cuñado *et al.*, 1996; Grandont *et al.*, 2014). Cependant, chez les allopolyploïdes évolués, ces multivalents synaptiques sont moins nombreux et se produisent sur des régions chromosomiques plus petites (**Figure 19**) (Hobolth, 1981; Gillies, 1985; Loidl *et al.*, 1990; Cuñado *et al.*, 1996; Grandont *et al.*, 2014). Avant la fin du stade pachytène, toutes les associations synaptiques multiples impliquant des chromosomes homéologues et/ou homologues sont dissoutes, et presque tous les chromosomes présentent des synapses exclusivement homologues (**Figure 19**) (Holm, 1986; Grandont *et al.*, 2014; Lloyd & Bomblies, 2016).

À la différence des allopolyploïdes évolués, les allopolyploïdes nouvellement formés ont un nombre plus important de multivalents synaptiques persistant en métaphase I, entraînant une fréquence élevée de recombinaison homéologue, de réarrangements chromosomiques et d'aneuploïdie dans la descendance (Szadkowski *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2011; Henry *et al.*, 2014). De plus, tout comme chez les autopolyploïdes, il a été montré chez certains allopolyploïdes que le nombre de CO par chromosome est plus élevé chez les allopolyploïdes nouvellement formés par rapport à leurs progéniteurs diploïdes comme c'est le cas chez le coton et chez des cultures de *Brassica* ; suggérant un allègement de l'interférence (Desai *et al.*, 2006; Leflon *et al.*, 2010; Pecinka *et al.*, 2011; Pelé *et al.*, 2017).

Par conséquent, il est essentiel de contrôler la recombinaison, en particulier entre chromosomes homéologues, pour prévenir la formation de chiasma(ta) entre bivalents ou

multivalents allosyndétiques, ainsi que pour éviter la perte potentielle d'information génétique et la réduction de la fertilité dans la descendance (Lv *et al.*, 2024).

Ainsi, la formation de bivalents homologues liés par chiasma en MI est capitale pour assurer une ségrégation fidèle des chromosomes homologues pendant l'anaphase I (Soares *et al.*, 2021). Ce comportement méiotique de type diploïde chez les allopolyploïdes évolués est le résultat d'un ensemble de systèmes de régulation génétique dont plusieurs ont été caractérisés moléculairement chez le blé et le colza (Soares *et al.*, 2021).

Dans les sous-parties ii. et iii., je décrirai plus en détail les recherches détaillant l'identification des régulateurs de la recombinaison homéologue chez le blé tendre et la plante *Brassica napus*.

ii. Les régulateurs de la recombinaison homéologue chez le blé tendre

Le blé tendre, *Triticum aestivum*, est un allohexaploïde issu de l'hybridation de trois espèces apparentées distinctes. En effet, dans un premier temps, il y a 800 000 ans, l'hybridation de deux espèces diploïdes *T. urartu* (AA) et une espèce d'*Aegilops* (BB) à donner naissance à *T. dicoccoides* (AABB), qui a été domestiqué pour créer le blé dur *T. turgidum* (Matsuoka, 2011; Svačina *et al.*, 2020a). Il y a environ 10 000 ans, *T. turgidum* s'est hybridé avec *A. tauschii* (DD) pour former le blé allohexaploïde (AABBDD), caractérisé par un héritage disomique et une régulation stricte de la formation de bivalents homologues en métaphase I (RILEY & CHAPMAN, 1958; Sears, 1976; Jauhar *et al.*, 1991; Matsuoka, 2011). C'est l'une des seules espèces allopolyploïdes (avec *Brassica* notamment) pour laquelle de nombreux travaux ont été menés pour étudier la régulation génétique de la diploïdisation cytologique (Sutton *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2006; Boden *et al.*, 2007, 2009). Ces études ont permis d'identifier plusieurs loci contribuant à la stabilisation méiotique du blé et de déterminer les gènes responsables (Riley & Chapman, 1958; Sears, 1976; Koo *et al.*, 2017).

1. Le locus *Ph1*

Le premier locus génétique identifié responsable de la stabilisation méiotique chez le blé tendre est le locus *Ph1* (*Pairing homoeologous 1*) qui favorise la recombinaison entre chromosomes homologues par rapport aux homéologues (Riley & Chapman, 1958; Sears, 1976; Dhaliwal *et al.*, 1977; Holm & Wang, 1988; Luo *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1999; Al-Kaff *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2014). Ce locus est situé sur le bras long du chromosome 5B (Sears, 1976). Le séquençage et l'analyse de clones BAC (Bacterial Artificial Chromosome) de blé porteur de la délétion du chromosome 5B (délétion d'une taille de 59,3 Mb, incluant environ

1187 gènes) ainsi que l'étude de la méiose chez des hybrides blé-seigle ont permis une caractérisation moléculaire du locus *Ph1* (Roberts *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2006; Al-Kaff *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2018).

En début de méiose, le locus *Ph1* promeut la formation de synapse entre chromosomes homologues (Martín *et al.*, 2014). Chez le blé, pendant l'interphase, les chromosomes adoptent une configuration dite de Rabl où les centromères et les télomères sont attachés à l'enveloppe nucléaire permettant de réduire l'enchevêtrement topologique des chromosomes (Pernickova *et al.*, 2019). Cette disposition périphérique des centromères et des télomères aide les chromosomes à trouver leur partenaire homologue pour s'apparier, synapser et recombiner ensemble (Pernickova *et al.*, 2019). Pendant l'interphase, *Ph1* joue un rôle important dans l'association des centromères homologues en régulant le remodelage des régions hétérochromatiques (Martinez *et al.*, 2001; Martinez-Perez *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2012; Mainiero & Pawlowski, 2014). En effet, en l'absence de *Ph1*, l'hétérochromatine est plus décondensée, favorisant des associations anormales entre régions répétitives de chromosomes homéologues (Martinez-Perez *et al.*, 2001; Martinez-Perez *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2012; Mainiero & Pawlowski, 2014). D'ailleurs, la présence du locus *Ph1* retarde l'appariement des télomères (bouquet de télomères), suggérant un intervalle temporel plus important pour que les chromosomes « vérifient » l'appariement correct entre homologues (Richards *et al.*, 2012). Au stade du bouquet de télomères, seules les synapses entre chromosomes homologues peuvent se former (Martín *et al.*, 2017).

Après la dispersion du bouquet de télomères, en absence de *Ph1* dans les méiocytes de blé et d'hybrides blé-seigle (composés de deux ensembles haploïdes de deux espèces différentes qui montrent un taux très faible de recombinaison dans un contexte sauvage : ABDR), des synapses non spécifiques entre chromosomes homéologues peuvent se produire. En présence de *Ph1*, la synapse ne se produit qu'entre chromosomes homologues chez le blé (Martín *et al.*, 2014, 2017, 2018). Les lignées ne contenant pas *Ph1* montrent une diminution du nombre de bivalents en forme d'anneau avec 2 CO et une augmentation du nombre de bivalents en forme de bâton avec un seul CO dans tous les méiocytes (Martín *et al.*, 2014). De plus, 56% des méiocytes des lignées *ph1* présentent des irrégularités méiotiques, avec une faible présence d'univalents (0,8 en moyenne par méiocyte) et de multivalents entre chromosomes homéologues en métaphase I (0,2 trivalents et 0,37 tétravalents en moyenne par méiocyte) (Martín *et al.*, 2014).

Il a donc été proposé que *Ph1* favorise la formation de synapses entre chromosomes homologues plutôt que d'inhiber les synapses entre chromosomes homéologues (Soares *et al.*,

2021). L'influence de *Phl* sur la formation de la synapse pourrait être liée à un changement de la structure de la chromatine par l'action d'un complexe de gènes de type CDK2 et de méthyltransférase, incluant notamment 4 cyclines connues pour affecter la condensation de la chromatine (Griffiths *et al.*, 2006; Greer *et al.*, 2012; Rey *et al.*, 2017). En effet, une altération de la phosphorylation de l'histone H1 dépendante de la kinase CDK2 pourrait affecter la structure chromatinienne, retarder la réplication préméiotique et favoriser les synapses homéologues au détriment des synapses homologues (Alexandrow & Hamlin, 2005; Krasinska *et al.*, 2008; Viera *et al.*, 2009; Greer *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2017; Rey *et al.*, 2017). Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants des homologues de type Ph1CDK2 présentent une synapse réduite (Zheng *et al.*, 2014). Une analyse protéomique a montré que la délétion de *Phl* entraîne une phosphorylation de type CDK2 pendant la méiose (Greer *et al.*, 2012). De plus, un traitement à l'acide okadaïque, un inhibiteur de la phosphatase, augmente la phosphorylation de type CDK2 et phénocopie les effets du mutant *phl* avec une augmentation des associations chromosomiques (Knight *et al.*, 2010).

Un autre effet de *Phl* se produisant plus tard dans la prophase I affecte la fréquence de formation des CO et la progression des sites MLH1 vers leur résolution en CO (Martín *et al.*, 2014). Pour rappel, la protéine MLH1 est nécessaire pour résoudre les jonctions de Holliday en crossing-over de classe I (Mézard *et al.*, 2007). Une immunolocalisation a révélé un nombre similaire de sites MLH1 dans les hybrides blé-seigle en présence et en absence de *Phl* (Martín *et al.*, 2014). Cependant, en absence de *Phl*, environ un tiers des sites MLH1 sont résolus en CO, alors qu'avec *Phl*, seulement environ 0,03 des sites MLH1 deviennent des chiasmata (Martín *et al.*, 2014). Ainsi, ces données montrent que *Phl* joue un rôle dans la résolution des doubles jonctions de Holliday en inhibant la progression des sites MLH1 homéologues en CO (Martín *et al.*, 2014).

Conformément à ces observations, des études montrent chez la souris que MLH1 s'associerait avec la kinase CDK2 sur la double jonction de Holliday et chez *C. elegans*, l'activité CDK serait nécessaire pour résoudre la jonction en CO (Ashley *et al.*, 2001; Yokoo *et al.*, 2012).

Alors que ce locus a été intensivement étudié pendant plusieurs décennies, sa complexité et son mode d'action moléculaire n'a été découvert qu'en partie récemment.

Dans les deux prochaines sous-parties a. et b., je décrirai les études ayant permis d'identifier deux régulateurs géniques importants associés au locus *Phl* : *ZIP4-B2* et *ASY1*.

a. Le gène *ZIP4*

En plus d'un groupe de gènes de type CDK2 et de méthyltransférase, le locus *Ph1* contient également un segment dupliqué d'hétérochromatine du chromosome 3B (Griffiths *et al.*, 2006). Ce segment d'hétérochromatine contient une nouvelle copie dominante *TaZIP4-B2* (la plus exprimée), une protéine du groupe ZMM (Griffiths *et al.*, 2006; Al-Kaff *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2017, 2021; Rey *et al.*, 2017). Ainsi, le blé allohexaploïde possède 4 gènes *ZIP4*, sur les chromosomes 3A, 3B, 3D et 5B qui correspond à *ZIP4-B2*, dupliqué et divergent (Martín *et al.*, 2021).

Chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz, *ZIP4* joue un rôle important dans la formation des CO de classe I entre chromosomes homologues mais pas dans la formation de la synapsis contrairement à *Ph1* (Chelysheva *et al.*, 2007; Lynn *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2012). Le mutant *zip4* chez *Arabidopsis thaliana* montre une réduction drastique du nombre de CO homologues, une ségrégation aléatoire des chromosomes en anaphase I et une stérilité. Cependant, chez la levure *S. cerevisiae*, *ZIP4* est nécessaire pour la formation de la synapse et pour la formation des CO (Tsubouchi *et al.*, 2006; Lynn *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2019).

Les hybrides issus d'une hybridation entre une espèce sauvage apparentée *Aegilops variabilis* (tétraploïde UUSS) et les mutants de blé (AABBDD) *TaZIP4-B2* TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes), *TaZIP4-B2* CRISPR ou le mutant de délétion *ph1b* montrent des niveaux de CO entre chromosomes homéologues similaires (Rey *et al.*, 2018). Par ailleurs, le mutant *Tazip4-B2* de blé seul montre une légère réduction de la recombinaison homologue avec une diminution du nombre de bivalents en forme d'anneau et une augmentation du nombre de bivalents en forme de bâtons et aucun multivalent (différence non significative entre le mutant et le sauvage) (Rey *et al.*, 2017). De plus, une étude récente montre que le mutant CRISPR *TaZIP4-B2* présente 56% de méiocytes avec des anomalies méiotiques en métaphase I (univalents et multivalents), 50% de tétrades avec des micronoyaux, une taille réduite de 48% des grains de pollen et une réduction d'environ 50% du nombre de grains de pollen (Alabdullah *et al.*, 2021). Par conséquent, ces résultats montrent qu'une quantité appropriée du gène *ZIP4* est nécessaire pour influencer la recombinaison vers le chromosome homologue en dépit de l'homéologue (Rey *et al.*, 2017).

De plus, une étude sur le blé dur allotétraploïde (AABB) a renforcé l'idée que le gène *ZIP4-B2* joue un rôle important dans la formation de la synapse (Draeger *et al.*, 2023). En effet, chez les plantes tétraploïdes déficientes dans les trois gènes *ZIP4*, des défauts de synapses sont observés ce qui est cohérent avec les données du blé allohexaploïde (Draeger *et al.*, 2023).

Ainsi, *TaZIP4-B2* semble être un régulateur clé responsable de la promotion de l'appariement entre chromosomes homologues, la formation des CO homologues et de la suppression des CO entre chromosomes homéologues (Blasio *et al.*, 2022). Cet allèle de *ZIP4* pourrait avoir subi une néo-fonctionnalisation et développé une plus grande sensibilité quant à la détection des polymorphismes (Bomblies, 2023).

b. Le gène *ASY1*

Une étude récente a identifié un autre régulateur de la recombinaison homologue chez le blé, un composant de l'axe chromosomique, le gène *ASY1* séparé de 33,5 Mb d'ADN du gène *ZIP4-5B* (Dio *et al.*, 2023). En effet, les mutants *asy1* TILLING de blés tétraploïdes présentent un retard de la progression méiotique pour les mutants hypomorphes et un arrêt pour les mutants *asy1* nuls (Dio *et al.*, 2023). De plus, en métaphase I, l'analyse des bivalents a mis en évidence une réduction des CO de manière dose-dépendante et la formation de multivalents en absence d'*ASY1* chez le blé tétraploïde (Dio *et al.*, 2023). De même, chez les mutants *asy1* de blés hexaploïdes, une réduction du nombre de CO et la présence de multivalents sont observées (Dio *et al.*, 2023). Concernant l'analyse de la recombinaison homéologue, les hybrides issus de croisement entre des mutants de blé tétraploïdes *asy1* avec *A. variabilis* montrent une augmentation du nombre de CO homéologue en métaphase I par rapport au croisement entre du blé sauvage et *A. variabilis* (Dio *et al.*, 2023).

De plus, les mutants avec une seule copie fonctionnelle de *ASY1* (mutants Aabb et aabB) présentent une réduction du nombre total de chiasmata avec une diminution des chiasmas proximaux et interstitiels et une augmentation des chiasmas distaux suggérant qu'*ASY1* favorise la formation des chiasmas loin des extrémités des chromosomes (Dio *et al.*, 2023).

Ainsi, ces données suggèrent que *ASY1* joue un rôle majeur dans la reconnaissance des chromosomes et favorise la recombinaison homologue tout en supprimant la recombinaison homéologue (Dio *et al.*, 2023).

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour approfondir la compréhension de l'influence du locus *Ph1* sur la progression méiotique chez le blé allohexaploïde, en se concentrant notamment sur la caractérisation des mécanismes moléculaires impliquant les protéines *ZIP4* et *ASY1*.

2. Le locus *Ph2*

Un autre locus *Ph* identifié est le locus *Ph2* situé sur le bras court du chromosome 3D (Mello-Sampayo, 1971; Soares *et al.*, 2021). Ce locus a également un effet sur la méiose bien que plus faible que celui du locus *Ph1* sur l'appariement des chromosomes du blé (Mello-Sampayo, 1971; Driscoll, 1972; Prieto *et al.*, 2005). En effet, Mello-Sampayo, 1971 note la formation de multivalents en l'absence du chromosome 3D dans des hybrides pentaploïdes entre le blé *T. aestivum* et le blé *T. durum* ainsi que dans les hybrides *T. aestivum* et *Aegilops* (Svačina *et al.*, 2020a). Deux mutants *ph2* ont ensuite été créés : un mutant *ph2a* avec une délétion substantielle générée avec des rayons X et un mutant *ph2b* chimique EMS (Wall *et al.*, 1971; Sears & E., 1982). L'étude de ces mutants a permis d'estimer à 80 Mb sur la partie terminale du bras court du chromosome 3D grâce à la synténie dans les régions de blé et de riz analysées (Sutton *et al.*, 2003). Cependant, l'étude de Svačina *et al.*, 2019 a montré que la délétion était plus grande dans le mutant *ph2a* : environ 125 Mb au lieu de 80 Mb sur la partie terminale du bras court du chromosome 3D. Aucune influence de mutation de *Ph2* sur la recombinaison homéologue n'a été décrite chez le blé hexaploïde, hormis une faible augmentation de la présence d'univalents (Martinez *et al.*, 2001; Sánchez-Morán *et al.*, 2001). De plus, les études anciennes de Sears ont montré chez des hybrides de blé et d'espèces étroitement apparentées, un nombre faible de chiasmata homéologues en l'absence de *Ph2* et en présence de *Ph1* (Sears & E., 1977, 1982). D'ailleurs, l'analyse cytologique des hybrides blé-seigle montre en absence de *Ph2* un nombre intermédiaire de chiasmata homéologues (par rapport aux hybrides blé mutant *ph1*-seigle) mais la majorité des associations chromosomiques se produisent entre les chromosomes du blé alors que les associations chromosomiques blé-seigle sont peu fréquentes (Prieto *et al.*, 2005). Ces données contrastent avec ce qui est connu en absence du locus *Ph1* où il est observé une augmentation de la fréquence d'associations chromosomiques blé-seigle (Prieto *et al.*, 2005).

Le mutant *ph2a* a été analysé plus dans le détail pour essayer d'identifier les gènes candidats responsables du phénotype observé chez le mutant *ph2* (Sutton *et al.*, 2003). Parmi ces gènes, on retrouve *TaMSH7*, l'homologue du gène *MSH6* impliquée dans la voie de réparation des mésappariements d'ADN et les membres de la famille de gènes WM1, WM3 et WM5 (Ji & Langridge, 1994; Dong *et al.*, 2002, 2005; Lloyd *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2021).

a. Le gène *MSH7-3D*

Le gène causal du locus *Ph2* est *MSH7-3D* (Serra *et al.*, 2021). Comme décrit précédemment, la protéine MSH7 est une protéine de reconnaissance des mésappariements spécifiques des plantes qui serait apparue par une ancienne duplication du gène *MSH6* au début de l'évolution des plantes (Hays, 1997; Culligan *et al.*, 2000). La protéine MSH7 est active en méiose et forme un complexe avec la protéine MSH2. Le croisement entre un mutant chimique EMS de blé hexaploïde *msh7* et *A. variabilis* montre une multiplication par 5 de la recombinaison homéologue qui est associée à une réduction de la recombinaison homologue (Serra *et al.*, 2021). Ces données suggèrent que MSH7 pourrait contribuer à stabiliser la méiose du blé tendre probablement en déstabilisant les intermédiaires de recombinaison établis entre les chromosomes homéologues (présentant des mésappariements du fait de leur divergence) et faciliterait ainsi le choix du partenaire de recombinaison (chromosomes homologues *vs* homéologues) (Serra *et al.*, 2021).

Ainsi, les protéines ZIP4, ASY1 et MSH7 pourraient fonctionner de manière séquentielle avec des modes d'actions distincts impliquant une régulation à plusieurs niveaux de la recombinaison homéologue chez le blé.

3. Le locus *Ph3*

Un autre locus impliqué dans la régulation de la recombinaison homéologue chez le blé tendre a également été défini, le locus *Ph3* situé sur le bras court du chromosome 3A (Driscoll, 1972; Svačina *et al.*, 2020a). L'absence de *Ph3* induit des effets similaires mais moins marqués que ceux observés pour le locus *Ph2* (Driscoll, 1972; Svačina *et al.*, 2020a). Ces deux loci sont situés sur les mêmes chromosomes de génomes parentaux différents suggérant une paralogie entre ces deux loci (Driscoll, 1972; Svačina *et al.*, 2020a). À ce jour, aucun gène causal n'a été identifié, mais il est supposé que le gène *MSH7-3A* pourrait jouer ce rôle.

iii. Les régulateurs de la recombinaison méiotique chez *Brassica napus*

Comme mentionné précédemment, la plante allopolyploïde *Brassica napus* est issue de l'hybridation entre deux espèces diploïdes probablement réalisée par l'homme car aucune population sauvage de *Brassica napus* n'est, à ce jour, connue (Bomblies, 2023). Comme chez le blé, il existe des loci génétiques supprimant la recombinaison homéologue chez *B. napus* méiotiquement stable (Jenczewski *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Cifuentes *et al.*, 2010a;

Grandont *et al.*, 2014; Higgins *et al.*, 2021). Cependant, les gènes impliqués dans l'inhibition de la recombinaison homéologues n'ont pas encore été identifiés, à l'exception du gène *MSH4*.

1. Le locus *PrBn*

Le locus majeur de contrôle de la recombinaison homéologue en méiose chez *B. napus* est le QTL (Quantitative Trait Locus) *PrBn* (*Pairing Regulator in B. Napus*) localisé sur le chromosome C9 (Jenczewski *et al.*, 2003; Jenczewski & Alix, 2004; Cifuentes *et al.*, 2010b). Ce locus a été mis en évidence par l'analyse de la descendance haploïde (AC) d'un hybride produit par croisement entre deux variétés diploïdes de colza : l'une des variétés présentait un taux faible (*Yudal*) et l'autre un taux élevé « d'appariement » entre chromosomes homéologues A et C (*Darmor-bzh*) (Jenczewski *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). En 2013, Jenczewski *et al.*, 2013 ont montré que la distribution du nombre d'univalents parmi des haploïdes suit une ségrégation d'un gène biallélique, *PrBn*, sur fond de variation polygénique. L'étude de Liu *et al.*, 2006 sur des haploïdes de colza a révélé que le locus *PrBn* présente une expression variable ou une pénétrance incomplète, avec des interactions épistatiques avec d'autres loci. De plus, cette étude a permis d'identifier 3 à 6 QTL mineurs ayant un faible effet additif sur la recombinaison homéologue, sans interaction avec *PrBn*. Ainsi, chez les haploïdes de colza, le système de contrôle de la recombinaison homéologue est polygénique et fonctionne de manière complexe. L'étude de Nicolas *et al.*, 2009 montre que le locus *PrBn* et les gènes avec lesquels il interagit contrôlent la fréquence des CO entre chromosomes homéologues des haploïdes de *B. napus* (*Yudal* et *Darmor-bzh*) et entre les homologues de plantes triploïdes ArAnC (Ar : *B. rapa*, An : *B. napus* *Yudal* et *Darmor-bzh*) mais pas leur distribution. Cependant, aucun effet n'a été observé sur le taux de CO dans les plantes tétraploïdes AACCC suggérant que l'effet de *PrBn* dépend du caryotype de fond (Nicolas *et al.*, 2009). Ainsi, il pourrait exister un effet de dosage de *PrBn* sur le génome C de *B. napus* (Soares *et al.*, 2021).

De plus, il est connu que des changements dépendants du génotype dans la progression méiotique sont plus fréquents chez les haploïdes et les triploïdes que chez les tétraploïdes puisqu'il y a plus de chromosomes qui restent non appariés (Soares *et al.*, 2021). D'ailleurs, toutes les plantes *B. napus* allotétraploïdes présentent un comportement méiotique de type diploïde peu importe le génotype au locus *PrBn* (Jenczewski *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2009).

2. Le locus *BnaPh1*

Trois autres QTL contribuant au contrôle de la recombinaison homéologue ont été mis en évidence en étudiant une population issue du croisement entre une lignée de *B. napus* resynthétisée (qui présentaient une fréquence élevée d'associations entre chromosomes homéologues et ne contient pas les gènes/allèles sélectionnés au cours de l'évolution) et des lignées *B. napus* établies (qui contiennent les gènes/allèles sélectionnés pour stabiliser la méiose) (Higgins *et al.*, 2021). L'un de ces QTL est *BnaPh1* (*B. napus Pairing homeologous 1*) qui se situe sur le chromosome A9 dans une région homéologue de celle contenant *PrBn* suggérant que ces deux loci pourraient être deux allèles homéologues distincts jouant le même rôle dans deux fonds génétiques différents (Higgins *et al.*, 2021). Tout comme *PrBn*, le locus *BnaPh1* contient également RPA1C, protéine intervenant lors de la réparation des cassures double-brin et MUS81, endonucléase impliquée dans la formation des CO de classe II (Higgins *et al.*, 2021; Blasio *et al.*, 2022). Cependant, leur validation fonctionnelle n'a pas encore été réalisée.

Les deux autres QTL identifiés par Higgins *et al.*, 2021 sont de taille plus réduite, avec l'un localisé sur le chromosome A3 et l'autre sur une région homologue au chromosome C7, abritant respectivement quatre et trois gènes méiotiques. Parmi ces gènes méiotiques, on trouve *MSH3*, qui tout comme *MSH7* chez le blé, appartient à la famille des protéines de reconnaissance des mésappariements (Higgins *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2021).

3. Le gène *MSH4*

L'étude de Gonzalo *et al.*, 2019 a mis en évidence que la réduction du nombre de copies fonctionnelles de *MSH4* empêche la formation de CO entre chromosomes homéologues chez *Brassica napus*. En réduisant *MSH4* à une seule copie fonctionnelle dans les allohaploïdes de *B. napus*, une réduction de la recombinaison entre chromosomes homéologues est observée (Gonzalo *et al.*, 2019). Cependant, en raison de leur faible fréquence, la formation de CO homéologues n'a pas pu être analysée dans les allotétraploïdes de *B. napus*. De plus, l'étude a montré que le taux de CO homologues n'était pas affecté par la perte de duplication du gène *MSH4* (sans élimination) dans les allotétraploïdes de *B. napus* (Gonzalo *et al.*, 2019).

On ne sait pas si *MSH4* affecte l'appariement ou la recombinaison entre chromosomes homéologues. Cependant, les mutants *msh4* de levure présentent un espacement entre chromosomes environ deux fois plus grand que chez le sauvage ce qui suggère que *MSH4*

contribuerait à la formation et/ou au maintien, de l'appariement entre chromosomes homologues (Storlazzi *et al.*, 2010).

Ainsi, ce travail suggère que la stabilisation de la méiose allopolyploïde peut être renforcée par la réduction de copies d'un gène important de la recombinaison méiotique.

D'ailleurs, après la duplication du génome entier, chez de nombreuses espèces il est observé une réduction rapide du nombre de copies de gènes ZMM notamment *MSH4*, *MSH5*, *MER3* et *ZIP4*. Cela soutient l'hypothèse selon laquelle réduire le nombre de copies fonctionnelles de ces gènes pourrait offrir un avantage sélectif dans la stabilisation de la méiose chez les espèces allopolyploïdes (Lloyd *et al.*, 2014; Gonzalo *et al.*, 2019).

4. D'autres gènes candidats

L'étude de Gaebelain *et al.*, 2019 a révélé que chez *B. napus* nouvellement synthétisé, des gènes stabilisateurs de la méiose sont hérités par la variation de ségrégation des parents diploïdes. En effet, cette étude a permis d'identifier sept régions génomiques associées à des effets quantitatifs sur la stabilité méiotique et la fertilité. Parmi ces sept régions, cinq contiennent des gènes de méiose, totalisant 14 gènes candidats dont 10 contiennent des polymorphismes dans leur séquence protéique distincts des parents diploïdes (Gaebelain *et al.*, 2019). Cependant, aucun de ces gènes n'a encore fait l'objet d'études fonctionnelles, bien que l'exploration de certains d'entre eux pourrait être captivante, notamment celle de la recombinase RAD51, des composants de cohésine SCC2 et SMC1 et de la protéine de réparation des mésappariements MSH2 (Gaebelain *et al.*, 2019).

IV. *Arabidopsis suecica* : une plante modèle pour étudier l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie

Arabidopsis suecica est une espèce modèle particulièrement intéressante pour comprendre comment les allopolyploïdes nouvellement formés réagissent et s'adaptent aux changements associés à la polypléidisation. Cette espèce est spécifiquement appropriée pour explorer les défis méiotiques liés à l'allopolyploïdisation.

1) Origine

Arabidopsis suecica ($2n = 4x = 26$) est un allotétraploïde récent formé par l'hybridation de *Arabidopsis thaliana* ($2n = 2x = 10$) et de *Arabidopsis arenosa* ($2n = 2x (4x) = 16 (32)$) il y a environ 16 000 ans (O'Kane *et al.*, 1996; Novikova *et al.*, 2017). Le séquençage d'organelles

d'*A. suecica* soutient qu'*Arabidopsis thaliana* serait le parent maternel (Jakobsson *et al.*, 2006). Ceci est confirmé au laboratoire par les croisements entre *A. thaliana* et *A. arenosa* qui ne fonctionnent que lorsque *A. thaliana* est le parent maternel (Comai *et al.*, 2000). Ainsi, *A. arenosa* est le parent paternel, hautement hétérozygote, présent naturellement dans des populations diploïdes et tétraploïdes en Europe (Comai *et al.*, 2000; Schmickl *et al.*, 2012; Monnahan *et al.*, 2019).

On pense que l'origine d'*A. suecica* réside dans la fécondation d'un ovule non réduit d'*A. thaliana* diploïde par un pollen diploïde provenant d'une plante diploïde ou tétraploïde d'*A. arenosa* après le dernier maximum glaciaire en Europe de l'Est ou en Eurasie centrale (Novikova *et al.*, 2017; Nibau *et al.*, 2022)

Cependant, l'origine d'*A. suecica* est aujourd'hui toujours sujet à discussion puisque récemment l'étude de Nibau *et al.*, 2022 a rapporté que le sous-génome d'*A. arenosa* d'*A. suecica* contient des variants diploïdes spécifiques des gènes méiotiques. De plus, l'étude de Leal *et al.*, 2023 indique, avec une nouvelle méthode de reconstruction phylogénétique (basée sur l'analyse de séquences exoniques), que le génome d'*A. suecica* est associé à 21% avec *A. arenosa* tétraploïde et à 15% avec *A. arenosa* diploïde. Ainsi, on ne peut pas omettre l'hypothèse selon laquelle *A. suecica* se serait formée, dans un premier temps, l'hybridation entre deux espèces diploïdes d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa* formant un hybride diploïde, suivie, dans un second temps, par une duplication de l'ensemble du génome pour créer l'espèce allotétraploïde *Arabidopsis suecica* (Robin Burns, communication personnelle).

De plus, il a été confirmé qu'*A. suecica* est issue de croisements indépendants puisque le séquençage de 15 accessions actuelles montre un polymorphisme génétique partagé avec les espèces ancestrales d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa* (Novikova *et al.*, 2017; Burns *et al.*, 2021).

Arabidopsis suecica est une plante autofertile et féconde comportant 13 paires de chromosomes : cinq provenant initialement d'*A. thaliana* et huit d'*A. arenosa*. Les espèces ancestrales ont divergé il y a environ 6 millions d'années (Hohmann *et al.*, 2015) et le séquençage récent du génome d'*A. suecica* a révélé que la diversité des séquences entre ses deux sous-génomes est de 11,6 % (Burns *et al.*, 2021). Il est important de noter que le degré élevé de diversité génétique entre les sous-génomes d'*A. suecica* n'est pas suffisant pour garantir un appariement homologue approprié et supprimer la recombinaison entre les chromosomes homéologues (Henry *et al.*, 2014).

2) Les challenges liés à la polyploïdisation

Chez *Arabidopsis suecica*, il n'a pas été observé de preuve majeure d'un choc génomique après la polyploïdisation comme des altérations structurelles et fonctionnelles malgré le fait qu'une faible proportion de réarrangements issus d'échanges homéologues continuent de s'accumuler tout au long de son évolution (Burns *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021). En effet, le génome d'*A. suecica* présente des sous-génomes distincts qui sont colinéaires aux génomes des espèces ancestrales et environ 93% du génome de référence d'*A. suecica* est synténique avec les génomes ancestraux (Burns *et al.*, 2021). De plus, aucune dominance d'un sous-génome en particulier n'a été décrite et la stabilité semble être maintenue dans la dynamique des éléments transposables (Burns *et al.*, 2021).

Cependant, il a été retrouvé des changements d'expression génique qui suggèrent une adaptation graduelle à la polyploïdie (Burns *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021). En effet, deux études ont comparé les changements épigénétiques et d'expression génique dans les tissus foliaires d'*A. suecica* néosynthétisées et évoluées (Burns *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021). Chez les plantes d'*A. suecica* évoluées, les gènes hypo-méthylés sont associés à une régulation positive de l'expression de gènes associés à la reproduction et à la méiose comme *PDS5* et *SMC6B* (appartenant au complexe SMC5/6) tandis que ces gènes sont plus méthylés dans des plantes néosynthétisées (Jiang *et al.*, 2021). De plus, dans les tissus foliaires d'*Arabidopsis suecica*, le sous-génome d'*A. thaliana* montre une régulation positive des gènes liés à la méiose et le sous-génome d'*A. arenosa* présente une régulation positive des gènes impliqués dans des processus cytonucléaires qui peut être dûe à une sélection du sous-génome d'*A. arenosa* pour rétablir la communication avec les organelles héritées d'*A. thaliana* (Burns *et al.*, 2021). Ces changements ne sont pas observés dans des lignées néosynthétisées d'*A. suecica* suggérant une adaptation progressive à la polyploïdie (Burns *et al.*, 2021).

Concernant la méiose, chez la plante *Arabidopsis suecica* évoluée, aucune association entre chromosomes homéologues n'a été observée (Comai *et al.*, 2003; Nibau *et al.*, 2022). Au contraire, le complexe synaptonémal se forme de manière ordonnée sans formation de multivalents synaptiques et la stabilité méiotique est caractérisée par la formation des bivalents homologues en métaphase I (Comai *et al.*, 2003; Nibau *et al.*, 2022). Cependant, quelques anomalies méiotiques sont observées à très faible fréquence (Nibau *et al.*, 2022).

Contrairement à la plante *A. suecica* évoluée, les plantes d'*A. suecica* néosynthétisées présentent des associations entre chromosomes homéologues ce qui entraînent une mauvaise

ségrégation des chromosomes en anaphase I, une viabilité pollinique réduite et la formation d'espèces aneuploïdes (Pontes *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2014).

3) Le locus *BYS*

Chez *Arabidopsis suecica*, des hybrides F2 issus du croisement entre des plantes *A. suecica* naturelle et synthétique ont été cartographié génétiquement permettant d'identifier un nouveau QTL situé sur le chromosome 9 d'*A. suecica* (chromosome 4 du sous-génome d'*A. arenosa*), le locus *BYS* (*Boy Named Sue*), associé à une amélioration de la stabilité méiotique et de la viabilité pollinique (Henry *et al.*, 2014). Ce locus explique environ 10% l'augmentation de la stabilité méiotique et de la viabilité du pollen, en supprimant les échanges entre chromosomes homéologues (Henry *et al.*, 2014). Cependant, à ce jour, aucun mécanisme ou gène candidat n'a été identifié.

D'autres études comparatives de la stabilité méiotique d'*A. suecica* évoluée et de l'instabilité méiotique des plantes d'*A. suecica* néosynthétisées sont donc nécessaire pour intensifier la compréhension des mécanismes moléculaires permettant l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie.

V. Les objectifs de la thèse

L'allopolyploïdie est une force majeure de l'évolution et de la spéciation des plantes. La ségrégation chromosomique au cours de la méiose des plantes allopolyploïdes est un processus difficile en raison de la présence de chromosomes apparentés mais non identiques (homéologues) hérités des espèces progénitrices.

Dans les allopolyploïdes nouvellement formés, la recombinaison méiotique entre chromosomes homéologues entraîne des erreurs de ségrégation chromosomique, de l'aneuploïdie et une réduction de la fertilité qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur la génération suivante. Les allopolyploïdes évolués/établis, quant à eux, sont très fertiles et se comportent comme de vrais diploïdes pendant la méiose avec une promotion de la formation de crossing-overs entre chromosomes homologues et une inhibition de la formation de crossing-overs entre chromosomes homéologues.

Les allopolyploïdes nouvellement synthétisés sont donc soumis à une forte sélection pour limiter ou éviter la formation de crossing-overs entre chromosomes homéologues. Bien

que ce sujet suscite un grand intérêt, il reste encore beaucoup à découvrir sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la stabilisation de la méiose après l'allopolyploïdisation.

L'objectif de ma thèse était d'apporter de nouveaux éléments pour comprendre quels sont les mécanismes moléculaires qui ont été mis en place au cours de l'évolution pour contrôler la recombinaison entre chromosomes homéologues chez la plante modèle allopolyploïde *Arabidopsis suecica*.

Pour ce faire, j'ai reproduit l'hybridation interspécifique entre *Arabidopsis thaliana* (parent femelle) et *Arabidopsis arenosa* (parent mâle) conduisant à la formation de l'allotétraploïde *Arabidopsis suecica*.

Mes travaux de recherche sur l'étude de l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie ont été partagés en deux objectifs principaux. Le premier était d'analyser l'évolution de la stabilité méiotique dans les premières générations après l'allopolyploïdisation de la plante *Arabidopsis suecica*, étant donné que cette stabilisation se produit rapidement au cours des générations chez cette espèce. Le deuxième objectif consistait à identifier le ou les régulateur(s) de l'inhibition de la recombinaison homéologue ou plus largement, de la stabilisation de la recombinaison méiotique.

Néanmoins, aucune comparaison entre des plantes néosynthétisées d'*A. suecica* de première génération et des plantes d'*A. suecica* évoluées n'avait encore été réalisée. Au début de ma thèse, j'ai donc réalisé des analyses de la fertilité, du comportement méiotique des chromosomes et du niveau de recombinaison homéologue chez des plantes *A. suecica* néosynthétisées et évoluées. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *New Phytologist* qui sera présentée dans le **CHAPITRE 2**.

Je me suis ensuite concentrée sur l'étude de l'évolution de la stabilité de la méiose sur les premières générations de plantes néosynthétisées d'*A. suecica*. Pour ce faire, j'ai analysé l'évolution de la fertilité et du comportement méiotique de 7 lignées néosynthétisées différentes sur quatre générations successives. Ces données seront expliquées dans le **CHAPITRE 3**.

En parallèle, j'ai réalisé une étude sans *a priori* pour essayer d'identifier des gènes candidats ayant un rôle dans la régulation de la recombinaison homéologue chez *A. suecica*. Pour ce faire, j'ai comparé le transcriptome de plantes néosynthétisées d'*A. suecica* de première génération avec les plantes d'*A. suecica* évoluées. Les résultats de cette étude seront dévoilés dans le **CHAPITRE 4**.

En plus de ces analyses, j'ai créé des mutants des protéines MSH qui, comme suggéré par l'étude qui a été réalisée chez le blé allohexaploïde, pourrait avoir un rôle dans la stabilisation méiotique des allopolyploïdes (Serra *et al.*, 2021). Ainsi, j'ai initié la création de

mutants *msh3*, *msh6* et généré des mutants *msh7* d'*A. suecica*. Je présenterai dans ce manuscrit, les données préliminaires de la caractérisation des mutants *msh7* d'*A. suecica* dans le **CHAPITRE 5**.

CHAPITRE 2 : Quand les deux sous-génomes d'*Arabidopsis suecica* se rencontrent pour la première fois ...

I. Introduction, Matériel et méthodes, Résultats et Discussion :

Incorrect recombination partner associations contribute to meiotic instability of neo-allopolyploid *Arabidopsis suecica*

Incorrect recombination partner associations contribute to meiotic instability of neo-allopolyploid *Arabidopsis suecica*

Floriane Chéron¹ , Valentine Petiot¹ , Christophe Lambing² , Charles White¹  and Heidi Serra¹ 

¹Genetics, Reproduction and Development Institute (iGRD), CNRS UMR 6293, Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, 63000, Clermont-Ferrand, France; ²Plant Science Department, Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, UK

Author for correspondence:
Heidi Serra
Email: heidi.serra@uca.fr

Received: 21 November 2023
Accepted: 29 November 2023

New Phytologist (2023)
doi: 10.1111/nph.19487

Key words: allopolyploid, *Arabidopsis suecica*, crossover, homoeologous chromosomes, meiosis, pairing, polyploidy, recombination.

Summary

- Combining two or more related homoeologous genomes in a single nucleus, newly formed allopolyploids must rapidly adapt meiosis to restore balanced chromosome segregation, production of euploid gametes and fertility. The poor fertility of such neo-allopolyploids thus strongly selects for the limitation or avoidance of genetic crossover formation between homoeologous chromosomes.
- In this study, we have reproduced the interspecific hybridization between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis arenosa* leading to the allotetraploid *Arabidopsis suecica* and have characterized the first allopolyploid meioses.
- First-generation neo-allopolyploid siblings vary considerably in fertility, meiotic behavior and levels of homoeologous recombination. We show that centromere dynamics at early meiosis is altered in synthetic neo-allopolyploids compared with evolved *A. suecica*, with a significant increase in homoeologous centromere interactions at zygotene. At metaphase I, the presence of multivalents involving homoeologous chromosomes confirms that homoeologous recombination occurs in the first-generation synthetic allopolyploid plants and this is associated with a significant reduction in homologous recombination, compared to evolved *A. suecica*.
- Together, these data strongly suggest that the fidelity of recombination partner choice, likely during the DNA invasion step, is strongly impaired during the first meiosis of neo-allopolyploids and requires subsequent adaptation.

Introduction

Polyploidization or whole-genome duplication is one of the driving forces of both diversity and speciation. It has occurred in every eukaryotic kingdom and is particularly prevalent in the evolutionary history of plants, where it has largely contributed to genome evolution (Soltis *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2011; Van De Peer *et al.*, 2017). Numerous crops of major economic importance are polyploids as having multiple sets of chromosomes can be beneficial for plants. Gene duplication provides a bulwark against the impact of deleterious mutation, improves biomass, development, and fertility of polyploids compared with their progenitors and contributes to promote stress resilience (Comai, 2005; Udall & Wendel, 2006; Bomblies, 2020).

Polyploids can be classified according to their mode of origin. Autopolyploids arise within species and possess more than two homologous genomes, while allopolyploids have a hybrid origin and thus carry two or more sets of related but non-identical homoeologous chromosomes derived from different evolutionary lineages (Ramsey & Schemske, 2002). Depending on the progenitor genomes, the homoeologous chromosomes may differ in

number, genomic synteny and DNA sequence (Ramsey & Schemske, 2002; Soares *et al.*, 2021).

When they first arise, newly formed (neo-)allopolyploids face numerous challenges as polyploidization potentially leads to changes in genome structure and regulation, chromatin remodeling, epigenetic changes, and activation of transposable elements (Blasio *et al.*, 2022). A key problem is the restoration of faithful segregation of homologous and homoeologous chromosomes during meiosis, the specialized cell division that underlies gamete formation for sexual reproduction (Ramsey & Schemske, 2002; Comai, 2005; Grandont *et al.*, 2013; Lloyd & Bomblies, 2016). In neo-allopolyploids, related chromosomes can pair, synapse and recombine with multiple partners simultaneously, leading to the formation of complex chromosomal structures called multivalents. Persistence of multivalents and unpaired univalents at the first meiotic division results in unbalanced chromosome segregation and production of aneuploid gametes, severely reducing fertility of neo-allopolyploids (Ramsey & Schemske, 2002; Otto, 2007). These events also lead to genome disorganization in the offspring by homogenizing the two (or more) sub-genomes or eliminating the gene contribution of one parent

(Lloyd & Bomblies, 2016). Meiotic instabilities, such as frequent whole-chromosome aneuploidies and/or persistence of multivalents at metaphase I, have indeed been reported in neo-allohexaploid wheat (Zhang *et al.*, 2013) and neo-allotetraploid *Arabidopsis suecica* (Comai *et al.*, 2000, 2003). Resynthesized *Brassica napus* also show evidence for extensive homoeologous exchanges (Szadkowski *et al.*, 2010; Gaebelein *et al.*, 2019) as well as neo-allopolyploid rice (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Early-generation allopolyploids are thus under strong selection to overcome the challenges of controlling meiotic pairing and recombination (Henry *et al.*, 2014).

Established allopolyploids are highly fertile and behave like true diploids during meiosis with bivalents formed between homologous chromosomes and prevented between homoeologous chromosomes, as seen in the absence, or only rare occurrence of multivalents in meiosis (Ramsey & Schemske, 2002). Although the prevention of homoeologous recombination plays a crucial role in meiotic adaptation to allopolyploidization, understanding of the underlying molecular mechanisms remains limited and only a few regulators have been identified and studied.

Striking recent examples come from studies of allohexaploid bread wheat, in which it has been demonstrated that TaZIP4-B2 (*Ph1*, *Pairing homoeologous 1*) promotes early pairing between homologous chromosomes (to the detriment of homoeologous chromosomes) and later prevents recombination intermediates established between homoeologous chromosomes from becoming CO (Martín *et al.*, 2014, 2017, 2021; Rey *et al.*, 2017; Blasio *et al.*, 2022). Also in wheat, the plant-specific DNA mismatch repair protein TaMSH7-3D (*Ph2*, *Pairing homoeologous 2*) has recently been identified as an inhibitor of homoeologous recombination (Serra *et al.*, 2021). In *B. napus*, gene copy number of a member of the same family (MSH4) has been shown to affect homoeologous recombination frequency (Gonzalo *et al.*, 2019). The *PrBn* (*Pairing regulator in B. napus*) and *BnaA9* (*BnaPh1*, *B. napus Pairing homoeologous 1*) loci are also involved in inhibition of the formation of homoeologous crossovers but the causative genes remain unidentified to date (Jenczewski *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2021). In *A. suecica*, the *BYS* (*Boy named sue*) quantitative trait locus has been described as a potential suppressor of homoeologous recombination, but no candidate gene has yet been identified and the underlying mechanisms remain unknown (Henry *et al.*, 2014).

Arabidopsis suecica is a particularly interesting model species for studies of how newly formed allopolyploids respond and adapt to changes associated with polyploidization, including meiotic challenges. *Arabidopsis suecica* ($2n=4x=26$) is a recent allopolyploid formed through the hybridization of *Arabidopsis thaliana* ($2n=2x=10$) and *Arabidopsis arenosa* ($2n=2x(4x)=16(32)$) *c.* 16 thousand years ago (Novikova *et al.*, 2017). Its origin is believed to be in the fertilization of an unreduced ovule of diploid *A. thaliana* by a diploid pollen from a diploid or a tetraploid *A. arenosa* plant after the Last Glacial Maximum in Eastern Europe or central Eurasia (Novikova *et al.*, 2017; Nibau *et al.*, 2022). *Arabidopsis suecica* is a self-fertile and fecund plant with 13 chromosome pairs: five initially coming from *A. thaliana* and eight from *A. arenosa*. The ancestral species diverged

c. 6 million years ago (Hohmann *et al.*, 2015; Mandáková *et al.*, 2017) and recent sequencing of the *A. suecica* genome revealed that the sequence diversity between its two sub-genomes is *c.* 11.6% (Burns *et al.*, 2021). Importantly, the high degree of genetic diversity between *A. suecica* sub-genomes is not enough to ensure proper homologous pairing and suppress recombination between homoeologous chromosomes (Henry *et al.*, 2014).

Elucidating the evolutionary processes of meiotic stabilization of neo-allopolyploids requires characterization of both unevolved (neo) and evolved (natural, established) allopolyploid meiosis. In this work, we mimicked the speciation process of an allopolyploid species by synthesizing neo-allotetraploid *A. suecica* and analyzing the first allopolyploid meiosis (when the progenitor genomes first interact) in order to identify the challenges that neo-allopolyploids must overcome to survive. We show that early prophase I centromere dynamics is altered in neo-synthetic plants and that this is associated with both a reduction in homologous recombination and an increase in homoeologous recombination, suggesting alteration in recombination partner choice. Interestingly, our study highlights considerable variability in fertility and meiotic behavior between newly synthesized allopolyploid siblings.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The natural *Arabidopsis suecica* accession ASS3 (Burns *et al.*, 2021) used in this study were obtained from the laboratory of Magnus Nordborg (Gregor Mendel Institute, Germany). The first-generation neo-synthetic *A. suecica* were derived from a single cross between the natural autotetraploid *A. thaliana* Wa-1 (from the NASC, N22644) as female recipient and the natural autotetraploid *A. arenosa* Care-1 (from the ABRC, CS3901) as pollen donor. The other first-generation neo-synthetic *A. suecica* studied were the result of a single cross between an autotetraploid *A. thaliana* Ler (from the NASC, N3900) and the autotetraploid *A. arenosa* Care-1 (from the ABRC, CS3901).

Arabidopsis suecica plants were stratified at 4°C during a week and then grown under long-day conditions (16 h : 8 h, light : dark) at 23°C for 4 wk. The plants were then vernalized at 12°C for 4 wk and returned to 23°C to induce flowering.

Pollen viability test

Pollen viability was assessed using Alexander staining (Alexander, 1969). Briefly, anthers from unopen flower buds were collected and dissected on a slide with 10 µl of Alexander solution (1% Malachite green, 1% acid fuchsin, 1% orange G). Living (fertile) pollen grains are stained in purple while non-viable (sterile, aborted) pollen grains remain green. About 500 pollen grains per anther and four anthers from different inflorescences were analyzed per plant using a Zeiss AxioImager.Z1 epifluorescence microscope (Carl Zeiss AG) in bright-field illumination using a ×20 objective. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis test with PRISM v.9 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Meiotic chromosome spreads

Meiotic chromosome spreading was performed according to the method described by Ross *et al.* (1996). *Arabidopsis suecica* flower buds were fixed in 100% ethanol:acetic acid 3:1 (v/v) for 3 × 30 min and stored at −20°C until use. The flower buds were rehydrated 2 × 5 min in water and rinsed 2 × 5 min in 10 mM citrate buffer pH 4.5. Then, the buds were digested in an enzyme solution (0.3% (m/v) cellulase (Sigma), 0.3% (m/v) pectolyase (Sigma) and 0.3% (m/v) cytohelicase (Sigma) in citrate buffer) for 3 h at 37°C in a humid chamber. The enzyme solution was then replaced with citrate buffer to stop the reaction. Each bud was transferred to a clean slide, crushed and 20 µl of 60% acetic acid was added to the slide. The slide was incubated on a 45°C heating block for 1 min, taking care to stir the drop to allow the chromosomes to spread. Finally, the chromosomes were fixed by adding 200 µl of Carnoy solution to the slide. The slides were then rinsed 2 min with sterile water, incubated with 4% formaldehyde in 1 × PBS for 10 min and rinsed with sterile water for 5 min. After drying, the slides were mounted in VECTASHIELD medium containing 1.5 µg ml^{−1} DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Pollen mother cells at metaphase I stage were imaged on a Zeiss LSM 800 Airyscan microscope with ×60 objective and a Zeiss DAPI filter. For each cell, the number of univalents (unpaired chromosome), rod bivalents (pair of chromosomes linked by a unique chiasma), ring bivalents (pair of chromosomes linked by at least two chiasmata), trivalents (three chromosomes linked by two chiasmata) and quadrivalents (four chromosomes linked by three or four chiasmata) were counted independently by two people. Frequency of chiasmata (the cytological manifestation of meiotic crossovers) was then calculated according to the criterion described in Parra-Nunez *et al.* (2020). Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis test with the GRAPHPAD PRISM v.9 software.

Fluorescence *in situ* hybridization

The centromeric probes (containing copies of the 180 bp centromeric repeat) specific to each sub-genome, *A. arenosa* and *A. thaliana*, were prepared by amplifying respectively, the pGEMT-AaCEN with dUTP-DIG and pCW640 with dUTP-Cy3 using T7 and M13 primers.

Meiotic chromosome spreads were denatured for 30 min at 60°C and the slides were incubated with 100 µl of RNase (100 µg ml^{−1} in 2 × SSC) for 1 h at 37°C in a humid chamber. Pre-hybridization washes were twice 2 × SSC, once 1 × PBS, once 4% formaldehyde in 1 × PBS, twice 1 × PBS and once 70%, 90% and 100% ethanol dehydration series. Slides were incubated with 20 µl of the hybridization solution containing 1 µl of each probe, HB50 (50% formamide, 2 × SSC, 50 mM sodium phosphate) and 20% Dextran Sulfate (in HB50) at 80°C for 2 min followed by an overnight incubation at 37°C in a moist chamber. Post-hybridization washes were performed at 42°C once in 2 × SSC, twice in SF50 and once in 2 × SSC. One hundred microliter of blocking solution (5% BSA, 0.2% Tween 20, 4 × SSC) was added on the slides and incubated at 37°C for 30 min in a humid chamber. Slides were washed twice with 4T

and once with TNT before mouse anti-digoxigenine antibody (in TNB) was added on the slides and incubated at 37°C in a dark moist chamber for 30 min. Three washes with 4T were performed before adding the Alexa 488 goat anti-mouse antibody (in TNB) and incubated at 37°C in a dark moist chamber for 30 min. Then, the slides were washed twice in TNT and once in sterile water at room temperature. Finally, the slides were dried and mounted in VECTASHIELD medium containing DAPI (1.5 µg ml^{−1}; Vector Laboratories Inc.).

All observations were made with a Zeiss AxioImager.Z1 epifluorescence microscope with a ×100 Plan Apochromat objective with oil immersion and appropriate filters for DAPI, DsRed and GFP. For each pollen mother cell, the number of magenta foci staining the centromeres of the *A. thaliana* sub-genome (AtCEN) and green foci staining the centromeres of the *A. arenosa* sub-genome (AaCEN) were quantified independently. The number of partially or fully overlapping green-magenta foci were defined as interactions between centromeres of both sub-genomes (AtCEN-AaCEN). Statistical analysis was performed using unpaired two-tailed Mann–Whitney test adjusted for multiple comparisons with Bonferroni correction.

MLH1 immunolabelling

Immunostaining of MLH1 was performed on meiotic chromosome spreads at diakinesis stage as described by Chelysheva *et al.* (2010). Briefly, the slides were incubated 10 min in 100% ethanol, washed with PBST, incubated in the hot tri-sodium solution (pH 7) for 45 s and washed again in PBST. The slides were then incubated with 50 µl of the solution containing the antibodies α-MLH1 (rabbit, 1 : 200 dilution, gift from Mathilde Grelon (INRAe Versailles)) and α-ASY1 (guinea pig, 1 : 250 dilution, gift from Eugenio Sanchez-Moran (University of Birmingham)) in a moist chamber at 4°C for 2 d. The slides were washed three times in PBST and then incubated 30 min with secondary antibodies (Cy3 donkey anti-rabbit and Alexa 488 goat anti-rabbit used at 1 : 100 dilution) at 37°C in a humid chamber. Three PBST washes were performed before airdried and mounted the slides in VECTASHIELD medium containing DAPI (1.5 µg ml^{−1}; Vector Laboratories Inc.).

All observations were made with a Zeiss AxioImager.Z1 epifluorescence microscope with a ×100 Apochromat plane objective with oil immersion and appropriate filters for DAPI, DsRed and GFP. For each cell at diakinesis stage, the MLH1 foci overlapping heterochromatic regions (marked with DAPI) were quantified. Statistical significance was assessed using unpaired two-tailed *t*-test.

Results

Neo-allopolyploid *A. suecica* exhibit reduced fertility compared with their natural counterparts

Eleven synthetic *A. suecica* siblings were produced from a single cross between two natural autotetraploids, *A. thaliana* accession Warschau (Wa-1; ♀) and *A. arenosa* accession Care-1 (♂). The

newly synthesized allopolyploids (Syn) carry the same chromosome composition as the natural *A. suecica* (Nat) but exhibit reduced seed set per silique (Fig. 1a,b; Supporting Information Dataset S1). Interestingly, silique lengths and seed numbers per

silique are highly variable along floral stems of most of the synthetic plants (Fig. 1a), as well as among sister plants (from 0 to 16.3 ± 2.3 seeds per silique in average in synthetic plants 8 and 5, respectively) (Fig. 1b). Quantification of pollen grain viability

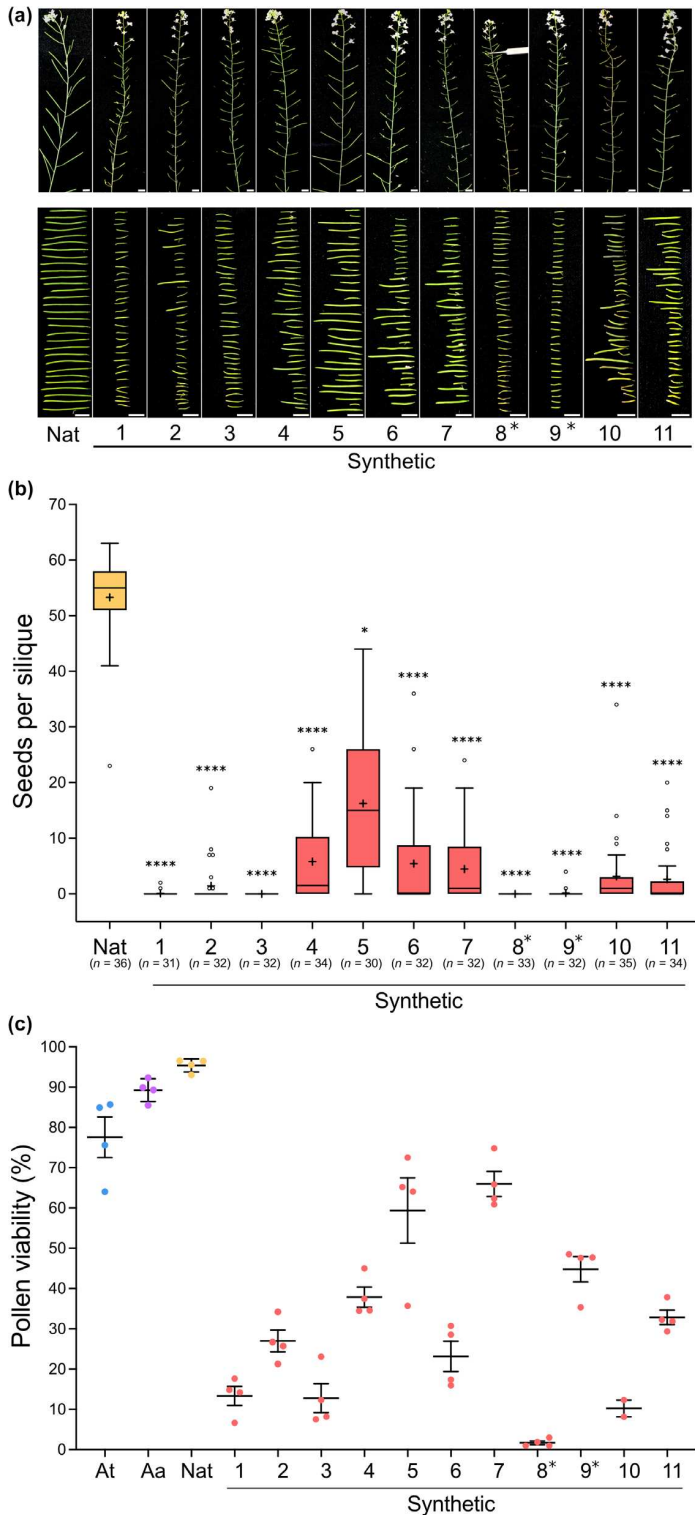


Fig. 1 Fertility of neo-synthetic *Arabidopsis suecica* is strongly reduced compared to evolved *A. suecica*. (a) Phenotype of the primary inflorescence and c. 30 siliques of self-pollinated natural plant (Nat, ecotype ASS3) and 11 first generation neo-synthetic siblings originated from a cross between *Arabidopsis thaliana*, ecotype Wa-1 and *Arabidopsis arenosa*, ecotype Care-1 (bars, 1 cm). The asterisks indicate aneuploid plants. (b) Number of seeds per silique counted in c. 30 siliques for the indicated genotypes. Tukey's box plots with horizontal middle lines indicating the median values and crosses, the mean values. Whiskers correspond to the lowest and highest values within 1.5 times the interquartile range. The asterisks indicate aneuploid plants (*, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$, Kruskal–Wallis test). (c) Pollen viability assessed using Alexander staining in the indicated genotypes. Each point represents an inflorescence from which at least 500 pollen grains were analyzed. Bars show mean \pm SE. The asterisks indicate aneuploid plants. At, *A. thaliana*, ecotype Wa-1; Aa, *A. arenosa*, ecotype Care-1 ($P < 0.0001$, Kruskal–Wallis test with comparison of each synthetic plant with the natural plant).

using Alexander staining showed that all synthetic plants produce a significantly lower proportion of viable pollen grains than the natural *A. suecica* (Fig. 1c), indicating that self-incompatibility alone is not responsible for the observed reductions in fertility. The neo-allopolyploid siblings moreover exhibit a high heterogeneity in their ability to produce viable pollen (from 1.7 ± 0.5 to $66.0 \pm 3.1\%$ of pollen viability in synthetic plants 8 and 7, respectively).

These data are consistent with a previous report of reduced pollen viability in synthetic *A. suecica* generated from a different cross (autotetraploid *A. thaliana* accession *Landsberg erecta* (Ler) crossed with the natural autotetraploid *A. arenosa* accession Care-1), compared to natural *A. suecica* (c. 30% vs 80% of viable pollen, respectively) (Henry *et al.*, 2014). We reproduced the same cross in our lab to evaluate (1) the potential variability in fertility of the offspring siblings and (2) if the specific accessions of the progenitors influence fertility of the offspring. Quantification of seed set per silique revealed that half of the analyzed synthetic plants are sterile, and the rest exhibiting severe reductions in fertility compared to the natural *A. suecica* (at least to 10-fold), with a high variability between plants (Fig. S1). Synthetic *A. suecica* from this cross (*A. thaliana* Ler \times *A. arenosa* Care-1) are, on average, less fertile than those generated from the cross between *A. thaliana* Wa-1 and *A. arenosa* Care-1 (Figs 1b, S1) confirming that the genetic background of the progenitors (at least the female parent) impacts fitness of neo-allopolyploids.

Meiotic stability is altered in neo-allopolyploid *A. suecica*

To assess whether the reduced fertility of neo-allopolyploids is associated with meiotic instability, we performed DAPI-stained chromosome spreads of *A. suecica* pollen mother cells at meiotic metaphase I. In agreement with the recent report from Nibau *et al.* (2022), natural *A. suecica* show largely diploid-like meiosis with 13 bivalents in 92.6% of meiocytes and 7.4% with 12 bivalents and a pair of univalents (Fig. 2; Datasets S1, S2). Severe genetic instability is however observed in synthetic *A. suecica*, with 9/11 euploid and 2/11 aneuploid plants (Plant 8 has $26 - 1$ chromosomes and plant 9, $26 + 1$ chromosomes). Compared with natural allopolyploid controls, all synthetic plants exhibit reduced and highly variable proportions of meiocytes with 13 bivalents (from 5% to 77%) (Fig. 2b). We assessed the fraction of meiotic nuclei exhibiting univalents and multivalent chromosome associations in synthetic *A. suecica* and show that frequencies of these meiotic abnormalities vary considerably between siblings (Fig. 2c,d). The presence of univalents (lacking chiasmata) in a high proportion of meioses indicates loss of the obligate chiasma and an inability to maintain crossover assurance in many synthetic plants. The presence of such univalents and multivalents concurs with the increased risk of chromosome mis-segregation and the formation of aneuploid and/or inviable gametes (Ramsey & Schemske, 2002). While it is not possible at this stage to confirm that it is the only contributing factor, the meiotic instability observed in neo-allopolyploid *A. suecica* is clearly a major contributor to the reduced fertility of these plants. In agreement with this, we find a positive correlation between meiotic stability (estimated by the proportion

of meiocytes with 13 bivalents) and pollen viability ($r=0.74$, $P=0.0064$) (Fig. S2).

Homoeologous recombination occurs in neo-allopolyploid *A. suecica* at variable rates

Multivalent chromosome associations at meiotic metaphase I result from the formation of crossovers between non-homologous chromosomes, and potentially between homoeologous chromosomes. To evaluate the extent of homoeologous recombination in neo-allopolyploid *A. suecica*, we performed fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using probes able to distinguish the centromeric repeat sequences of *A. thaliana* (At) and *A. arenosa* (Aa) sub-genomes. We searched for allosyndetic chromosome associations (i.e. involving chromosomes from both related sub-genomes) in synthetic *A. suecica* meiocytes at diakinesis and metaphase I and clearly identified At-Aa bivalents and multivalents, that is exhibiting both centromeric signals (Figs 3a, S3; Datasets S1, S3–S5). Interestingly, connections between bivalents were observed at diakinesis that do not persist at metaphase I (Fig. S3), as remarked previously by (Nibau *et al.*, 2022). We have thus limited our analysis of chromosome associations to metaphase I and define three categories of meioses: (I) meioses with no visible allosyndetic associations; (II) meioses showing one or more allosyndetic associations (i.e. bivalent pair and/or multivalent formed with chromosomes from *A. thaliana* and *A. arenosa* sub-genomes) and (III) meioses exhibiting complex structures that are difficult to interpret (Fig. 3a). We quantified numbers of each category in natural *A. suecica* and synthetic plants 1 and 2. Unlike natural *A. suecica* meioses, >40% of meiocytes from synthetic plants 1 and 2 exhibit clear allosyndetic association(s) (category II) and/or complex chromosome aberrations, that very probably also contain allosyndetic associations (category III) (Fig. 3b). The presence of these chromosome associations indicates that reciprocal exchanges of genetic material occur between homoeologous chromosomes in neo-allopolyploid *A. suecica*, and very likely, at variable frequencies between siblings.

As the complexity of the category III images does not allow accurate discrimination between chromosome configurations, these were quantified in meiocytes of category I and II from both natural and synthetic (plant 1) *A. suecica* (Table 1). This analysis confirms that allosyndetic multivalents (At-Aa) are more frequent in meiocytes of synthetic compared with natural *A. suecica* plants (0.22 ± 0.08 vs 0.02 ± 0.02 At-Aa multivalents per meiosis, respectively; $P=0.0089$) and revealed that autosyndetic multivalents (associations between more than two chromosomes from the same sub-genome) also occur at low frequency in meiocytes from synthetic plants (Table 1). This implies that recombination between homoeologous chromosomes, but also between non-homologous chromosomes is not efficiently inhibited in neo-allopolyploids.

Genome-wide meiotic crossover frequency is reduced in neo-allopolyploid *A. suecica*

Careful comparison of meiotic chromosome spreads from natural and synthetic *A. suecica* brings to light an interesting difference in

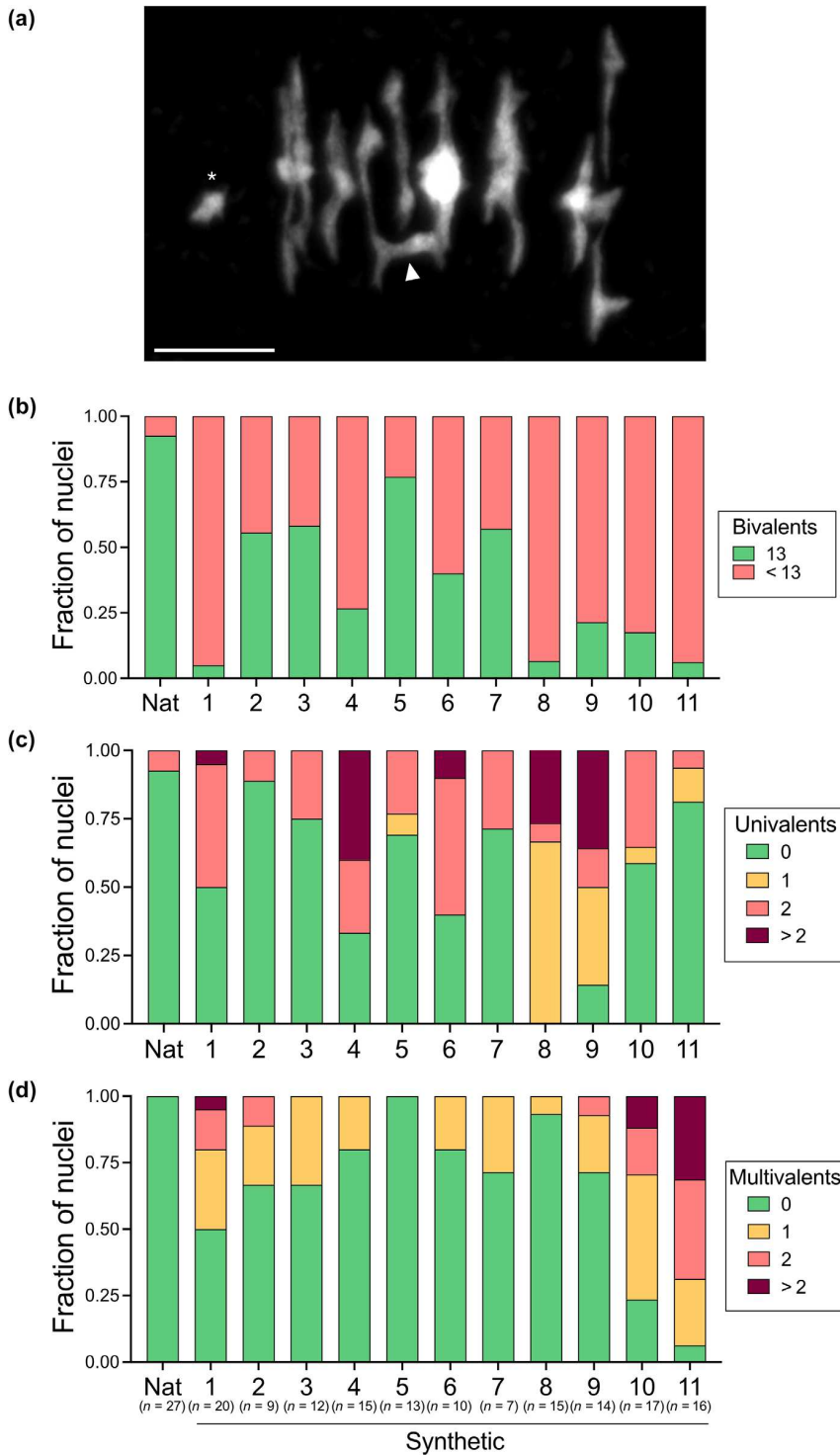


Fig. 2 Abnormal meiotic chromosome configurations are frequent in neo-synthetic *Arabidopsis suecica*. (a) Representative meiotic chromosome spread of male meiocyte at metaphase I from neo-synthetic plant 11 showing univalents (*) and multivalents (triangle). DNA is stained with DAPI (bar, 5 μ m). (b) Fraction of nuclei with 13 bivalents at metaphase I in natural (Nat, ecotype ASS3) and neo-synthetic *A. suecica* siblings originated from a cross between *Arabidopsis thaliana*, ecotype Wa-1 and *Arabidopsis arenosa*, ecotype Care-1. (c) Fraction of nuclei with univalents at metaphase I in the indicated genotypes. (d) Fraction of nuclei with multivalents at metaphase I in the indicated genotypes.

bivalent shapes at metaphase I between the two populations (less ring vs rod bivalents in the synthetic plants). As bivalent shape is directly influenced by chiasma number and location, this implies a difference in chiasmata (the cytological manifestation of meiotic crossovers) between these plants. To verify this, we assessed total chiasma frequencies per meiosis by scoring frequencies of

univalents, rod and ring bivalents as well as multivalents at meiotic metaphase I in the natural and synthetic *A. suecica* (see the [Material and Methods](#) section). While natural *A. suecica* exhibit 20.37 ± 0.39 chiasmata/meiocyte, mean chiasma numbers were reduced in all synthetic plants (from 14.30 ± 0.36 in plant 6 to 17.92 ± 0.45 in plant 3, with a mean chiasma number of 16.39),

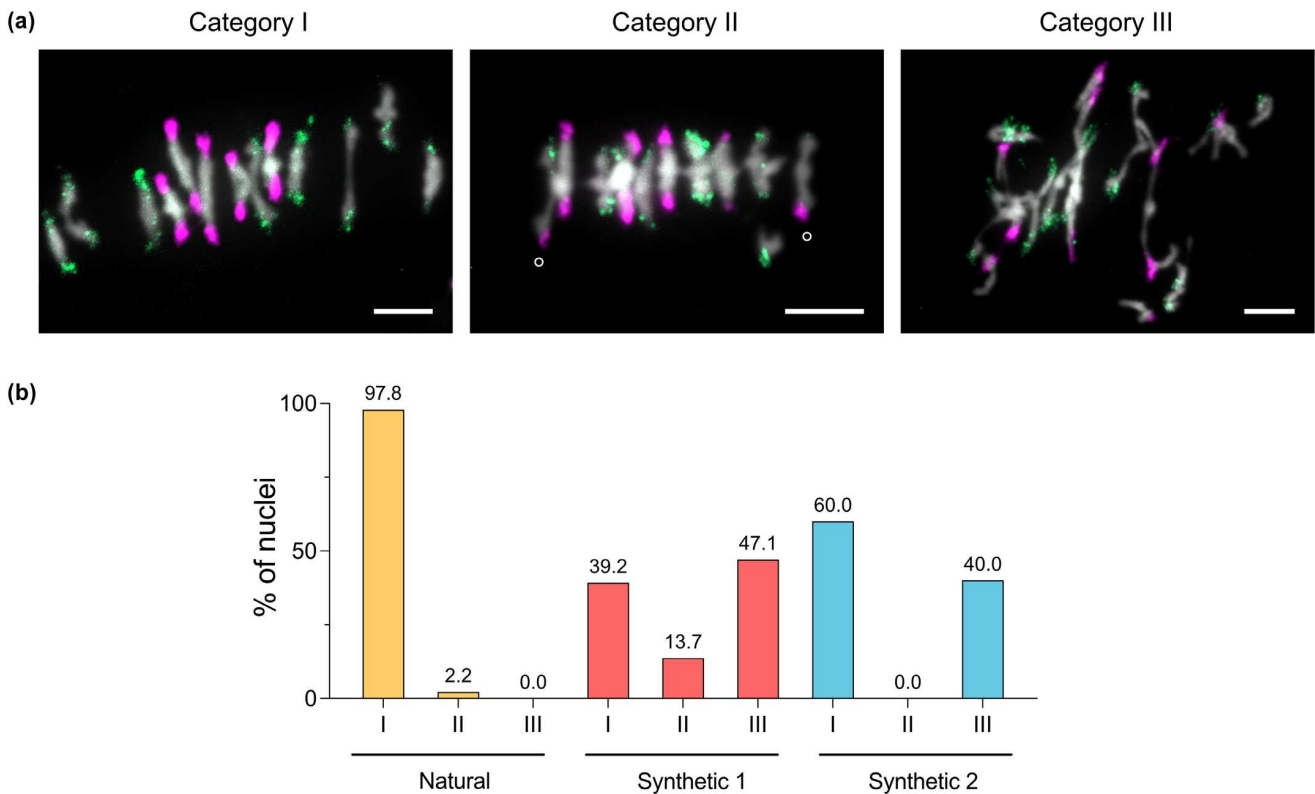


Fig. 3 Evidence of homoeologous exchanges and complex meiotic aberrations in neo-synthetic *Arabidopsis suecica*. (a) Fluorescent *in situ* hybridization of centromeric repeats on neo-synthetic plant 1 meicytes. Probes specific to *Arabidopsis thaliana* (AtCEN, magenta) and *Arabidopsis arenosa* (AaCEN, green) were hybridized to male meiotic chromosome spreads at metaphase I stained with DAPI (white). Representative images of the three metaphase I categories are represented. Category I, meiosis with no allosyndetic associations; Category II, meiosis showing one or more allosyndetic associations (i.e. bivalent pair (o) and/or multivalent formed with chromosomes from *A. thaliana* and *A. arenosa* sub-genomes); Category III, meiosis exhibiting complex structures that are difficult to interpret (bars, 5 μ m). (b) Percentage of nuclei of each category in natural *A. suecica* and neo-synthetic plants 1 and 2.

notwithstanding the increased number of multivalents (Fig. 4; Datasets S1, S2). This corresponds to a statistically significant reduction in mean chiasma frequency per chromosome pair from 1.57 to 1.26 in natural vs synthetic *A. suecica*, respectively ($P < 0.0001$, unpaired two-tailed Mann–Whitney test).

To test whether this reduced chiasma frequency in neo-allopolyploid *A. suecica* is associated with a decrease in Class I crossovers (CO), we performed immunolocalization of MLH1 in evolved and synthetic *A. suecica* meicytes at the diakinesis stage (Fig. 5). Natural *A. suecica* show 20.28 ± 0.47 MLH1 foci per meicyte, fully consistent with the chiasma counts (Fig. 4) and a previous report (Nibau *et al.*, 2022). MLH1 foci numbers were significantly lower in synthetic *A. suecica* with a mean of 18.20 ± 0.44 foci per meicyte ($P = 0.0023$, unpaired *t*-test) (Fig. 5; Dataset S1). This result thus confirms that Class I CO frequency is reduced in neo-allopolyploid *A. suecica* compared with their evolved counterpart. A reduction in class II CO cannot be excluded but the low frequency of this class of CO makes analysis difficult without markers.

The presence of CO between homoeologues in the first meiosis following allopolyploidization is thus accompanied by an overall reduction in numbers of chiasmata and Class I CO, and therefore by reduced numbers of inter-homologous chiasmata.

These data strongly suggest that recombination partner choice (homologues vs homoeologues) is perturbed in neo-allopolyploid *A. suecica*.

Meiotic prophase I centromere dynamics is altered in neo-allopolyploid *A. suecica*

Meiotic crossovers observed as chiasmata at diakinesis and metaphase I result from recombination processes initiated at leptotene that are associated with changes in structure and movements of chromosomes (Alleva & Smolikove, 2017). To gain further insight into early meiotic chromosome dynamics in *A. suecica* and determine whether the defects observed in synthetic plants result from problems during earlier stages of meiosis, sub-stages of prophase I were analyzed using FISH with sub-genome-specific centromeric probes (Fig. 6; Datasets S1, S3–S5). In pre-meiotic interphase, centromeres are dispersed and unpaired as shown by the 10 magenta foci staining the centromeres of *A. thaliana* sub-genome (AtCEN) and the 16 green foci staining the centromeres of *A. arenosa* sub-genome (AaCEN) (Fig. 6a,b). The number of fluorescent signals is reduced by more than two-fold at zygotene indicating that centromeres cluster at early meiosis in allopolyploid *A. suecica*, as observed in diploid *A. thaliana*

Table 1 Chromosome configurations at metaphase I in natural plant and neo-synthetic plant 1 *Arabidopsis suecica*.

	Univalents				Bivalents				Multivalents			
	N	At	Aa	Total	At	Aa	At-Aa	Total	At	Aa	At-Aa	Total
Nat	46	0	0	0	4.98 ± 0.02 (4-5)	7.98 ± 0.02 (7-8)	0	12.96 ± 0.04 (11-13)	0	0	0.02 ± 0.02 (0-1)	0.02 ± 0.02 (0-1)
Syn	27	0.07 ± 0.07 (0-2)	0.56 ± 0.17 (0-2)	0.63 ± 0.18 (0-2)	4.22 ± 0.19 (1-5)	6.96 ± 0.20 (5-8)	0.22 ± 0.12 (0-2)	11.41 ± 0.27 (8-13)	0.19 ± 0.09 (0-2)	0.19 ± 0.08 (0-1)	0.22 ± 0.08 (0-1)	0.59 ± 0.12 (0-2)
P-value			0.0002	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		< 0.0001			0.0089	< 0.0001

Counts include meiocytes from categories I and II but not from category III as they do not allow accurate discrimination and quantification of chromosome configurations. Mean ± SE (range) of numbers of the given class of structure per meiotic nucleus. N, number of cells examined. At – univalent, bivalent or multivalent stained with *Arabidopsis thaliana* centromeric probe. Aa, univalent, bivalent or multivalent stained with *Arabidopsis arenosa* centromeric probe; At-Aa, bivalent or multivalent stained with both centromeric probes, that is composed by chromosomes from both sub-genomes. Mean numbers of univalents, bivalents and multivalents are in bold. Mann-Whitney tests were performed to test for statistically significant differences between natural (Nat) and synthetic (Syn) *A. suecica* for each chromosome configuration.

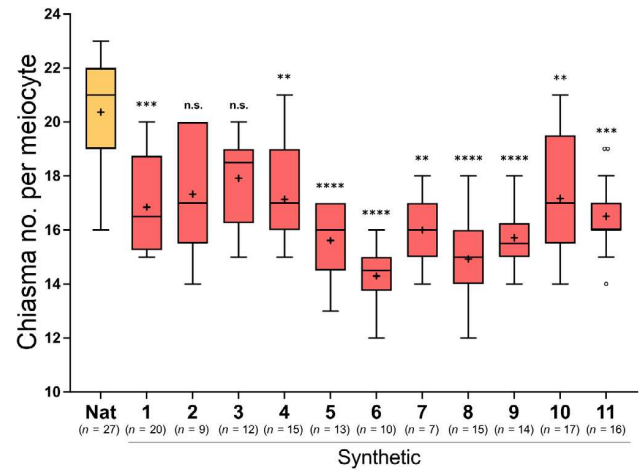


Fig. 4 Chiasma frequency is reduced in neo-synthetic compared with natural *Arabidopsis suecica*. Chiasma number per meioocyte was estimated based on bivalent and multivalent shapes from metaphase I chromosome spreads of the natural (Nat, ecotype ASS3) and each neo-synthetic *A. suecica* originated from a cross between *Arabidopsis thaliana*, ecotype Wa-1 and *Arabidopsis arenosa*, ecotype Care-1. Tukey's box plots with horizontal middle lines indicating the median values and crosses, the mean values (ns, not significantly different; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). Whiskers correspond to the lowest and highest values within 1.5 times the interquartile range.

(Armstrong *et al.*, 2001; Da Ines & White, 2015). Interestingly, synthetic *A. suecica* meioocytes exhibit on average more AtCEN and AaCEN foci than natural *A. suecica* meioocytes at this stage (Figs 6b, S4). Thus, the interactions between centromeres from the same sub-genome (AtCEN-AtCEN and AaCEN-AaCEN) are delayed, less frequent and/or less stable in synthetic *A. suecica* meiosis than in evolved *A. suecica*.

To assess the interactions between centromeres from *A. thaliana* and *A. arenosa* sub-genomes at early meiosis, we quantified the number of AtCEN-AaCEN overlapping foci (Fig. 6c). The number of AtCEN-AaCEN interactions clearly increases in zygotene compared with pre-meiotic stages (Fig. 6c), indicating that centromere clustering at the onset of meiosis also involves homoeologous chromosomes. Interestingly, AtCEN-AaCEN interactions are more frequent in synthetic compared to natural *A. suecica* meioocytes (3.77 ± 0.24 (Syn1); 2.44 ± 0.27 (Syn2) vs 1.56 ± 0.17 (Nat)) (Fig. 6c) revealing that the zygotene interactions between homoeologous centromeres are significantly more numerous and/or more stable in neo-allopolyploid *A. suecica*. Intriguingly, this zygotene excess of inter-homoeologue centromeric interactions is then corrected as no differences are observed between Nat and Syn plants at pachytene and diplotene (Fig. 6c).

Taken together, these data demonstrate that centromere dynamics at the onset of meiosis is perturbed in neo-allopolyploid *A. suecica*, with a substantial increase in homoeologous associations and a reduction in true homologous associations.

Discussion

Allopolyploidy represents a tremendous evolutionary opportunity for immediate species formation but is associated with an array of

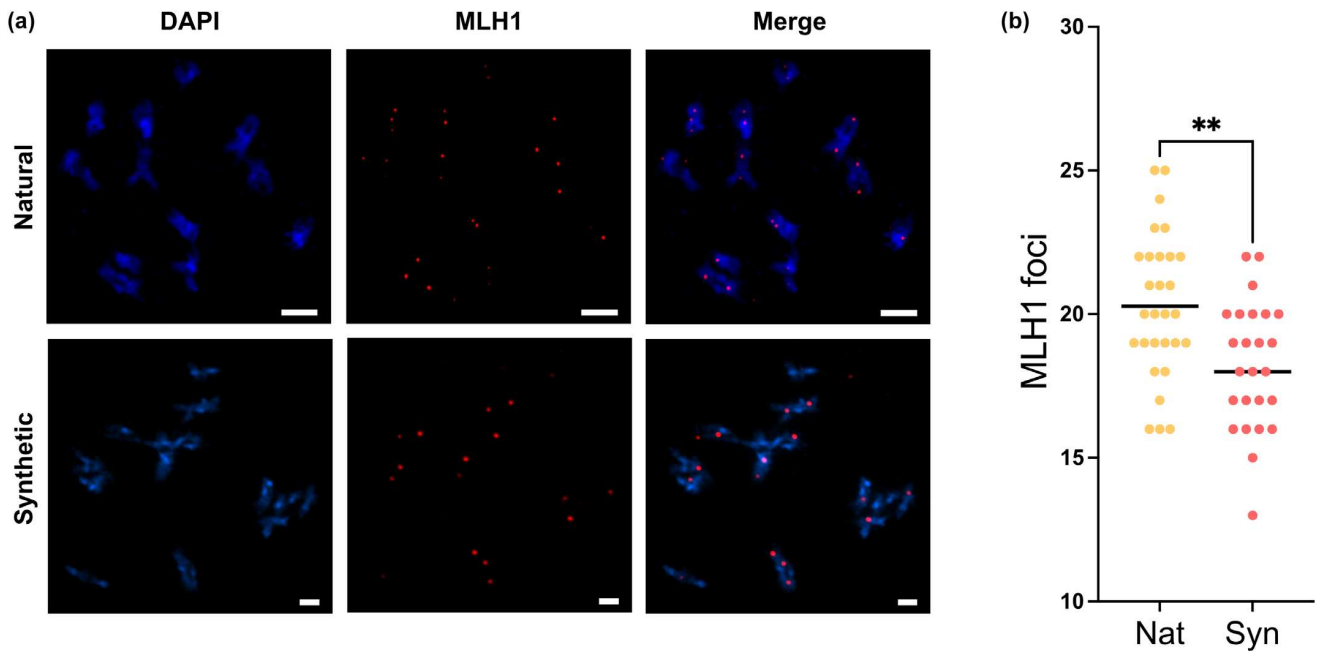


Fig. 5 Genome-wide class I crossover frequency is significantly reduced in neo-synthetic plants compared to the natural *Arabidopsis suecica*. (a) Immunolocalization of the protein MLH1 (red) in male meiocytes at diakinesis stage in natural *A. suecica* and in the neo-synthetic plant 10. DNA was stained with DAPI (blue) (bars, 5 μ m). (b) Quantification of MLH1 foci per meiocyte in natural *A. suecica* and the neo-synthetic plant 10. Bars indicate the mean. Statistical significance was assessed using an unpaired two-tailed *t*-test (**, $P < 0.01$).

challenges triggered by the combination of diverged parental sub-genomes within a single nucleus. Recombination between homoeologous chromosomes leads to difficulties with balanced chromosomal sorting and to rearrangements between homoeologues. Importantly, the karyotypic changes resulting from extensive homoeologous exchanges during the first allopolyploid meioses can strongly impact chromosome pairing, meiotic stability and fertility of the following generations (Pontes *et al.*, 2004; Szadkowski *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2014). To better understand the processes involved, we analyzed meiotic chromosome behavior and chromosome sorting in neo-allopolyploid *A. suecica* plants of the first generation, when true homologous and homoeologous chromosomes first meet.

We show that both seed set and pollen viability are strongly reduced (and highly variable) in neo-allopolyploid compared with evolved *A. suecica* (Fig. 1). While the effects on pollen viability would not be affected by potential self-incompatibility in the synthetic plants, this could be so for seed set – and could point to an explanation for the apparent discrepancy between relatively high pollen viability and low seed sets of some Syn plants (Durvasula *et al.*, 2017; Novikova *et al.*, 2017). We also report the presence of allosyndetic chromosomal associations in neo-allopolyploid meioses (Fig. 3), revealing that recombination between homoeologous chromosomes occurs in synthetic *A. suecica*. Together with previous reports in *A. suecica* and other neo-allopolyploids, these data highlight considerable variations of the frequency of these events between species, accessions and individuals (Comai *et al.*, 2000; Szadkowski *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017; Gaebelien *et al.*, 2019;

Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). We show that the presence of homoeologous recombination in neo-allopolyploid *A. suecica* is associated with a significant reduction in genome-wide crossover frequency, seen both in the decrease in chiasma frequency and Class I CO (MLH1 foci) (Figs 4, 5). Recombination partner choice thus appears to be severely altered in synthetic *A. suecica* with the formation of CO between homoeologous chromosomes appearing to be to the detriment of homologous CO.

Meiotic CO formation is initiated at leptotene by the induction of numerous DNA double-strand breaks and the generation of 3' single-stranded DNA overhangs, onto which RAD51 and/or DMC1 are polymerized (Brown & Bishop, 2015; Emmenecker *et al.*, 2023). During leptotene/zygotene, this presynaptic nucleoprotein filament catalyzes homology search and invasion of a double-stranded DNA template which will be used for repair (Mercier *et al.*, 2015; Wang & Copenhaver, 2018). In most studied species, DNA invasion is accompanied by chromosome pairing at zygotene and establishment of the synaptonemal complex with a zipper-like effect, leading to full chromosome synapsis at pachytene (Brown & Bishop, 2015; Zickler & Kleckner, 2015; Emmenecker *et al.*, 2023). The joint recombination intermediates are processed to yield non-CO or CO products and chromatid cohesion holds homologous chromosome pairs together until anaphase (Hunter, 2015; Mercier *et al.*, 2015; Wang & Copenhaver, 2018). The mechanisms of recognition and choice of the recombination partner (donor chromatid) in this process are not well understood. Discrimination between homologous vs more diverged homoeologous sequences can potentially be made (1) during the initial strand invasion where the presence of

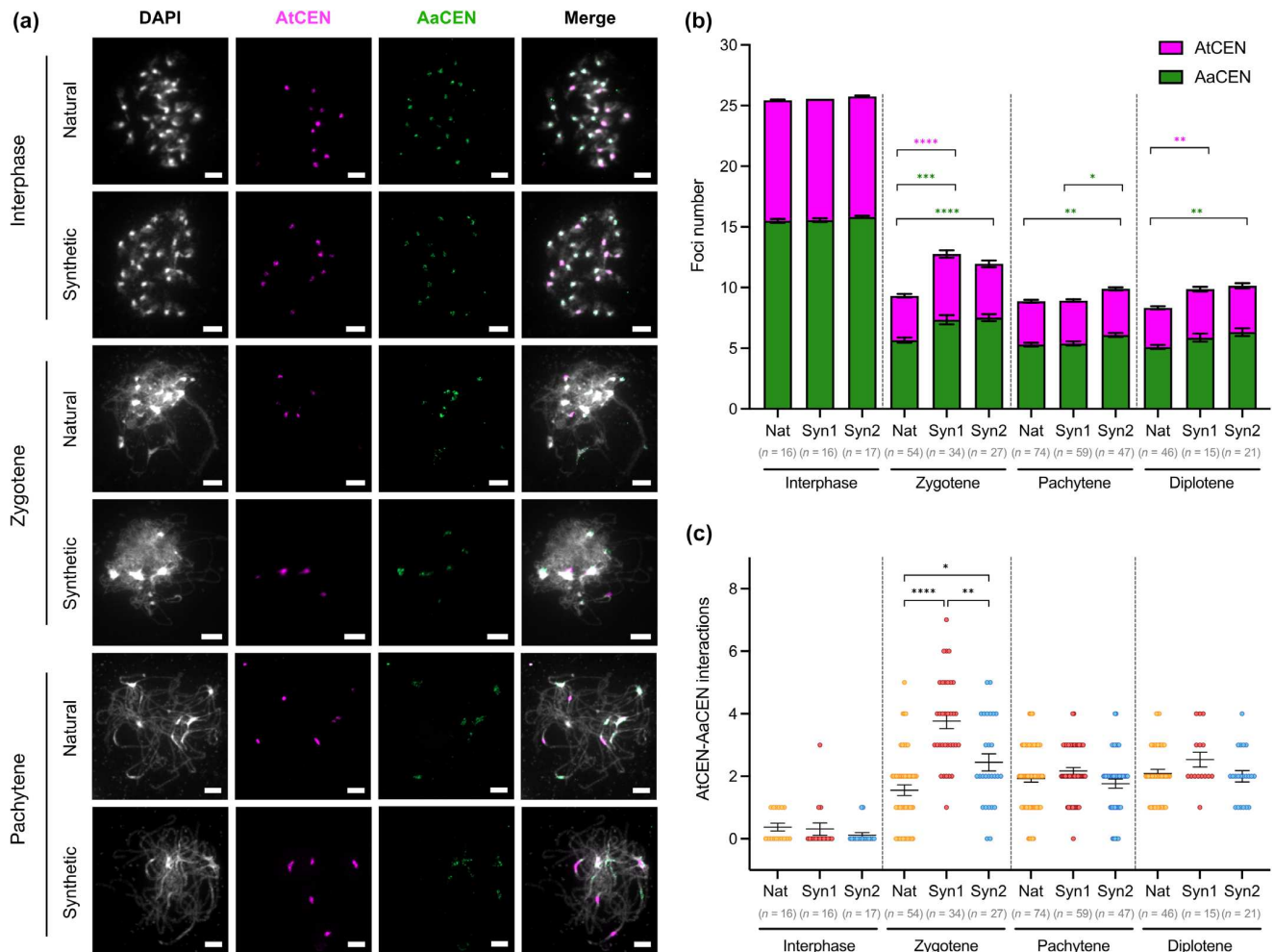


Fig. 6 Comparison of centromere dynamics during meiotic prophase I in natural and neo-synthetic *Arabidopsis suecica*. (a) Fluorescent *in situ* hybridization of centromeric repeats to natural and neo-synthetic plant 1 meicyotes. Probes specific to *Arabidopsis thaliana* (AtCEN, magenta) and *Arabidopsis arenosa* (AaCEN, green) were hybridized to male meiotic chromosome spreads stained with DAPI (white) at the labeled stages (bars, 5 μ m). (b) Stacked bar showing the quantification of centromeric foci of *A. thaliana* (AtCEN, magenta) and *A. arenosa* (AaCEN, green) sub-genomes in natural (Nat), neo-synthetic plant 1 (Syn1) and plant 2 (Syn2) at the labeled stages. Bars show mean \pm SE. Statistical significance was assessed using unpaired two-tailed Mann–Whitney tests adjusted for multiple comparisons with Bonferroni correction (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$). (c) Quantification of overlapping foci between centromeres from *A. thaliana* and *A. arenosa* sub-genomes in natural (Nat), neo-synthetic plant 1 (Syn1) and plant 2 (Syn2) at the labeled stages. Bars show mean \pm SE. Statistical significance was assessed using unpaired two-tailed Mann–Whitney tests adjusted for multiple comparisons with the Bonferroni correction (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

mismatches in heteroduplex DNA can promote heteroduplex rejection (i.e. dissociation of invading strand DNA) and/or (2) during CO maturation by preventing recombination intermediates from becoming CO. In established allohexaploid bread wheat, the prevention of recombination between homoeologous chromosomes is thought to be regulated at both levels (Martín *et al.*, 2017; Serra *et al.*, 2021). In *A. suecica*, the presence of interactions between chromosomes from both sub-genomes at zygotene (as seen by centromere interactions; Fig. 6a,c) suggests that homology search and strand invasion could be initiated between both homologous and homoeologous chromosomes, possibly leading to the formation of synaptic multivalents. This is consistent with the few synaptic multivalents reported in *B. napus*, *Aegilops* species, wheat and *Festuca* polyploids

(Hobolth, 1981; Thomas & Thomas, 1993; Cuñado *et al.*, 1996; Grandont *et al.*, 2013). Interestingly, the interactions (and possibly pairing) between homoeologous centromeres are more frequent (up to more than twofold) in neo-synthetic compared to evolved *A. suecica* plants at zygotene (Fig. 6c), and this is associated with a reduction in the interactions between centromeres from the same sub-genomes (including homologous interactions) (Fig. 6b). These observations could reflect an abnormal stabilization of DNA strand invasion and exchange within homoeologous sequences, leading to the formation of numerous synaptic multivalents, and consequently to allosyndetic multivalents at diakinesis and metaphase I (Figs 3, S3). In established *A. suecica*, efficient discrimination between homologous vs homoeologous sequences during the strand invasion step could however limit

formation of homoeologous CO and consequently, ensure accurate chromosome segregation.

It has been proposed that meiotic chromosome recognition and pairing are facilitated by initial interactions between particular chromosomal regions such as telomeres, centromeres or specific pairing centers (Da Ines & White, 2015; Zickler & Kleckner, 2015; Zhang & Han, 2017). These initial contacts are thought to trigger chromosome movements that promote homology search and pairing of homologous chromosomes, which can then be stabilized by homologous recombination and synaptonemal complex assembly (Da Ines & White, 2015). In polyploid wheat and rice, centromeres associate and then form homologous pairs prior to the onset of meiosis suggesting that pre-meiotic centromere associations could mediate the sorting of homologous and homoeologous chromosomes in these polyploids (Martinez-Perez *et al.*, 1999, 2000, 2001; Prieto *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2022). In agreement with data as previously described (Comai *et al.*, 2003), we do not observe pre-meiotic centromere association in allopolyploid *A. suecica*, but centromere dynamics comparable to diploid *A. thaliana* and *Brachipodium distachyon*, where centromeres cluster at the leptotene-zygotene transition prior to chromosome arm synapsis (Fig. 6; Wen *et al.*, 2012; Da Ines & White, 2015). Pre-meiotic centromere interactions are thus not a general requirement in allopolyploid species, but perhaps facilitate chromosome sorting in species with higher chromosome numbers.

In *Arabidopsis* autotetraploids (that carry four homologous copies of each chromosome), meiotic stabilization is reported to arise largely from an increase in crossover interference that limits crossover numbers per chromosome and consequently, reduces the occurrence of multivalents (Morgan *et al.*, 2021; Bomblies, 2023). Reducing meiotic CO rates is moreover sufficient to decrease multivalent frequency in neo-autotetraploid *Arabidopsis*, although it does not rescue fertility (Gonzalo *et al.*, 2023). In a previous study in allotetraploid hybrids formed between neo- and evolved *A. suecica*, the authors show increased CO rates compared to diploids in a 5 Mb genetic interval on chromosome 3 (Pecinka *et al.*, 2011). Here, we provide a comparison of genome-wide CO frequency in the first neo-allopolyploid meioses vs evolved *A. suecica* meioses and show that CO rates are significantly lower in the neo-synthetic plants (Fig. 4). Thus, while meiotic adaptation is associated with reduced CO formation in autotetraploid *A. arenosa* (Morgan *et al.*, 2021; Bomblies, 2023), meiotic adaptation in allopolyploid *A. suecica* seems instead associated with increased CO formation. A tempting hypothesis would be that, after an initial reduction of meiotic CO to partially stabilize meiosis by limiting homoeologous recombination, a progressive increase of meiotic recombination efficiency in subsequent generations would gradually establish full meiotic adaptation to allopolyploidy – ensuring the obligate crossover required for accurate chromosome segregation and increased genetic diversity among the offspring. We note that this would imply different evolutionary trajectories for auto- and allopolyploid *Arabidopsis* to stabilize their meiosis. An important point to take into account is possible roles of specific progenitors in allopolyploid phenotypes. We note that the ploidy (and the accessions) of *A. suecica* progenitors are

still subject to debate (Novikova *et al.*, 2017; Nibau *et al.*, 2022). In this work, we crossed two natural autotetraploid species (*A. thaliana* Wa-1 & *A. arenosa* Care-1) that could have transmitted a low chiasma frequency to the neo-allopolyploids.

Genome sequencing of neo and evolved allopolyploid species revealed that homoeologous rearrangements are larger and globally more frequent in neo-synthetic lines than in natural varieties (Chalhoub *et al.*, 2014; Lloyd *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). For example, natural allopolyploid cotton and *A. suecica* maintain their sub-genomes separate and do not show evidence of bursts of extensive homoeologous exchanges having occurred following their formation (Salmon *et al.*, 2010; Burns *et al.*, 2021). How then can we explain the dramatic meiotic instability seen in neo-allopolyploids? Two interesting observations cast light on this intriguing question. First, we showed that the fitness of neo-synthetic *A. suecica* plants varies according to the genotypes of the progenitors (*A. thaliana* Wa-1 vs Ler; Figs 1, S1). Previous studies have also reported such an effect on the extent of genome rearrangements in neo-synthetic *B. napus*, probably via segregation of genetic variants that affect meiotic stability (Attia & Röbbelen, 1986; Szadkowski *et al.*, 2010; Ferreira de Carvalho *et al.*, 2021). So, it seems that some accessions are more prone to give ‘stable’ allopolyploid offspring and it is probable that the allopolyploid lineages that survive are those that are, from the outset, less inclined to genome rearrangement with a preference for recombining with homologues over homoeologues. Such an influence of the genetic contribution of the progenitors to ‘kickstart’ the (partial) fertility of a given neo-allopolyploid could clearly play an important role in the natural context. Second, an unanticipated finding here was the considerable variability between the neo-synthetic siblings regarding fertility, meiotic stability and homoeologous recombination rate – and notably the ‘reasonable’ fertility of some of these first-generation allopolyploid plants. This observation clearly suggests that the evolved allopolyploids could derive from the more stable neo-allopolyploids within the first generations following the hybridization. Conditions for allopolyploid success could thus initially rely on preexisting genetic determinants which partially limit homoeologous pairing and recombination, to be followed by fine-tuning the adaptation in subsequent generations.

Acknowledgements

We thank Magnus Nordborg (Gregor Mendel Institute, Vienna), Mathilde Grelon (INRAE, IJPB, Versailles) and Eugenio Sanchez-Moran (University of Birmingham) for providing ASS3 seeds, α -MLH1 and α -ASY1 antibodies, respectively. We also thank the platform CLIC (Clermont-Ferrand Imagerie Confocale, Clermont Auvergne University) for confocal microscopy as well as James Higgins (University of Leicester) for access to his epifluorescence microscope. We acknowledge the members of the group for their help and discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Clermont Auvergne University, the ANR JJC MeioAdapt (ANR-21-CE20-0004-01), the Springboard

Programme for a Sustainable Future and the Bettencourt-Schueller Foundation.






Competing interests

None declared.

Author contributions

FC, CW and HS conceived the research and designed the experiments. FC, VP and HS performed the experiments. CL provided training for MLH1 immunostaining. FC, CW and HS analyzed the data. FC and HS wrote the manuscript with inputs from CW. All authors approved the manuscript.

ORCID

Floriane Chéron  <https://orcid.org/0009-0006-7756-2695>
 Christophe Lambing  <https://orcid.org/0000-0001-5218-4217>
 Valentine Petiot  <https://orcid.org/0009-0001-4718-0227>
 Heïdi Serra  <https://orcid.org/0000-0002-5457-2050>
 Charles White  <https://orcid.org/0000-0001-8152-5797>

Data availability

All image data used in this study are available in Datasets [S2–S5](#).

References

- Alexander MP. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44: 117–122.
- Alleva B, Smolikove S. 2017. Moving and stopping: regulation of chromosome movement to promote meiotic chromosome pairing and synapsis. *Nucleus* 8: 613–624.
- Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. 2001. Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science* 114: 4207–4217.
- Attia T, Röbbelen G. 1986. Cytogenetic relationship within cultivated *Brassica* analyzed in amphihaploids from the three diploid ancestors. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28: 323–329.
- Barea L, Redondo-Río A, Lucena-Marín R, Serrano-Heredia S, Aguilar M, Prieto P. 2022. Homologous chromosome associations in domains before meiosis could facilitate chromosome recognition and pairing in wheat. *Scientific Reports* 12: 1–11.
- Blasio F, Prieto P, Pradillo M, Naranjo T. 2022. Genomic and meiotic changes accompanying polyploidization. *Plants* 11: 1–32.
- Bombles K. 2020. When everything changes at once: finding a new normal after genome duplication: evolutionary response to polyploidy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287: 20202154.
- Bombles K. 2023. Learning to tango with four (or more): the molecular basis of adaptation to polyploid meiosis. *Plant Reproduction* 36: 107–124.
- Brown MS, Bishop DK. 2015. DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: 1–29.
- Burns R, Mandáková T, Gunis J, Soto-Jiménez LM, Liu C, Lysak MA, Novikova PY, Nordborg M. 2021. Gradual evolution of allopolyploidy in *Arabidopsis suecica*. *Nature Ecology & Evolution* 5: 1367–1381.
- Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B *et al.* 2014. Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345: 950–953.
- Chelysheva L, Grandont L, Vrielynck N, le Guin S, Mercier R, Grelon M. 2010. An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 143–153.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836–846.
- Comai L, Tyagi AP, Lysak MA. 2003. FISH analysis of meiosis in *Arabidopsis* allopolyploids. *Chromosome Research* 11: 217–226.
- Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12: 1551–1567.
- Cuñado N, Callejas S, García MJ, Fernández A, Santos JL. 1996. The pattern of zygotene and pachytene pairing in allotetraploid *Aegilops* species sharing the U genome. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1152–1155.
- Da Ines O, White CI. 2015. Centromere associations in meiotic chromosome pairing. *Annual Review of Genetics* 49: 95–114.
- Durvasula A, Fulgione A, Gutaker RM, Alacakaptan SI, Flood PJ, Neto C, Tsuchimatsu T, Burbano HA, Picó FX, Alonso-Blanco C *et al.* 2017. African genomes illuminate the early history and transition to selfing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 114: 5213–5218.
- Emmenecker C, Mézard C, Kumar R. 2023. Repair of DNA double-strand breaks in plant meiosis: role of eukaryotic RecA recombinases and their modulators. *Plant Reproduction* 36: 17–41.
- Ferreira de Carvalho J, Stoeckel S, Eber F, Lodé-Taburel M, Gilet MM, Trotoux G, Morice J, Falentin C, Chèvre AM, Rousseau-Gueutin M. 2021. Untangling structural factors driving genome stabilization in nascent *Brassica napus* allopolyploids. *New Phytologist* 230: 2072–2084.
- Gaebelein R, Schiessl SV, Samans B, Batley J, Mason AS. 2019. Inherited allelic variants and novel karyotype changes influence fertility and genome stability in *Brassica* allohexaploids. *New Phytologist* 223: 965–978.
- Gonzalo A, Lucas MO, Charpentier C, Sandmann G, Lloyd A, Jenczewski E. 2019. Reducing MSH4 copy number prevents meiotic crossovers between non-homologous chromosomes in *Brassica napus*. *Nature Communications* 10: 1–9.
- Gonzalo A, Parra-Nunez P, Bachmann AL, Sanchez-Moran E, Bombles K. 2023. Partial cytological diploidization of neoautotetraploid meiosis by induced cross-over rate reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 120: 2017.
- Grandont L, Jenczewski E, Lloyd A. 2013. Meiosis and its deviations in polyploid plants. *Cytogenetic and Genome Research* 140: 171–184.
- Henry IM, Dilkes BP, Tyagi A, Gao J, Christensen B, Comai L. 2014. The BOY NAMED SUE quantitative trait locus confers increased meiotic stability to an adapted natural allopolyploid of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 181–194.
- Higgins EE, Howell EC, Armstrong SJ, Parkin IAP. 2021. A major quantitative trait locus on chromosome A9, BnaPh1, controls homeologous recombination in *Brassica napus*. *New Phytologist* 229: 3281–3293.
- Hobolth P. 1981. Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Research Communications* 46: 129–173.
- Hohmann N, Wolf EM, Lysak MA, Koch MA. 2015. A time-calibrated road map of brassicaceae species radiation and evolutionary history. *Plant Cell* 27: 2770–2784.
- Hunter N. 2015. Meiotic recombination: the essence of heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a016618.
- Jenczewski E, Eber F, Grimaud A, Huet S, Lucas MO, Monod H, Chèvre AM. 2003. PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (*Brassica napus*) haploids. *Genetics* 164: 645–653.
- Jiao Y, Wickert NJ, Ayyampalayam S, Chandrabali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS *et al.* 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100.
- Li N, Xu C, Zhang A, Lv R, Meng X, Lin X, Gong L, Wendel JF, Liu B. 2019. DNA methylation repatterning accompanying hybridization, whole genome doubling and homeolog exchange in nascent segmental rice allotetraploids. *New Phytologist* 223: 979–992.
- Lloyd A, Blary A, Charif D, Charpentier C, Tran J, Balzergue S, Delannoy E, Rigauil G, Jenczewski E. 2018. Homeologous exchanges cause extensive

- dosage-dependent gene expression changes in an allopolyploid crop. *New Phytologist* 217: 367–377.
- Lloyd A, Bomblies K. 2016. Meiosis in autopolyploid and allopolyploid *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 30: 116–122.
- Mandáková T, Pouch M, Harmanová K, Zhan SH, Mayrose I, Lysak MA. 2017. Multispeed genome diploidization and diversification after an ancient allopolyploidization. *Molecular Ecology* 26: 6445–6462.
- Martín AC, Alabdullah AK, Moore G. 2021. A separation-of-function ZIP4 wheat mutant allows crossover between related chromosomes and is meiotically stable. *Scientific Reports* 11: 1–13.
- Martín AC, Rey MD, Shaw P, Moore G. 2017. Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* 126: 669–680.
- Martín AC, Shaw P, Phillips D, Reader S, Moore G. 2014. Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. *Nature Communications* 5: 1–5.
- Martínez-Perez E, Shaw PJ, Moore G. 2000. Polyploidy induces centromere association. *Journal of Cell Biology* 148: 233–238.
- Martínez-Perez E, Shaw PJ, Moore G. 2001. The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* 411: 204–207.
- Martínez-Perez E, Shaw PJ, Reader S, Aragón-Alcaide L, Miller T, Moore G. 1999. Homologous chromosome pairing in wheat. *Journal of Cell Science* 112: 1761–1769.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015. The molecular biology of meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 66: 297–327.
- Morgan C, Fozard JA, Hartley M, Henderson IR, Bomblies K, Howard M. 2021. Diffusion-mediated HEI10 coarsening can explain meiotic crossover positioning in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 12: 4674.
- Nibau C, Gonzalo A, Evans A, Sweet-Jones W, Phillips D, Lloyd A. 2022. Meiosis in allopolyploid *Arabidopsis suecica*. *The Plant Journal* 111: 1110–1122.
- Novikova PY, Tsuchimatsu T, Simon S, Nizhynska V, Voronin V, Burns R, Fedorenko OM, Holm S, Säll T, Prat E *et al.* 2017. Genome sequencing reveals the origin of the allotetraploid *Arabidopsis suecica*. *Molecular Biology and Evolution* 34: 957–968.
- Otto SP. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131: 452–462.
- Parra-Nunez P, Pradillo M, Santos JL. 2020. How to perform an accurate analysis of metaphase I chromosome configurations in autopolyploids of *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology* 2061: 25–36.
- Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy AA, Mittelsten Scheid O. 2011. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biology* 9: 24.
- Pontes O, Neves N, Silva M, Lewis MS, Madlung A, Comai L, Viegas W, Pikaard CS. 2004. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 18240–18245.
- Prieto P, Santos AP, Moore G, Shaw P. 2004. Chromosomes associate premeiotically and in xylem vessel cells via their telomeres and centromeres in diploid rice (*Oryza sativa*). *Chromosoma* 112: 300–307.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 589–639.
- Rey MD, Martín AC, Higgins J, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, Moore G. 2017. Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Molecular Breeding* 37: 95.
- Ross KJ, Franz P, Jones GH. 1996. A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* 4: 507–516.
- Salmon A, Flagel L, Ying B, Udall JA, Wendel JF. 2010. Homoeologous nonreciprocal recombination in polyploid cotton. *New Phytologist* 186: 123–134.
- Serra H, Svačina R, Baumann U, Whitford R, Sutton T, Bartoš J, Sourdille P. 2021. Ph2 encodes the mismatch repair protein MSH7-3D that inhibits wheat homoeologous recombination. *Nature Communications* 12: 1–10.
- Soares NR, Mollinari M, Oliveira GK, Pereira GS, Vieira MLC. 2021. Meiosis in polyploids and implications for genetic mapping: a review. *Genes* 12: 1517.
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD, Leitch IJ. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany* 90: 1596–1603.
- Song JM, Guan Z, Hu J, Guo C, Yang Z, Wang S, Liu D, Wang B, Lu S, Zhou R *et al.* 2020. Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nature Plants* 6: 34–45.
- Sun Y, Wu Y, Yang C, Sun S, Lin X, Liu L, Xu C, Wendel JF, Gong L, Liu B. 2017. Segmental allotetraploidy generates extensive homoeologous expression rewiring and phenotypic diversity at the population level in rice. *Molecular Ecology* 26: 5451–5466.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M, Huneau C, Belcram H, Coriton O, Manzaneres-Dauleux MJ, Delourme R, King GJ *et al.* 2010. The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist* 186: 102–112.
- Thomas HM, Thomas BJ. 1993. Synaptonemal complex formation in two allohexaploid *Festuca* species and a pentaploid hybrid. *Heredity* 71: 305–311.
- Udall JA, Wendel JF. 2006. Polyploidy and crop improvement. *Crop Science* 46 (Suppl 1): 3–14.
- Van De Peer Y, Mizrahi E, Marchal K. 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* 18: 411–424.
- Wang Y, Copenhaver GP. 2018. Meiotic recombination: mixing it up in plants. *Annual Review of Plant Biology* 69: 577–609.
- Wen R, Moore G, Shaw PJ. 2012. Centromeres cluster *de novo* at the beginning of meiosis in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* 7: e44681.
- Zhang H, Bian Y, Gou X, Zhu B, Xu C, Qi B, Li N, Rustgi S, Zhou H, Han F *et al.* 2013. Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110: 3447–3452.
- Zhang J, Han F. 2017. Centromere pairing precedes meiotic chromosome pairing in plants. *Science China Life Sciences* 60: 1197–1202.
- Zhang Z, Gou X, Xun H, Bian Y, Ma X, Li J, Li N, Gong L, Feldman M, Liu B *et al.* 2020. Homoeologous exchanges occur through intragenic recombination generating novel transcripts and proteins in wheat and other polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 117: 14561–14571.
- Zickler D, Kleckner N. 2015. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a016626.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Dataset S1 Raw data for fertility and cytogenetic analyses.

Dataset S2 Microscopy images of meiotic metaphases I from natural *A. suecica* and neo-synthetic plants 1 and 2 (Zeiss ZEN).

Dataset S3 FISH images from natural *A. suecica* (Zeiss ZEN).

Dataset 4 FISH images from neo-synthetic plant 1 (Zeiss ZEN).

Dataset S5 FISH images from neo-synthetic plant 2 (Zeiss ZEN).

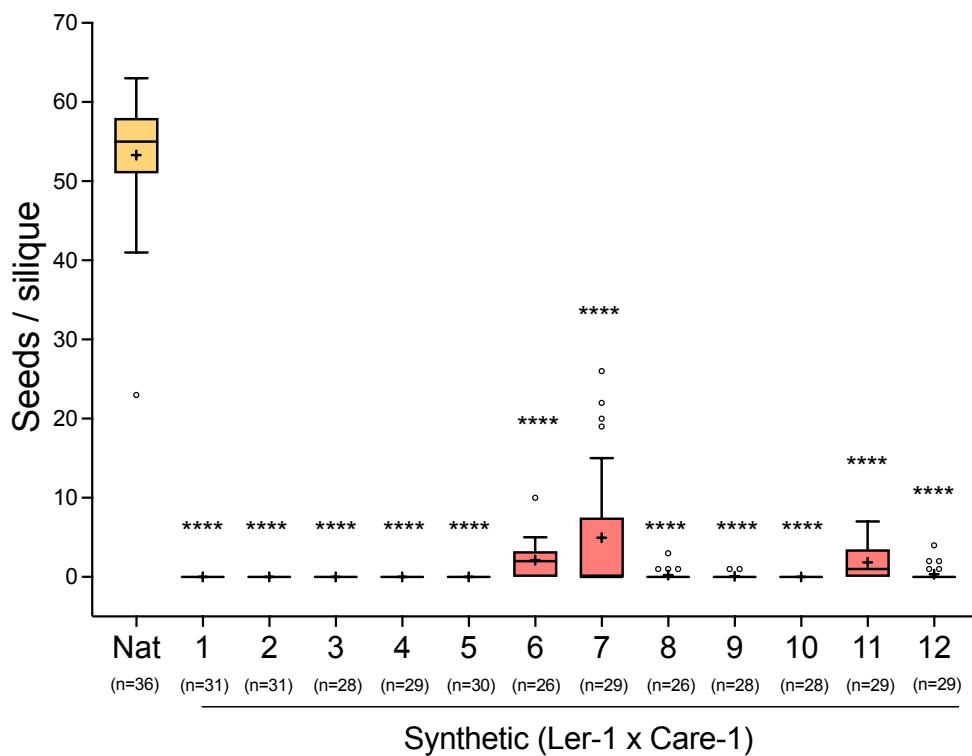
Fig. S1 Fertility of neo-synthetic *Arabidopsis suecica* generated from a cross between *Arabidopsis thaliana*, ecotype Ler and *Arabidopsis arenosa*, ecotype Care-1 is drastically reduced compared with evolved *A. suecica*.

Fig. S2 Positive correlation between pollen viability and meiotic stability in *Arabidopsis suecica*.

Fig. S3 Connections between bivalents at diakinesis in *Arabidopsis suecica*.

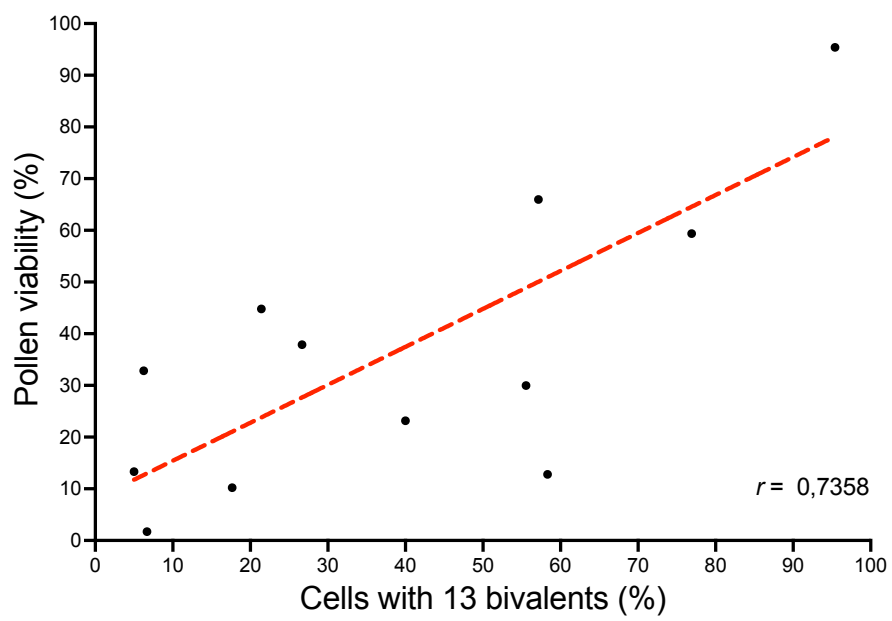
Fig. S4 Frequency distributions of AtCEN and AaCEN foci numbers in natural *Arabidopsis suecica* and the neo-synthetic plants 1 (Syn 1) and 2 (Syn 2) at zygotene, pachytene and diplotene stages.

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

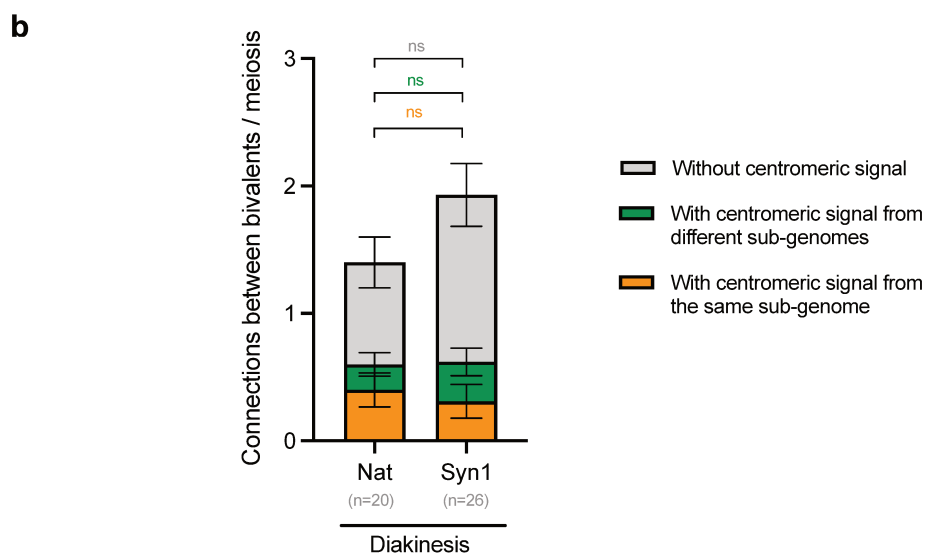
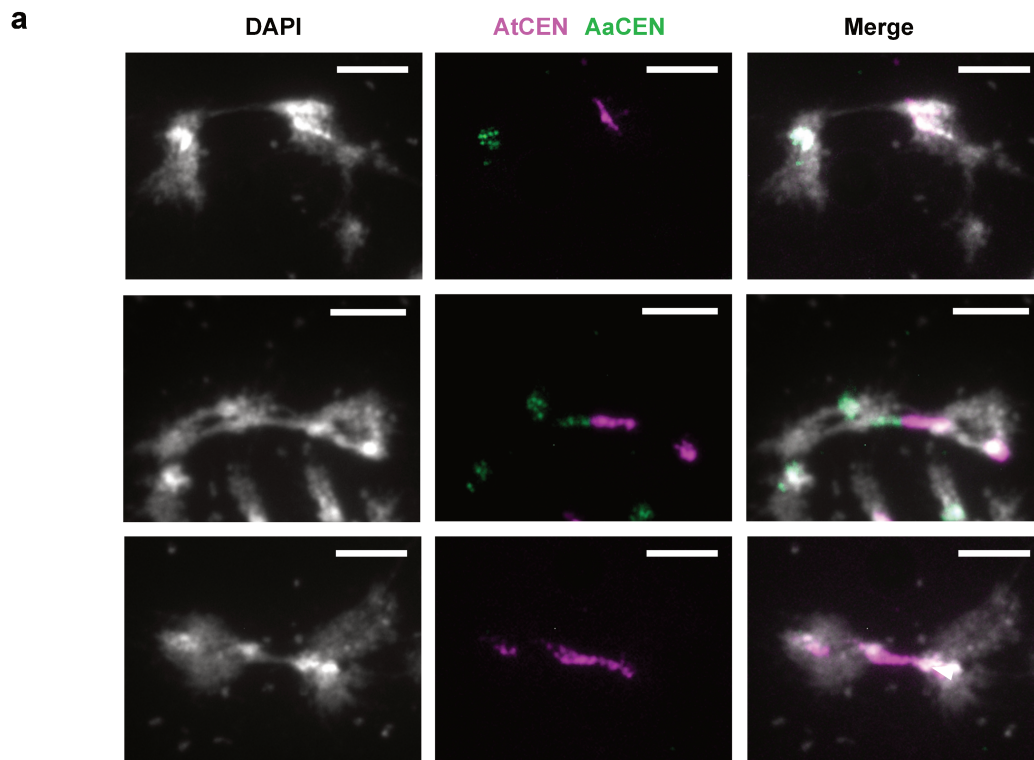


Supplementary figure 1. Fertility of neo-synthetic *A. suecica* generated from a cross between *A. thaliana*, ecotype Ler and *A. arenosa*, ecotype Care-1 is drastically reduced compared to evolved *A. suecica*.

Tukey's box plots showing the number of seeds per silique counted in ~30 siliques for the indicated genotypes. Horizontal middle lines indicate the median values and crosses, the mean values. (****p<0.0001, Kruskal-Wallis test).



Supplementary figure 2. Positive correlation between pollen viability and meiotic stability in *A. suecica*
Points represent the natural plant and the 11 first generation neo-synthetic siblings. Statistical significance was assessed using unpaired Pearson correlation coefficient ($r = 0.74$, $p = 0.0064$).



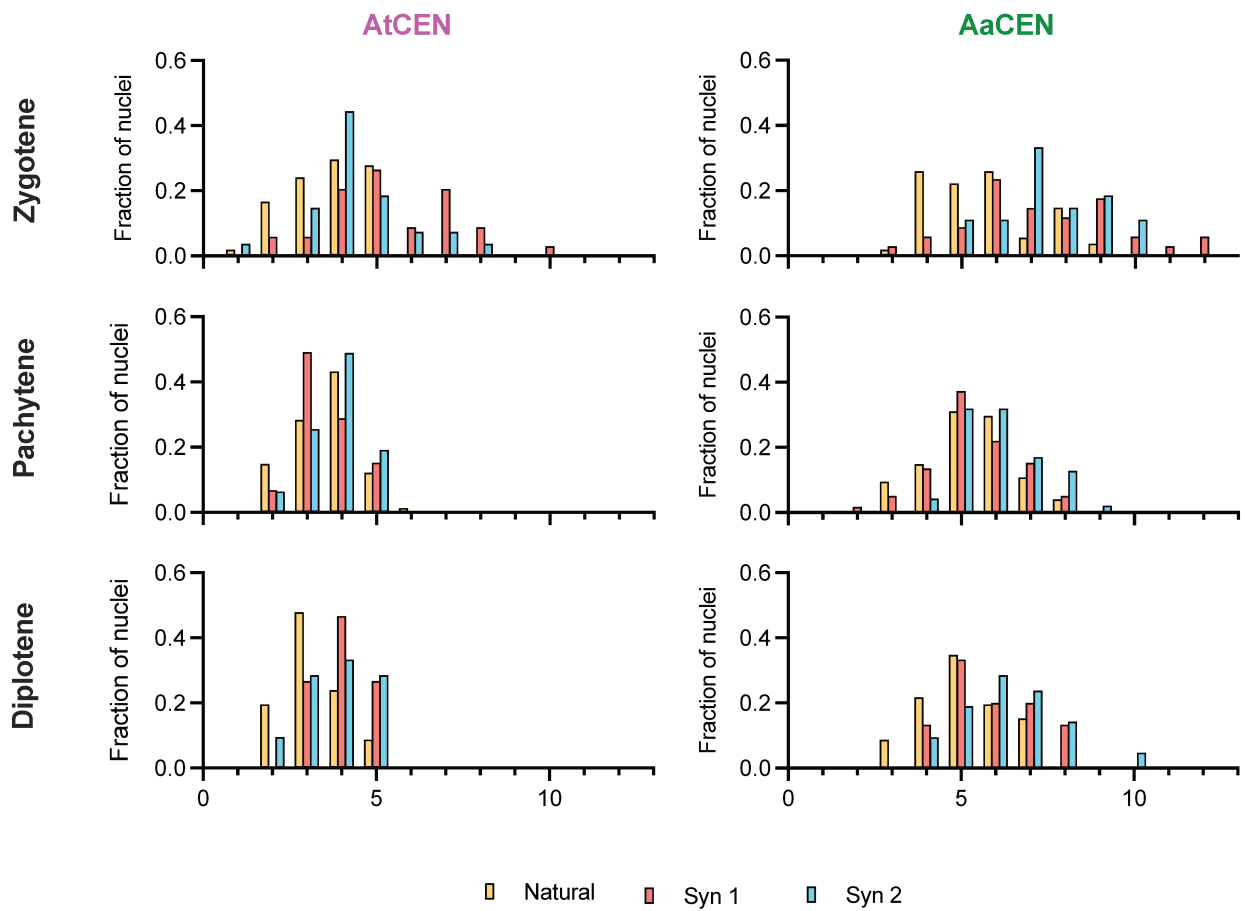
c

	Diakinesis					Metaphase I	
	Number of cells examined	Connections between bivalents per meiosis	Without centromeric signal	With centromeric signal		Number of cells examined	Multivalent per meiosis
				from different sub-genomes	from the same sub-genome		
Nat	20	1.4 ± 0.28	57%	14%	29%	46	0.02 ± 0.02
Syn	26	1.92 ± 0.35	68%	16%	16%	27	0.59 ± 0.12
p		0.405					< 0.0001

Supplementary figure 3. Connections between bivalents at diakinesis in *A. suecica*.

(a) Representative images of connections that do not contain centromeric signal (top) or containing centromeric signal from different (middle) or the same sub-genome (bottom). Chromosome spreads were probed with *A. thaliana* (AtCEN, magenta) and *A. arenosa* (AaCEN, green) specific centromeric probes and stained with DAPI (white). (Scale bars, 5 μm)

(b-c) Stacked bar and table showing the quantification of these connections in natural (Nat) and neo-synthetic plant 1 (Syn 1). Bars show mean ± SEM. Statistical significance was assessed using unpaired two-tailed Mann-Whitney tests.



Supplementary figure 4. Frequency distributions of AtCEN and AaCEN foci numbers in natural *A. suecica* and the neo-synthetic plant 1 (Syn 1) and 2 (Syn 2) at zygotene, pachytene and diplotene stages.

II. Expériences additionnelles

1) Hypothèses initiales

Pour approfondir notre étude sur les plantes néosynthétisées de première génération d'*Arabidopsis suecica*, nous avons voulu tester deux hypothèses supplémentaires.

En effet, les données démontrant une augmentation des interactions entre centromères homéologues au stade zygotène dans les méiocytes mâles des plantes néosynthétisées nous ont amené à nous interroger quant à l'évolution temporelle des différents stades méiotiques. En effet, on pourrait supposer un ralentissement de la méiose entre le stade zygotène et le stade pachytène, avec une prolongation du stade zygotène chez les plantes néosynthétisées. D'ailleurs, il est observé que les interactions entre centromères homéologues sont corrigées au stade pachytène, atteignant un niveau équivalent à celui de la plante naturelle.

De plus, de manière inattendue, une diminution du nombre de chiasma par méiocyte a été observée chez les plantes néosynthétisées de première génération d'*Arabidopsis suecica* par rapport à la plante évoluée. Nous avons voulu vérifier si cette réduction du nombre de chiasmas chez les plantes néosynthétisées pouvait être due à une diminution du nombre de cassures double brin en début de prophase I par rapport aux plantes naturelles.

2) Matériels et méthodes

i. Marquage EdU et analyse cytologique

Les solutions de travail d'EdU ont été préparées dans un tampon PBS 1X à la concentration 10 mM. Les hampes florales avec une inflorescence apicale ont été immergées dans l'eau pour éviter la formation de bulles d'air dans les tissus vasculaires lors de la coupure oblique réalisée avec une lame de rasoir (4-5 cm sous l'inflorescence). Puis, les hampes florales avec les inflorescences ont été incubées pendant 2 heures dans des tubes contenant la solution d'EdU placés dans les mêmes conditions de croissance que les plantes. Après 2 heures d'incubation, la solution d'EdU est échangée avec de l'eau plusieurs fois pour stopper l'addition d'EdU. Après 15h, 20h, 25h et 30h, les inflorescences sont fixées dans une solution 100% éthanol : acide acétique 3 :1 (v/v) pendant 3 x 3 min et stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

Ensuite, les chromosomes ont été étalés comme précédemment décrit dans la partie « Meiotic chromosome spreads » du matériel et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023. Les lames ont été lavées deux fois avec la solution 4T (4x SSC, 0,05% v/v Tween 20) et une fois avec la solution PBS 1X. Puis, chaque lame a été incubée 30 min à 37°C dans une chambre

humide sombre avec 30 µl de mélange Click-iT™ contenant 25,8 µl de tampon de réaction Click-iT EdU, 1,2 µl de CuSO₄, 0,075 µl de fluorochrome Alexa Fluor azide et 3 µl de tampon de réaction additif. Pour finir, les lames ont été lavées une fois dans du PBS 1X puis séchées et montées dans du milieu VECTASHIELD contenant du DAPI (1,5 µg ml⁻¹ ; Vector Laboratories Inc.)

Toutes les observations ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager.Z1 avec un objectif Plan Apochromat x100 avec immersion dans l'huile et des filtres appropriés (DAPI et DsRed).

ii. Immunomarquage des protéine RAD51 et DMC1

Pour chaque lame, un bourgeon frais d'*Arabidopsis suecica* a été sélectionné selon sa taille (son stade méiotique) sur du papier filtre. Puis, ce bourgeon a été disséqué pour collecter les anthères dans 10 µl de mélange de digestion (0,4 % de cytohélicase, 1,5% de sucrose et 1% de polyvinylpyrrolidone), et digéré pendant 5 min à 37°C dans un incubateur maison humide. Les anthères ont ensuite été écrasées à l'aide d'une aiguille puis incubées à 37°C pendant 10 min dans l'incubateur maison. 10 µl de lipsol à 2% ont été ajoutés à la lame et étalés pendant 2 min puis incubés pendant 4 min à température ambiante. Sous la sorbonne, 40 µl de paraformaldéhyde à 4% ont été immédiatement ajoutés et étalés sur la lame puis, la lame a été laissée à sécher pendant 3 h.

Après séchage, un lavage avec de l'eau et trois lavages avec du PBST ont été réalisés puis la lame a été incubée pendant 30 min avec 50 µl de solution de blocage (3% BSA dans du PBST) et 50 µl d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage ont été ajoutés : cochon d'inde anti-ASY1 1/250, lapin anti-DMC1 1/100 et rat anti-RAD51 1/500. La lame a ensuite été incubée dans une chambre humide sombre à 4°C pendant une nuit. Après cette incubation, la lame a été lavée trois fois dans la solution de PBST, 50 µl d'anticorps secondaires dilués dans la solution de blocage ont été ajoutés à la lame qui a ensuite été incubée dans une chambre humide sombre à 37°C pendant 1h. Les concentrations des anticorps secondaires sont les suivantes : Cy3 anti-rat/cochon d'inde 1/100 et Alexa 488 anti-lapin 1/100 (ThermoFisher). Après incubation, la lame a été lavée 3 fois dans la solution de PBST, séchée et montée dans du milieu VECTASHIELD contenant du DAPI (1,5 µg ml⁻¹ ; Vector Laboratories Inc.).

Toutes les observations ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioImager.Z1 avec un objectif Plan Apochromat x100 avec immersion dans l'huile et des filtres appropriés (DAPI, DsRed et GFP).

3) Résultats

i. La plante néoallopolyploïde ne montre aucun changement majeur de la cinétique de la méiose

Pour évaluer si la durée des différents stades de la méiose mâle d'*Arabidopsis suecica* est différente chez les plantes néosynthétiques par rapport aux plantes naturelles évoluées, nous avons réalisé pendant 2 heures un marquage EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine), un analogue de la thymidine qui s'incorpore lors de la phase S de réplication de l'ADN précédent le début de la prophase I. Ainsi, les méiocytes mâles ayant incorporés l'EdU dans leur ADN ont pu être analysés par microscopie pour déterminer leurs stades méiotiques.

Après 15 heures d'incubation, les méiocytes de la plante naturelle et de la plante synthétique 11 aux stades interphase, leptotène et zygotène sont marqués avec de l'EdU (**Figure 21**). Cependant, des informations sont manquantes quant à la présence d'EdU dans les cellules méiotiques au stade pachytène de la plante naturelle. Après 20 et 25 heures, la méiose a continué son déroulement, comme le montrent les cellules marquées (**Figure 21**). Il n'est pas étonnant que les cellules soient marquées au même stade méiotique à deux intervalles de temps différents étant donné que la durée du stade pachytène est estimée à environ 10 heures chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Prusicki *et al.*, 2019). Cependant, pour la plante synthétique, aucune cellule à ce stade n'a pu être analysée (**Figure 21**). Pour finir, 30 heures après l'incubation, bon nombre de données sont manquantes aussi bien chez la plante synthétique que chez la plante naturelle. Ainsi, les cellules marquées avec de l'EdU ont pu être observées jusqu'au stade télophase I pour la plante synthétique et jusqu'au stade diacinèse pour la plante naturelle (**Figure 21**).

Ainsi, ces données préliminaires montrent qu'aucun changement drastique de la cinétique de la méiose n'est observé chez la plante néosynthétique par rapport à la plante naturelle d'*Arabidopsis suecica*. De plus, ces expériences ont pu mettre en évidence des durées de phases méiotiques similaires à celles de la plante diploïde *Arabidopsis thaliana* (Prusicki *et al.*, 2019).

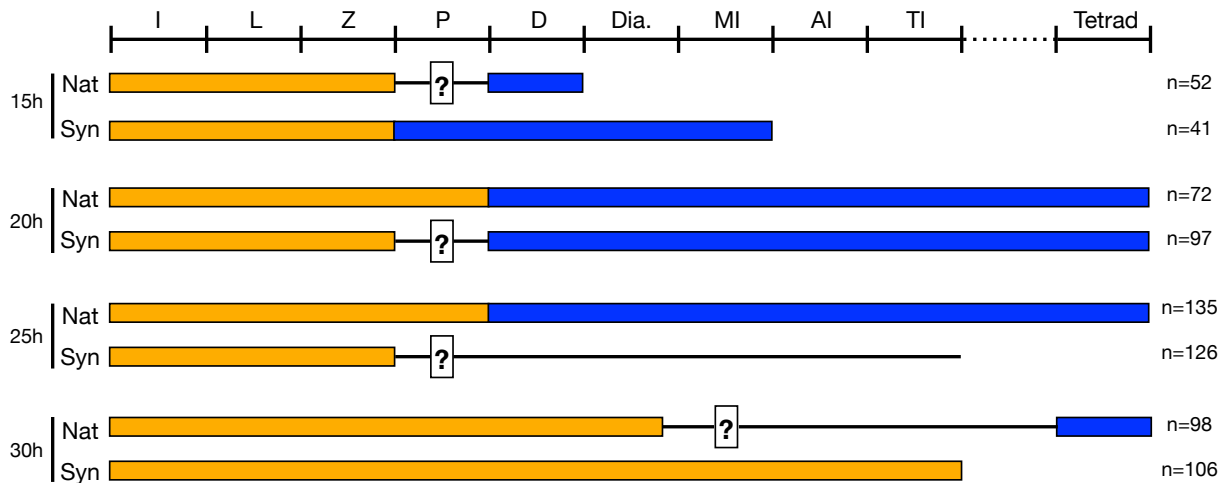


Figure 21 : Aucun changement drastique de la cinétique de la méiose mâle n’est observé chez la plante néosynthétisée par rapport à la plante naturelle d’*Arabidopsis suecica*.

Comparaison des chronologies méiotiques de la plante naturelle et de la plante néosynthétique 11 obtenues par marquage EdU (incubation de 2 heures) ; après la fixation des inflorescences à différents temps (indiqués à gauche). I signifie interphase, L pour leptotène, Z pour zygotène, P pour pachytène, D pour diplotène, Dia pour diacinèse, MI pour métaphase I, AI pour anaphase I et TI pour télophase I. En orange sont représentés les stades où les cellules méiotiques mâles sont marquées par l’EdU et en bleu, les phases méiotiques pour lesquelles les cellules n’ont pas incorporé d’EdU. Les point d’interrogation (?) représentent les stades méiotiques pour lesquels des informations sont manquantes, aucune cellule de ces stades n’a pu être analysée.

ii. Des essais d’immunomarquage non concluants sur *Arabidopsis suecica*

Pour tester une possible réduction du nombre de cassures double-brin en début de méiose chez la plante néosynthétique, nous avons réalisé des immunomarquages ASY1/RAD51 et ASY1/DMC1. Malgré de multiples tentatives, les immunomarquages ASY1/RAD51 et ASY1/DMC1 de cellules au stade leptotène se sont avérés infructueux. En effet, l’immunomarquage de la protéine ASY1 est bien réalisé mais celui de RAD51 et de DMC1 ressemble à un nuage de points difficilement quantifiable.

Ainsi, la question de savoir si la réduction du nombre de chiasma dans les plantes néosynthétiques d’*Arabidopsis suecica* serait liée à une réduction du nombre de cassures reste ouverte.

III. Résumé

Cette comparaison entre des plantes néosynthétisées d'*A. suecica* de première génération et des plantes d'*A. suecica* évoluées a permis de mettre en évidence chez les plantes synthétiques :

- Une considérable variabilité de la fertilité, du comportement méiotique et du niveau de recombinaison homéologue entre des plantes néosynthétiques sœurs
- Une dynamique des centromères altérée pendant le stade zygotène avec une augmentation des interactions entre centromères homéologues
- Une recombinaison homéologue fréquente associée à une réduction de la recombinaison homologue
- Une hypothèse solide selon laquelle la fidélité du choix du partenaire de recombinaison est perturbée pendant la première méiose des plantes néoallopolyploïdes
- Une cinétique de la méiose qui n'est pas drastiquement affectée

CHAPITRE 3 : Étude de l'évolution de la stabilité méiotique de plantes néosynthétisées d'*Arabidopsis suecica* dans les premières générations

I. Hypothèses initiales

Pour rappel, les plantes néosynthétisées présentent une réduction de la fertilité et de la stabilité méiotique, tandis que les plantes évoluées se caractérisent par une fertilité élevée et une méiose stable. Plusieurs scénarios ont été envisagés quant à la restauration de la fertilité et de la stabilité méiotique chez les plantes néosynthétisées d'*A. suecica* (**Figure 22**). En effet, la restauration de la fertilité pourrait se produire de manière progressive, s'effectuer en deux temps ou en un seul temps (**Figure 22A**). De même, pour la restauration de la stabilité méiotique (**Figure 22B**). Quant au parallèle entre les restaurations de fertilité et de stabilité méiotique, ces restaurations pourraient se produire chronologiquement de manière identique, simultanée, ou l'une pourrait précéder l'autre dans le temps (**Figure 22B**). Nous nous attendions initialement à une restauration rapide de la stabilité méiotique au cours de ma thèse, en nous basant sur l'observation du laboratoire de Lucas Comai et de notre ancienne stagiaire en Master 2, Valentine Petiot. Ils avaient constaté une restauration complète de la stabilité méiotique chez des plantes néosynthétisées d'*A. suecica* (issues du croisement entre *A. thaliana* d'écotype Ler doublé à la colchicine et *A. arenosa* d'écotype Care-1) à la sixième génération.

De plus, les différentes lignées néosynthétiques d'*A. suecica* pourraient avoir un devenir différent, il pourrait y avoir des lignées tout à fait capables de restaurer la fertilité/méiose dans leurs progénitures alors que d'autres n'y parviendraient pas à cause, par exemple, de la ségrégation de variants génétiques qui affecterait la fertilité/méiose.

J'ai donc étudié l'évolution de la stabilisation de la fertilité et de la méiose sur les premières générations de plantes néosynthétisées d'*A. suecica* issues d'un seul croisement, sur 7 lignées indépendantes, durant quatre générations successives.

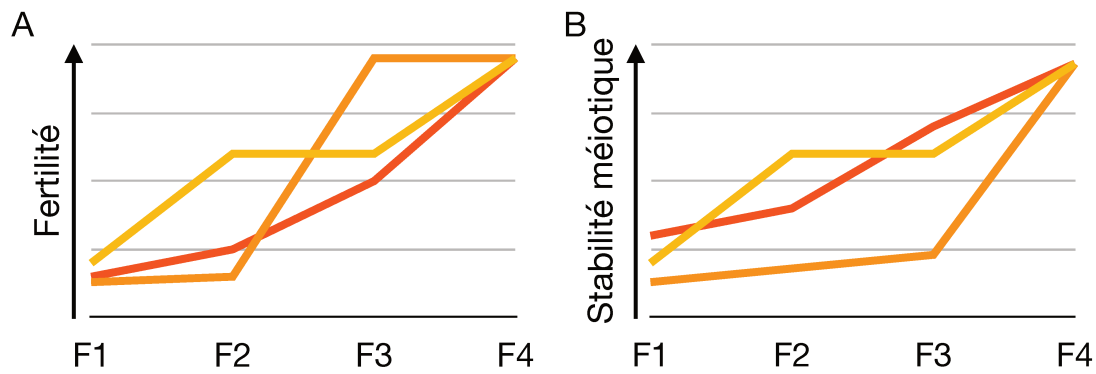


Figure 22 : Différents scénarios possibles quant à la restauration de la fertilité et de la stabilité méiotique chez les plantes néosynthétisées d'*Arabidopsis suecica* au cours de 4 générations.

- (A) Scénarios envisageables pour la restauration de la fertilité des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* au cours des 4 premières générations. La restauration pourrait être progressive/linaire au cours des générations (en rouge), s'opérer en deux temps (en jaune) ou être achevée en un seul temps dès la troisième génération (en orange). Il est également possible que certaines lignées ne montrent jamais d'amélioration.
- (B) Scénarios possibles de restauration de la stabilité méiotique des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* sur 4 générations successives. La restauration de la stabilité méiotique pourrait être identique (en jaune), plus rapide (en rouge) ou moins rapide (en orange) que la restauration de la fertilité.

II. Matériels et méthodes

1) Matériel végétal et conditions de croissance

Après un seul croisement entre la plante maternelle autotétraploïde *A. thaliana* Wa-1 (provenant du NASC, N22644) et la plante paternelle *A. Arenosa* Care-1 (provenant d'ABRC, CS3901), les plantes néosynthétiques de première génération ont été créées (Chéron *et al.*, 2023) et analysées sur cinq générations successives (**Figure 23A**). Concernant la sélection de ces lignées, les plantes ont été choisies selon la méthode de « Single seed descent » où la viabilité des grains de pollen a été analysée chez 10 descendants de chaque F1 pour sélectionner la plante présentant le plus haut pourcentage de viabilité des grains de pollen (**Figure 23B**). Ceci a été appliqué sur les générations suivantes (**Figure 23B**).

Concernant l'accession naturelle d'*A. suecica* ASS3 (Burns *et al.*, 2021) utilisée dans cette étude, elle a été obtenue dans le laboratoire de Magnus Nordborg (Institut Gregor Mendel, Autriche).

Les plantes d'*Arabidopsis suecica* ont été stratifiées à 4°C pendant une semaine, puis cultivées dans des conditions de jours longs (16 h : 8 h, lumière : obscurité) à 23°C pendant 4 semaines. Les plantes ont ensuite été vernalisées à 12°C pendant 4 semaines et ramenées à 23°C pour induire la floraison.

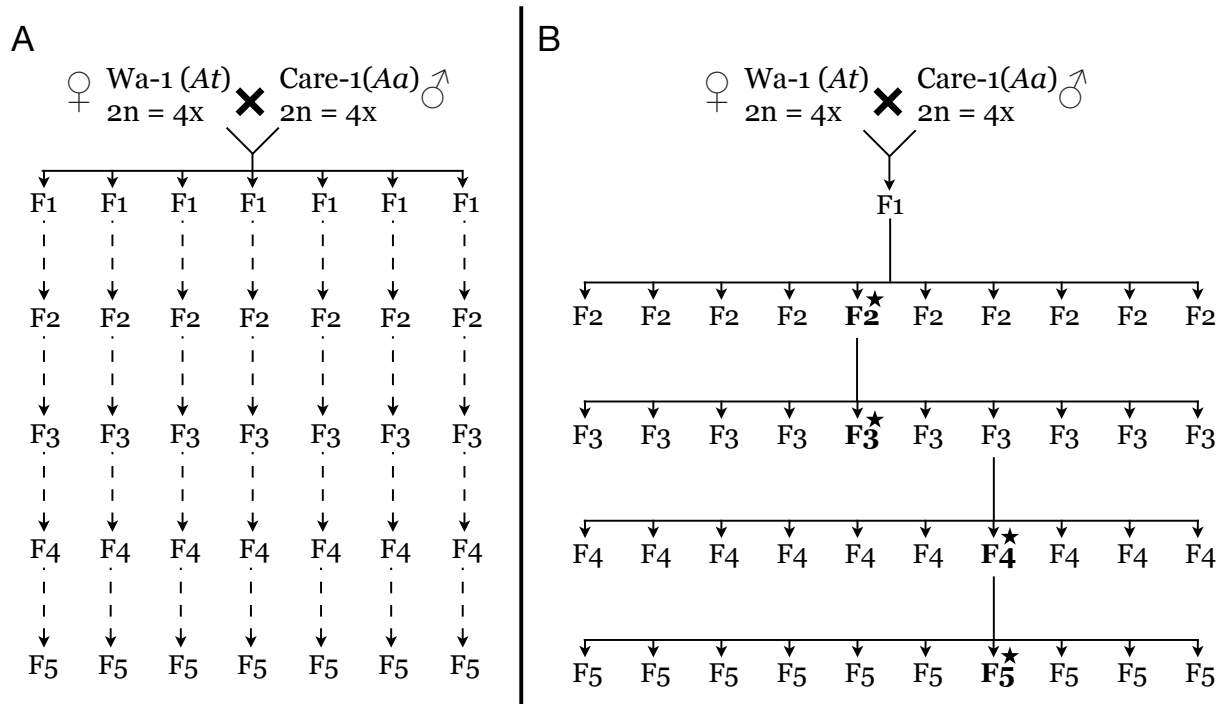


Figure 23 : Le croisement et la formation des différentes lignées d'*Arabidopsis suecica* resynthétisées analysées au cours de 5 générations.

(A) Après le croisement entre la plante maternelle autotétraploïde *A. thaliana* Wa-1 et la plante paternelle *A. Arenosa* Care-1, sept lignées indépendantes de plantes néosynthétiques de première génération ont été créées. Ces différentes lignées ont été étudiées sur 5 générations successives.

(B) Pour chaque lignée, la viabilité des grains de pollen de 10 descendants a été analysée afin de sélectionner la plante ayant la plus haute viabilité des pollens (représenté en gras avec une étoile). Ceci a également été réalisé pour les générations suivantes.

2) Analyse de la viabilité des grains de pollen

Voir partie Matériels et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023

3) Étalements des chromosomes méiotiques

Voir partie Matériels et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023

III. Résultats

1) La fertilité des plantes synthétiques d'*A. suecica* reste réduite malgré une augmentation de la viabilité des grains de pollen au cours des générations

Comme décrit dans l'article Chéron *et al.*, 2023, les plantes néosynthétiques de première génération ont montré une corrélation positive entre la stabilité méiotique (estimée par la proportion de cellules avec 13 bivalents) et la viabilité des pollens ($r=0,74$, $P= 0,0064$). Dans l'objectif de restaurer rapidement la stabilité méiotique au cours des générations, nous avons choisi de sélectionner pour les 7 lignées indépendantes de plantes néosynthétiques de première génération générée dans l'article Chéron *et al.*, 2023, la plante fille ayant le plus haut pourcentage de viabilité des grains de pollen parmi 10 descendants et ce, pour chaque génération en utilisant la solution d'Alexander (**Figure 23**).

Comme attendu, au cours des 3 premières générations, une augmentation croissante de la viabilité des pollens est observée pour les 7 lignées indépendantes de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* (**Figure 24A**). En effet, en première génération, la viabilité des pollens est comprise entre 12,78% (lignée 3) et 65,97% (lignée 7) alors qu'en troisième génération, elle augmente et varie entre 54,18% (lignée 1) et 89,72% (lignée 7) (**Figure 24A**). La lignée 3 montre la plus grande amélioration de viabilité des pollens avec en première génération 12,78% de pollens viables et en cinquième génération, 90,82% de pollens viables ce qui est très proche du pourcentage de viabilité des pollens de la plante naturelle d'*A. suecica* de 95,4% (**Figure 24A**). Cependant, certaines lignées (les lignées 1, 2, 4 et 6) présentent en quatrième et/ou en cinquième génération une stabilisation du pourcentage de viabilité des pollens et d'autres lignées (les lignées 5 et 7) montrent une diminution modérée de la viabilité des pollens de la génération 3 à la génération 5 (**Figure 24A**).

De plus, pour certaines lignées (par exemple la lignée 2 pour les générations 2, 3 et 4), les descendants se regroupent en deux populations : une population qui montre une augmentation de la viabilité des pollens par rapport à la plante progénitrice et une autre population avec une diminution du pourcentage de viabilité des pollens par rapport au parent (de la génération précédente) (**Figure 24A**).

Concernant la fertilité des plantes néosynthétiques d'*A. suecica*, pour l'ensemble des lignées, la moyenne du nombre de graines par silique reste faible au cours de ces 5 générations, ne dépassant pas 41% de la moyenne du nombre de graines par silique de la plante naturelle d'*A. suecica* dans la plupart des lignées (**Figure 24B**). Néanmoins, la lignée 3 montre une tendance à l'augmentation du nombre de graines par silique de la génération 1 à la génération

5, atteignant en cinquième génération 65% de la valeur moyenne de graines par silique de la plante naturelle d'*A. suecica* (Figure 24B).

Ainsi, malgré une amélioration de la viabilité des pollens, la fertilité des différentes lignées de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* reste relativement faible, à l'exception de la lignée 3.

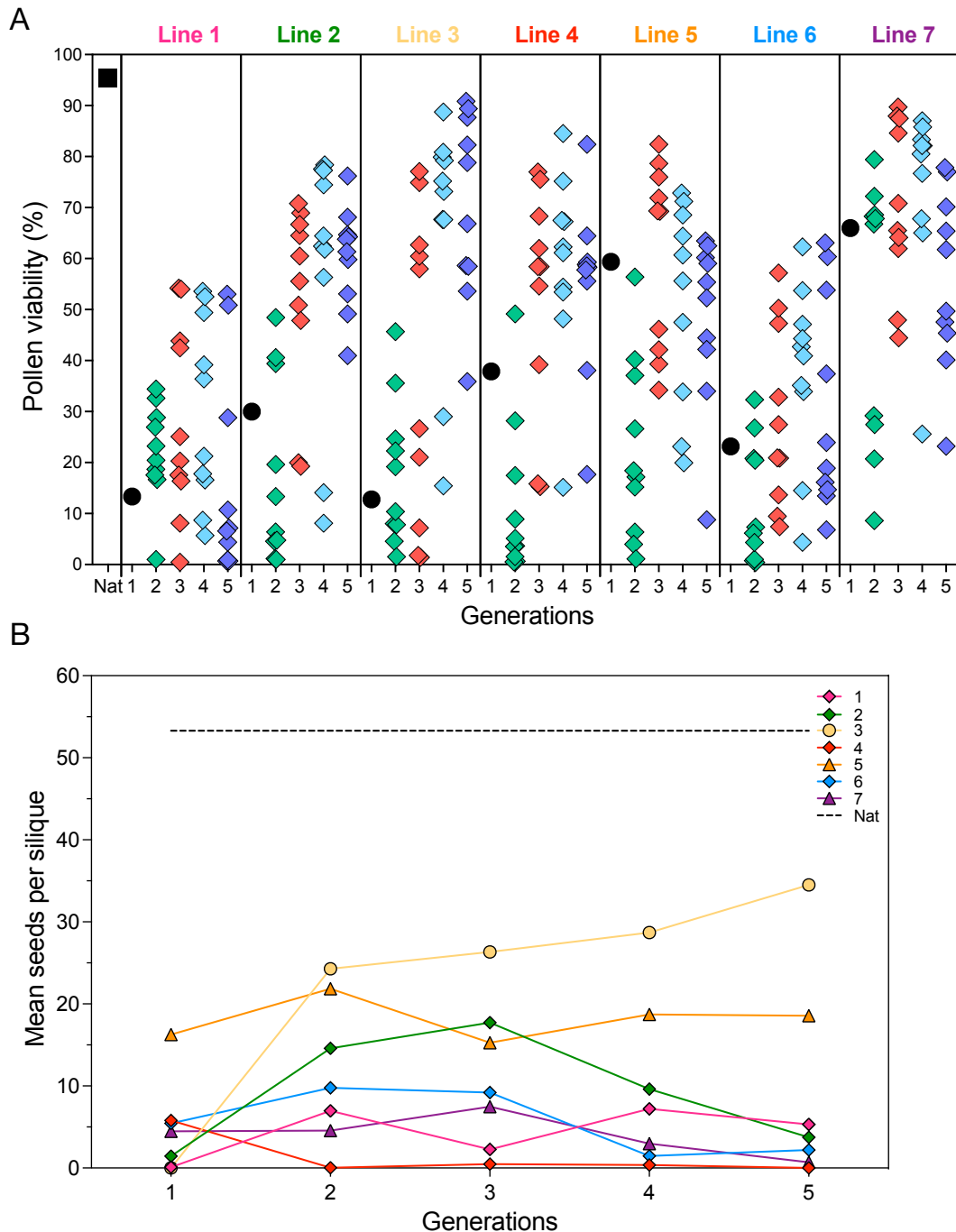


Figure 24 : Évolution de la viabilité des grains de pollen et de la fertilité de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* au cours de cinq générations successives.

(A) Viabilité des grains de pollen évaluée à l'aide de la coloration d'Alexander dans la plante naturelle d'*A. suecica* (Nat, carré noir) et les différentes lignées d'*A. suecica* néosynthétiques

au cours des générations (indiquées en haut du graphique). Chaque point représente une plante pour laquelle la moyenne de deux inflorescences différentes pour lesquelles au moins 500 pollens ont été analysés. Le rond noir représente le pourcentage de viabilité des pollens de la génération 1 et les losanges vert, rouge, bleu et violet, la viabilité des pollens pour les générations 2, 3, 4 et 5, respectivement.

(B) Nombre moyen de graines par silique comptées dans environ 30 siliques pour la plante naturelle et les 7 lignées de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* au cours de 5 générations successives (indiqué sur le graphique).

2) Une variabilité dans l'évolution de la stabilité méiotique est observée chez les différentes lignées d'*A. suecica* néosynthétiques

Pour étudier l'évolution de la stabilité méiotique des néoallopolyploïdes, nous avons réalisé des étalements de chromosomes colorés au DAPI de cellules mères de pollen d'*A. suecica* et analysé les cellules méiotiques au stade métaphase I. La stabilité méiotique a été évaluée en calculant la proportion de méiocytes présentant 13 bivalents en métaphase I. De la génération 1 à la génération 4, les lignées néosynthétiques présentent des schémas d'évolution de la stabilité méiotique distincts (les données de la 5^{ème} génération n'ont pas encore été générées).

En premier lieu, dans la lignée 1, le pourcentage de cellules en métaphase I avec 13 bivalents correctement appariés reste stable et très faible au cours des 4 générations successives, ne dépassant pas 18% par rapport au 93% de la plante naturelle d'*A. suecica* (**Figure 25A**). Par ailleurs, dans cette lignée, le pourcentage de cellules avec des anomalies méiotiques tend à rester élevé au cours des générations avec en moyenne sur 4 générations 65% de cellules avec au moins un univalents et 56% de cellules avec au moins un multivalent contrairement à la plante évoluée d'*A. suecica* qui présente 7% de cellules avec des univalents et 0% de cellules avec des multivalents (**Figure 25B et C**).

En deuxième lieu, les lignées 2 et 5 montrent une diminution importante de la stabilité méiotique de la génération 1 à la génération 4 avec un pourcentage de cellules avec 13 bivalents qui décline d'environ 35% pour la lignée 2 et d'environ 44% pour la lignée 5 (**Figure 25A**). Ceci étant associé à une augmentation notable du pourcentage de cellules avec des univalents (d'environ 39% et 25% pour les lignées 2 et 5, respectivement) et de cellules avec des multivalents (d'environ 37% et 56% pour les lignées 2 et 5, respectivement) (**Figure 25B et C**).

En troisième lieu, la lignée 4 témoigne d'une augmentation accrue de la stabilité méiotique sur les trois premières générations avec 27% de cellules avec 13 bivalents en

génération 1 et jusqu'à 71% de cellules avec 13 bivalents en génération 3 (**Figure 25A**). Toutefois, une réduction drastique de la stabilité méiotique de 51% est rapportée entre les générations 3 et 4 (**Figure 25A**). En parallèle, le pourcentage de cellules avec au moins un univalent suit la tendance inverse (67% en 1^{ère} génération, 14% en 3^{ème} génération puis 50% en génération 4) (**Figure 25B**). Concernant les cellules avec au moins un multivalent, le pourcentage oscille grandement avec un taux en génération 4 qui atteint 50% (**Figure 25C**).

En dernier lieu, les lignées 3, 6 et 7 présentent une tendance à la diminution de la stabilité méiotique de la génération 1 à la génération 3 puis une amélioration importante du pourcentage de cellules avec 13 bivalents entre la 3^{ème} et la 4^{ème} génération est observée (ceci étant moins marqué pour la lignée 3). En effet, pour les lignées 6 et 7, toutes deux rapportent une réduction d'environ 40 points de pourcentage de cellules avec 13 bivalents entre les générations 1 et 3 et une augmentation du pourcentage de cellules avec 13 bivalents de la 3^{ème} à la 4^{ème} génération de 50% et de 42% pour les lignées 6 et 7, respectivement (**Figure 25A**). Concernant les anomalies méiotiques, les pourcentages sont variables entre les différentes lignées, aussi bien pour les univalents que pour les multivalents mais les pourcentages de cellules avec des univalents et des multivalents ne dépassent respectivement pas 50 et 40% en quatrième génération (**Figure 25B et C**).

Par conséquent, l'analyse des cellules méiotiques au stade métaphase I des 7 lignées indépendantes de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* a permis de mettre en évidence quatre tendances distinctes dans l'évolution de la stabilité méiotique au cours des quatre premières générations suivant l'hybridation entre *A. thaliana* et *A. arenosa*.

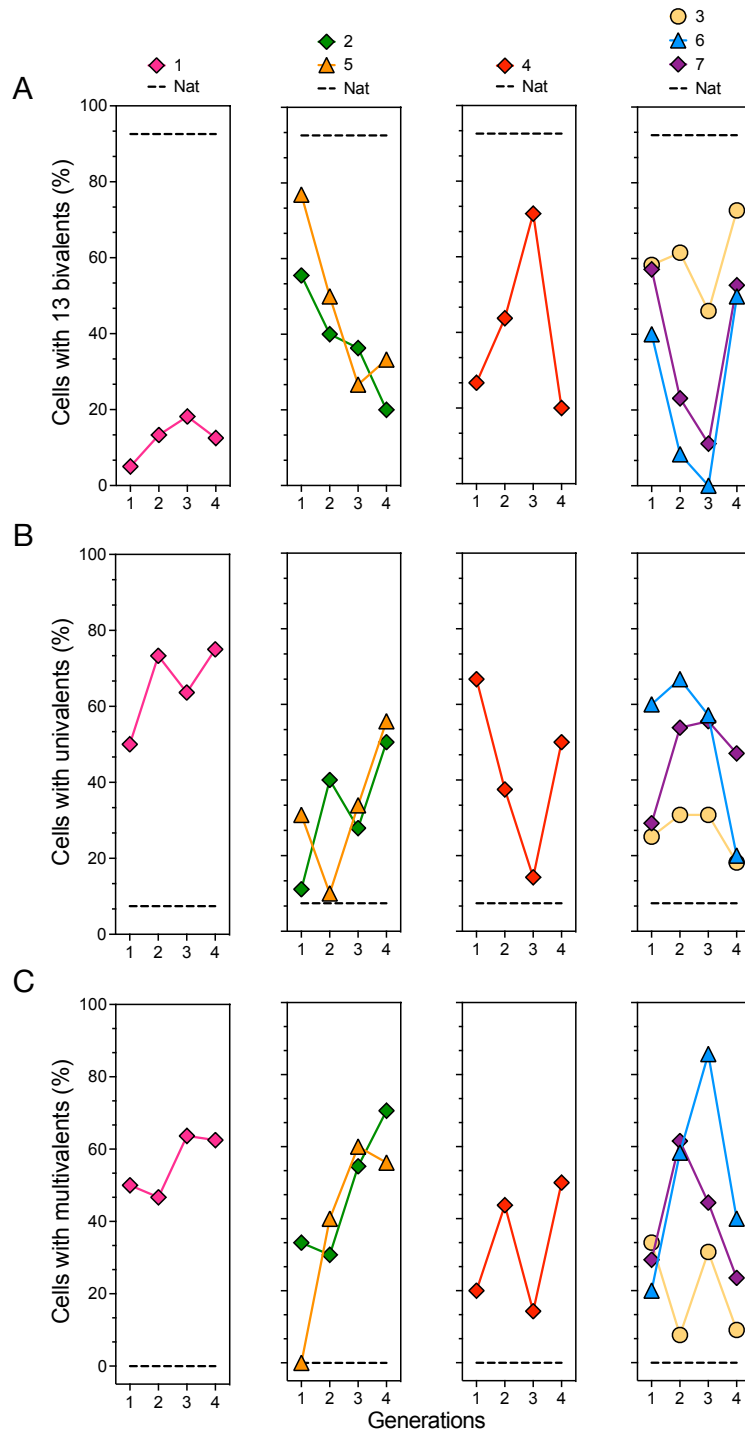


Figure 25 : Les lignées indépendantes de plantes néosynthétisées d'*Arabidopsis suecica* montrent des voies différentes d'évolution de la stabilité méiotique.

(A) Pourcentage de cellules avec 13 bivalents en métaphase I, (B) avec au moins un univalent et (C) avec au moins un multivalent dans la plante naturelle (n=27) et les sept lignées de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* (quantifiées sur un intervalle de n=7 à n=17 cellules).

3) Il n'y a pas de corrélation directe entre la viabilité des grains de pollen et la stabilité méiotique chez les plantes néoallopolyploïdes d'*A. suecica*

Pour examiner le lien entre une amélioration de la viabilité des grains de pollen et un accroissement de la stabilité méiotique, nous avons choisi d'étudier parmi les 10 descendants de plante néosynthétique de première génération, la plante G2 (génération 2) ayant le plus haut pourcentage de viabilité des grains de pollen, nommée HPV (High Pollen Viability) et une autre plante sœur G2 avec le plus faible pourcentage de viabilité des pollens, nommée LPV (Low Pollen Viability) (en génération 2). Cette analyse a été réalisée sur les lignées 2 et 7 des plantes issues des générations G2, G3 et G4 pour évaluer la viabilité des pollens ainsi que sur les plantes issues des générations G2 et G3 pour étudier la stabilité méiotique (**Figure 26A**). Les plantes G3 et G4 ont été sélectionnées comme précédemment, en choisissant celles présentant le pourcentage le plus élevé de viabilité des grains de pollen.

Comme attendu, on constate une tendance à l'augmentation de la viabilité des pollens similaire entre les lignées HPV et LPV à partir de la troisième et de la quatrième génération pour les lignées 2 et 7, respectivement (**Figure 26A**). Cependant, l'évolution de la stabilité méiotique est différente entre les lignées 2 et 7. En effet, dans la lignée 2, il est observé un pourcentage de cellules avec 13 bivalents qui au cours de deux générations (2 et 3) reste supérieur pour la lignée 2 – HPV (36%) par rapport à la lignée 2 – LPV (17%) (**Figure 26B**). Par ailleurs, en deuxième génération, le pourcentage de cellules avec 13 bivalents est plus élevé pour la lignée 7 – LPV (50%) que pour la lignée 7 – HPV (23%) alors qu'en troisième génération, ces pourcentages sont rapportés proche dans les deux lignées (**Figure 26C**).

Toutefois, dans les lignées 2 et 7, on remarque que les lignées HPV et LPV présentent toutes deux une tendance à la diminution de la stabilité méiotique de la génération 1 à la génération 3.

Ainsi, cette étude a permis de démontrer qu'il n'y a pas de corrélation directe entre une amélioration ou une aggravation de la viabilité des grains de pollen et le devenir de la stabilité méiotique chez ces plantes néosynthétiques d'*A. suecica*.

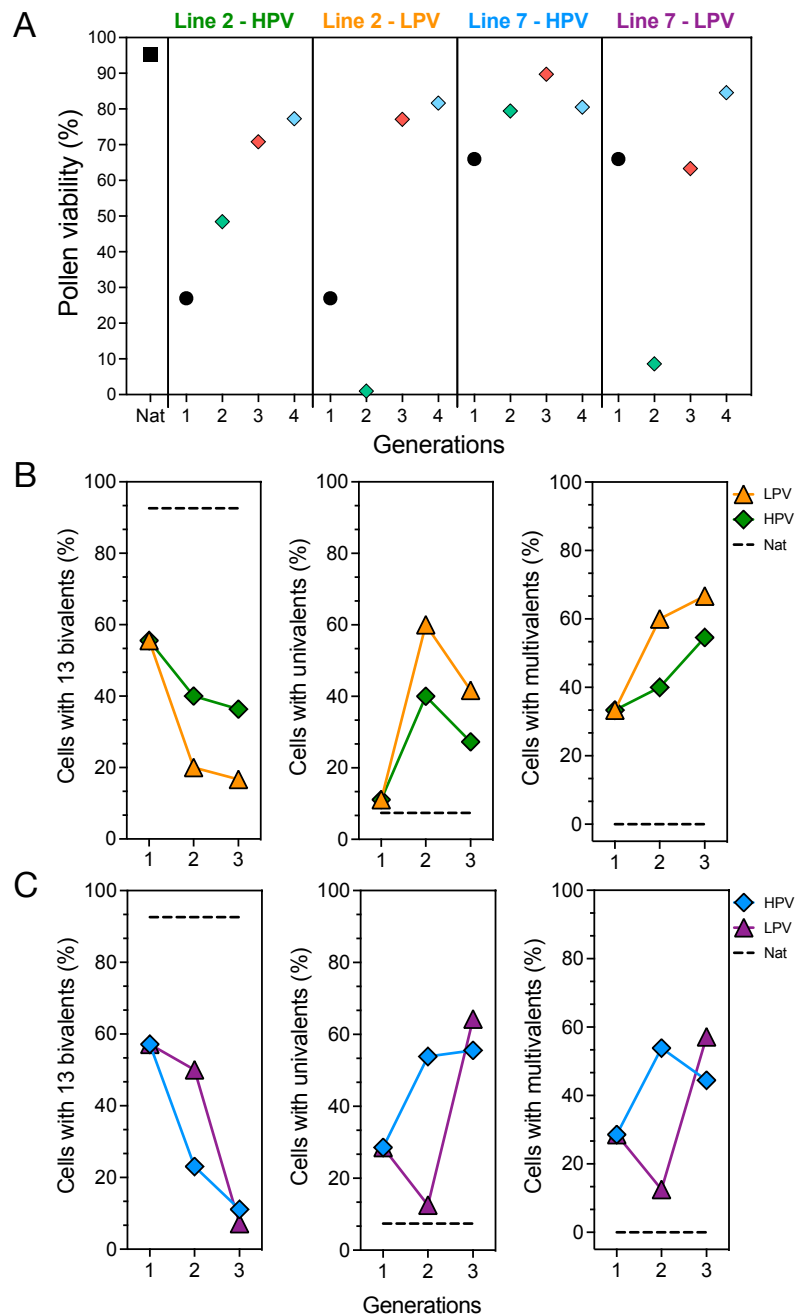


Figure 26 : L'évolution de la viabilité des grains de pollen n'est pas corrélée à une stabilisation de la méiose chez les plantes néoallopolyploïdes d'*A. suecica*.

- (A) Viabilité des grains de pollen évaluée à l'aide de la coloration d'Alexander dans la plante naturelle d'*A. suecica* (Nat, carré noir) et les différentes lignées d'*A. suecica* néosynthétiques (indiquées en haut du graphique) au cours des générations. Chaque point représente la moyenne de deux inflorescences différentes pour lesquelles au moins 500 pollens ont été analysés. Le rond noir représente le pourcentage de viabilité des pollens de la génération 1 et les losanges vert, rouge, bleu la viabilité des grains de pollen pour les générations 2, 3 et 4, respectivement.
- (B) Pourcentage de cellules avec 13 bivalents en métaphase I, avec au moins un univalent et avec au moins un multivalent dans la plante naturelle (n=27), la lignée 2 – HPV (High Pollen

Viability) et la lignée 2 – LPV (Low Pollen Viability) de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* (quantifiées sur un intervalle de n=8 à n=13 cellules).

(C) Pourcentage de cellules avec 13 bivalents en métaphase I, avec au moins un univalent et avec au moins un multivalent dans la plante naturelle (n=27), la lignée 7 – HPV (High Pollen Viability) et la lignée 7 – LPV (Low Pollen Viability) de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* (quantifiées sur un intervalle de n=9 à n=14 cellules)

IV. Résumé

Cette étude sur sept lignées indépendantes de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* au cours des premières générations a permis de caractériser l'évolution de la fertilité et de la stabilité méiotique chez de jeunes allopolyploïdes après l'hybridation, explorant ainsi plusieurs routes évolutives possibles. De plus, elle a souligné que :

- La sélection des plantes présentant la plus haute viabilité des pollens à chaque génération a permis d'observer une augmentation significative de la viabilité pollinique, atteignant pour certaines le pourcentage observé chez la plante naturelle. Cependant, pour deux lignées néosynthétiques, cette augmentation s'infléchit après la troisième génération.
- Une amélioration de la viabilité des grains de pollen n'est pas suffisante pour restaurer la fertilité des plantes pour la majorité des lignées
- 4 voies distinctes d'évolution de la stabilité méiotique sont caractérisées chez ces plantes néoallopolyploïdes
- Le lien entre la restauration de la viabilité des grains de pollen et la stabilité méiotique est absent dans les lignées 2 et 7

CHAPITRE 4 : Analyse de l'expression des gènes méiotiques dans les plantes néosynthétisées d'*Arabidopsis suecica*

I. Hypothèses initiales

Au début de ma thèse, aucune étude transcriptomique n'avait encore été réalisée sur les méiocytes mâles de plantes d'*A. suecica* naturelle et néosynthétique. Nous avons émis l'hypothèse que les différences de stabilité méiotique observées entre les plantes néosynthétiques et naturelles, ainsi qu'entre plantes néosynthétiques sœurs, pourraient être liées à des variations dans l'expression de régulateurs clés de la stabilité méiotique et éventuellement de la recombinaison homéologue. L'objectif de cette étude était donc de mener une analyse transcriptomique sans *a priori* pour comparer et analyser le transcriptome de ces plantes afin d'identifier des gènes candidats responsables de l'instabilité méiotique chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica* de première génération.

II. Matériels et méthodes

1) Matériel végétal pour le séquençage d'ARN

Les données transcriptomiques générées dans cette étude incluent une plante naturelle d'*A. suecica* ASS3 (Burns *et al.*, 2021) (provenant du laboratoire de Magnus Nordborg, Institut Gregor Mendel en Autriche) et deux plantes néosynthétiques d'*A. suecica* F1.1 et F1.5, provenant de l'hybridation entre *A. thaliana* Wa-1 et *A. arenosa* Care-1 (Chéron *et al.*, 2023).

Les plantes d'*Arabidopsis suecica* ont été stratifiées à 4°C pendant une semaine, puis cultivées dans des conditions de jours longs (16 h : 8 h, lumière : obscurité) à 23°C pendant 4 semaines. Les plantes ont ensuite été vernalisées à 12°C pendant 4 semaines et ramenées à 23°C pour induire la floraison. Pour les plantes naturelles et néosynthétiques, 3 et 2 collections indépendantes de méiocytes ont été réalisées, respectivement.

2) Extraction et séquençage des ARN

Les cellules méiotiques ont été isolées et leur ARN extrait selon le protocole de (Chen & Retzel, 2013). Les bourgeons floraux en début de prophase I d'une taille comprise entre 0,6 et 0,65 mm ont été sélectionnés sur papier filtre humide. Les bourgeons ainsi que les anthères ont ensuite été disséqués soigneusement avec des aiguilles à dissection dans 20 µl de solution de tampon de collection (0,5X Murashige and Skoog medium, 20% de sucrose et 1U/

µl d'inhibiteur RNase) pour faire sortir les colonnes archéporiennes sporogènes (CAS) contenant les méiocytes (**Figure 27**). Les CAS ont ensuite été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur maison (aminée au niveau de l'embout avec un brûleur à alcool) puis collectées dans un tube eppendorf placé dans de la glace contenant 20 µl de solution de tampon de collection. Chaque tube a été congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C. Pour chaque réplicat, 50 CAS ont été prélevées.

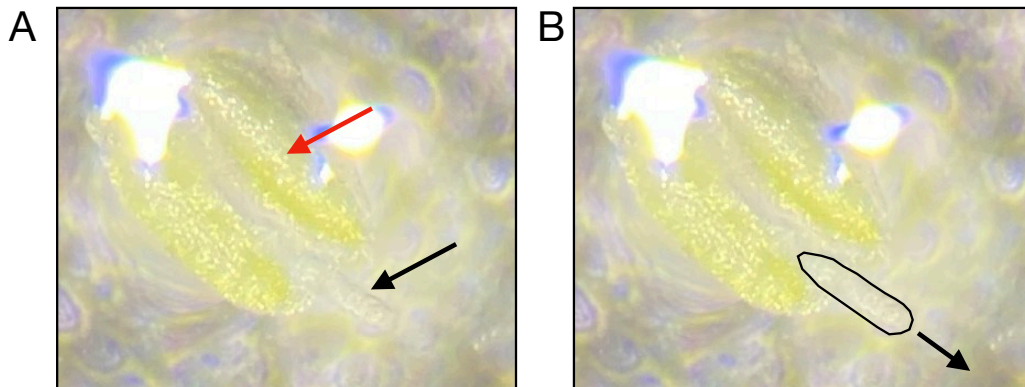


Figure 27 : Extraction d'une colonne archéporienne sporogène contenant les méiocytes mâles

- (A) Photo d'une anthère d'*A. suecica* prise sous une loupe binoculaire. Un des sacs polliniques est indiqué par la flèche rouge et la colonne archéporienne sporogène (CAS) contenant les méiocytes mâles par la flèche noire.
- (B) Pour dégager et prélever la CAS du sac pollinique, il faut délicatement taper sur le sac pollinique dans la direction indiquée par la flèche noire.

Les ARN totaux des méiocytes ont ensuite été extraits avec l'aide du kit RNAqueous™-Micro Kit en adaptant la procédure pour des microdissections par capture laser (LCM) avec les modifications suivantes : étape 1.a, incubation à 42°C pendant 15 min et en choisissant pour l'étape 4, « to recover large and small RNA species : Add 1,25 volumes of 100% ethanol ». La concentration et l'intégrité des échantillons d'ARN ont été évaluées par la compagnie BGI Genomics (Beijing Genomics Institute) à l'aide du kit Agilent 2100 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Une purification de l'ARNm et de la queue poly(A) a ensuite été réalisée par BGI Genomics.

Les bibliothèques ont été préparées par BGI Genomics avec le protocole « BGISEQ-500 Ultra Low Input RNA Sample Library Construction Protocol » et amplifiées pour produire des nanoballes d'ADN contenant plus de 300 copies d'une molécule d'ADN. Les bibliothèques ont ensuite été séquencées avec la méthode DNBSEQ™ par BGI Genomics. Le logiciel SOAPnuke développé par BGI Genomics a ensuite filtré les données brutes contenant les séquences de

mauvaises qualités ou les séquences d'adaptateurs pour obtenir 30M de reads propres de 100 pb paired-end.

3) Analyse bioinformatique des ARN messagers

Les reads propres ont été alignés au génome de référence d'*A. suecica* ASS3 en utilisant l'outil RNA-STAR (Galaxy Version 2.7.2b) en autorisant 0 mismatch (--outFileMismatchNmax = 1). Les nombres de reads par gène annoté ont ensuite été comptés en utilisant l'outil htseq-count (Galaxy Version 0.9.1 +galaxy 1) (mode : union, stranded : no, minimum alignment quality : 10, feature type : gene) et les RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) normalisés ont été calculés pour estimer le niveau d'expression des gènes dans chaque échantillon. Par la suite, l'analyse des gènes différentiellement exprimés a été effectuée par l'outil DeSeq2 (Galaxy Version 2.11.40.6 +galaxy 1) (paramètre par défaut). Les gènes ayant un fold-change (FC) de 2 et une *P*-value ajustée < 0,05 sont identifiés comme des gènes différentiellement exprimés.

III. Résultats

1) La proportion de gènes exprimés en méiose est similaire entre les plantes naturelles et néosynthétiques d'*A. suecica*

Dans le but d'établir une comparaison des transcriptomes de méiocytes mâles entre les plantes naturelles et néosynthétiques de première génération d'*A. suecica*, nous avons choisi d'étudier deux types de plantes néosynthétiques décrites dans l'article Chéron *et al.*, 2023. La plante F1.1 qui présentait une méiose remarquablement instable avec seulement 15% de méiocytes en métaphase I avec 13 bivalents (50% de cellules avec au moins un univalent et 50% avec au moins un univalent) et la plante F1.5 avec une méiose moins instable avec 67% de cellules avec 13 bivalents (30% de cellules avec au moins un univalent et absence de multivalents) (**Figure 28**).

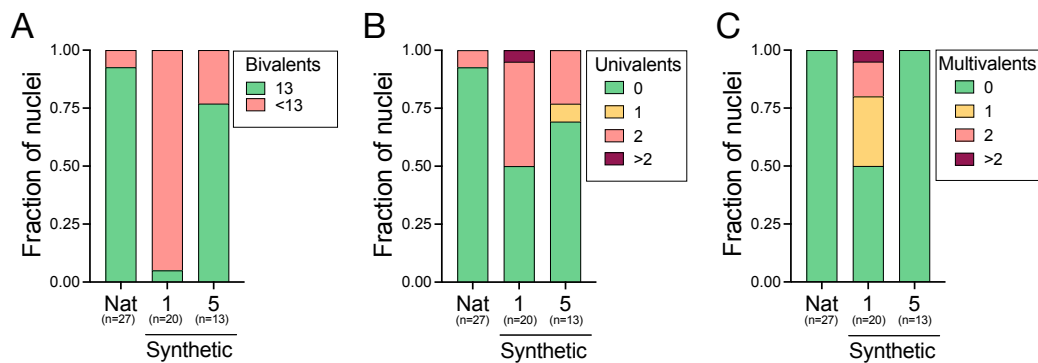


Figure 28 : Caractérisation des anomalies méiotiques retrouvées chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

- (A) Fraction de noyaux avec 13 bivalents au stade métaphase I dans les plantes naturelles (Nat, écotype ASS3) et néosynthétiques d'*A. suecica* issues d'un croisement entre *A. thaliana* Wa-1 et *A. arenosa*, écotype Care-1.
- (B) Fraction de noyaux avec un ou plusieurs univalents au stade métaphase I dans les génotypes indiqués
- (C) Fraction de noyaux avec un ou plusieurs multivalents au stade métaphase I dans les génotypes indiqués

Les données du séquençage des ARN des plantes naturelles et néosynthétiques d'*A. suecica* ont été alignées sur le génome de référence d'*A. suecica* écotype ASS3 en autorisant aucun mésappariement. Nous observons des pourcentages d'alignement unique similaires entre réplicats biologiques d'une même plante (**Tableau 1**). En effet, entre 66,06 et 69,97% des reads sont alignés uniquement pour la plante naturelle ASS3 et pour les plantes néosynthétiques, ce pourcentage diminue et est compris entre 54,07% et 58,90% (**Tableau 1**). Une des hypothèses privilégiées sur la réduction de ce pourcentage d'alignement unique chez les plantes néosynthétiques serait liée à la variabilité génétique entre les plantes néosynthétiques générées et le génome de référence utilisé. En effet, l'hybridation de ces plantes n'a pas été réalisée avec les mêmes parents et comme mentionné dans la partie IV.1) du CHAPITRE 1, la ploïdie des parents d'*A. suecica* naturelle est toujours sujet à débat. Dans notre étude, nous avons choisi de recréer l'espèce *A. suecica* en utilisant deux parents issues de populations autotétraploïdes, ce qui simplifie le croisement en évitant la nécessité de doubler le génome après l'hybridation. Ainsi, la perte de reads alignés uniquement serait due à la présence de polymorphismes entre les séquences des plantes néosynthétiques F1 générées et le génome de référence d'*A. suecica* (ASS3).

Sample name	Number of input reads	Uniquely mapped reads number	Uniquely mapped rate (%)	Multiple loci mapped reads number	Multiple loci mapped rate (%)
ASS3_1	35708381	23590375	66,06	1243463	3,48
ASS3_2	36129101	25279465	69,97	1310773	3,63
ASS3_3	36023156	25168837	69,87	1269831	3,53
F1.1_1	36118962	20800959	57,59	1161191	3,21
F1.1_2	36164045	20517637	56,73	1221990	3,38
F1.5_1	32247157	17434842	54,07	1026794	3,18
F1.5_2	36179481	21308908	58,90	1255275	3,47

Tableau 1 : Statistiques descriptives du séquençage d'ARN dans une plante naturelle (ASS3) et deux plantes néosynthétiques (F1.1 et F1.5) d'*A. suecica*

Pour évaluer la proportion de gènes exprimés en méiose dans les méiocytes mâles, nous avons étudié les niveaux d'expression géniques normalisés entre répliquats biologiques d'une même plante dans les 7 échantillons en RPKM (Reads Per Kilobase per Million Mapped reads) (**Figure 29**). Nous pouvons constater que les proportions de gènes non exprimés (ayant un RPKM égale à 0) et de gènes exprimés avec un RPKM supérieur à 0 sont similaires entre les 7 répliquats (**Figure 29**). Ainsi, environ 25-30% de gènes ne sont pas exprimés dans les plantes naturelles et les plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 d'*A. suecica* (**Figure 29**). Comme contrôle positif de notre étude, nous avons confirmé que les gènes impliqués dans la méiose, tels que DMC1 et SPO11-1, sont bien exprimés dans nos 7 répliquats biologiques (RPKM > 0).

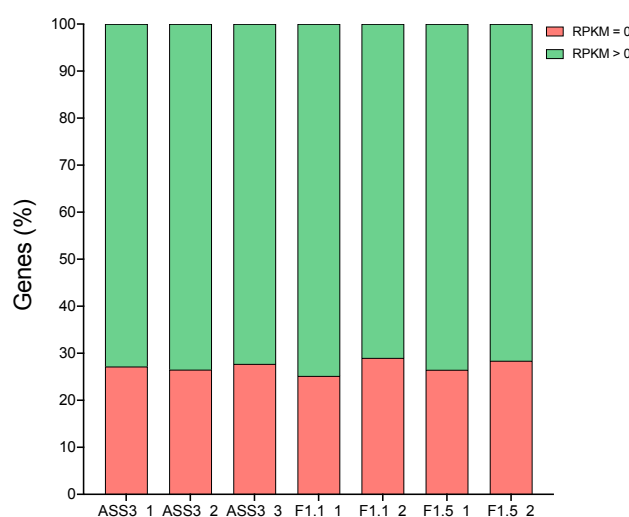


Figure 29 : Caractérisation globale des transcriptomes de plantes d'*A. suecica*

Pourcentage de gènes non exprimés (RPKM = 0, en rose) et exprimés (RPKM > 0, en vert) dans les 3 répliquats de la plante naturelle ASS3 et 2 répliquats des plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5.

2) Comparaison globale des transcriptomes de plantes naturelles et néosynthétiques d'*A. suecica*

Pour étudier les différences entre les transcriptomes de plantes naturelles et néosynthétiques d'*A. suecica*, nous avons réalisé l'analyse de gènes différentiellement exprimés à l'aide de l'outil DeSeq2 entre les conditions ASS3 vs. F1.1, ASS3 vs. F1.5 et F1.1 vs. F1.5. Lorsqu'on regarde la répartition des gènes sur les chromosomes d'*A. suecica*, on remarque une augmentation des gènes différentiellement exprimés sur les chromosomes du sous-génome d'*A. arenosa* (P -value ajustée $\leq 0,01$, **Figure 30**).

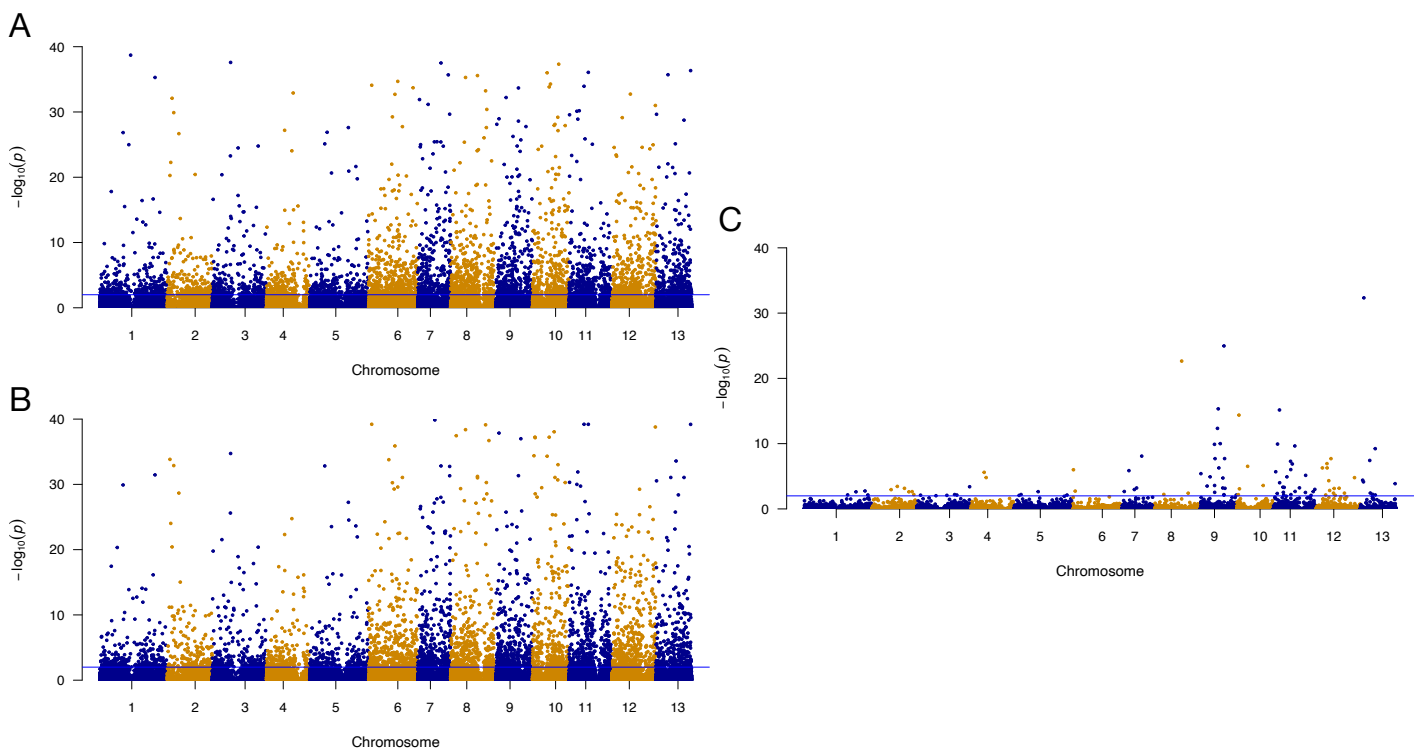


Figure 30 : Diagrammes de Manhattan montrant les gènes différentiellement exprimés.

- (A) Diagramme de Manhattan des résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition ASS3 vs. F1.1. Chaque point représente un gène et la position génomique physique (chromosome) est indiquée sur l'axe des abscisses avec les 13 chromosomes d'*A. suecica* : les chromosomes 1 à 5 appartenant au sous-génome d'*A. thaliana* et les chromosomes 6 à 13, au sous-génome d'*A. arenosa*. Sur l'axe des ordonnées, le $-\log_{10}(P)$ dépeint la significativité de différence d'expression de chaque gène avec comme seuil, la ligne bleue qui représente la P -value ajustée égale à 0,01.
- (B) Diagramme de Manhattan des résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition ASS3 vs. F1.5.
- (C) Diagramme de Manhattan des résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition F1.1 vs. F1.5.

De plus, lorsqu'on regarde plus précisément les gènes différentiellement exprimés qui sont sur-exprimés ou sous-exprimés dans les différentes conditions, on remarque une proportion plus importante de gènes surexprimés dans la plante naturelle ASS3 par rapport aux plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 que de gènes sous-exprimés (*P-value* ajustée < 0,05 et FC de 2, **Figure 31A et B**). Il est important de noter que dans notre étude n'a pas pris en compte les éventuels polymorphismes de séquences entre les séquences des plantes néosynthétiques et la plante naturelle ASS3 de référence, ce qui pourrait réduire le nombre de reads correctement alignés sur le génome de référence pour les plantes néosynthétiques. Au total pour les conditions ASS3 vs. F1.1 et ASS3 vs. F1.5, il existe, respectivement, 3861 et 3942 gènes surexprimés ainsi que 1885 et 1538 gènes sous-exprimés dans la plante naturelle ASS3 (*P-value* ajustée < 0,05 et FC de 2, **Figure 31D et E**). Néanmoins, entre les plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5, il y a autant de gènes sur- et sous-exprimés dans la plante F1.1 par rapport à la plante F1.5 : 92 gènes sont surexprimés et 90 sous-exprimés (*P-value* ajustée < 0,05 et FC de 2, **Figure 31C, D et E**).

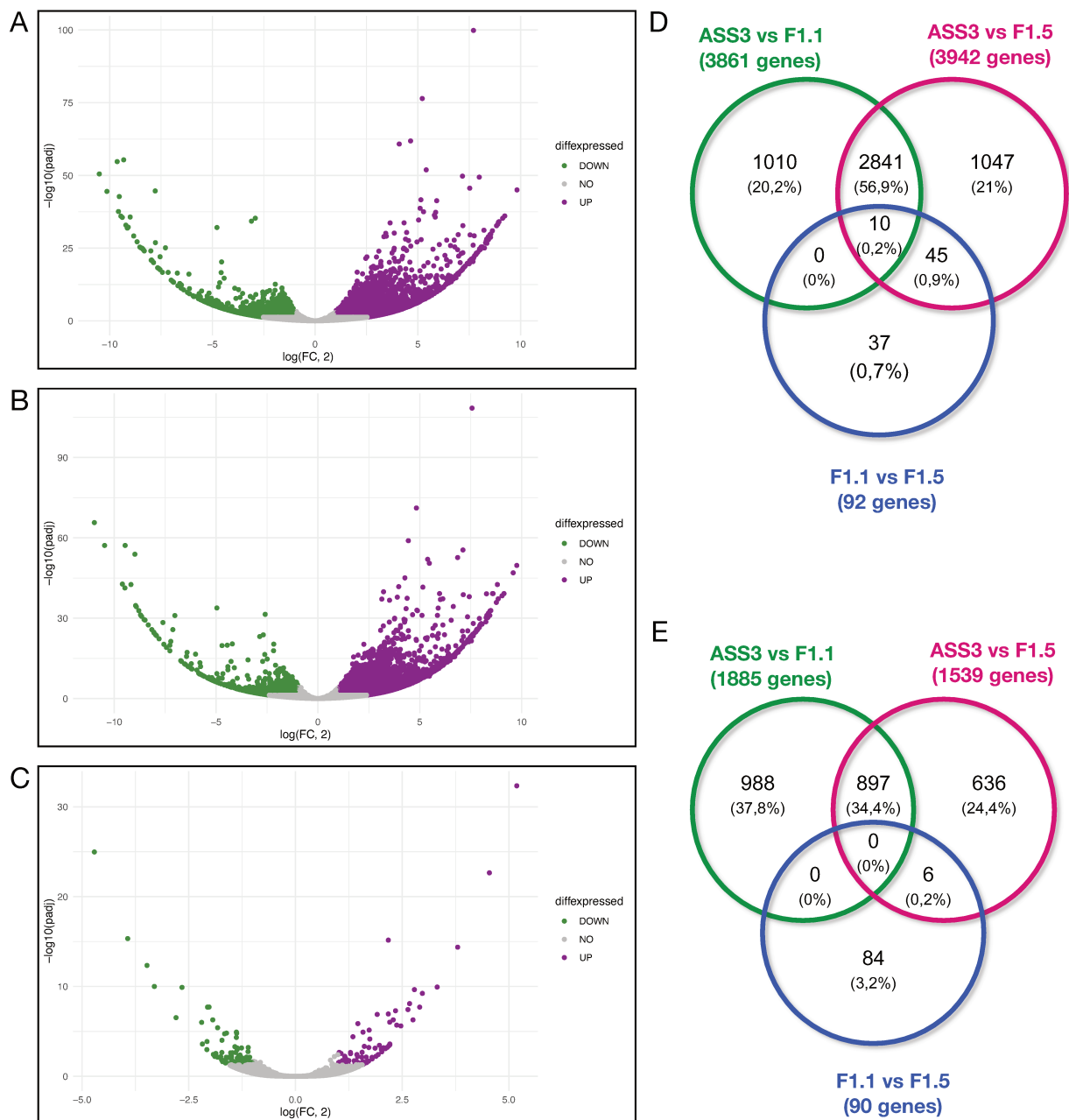


Figure 31 : Comparaison des gènes différentiellement exprimés entre les différentes conditions.

- (A) Diagramme de Volcan illustrant les résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition ASS3 vs. F1.1. Chaque point violet représente un gène surexprimé (P -value ajustée $< 0,05$ et $\text{FC} > 2$) et chaque point vert désigne un gène sous-exprimé dans la condition ASS3 vs. F1.1 (P -value ajustée $< 0,05$ et $\text{FC} < 2$). Le $\log(\text{FC}, 2)$ est indiqué sur l'axe des abscisses et le $-\log_{10}(P\text{-value})$ sur l'axe des ordonnées.
- (B) Diagramme de Volcan illustrant les résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition ASS3 vs. F1.5.
- (C) Diagramme de Volcan illustrant les résultats de l'analyse de gènes différentiellement exprimés réalisée avec l'outil DeSeq2 pour la condition F1.1 vs. F1.5.

- (D) Diagramme de Venn des gènes surexprimés montrant les expressions distinctes et chevauchantes entre les différentes conditions (P -value ajustée $< 0,05$ et FC > 2). Les conditions ASS3 vs. F1.1, ASS3 vs. F1.5 et F1.1 vs. F1.5 sont représentées en vert, rose et bleu, respectivement.
- (E) Diagramme de Venn des gènes sous-exprimés montrant les expressions distinctes et chevauchantes entre les différentes conditions (P -value ajustée $< 0,05$ et FC < 2). Les conditions ASS3 vs. F1.1, ASS3 vs. F1.5 et F1.1 vs. F1.5 sont représentées en vert, rose et bleu, respectivement.

3) Des gènes méiotiques connus sont sous-exprimés dans les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

Pour analyser l'ontologie de ces gènes différentiellement exprimés, nous avons dans un premier temps utilisé un tableau de correspondance des séquences d'*A. suecica* avec celles d'*A. thaliana*, obtenu en alignant les séquences d'*A. suecica* sur le génome d'*A. thaliana* à l'aide de l'outil BLAST (généreusement partagé par le D^r Andrew Lloyd, Aberystwyth University) (Sayers *et al.*, 2021). Ce tableau nous a permis d'identifier les gènes similaires entre *A. suecica* et *A. thaliana* qui ont des noms de gènes fonctionnels de la base de données TAIR (The Arabidopsis Information Resource) d'*A. thaliana* correspondant à notre gène différentiellement exprimé (Berardini *et al.*, 2015). À la suite de cela, nous avons effectué une analyse de GeneOntology avec l'aide de l'outil GO::TermFinder (Boyle *et al.*, 2004) pour permettre de trouver les termes GO significativement partagés entre la liste de gènes différentiellement exprimés et de découvrir les processus communs.

Dans le but d'établir une liste de gènes candidats responsables de l'instabilité méiotique chez les plantes néosynthétiques, nous avons dans un premier temps centré notre analyse sur des gènes ayant un rôle connu dans les processus de méiose I, de ségrégation des chromosomes, de la recombinaison de l'ADN, de l'assemblage du chiasma et de la division nucléaire méiotique. Ainsi, 114 et 126 gènes appartenant à ces processus sont surexprimés dans la plante ASS3 par rapport à la plante F1.1 et F1.5, respectivement (P -value $< 0,01$ avec la correction de Bonferonni). De façon intéressante, il n'existe que 6 gènes sous-exprimés qui appartiennent à ces processus dans la condition F1.1 vs. F1.5 (P -value $< 0,01$). En effet, ces 6 gènes qui jouent un rôle important lors de la méiose sont en commun entre les gènes qui sont surexprimés dans la plante naturelle par rapport aux plantes néosynthétiques et sous-exprimés dans la plante F1.1 néosynthétique ayant une méiose plus instable que la plante F1.5. Ces gènes

codent pour des composants du complexe synaptonémal comme ASY4 appartenant aux éléments axiaux et SCPE2, composante des éléments transversaux. De plus, deux gènes candidats codent pour des protéines ZMM impliquées dans la formation des crossing-overs de classe I dont HEI10 et MSH5. Concernant les deux autres gènes candidats, ils jouent un rôle lors de la méiose II avec CYCA1 qui code pour une protéine centrale du cycle cellulaire jouant un rôle lors de la microsporogénèse et NACK2 qui code une kinésine lors de la cytokinèse.

Dans le but de déterminer quels sont les mécanismes moléculaires régulant la formation d'anomalies méiotiques tels que les univalents et les multivalents retrouvés dans nos plantes néosynthétiques d'*A. suecica*, nous avons choisi d'étudier l'expression génique des gènes candidats codants pour des protéines impliquées dans la formation du complexe synaptonémal et des crossing-overs de classe I. Chez *A. suecica*, chaque protéine est codée par deux gènes homéologues présents sur chacun des sous-génomes d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa*. Lorsqu'on étudie l'expression de ces gènes (mesurée par le calcul des RPKM normalisés par plante), on observe une diminution significative de l'expression des gènes *AsAtHEI10*, *AsAtASY4*, *AsAtSCEP2* et *AsAaSCEP2* dans la plante néosynthétique F1.1 par rapport aux plantes F1.5 et ASS3 pour les gènes (**Figure 32 A, B et D**). Il existe également une tendance à la diminution de l'expression simultanément pour les deux plantes néosynthétiques par rapport à la plante naturelle pour le gène *AsAaHEI10* (**Figure 32A**). De plus, une réduction significative de l'expression par palier est suggérée pour les gènes *AsAaASY4*, *AsAtMSH5* et *AsAMSH5* avec la plante ayant la valeur la plus élevée, la plante F1.1 (ayant une méiose plus instable que la plante F1.5), la valeur la plus faible et la plante F1.5 ayant une valeur intermédiaire entre ces deux plantes (**Figure 32B et C**).

Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car l'impact des polymorphismes de séquences entre les plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 et la plante naturelle de référence ASS3 n'a pas été pris en compte dans cette analyse. Néanmoins, cette étude nous a permis d'établir une liste de gènes candidats sous-exprimés dans les méiocytes mâles de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* qui pourraient être responsables de l'instabilité méiotique observée dans ces plantes.

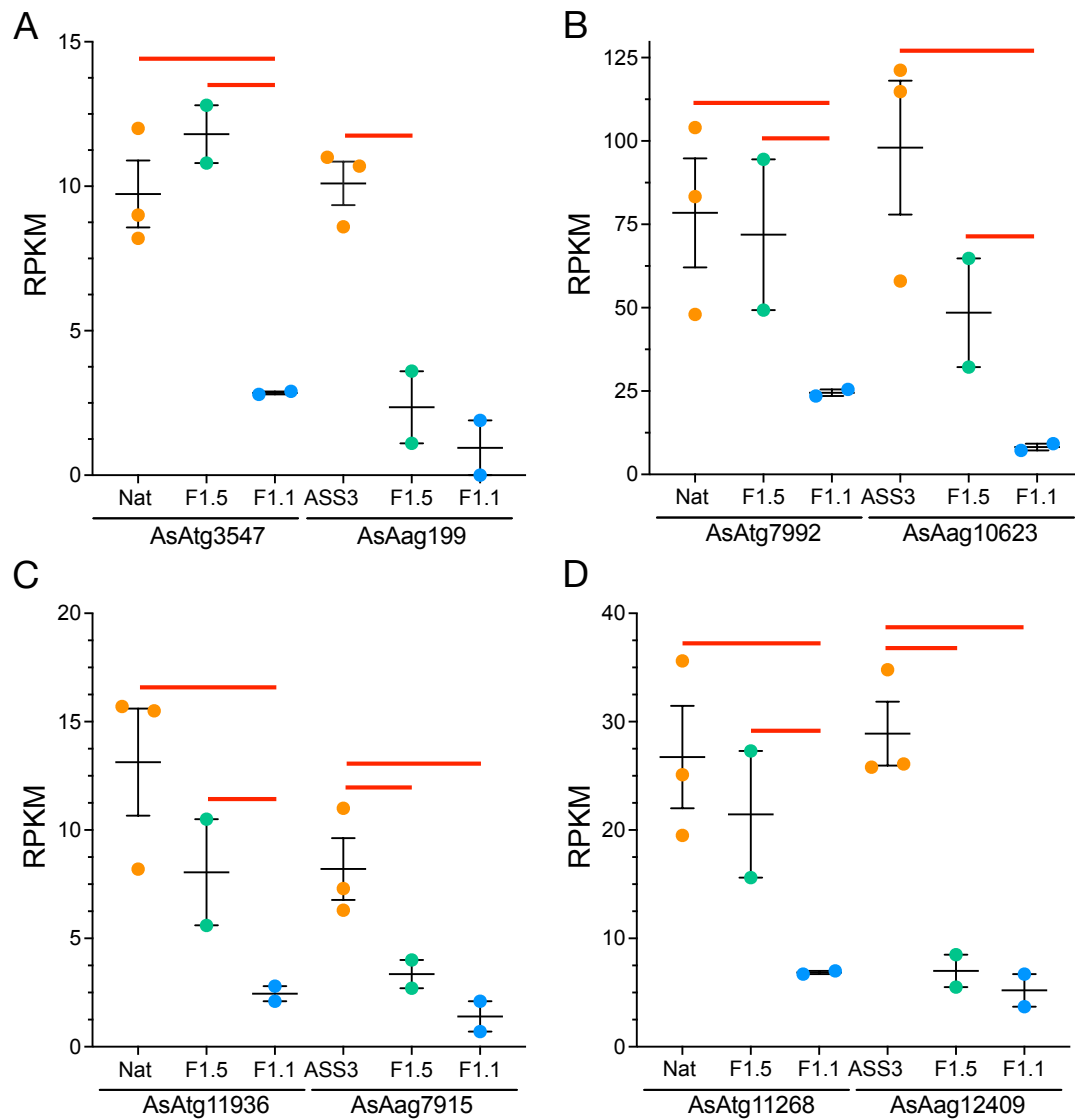


Figure 32 : Analyse des niveaux d'expression génique des gènes candidats jouant un rôle lors de la méiose I.

Graphiques montrant les niveaux d'expression génique des gènes codants pour les protéines HEI10 (A), ASY4 (B), MSH5 (C) et SCEP2 (D). Les valeurs des RPKM normalisés par plante sont représentées sur l'axe des ordonnées avec les différents génotypes indiqués sur l'axe des abscisses (Nat pour la plante naturelle écotype ASS3 ; F1.1 et F1.5 pour les plantes néosynthétiques). Ces protéines sont codées par deux gènes d'*A. suecica* des sous-génomes d'*A. thaliana* (*AsAtg*) et d'*A. arenosa* (*AsAag*) qui sont décrits sur l'axe des abscisses. Les différences significatives d'expression entre les différentes conditions analysées avec l'outil DeSeq2 sont représentées par les lignes rouges (*P-value* ajustée < 0,05 et FC de 2).

IV. Résumé

La comparaison des transcriptomes de méiocytes mâles de plantes d'*A. suecica* naturelles et néosynthétiques a permis de révéler que :

- Les réplicats des trois plantes analysées présentent une proportion similaire de gènes non exprimés (RPKM = 0) et de gènes exprimés (RPKM > 0), ce qui indique que la proportion de gènes exprimés en méiose ne semble pas varier au cours de l'évolution (plantes néosynthétiques vs. naturelles)
- Un nombre plus important de gènes différentiellement exprimés est localisé sur les chromosomes du sous-génome d'*A. arenosa*
- Il existe autant des gènes surexprimés que de gènes sous-exprimés dans la plante néosynthétique F1.1 par rapport à la plante F1.5
- 6 gènes candidats sont surexprimés dans la plante naturelle par rapport aux plantes néosynthétiques et sous-exprimés dans la plante F1.1 par rapport à la plante F1.5 : ASY4, SCEP2, HEI10, MSH5, CYCA1 et NACK2
- 4 gènes méiotiques d'intérêt différentiellement exprimés pourraient être à l'origine de l'instabilité méiotique retrouvée lors de la méiose I chez les plantes néosynthétiques : ASY4, SCEP2, HEI10 et MSH5

CHAPITRE 5 : Rôle des protéines MSH dans la recombinaison méiotique chez *A. suecica*

I. Hypothèses initiales

Plusieurs études ont montré que le système de réparation des mésappariements régule la recombinaison méiotique entre séquences divergentes en détectant les mésappariements et en intervenant dans la formation des intermédiaires de recombinaison, soit en corrigeant ces erreurs, soit en rejetant le brin envahisseur. Par exemple, le mutant *msh2* montre respectivement une augmentation de la recombinaison homéologue de 9 à 12 fois pour *A. thaliana* et de 15 fois pour la mousse autopolyploïde *Physcomitrella patens* (Li *et al.*, 2006; Trouiller *et al.*, 2006). Chez la tomate diploïde *Solanum lopersicum*, la réduction de l'expression des gènes MSH2 et MSH7 par ARN interférents a conduit à une augmentation modeste de la recombinaison homéologue, variant de 3,8% à 29,2% par rapport aux contrôles (taux moyen de 17,8%) (Tam *et al.*, 2011). De plus, le mutant *Atmsh7* d'*A. thaliana* a montré une augmentation de 97% du taux de recombinaison méiotique entre deux marqueurs fluorescents spécifiques des graines (Lario *et al.*, 2015). Chez le blé, l'étude de Serra *et al.*, 2021 a révélé une augmentation de la recombinaison homéologue allant jusqu'à 5,5 fois dans les hybrides blé et des espèces étroitement apparentées. De même, une augmentation modeste de la recombinaison homéologue a été observée dans des mutants *msh6* de riz triploïde, variant de 2 à 32,5% (Jiang *et al.*, 2020). Ces mutations ne semblent pas impacter la fertilité des plantes dans le cas d'*A. thaliana*, de la tomate et du blé, sauf chez l'orge où une diminution significative du nombre de graines par épi est observée ainsi que chez le maïs où des aberrations méiotiques affectent significativement la viabilité des pollens (Li *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2007; Tam *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2024).

Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les protéines MSH pourraient également contribuer au contrôle de la stabilité méiotique chez *A. suecica*. En effet, nous suggérons qu'elles jouent un rôle dans la discrimination entre les chromosomes homologues et homéologues lors de la recombinaison méiotique chez *A. suecica*. L'objectif de cette étude était donc d'analyser les séquences des gènes *MSH* d'*A. suecica*, de créer des mutants de ces gènes et d'observer l'impact de ces mutations sur la fertilité et la stabilité méiotique chez des plantes d'*A. suecica* (écotype ASS3).

II. Matériels et méthodes

1) Analyse des séquences des gènes *MSH* d'*A. suecica*

Pour trouver la localisation génomique des gènes *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* et *MSH7* d'*A. suecica*, nous avons réalisé un alignement des gènes *MSH* d'*A. thaliana* trouvés sur la base de données TAIR (The Arabidopsis Information Resource) sur le génome de référence d'*A. suecica* ASS3 (avec l'identifiant de l'assemblage GCA_905175345) avec l'outil BLAST (paramètre : highly similar sequences) (Berardini *et al.*, 2015; Sayers *et al.*, 2021). Cela nous a permis d'identifier la localisation chromosomique et génomique de nos gènes *MSH* d'*A. suecica* et de déterminer les numéros de ces gènes annotés sur le fichier gff d'*A. suecica* ASS3 (par exemple : AsAtg199 ou AsAag143). A partir de ces données, nous avons analysé chaque gène *MSH* d'*A. suecica* et leurs séquences codantes respectives à l'aide du logiciel Snapgene (www.snapgene.com). Les séquences protéiques de chaque gène *MSH* d'*A. suecica* ont été prédites par le logiciel Snapgene et les domaines protéiques prédits par la base de données Pfam de l'outil EnsemblPlants (Harrison *et al.*, 2023). Pour étudier le pourcentage d'identité entre les séquences codantes et les séquences protéiques d'*A. thaliana* (écotype Col0, séquences disponibles sur TAIR), d'*A. arenosa* (écotype AA4, avec l'identifiant de l'assemblage GCA_905175405) et des deux sous-génomes d'*A. suecica* (écotype ASS3), AsAt et AsAa, nous avons réalisé un alignement local Smith Waterman à l'aide du logiciel Snapgene.

2) Conditions de croissance

Les plantes d'*Arabidopsis suecica* ASS3 ont été stratifiées à 4°C pendant une semaine, puis cultivées dans des conditions de jours longs (16 h : 8 h, lumière : obscurité) à 23°C pendant 4 semaines. Les plantes ont ensuite été vernalisées à 12°C pendant 4 semaines et ramenées à 23°C pour induire la floraison.

3) Conception des mutants *msh*

i. Création des séquences codant les ARN guides

Pour chaque gène *MSH* d'*A. suecica*, des mutants ont été créés à l'aide du système CRISPR/Cas12a (FnCpf1, *Francisella novicida*) (Endo *et al.*, 2016). Pour cela, 2 ARN guides pouvant s'hybrider sur les deux gènes d'*A. suecica* appartenant aux sous-génomes d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa* et sur des régions codantes pour des domaines protéiques essentiels à l'activité

de la protéine (sauf pour *MSH7*) ont été conçus à l'aide du logiciel CHOPCHOP (paramètres In : *Arabidopsis thaliana* (Araport 11), Using : CRISPR/Cpf1, For : Knock-out, sgRNA length without PAM : 23, 5'-PAM : TTTN) (**Figure 33**) (Labun *et al.*, 2019). La séquence d'ADN double brin, qui code pour deux ARN guides suivis chacun d'une séquence de répétition directe (DR), a été synthétisée par la compagnie IDT (Integrated DNA technologie, <https://eu.idtdna.com>).

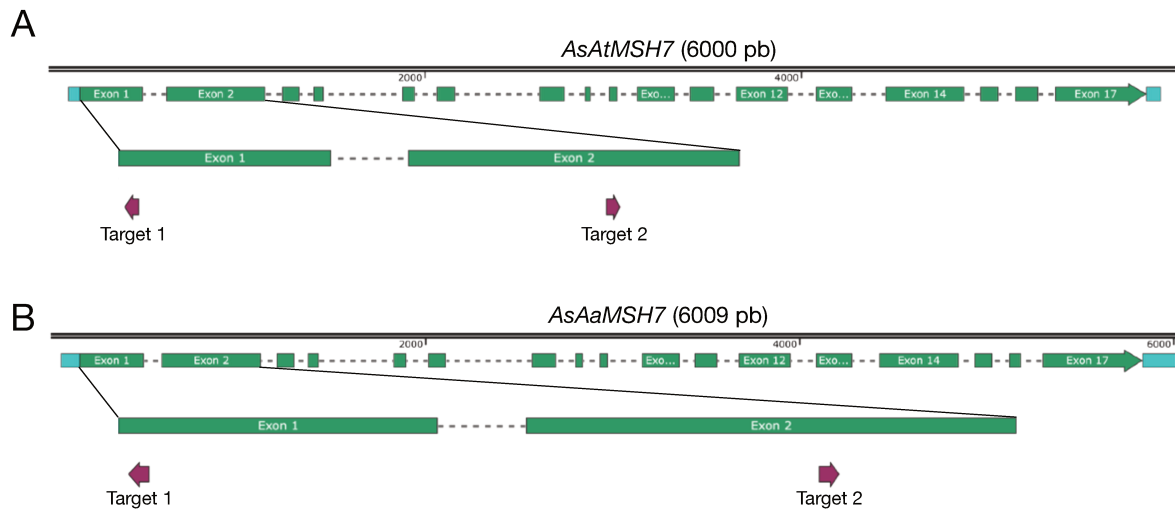


Figure 33 : Élaboration des séquences codant les ARN guides.

Représentation de la séquence génomique des gènes *MSH7* d'*A. suecica* du sous-génome d'*A. thaliana* (A) et du sous-génome d'*A. arenosa* (B) : en bleu ciel sont indiqués le 5' UTR et le 3'UTR, en vert, les exons et avec une ligne hachurée, les introns. À l'aide du logiciel CHOPCHOP, les séquences codant les ARN guides (flèche rose) ont été élaborées pour que la Cas12a puisse cliver simultanément les séquences *MSH7* des deux sous-génomes d'*A. suecica*.

ii. Clonage

1. Clonage de la séquence codant les ARN guides

Le plasmide pUC19-AtU6 a été digéré avec l'enzyme de restriction BbsI pour permettre d'insérer la séquence d'intérêt synthétisée par IDT et d'enlever la cassette de sélection codant pour la toxine *ccdB* au plasmide (**Figure 34A**). Pour cela, 2 µg de plasmide pUC19-AtU6 ont été digérés avec 1 µl d'enzyme BbsI (NEB), 5 µl de tampon de digestion 10X (NEBuf2.1) et 34 µl d'eau avec une incubation sur la nuit à 37°C. Le plasmide digéré a ensuite été extrait sur gel et élué grâce au kit Neo Biotech. Par la suite, une ligation du plasmide pUC19-AtU6 et l'ADN codant les deux ARN guides a été réalisée sur la nuit à 4°C avec 20 ng de plasmide

pUC19-AtU6 digéré et purifié, 0,68 µl de la séquence d'ADN d'intérêt double brin, 0,5 µl d'enzyme ligase (T4 DNA ligase, Promega), 5 µl de tampon ligase 2X (Promega) et de 1,82 µl d'eau (Figure 2A). Le plasmide pUC19-AtU contenant la séquence d'intérêt a été transformé dans des bactéries compétentes TOP10 Invitrogen avec une incubation de 30 min sur la glace de 50 µl de bactéries et 5 µl de mélange de ligation puis un choc thermique à 42°C pendant 30s a été réalisé. 250 µl de milieu LB liquide ont ensuite été ajoutés aux bactéries puis mis à incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Les bactéries ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB supplémenté en ampicilline (100 µg/ml) et été mises à incuber une nuit à 37°C. Pour vérifier les clones, des colonies distinctes de bactéries ont étéensemencées dans un tube contenant 3 mL de milieu LB liquide et supplémentées en ampicilline (100 µg/ml) et incubées une nuit sous agitation à 37°C. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait, purifié à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel™) et séquencé par séquençage Sanger par la compagnie Eurofins Genomics (avec l'oligo M13rev29).

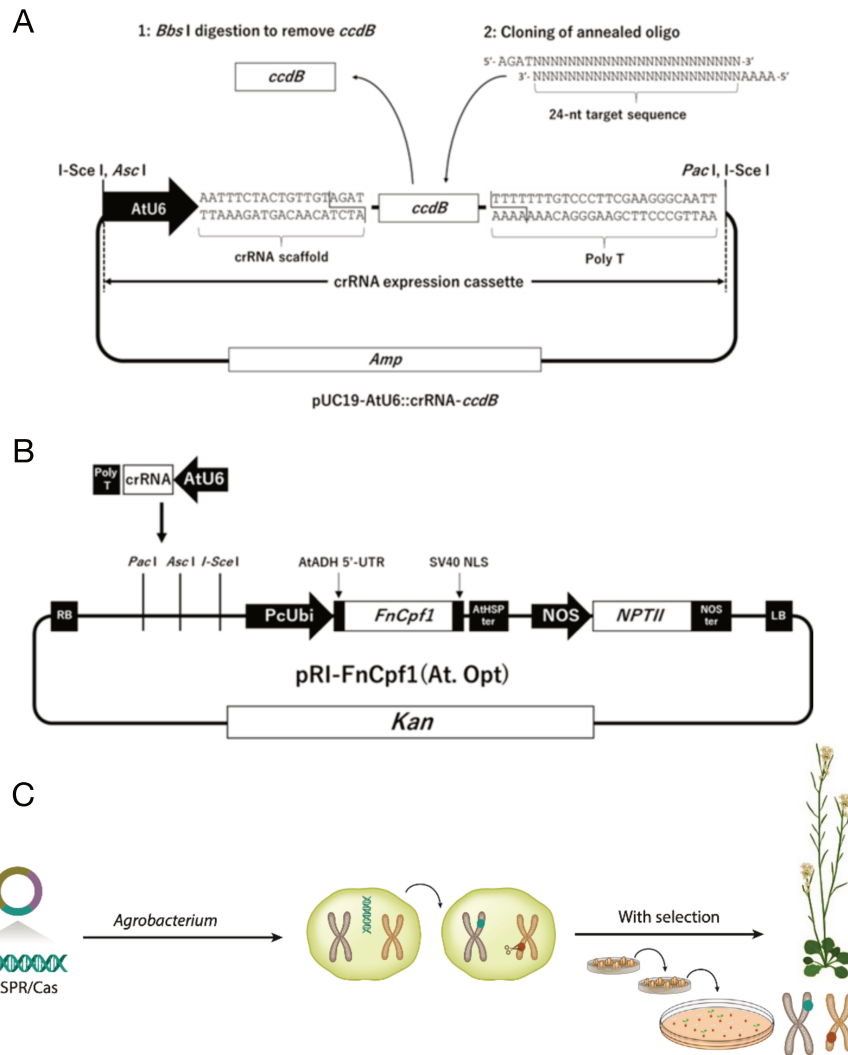


Figure 34 : Description du clonage et de la transformation des plantes pour la création de mutants *msh* avec le système CRISPR/Cas12a.

(A) Le plasmide pUC19-AtU6 a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bbs*I pour enlever la cassette de sélection codant pour la toxine *ccdB* et insérer la séquence d'intérêt codant les ARN guides. D'après (Endo *et al.*, 2019).

(B) Les plasmides pRI-FnCpf1 et pUC19-AtU6 (contenant le fragment d'intérêt avec le promoteur AtU6, la séquence codant les ARN guides et une queue polyT) (A) ont été digérés avec les enzymes de restriction *Pac*I et *Asc*I. Le fragment provenant du plasmide pUC19-AtU6 (contenant le promoteur, la séquence codante les ARN guides et une queue polyT) et le plasmide pRI-FnCpf1 ont ensuite été liés entre eux par ligation. D'après (Endo *et al.*, 2019).

(C) Les plasmides contenant la Cas12a et la séquence codant les deux ARN guides ont été transférés dans des plantes d'*A. thaliana* via une transformation médiée par les bactéries *A. tumefaciens*. Les graines des plantes transformées ont ensuite été sélectionnées sur milieu gélosé contenant les antibiotiques de sélection et ces plantes ont été génotypées par séquençage Sanger.

Adapté depuis Chen *et al.*, 2019.

2. Clonage du fragment d'intérêt dans le plasmide d'expression de la plante

Les deux plasmides pUC19-AtU6 (contenant le fragment d'intérêt avec le promoteur, la séquence codant les ARN guides et une queue polyT) et pRI-FnCpf1 ont été digérés avec les enzymes de restriction PacI et AscI avec 2 µg de plasmide, 1 µl d'enzyme PacI (NEB), 1 µl d'enzyme AscI (NEB), 5 µl de tampon de digestion 10X (Cutsmart, NEB) et de l'eau (QSP 50 µl) pendant une nuit à 37°C (**Figure 34A et B**). Le plasmide (pour pRI-FnCpf1) et le fragment (pour pUC19-AtU6) ont ensuite été extraits sur gel et élués grâce au kit Neo Biotech. Par la suite, une ligation du fragment provenant du plasmide pUC19-AtU6 (contenant le promoteur, la séquence codant les ARN guides et une queue polyT) et le plasmide pRI-FnCpf1 a été réalisée sur la nuit à 4°C avec 20 ng de plasmide pRI-FnCpf1 digéré et purifié, 3 ng du fragment, 0,5 µl d'enzyme ligase (T4 DNA ligase, Promega), 5 µl de tampon ligase 2X (Promega) et de l'eau (QSP 10 µl) (**Figure 34B**). Le plasmide pRI-FnCpf1 contenant le fragment d'intérêt a été transformé dans des bactéries compétentes TOP10 Invitrogen avec une incubation de 30 min sur la glace de 50 µl de bactéries et 5 µl de mélange de ligation puis un choc thermique à 42°C pendant 30s a été réalisé. 250 µl de milieu LB liquide ont ensuite été ajoutés aux bactéries puis mis à incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Les bactéries ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB supplémenté en kanamycine (100 µg/ml) et été mises à incuber une nuit à 37°C. Pour vérifier les clones, des colonies distinctes de bactéries ont été ensemencées dans un tube contenant 3 mL de milieu LB liquide supplémenté en kanamycine (100 µg/ml) et incubées une nuit sous agitation à 37°C. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait, purifié à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel™) et séquencé par séquençage Sanger par la compagnie Eurofins Genomics (avec l'oligo M13univ-21 forward).

iii. Transformation des plantes d'*A. suecica* par les bactéries *Agrobacterium tumefaciens*

Les plasmides portant la Cas12a et la séquence codant les deux ARN guides ont été transférés dans des plantes d'*Arabidopsis suecica* (écotype ASS3) via une transformation médiée par les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* (**Figure 34C**). Des aliquots de 50 µl d'*Agrobacterium tumefaciens* électrocompétents C58C1 ont été décongelés, mélangés doucement avec 100 ng d'ADN plasmidique et incubés 30 min dans la glace. Ce mélange a ensuite été placé dans une cuve d'électroporation (préalablement refroidie dans de la glace) et une impulsion électrique de 1,8 kV a été réalisée dans le dispositif d'électroporation Bio-Rad

E. coli Pulser™. Après l'ajout de 250 µl de milieu LB liquide, les cellules ont été incubées pendant 3 heures à 28 °C sous agitation à 140 tr/min et étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB supplémenté avec de la kanamycine (100 µg/ml ; pour sélectionner le plasmide d'expression), de la gentamicine et de la rifampicine (100 µg/ml et 50 µg/ml, respectivement ; pour sélectionner les bactéries *A. tumefaciens* qui contiennent les plasmides). Ces boîtes ont été mises à incuber 3 jours à 29°C. Des colonies distinctes de bactéries ont étéensemencées dans un tube contenant 5 mL de milieu LB liquide supplémenté avec de la kanamycine (100 µg/ml) et de la gentamicine (100 µg/ml) et incubé 2 nuits à 29°C sous agitation. Ces cultures ont ensuite été ajoutées à 200 mL de milieu LB liquide supplémenté en kanamycine et gentamicine et mises à incuber toute la nuit à 29°C sous agitation jusqu'à la phase de croissance exponentielle des bactéries (DO à 600nm entre 0,6 et 1). Les bactéries ont été culottées pendant 15 min à 4000 rpm et resuspendues dans une solution de sucrose 5%, 0,5% v/v Silwet L-77™. En parallèle, les plantes d'*A. suecica* ont été préparées en retirant toutes les feuilles ouvertes et les siliques. Par la suite, les inflorescences ont été plongées dans la solution contenant les cultures d'*A. tumefaciens* pendant 3s selon la méthode du « Floral dip » (Desfeux *et al.*, 2000). Les plantes d'*A. suecica* transformées ont été mises dans des boîtes de culture fermées par un couvercle pendant 1 journée dans la chambre climatique puis laissées se développer pour produire des graines.

iv. Sélections et caractérisations des transformants

Les graines des plantes d'*A. suecica* transformées par *A. tumefaciens* ont été stérilisées pendant 5 min avec une solution 70% éthanol/SDS 0,05%, rincées pendant 5 min avec 95% d'éthanol et laissées sécher sous la sorbonne. Les graines stérilisées ont ensuite été semées sur des boîtes de culture contenant 2,5g de milieu MS (Murashige et Skoog), 1% de sucrose, 0,8% de bacto-agar et les antibiotiques de sélection : kanamycine (sélection du plasmide d'intérêt) et céfotaxime (supprime *A. tumefaciens*), mises à stratifier pendant 7 jours à 4°C et placées à 23°C (**Figure 34C**). Lorsque les transformants positifs ont pu être observés par l'apparition des premières feuilles, ils ont immédiatement été repiqués dans du terreau et placés dans la chambre climatique (**Figure 34C**).

Dans le but d'identifier les mutations produites par la Cas12a au niveau de séquence cible, les transformants positifs ont été génotypés par séquençage Sanger par la compagnie Eurofins Genomics avec deux couples d'amorces s'hybridant spécifiquement pour l'un, sur le gène *MSH* du sous-génome d'*A. thaliana* et l'autre d'*A. arenosa*. Pour ce faire, l'ADN d'un

fragment de feuille de plante transformée d'*A. suecica* a été extrait avec 300 µl de solution d'extraction (Tris-HCl 1M pH 7,5, NaCl 5M, EDTA 0,5M pH8, SDS20%, H₂O QSP 50 ml), une bille métallique et un broyage dans le tissu lyser 2 (QIAGEN). Ce mélange a ensuite été mis à incuber 15 min à 65°C et l'ADN a été précipité avec 300 µl d'isopropanol et une centrifugation de 5 min à 14000 rpm. Après retrait du surnageant, les culots d'ADN ont été mis à sécher puis resuspendus dans 100 µl d'eau stérile. Le mix PCR (Polymerase Chain Reaction) a été préparé avec des dNTP 10µM, la Taq polymérase, du MgCl₂ 25X, du Buffer 5X, de l'eau et les amorces d'intérêt. Les produits PCR ont ensuite été purifiés avec le kit Neobiotech "FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit" et envoyés à séquencer. Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide de l'outil TIDE qui génère un spectre quantitatif des mutations (indels) autour du site cible de coupure de la Cas12a et permet d'évaluer l'efficacité de coupure de la Cas12a dans nos transformants (<https://tide.nki.nl>).

4) Analyse de la viabilité des grains de pollen

Voir partie Matériels et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023

5) Étalements de chromosomes méiotiques

Voir partie Matériels et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023

Pour *A. thaliana*, les bourgeons ont été digérés dans une solution enzymatique (0,3% (m/v) de cellulase (Sigma), 0,3% (m/v) de pectolyase (Sigma) et 0,3% (m/v) de cytohelicase (Sigma) dans un tampon citrate) pendant 1h30 à 37°C dans une chambre humide.

6) Immunolocalisation de la protéine MLH1

Voir partie Matériels et méthodes de l'article Chéron *et al.*, 2023

III. Résultats

1) Analyse des séquences de gènes *MSH* d'*Arabidopsis suecica*

Pour étudier les séquences de gènes *MSH* d'*A. suecica*, nous avons réalisé un alignement des gènes *MSH* d'*A. thaliana* trouvé sur TAIR sur le génome de référence d'*A. suecica* ASS3 avec l'outil BLAST (paramètre : highly similar sequences) (Berardini *et al.*, 2015; Sayers *et al.*, 2021). Pour chaque gène *MSH*, le gène *MSH* du sous-génome d'*A. thaliana* (AsAtMSH) est localisé dans une région synténique à l'autre gène *MSH* du sous-génome d'*A. arenosa* (AsAaMSH) (Tableau 2 et Figure 35A). Le nombre et la taille des exons sont intimement conservés entre les gènes *MSH* d'*A. thaliana* vs. du sous-génome (SG) d'*A. thaliana* d'*A. suecica*, d'*A. arenosa* vs. du SG d'*A. arenosa* d'*A. suecica* et entre les deux SG d'*A. suecica*. D'ailleurs, il existe plus de 90% d'identité entre les séquences codantes et les séquences protéiques de ces trois conditions (Figure 35B et C, Tableaux 3 et 4). Concernant les domaines protéiques des protéines MSH de la plante d'*A. thaliana*, les domaines « N-terminal mismatch recognition domain », « connector domain », « core domain » et « C-terminal ATPase domain » sont conservés entre les protéines MSH2, MSH3, MSH6 et MSH7 (Figure 35D). Cependant, la protéine MSH7 est la seule protéine MSH pour laquelle le domaine « clamp domain » est absent (Figure 35D). Ce domaine est suggéré aider à la reconnaissance des mésappariements en facilitant la courbure de l'ADN au niveau du mésappariement (Wu *et al.*, 2003). Les analyses de séquences protéiques de chaque gène *MSH* d'*A. suecica* prédites par le logiciel Snapgene avec les domaines protéiques prédits par la base de données Pfam de l'outil EnsemblPlants ont également montrées une conservation des domaines protéiques présents chez les protéines MSH d'*A. thaliana* avec l'absence du domaine « clamp domain » dans la protéine MSH7 d'*A. suecica*.

Gène <i>MSH</i> d' <i>A. suecica</i>	Localisation chromosomique	Coordonnées génomiques	Taille (pb)	Nombre d'exons
<i>AsAtMSH2</i>	3	17 495 962 - 17 500 982	5021	13
<i>AsAaMSH2</i>	8	7 510 879 - 7 515 431	5191	13
<i>AsAtMSH3</i>	4	5 713 582 - 5 719 388	5775	12
<i>AsAaMSH3</i>	12	6 328 293 - 6 331 309	5654	12
<i>AsAtMSH6</i>	4	18 137 848 - 18 142 721	7414	21
<i>AsAaMSH6</i>	11	17 986 196 - 17 989 656	7486	21
<i>AsAtMSH7</i>	3	14 979 704 - 14 985 506	5931	17
<i>AsAaMSH7</i>	8	10 738 628 - 10 741 548	5954	17

Tableau 2 : Description des séquences nucléotidiques des gènes *MSH* d'*A. suecica*.

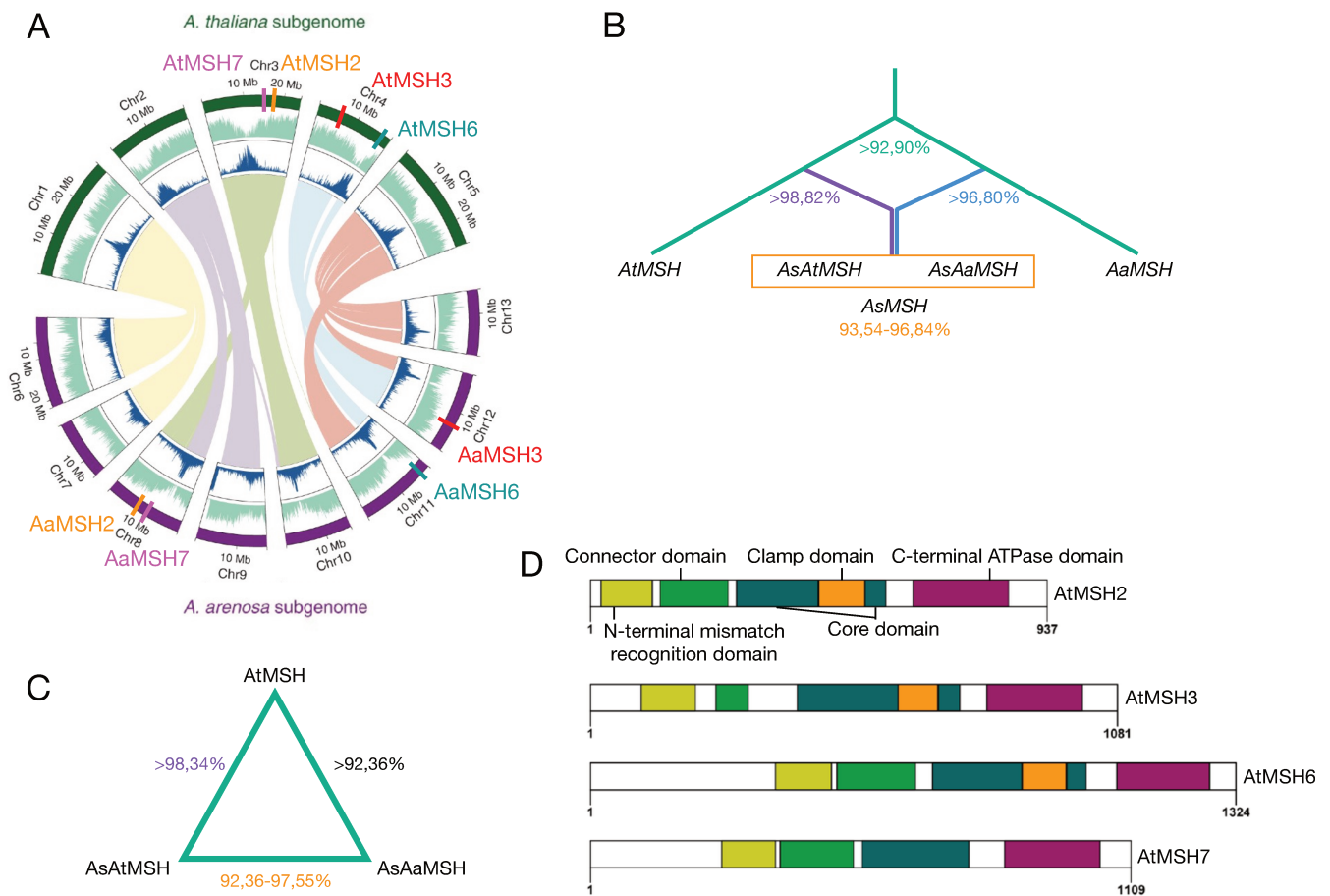


Figure 35 : Analyse des séquences géniques et protéiques des gènes *MSH* d'*A. suecica*.

- (A) Diagramme représentant l'assemblage des chromosomes du génome d'*A. suecica* avec les liens internes montrant les régions synténiques entre les sous-génomes d'*A. thaliana* et d'*A. arenosa* d'*A. suecica*. Les histogrammes montrent en vert les gènes codant pour des protéines et en bleu, la distribution des éléments transposables le long des chromosomes. La localisation des gènes *MSH* d'*A. suecica* est indiquée en orange, rouge, bleu et rose pour *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* et *MSH7*, respectivement. Adapté de (Burns *et al.*, 2021).
- (B) Schéma décrivant les pourcentages d'identité des séquences codantes des gènes *MSH* entre *A. thaliana*, *A. arenosa* et les deux sous-génomes d'*A. suecica*.
- (C) Schéma décrivant les pourcentages d'identité des séquences protéiques entre *A. thaliana* et les deux sous-génomes d'*A. suecica*.
- (D) Schéma représentant les différents domaines protéiques des protéines *MSH* d'*A. thaliana*.

% Identité CDS	At vs. Aa	At vs. AsAt	Aa vs. AsAa	AsAt vs. AsAa
MSH2	96,84	99,32	96,84	96,84
MSH3	93,54	99,91	98,65	93,54
MSH6	96,03	98,82	99,67	96,03
MSH7	93,46	99,94	96,80	93,46

Tableau 3 : Pourcentage d'identité de séquences codantes des gènes *MSH* chez *Arabidopsis*.

At, Aa, AsAt et AsAa se rapportent respectivement au génome d'*A. thaliana*, d'*A. arenosa* et aux deux sous-génomes d'*A. suecica*.

% Identité Protéine	At vs. AsAt	At vs. AsAa	AsAt vs. AsAa
MSH2	99,89	97,65	97,55
MSH3	100	92,36	92,36
MSH6	98,34	95,47	96
MSH7	99,91	92,61	92,70

Tableau 4 : Pourcentages d'identité de séquences protéiques *MSH* chez *Arabidopsis*.

At, AsAt et AsAa se rapportent respectivement au génome d'*A. thaliana* et aux deux sous-génomes d'*A. suecica*.

Dans le but d'analyser l'impact de mutations des gènes *MSH* d'*A. suecica* sur la fertilité et la stabilité méiotique des plantes d'*A. suecica*, j'ai réalisé la création des séquences codants les ARN guides, le clonage et la transformation des plantes afin de générer des mutants *msh3*, *msh6* à l'aide du système CRISPR/Cas12a. Malheureusement, l'analyse des transformants de plantes *msh3* et *msh6* à l'aide de l'outil TIDE n'a pas permis de mettre en évidence un transformant ayant un pourcentage d'efficacité de coupure significatif pour induire une mutation. Cependant, des mutants *AsAtmsh7* *AsAamsh7* d'*A. suecica* ont été créés et analysés par l'hybridation entre des mutants *AsAtmsh7* et *AsAamsh7* précédemment générés au laboratoire. En parallèle, des mutants *Atmsh7* d'*A. thaliana* ont été créés en utilisant les plasmides disponibles pour *A. suecica*. Je présenterai dans les prochaines parties les données préliminaires quant à l'analyse de la fertilité et de la stabilité méiotique de ces mutants.

2) La fertilité n'est pas impactée par la mutation du gène *msh7* chez les plantes d'*A. thaliana*

À l'aide du système CRISPR/Cas12a, nous avons généré un mutant *msh7* d'*A. thaliana* qui présente une délétion de 7 pb dans l'exon 1 du gène *MSH7* (**Figure 36**). Cette mutation induit un changement dans le cadre de lecture et la création d'un codon de terminaison prématuré conduisant à la formation d'une protéine tronquée de 38 acides aminés avec

l'absence des domaines essentiels à l'activité de la protéine suggérant la formation d'une protéine non fonctionnelle (**Figure 36**).

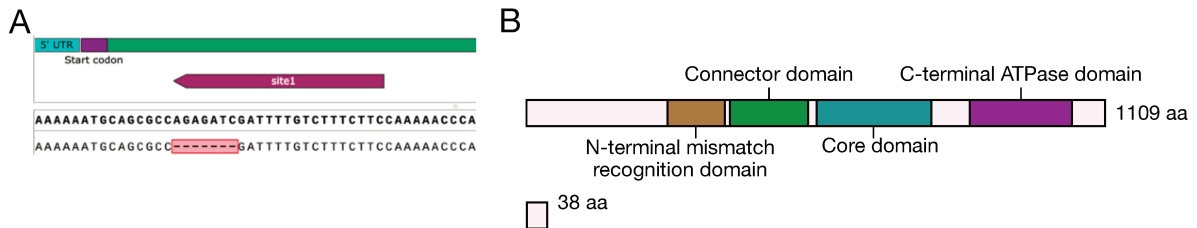


Figure 36 : Représentations schématiques du mutant *msh7* d'*A. thaliana*.

- (A) Une délétion de 7 pb (surlignée en rose) est présente au niveau du site cible 1 de la Cas12a (situé dans l'exon 1) du gène *msh7* d'*A. thaliana*.
- (B) Cette mutation induit la formation d'une protéine tronquée de 38 acides aminés avec une absence des domaines fonctionnels de la protéine AtMSH7.

Pour déterminer si la mutation du gène *MSH7* affecte la fertilité des plantes d'*A. thaliana*, nous avons compté le nombre de graines par silique et évalué la viabilité des grains de pollen à l'aide de la solution d'Alexander. Il n'existe pas de variation du nombre moyen de graines par silique par plante entre les génotypes sauvages, hétérozygotes et mutants *msh7*. En effet, le nombre moyen de graines par silique par plante varie entre 42 et 55 pour ces trois génotypes (**Figure 37A**). De même, le pourcentage de viabilité des pollens ne varie pas de manière significative entre les génotypes sauvages, hétérozygotes et mutants *msh7* avec des pourcentages de viabilité des pollens supérieurs à 90% (**Figure 37B**).

Ainsi, la fertilité des plantes d'*A. thaliana* n'est pas affectée par la mutation du gène *MSH7*.

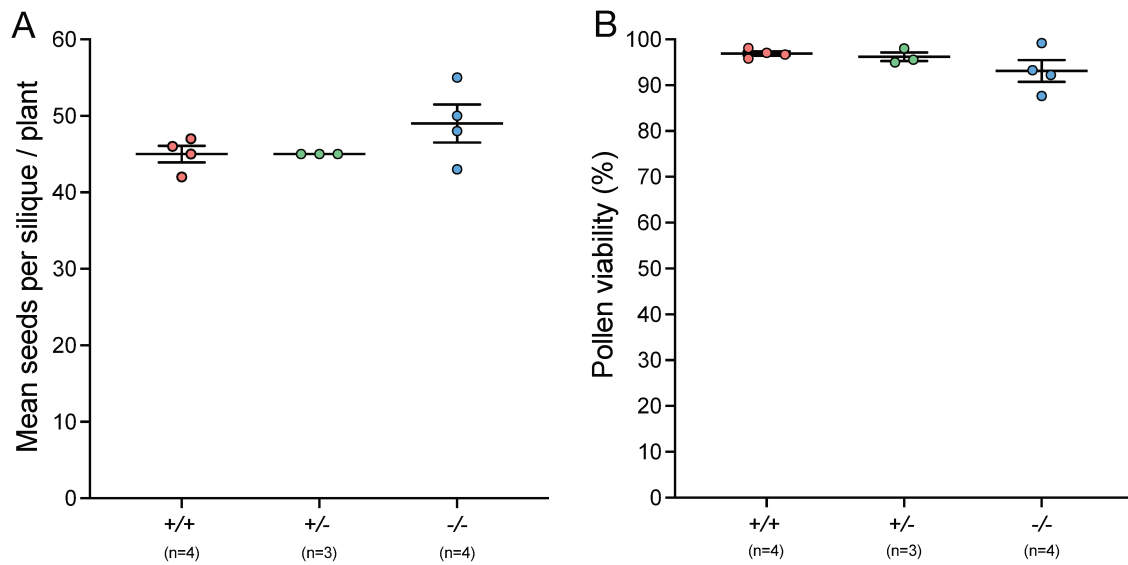


Figure 37 : La fertilité des plantes d’*A. thaliana* n’est pas impactée par la mutation du gène *msh7*.

(A) Nombre moyen de graines par silique comptées dans environ 30 siliques pour les 3 génotypes indiqués qui sont des plantes sœurs. Chaque point représente une plante. La ligne la plus large correspond à la moyenne et les autres lignes à l’erreur standard de la moyenne (SEM). Aucune différence significative n’a été mesurée entre les 3 génotypes avec le test statistique ANOVA à un facteur.

(B) Viabilité des grains de pollen évaluée à l’aide de la coloration d’Alexander dans les 3 génotypes indiqués qui sont des plantes sœurs. Chaque point représente une plante pour laquelle au moins 1000 pollens ont été analysés. La ligne la plus large correspond à la moyenne et les autres lignes à l’erreur standard de la moyenne (SEM). Aucune différence significative n’a été mesurée entre les 3 génotypes avec le test statistique Kruskal-Wallis.

3) La fertilité des plantes d’*A. suecica* n’est pas affectée par la mutation des gènes *msh7*

Une lignée mutante pour les deux gènes *MSH7* d’*A. suecica* a été produite à l’aide du croisement entre un transformant possédant une délétion de 27 pb et insertion de 8 pb dans l’exon 2 du gène *AsAtMSH7* et un transformant avec une délétion 2 pb dans l’exon 1 du gène *AsAaMSH7* (**Figure 38A et C**). Ces mutations induisent un changement dans le cadre de lecture conduisant à la création de codons stop prématurés. Ainsi, il est prédit que ces mutations conduiraient à la formation de protéines tronquées de 292 acides aminés pour la protéine *MSH7* du SG d’*A. thaliana* et de 27 acides aminés pour la protéine *MSH7* du SG d’*A. arenosa* avec l’absence des domaines essentiels à l’activité de ces protéines suggérant la production de protéines non fonctionnelles (**Figure 38B et D**).

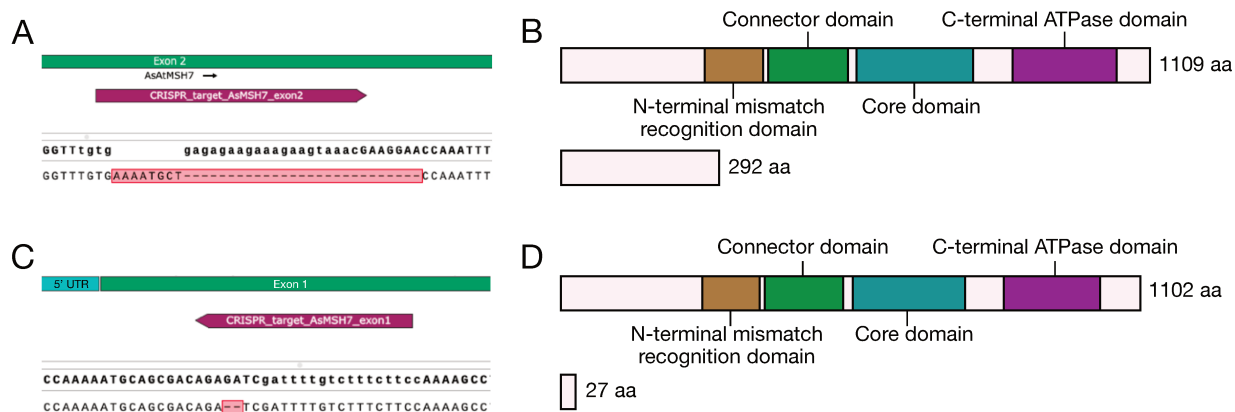


Figure 38 : Représentations schématiques des mutants *msh7* d'*A. suecica*.

- (A) Une délétion de 27 pb et une insertion de 8 pb (surlignées en rose) sont présentes au niveau du site cible 2 (situé dans l'exon 2) du gène *AsAtMSH7* d'*A. suecica*.
- (B) Cette mutation induit la formation d'une protéine tronquée de 292 acides aminés avec une absence des domaines fonctionnels de la protéine *AsAtMSH7*.
- (C) Une délétion de 2 pb (surlignée en rose) est présente au niveau du site cible 1 (situé dans l'exon 1) du gène *AsAaMSH7* d'*A. suecica*.
- (D) Cette mutation induit la formation d'une protéine tronquée de 27 acides aminés avec une absence des domaines fonctionnels de la protéine *AsAtMSH7*.

Concernant l'effet de la mutation des deux gènes *MSH7* d'*A. suecica* sur la fertilité des plantes d'*A. suecica*, nous ne remarquons pas de différence significative du nombre moyen de graines par silique par plante et du pourcentage de viabilité des pollens entre les plantes sauvages, mutantes pour le gène *MSH7* du SG d'*A. thaliana Atmsh7 AaMSH7*, mutantes pour le SG d'*A. arenosa (AtMSH7 Aamsh7)* et mutantes pour les deux SG d'*A. suecica (Atmsh7 Aamsh7)* (**Figure 39A et B**). En effet, le nombre moyen de graines par silique varie entre ces 4 génotypes en moyenne de 57 (pour les plantes sauvages) à 60,33 (pour les plantes mutantes *Atmsh7 Aamsh7*) (**Figure 39A**). De même, le pourcentage moyen de viabilité des pollens varie pour ces 4 génotypes entre 85,35 % (pour les plantes *AtMSH7 Aamsh7*) et 89,07 (pour les plantes *Atmsh7 Aamsh7*) (**Figure 39B**).

Par conséquent, les mutations des gènes *MSH7* d'*A. suecica* n'impactent pas la fertilité des plantes d'*A. suecica*.

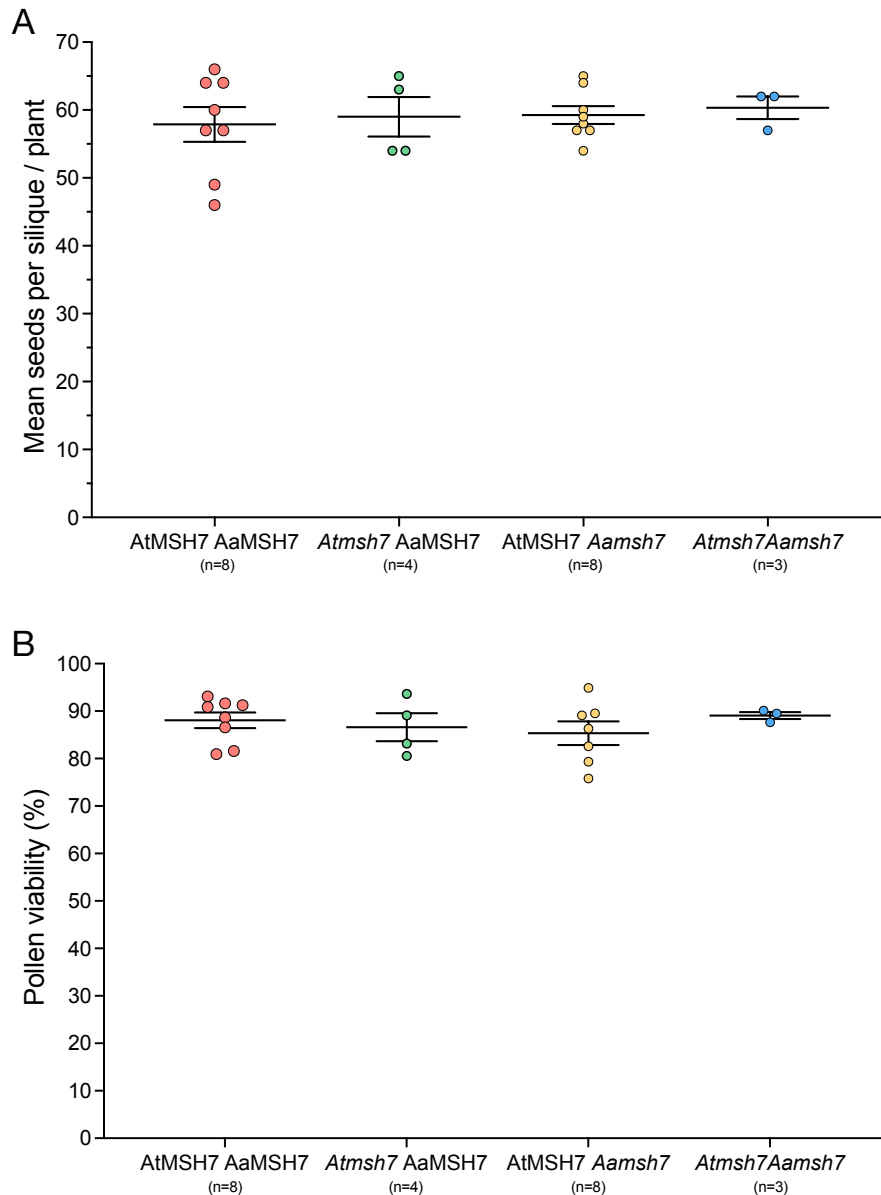


Figure 39 : La fertilité des plantes d'*A. suecica* n'est pas altérée par la mutation des gènes *msh7*.

(A) Nombre moyen de graines par silique comptées dans environ 30 siliques pour les 4 génotypes indiqués qui sont des plantes sœurs. Chaque point représente une plante. La ligne la plus large correspond à la moyenne et les autres lignes à l'erreur standard de la moyenne (SEM). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les 4 génotypes avec le test statistique Kruskal-Wallis.

(B) Viabilité des grains de pollen évaluée à l'aide de la coloration d'Alexander dans les 4 génotypes indiqués qui sont des plantes sœurs. Chaque point représente une plante pour laquelle au moins 1000 pollens ont été analysés. La ligne la plus large correspond à la moyenne et les autres lignes à l'erreur standard de la moyenne (SEM). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les 3 génotypes avec le test statistique ANOVA à un facteur.

4) La mutation du gène *msh7* semble affecter la stabilité méiotique d'*A. suecica*

Dans le but d'étudier l'influence de la mutation *msh7* sur la stabilité méiotique d'*A. suecica*, nous avons réalisé des étalements de chromosomes colorés au DAPI de cellules mères de pollen d'*A. suecica* et analysé les cellules méiotiques au stade métaphase I.

L'analyse des cellules méiotiques au stade métaphase I des plantes sauvages et mutantes *Atmsh7 Aamsh7* a permis de mettre en évidence une réduction du nombre de méiocytes avec 13 bivalents considérés comme des méioses stables (**Figure 40A**). En effet, les plantes mutantes montrent un pourcentage de cellules avec 13 bivalents qui varie entre 63,63 et 73,33% alors que pour les plantes sauvages, ce pourcentage est plus élevé et compris entre 81,81 et 92,86% (**Figure 40A**). Comme attendu, ceci est corrélé avec une augmentation du pourcentage de cellules avec des anomalies dans les plantes mutantes *msh7* par rapport aux plantes sauvages (**Figure 40B et C**). Le pourcentage de cellules avec au moins un univalent varie entre 13 et 27% chez les plantes mutantes *msh7* contre moins de 10% chez les plantes sauvages (**Figure 40B**). De plus, le pourcentage de cellules avec au moins un multivalent varie de 13 à 18% entre les deux plantes mutantes *msh7* alors que les plantes sauvages ne présentent pas de cellules avec des multivalents (en accord avec les données de la littérature (Nibau *et al.*, 2022; Chéron *et al.*, 2023)) (**Figure 40C**).

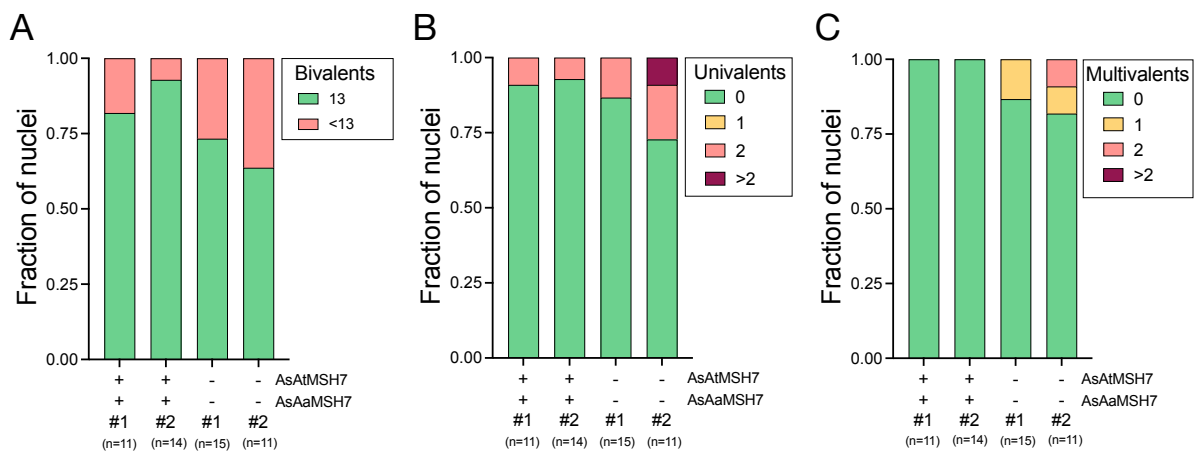


Figure 40 : Caractérisation des anomalies méiotiques retrouvées chez les plantes mutantes *msh7* d'*A. suecica*

(A) Fraction de noyaux avec 13 bivalents au stade métaphase I dans les plantes sauvages *AtMSH7 AaMSH7* (#1 et #2) et mutantes *Atmsh7 Aamsh7* d'*A. suecica* (#1 et #2).

(B) Fraction de noyaux avec un ou plusieurs univalents au stade métaphase I dans les géotypes indiqués.

(C) Fraction de noyaux avec un ou plusieurs multivalents au stade métaphase I dans les génotypes indiqués.

Par ailleurs, l'étude précédente du gène *MSH7* du blé allohexaploïde a rapporté une diminution de la fréquence de chiasma par méiocyte dans le mutant *Tamsh7-3D* (Serra *et al.*, 2021). Pour vérifier si ce phénotype est conservé chez *A. suecica*, nous avons évalué les fréquences de chiasma par méiocytes en dénombrant les fréquences d'univalents (chromosomes homologues non liés entre eux), de bivalents en forme de bâton (paire de chromosomes liés par un seul chiasma), de bivalents en forme d'anneau (paire de chromosomes liés par au moins 2 chiasmata), de trivalents (2 chromosomes liés par 2 chiasmata) et de quadrivalents (4 chromosomes liés par 3 ou 4 chiasmata). Nous observons une tendance à la diminution du nombre de chiasma par méiocyte pour les plantes mutantes *Atmsh7 Aamsh7* par rapport aux plantes sauvages (**Figure 41A**). D'ailleurs, pour la plante mutante #1, cette réduction du nombre de chiasma est significative avec une moyenne de $18,20 \pm 0,48$ contre $20,09 \pm 0,73$ pour la plante sauvage #1 et $20,07 \pm 0,55$ pour la plante sauvage #2 ($P= 0,0337$ entre #1 *AtMSH7 AaMSH7* et #1 *Atmsh7 Aamsh7*, $P= 0,0158$ entre #2 *AtMSH7 AaMSH7* et #1 *Atmsh7 Aamsh7*, test t non apparié).

Pour tester si cette réduction du nombre de chiasma dans le mutant *msh7* est associée à une diminution des crossing-over de classe I, nous avons réalisé une immunolocalisation de la protéine MLH1 sur des méiocytes au stade diacinèse. Nous remarquons une diminution significative du nombre de foci MLH1 dans le mutant *msh7* par rapport à la plante sauvage ($P= 0,0121$, test t non apparié) (**Figure 41B**). En effet, le nombre moyen de foci MLH1 est de $19,29 \pm 0,29$ pour la plante mutante *msh7* contre $20,46 \pm 0,34$ pour la plante sauvage.

Par conséquent, ces données montrent que la protéine MSH7 semble impacter la stabilité méiotique d'*A. suecica* avec une augmentation de la fréquence d'anomalies méiotiques (univalents et multivalents) et la réduction du nombre de chiasma/ crossing-overs de classe I dans certaines plantes.

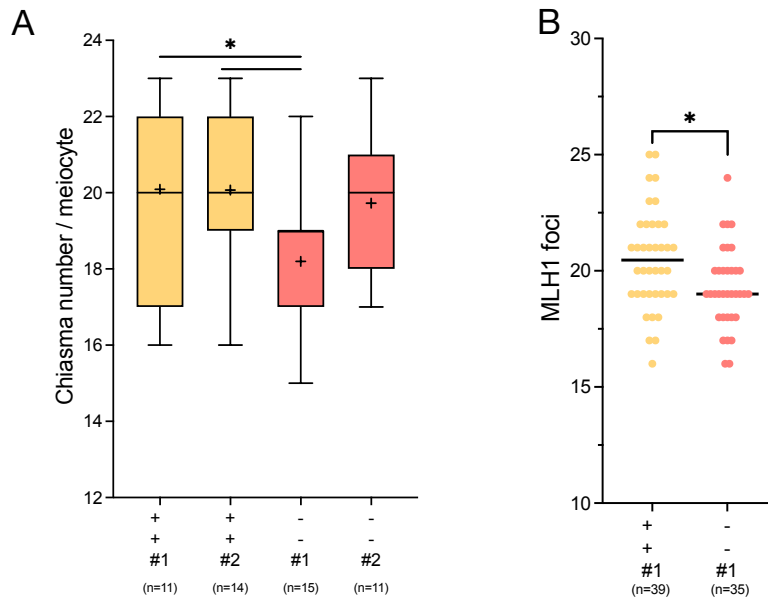


Figure 41 : La fréquence de la recombinaison semble être réduite dans les plantes mutantes *msh7* d'*A. suecica*.

(A) Le nombre de chiasma par méiocyte a été estimé à partir des conformations des bivalents et multivalents des chromosomes étalés au stade métaphase I pour les plantes sauvages *AtMSH7 AaMSH7* (en jaune) et mutantes *Atmsh7 Aamsh7* d'*A. suecica* (en rose). Les diagrammes en boîte de Tukey avec les lignes horizontales indiquent les valeurs médianes et les croix, les valeurs moyennes (*, $P < 0,05$, test t non apparié).

(B) Quantification des foci MLH1 dans les méiocytes mâles au stade diacinèse de la plante sauvage *AtMSH7 AaMSH7* #1 (en jaune) et mutante *Atmsh7 Aamsh7* #1 d'*A. suecica* (en rose). Les barres indiquent la moyenne. La signification statistique a été évaluée à l'aide du test t bilatéral non apparié (*, $P < 0,05$).

5) Analyse de l'expression des gènes *MSH* dans les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

Concernant l'expression des gènes *MSH* dans les méiocytes mâles de plantes néosynthétiques de première génération d'*A. suecica*, l'analyse des RPKM normalisés par plante montre pour le gène *AsAaMSH2*, une tendance à la diminution de l'expression uniquement pour la plante néosynthétique F1.1, qui présente une méiose instable, par rapport aux plantes F1.5 (avec une méiose moins instable) et aux plantes naturelles (**Figure 42 A**). De plus, une réduction de l'expression par palier est suggérée pour le gène *AsAaMSH6* avec la plante naturelle ayant la valeur la plus élevée, la plante F1.1, la valeur la plus faible et la plante F1.5 ayant une valeur intermédiaire entre ces deux plantes (**Figure 42C**). Il existe également une tendance générale à la diminution de l'expression pour les deux plantes néo-synthétiques

par rapport à la plante naturelle pour les gènes *AsAaMSH3* et *AsAaMSH7* (**Figure 42B et D**). Ainsi, l'expression des gènes *MSH* du sous-génome d'*A. arenosa* semble être altérée dans ces deux plantes néo-synthétiques d'*A. suecica* par rapport à la plante naturelle évoluée sous réserve qu'il n'y ait pas de polymorphismes de séquences entre les séquences de plantes néosynthétiques et le génome de référence d'*A. suecica* ASS3.

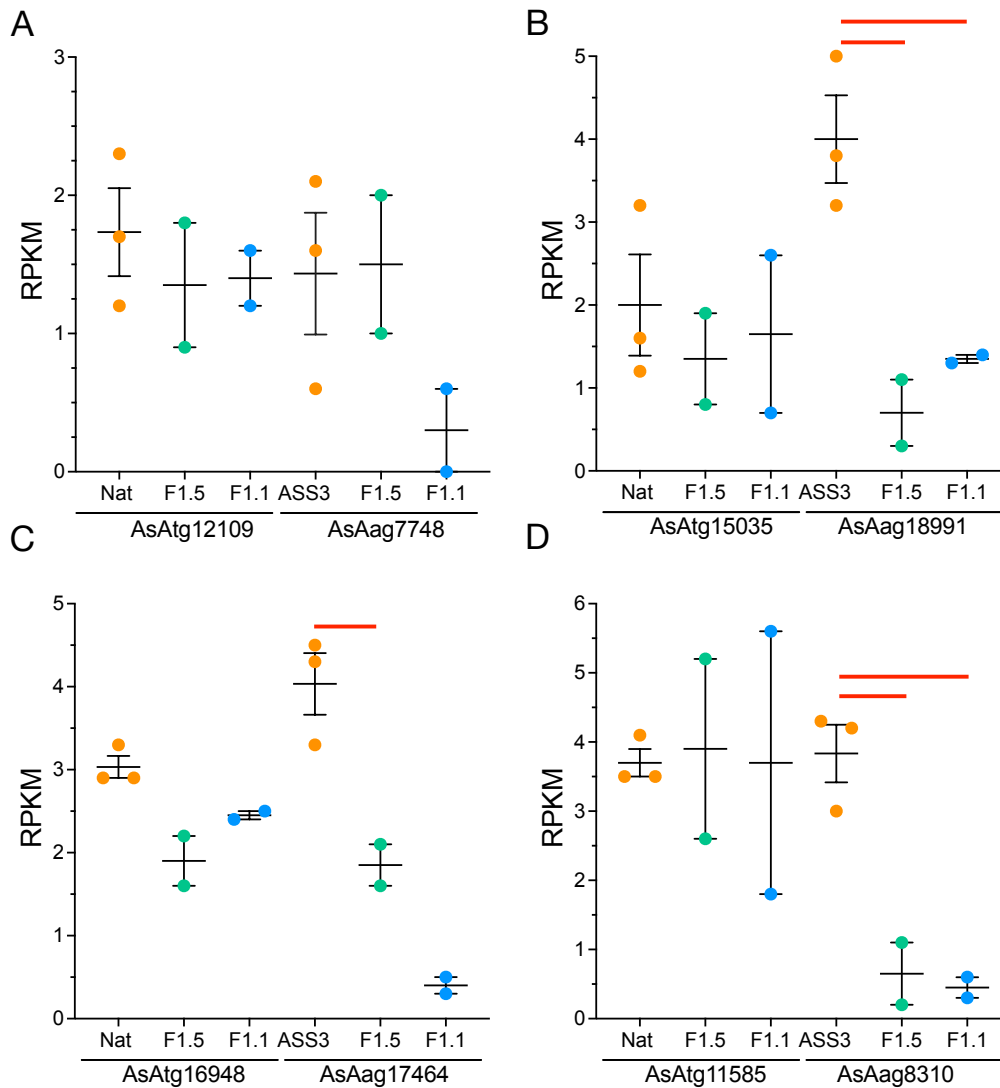


Figure 42 : Analyse des niveaux d'expression des gènes *MSH* d'*A. suecica*.

Graphiques montrant les niveaux d'expression des gènes codant pour les protéines MSH2 (A), MSH3 (B), MSH6 (C) et MSH7 (D). Les valeurs des RPKM normalisés par plante sont représentées sur l'axe des ordonnées avec les différents génotypes indiqués sur l'axe des abscisses (Nat pour la plante naturelle écotype ASS3 ; F1.1 et F1.5 pour les plantes néosynthétiques). Ces protéines sont codées par deux gènes d'*A. suecica* des sous-génomes d'*A. thaliana* (AsAtg) et d'*A. arenosa* (AsAag) qui sont décrits sur l'axe des abscisses. Les différences significatives d'expression entre les différentes conditions analysées avec l'outil DeSeq2 sont représentées par les lignes rouges (P -value ajustée < 0,05 et FC de 2).

IV. Résumé

Cette étude sur les gènes *MSH* d'*A. suecica* a permis de souligner que :

- Les séquences nucléotidiques et protéiques sont hautement conservées entre *A. thaliana*, *A. arenosa* et les deux sous-génomés d'*A. suecica* suggérant un rôle clé de ces protéines
- La mutation de la protéine MSH7 n'a pas d'impact sur la fertilité des plantes d'*A. thaliana* et d'*A. suecica*
- La mutation de la protéine MSH7 semble affecter la méiose des plantes d'*A. suecica* avec une augmentation d'anomalies méiotiques et la réduction de la recombinaison méiotique (diminution du nombre de chiasma/ crossing-overs de classe I)

CHAPITRE 6 : Discussion générale

L'allopolyploïdie joue un rôle crucial dans l'évolution et la spéciation des plantes. Cependant, les allopolyploïdes nouvellement formés doivent surmonter des défis liés à l'instabilité génétique, épigénétique et méiotique. En effet, la ségrégation des chromosomes pendant la méiose des plantes allopolyploïdes est un processus complexe en raison de la présence de chromosomes apparentés mais non identiques (homéologues) hérités des espèces progénitrices. La recombinaison méiotique entre chromosomes homéologues peut entraîner des erreurs de ségrégation chromosomique, de l'aneuploïdie et une diminution de la fertilité. À l'inverse, les allopolyploïdes évolués sont hautement fertiles et se comportent comme de vrais diploïdes pendant la méiose, favorisant la formation de crossing-overs entre chromosomes homologues tout en inhibant ceux entre chromosomes homéologues. Ainsi, les allopolyploïdes des premières générations subissent une forte pression de sélection pour limiter ou éviter la formation de crossing-overs entre chromosomes homéologues.

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la stabilisation de la méiose après l'allopolyploïdisation, nous avons analysé la fertilité et le comportement méiotique des quatre premières générations de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* issues d'un unique croisement entre le parent maternel autotétraploïde *A. thaliana* d'écotype Wa-1 et le parent paternel autotétraploïde *A. arenosa* d'écotype Care-1. En parallèle, nous avons comparé le transcriptome de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* de première génération avec celui des plantes d'*A. suecica* évoluées pour identifier des gènes candidats impliqués dans la régulation de la recombinaison homéologue. Nous avons également étudié l'impact de la mutation du gène *MSH7* (dont la protéine spécifique des plantes joue un rôle dans la reconnaissance des mésappariements) sur la fertilité et le comportement méiotique des plantes *msh7* d'*A. suecica*.

Je vais à présent discuter de la manière dont l'ensemble de ces résultats ont contribué à enrichir notre compréhension sur les mécanismes moléculaires mis en place au cours de l'évolution pour contrôler la stabilité méiotique chez la plante *Arabidopsis suecica*. J'apporterai également des éléments susceptibles de susciter de nouvelles hypothèses et perspectives pour approfondir ces recherches.

I. La régulation de l'appariement, de la synapse et de la recombinaison méiotique chez *Arabidopsis suecica*

La plante *Arabidopsis suecica* évoluée (d'écotype ASS3) présente une stabilité méiotique notable avec une formation ordonnée du complexe synaptonémal et un pourcentage de cellules avec 13 bivalents atteignant 93%. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Nibau *et al.*, 2022 qui rapportent environ 90% de cellules avec 13 bivalents pour la plante naturelle d'*A. suecica* d'écotype As9052. Des univalents sont observés à faible fréquence : 7% dans notre étude et environ 10% dans l'étude de Nibau *et al.*, 2022. De plus, les deux études montrent qu'aucun multivalent n'est présent dans la plante naturelle d'*A. suecica*.

Cependant, chez la plante néosynthétique d'*A. suecica*, on observe des altérations en début de méiose, notamment dans la fréquence des interactions initiales entre les centromères supposés favoriser l'alignement/l'appariement des chromosomes homologues au stade zygotène afin de faciliter la recherche d'homologie nécessaire à la réparation des cassures double brin (Daines & White, 2015; Zickler & Kleckner, 2015; Zhang & Han, 2017; Cromer *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024). Notre étude a montré que les interactions entre les centromères des deux sous-génomes d'*A. suecica* sont plus fréquentes au stade zygotène dans les plantes néosynthétiques par rapport à la plante évoluée alors que les interactions entre les centromères du même sous-génome sont réduites (Chéron *et al.*, 2023). Ainsi, ces données suggèrent que les centromères et potentiellement d'autres régions chromosomiques homéologues pourraient s'associer et conduire à la formation de multivalents synaptiques dans les plantes néosynthétiques. Pour distinguer de façon fiable les chromosomes homologues des homéologues, il est nécessaire d'optimiser la technique du GISH (Genomic In Situ Hybridization, (Ali *et al.*, 2004)) associée à la microscopie à haute résolution. Cela permettra d'identifier et de quantifier les multivalents synaptiques entre les deux sous-génomes d'*A. suecica* et de suivre leur évolution.

Ces observations pourraient indiquer une stabilisation anormale de l'invasion et de l'échange de brins d'ADN entre séquences homéologues, ce qui pourrait conduire à la formation de multivalents ou bivalents allosyndétiques en diacynèse et en métaphase I. Grâce à la technique du FISH, nous avons montré que la présence de la recombinaison homéologue est associée avec une réduction significative de la fréquence de crossing-over à l'échelle du génome, avec une diminution de la fréquence des chiasmata et des CO de classe I (foci MLH1) chez les plantes néosynthétiques sœurs de première génération d'*A. suecica* par rapport à la plante évoluée. Par conséquent, ces données suggèrent fortement que le choix du partenaire de

recombinaison est perturbé dans les plantes néosynthétiques d'*A. suecica* avec la formation de CO entre chromosomes homéologues au détriment des CO entre les chromosomes homologues.

De même, une communication personnelle avec Andrew Lloyd (Aberystwyth University, UK), qui a également observé une diminution de la fréquence des crossing-overs chez des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* issues de parents différents, confirme ce résultat. De plus, le nombre moyen de chiasma n'a pas augmenté après 4 générations, variant de 14,3 et 17,9 en première génération et de 14,5 à 18,27 en quatrième génération pour toutes les lignées indépendantes, y compris celles où une amélioration de la stabilité méiotique a été observée (**Figure 43**). En comparaison, le nombre moyen de chiasma est de 20,37 pour la plante naturelle évoluée (**Figure 43**). Ainsi, nous suggérons que les progéniteurs autotétraploïdes naturels pourraient avoir transmis un « faible nombre moyen de chiasma » aux plantes néosynthétiques.

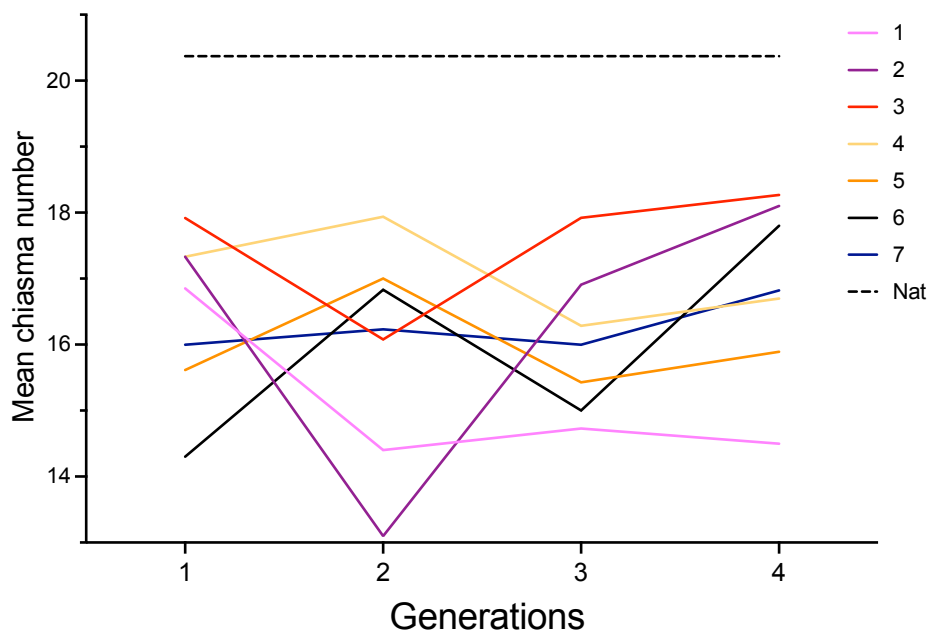


Figure 43 : Évolution du nombre moyen de chiasma de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* au cours de quatre générations successives.

Nombre moyen de chiasma quantifié sur des étalements chromosomiques de cellules méiotiques mâles (n=7 à n=17) pour la plante naturelle et les 7 lignées de plantes d'*A. suecica* au cours de 4 générations successives (indiquer sur le graphique).

Nous avons émis l'hypothèse que les protéines MSH pourraient jouer un rôle dans la régulation de la balance entre recombinaison homologue et recombinaison homéologue chez *A. suecica*. En effet, les protéines MSH sont supposées contrôler et corriger ou rejeter les événements de recombinaison présentant un nombre de mésappariements de l'ADN élevé pour aider à discriminer les chromosomes homologues des homéologues pendant la création des crossing-overs. Dans deux plantes mutantes *Atmsh7 Aamsh7*, nous avons constaté une réduction du pourcentage de cellules présentant 13 bivalents associée à une augmentation du pourcentage de cellules avec au moins un univalent (13-27%) et un multivalent (13-18%) par rapport aux plantes sauvages (**Figure 40**). De plus, la plante mutante *Atmsh7 Aamsh7 #1* présente une réduction significative du nombre de chiasma par méiocyte et de CO de classe I (foci MLH1) par rapport à la plante sauvage #1 (**Figure 41A**). Aucune différence significative n'a été observée entre la plante mutante *Atmsh7 Aamsh7 #2* et les plantes sauvages bien qu'on observe une tendance à la diminution du nombre moyen de chiasma par méiocyte (**Figure 41A**). Ces données sont en accord avec l'étude du gène *MSH7-3D* chez le blé tendre, qui a montré une réduction significative bien que légère de la fréquence de recombinaison homologue à l'échelle du génome dans le mutant *Tamsh7-3D* (Serra *et al.*, 2021). De plus, dans notre étude, nous avons observé une diminution du nombre de foci MLH1, désignant les CO de classe I, dans le mutant *Atmsh7 Aamsh7 #1* avec un nombre moyen de foci de $19,29 \pm 0,29$ contre $20,46 \pm 0,34$ pour la plante sauvage #1 (**Figure 41B**). Cela suggère que la protéine MSH7 joue un rôle à plusieurs niveaux dans (1) le rejet du brin envahisseur lors de l'étape d'invasion d'une séquence hom(é)ologue et (2) la correction des mésappariements afin de stabiliser la formation de foci MLH1 et des CO de classe I. En effet, on estime que 94% des sites MLH1 donneront des CO dans le mutant *msh7* contre 98% chez la plante sauvage ce qui suggère que MSH7 pourrait également intervenir plus tard dans la stabilisation/la correction de la double jonction de Holliday. De plus, l'étude de Hu *et al.*, 2017 a révélé que, chez le riz diploïde, MSH7 interagit avec la protéine MEICA1 (MEIOTIC CHROMOSOME ASSOCIATION 1), un orthologue de FLIP connu pour former un complexe avec FIGL1 pour réguler l'étape d'invasion de brin. Ainsi, cette interaction entre ces deux protéines suggère un rôle important de MSH7 dans la régulation de l'étape d'invasion. D'ailleurs, chez le riz, le mutant *meical* présente des associations aberrantes entre chromosomes ressemblant à des multivalents synaptiques comme chez *Arabidopsis arenosa*.

Par conséquent, tout comme chez le blé, la mutation des gènes *MSH7* d'*A. suecica* a un effet modeste sur la recombinaison. Cependant, il reste à déterminer si la protéine MSH7 joue un rôle direct dans la régulation de la recombinaison homéologue. Pour ce faire, nous avons

créé des allohaploïdes en hybridant une plante diploïde mutante CRISPR/Cas12a *Atmsh7* d'*Arabidopsis thaliana* (décrite précédemment) et une plante diploïde d'*Arabidopsis lyrata* (utilisée comme substitut pour *A. arenosa* ; ces deux espèces ont divergé il y a environ 1 million d'années) dont le croisement est connu pour fonctionner selon (Beaulieu *et al.*, 2009). Si la protéine MSH7 joue un rôle direct dans l'inhibition de la recombinaison homéologue, nous devrions observer une plus grande fréquence de formation de bivalents entre chromosomes non-homologues/ homéologues dans le croisement mutant *Atmsh7* x *AIMSH7* par rapport au croisement sauvage *AtMSH7* x *AIMSH7*. L'analyse de ces résultats est actuellement en cours. Pour renforcer notre hypothèse selon laquelle MSH7 joue un rôle dans la régulation de la recombinaison homéologue, il serait également intéressant de séquencer le génome de la descendance des plantes mutantes *Atmsh7 Aamsh7* et d'analyser de manière plus approfondie la présence ou l'absence d'échanges homéologues entre les deux sous-génomes d'*A. suecica*.

De plus, la mutation d'un seul ou des deux gènes *MSH7* d'*A. suecica* n'affecte pas la fertilité des plantes (viabilité des grains de pollen et nombre de graines par silique), comme c'est également le cas chez *Arabidopsis thaliana*, le blé (uniquement pour le nombre de graines par épi) et chez la tomate (avec *MSH7* réduit au silence par ARN interférents) (Li *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2021). En revanche, la mutation *msh7* impacte le nombre de graines par épi chez l'orge diploïde et la viabilité des pollens chez le maïs diploïde (Lloyd *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2024). Ainsi, une question persiste : pourquoi observe-t-on des phénotypes différents entre ces différentes espèces ?

Par ailleurs, notre étude transcriptomique n'a pas pu être directement comparée avec celles réalisées sur les méiocytes mâles de plantes sauvages d'*A. thaliana*, de maïs, de tournesol et de blé tendre (Dukowic-Schulze *et al.*, 2014; Flórez-Zapata *et al.*, 2014; Barra *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2023). En effet, plusieurs méthodes de normalisation de l'abondance des transcrits sont possibles : certaines études utilisent le calcul des RPM, qui prend en compte la profondeur de séquençage, ou des TPM, qui tient compte de la longueur des transcrits et du nombre total de reads, alors que nous avons utilisé dans notre étude la normalisation RPKM, qui prend en compte la profondeur du séquençage et la longueur du gène. Ainsi, bien que ces résultats ne soient pas directement comparables, nous observons une moyenne de 45,14% gènes avec un RPKM \geq 2 entre nos 7 réplicats. Chez *A. thaliana*, 52,8% de gènes ont un RPM \geq 2, montrant ainsi une tendance similaire (Dukowic-Schulze *et al.*, 2014).

La comparaison des transcriptomes des méiocytes mâles entre les plantes néosynthétiques et les plantes naturelles évoluées a mis en lumière une liste de gènes candidats sous-exprimés dans les méiocytes mâles des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* par rapport à

la plante naturelle. Une variation de l'expression des gènes candidats identifiés pourrait être responsable de l'instabilité méiotique observée chez ces plantes néosynthétiques. En effet, les gènes des deux sous-génomes codant pour les protéines du complexe synaptonémal *ASY4* et *SCEP2* montrent une diminution d'expression (mesurée en RPKM normalisés par plante), que ce soit uniquement pour la plante néosynthétique F1.1 ou les deux plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 (**Figure 32**). La protéine *ASY4* interagit avec les autres éléments axiaux *ASY1* et *ASY3* pour former l'axe chromosomique en début de prophase I (Rafiei & Ronceret, 2023). Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *asy4* présente des défauts de formation de l'axe chromosomique empêchant la formation du complexe synaptonémal en zygotène/pachytène (Chambon *et al.*, 2018). Par conséquent, on observe dans le mutant *asy4* une diminution des foyers *MLH1* et *HEI10* (désignant les CO de classe I) et une réduction d'un facteur 1,5 de la fréquence de CO avec une formation de CO dans les parties distales des chromosomes (Chambon *et al.*, 2018). Comme la synapse commence préférentiellement aux extrémités distales des chromosomes chez *A. thaliana*, il est suggéré que la restriction de la formation du complexe synaptonémal dans ces régions chez le mutant *asy4* pourrait expliquer cette répartition de CO (Chambon *et al.*, 2018). Quant à la protéine *SCEP2*, une étude récente chez *Arabidopsis thaliana* a montré qu'elle est impliquée dans la formation du complexe synaptonémal en s'associant avec la protéine *SCEP1* (Vrielynck *et al.*, 2023). Ensemble avec la protéine *ZYP1*, ces protéines assemblent la région centrale du complexe synaptonémal. Dans le mutant *Atscep2*, le complexe synaptonémal ne se forme pas entre les chromosomes homologues bien que les chromosomes restent alignés (Vrielynck *et al.*, 2023). De plus, l'interférence est perdue et la fréquence de CO est augmentée par rapport au sauvage (Vrielynck *et al.*, 2023). On observe également une légère diminution du nombre de graines par silique chez le mutant *Atscep2* par rapport à la plante sauvage (Vrielynck *et al.*, 2023).

Deux autres gènes, *MSH5* et *HEI10*, impliqués dans la désignation des CO de classe I présentent également une diminution d'expression (mesurée en RPKM normalisés) pour la plante néosynthétique F1.1 ou pour les deux plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 (**Figure 32**). Chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz, bien que la synapse se forme normalement, la mutation du gène *msh5* entraîne une diminution de 13% et d'environ 10% du nombre de chiasmata par cellule, respectivement pour *A. thaliana* et le riz (Higgins *et al.*, 2008b; Luo *et al.*, 2013). L'étude de Luo *et al.*, 2013 suggère que, chez le riz, *MSH5* agit en amont d'autres protéines *ZMM* *ZIP4*, *MER3* et *HEI10*, puisque ces protéines ne peuvent pas se localiser correctement sur les chromosomes en l'absence de *MSH5*. De plus, la fertilité est réduite chez le mutant *msh5* : chez *A. thaliana*, on observe une diminution de la longueur des siliques et chez le riz, la

présence de pollens non colorés et amorphes (Higgins *et al.*, 2008b; Luo *et al.*, 2013). En ce qui concerne la protéine HEI10, comme décrit dans l'introduction bibliographique, cette protéine joue un rôle dans le processus d'interférence, influençant le nombre et la distribution des CO sur une grande proportion de la longueur des chromosomes (Girard *et al.*, 2023; Morgan *et al.*, 2024). Chez *A. thaliana*, on observe une diminution progressive du nombre de foyers HEI10 le long du complexe synaptonémal du stade zygotène au stade diacynèse (Chelysheva *et al.*, 2012). Tout comme le mutant *msh5*, la mutation *hei10* n'affecte pas la formation du complexe synaptonémal mais entraîne une diminution importante et significative de la fréquence des chiasmata tant chez *A. thaliana* (85-90%) que le riz (environ 70%) (Chelysheva *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013). De même, la fertilité est réduite chez le mutant *hei10* : chez *A. thaliana*, on observe une diminution drastique du nombre moyen de graines par silique et chez le riz, la présence de pollens non colorés et amorphes (Chelysheva *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013). De plus, chez le mutant *hei10* de plantes néosynthétiques autotétraploïdes d'*A. thaliana*, on observe une diminution de la fréquence des CO, associée d'une réduction du taux de multivalents et d'une augmentation du nombre d'univalents (Gonzalo *et al.*, 2023; Parra-Nunez *et al.*, 2023).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que l'instabilité méiotique observée chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica* pourrait être liée à la sous-expression d'ASY4 et de SCEP2, entraînant une production insuffisante de ces protéines, ce qui pourrait compromettre la formation du complexe synaptonémal. Cette perturbation, combinée à la sous-expression des protéines ZMM MSH5 et HEI10 (désignant les CO de classe I soumis à l'interférence), pourrait expliquer cette instabilité. Une corrélation positive entre la longueur du complexe synaptonémal et la fréquence de CO a été décrite (Rafiei & Ronceret, 2023). Chez *A. arenosa*, la longueur de l'axe/du complexe synaptonémal est plus courte chez les plantes évoluées que chez les plantes néopolyploïdes, entraînant une diminution de la fréquence des CO (Morgan *et al.*, 2021b). Pour poursuivre notre étude, il serait donc intéressant de mesurer cytologiquement la longueur du complexe synaptonémal et d'analyser la répartition des foci HEI10 chez nos plantes néosynthétiques pour voir s'il existe une différence avec la plante naturelle. De plus, pour valider fonctionnellement chacun de ces gènes, une analyse de mutants CRISPR/Cas12a d'*A. suecica* devra être effectuée. Il serait également pertinent d'analyser et de comparer les séquences de ces deux plantes néosynthétiques avec la plante naturelle pour vérifier si le nombre de copies de chacun de ces gènes n'est pas supérieur chez la plante naturelle, ce qui pourrait expliquer cette augmentation d'expression. De même, étant donné que notre analyse ne prend pas en compte les polymorphismes de séquences, les variants alléliques du sous-

génomique d'*A. arenosa*, plante hautement hétérozygote, devront être analysés pour identifier toutes différences entre la plante naturelle et les plantes néosynthétiques. Il serait aussi intéressant de détecter des polymorphismes de séquences protéiques de ces 4 gènes candidats, comme c'est le cas pour ASY3 chez *A. lyrata* évoluée et ASY1 chez *A. arenosa* évoluée (Morgan *et al.*, 2020; Seear *et al.*, 2020).

Ainsi cette étude suggère que, comme chez *A. arenosa* et le blé tendre, le processus évolutif d'adaptation méiotique à la polyploïdie pourrait être multigénique chez la plante *Arabidopsis suecica*.

II. D'autres causes potentielles méiotiques pourraient être à l'origine de l'instabilité observée chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

Durant ma thèse, en raison du manque de temps, je me suis limitée à l'analyse cytologique des prophases I et des métaphases I, sans examiner les autres stades méiotiques chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. Cependant, la comparaison des transcriptomes des méiocytes mâles entre les deux plantes néosynthétiques F1.1 et F1.5 met en lumière d'autres causes potentielles de problèmes méiotiques qui pourraient être à l'origine de l'instabilité méiotique constatée chez ces plantes. En effet, les gènes *CYCA1*, *KIS*, *PS1*, *MAD1* et *NACK2* sont sous-exprimés dans la plante F1.1 néosynthétique ayant une méiose plus instable par rapport à la plante F1.5 (**Figure 31E**). Lors de la méiose mâle, la protéine CYCA1 (également connue sous le nom de TAM, pour Tardy Asynchronous Meiosis) est une cycline essentielle. Elle joue un rôle crucial au cours de la première division méiotique en interagissant avec des kinases CDK, en particulier dans les transitions entre la prophase I et la métaphase I, ainsi que entre la méiose I et la méiose II (d'Erfurth *et al.*, 2010; Cromer *et al.*, 2012). Les mutants *Attam* ne parviennent pas à entrer en méiose II ce qui entraîne la production de gamètes diploïdes fonctionnels au lieu de gamètes haploïdes (d'Erfurth *et al.*, 2010). La protéine KIS (ou KIESEL) est également cruciale. Elle régule l'organisation du fuseau méiotique avant la métaphase I et est essentielle à la biogenèse des microtubules (Kirik *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2010). Chez *A. thaliana*, les mutants *kis* présentent des défauts embryonnaires et sont stériles (Kirik *et al.*, 2002). La protéine PS1 (Parallele Spindle 1) joue un rôle clé dans l'organisation du fuseau méiotique, ce qui est essentiel à la ségrégation correcte des chromosomes pendant la méiose (d'Erfurth *et al.*, 2008; Blasio *et al.*, 2022). Chez *A. thaliana*, les mutants *ps1* présentent des défauts dans l'organisation du fuseau méiotique en méiose II, conduisant à la production de gamètes diploïdes lors de la méiose mâle (d'Erfurth *et al.*, 2008). La protéine MAD1 (Mitotic Arrest Deficiency 1), une composante du contrôle du fuseau (Spindle Assembly Checkpoint), agit principalement en

métaphase I et II pour s'assurer que tous les chromosomes sont correctement attachés aux microtubules avant l'activation du complexe promoteur d'anaphase (APC) (Ding *et al.*, 2012; Devigne & Bhalla, 2021). Enfin, la protéine NACK2 (NPK1-Activating Kinesin 2) est une kinésine impliquée dans la régulation de la cytokinèse à la fin de méiose II, assurant la séparation finale des cellules haploïdes (Tanaka *et al.*, 2004).

Ainsi, il est nécessaire d'analyser plus en détail les autres stades méiotiques pour évaluer la présence ou l'absence de défauts méiotiques chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*.

De plus, il pourrait exister des différences entre la méiose mâle et femelle, chacune pouvant être altérée de manière distincte ou non dans nos plantes néosynthétiques. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir des étalements de chromosomes méiotiques femelles chez nos plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. Chez les eucaryotes, y compris les plantes, des différences de fréquence et de répartition des crossing-overs le long des chromosomes entre la méiose femelle et mâle, connues sous le nom d'hétérochiasmie, ont été observées (Dluzewska *et al.*, 2018; Lloyd, 2022; Rafiei & Ronceret, 2023). Chez *A. thaliana*, le taux de CO est environ 40% plus élevé lors de la méiose mâle par rapport à la méiose femelle (Giraut *et al.*, 2011). De plus, lors de la méiose mâle, les CO sont plus fréquents dans les régions distales des chromosomes alors que pour la méiose femelle, ils sont plus près des péricentromères (Giraut *et al.*, 2011). Ces différences peuvent s'expliquer par la longueur variable du complexe synaptonémal entre les sexes chez *A. thaliana*, les femelles ayant un complexe synaptonémal plus court avec une interférence des CO plus marquée (Giraut *et al.*, 2011; Lloyd & Jenczewski, 2019). Il est suggéré que, plus la taille moyenne des boucles d'ADN est grande, plus la longueur du complexe synaptonémal sera courte (Lloyd, 2022). Par conséquent, des études cytologiques supplémentaires sur les méiocytes femelles d'*A. suecica* sont nécessaires pour enrichir la compréhension de l'adaptation méiotique à l'allopolypléidie chez *A. suecica*.

III. En plus d'une méiose instable, d'autres problèmes pourraient affecter la fertilité des plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

Dans notre étude portant sur de la fertilité et de la stabilité de la méiose au cours des quatre premières générations successives de plantes néosynthétisées d'*A. suecica* issues d'un même croisement, nous avons observé que la relation entre la stabilité de la méiose, la viabilité des grains de pollen et le nombre de graines par silique n'est pas linéaire (**Figures 24 et 25**). Cela suggère qu'il existe d'autres facteurs affectant la fertilité, indépendants de la méiose.

En effet, les analyses des lignées 2 et 7 à haute viabilité pollinique (HPV) et faible viabilité pollinique (LPV) ont révélé des différences dans l'évolution de la stabilité méiotique. La lignée 2 – HPV présente une meilleure stabilité méiotique par rapport à la lignée 2 – LPV, tandis que la tendance inverse est observée pour la lignée 7 (**Figure 26**). De même, parmi nos 7 lignées indépendantes, aucune corrélation directe n'a été trouvée entre l'amélioration de la viabilité des grains de pollen et un accroissement de la stabilité méiotique (**Figures 24 et 25**). Par exemple, pour la lignée 4, en quatrième génération 85% de pollens sont viables alors que seulement 20% des méiocytes montrent une stabilité méiotique correcte avec 13 bivalents (avec 30% de cellules présentant uniquement 2 univalents) (**Figures 24 et 25**). Nous émettons l'hypothèse que des aneuploïdies, des pseudo-aneuploïdies ou des instabilités chromosomiques telles que des réarrangements pourraient ne pas être détectées par la coloration des pollens avec la solution d'Alexander. Cette solution utilise l'acide fuchsine pour colorer les lipides du protoplasme en violet et la malachite pour colorer les polysaccharides de la paroi cellulaire en vert. Ainsi, les grains de pollen présentant des anomalies peuvent rester viables si les erreurs chromosomiques n'affectent pas directement leur fonction.

Bien que la coloration d'Alexander classe ces pollens comme viables, ils pourraient ne pas être capables de germer chez nos plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. En effet, une étude récente de Westermann *et al.*, 2024 a montré que chez les plantes néosynthétiques d'*A. arenosa*, la croissance des tubes polliniques induits expérimentalement est déficiente, avec une anatomie et une physiologie perturbée, une croissance lente et une expression génique altérée. En revanche, la croissance des tubes polliniques n'est pas altérée chez les plantes tétraploïdes évoluées. De plus, il a été montré que la croissance de l'extrémité du tube pollinique est améliorée grâce aux allèles des gènes AGC1 et ACA8 dérivées des tétraploïdes (Westermann *et al.*, 2024). Ainsi, il serait pertinent de mener de nouvelles recherches pour étudier la croissance du pollen chez nos plantes néosynthétiques d'*A. suecica*.

Avant l'étape de la germination et de la croissance du pollen, un autre problème non méiotique pouvant conduire à la stérilité des plantes peut survenir en raison de l'auto-incompatibilité au niveau de l'interaction entre la membrane plasmique des cellules papillaires et l'enveloppe du pollen. En effet, nos plantes néosynthétiques pourraient exprimer des haplotypes S incompatibles, ce qui entraînerait l'inhibition de la germination du pollen. Par conséquent, il serait nécessaire de séquencer et d'analyser la combinaison des locus S des plantes néosynthétiques d'*A. suecica* afin de déterminer si des problèmes d'auto-incompatibilité peuvent affecter la fertilité et la production de graines chez ces plantes.

Après fécondation entre les gamètes mâles et femelles, la formation de l'embryon et, par la suite, celle de l'endosperme (un tissu fournissant les nutriments nécessaires au développement de l'embryon et soutenant la germination de la graine) peuvent également être perturbées chez nos plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. Cette perturbation pourrait expliquer le très faible nombre de graines par silique observé chez ces plantes néoallopolyploïdes. En effet, il est possible qu'il y ait des conflits génétiques entre les génomes des progéniteurs de ces plantes, résultant d'une dérégulation de mécanismes épigénétiques à la suite de l'hybridation (Madlung & Wendel, 2013; Song & Chen, 2015; Köhler *et al.*, 2021).

Ainsi, en plus des problèmes liés à la méiose, ces autres facteurs non méiotiques affectant la fertilité pourraient expliquer pourquoi la moyenne du nombre de graines par silique des plantes néosynthétiques ne dépasse pas 41% de celle de la plante naturelle d'*A. suecica*. De nombreuses analyses restent à réaliser pour mieux comprendre les problèmes spécifiques à résoudre au cours de l'évolution pour restaurer la fertilité des plantes d'*A. suecica*.

IV. Des changements épigénétiques pourraient influencer l'évolution de la stabilité méiotique dans les premières générations des plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

L'analyse des méiocytes au stade métaphase I des 7 lignées indépendantes de plantes néosynthétiques d'*A. suecica* a révélé quatre schémas distincts d'évolution de la stabilité méiotique au cours des quatre premières générations suivant l'hybridation entre *A. thaliana* et *A. arenosa* (**Figure 25**). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. Premièrement, il est possible que la ségrégation de variants bénéfiques et délétères d'*A. arenosa* ait un impact sur la stabilité méiotique. Cette hypothèse devra être confirmée par l'analyse des séquences. De plus, après l'hybridation, certaines régions de l'ADN peuvent être différenciellement méthylées par rapport aux progéniteurs (Edger *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2024). Par exemple, chez *A. suecica*, il a été observé que le sous-génome d'*A. arenosa* est rapidement hypométhylé après l'hybridation alors qu'il converge vers le niveau de méthylation du sous-génome d'*A. thaliana* dans la plante naturelle évoluée (Jiang *et al.*, 2021). Il est donc possible que la ségrégation d'épiallèles influençant l'expression de gènes méiotiques comme nos gènes candidats HEI10, MSH5, ASY4, SCEP2, impacte la stabilité méiotique. Par conséquent, des analyses plus approfondies sur l'épigénome des plantes néosynthétiques seraient nécessaires pour comprendre ces quatre trajectoires différentes d'évolution de la stabilité méiotique dans nos sept lignées néosynthétiques d'*A. suecica*. De plus, certains éléments transposables peuvent être réactivés après la déméthylation de l'ADN consécutive à

l'hybridation (Voir Chapitre 1 : Introduction bibliographique). Bien que la plante naturelle évoluée d'*A. suecica* maintienne une stabilité dans la dynamique des éléments transposables (Burns *et al.*, 2021), il est important de considérer que la réactivation et l'expansion des éléments transposables puissent survenir à la suite d'un relâchement épigénétique chez les plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. Cela pourrait entraîner des instabilités génétiques, des modifications d'expression génique ou des insertions dans des gènes méiotiques clés, affectant ainsi la stabilité méiotique.

D'autre part, comme l'a montré la récente étude de Karimi-Ashtiyani *et al.*, 2024, il est possible que dans nos plantes néosynthétiques, la dominance d'un des deux sous-génomes régule l'expression de gènes essentiels au bon déroulement de la méiose. En effet, Karimi-Ashtiyani *et al.*, 2024 a démontré que l'expression et la contribution de CENH3 sont généralement plus importantes pour le sous-génome d'*A. arenosa* par rapport à celui d'*A. thaliana* dans les plantes synthétiques. Ces données fournissent une preuve de la dominance d'un sous-génome chez les plantes synthétiques d'*A. suecica* (Karimi-Ashtiyani *et al.*, 2024).

V. Des échanges homéologues pourraient affecter l'évolution de la stabilité méiotique dans les premières générations des plantes néosynthétiques d'*A. suecica*

Par ailleurs, la formation puis la ségrégation d'échanges homéologues pourraient expliquer les variations dans les trajectoires d'évolution de la stabilité méiotique observées dans nos sept lignées indépendantes d'*A. suecica* néosynthétiques. En effet, une étude antérieure sur différentes lignées de *Brassica napus* a montré une diminution significative du pourcentage de cellules méiotiquement stables avec 19 bivalents, liée à une augmentation des échanges homéologues *de novo* entre la génération 1 et la génération 4, suivie d'une diminution de ces échanges entre la génération 4 et la génération 9 (Carvalho *et al.*, 2021). Il est donc possible que l'aggravation de l'instabilité méiotique dans nos lignées néosynthétiques soit également liée à la formation d'échanges homéologues au cours de la méiose. Pour valider cette hypothèse, il est nécessaire de séquencer chaque échange homéologue à chaque génération afin de suivre leur dynamique et de déterminer s'ils impactent la restauration de la stabilité méiotique chez certaines lignées de plantes néosynthétiques d'*A. suecica*. De plus, il serait intéressant de déterminer si ces échanges homéologues sont biaisés en faveur de l'un des deux sous-génomes.

Pour conclure, cette thèse a permis d'approfondir la compréhension de l'adaptation méiotique à l'allopolyploïdie chez *Arabidopsis suecica*, en se concentrant sur la caractérisation de la fertilité et du comportement méiotique des plantes néosynthétiques dans les premières générations. Après 4 générations, nous avons identifié quatre voies distinctes d'évolution de la stabilité méiotique chez ces plantes néoallopolyploïdes. De plus, cette étude met en lumière le rôle potentiel des protéines MSH7, ASY4, SCEP2, MSH5 et HEI10 dans la régulation de la recombinaison méiotique d'*A. suecica*. Pour approfondir ces découvertes, il est nécessaire de valider fonctionnellement ces gènes candidats par la création et l'analyse de mutants CRISPR/Cas12a. Ces recherches ouvrent ainsi des perspectives prometteuses pour explorer les mécanismes moléculaires liés à l'adaptation et à la stabilité méiotique des plantes allopolyploïdes.

Références

- Abraham K, Nemorin A, Lebot V, Arnau G. 2013.** Meiosis and sexual fertility of autotetraploid clones of greater yam *Dioscorea alata* L. **60**: 819-823.
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003.** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 4649-4654.
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology* **8**: 135-41.
- Alabdullah AK, Moore G, Martín AC. 2021.** A Duplicated Copy of the Meiotic Gene ZIP4 Preserves up to 50% Pollen Viability and Grain Number in Polyploid Wheat. *Biology* **10**.
- Alexandrow MG, Hamlin JL. 2005.** Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation. *The Journal of Cell Biology* **168**: 875-886.
- Alger EI, Edger PP. 2020.** One subgenome to rule them all: underlying mechanisms of subgenome dominance. *Current Opinion in Plant Biology* **54**: 108-113.
- Ali HBM, Lysak MA, Schubert I. 2004.** Genomic in situ hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific Arabidopsis hybrids. *Genome* **47**: 954-960.
- Al-Kaff N, Knight E, Bertin I, Foote T, Hart N, Griffiths S, Moore G. 2008.** Detailed Dissection of the Chromosomal Region Containing the Ph1 Locus in Wheat *Triticum aestivum*: With Deletion Mutants and Expression Profiling. *Annals of Botany* **101**: 863-872.
- Armstrong SJ, Caryl AP, Jones GH, Franklin FCH. 2002.** Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica. *Journal of Cell Science* **115**: 3645-3655.
- Ashley T, Walpita D, Rooij DG de. 2001.** Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *Journal of cell science* **114**: 685-93.
- Attia T, Röbbelen G. 1986.** Cytogenetic relationship within cultivated Brassica analyzed in amphihaploids from the three diploid ancestors. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **28**: 323-329.
- Bachmann JA, Tedder A, Fracassetti M, Steige KA, Lafon-Placette C, Köhler C, Slotte T. 2021.** On the origin of the widespread self-compatible allotetraploid *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae). *Heredity* **127**: 124-134.

Bachmann JA, Tedder A, Laenen B, Fracassetti M, Désamoré A, Lafon-Placette C, Steige KA, Callot C, Marande W, Neuffer B, et al. 2019. Genetic basis and timing of a major mating system shift in *Capsella*. *New Phytologist* **224**: 505-517.

Bai X, Peirson BN, Dong F, Xue C, Makaroff CA. 1999. Isolation and Characterization of SYN1, a RAD21-like Gene Essential for Meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **11**: 417-430.

Baidouri ME, Kim KD, Abernathy B, Arikrit S, Maumus F, Panaud O, Meyers BC, Jackson SA. 2015. A new approach for annotation of transposable elements using small RNA mapping. *Nucleic Acids Research* **43**: e84-e84.

Barra L, Termolino P, Cigliano RA, Cremona G, Paparo R, Lanzillo C, Consiglio MF, Conicella C. 2021. Meiocyte Isolation by INTACT and Meiotic Transcriptome Analysis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **12**: 638051.

Barrett, Shore SCH and, Joel S. 1989. Isozyme Variation in Colonizing Plants ([\"Soltis, Douglas E.\nand Soltis, Pamela S.\nand Dudley, et Theodore R.\"], Éd.). : 106-126.

Bateman AJ. 1954. Self-incompatibility systems in angiosperms II. *Iberis amara*. *Heredity* **8**: 305-332.

Beaulieu J, Jean M, Belzile F. 2009. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*–*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Molecular Genetics and Genomics* **281**: 421-435.

Bennetzen JL, Wang H. 2014. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual review of plant biology* **65**: 505-30.

Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. 2015. The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the « gold standard » annotated reference plant genome. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **53**: 474-85.

Berchowitz LE, Copenhaver GP. 2010. Genetic Interference: Don't Stand So Close to Me. *Current Genomics* **11**: 91-102.

Bertioli DJ, Jenkins J, Clevenger J, Dudchenko O, Gao D, Seijo G, Leal-Bertioli SCM, Ren L, Farmer AD, Pandey MK, et al. 2019. The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea*. *Nature Genetics* **51**: 877-884.

Beschorner M, Plümper B, Odenbach W. 1995. Analysis of self-incompatibility interactions in 30 resynthesized *Brassica napus* lines. I. Fluorescence microscopic studies. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **90**: 665-70.

Bird KA, Niederhuth CE, Ou S, Gehan M, Pires JC, Xiong Z, VanBuren R, Edger PP. 2021. Replaying the evolutionary tape to investigate subgenome dominance in allopolyploid *Brassica napus*. *New Phytologist* **230**: 354-371.

- Bird KA, VanBuren R, Puzey JR, Edger PP. 2018.** The causes and consequences of subgenome dominance in hybrids and recent polyploids. *New Phytologist* **220**: 87-93.
- Blackwell AR, Dluzewska J, Szymanska-Lejman M, Desjardins S, Tock AJ, Kbir N, Lambing C, Lawrence EJ, Bieluszewski T, Rowan B, et al. 2020.** MSH2 shapes the meiotic crossover landscape in relation to interhomolog polymorphism in Arabidopsis. *The EMBO Journal* **39**: e104858.
- BLAKESLEE AF, AVERY AG. 1937.** METHODS OF INDUCING DOUBLING OF CHROMOSOMES IN PLANTS: By Treatment With Colchicine*. *Journal of Heredity* **28**: 393-411.
- Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH. 2003.** A Recent Polyploidy Superimposed on Older Large-Scale Duplications in the Arabidopsis Genome. *Genome Research* **13**: 137-144.
- Blasio F, Prieto P, Pradillo M, Naranjo T. 2022.** Genomic and Meiotic Changes Accompanying Polyploidization. *Plants* **11**: 125.
- Boden SA, Langridge P, Spangenberg G, Able JA. 2009.** TaASY1 promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of Ph1. *The Plant Journal* **57**: 487-497.
- Boden SA, Shadiac N, Tucker EJ, Langridge P, Able JA. 2007.** Expression and functional analysis of TaASY1 during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*). *BMC Molecular Biology* **8**: 65.
- Bohutínská M, Alston M, Monnahan P, Mandáková T, Bray S, Paajanen P, Kolář F, Yant L. 2021a.** Novelty and convergence in adaptation to whole genome duplication. *Molecular Biology and Evolution* **38**: msab096-.
- Bohutínská M, Handrick V, Yant L, Schmickl R, Kolář F, Bomblies K, Paajanen P. 2021b.** De Novo Mutation and Rapid Protein (Co-)evolution during Meiotic Adaptation in *Arabidopsis arenosa*. *Molecular Biology and Evolution* **38**: 1980-1994.
- Bomblies K. 2020.** When everything changes at once: finding a new normal after genome duplication. *Proceedings of the Royal Society B* **287**: 20202154.
- Bomblies K. 2023.** Learning to tango with four (or more): the molecular basis of adaptation to polyploid meiosis. *Plant Reproduction* **36**: 107-124.
- Bomblies K, Higgins JD, Yant L. 2015.** Meiosis evolves: adaptation to external and internal environments. *New Phytologist* **208**: 306-323.
- Bomblies K, Jones G, Franklin C, Zickler D, Kleckner N. 2016.** The challenge of evolving stable polyploidy: could an increase in “crossover interference distance” play a central role? *Chromosoma* **125**: 287-300.
- Bomblies K, Madlung A. 2014.** Polyploidy in the Arabidopsis genus. *Chromosome Research* **22**: 117-134.

Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH. 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* **422**: 433-8.

Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G. 2004. GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20**: 3710-3715.

Bretagnolle F, Thompson JD. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* **129**: 1-22.

Brown MS, Bishop DK. 2014. DNA Strand Exchange and RecA Homologs in Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**: a016659.

Brummer EC, Cazarro PM, Luth D. 1999. Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry. *Crop Science* **39**: crops1999.0011183X003900040041x.

Buggs RJA, Zhang L, Miles N, Tate JA, Gao L, Wei W, Schnable PS, Barbazuk WB, Soltis PS, Soltis DE. 2011. Transcriptomic Shock Generates Evolutionary Novelty in a Newly Formed, Natural Allopolyploid Plant. *Current Biology* **21**: 551-556.

Burns R, Mandáková T, Gunis J, Soto-Jiménez LM, Liu C, Lysak MA, Novikova PYu, Nordborg M. 2021. Gradual evolution of allopolyploidy in *Arabidopsis suecica*. *Nature Ecology & Evolution* **5**: 1367-1381.

Cai X, Dong F, Edelman RE, Makaroff CA. 2003. The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *Journal of Cell Science* **116**: 2999-3007.

Capilla-Pérez L, Durand S, Hurel A, Lian Q, Chambon A, Taochy C, Solier V, Grelon M, Mercier R. 2021. The synaptonemal complex imposes crossover interference and heterochiasmy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.

Carvalho A, Delgado M, Barão A, Frescatada M, Ribeiro E, Pikaard CS, Viegas W, Neves N. 2010. Chromosome and DNA methylation dynamics during meiosis in the autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Sexual Plant Reproduction* **23**: 29-37.

Carvalho JF de, Stoeckel S, Eber F, Lodé-Taburel M, Gilet M, Trotoux G, Morice J, Falentin C, Chèvre A, Rousseau-Gueutin M. 2021. Untangling structural factors driving genome stabilization in nascent *Brassica napus* allopolyploids. *New Phytologist* **230**: 2072-2084.

Castric V, Bechsgaard J, Schierup MH, Vekemans X. 2008. Repeated Adaptive Introgression at a Gene under Multiallelic Balancing Selection. *PLoS Genetics* **4**: e1000168.

Castric V, Vekemans X. 2004. INVITED REVIEW: Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* **13**: 2873-2889.

Chakraborty U, Alani E. 2016. Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Research* **16**: fow071.

Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, et al. 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic Brassica napus oilseed genome. *Science* **345**: 950-953.

Chambon A, West A, Vezon D, Horlow C, Muyt AD, Chelysheva L, Ronceret A, Darbyshire A, Osman K, Heckmann S, et al. 2018. Identification of ASYNAPTIC4, a Component of the Meiotic Chromosome Axis. *Plant Physiology* **178**: 233-246.

Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, et al. 2005. Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the Hardness Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (Triticum and Aegilops). *The Plant Cell* **17**: 1033-1045.

Chaudhary B, Flagel L, Stupar RM, Udall JA, Verma N, Springer NM, Wendel JF. 2009. Reciprocal Silencing, Transcriptional Bias and Functional Divergence of Homeologs in Polyploid Cotton (*Gossypium*). *Genetics* **182**: 503-517.

Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, Belcram K, Rocques N, Márquez-Lema A, Bhatt AM, Horlow C, et al. 2005. AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *Journal of Cell Science* **118**: 4621-4632.

Chelysheva L, Gendrot G, Vezon D, Doutriaux M-P, Mercier R, Grelon M. 2007. Zip4/Spo22 Is Required for Class I CO Formation but Not for Synapsis Completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **3**: e83.

Chelysheva L, Vezon D, Chambon A, Gendrot G, Pereira L, Lemhemdi A, Vrielynck N, Guin SL, Novatchkova M, Grelon M. 2012. The *Arabidopsis* HEI10 Is a New ZMM Protein Related to Zip3. *PLoS Genetics* **8**: e1002799.

Chen ZJ. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual review of plant biology* **58**: 377-406.

Chen ZJ. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* **15**: 57-71.

Chen ZJ. 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Reviews Genetics* **14**: 471-482.

Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. 1998. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in

Arabidopsis allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 14891-14896.

Chen ZJ, Pikaard CS. 1997a. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: Biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in Brassica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 3442-3447.

Chen ZJ, Pikaard CS. 1997b. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes & development* **11**: 2124-36.

Chen S, Ren F, Zhang L, Liu Y, Chen X, Li Y, Zhang L, Zhu B, Zeng P, Li Z, et al. 2018. Unstable Allotetraploid Tobacco Genome due to Frequent Homeologous Recombination, Segmental Deletion, and Chromosome Loss. *Molecular Plant* **11**: 914-927.

Chen C, Retzel EF. 2013. Plant Meiosis, Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* **990**: 203-213.

Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual review of plant biology* **70**: 667-697.

Cheng F, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B, Lin K, Bonnema G, Wang X. 2012. Biased Gene Fractionation and Dominant Gene Expression among the Subgenomes of Brassica rapa. *PLoS ONE* **7**: e36442.

Chéron F, Petiot V, Lambing C, White C, Serra H. 2023. Incorrect recombination partner associations contribute to meiotic instability of neo-allopolyploid Arabidopsis suecica. *New Phytologist*.

Chester M, Gallagher JP, Symonds VV, Silva AVC da, Mavrodiev EV, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE. 2012. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 1176-1181.

Choi K, Henderson IR. 2015. Meiotic recombination hotspots – a comparative view. *The Plant Journal* **83**: 52-61.

Choi K, Zhao X, Kelly KA, Venn O, Higgins JD, Yelina NE, Hardcastle TJ, Ziolkowski PA, Copenhaver GP, Franklin FCH, et al. 2013. Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nature Genetics* **45**: 1327-1336.

Choi K, Zhao X, Tock AJ, Lambing C, Underwood CJ, Hardcastle TJ, Serra H, Kim J, Cho HS, Kim J, et al. 2018. Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in Arabidopsis thaliana transposons and gene regulatory regions. *Genome Research* **28**: 532-546.

Choudhary A, Wright L, Ponce O, Chen J, Prashar A, Sanchez-Moran E, Luo Z, Compton L. 2020. Varietal variation and chromosome behaviour during meiosis in *Solanum tuberosum*. *Heredity* **125**: 212-226.

Chu Y, Bertioli D, Levinson CM, Stalker HT, Holbrook CC, Ozias-Akins P. 2021. Homoeologous recombination is recurrent in the nascent synthetic allotetraploid *A. ipaënsis* x *A. correntina*4x and its derivatives. *G3 Genes/Genomes/Genetics* **11**: jkab066-.

Cifuentes M, Eber F, Lucas M-O, Lode M, Chèvre A-M, Jenczewski E. 2010a. Repeated Polyploidy Drove Different Levels of Crossover Suppression between Homoeologous Chromosomes in *Brassica napus* Allohaploids . *The Plant Cell* **22**: 2265-2276.

Cifuentes M, Grandont L, Moore G, Chèvre AM, Jenczewski E. 2010b. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist* **186**: 29-36.

Claessen H, Keulemans W, Poel BV de, Storme ND. 2019. Finding a Compatible Partner: Self-Incompatibility in European Pear (*Pyrus communis*); Molecular Control, Genetic Determination, and Impact on Fertilization and Fruit Set. *Frontiers in Plant Science* **10**: 407.

Clift D, Marston AL. 2011. The role of shugoshin in meiotic chromosome segregation. *Cytogenetic and genome research* **133**: 234-42.

Cloud V, Chan Y-L, Grubb J, Budke B, Bishop DK. 2012. Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation During Meiosis. *Science* **337**: 1222-1225.

Cole F, Kauppi L, Lange J, Roig I, Wang R, Keeney S, Jasin M. 2012. Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nature Cell Biology* **14**: 424-430.

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

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

Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000. Phenotypic Instability and Rapid Gene Silencing in Newly Formed *Arabidopsis* Allotetraploids. *The Plant Cell Online* **12**: 1551-1567.

Compton ME, Gray DJ, Elmstrom GW. 1996. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured in vitro. *Euphytica* **87**: 165-172.

Cromer L, Heyman J, Touati S, Harashima H, Araou E, Girard C, Horlow C, Wassmann K, Schnittger A, Veylder LD, et al. 2012. OSD1 Promotes Meiotic Progression via APC/C Inhibition and Forms a Regulatory Network with TDM and CYCA1;2/TAM. *PLoS Genetics* **8**: e1002865.

Cromer L, Jolivet S, Singh DK, Berthier F, Winne ND, Jaeger GD, Komaki S, Prusicki MA, Schnittger A, Guérois R, et al. 2019. Patronus is the elusive plant securin, preventing chromosome separation by antagonizing separase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 16018-16027.

Cromer L, Tiscareno-Andrade M, Lefranc S, Chambon A, Hurel A, Brogniez M, Guérin J, Masson IL, Adam G, Charif D, et al. 2024. Rapid meiotic prophase chromosome movements in *Arabidopsis thaliana* are linked to essential reorganization at the nuclear envelope. *Nature Communications* **15**: 5964.

Crowley JG, Rees H. 1968. Fertility and selection in tetraploid *Lolium*. *Chromosoma* **24**: 300-308.

Culligan KM, Meyer-Gauen G, Lyons-Weiler J, Hays JB. 2000. Evolutionary origin, diversification and specialization of eukaryotic MutS homolog mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Research* **28**: 463-471.

Cuñado N, Callejas S, García MJ, Fernández A, Santos JL. 1996. The pattern of zygotene and pachytene pairing in allotetraploid *Aegilops* species sharing the U genome. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 1152-1155.

Dalnes O, Bazile J, Gallego ME, White CI. 2022. DMC1 attenuates RAD51-mediated recombination in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **18**: e1010322.

Dalnes O, Degroote F, Goubely C, Amiard S, Gallego ME, White CI. 2013. Meiotic Recombination in *Arabidopsis* Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLoS Genetics* **9**: e1003787.

Dalnes O, White CI. 2015. Centromere Associations in Meiotic Chromosome Pairing. *Annual Review of Genetics* **49**: 1-20.

Darrier B, Rimbert H, Balfourier F, Pingault L, Josselin A-A, Servin B, Navarro J, Choulet F, Paux E, Sourdille P. 2017. High-Resolution Mapping of Crossover Events in the Hexaploid Wheat Genome Suggests a Universal Recombination Mechanism. *Genetics* **206**: 1373-1388.

Davies A, Jenkins G, Rees H. 1990. Diploidisation of *Lotus corniculatus* L. (Fabaceae) by elimination of multivalents. *Chromosoma* **99**: 289-295.

Deb SK, Edger PP, Pires JC, McKain MR. 2023a. Patterns, mechanisms, and consequences of homoeologous exchange in allopolyploid angiosperms: a genomic and epigenomic perspective. *New Phytologist* **238**: 2284-2304.

Deb SK, Edger PP, Pires JC, McKain MR. 2023b. Patterns, mechanisms, and consequences of homoeologous exchange in allopolyploid angiosperms: a genomic and epigenomic perspective. *New Phytologist* **238**: 2284-2304.

Desai A, Chee PW, Rong J, May OL, Paterson AH. 2006. Chromosome structural changes in diploid and tetraploid A genomes of *Gossypium*. *Genome* **49**: 336-45.

- Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. 2000.** Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the Arabidopsis Floral-Dip Method1. *Plant Physiology* **123**: 895-904.
- Devigne A, Bhalla N. 2021.** Mad1's ability to interact with Mad2 is essential to regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans*. *PLoS Genetics* **17**: e1009598.
- deWet JM. 1979.** Origins of polyploids. *Basic life sciences* **13**: 3-15.
- Dewitte A, Laere KV, Huylbroeck JV. 2012.** Plant Breeding.
- Dhaliwal HS, GILL BS, WAINES JG. 1977.** Analysis of induced homoeologous pairing in a ph mutant wheat X rye hybrid. *Journal of Heredity* **68**: 207-209.
- Ding M, Chen ZJ. 2018.** Epigenetic perspectives on the evolution and domestication of polyploid plant and crops. *Current Opinion in Plant Biology* **42**: 37-48.
- Ding D, Muthuswamy S, Meier I. 2012.** Functional interaction between the Arabidopsis orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. *Plant Molecular Biology* **79**: 203-216.
- Dio CD, Serra H, Sourdille P, Higgins JD. 2023.** ASYNAPSIS 1 ensures crossover fidelity in polyploid wheat by promoting homologous recombination and suppressing non-homologous recombination. *Frontiers in Plant Science* **14**: 1188347.
- Dluzewska J, Dziegielewski W, Szymanska-Lejman M, Gazecka M, Henderson IR, Higgins JD, Ziolkowski PA. 2023.** MSH2 stimulates interfering and inhibits non-interfering crossovers in response to genetic polymorphism. *Nature Communications* **14**: 6716.
- Dluzewska J, Szymanska M, Ziolkowski PA. 2018.** Where to Cross Over? Defining Crossover Sites in Plants. *Frontiers in Genetics* **9**: 609.
- Dong C, Thomas S, Becker D, Lörz H, Whitford R, Sutton T, Able JA, Langridge P. 2005.** WM5: Isolation and characterisation of a gene expressed during early meiosis and shoot meristem development in wheat. *Functional plant biology : FPB* **32**: 249-258.
- Dong C, Whitford R, Langridge P. 2002.** A DNA mismatch repair gene links to the Ph2 locus in wheat. *Genome* **45**: 116-24.
- Draeger TN, Rey M-D, Hayta S, Smedley M, Alabdullah AK, Moore G, Martín AC. 2023.** ZIP4 is required for normal progression of synapsis and for over 95% of crossovers in wheat meiosis. *Frontiers in plant science* **14**: 1189998.
- Driscoll JC. 1972.** GENETIC SUPPRESSION OF HOMOELOGOUS CHROMOSOME PAIRING IN HEXAPLOID WHEAT. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **14**: 39-42.

- Duan T, Zhang Z, Genete M, Poux C, Sicard A, Lascoux M, Castric V, Vekemans X. 2024.** Dominance between self-incompatibility alleles determines the mating system of *Capsella* allopolyploids. *Evolution Letters*: qrae011.
- Dubois E, Muylt AD, Soyer JL, Budin K, Legras M, Piolot T, Debuchy R, Kleckner N, Zickler D, Espagne E. 2019.** Building bridges to move recombination complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 12400-12409.
- Dukowic-Schulze S, Harris A, Li J, Sundararajan A, Mudge J, Retzel EF, Pawlowski WP, Chen C. 2014.** Comparative Transcriptomics of Early Meiosis in Arabidopsis and Maize. *Journal of Genetics and Genomics* **41**: 139-152.
- Durand S, Lian Q, Jing J, Ernst M, Grelon M, Zwicker D, Mercier R. 2022.** Joint control of meiotic crossover patterning by the synaptonemal complex and HEI10 dosage. *Nature Communications* **13**: 5999.
- Durand E, Méheust R, Soucaze M, Goubet PM, Gallina S, Poux C, Fobis-Loisy I, Guillon E, Gaude T, Sarazin A, et al. 2014.** Dominance hierarchy arising from the evolution of a complex small RNA regulatory network. *Science* **346**: 1200-1205.
- Edger PP, Smith R, McKain MR, Cooley AM, Vallejo-Marin M, Yuan Y, Bewick AJ, Ji L, Platts AE, Bowman MJ, et al. 2017.** Subgenome Dominance in an Interspecific Hybrid, Synthetic Allopolyploid, and a 140-Year-Old Naturally Established Neo-Allopolyploid Monkeyflower. *The Plant Cell* **29**: 2150-2167.
- Eichten SR, Briskine R, Song J, Li Q, Swanson-Wagner R, Hermanson PJ, Waters AJ, Starr E, West PT, Tiffin P, et al. 2013.** Epigenetic and Genetic Influences on DNA Methylation Variation in Maize Populations. *The Plant Cell* **25**: 2783-2797.
- Emmenecker C, Mézard C, Kumar R. 2023.** Repair of DNA double-strand breaks in plant meiosis: role of eukaryotic RecA recombinases and their modulators. *Plant Reproduction* **36**: 17-41.
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S. 2016.** Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Scientific Reports* **6**: 38169.
- Endo, Toki A and, Seiichi. 2019.** Targeted Mutagenesis Using FnCpf1 in Tobacco (["Qi et Yiping"], Éd.). : 269-281.
- d'Erfurth I, Cromer L, Jolivet S, Girard C, Horlow C, Sun Y, To JPC, Berchowitz LE, Copenhaver GP, Mercier R. 2010.** The CYCLIN-A CYCA1;2/TAM Is Required for the Meiosis I to Meiosis II Transition and Cooperates with OSD1 for the Prophase to First Meiotic Division Transition. *PLoS Genetics* **6**: e1000989.
- d'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Simon M, Jenczewski E, Mercier R. 2008.** Mutations in AtPS1 (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle 1) Lead to the Production of Diploid Pollen Grains. *PLoS Genetics* **4**: e1000274.

Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, Morris PL, Tjian R, Richards JS. 2005. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes & Development* **19**: 794-803.

Feliner GN, Casacuberta J, Wendel JF. 2020. Genomics of Evolutionary Novelty in Hybrids and Polyploids. *Frontiers in Genetics* **11**: 792.

Ferdous M, Higgins JD, Osman K, Lambing C, Roitinger E, Mechtler K, Armstrong SJ, Perry R, Pradillo M, Cuñado N, et al. 2012. Inter-Homolog Crossing-Over and Synapsis in Arabidopsis Meiosis Are Dependent on the Chromosome Axis Protein AtASY3. *PLoS Genetics* **8**: e1002507.

Fernandes JB, Séguéla-Arnaud M, Larchevêque C, Lloyd AH, Mercier R. 2018. Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: 2431-2436.

Flórez-Zapata NMV, Reyes-Valdés MH, Hernandez-Godínez F, Martínez O. 2014. Transcriptomic landscape of prophase I sunflower male meiocytes. *Frontiers in Plant Science* **5**: 277.

Fozard JA, Morgan C, Howard M. 2023. Coarsening dynamics can explain meiotic crossover patterning in both the presence and absence of the synaptonemal complex. *eLife* **12**: e79408.

France MG, Enderle J, Röhrig S, Puchta H, Franklin FCH, Higgins JD. 2021. ZYP1 is required for obligate cross-over formation and cross-over interference in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.

Franklin-Tong VE, Franklin FCH. 2003. The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **358**: 1025-1032.

Freeling M, Woodhouse MR, Subramaniam S, Turco G, Lisch D, Schnable JC. 2012. Fractionation mutagenesis and similar consequences of mechanisms removing dispensable or less-expressed DNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 131-139.

Freeling M, Xu J, Woodhouse M, Lisch D. 2015. A Solution to the C-Value Paradox and the Function of Junk DNA: The Genome Balance Hypothesis. *Molecular Plant* **8**: 899-910.

Fuentes RR, Chebotarov D, Duitama J, Smith S, Hoz JFD Ia, Mohiyuddin M, Wing RA, McNally KL, Tatarinova T, Grigoriev A, et al. 2019. Structural variants in 3000 rice genomes. *Genome Research* **29**: 870-880.

Fujii S, Kubo K, Takayama S. 2016. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nature Plants* **2**: 16130.

Fujii S, Takayama S. 2018. Multilayered dominance hierarchy in plant self-incompatibility. *Plant reproduction* **31**: 15-19.

Gaebelein R, Schiessl SV, Samans B, Batley J, Mason AS. 2019. Inherited allelic variants and novel karyotype changes influence fertility and genome stability in Brassica allohexaploids. *New Phytologist* **223**: 965-978.

Gaeta RT, Pires JC. 2010. Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist* **186**: 18-28.

Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007. Genomic Changes in Resynthesized Brassica napus and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *The Plant Cell* **19**: 3403-3417.

Geelen S and. 2022. Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation.

Gillies CB. 1985. An electron microscopic study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye. *Chromosoma* **92**: 165-175.

Girard C, Zwicker D, Mercier R. 2023. The regulation of meiotic crossover distribution: a coarse solution to a century-old mystery? *Biochemical Society Transactions*.

Giraut L, Falque M, Drouaud J, Pereira L, Martin OC, Mézard C. 2011. Genome-Wide Crossover Distribution in Arabidopsis thaliana Meiosis Reveals Sex-Specific Patterns along Chromosomes. *PLoS Genetics* **7**: e1002354.

Gómez R, Spampinato CP. 2013. Mismatch recognition function of Arabidopsis thaliana MutSy. *DNA Repair* **12**: 257-264.

Gonzalo A. 2022a. All Ways Lead to Rome—Meiotic Stabilization Can Take Many Routes in Nascent Polyploid Plants. *Genes* **13**: 147.

Gonzalo A. 2022b. All Ways Lead to Rome—Meiotic Stabilization Can Take Many Routes in Nascent Polyploid Plants. *Genes* **13**: 147.

Gonzalo A, Lucas M-O, Charpentier C, Sandmann G, Lloyd A, Jenczewski E. 2019. Reducing MSH4 copy number prevents meiotic crossovers between non-homologous chromosomes in Brassica napus. *Nature Communications* **10**: 2354.

Gonzalo A, Parra-Nunez P, Bachmann AL, Sanchez-Moran E, Bomblies K. 2023. Partial cytological diploidization of neotetraploid meiosis by induced cross-over rate reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **120**: e2305002120.

Goring DR, Bosch M, Franklin-Tong VE. 2023. Contrasting self-recognition rejection systems for self-incompatibility in Brassica and Papaver. *Current Biology* **33**: R530-R542.

Goring DR, Glavin TL, Schafer U, Rothstein SJ. 1993. An S receptor kinase gene in self-compatible Brassica napus has a 1-bp deletion. *The Plant cell* **5**: 531-539.

- Gou X, Bian Y, Zhang A, Zhang H, Wang B, Lv R, Li J, Zhu B, Gong L, Liu B. 2018.** Transgenerationally Precipitated Meiotic Chromosome Instability Fuels Rapid Karyotypic Evolution and Phenotypic Diversity in an Artificially Constructed Allotetraploid Wheat (AADD). *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1078-1091.
- Goubet PM, Bergès H, Bellec A, Prat E, Helmstetter N, Mangenot S, Gallina S, Holl A-C, Fobis-Loisy I, Vekemans X, et al. 2012.** Contrasted Patterns of Molecular Evolution in Dominant and Recessive Self-Incompatibility Haplotypes in Arabidopsis. *PLoS Genetics* **8**: e1002495.
- Grandont L, Cuñado N, Coriton O, Huteau V, Eber F, Chèvre AM, Grelon M, Chelysheva L, Jenczewski E. 2014.** Homoeologous Chromosome Sorting and Progression of Meiotic Recombination in Brassica napus : Ploidy Does Matter! *The Plant Cell* **26**: 1448-1463.
- Grandont L, Jenczewski E, Lloyd A. 2013.** Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants. *Cytogenetic and Genome Research* **140**: 171-184.
- Grant V. 1981.** *Plant speciation / Verne Grant*. Columbia University Press.
- Greer E, Martín AC, Pendle A, Colas I, Jones AME, Moore G, Shaw P. 2012.** The Ph1 Locus Suppresses Cdk2-Type Activity during Premeiosis and Meiosis in Wheat. *The Plant Cell* **24**: 152-162.
- Griffiths AG, Moraga R, Tausen M, Gupta V, Bilton TP, Campbell MA, Ashby RL, Nagy I, Khan A, Larking A, et al. 2019.** Breaking Free: the Genomics of Allopolyploidy-facilitated Niche Expansion in White Clover. *The Plant Cell* **31**: tpc.00606.2018.
- Griffiths S, Sharp R, Foote TN, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, Moore G. 2006.** Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *439*: 749-752.
- Grive KJ, Gustafson EA, Seymour KA, Baddoo M, Schorl C, Golnoski K, Rajkovic A, Brodsky AS, Freiman RN. 2016.** TAF4b Regulates Oocyte-Specific Genes Essential for Meiosis. *PLoS Genetics* **12**: e1006128.
- Guo X, Han F. 2014.** Asymmetric Epigenetic Modification and Elimination of rDNA Sequences by Polyploidization in Wheat. *The Plant Cell* **26**: 4311-4327.
- Guo Y-L, Zhao X, Lanz C, Weigel D. 2011.** Evolution of the S-Locus Region in Arabidopsis Relatives . *Plant Physiology* **157**: 937-946.
- Gupta M, Atri C, Agarwal N, Banga SS. 2016.** Development and molecular-genetic characterization of a stable Brassica allohexaploid. *Theoretical and Applied Genetics* **129**: 2085-2100.
- Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, Carrington JC, Chen X, Wang X-J, Chen ZJ. 2009.** Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in

Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 17835-17840.

Han J, Masonbrink RE, Shan W, Song F, Zhang J, Yu W, Wang K, Wu Y, Tang H, Wendel JF, et al. 2016. Rapid proliferation and nucleolar organizer targeting centromeric retrotransposons in cotton. *The Plant Journal* **88**: 992-1005.

Harrison PW, Amode MR, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Becker A, Bennett R, Berry A, Bhai J, et al. 2023. Ensembl 2024. *Nucleic Acids Research* **52**: D891-D899.

Hatakeyama K, Takasaki T, Suzuki G, Nishio T, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. 2001. The S receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in Brassica. *The Plant Journal* **26**: 69-76.

Hays KMC and JB. 1997. Arabidopsis MutS Homologs—AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a Novel AtMSH7—Form Three Distinct Protein Heterodimers with Different Specificities for Mismatched DNA.

Hazarika MH, Rees H. 1967. Genotypic control of chromosome behaviour in rye X. Chromosome pairing and fertility in autotetraploids. *Heredity* **22**: 317-332.

Hénaff E, Vives C, Desvoyes B, Chaurasia A, Payet J, Gutierrez C, Casacuberta JM. 2014. Extensive amplification of the E2F transcription factor binding sites by transposons during evolution of Brassica species. *The Plant Journal* **77**: 852-862.

Henry IM, Dilkes BP, Tyagi A, Gao J, Christensen B, Comai L. 2014. The BOY NAMED SUE Quantitative Trait Locus Confers Increased Meiotic Stability to an Adapted Natural Allopolyploid of Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **26**: 181-194.

Heping H, Shanlin G, Lanlan C, Xiaoke J. 2008. In vitro induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. **44**: 448-455.

Higgins JD, Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. 2004. The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. *Genes & Development* **18**: 2557-2570.

Higgins JD, Buckling EF, Franklin FCH, Jones GH. 2008a. Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *The Plant Journal* **54**: 152-162.

Higgins EE, Clarke WE, Howell EC, Armstrong SJ, Parkin IAP. 2018. Detecting de Novo Homoeologous Recombination Events in Cultivated Brassica napus Using a Genome-Wide SNP Array. *G3: Genes/Genomes/Genetics* **8**: 2673-2683.

Higgins EE, Howell EC, Armstrong SJ, Parkin IAP. 2021. A major quantitative trait locus on chromosome A9, BnaPh1, controls homoeologous recombination in Brassica napus. *New Phytologist* **229**: 3281-3293.

Higgins JD, Vignard J, Mercier R, Pugh AG, Franklin FCH, Jones GH. 2008b. AtMSH5 partners AtMSH4 in the class I meiotic crossover pathway in *Arabidopsis thaliana*, but is not required for synapsis. *The Plant Journal* **55**: 28-39.

Hinch AG, Becker PW, Li T, Moralli D, Zhang G, Bycroft C, Green C, Keeney S, Shi Q, Davies B, et al. 2020. The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Molecular Cell* **79**: 689-701.e10.

Hobolth P. 1981. Chromosome pairing in allohexaploid wheat var. Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Research Communications* **46**: 129.

Hohmann N, Wolf EM, Lysak MA, Koch MA. 2015. A Time-Calibrated Road Map of Brassicaceae Species Radiation and Evolutionary History. *The Plant Cell* **27**: 2770-2784.

Hollister JD, Arnold BJ, Svedin E, Xue KS, Dilkes BP, Bomblies K. 2012. Genetic Adaptation Associated with Genome-Doubling in Autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genetics* **8**: e1003093.

Hollister JD, Gaut BS. 2009. Epigenetic silencing of transposable elements: A trade-off between reduced transposition and deleterious effects on neighboring gene expression. *Genome Research* **19**: 1419-1428.

Holm PB. 1986. Chromosome pairing and chiasma formation in allohexaploid wheat, *Triticum aestivum* analyzed by spreading of meiotic nuclei. *Carlsberg Research Communications* **51**: 239.

Holm PB, Wang X. 1988. The effect of chromosome 5B on synapsis and chiasma formation in wheat, *triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Carlsberg Research Communications* **53**: 191.

Hu Q, Li Y, Wang H, Shen Y, Zhang C, Du G, Tang D, Cheng Z. 2017. Meiotic Chromosome Association 1 Interacts with TOP3 α and Regulates Meiotic Recombination in Rice. *The Plant Cell* **29**: 1697-1708.

Hu M, Xi Z, Wang J. 2023. Epigenetic Regulation of Subgenomic Gene Expression in Allotetraploid *Brassica napus*. *Plants* **12**: 2608.

Huang J, Gao Y, Jia H, Liu L, Zhang D, Zhang Z. 2015. Comparative transcriptomics uncovers alternative splicing changes and signatures of selection from maize improvement. *BMC Genomics* **16**: 363.

Hughes AL, Friedman R, Ekollu V, Rose JR. 2003. Non-random association of transposable elements with duplicated genomic blocks in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular phylogenetics and evolution* **29**: 410-6.

Hunter N. 2015. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**: a016618.

Hurgobin B, Golicz AA, Bayer PE, Chan CK, Tirnaz S, Dolatabadian A, Schiessl SV, Samans B, Montenegro JD, Parkin IAP, et al. 2018. Homoeologous exchange is a major cause of gene presence/absence variation in the amphidiploid *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* **16**: 1265-1274.

Husband BC. 2000. Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **267**: 217-223.

Husband BC. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of The Linnean Society* **82**: 537-546.

Husband BC, Schemske DW, Burton TL, Goodwillie C. 2002. Pollen competition as a unilateral reproductive barrier between sympatric diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **269**: 2565-2571.

Husted L. 1936. Cytological Studies an the Peanut, *Arachis*. II. *CYTOLOGIA* **7**: 396-423.

Initiative TAG. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Jakobsson M, Hagenblad J, Tavaré S, Säll T, Halldén C, Lind-Halldén C, Nordborg M. 2006. A Unique Recent Origin of the Allotetraploid Species *Arabidopsis suecica*: Evidence from Nuclear DNA Markers. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 1217-1231.

Jarvis DE, Ho YS, Lightfoot DJ, Schmöckel SM, Li B, Borm TJA, Ohyanagi H, Mineta K, Mitchell CT, Saber N, et al. 2017. The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature* **542**: 307-312.

Jauhar PP, Riera-Lizarazu O, Dewey WG, Gill BS, Crane CF, Bennett JH. 1991. Chromosome pairing relationships among the A, B, and D genomes of bread wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **82**: 441-9.

Jenczewski E, Alix K. 2004. From Diploids to Allopolyploids: The Emergence of Efficient Pairing Control Genes in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**: 21-45.

Jenczewski E, Chèvre AM, Alix K. 2013. Chromosomal and Gene Expression Changes in *Brassica* Allopolyploids. : 171-186.

Jenczewski E, Eber F, Grimaud A, Huet S, Lucas MO, Monod H, Chèvre AM. 2003. PrBn, a Major Gene Controlling Homeologous Pairing in Oilseed Rape (*Brassica napus*) Haploids. *Genetics* **164**: 645-653.

Ji L-H, Langridge P. 1994. An early meiosis cDNA clone from wheat. *Molecular and General Genetics MGG* **243**: 17-23.

Jiang L, Guo T, Song X, Jiang H, Lu M, Luo J, Rossi V, He Y. 2024. MSH7 confers quantitative variation in pollen fertility and boosts grain yield in maize. *Plant Biotechnology Journal*.

Jiang Y, N'Diaye A, Koh CS, Quilichini TD, Shunmugam ASK, Kirzinger MW, Konkin D, Bekkaoui Y, Sari E, Pasha A, et al. 2023. The coordinated regulation of early meiotic stages is dominated by non-coding RNAs and stage-specific transcription in wheat. *The Plant Journal* **114**: 209-224.

Jiang X, Song Q, Ye W, Chen ZJ. 2021. Concerted genomic and epigenomic changes accompany stabilization of Arabidopsis allopolyploids. *Nature Ecology & Evolution* **5**: 1382-1393.

Jiang M, Wu X, Song Y, Shen H, Cui H. 2020. Effects of OsMSH6 Mutations on Microsatellite Stability and Homeologous Recombination in Rice. *Frontiers in Plant Science* **11**: 220.

Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, et al. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* **473**: 97-100.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C. 2000. Molecular Analysis of FRIGIDA, a Major Determinant of Natural Variation in Arabidopsis Flowering Time. *Science* **290**: 344-347.

Jones GH, Khazanehdari KA, Ford-Lloyd BV. 1996. Meiosis in the leek (*Allium porrum* L.) revisited. II. Metaphase I observations. *Heredity* **76**: 186-191.

Jones GH, Vincent JE. 1994. Meiosis in allopolyploid *Crepis capillaris*. II. Autotetraploids. *Genome* **37**: 497-505.

Karimi-Ashtiyani R, Banaei-Moghaddam AM, Ishii T, Weiss O, Fuchs J, Schubert V, Houben A. 2024. Centromere sequence-independent but biased loading of subgenome-specific CENH3 variants in allopolyploid Arabidopsis suecica. *Plant Molecular Biology* **114**: 74.

Khazanehdari KA, Jones GH, Ford-Lloyd BV. 1995. Meiosis in the leek (*Allium porrum* L.) revisited. I. Prophase I pairing. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **3**: 433-9.

Kim J, Choi K. 2019. Signaling-mediated meiotic recombination in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **51**: 44-50.

Kim MY, Zilberman D. 2014. DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends in Plant Science* **19**: 320-326.

Kirik V, Grini PE, Mathur J, Klinkhammer I, Adler K, Bechtold N, Herzog M, Bonneville J-M, Hülskamp M. 2002. The Arabidopsis TUBULIN-FOLDING COFACTOR A Gene Is Involved in the Control of the α/β -Tubulin Monomer Balance. *The Plant Cell* **14**: 2265-2276.

Kitashiba H, Nasrallah JB. 2014. Self-incompatibility in Brassicaceae crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breeding Science* **64**: 23.

Kleckner N, Storlazzi A, Zickler D. 2003. Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends in Genetics* **19**: 623-628.

Kleckner N, Zickler D, Jones GH, Dekker J, Padmore R, Henle J, Hutchinson J. 2004. A mechanical basis for chromosome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 12592-12597.

Knight E, Greer E, Draeger T, Thole V, Reader S, Shaw P, Moore G. 2010. Inducing chromosome pairing through premature condensation: analysis of wheat interspecific hybrids. *Functional & Integrative Genomics* **10**: 603-608.

Köhler C, Dziasek K, León GDT-D. 2021. Postzygotic reproductive isolation established in the endosperm: mechanisms, drivers and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **376**: 20200118.

Kolesnikova UK, Scott AD, Velde JDV de, Burns R, Tikhomirov NP, Pfordt U, Clarke AC, Yant L, Seregin AP, Vekemans X, et al. 2023. Transition to Self-compatibility Associated With Dominant S-allele in a Diploid Siberian Progenitor of Allotetraploid Arabidopsis kamchatica Revealed by Arabidopsis lyrata Genomes. *Molecular Biology and Evolution* **40**: msad122.

Kollmann F. 1972. Allium Ampeloprasum — A Polyploid Complex II. Meiosis and Relationships between the Ploidy Types. *Caryologia* **25**: 295-312.

Koo D-H, Liu W, Friebe B, Gill BS. 2017. Homoeologous recombination in the presence of Ph1 gene in wheat. **126**: 531-540.

Krasinska L, Besnard E, Cot E, Dohet C, Méchali M, Lemaitre J, Fisher D. 2008. Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in Xenopus. *The EMBO Journal* **27**: 758-769.

Krebs SL, Hancock JF. 1989. Tetrasomic inheritance of isoenzyme markers in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Heredity* **63**: 11-18.

Kreiner JM, Kron P, Husband BC. 2017. Evolutionary Dynamics of Unreduced Gametes. *Trends in Genetics* **33**: 583-593.

Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, et al. 2010. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science (New York, N.Y.)* **330**: 796-9.

Kurzbauer M-T, Pradillo M, Kerzendorfer C, Sims J, Ladurner R, Oliver C, Janisiw MP, Mosiolek M, Schweizer D, Copenhaver GP, et al. 2018. Arabidopsis thaliana FANCD2 Promotes Meiotic Crossover Formation. *The Plant Cell* **30**: 415-428.

Kusaba M, Dwyer K, Hendershot J, Vrebalov J, Nasrallah JB, Nasrallah ME. 2001. Self-Incompatibility in the Genus Arabidopsis: Characterization of the S Locus in the Outcrossing A. lyrata and Its Autogamous Relative A. thaliana. *The Plant Cell* **13**: 627-643.

Kusaba M, Tung C-W, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 2002. Monoallelic Expression and Dominance Interactions in Anthers of Self-Incompatible *Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiology* **128**: 17-20.

Labun K, Montague TG, Krause M, Cleuren YNT, Tjeldnes H, Valen E. 2019. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* **47**: W171-W174.

Lambing C, Kuo PC, Tock AJ, Topp SD, Henderson IR. 2020a. ASY1 acts as a dosage-dependent antagonist of telomere-led recombination and mediates crossover interference in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**: 13647-13658.

Lambing C, Tock AJ, Topp SD, Choi K, Kuo PC, Zhao X, Osman K, Higgins JD, Franklin FCH, Henderson IR. 2020b. Interacting Genomic Landscapes of REC8-Cohesin, Chromatin, and Meiotic Recombination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **32**: 1218-1239.

Lario LD, Botta P, Casati P, Spampinato CP. 2015. Role of AtMSH7 in UV-B-induced DNA damage recognition and recombination. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3019-3026.

Lashermes P, Combes M, Hueber Y, Severac D, Dereeper A. 2014. Genome rearrangements derived from homoeologous recombination following allopolyploidy speciation in coffee. *The Plant Journal* **78**: 674-685.

Lashermes P, Hueber Y, Combes M-C, Severac D, Dereeper A. 2016. Inter-genomic DNA Exchanges and Homeologous Gene Silencing Shaped the Nascent Allopolyploid Coffee Genome (*Coffea arabica* L.). *G3 Genes/Genomes/Genetics* **6**: 2937-2948.

Lavania UC. 1986. High bivalent frequencies in artificial autopolyploids of *Hyoscyamus muticus* L. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **28**: 7-11.

Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS. 2004. A Concerted DNA Methylation/Histone Methylation Switch Regulates rRNA Gene Dosage Control and Nucleolar Dominance. *Molecular Cell* **13**: 599-609.

Lawrence EJ, Gao H, Tock AJ, Lambing C, Blackwell AR, Feng X, Henderson IR. 2019. Natural Variation in TBP-ASSOCIATED FACTOR 4b Controls Meiotic Crossover and Germline Transcription in *Arabidopsis*. *Current Biology* **29**: 2676-2686.e3.

Leal JL, Milesi P, Salojärvi J, Lascoux M. 2023. Phylogenetic Analysis of Allotetraploid Species Using Polarized Genomic Sequences. *Systematic Biology* **72**: 372-390.

Leal-Bertioli SCM, Godoy IJ de, Santos JF dos, Doyle JJ, Guimarães PM, Abernathy B, Jackson SA, Moretzsohn MC, Bertioli DJ. 2018. Segmental allopolyploidy in action: Increasing diversity through polyploid hybridization and homoeologous recombination. *American Journal of Botany* **105**: 1053–1066.

Leebens-Mack JH, Barker MS, Carpenter EJ, Deyholos MK, Gitzendanner MA, Graham SW, Grosse I, Li Z, Melkonian M, Mirarab S, et al. 2019. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature* **574**: 679-685.

Leflon M, Grandont L, Eber F, Huteau V, Coriton O, Chelysheva L, Jenczewski E, Chèvre A-M. 2010. Crossovers Get a Boost in Brassica Allotriploid and Allotetraploid Hybrids. *The Plant Cell* **22**: 2253-2264.

Lermontova I, Sandmann M, Mascher M, Schmit A, Chabouté M. 2015. Centromeric chromatin and its dynamics in plants. *The Plant Journal* **83**: 4-17.

Levin DA. 1975. MINORITY CYTOTYPE EXCLUSION IN LOCAL PLANT POPULATIONS. *TAXON* **24**: 35-43.

Levin DA. 1983. Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. *The American Naturalist* **122**: 1-25.

Levin DA. 2012. Mating system shifts on the trailing edge. *Annals of Botany* **109**: 613-620.

Li L, Jean M, Belzile F. 2006. The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in Arabidopsis. *The Plant Journal* **45**: 908-916.

Li A, Liu D, Wu J, Zhao X, Hao M, Geng S, Yan J, Jiang X, Zhang L, Wu J, et al. 2014. mRNA and Small RNA Transcriptomes Reveal Insights into Dynamic Homoeolog Regulation of Allopolyploid Heterosis in Nascent Hexaploid Wheat. *The Plant Cell* **26**: 1878-1900.

Li G, Wu Y, Bai Y, Zhao N, Jiang Y, Li N, Lin X, Liu B, Xu C. 2023. Patterns of Chromosomal Variation, Homoeologous Exchange, and Their Relationship with Genomic Features in Early Generations of a Synthetic Rice Segmental Allotetraploid. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 6065.

Li X, Zhang J, Huang J, Xu J, Chen Z, Copenhaver GP, Wang Y. 2021. Regulation of interference-sensitive crossover distribution ensures crossover assurance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2107543118.

Li X, Zhang L, Wei X, Datta T, Wei F, Xie Z. 2024. Polyploidization: A Biological Force That Enhances Stress Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* **25**: 1957.

Lin Z, Kong H, Nei M, Ma H. 2006. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 10328-10333.

Lisch D. 2013. How important are transposons for plant evolution? *Nature reviews. Genetics* **14**: 49-61.

Liu Z, Adamczyk K, Manzanares-Dauleux M, Eber F, Lucas M-O, Delourme R, Chèvre AM, Jenczewski E. 2006. Mapping PrBn and Other Quantitative Trait Loci Responsible for the

Control of Homeologous Chromosome Pairing in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Haploids. *Genetics* **174**: 1583-1596.

Liu Z, Makaroff CA. 2006. Arabidopsis Separase AESP Is Essential for Embryo Development and the Release of Cohesin during Meiosis. *The Plant Cell* **18**: 1213-1225.

Liu C, Wang J, Sun P, Yu J, Meng F, Zhang Z, Guo H, Wei C, Li X, Shen S, et al. 2020. Illegitimate Recombination Between Homeologous Genes in Wheat Genome. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1076.

Llaurens V, Billiard S, Leducq J, Castric V, Klein EK, Vekemans X. 2008. DOES FREQUENCY-DEPENDENT SELECTION WITH COMPLEX DOMINANCE INTERACTIONS ACCURATELY PREDICT ALLELIC FREQUENCIES AT THE SELF-INCOMPATIBILITY LOCUS IN ARABIDOPSIS HALLERI? *Evolution* **62**: 2545-2557.

Lloyd A. 2022. Crossover patterning in plants. *Plant Reproduction*: 1-18.

Lloyd A, Blary A, Charif D, Charpentier C, Tran J, Balzergue S, Delannoy E, Rigail G, Jenczewski E. 2018. Homoeologous exchanges cause extensive dosage-dependent gene expression changes in an allopolyploid crop. *New Phytologist* **217**: 367-377.

Lloyd A, Bomblies K. 2016. Meiosis in autopolyploid and allopolyploid Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **30**: 116-122.

Lloyd A, Jenczewski E. 2019. Modelling Sex-Specific Crossover Patterning in Arabidopsis. *Genetics* **211**: 847-859.

Lloyd AH, Milligan AS, Langridge P, Able JA. 2007. TaMSH7: A cereal mismatch repair gene that affects fertility in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology* **7**: 67.

Lloyd AH, Ranoux M, Vautrin S, Glover N, Fourment J, Charif D, Choulet F, Lassalle G, Marande W, Tran J, et al. 2014. Meiotic Gene Evolution: Can You Teach a New Dog New Tricks? *Molecular Biology and Evolution* **31**: 1724-1727.

Loidl J, Ehrendorfer F, Schweizer D. 1990. EM analysis of meiotic chromosome pairing in a pentaploid *Achillea* hybrid. *Heredity* **65**: 11-20.

Loidl J, Jones GH. 1986. Synaptonemal complex spreading in *Allium*. *Chromosoma* **93**: 420-428.

Lu L, Nan J, Mi W, Li L-F, Wei C-H, Su X-D, Li Y. 2010. Crystal structure of tubulin folding cofactor A from Arabidopsis thaliana and its β -tubulin binding characterization. *FEBS Letters* **584**: 3533-3539.

Lumaret R, Guillerm J-L, Delay J, Loutfi AAL, Izco J, Jay M. 1987. Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L. from Galicia (Spain). *Oecologia* **73**: 436-446.

- Luo M-C, Dubcovsky J, Dvořák J. 1996.** Recognition of Homeology by the Wheat Ph1 Locus. *Genetics* **144**: 1195-1203.
- Luo Q, Tang D, Wang M, Luo W, Zhang L, Qin B, Shen Y, Wang K, Li Y, Cheng Z. 2013.** The Role of OsMSH5 in Crossover Formation during Rice Meiosis. *Molecular Plant* **6**: 729-742.
- Luo S-C, Yeh H-Y, Lan W-H, Wu Y-M, Yang C-H, Chang H-Y, Su G-C, Lee C-Y, Wu W-J, Li H-W, et al. 2021.** Identification of fidelity-governing factors in human recombinases DMC1 and RAD51 from cryo-EM structures. *Nature Communications* **12**: 115.
- Lv Y, Hu F, Zhou Y, Wu F, Gaut BS. 2019.** Maize transposable elements contribute to long non-coding RNAs that are regulatory hubs for abiotic stress response. *BMC Genomics* **20**: 864.
- Lv Z, Nyarko CA, Ramtekey V, Behn H, Mason AS. 2024.** Defining autopolyploidy: Cytology, genetics, and taxonomy. *American Journal of Botany*: e16292.
- Lynn A, Soucek R, Börner GV. 2007.** ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. *Chromosome Research* **15**: 591-605.
- Ma J, Devos KM, Bennetzen JL. 2004.** Analyses of LTR-Retrotransposon Structures Reveal Recent and Rapid Genomic DNA Loss in Rice. *Genome Research* **14**: 860-869.
- Macaisne N, Novatchkova M, Peirera L, Vezon D, Jolivet S, Froger N, Chelysheva L, Grelon M, Mercier R. 2008.** SHOC1, an XPF Endonuclease-Related Protein, Is Essential for the Formation of Class I Meiotic Crossovers. *Current Biology* **18**: 1432-1437.
- Macaisne N, Vignard J, Mercier R. 2011.** SHOC1 and PTD form an XPF–ERCC1-like complex that is required for formation of class I crossovers. *Journal of Cell Science* **124**: 2687-2691.
- Macgregor SR, Lee HK, Nelles H, Johnson DC, Zhang T, Ma C, Goring DR. 2022.** Autophagy is required for self-incompatible pollen rejection in two transgenic *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Physiology* **188**: 2073-2084.
- Madlung A, Wendel JF. 2013.** Genetic and Epigenetic Aspects of Polyploid Evolution in Plants. *Cytogenetic and Genome Research* **140**: 270-285.
- Mainiero S, Pawlowski WP. 2014.** Meiotic Chromosome Structure and Function in Plants. **143**: 6-17.
- Makarevitch I, Waters AJ, West PT, Stitzer M, Hirsch CN, Ross-Ibarra J, Springer NM. 2015.** Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. *PLoS Genetics* **11**: e1004915.
- Mandáková T, Lysak MA. 2018.** Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current Opinion in Plant Biology* **42**: 55-65.

- Martín AC, Alabdullah AK, Moore G. 2021.** A separation-of-function ZIP4 wheat mutant allows crossover between related chromosomes and is meiotically stable. *Scientific Reports* **11**: 21811.
- Martín AC, Borrill P, Higgins J, Alabdullah A, Ramírez-González RH, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, Moore G. 2018.** Genome-Wide Transcription During Early Wheat Meiosis Is Independent of Synapsis, Ploidy Level, and the Ph1 Locus. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1791.
- Martín AC, Rey M-D, Shaw P, Moore G. 2017.** Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* **126**: 669-680.
- Martín AC, Shaw P, Phillips D, Reader S, Moore G. 2014.** Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. *Nature Communications* **5**: 4580.
- Martinez M, Cuñado N, Carcelén N, Romero C. 2001.** The Ph1 and Ph2 loci play different roles in the synaptic behaviour of hexaploid wheat *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 398-405.
- Martinez-Perez E, Shaw P, Aragon-Alcaide L, Moore G. 2003.** Chromosomes form into seven groups in hexaploid and tetraploid wheat as a prelude to meiosis. *The Plant Journal* **36**: 21-29.
- Martinez-Perez E, Shaw P, Moore G. 2001.** The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* **411**: 204-207.
- Martini E, Diaz RL, Hunter N, Keeney S. 2006.** Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* **126**: 285-95.
- Mason AS, Chauhan P, Banga S, Banga SS, Salisbury P, Barbetti MJ, Batley J. 2018.** Agricultural selection and presence/absence variation in spring-type canola germplasm. *Crop and Pasture Science* **69**: 55-64.
- Mason AS, Nelson MN, Yan G, Cowling WA. 2011.** Production of viable male unreduced gametes in Brassica interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC Plant Biology* **11**: 103.
- Mason AS, Wendel JF. 2020.** Homoeologous Exchanges, Segmental Allopolyploidy, and Polyploid Genome Evolution. *Frontiers in Genetics* **11**: 1014.
- Matsuoka Y. 2011.** Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant and Cell Physiology* **52**: 750-764.
- McClintock B. 1984.** The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* **226**: 792-801.
- McCollum CD. 1958.** Comparative studies of chromosome pairing in natural and induced tetraploid *Dactylis*. *Chromosoma* **9**: 571-605.

Mello-Sampayo T. 1971. Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nature: New biology* **230**: 22-3.

Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015. The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 1-31.

Mézard C, Vignard J, Drouaud J, Mercier R. 2007. The road to crossovers: plants have their say. *Trends in Genetics* **23**: 91-99.

Mhiri C, Borges F, Grandbastien M-A. 2022. Specificities and Dynamics of Transposable Elements in Land Plants. *Biology* **11**: 488.

Michaels SD, Amasino RM. 1999. FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *The Plant Cell* **11**: 949-956.

Monnahan P, Kolář F, Baduel P, Sailer C, Koch J, Horvath R, Laenen B, Schmickl R, Paajanen P, Šrámková G, et al. 2019. Pervasive population genomic consequences of genome duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Nature ecology & evolution* **3**: 457-468.

Morgan C, Fozard JA, Hartley M, Henderson IR, Bomblies K, Howard M. 2021a. Diffusion-mediated HEI10 coarsening can explain meiotic crossover positioning in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **12**: 4674.

Morgan C, Howard M, Henderson IR. 2024. HEI10 coarsening, chromatin and sequence polymorphism shape the plant meiotic recombination landscape. *Current Opinion in Plant Biology* **81**: 102570.

Morgan C, Knight E, Bomblies K. 2022a. The meiotic cohesin subunit REC8 contributes to multigenic adaptive evolution of autopolyploid meiosis in *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genetics* **18**: e1010304.

Morgan C, Knight E, Bomblies K. 2022b. The meiotic cohesin subunit REC8 contributes to multigenic adaptive evolution of autopolyploid meiosis in *Arabidopsis arenosa*. *PLoS genetics* **18**: e1010304.

Morgan C, Nayak A, Hosoya N, Smith GR, Lambing C. 2022c. Meiotic chromosome organization and its role in recombination and cancer. *Current Topics in Developmental Biology* **151**: 91-126.

Morgan C, White MA, Franklin FCH, Zickler D, Kleckner N, Bomblies K. 2021b. Evolution of crossover interference enables stable autopolyploidy by ensuring pairwise partner connections in *Arabidopsis arenosa*. *Current Biology* **31**: 4713-4726.e4.

Morgan C, Zhang H, Henry CE, Franklin FCH, Bomblies K. 2020. Derived alleles of two axis proteins affect meiotic traits in autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**: 8980-8988.

Morrison JW, RAJHATHY T. 1960. Chromosome behaviour in autotetraploid cereals and grasses. *Chromosoma* **11**: 297-309.

Mulligan, Gerald A. 1967. DIPLOID AND AUTOTETRAPLOID PHYSARIA VITULIFERA (CRUCIFERAE). *Canadian Journal of Botany* **45**: 183-188.

Murat F, Zhang R, Guizard S, Flores R, Armero A, Pont C, Steinbach D, Quesneville H, Cooke R, Salse J. 2014. Shared Subgenome Dominance Following Polyploidization Explains Grass Genome Evolutionary Plasticity from a Seven Protochromosome Ancestor with 16K Protogenes. *Genome Biology and Evolution* **6**: 12-33.

Muyt AD, Zhang L, Piolot T, Kleckner N, Espagne E, Zickler D. 2014. E3 ligase Hei10: a multifaceted structure-based signaling molecule with roles within and beyond meiosis. *Genes & Development* **28**: 1111-1123.

Nah G, Chen ZJ. 2010. Tandem duplication of the FLC locus and the origin of a new gene in Arabidopsis related species and their functional implications in allopolyploids. *New Phytologist* **186**: 228-238.

Nasrallah JB. 2018. Self-incompatibility in the Brassicaceae: Regulation and mechanism of self-recognition. *Current Topics in Developmental Biology* **131**: 435-452.

Nasrallah JB, Rundle SJ, Nasrallah ME. 1994. Genetic evidence for the requirement of the Brassica S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *The Plant Journal* **5**: 373-384.

Ni Z, Kim E-D, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, Sun Q, Chen ZJ. 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**: 327-331.

Nibau C, Gonzalo A, Evans A, Sweet-Jones W, Phillips D, Lloyd A. 2022. Meiosis in allopolyploid Arabidopsis suecica. *The Plant Journal* **111**: 1110-1122.

Nicolas SD, Leflon M, Monod H, Eber F, Coriton O, Huteau V, Chèvre A-M, Jenczewski E. 2009. Genetic Regulation of Meiotic Cross-Overs between Related Genomes in Brassica napus Haploids and Hybrids . *The Plant Cell* **21**: 373-385.

Nicolas SD, Monod H, Eber F, Chèvre A, Jenczewski E. 2012. Non-random distribution of extensive chromosome rearrangements in Brassica napus depends on genome organization. *The Plant Journal* **70**: 691-703.

Novikova PYu, Kolesnikova UK, Scott AD. 2023. Ancestral self-compatibility facilitates the establishment of allopolyploids in Brassicaceae. *Plant Reproduction* **36**: 125-138.

Novikova PYu, Tsuchimatsu T, Simon S, Nizhynska V, Voronin V, Burns R, Fedorenko OM, Holm S, Säll T, Prat E, et al. 2017. Genome Sequencing Reveals the Origin of the Allotetraploid Arabidopsis suecica. *Molecular Biology and Evolution* **34**: 957-968.

Okamoto S, Odashima M, Fujimoto R, Sato Y, Kitashiba H, Nishio T. 2007. Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in S-locus genes. *The Plant Journal* **50**: 391-400.

O’Kane SL, Schaal BA, Al-Shehbaz IA. 1996. The Origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as Indicated by Nuclear rDNA Sequences. *Systematic Botany* **21**: 559.

Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, et al. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**: 141-147.

Otto SP. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell* **131**: 452-462.

Otto SP, Lenormand T. 2002. Resolving the paradox of sex and recombination. *Nature Reviews Genetics* **3**: 252-261.

Otto SP, Payseur BA. 2019. Crossover Interference: Shedding Light on the Evolution of Recombination. *Annual Review of Genetics* **53**: 1-26.

Otto SP, Whitton J. 2000. POLYPLOID INCIDENCE AND EVOLUTION. *Annual Review of Genetics* **34**: 401-437.

Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Mhiri C, Ainouche M, Chalhoub B, Grandbastien M. 2010a. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytologist* **186**: 37-45.

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010b. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* **186**: 5-17.

Parisod C, Mhiri C, Lim KY, Clarkson JJ, Chase MW, Leitch AR, Grandbastien M-A. 2012. Differential Dynamics of Transposable Elements during Long-Term Diploidization of *Nicotiana Section Repandae* (Solanaceae) Allopolyploid Genomes. *PLoS ONE* **7**: e50352.

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

Parra-Nunez P, Fernández-Jiménez N, Pachon-Penalba M, Sanchez-Moran E, Pradillo M, Santos JL. 2023. Synthetically induced *Arabidopsis thaliana* autotetraploids provide insights into the analysis of meiotic mutants with altered crossover frequency. *New Phytologist*.

Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy AA, Scheid OM. 2011. Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biology* **9**: 24-24.

Pécricx Y, Rallo G, Folzer H, Cigna M, Gudín S, Bris ML. 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *Journal of Experimental Botany* **62**: 3587-3597.

Peer YV de, Mizrahi E, Marchal K. 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* **18**: 411-424.

Pelé A, Falque M, Trotoux G, Eber F, Nègre S, Gilet M, Huteau V, Lodé M, Jousseau T, Dechaumet S, et al. 2017. Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in Brassicas. *PLoS Genetics* **13**: e1006794.

Pelé A, Rousseau-Gueutin M, Chèvre A-M. 2018. Speciation Success of Polyploid Plants Closely Relates to the Regulation of Meiotic Recombination. *Frontiers in Plant Science* **9**: 907.

Pernickova K, Linc G, Gaal E, Kopecky D, Samajova O, Lukaszewski AJ. 2019. Out-of-position telomeres in meiotic leptotene appear responsible for chiasmate pairing in an inversion heterozygote in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chromosoma* **128**: 31-39.

Petiot V, White C, Ines OD. 2024. DNA binding site II is required for RAD51 recombinogenic activity in *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv*: 2024.03.07.583932.

Pinzón YG, Kise JKG, Rueda P, Ronceret A. 2021. The Formation of Bivalents and the Control of Plant Meiotic Recombination. *Frontiers in plant science* **12**: 717423.

Pires JC, ZHAO J, SCHRANZ ME, LEON EJ, QUIJADA PA, LUKENS LN, OSBORN TC. 2004. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized Brassica polyploids (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 675-688.

Planchais S, Glab N, Inzé D, Bergounioux C. 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters* **476**: 78-83.

Planesas BC, Vives C, Castells-Graells R, Casacuberta J. 2015. The Impact of Transposable Elements in the Evolution of Plant Genomes: From Selfish Elements to Key Players. *Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype*: 93-105.

Pochon G, Henry IM, Yang C, Lory N, Fernández-Jiménez N, Böwer F, Hu B, Carstens L, Tsai HT, Pradillo M, et al. 2022. The *Arabidopsis* Hop1 homolog ASY1 mediates cross-over assurance and interference. *PNAS Nexus* **2**: pgac302.

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

Poretti M, Praz CR, Meile L, Kälin C, Schaefer LK, Schläfli M, Widrig V, Sanchez-Vallet A, Wicker T, Bourras S. 2020. Domestication of High-Copy Transposons Underlies the Wheat Small RNA Response to an Obligate Pathogen. *Molecular Biology and Evolution* **37**: 839-848.

Prieto P, Moore G, Reader S. 2005. Control of conformation changes associated with homologue recognition during meiosis. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 505-510.

- Prigoda NL, Nassuth A, Mable BK. 2005.** Phenotypic and Genotypic Expression of Self-incompatibility Haplotypes in *Arabidopsis lyrata* Suggests Unique Origin of Alleles in Different Dominance Classes. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1609-1620.
- Prusicki MA, Keizer EM, Rosmalen RP van, Komaki S, Seifert F, Müller K, Wijnker E, Fleck C, Schnittger A. 2019.** Live cell imaging of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **8**: e42834.
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, Riha K. 2004.** Mre11 Deficiency in *Arabidopsis* Is Associated with Chromosomal Instability in Somatic Cells and Spo11-Dependent Genome Fragmentation during Meiosis. *The Plant Cell* **16**: 1968-1978.
- Quadrana L, Etcheverry M, Gilly A, Caillieux E, Madoui M-A, Guy J, Silveira AB, Engelen S, Baillet V, Wincker P, et al. 2019.** Transposition favors the generation of large effect mutations that may facilitate rapid adaption. *Nature Communications* **10**: 3421.
- Rafiei N, Ronceret A. 2023.** Crossover interference mechanism: New lessons from plants. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **11**: 1156766.
- Raman H, Raman R, Pirathiban R, McVittie B, Sharma N, Liu S, Qiu Y, Zhu A, Kilian A, Cullis B, et al. 2022.** Multienvironment QTL analysis delineates a major locus associated with homoeologous exchanges for water-use efficiency and seed yield in canola. *Plant, Cell & Environment* **45**: 2019-2036.
- Ramsey J, Schemske DW. 1998.** PATHWAYS, MECHANISMS, AND RATES OF POLYPLOID FORMATION IN FLOWERING PLANTS. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467-501.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** NEOPOLYPLOIDY IN FLOWERING PLANTS. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 589-639.
- Rebollo R, Romanish MT, Mager DL. 2012.** Transposable Elements: An Abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. *Annual Review of Genetics* **46**: 21-42.
- Rey M-D, Martín AC, Higgins J, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, Moore G. 2017.** Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Molecular Breeding* **37**: 95.
- Rey M-D, Martín AC, Smedley M, Hayta S, Harwood W, Shaw P, Moore G. 2018.** Magnesium Increases Homoeologous Crossover Frequency During Meiosis in ZIP4 (Ph1 Gene) Mutant Wheat-Wild Relative Hybrids. *Frontiers in plant science* **9**: 509.
- Richards DM, Greer E, Martin AC, Moore G, Shaw PJ, Howard M. 2012.** Quantitative dynamics of telomere bouquet formation. *PLoS computational biology* **8**: e1002812.
- RILEY R, CHAPMAN V. 1958.** Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *Nature* **182**: 713-715.

- Riley R, Chapman V. 1958.** Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *182*: 713-715.
- Roalson EH, McCubbin AG. 2003.** S-RNases and sexual incompatibility: structure, functions, and evolutionary perspectives. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 490-506.
- Roberts MA, Reader SM, Dalglish C, Miller TE, Foote TN, Fish LJ, Snape JW, Moore G. 1999.** Induction and Characterization of Ph1 Wheat Mutants. *Genetics* **153**: 1909-1918.
- Ronfort J. 1999.** The mutation load under tetrasomic inheritance and its consequences for the evolution of the selfing rate in autotetraploid species. *Genetics Research* **74**: 31-42.
- Ronfort J, Jenczewski E, Bataillon T, Rousset F. 1998.** Analysis of Population Structure in Autotetraploid Species. *Genetics* **150**: 921-930.
- Ross KJ, Fransz P, Jones GH. 1996.** A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* **4**: 507-516.
- Rosu S, Libuda DE, Villeneuve AM. 2011.** Robust Crossover Assurance and Regulated Interhomolog Access Maintain Meiotic Crossover Number. *Science* **334**: 1286-1289.
- Rousseau-Gueutin M, Morice J, Coriton O, Huteau V, Trotoux G, Nègre S, Falentin C, Deniot G, Gilet M, Eber F, et al. 2016.** The Impact of Open Pollination on the Structural Evolutionary Dynamics, Meiotic Behavior, and Fertility of Resynthesized Allotetraploid *Brassica napus* L. *G3: Genes/Genomes/Genetics* **7**: 705-717.
- Rowan BA, Heavens D, Feuerborn TR, Tock AJ, Henderson IR, Weigel D. 2019.** An Ultra High-Density *Arabidopsis thaliana* Crossover Map That Refines the Influences of Structural Variation and Epigenetic Features. *Genetics* **213**: 771-787.
- Sakuno T, Hiraoka Y. 2022.** Rec8 Cohesin: A Structural Platform for Shaping the Meiotic Chromosomes. *Genes* **13**: 200.
- Salmon A, Flagel L, Ying B, Udall JA, Wendel JF. 2010.** Homoeologous nonreciprocal recombination in polyploid cotton. *New Phytologist* **186**: 123-134.
- Samans B, Chalhou B, Snowdon RJ. 2017.** Surviving a Genome Collision: Genomic Signatures of Allopolyploidization in the Recent Crop Species *Brassica napus*. *The Plant Genome* **10**.
- Sánchez-Morán E, Benavente E, Orellana J. 2001.** Analysis of karyotypic stability of homoeologous-pairing (ph) mutants in allopolyploid wheats. *Chromosoma* **110**: 371-7.
- Sanchez-Moran E, Santos J-L, Jones GH, Franklin FCH. 2007.** ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **21**: 2220-2233.

- Santos JL, Alfaro D, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. 2003.** Partial Diploidization of Meiosis in Autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **165**: 1533-1540.
- Sarilar V, Marmagne A, Brabant P, Joets J, Alix K. 2011.** BraSto, a Stowaway MITE from Brassica: recently active copies preferentially accumulate in the gene space. *Plant Molecular Biology* **77**: 59-75.
- Sarilar V, Palacios PM, Rousselet A, Ridel C, Falque M, Eber F, Chèvre A, Joets J, Brabant P, Alix K. 2013.** Allopolyploidy has a moderate impact on restructuring at three contrasting transposable element insertion sites in resynthesized Brassica napus allotetraploids. *New Phytologist* **198**: 593-604.
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1992.** Self-Incompatibility-Related RNases in Styles of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant and Cell Physiology* **33**: 811-814.
- Sassa H, Koba T, Ikehashi H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H. 1996.** Self-incompatibility (S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics MGG* **252**: 222-222.
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR. 2016.** The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* **243**: 281-296.
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, et al. 2021.** Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* **50**: D20-D26.
- Scalabrin S, Magris G, Liva M, Vitulo N, Vidotto M, Scaglione D, Terra LD, Ruosi MR, Navarini L, Pellegrino G, et al. 2024.** A chromosome-scale assembly reveals chromosomal aberrations and exchanges generating genetic diversity in *Coffea arabica* germplasm. *Nature Communications* **15**: 463.
- Schiessl S, Huettel B, Kuehn D, Reinhardt R, Snowdon R. 2017.** Post-polyploidisation morphotype diversification associates with gene copy number variation. *Scientific Reports* **7**: 41845.
- Schmickl R, Paule J, Klein J, Marhold K, Koch MA. 2012.** The Evolutionary History of the *Arabidopsis arenosa* Complex: Diverse Tetraploids Mask the Western Carpathian Center of Species and Genetic Diversity. *PLoS ONE* **7**: e42691.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, et al. 2009.** The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* **326**: 1112-1115.
- Schoen DJ, Busch JW. 2009.** THE EVOLUTION OF DOMINANCE IN SPOROPHYTIC SELF-INCOMPATIBILITY SYSTEMS. II. MATE AVAILABILITY AND RECOMBINATION. *Evolution* **63**: 2099-2113.

Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 1999. The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science (New York, N.Y.)* **286**: 1697-700.

Sears ER. 1976. Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual review of genetics* **10**: 31-51.

Sears, E. R. 1977. GENETICS SOCIETY OF CANADA AWARD OF EXCELLENCE LECTURE AN INDUCED MUTANT WITH HOMOELOGOUS PAIRING IN COMMON WHEAT. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **19**: 585-593.

Sears, E. R. 1982. A WHEAT MUTATION CONDITIONING AN INTERMEDIATE LEVEL OF HOMOELOGOUS CHROMOSOME PAIRING. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **24**: 715-719.

Seear PJ, France MG, Gregory CL, Heavens D, Schmickl R, Yant L, Higgins JD. 2020. A novel allele of ASY3 is associated with greater meiotic stability in autotetraploid *Arabidopsis lyrata*. *PLoS Genetics* **16**: e1008900.

Serra H, Svačina R, Baumann U, Whitford R, Sutton T, Bartoš J, Sourdille P. 2021. Ph2 encodes the mismatch repair protein MSH7-3D that inhibits wheat homoeologous recombination. *Nature Communications* **12**: 803.

Shan S, Gitzendanner MA, Boatwright JL, Spoelhof JP, Ethridge CL, Ji L, Liu X, Soltis PS, Schmitz RJ, Soltis DE. 2024. Genome-wide DNA methylation dynamics following recent polyploidy in the allotetraploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *New Phytologist* **242**: 1363-1376.

Sheidai M, Noormohamadi Z, Sotodeh M. 2006. Cytogenetic Variability In Several Canola (*Brassica napus*) Cultivare. *Caryologia* **59**: 267-276.

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. 1999. The FLF MADS Box Gene: A Repressor of Flowering in *Arabidopsis* Regulated by Vernalization and Methylation. *The Plant Cell* **11**: 445-458.

Shen Y, Tang D, Wang K, Wang M, Huang J, Luo W, Luo Q, Hong L, Li M, Cheng Z. 2012. ZIP4 in homologous chromosome synapsis and crossover formation in rice meiosis. *Journal of Cell Science* **125**: 2581-2591.

Shen E, Zou J, Behrens FH, Chen L, Ye C, Dai S, Li R, Ni M, Jiang X, Qiu J, et al. 2015. Identification, evolution, and expression partitioning of miRNAs in allopolyploid *Brassica napus*. *Journal Of Experimental Botany* **66**: 7241-7253.

Shiba H, Kakizaki T, Iwano M, Tarutani Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2006. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nature genetics* **38**: 297-9.

Shimizu KK. 2022. Robustness and the generalist niche of polyploid species: Genome shock or gradual evolution? *Current Opinion in Plant Biology* **69**: 102292.

- Shimizu KK, Tsuchimatsu T. 2014.** Evolution of Selfing: Recurrent Patterns in Molecular Adaptation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **46**: 1-30.
- Sidhu GK, Fang C, Olson MA, Falque M, Martin OC, Pawlowski WP. 2015.** Recombination patterns in maize reveal limits to crossover homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 15982-15987.
- Soares NR, Mollinari M, Oliveira GK, Pereira GS, Vieira MLC. 2021.** Meiosis in Polyploids and Implications for Genetic Mapping: A Review. *Genes* **12**: 1517.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Pamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336-348.
- Soltis PS, Marchant DB, Peer YV de, Soltis DE. 2015.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* **35**: 119-125.
- Soltis PS, Soltis DE. 2000.** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7051-7057.
- Soltis PS, Soltis DE. 2016.** Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology* **30**: 159-65.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2004a.** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* **161**: 173-191.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2004b.** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* **161**: 173-191.
- Song Q, Chen ZJ. 2015.** Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current Opinion in Plant Biology* **24**: 101-109.
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. 1995.** Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 7719-7723.
- Spies M, Fishel R. 2015.** Mismatch Repair during Homologous and Homeologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**: a022657.
- Springer NM, Lisch D, Li Q. 2016.** Creating Order from Chaos: Epigenome Dynamics in Plants with Complex Genomes. *The Plant Cell* **28**: 314-325.
- Srivastava S, Lavania UC, Sybenga J. 1992.** Genetic variation in meiotic behaviour and fertility in tetraploid *Hyoscyamus muticus*: correlation with diploid meiosis. *Heredity* **68**: 231-239.
- Stack SM, Roelofs D. 1996.** Localized chiasmata and meiotic nodules in the tetraploid onion *Allium porrum*. *Genome* **39**: 770-83.

- Stein A, Coriton O, Rousseau-Gueutin M, Samans B, Schiessl SV, Obermeier C, Parkin IAP, Chèvre A, Snowdon RJ. 2017.** Mapping of homoeologous chromosome exchanges influencing quantitative trait variation in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 1478-1489.
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 1991.** Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 8816-8820.
- Steinfeld JB, Beláň O, Kwon Y, Terakawa T, Al-Zain A, Smith MJ, Crickard JB, Qi Z, Zhao W, Rothstein R, et al. 2019.** Defining the influence of Rad51 and Dmc1 lineage-specific amino acids on genetic recombination. *Genes & Development* **33**: 1191-1207.
- Storlazzi A, Gargano S, Ruprich-Robert G, Falque M, David M, Kleckner N, Zickler D. 2010.** Recombination Proteins Mediate Meiotic Spatial Chromosome Organization and Pairing. *Cell* **141**: 94-106.
- Storme ND, Geelen D. 2013a.** Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* **198**: 670-684.
- Storme ND, Geelen D. 2013b.** Cytokinesis in plant male meiosis. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e23394.
- Sun Y, Wu Y, Yang C, Sun S, Lin X, Liu L, Xu C, Wendel JF, Gong L, Liu B. 2017.** Segmental allotetraploidy generates extensive homoeologous expression rewiring and phenotypic diversity at the population level in rice. *Molecular Ecology* **26**: 5451-5466.
- Sun C, Wu J, Zhou X, Fu S, Liu H, Xue Z, Wang X, Peng Q, Gao J, Chen F, et al. 2024.** Homoeologous exchanges contribute to branch angle variations in rapeseed: Insights from transcriptome, QTL-seq and gene functional analysis. *Plant Biotechnology Journal*.
- Sutton T, Whitford R, Baumann U, Dong C, Able JA, Langridge P. 2003.** The Ph2 pairing homoeologous locus of wheat (*Triticum aestivum*): identification of candidate meiotic genes using a comparative genetics approach. *The Plant Journal* **36**: 443-456.
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K. 1999.** Genomic Organization of the S Locus: Identification and Characterization of Genes in SLG/SRK Region of S9 Haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* **153**: 391-400.
- Svačina R, Karafiátová M, Malurová M, Serra H, Vítek D, Endo TR, Sourdille P, Bartoš J. 2019.** Development of Deletion Lines for Chromosome 3D of Bread Wheat. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1756.
- Svačina R, Sourdille P, Kopecký D, Bartoš J. 2020a.** Chromosome Pairing in Polyploid Grasses. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1056.
- Svačina R, Sourdille P, Kopecký D, Bartoš J. 2020b.** Chromosome Pairing in Polyploid Grasses. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1056.

- Swaminathan MS, Sulbha K. 1959.** Multivalent frequency and seed fertility in raw and evolved tetraploids of *Brassica campestris* var. toria. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **90**: 385-392.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M, Coriton O, Jenczewski E, Chèvre AM. 2011.** Polyploid formation pathways have an impact on genetic rearrangements in resynthesized *Brassica napus*. *New Phytologist* **191**: 884-894.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M, Huneau C, Belcram H, Coriton O, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, King GJ, et al. 2010.** The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist* **186**: 102-112.
- Takayama S, Isogai A. 2005.** SELF-INCOMPATIBILITY IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 467-489.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. 2000.** The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 1920-1925.
- Takayama S, Shimosato H, Shiba H, Funato M, Che FS, Watanabe M, Iwano M, Isogai A. 2001.** Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **413**: 534-8.
- Tam SM, Hays JB, Chetelat RT. 2011.** Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **123**: 1445-1458.
- Tanaka H, Ishikawa M, Kitamura S, Takahashi Y, Soyano T, Machida C, Machida Y. 2004.** The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes to Cells* **9**: 1199-1211.
- Tarutani Y, Shiba H, Iwano M, Kakizaki T, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. 2010.** Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **466**: 983-986.
- Tayalé A, Parisod C. 2013.** Natural Pathways to Polyploidy in Plants and Consequences for Genome Reorganization. *Cytogenetic and Genome Research* **140**: 79-96.
- Tham K-C, Kanaar R, Lebbink JHG. 2016.** Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair* **38**: 75-83.
- Thompson JD, Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in ecology & evolution* **7**: 302-7.
- Tian L, Gu L, Li G-M. 2009.** Distinct Nucleotide Binding/Hydrolysis Properties and Molar Ratio of MutS α and MutS β Determine Their Differential Mismatch Binding Activities*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 11557-11562.

Tian E, Jiang Y, Chen L, Zou J, Liu F, Meng J. 2010. Synthesis of a Brassica trigeneric allohexaploid (*B. carinata* × *B. rapa*) de novo and its stability in subsequent generations. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **121**: 1431-40.

Tock AJ, Holland DM, Jiang W, Osman K, Sanchez-Moran E, Higgins JD, Edwards KJ, Uauy C, Franklin FCH, Henderson IR. 2021. Crossover-active regions of the wheat genome are distinguished by DMC1, the chromosome axis, H3K27me3, and signatures of adaptation. *Genome research* **31**: 1614-1628.

Trouiller B, Schaefer DG, Charlot F, Nogu e F. 2006. MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* **34**: 232-242.

Tsubouchi T, Zhao H, Roeder GS. 2006. The Meiosis-Specific Zip4 Protein Regulates Crossover Distribution by Promoting Synaptonemal Complex Formation Together with Zip2. *Developmental Cell* **10**: 809-819.

Tsuchimatsu T, Kaiser P, Yew C-L, Bachelier JB, Shimizu KK. 2012. Recent Loss of Self-Incompatibility by Degradation of the Male Component in Allotetraploid *Arabidopsis kamchatica*. *PLoS Genetics* **8**: e1002838.

Tsuchimatsu T, Suwabe K, Shimizu-Inatsugi R, Isokawa S, Pavlidis P, St adler T, Suzuki G, Takayama S, Watanabe M, Shimizu KK. 2010. Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature* **464**: 1342-1346.

Udall JA, Wendel JF. 2006. Polyploidy and Crop Improvement. *Crop Science* **46**: S-3-S-14.

Uyenoyama MK, Zhang Y, Newbigin E. 2001. On the Origin of Self-Incompatibility Haplotypes: Transition Through Self-Compatible Intermediates. *Genetics* **157**: 1805-1817.

Vanneste K, Baele G, Maere S, Peer YV de. 2014. Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous–Paleogene boundary. *Genome Research* **24**: 1334-1347.

Varas J, Sánchez-Morán E, Copenhaver GP, Santos JL, Pradillo M. 2015. Analysis of the Relationships between DNA Double-Strand Breaks, Synaptonemal Complex and Crossovers Using the *Atfas1-4* Mutant. *PLoS Genetics* **11**: e1005301.

Vicient CM, Casacuberta JM. 2017. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Annals of Botany* **120**: 195-207.

Vicient CM, Kalendar R, Schulman AH. 2005. Variability, Recombination, and Mosaic Evolution of the Barley BARE-1 Retrotransposon. *Journal of Molecular Evolution* **61**: 275-291.

Viera A, Rufas JS, Martínez I, Barbero JL, Ortega S, Suja JA. 2009. CDK2 is required for proper homologous pairing, recombination and sex-body formation during male mouse meiosis. *Journal of Cell Science* **122**: 2149-2159.

Vision TJ, Brown DG, Tanksley SD. 2000. The Origins of Genomic Duplications in Arabidopsis. *Science* **290**: 2114-2117.

Vrielynck N, Peuch M, Durand S, Lian Q, Chambon A, Hurel A, Guérin J, Guérois R, Mercier R, Grelon M, et al. 2023. SCEP1 and SCEP2 are two new components of the synaptonemal complex central element. *Nature Plants* **9**: 2016-2030.

Wall AM, Riley R, Chapman V. 1971. Wheat mutants permitting homoeologous meiotic chromosome pairing. *Genetical Research* **18**: 311-328.

Wang L, Cao S, Wang P, Lu K, Song Q, Zhao F-J, Chen ZJ. 2021. DNA hypomethylation in tetraploid rice potentiates stress-responsive gene expression for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2023981118.

Wang C, Chen Z, Copenhaver GP, Wang Y. 2024. Heterochromatin in plant meiosis. *Nucleus* **15**: 2328719.

Wang Y, Copenhaver GP. 2018. Meiotic Recombination: Mixing It Up in Plants. *Annual Review of Plant Biology*: 577-609.

Wang J, Tian L, Lee H-S, Chen ZJ. 2006a. Nonadditive Regulation of FRI and FLC Loci Mediates Flowering-Time Variation in Arabidopsis Allopolyploids. *Genetics* **173**: 965-974.

Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, et al. 2006b. Genomewide Nonadditive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids. *Genetics* **172**: 507-517.

Wang K, Wang M, Tang D, Shen Y, Miao C, Hu Q, Lu T, Cheng Z. 2012. The Role of Rice HEI10 in the Formation of Meiotic Crossovers. *PLoS Genetics* **8**: e1002809.

Wang Z, Yang J, Cheng F, Li P, Xin X, Wang W, Yu Y, Zhang D, Zhao X, Yu S, et al. 2022. Subgenome dominance and its evolutionary implications in crop domestication and breeding. *Horticulture Research* **9**: uhac090.

Weiss H, Maluszynska J. 2001. Chromosomal Rearrangement in Autotetraploid Plants of Arabidopsis Thaliana. *Hereditas* **133**: 255-261.

Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant molecular biology* **42**: 225-49.

Wendel JF. 2015. The wondrous cycles of polyploidy in plants. *American Journal of Botany* **102**: 1753-1756.

Westermann J, Srikant T, Gonzalo A, Tan HS, Bomblies K. 2024. Defective pollen tube tip growth induces neo-polyploid infertility. *Science* **383**: eadh0755.

White J, Jenkins G, Parker JS. 1988. Elimination of multivalents during meiotic prophase in *Scilla autumnalis*. I. Diploid and triploid. *Genome* **30**: 930-939.

- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, et al. 2007.** A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature reviews. Genetics* **8**: 973-82.
- Willing E-M, Rawat V, Mandáková T, Maumus F, James GV, Nordström KJV, Becker C, Warthmann N, Chica C, Szarzynska B, et al. 2015.** Genome expansion of *Arabidopsis alpina* linked with retrotransposition and reduced symmetric DNA methylation. *Nature Plants* **1**: 14023.
- Wilson ZA, Zhang D-B. 2009.** From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1479-1492.
- Wolf PG, Soltis PS, Soltis DE. 1989.** Tetrasomic inheritance and chromosome pairing behaviour in the naturally occurring autotetraploid *Heuchera grossulariifolia* (Saxifragaceae). *Genome* **32**: 655-659.
- Wright KM, Arnold B, Xue K, Šurinová M, O'Connell J, Bomblies K. 2015.** Selection on Meiosis Genes in Diploid and Tetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Molecular Biology and Evolution* **32**: 944-955.
- Wu S, Culligan K, Lamers M, Hays J. 2003.** Dissimilar mispair-recognition spectra of *Arabidopsis* DNA-mismatch-repair proteins MSH2·MSH6 (MutS α) and MSH2·MSH7 (MutS γ). *Nucleic Acids Research* **31**: 6027-6034.
- Wu J-H, Datson PM, Manako KI, Murray BG. 2014.** Meiotic chromosome pairing behaviour of natural tetraploids and induced autotetraploids of *Actinidia chinensis*. *Theoretical and Applied Genetics* **127**: 549-557.
- Wu Y, Lin F, Zhou Y, Wang J, Sun S, Wang B, Zhang Z, Li G, Lin X, Wang X, et al. 2020.** Genomic mosaicism due to homoeologous exchange generates extensive phenotypic diversity in nascent allopolyploids. *National Science Review* **8**: nwa277.
- Xiong Z, Gaeta RT, Edger PP, Cao Y, Zhao K, Zhang S, Pires JC. 2020.** Chromosome inheritance and meiotic stability in allopolyploid *Brassica napus*. *G3* **11**: jkaa011.
- Xiong Z, Gaeta RT, Pires JC. 2011.** Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 7908-7913.
- Xu J, Zhao L, Peng S, Chu H, Liang R, Tian M, Connell PP, Li G, Chen C, Wang H-W. 2021.** Mechanisms of distinctive mismatch tolerance between Rad51 and Dmc1 in homologous recombination. *Nucleic Acids Research* **49**: 13135-13149.
- Xue M, Wang J, Jiang L, Wang M, Wolfe S, Pawlowski WP, Wang Y, He Y. 2018.** The Number of Meiotic Double-Strand Breaks Influences Crossover Distribution in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **30**: 2628-2638.
- Yaakov B, Kashkush K. 2012.** Mobilization of Stowaway-like MITEs in newly formed allohexaploid wheat species. *Plant Molecular Biology* **80**: 419-427.

- Yamamoto M, Ishii T, Ogura M, Akanuma T, Zhu X-Y, Kitashiba H. 2023.** S haplotype collection in Brassicaceae crops—an updated list of S haplotypes. *Breeding Science* **73**: 132-145.
- Yang F, Jiménez NF, Majka J, Pradillo M, Pecinka A. 2021.** Structural Maintenance of Chromosomes 5/6 Complex Is Necessary for Tetraploid Genome Stability in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **12**: 748252.
- Yant L, Hollister JD, Wright KM, Arnold BJ, Higgins JD, Franklin FCH, Bomblies K. 2013.** Meiotic Adaptation to Genome Duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Current Biology* **23**: 2151-2156.
- Yirga M. 2021.** Polyploidy and its implications in plants breeding – A review. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology* **8**: 1-9.
- Yokoo R, Zawadzki KA, Nabeshima K, Drake M, Arur S, Villeneuve AM. 2012.** COSA-1 Reveals Robust Homeostasis and Separable Licensing and Reinforcement Steps Governing Meiotic Crossovers. *Cell* **149**: 75-87.
- Younis A, Hwang Y-J, Lim K-B. 2014.** Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant cell reports* **33**: 215-23.
- Yuan G, Ahootapeh BH, Komaki S, Schnittger A, Lillo C, Storme ND, Geelen D. 2018.** PROTEIN PHOSHATASE 2A B'α and β Maintain Centromeric Sister Chromatid Cohesion during Meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **178**: 317-328.
- Zamariola L, Storme ND, Vannerum K, Vandepoele K, Armstrong SJ, Franklin FCH, Geelen D. 2014.** SHUGOSHINs and PATRONUS protect meiotic centromere cohesion in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **77**: 782-794.
- Zhang H, Bian Y, Gou X, Zhu B, Xu C, Qi B, Li N, Rustgi S, Zhou H, Han F, et al. 2013.** Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 3447-3452.
- Zhang Z, Gou X, Xun H, Bian Y, Ma X, Li J, Li N, Gong L, Feldman M, Liu B, et al. 2020.** Homoeologous exchanges occur through intragenic recombination generating novel transcripts and proteins in wheat and other polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**: 14561-14571.
- Zhang J, Han F. 2017.** Centromere pairing precedes meiotic chromosome pairing in plants. *Science China. Life sciences* **60**: 1197-1202.
- Zhang T, Hu Y, Jiang W, Fang L, Guan X, Chen J, Zhang J, Saski CA, Scheffler BE, Stelly DM, et al. 2015a.** Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature Biotechnology* **33**: 531-537.
- Zhang H, Lang Z, Zhu J-K. 2018.** Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**: 489-506.

Zhang L, Liang Z, Hutchinson J, Kleckner N. 2014. Crossover Patterning by the Beam-Film Model: Analysis and Implications. *PLoS Genetics* **10**: e1004042.

Zhang J, Liu Y, Xia E-H, Yao Q-Y, Liu X-D, Gao L-Z. 2015b. Autotetraploid rice methylome analysis reveals methylation variation of transposable elements and their effects on gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E7022-E7029.

Zhao D, Ferguson AA, Jiang N. 2016. What makes up plant genomes: The vanishing line between transposable elements and genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1859**: 366-380.

Zhao J, Udall JA, Quijada PA, Grau CR, Meng J, Osborn TC. 2006. Quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and its association with a homeologous non-reciprocal transposition in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 509-516.

Zheng T, Nibau C, Phillips DW, Jenkins G, Armstrong SJ, Doonan JH. 2014. CDKG1 protein kinase is essential for synapsis and male meiosis at high ambient temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 2182-2187.

Zhuang W, Chen H, Yang M, Wang J, Pandey MK, Zhang C, Chang W-C, Zhang L, Zhang X, Tang R, et al. 2019. The genome of cultivated peanut provides insight into legume karyotypes, polyploid evolution and crop domestication. *Nature Genetics* **51**: 865-876.

Zickler D, Kleckner N. 2015. Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**: a016626.

Ziegler DJ, Khan D, Pulgar-Vidal N, Parkin IAP, Robinson SJ, Belmonte MF. 2023. Genomic asymmetry of the *Brassica napus* seed: epigenetic contributions of DNA methylation and small RNAs to subgenome bias. *The Plant Journal* **115**: 690-708.

Ziolkowski PA. 2022. Why do plants need the ZMM crossover pathway? A snapshot of meiotic recombination from the perspective of interhomolog polymorphism. *Plant Reproduction*: 1-12.

Ziolkowski PA, Underwood CJ, Lambing C, Martinez-Garcia M, Lawrence EJ, Ziolkowska L, Griffin C, Choi K, Franklin FCH, Martienssen RA, et al. 2017. Natural variation and dosage of the HEI10 meiotic E3 ligase control *Arabidopsis* crossover recombination. *Genes & Development* **31**: 306-317.

Zou M, Shabala S, Zhao C, Zhou M. 2024. Molecular mechanisms and regulation of recombination frequency and distribution in plants. *Theoretical and Applied Genetics* **137**: 86.