

# THÈSE

École Normale Supérieure de Lyon  
Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes

pour obtenir le titre de

**Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon**  
**Spécialité: Sciences de la vie**

N° d'ordre : 323  
N° attribué par la bibliothèque : 05ENSL0 323

---

**Le genre *Silene* :**  
**des chromosomes sexuels au dimorphisme floral**

---

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2005  
par:  
**Michaël NICOLAS**

Devant la commission d'examen formée de:

Michael Mitchell	Rapporteur
Patrick Laufs	Rapporteur
Denis Tagu	Examineur
Christine Oger	Examineur
Ioan Negrutiu	Examineur
Françoise Monéger	Directeur de thèse



# REMERCIEMENTS

Je remercie Michael Mitchell, Patrick Laufs, Denis Tagu et Christine Oger pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier Fanfan pour avoir été un coach si exceptionnel, toujours présent et à l'écoute. Ton énergie et ta volonté d'aller de l'avant ont largement contribué à rendre ces années si riches. J'ai beaucoup appris à tes côtés, y compris dans le domaine des blagues croustillantes. Je ne sais pas si l'élève pourra un jour dépasser le maître.

Merci aussi à toi Nelu, mon « patriarche » pour avoir cru en moi lorsque j'étais un jeune stagiaire de Licence. J'espère que tu es satisfait du travail de « junior ».

Je remercie Christian à qui je dois d'avoir pu passer ces (presque) cinq années passées au laboratoire.

C'est maintenant que les choses se compliquent. Pour être sûr d'oublier personne, je fais tout d'abord un remerciement général à tous les membres du RDP, les présents et les anciens et merci aux futurs acteurs de contribuer à entretenir la bonne humeur au sein du labo.

Dans le désordre je remercie donc :

Christophe avec qui j'ai partagé de bons moments scientifiques, footballistiques et autres.

Patrice pour ses talents de DJ. Maintenant je sais qu'il ne faut pas faire écouter du Gérard Manset à un dépressif.

Adeline pour avoir été une stagiaire hors pair.

Jitka et Bohous pour m'avoir fait découvrir l'alcool Tchèque.

Nat pour avoir perdu deux fois suite contre moi aux colons de Catanes avec le sourire.

Vladka, avec qui j'ai commencé comme stagiaire.

Pierre pour son aide technique qui a été si précieuse.

Annick, merci d'avoir tâter des Silènes sur les routes de campagne afin de combler mon manque de femelles.

Merci à Charly avec qui j'ai également passé de très bons moments, au labo ou autour d'une Guinness au Flemings.

Chloé, que je connais depuis les bancs de la fac de Lyon. Mieux vaut tard que jamais, on finira bien par le prendre ce coup à boire.

Merci à Vanessa pour être la plus grande fan de mon guide culinaire. Si tu arrêtes la Salsa, tu sais que je connais un très bon dojo d'Aïkido, peut-être un peu trop feng shui mais on s'y fait.

Yvon, pour ses dons généreux à ma collection de « BioArts ». On ne fait pas un métier facile.

Seb, pour tous les grands moments de Sciences et de poudreuses.

Adrienne et Edwige pour m'avoir tenu au courant sur toutes les informations à caractère non scientifique du bâtiment LR5.

Cédric pour reprendre le flambeau en évolution au labo.

Mic, car un Mic ne peut être remplacé que par un autre Mic.  
Merci à Nathalie pour son humour décapant.  
Isabelle et Claudia, les reines de la Salsa.  
Anne Marie, la grande prêtresse de la biochimie.  
Hervé pour son aide précieuse au jour le jour.  
Gabriel Marais sans qui le projet « évolution du Y » n'aurait aucun sens.  
Frédérique Rozier pour ses conseils sur les hybridations *in situ*.  
Annie pour ses bons conseils en bio mol.  
Merci à Fabienne et Laetitia pour leur efficacité.  
Alexis et Armand et leur soutien inconditionnel pour la culture des Silènes...  
Je remercie tous les joueurs de l'équipe de foot en salle « Drintim », encore connu sous le nom « les valseuses » : Fabrice, Karim, Le corse, Stéphane, Momo, Jimmy, Guillaume, les deux Nico, Philippe... On aura fini par le gagner ce championnat.  
Merci à Philippe Vergne et Philippe Hugueney avec qui les petites discussions au jour le jour ont également été des moments privilégiés de la vie au labo.

Je remercie également tous ceux qui sont partis avant moi. Nico, que je vais retrouver bientôt, pour remonter une équipe de foot : « les gruyères » ? Marion et Babeth, pour leur bonne humeur qui a rayonné dans tout le labo. Stéphanie avec qui j'ai toujours aimé les discussions de fin de journée. Fred, mon voisin de Bureau avant son départ pour Singapour. Lili, Pierre-Yves, Etienne, Corinne, Gabriel, Pascal...  
Je remercie aussi tous mes amis du « clan lyonnais » avec qui j'ai partagé des moments heureux mais aussi tragiques qui resteront gravés : Seb, Ju, Marik, Mu, Fredo et Alex....

Enfin je remercie ma famille qui me soutient depuis toujours. Mes parents, mes grand-parents, mes frères et toutes la nouvelle génération de petits Nicolas.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>7</b>
<b>POURQUOI LE SEXE ? .....</b>	<b>8</b>
<b>1 ORIGINE ET EVOLUTION DES CHROMOSOMES SEXUELS.....</b>	<b>10</b>
1.1 Mise en place des chromosomes sexuels .....	10
1.1.1 Chromosomes sexuels : définition .....	10
1.1.2 Origine des chromosomes sexuels.....	11
1.1.3 Les différentes origines indépendantes de chromosomes sexuels .....	14
1.1.4 L'étalement de la région non-recombinante.....	19
1.2 L'arrêt de la recombinaison des chromosomes Y ou W .....	22
1.2.1 Les strates évolutives .....	22
1.2.2 Les limites du modèle par strates .....	25
1.2.3 Quels autres mécanismes pour l'arrêt de la recombinaison ? .....	28
1.3 Les conséquences de l'arrêt de la recombinaison .....	28
1.3.1 Accumulation de séquences répétées.....	28
1.3.2 La dégénérescence du chromosome Y .....	29
1.3.3 Vers la fin du chromosome Y ? .....	32
1.3.4 La compensation de dose.....	35
<b>2 LE DEVELOPPEMENT FLORAL ET LA MISE EN PLACE D'UN DIMORPHISME SEXUEL.....</b>	<b>38</b>
2.1 Le développement végétal : organogenèse à partir des méristèmes .....	38
2.1.1 Introduction au développement végétal.....	38
2.1.2 Organisation d'un méristème apical caulinaire .....	39
2.2 Principe du fonctionnement du méristème apical caulinaire .....	41
2.2.1 Définition de l'identité du méristème .....	41
2.2.2 Le maintien des cellules souche .....	41
2.2.3 Les relations entre <i>WUS</i> , <i>CLV</i> , <i>STM</i> et <i>HAM</i> pour le bon fonctionnement du MAC .....	47
2.2.4 Mise en place des primordia .....	48
2.2.5 Le rôle des bordures.....	51
2.3 Du méristème apical caulinaire au méristème floral, entre similarité et singularité.....	53
2.3.1 Les différences de structures et de fonctionnement.....	53
2.3.2 Identité florale et croissance des primordia.....	54
2.3.3 Les frontières au sein du méristème floral .....	56
2.3.4 Le contrôle du caractère déterminé du méristème floral .....	58
<b>3 SUJET DE THESE .....</b>	<b>61</b>
3.1 Contexte .....	61
3.2 Les objectifs .....	61
3.2.1 Origine et évolution des chromosomes sexuels dans le genre <i>Silene</i> .....	61
3.2.2 Comment produire des fleurs sans carpelles ? .....	62
<b>RESULTATS DISCUSSION.....</b>	<b>64</b>
<b>Partie I : Origine et évolution des chromosomes sexuels chez des espèces dioïques du genre <i>Silene</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>1 Etude dans le clade de <i>Silene latifolia</i>.....</b>	<b>67</b>
1.1 Résumé de l'article.....	67

1.2	Article : A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants .....	67
1.3	Conclusions et perspectives.....	68
<b>2</b>	<b>Analyse du gène 3.....</b>	<b>69</b>
2.1	Caractérisation des séquences génomiques du gène 3.....	69
2.2	SIY3 s'exprime-t-il ? .....	71
2.3	Analyse des séquences génomiques de SIY3 .....	73
2.4	Conclusion.....	76
<b>3</b>	<b>Sexe et chromosomes sexuels dans le clade de <i>S. otites</i>.....</b>	<b>77</b>
3.1	Introduction.....	77
3.2	Résultats.....	77
3.2.1	Nouvelle phylogénie du genre <i>Silene</i> .....	77
3.2.2	Les différences morphologiques florales entre les quatre espèces dioïques.....	82
3.2.3	La même paire d'autosomes à l'origine des chromosomes sexuels chez <i>S. otites</i> ? .....	84
<b>Partie II : Des fleurs mâles chez <i>S. latifolia</i> .....</b>		<b>87</b>
<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>87</b>
<b>2</b>	<b>Résultats (manuscrit).....</b>	<b>88</b>
<b><u>CONCLUSION PERSPECTIVES</u> .....</b>		<b>102</b>
<b>La quête de nouveaux gènes sur le chromosome Y .....</b>		<b>103</b>
<b>La dégénérescence et ses conséquences chez <i>S. latifolia</i>.....</b>		<b>104</b>
<b>Quels sont les chromosomes sexuels de <i>S. otites</i> ? .....</b>		<b>105</b>
<b>Le méristème en perspective .....</b>		<b>105</b>
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u>.....</b>		<b>107</b>
<b>1</b>	<b>Matériels.....</b>	<b>108</b>
1.1	Matériel végétal .....	108
1.2	Bactéries compétentes .....	108
<b>2</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>109</b>
2.1	Extraction d'ADN génomique de <i>Silene</i> .....	109
2.2	Extraction d'ARNs totaux de plante .....	109
2.3	Transcription reverse .....	109
2.4	Amplification PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	110
2.4.1	PCR pour l'amplification du gène 3.....	110
2.4.2	PCR pour les analyses phylogénétiques chez <i>S. otites</i> .....	110
2.4.3	PCR pour l'amplification des gènes 3 chez <i>S. otites</i> .....	111
2.4.4	Marche génomique .....	111
2.5	Clonage des produits PCR.....	111
2.6	Séquençage .....	112
2.7	Analyse phylogénétique.....	112
2.8	Analyses bioinformatiques.....	114
2.9	Hybridation sur membrane nylon .....	114
2.10	Hybridation in situ.....	114
2.10.1	Préparation des ribosondes pour l'hybridation <i>in situ</i> .....	114
2.10.2	Hybridation <i>in situ</i> .....	117
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....</b>		<b>122</b>

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## POURQUOI LE SEXE ?

Pourquoi le sexe ? Certains vous répondront que sans sexe, il n'y aurait pas de fleurs dans les champs, de parades amoureuses et que ce monde alors dénué de couleurs extravagantes paraîtrait bien terne. S'il existe une réponse poétique à cette question, dans le domaine de la biologie évolutive, elle fait partie des grands mystères. Le sexe implique la reproduction sexuée, c'est-à-dire la formation d'une descendance par combinaison de matériels génétiques provenant de deux parents. Elle s'oppose à la reproduction asexuée qui produit des individus génétiquement identiques à leurs parents. La plupart des biologistes pensent donc généralement que le sexe favorise la variabilité biologique car il implique systématiquement un brassage génétique grâce à la recombinaison. Il permettrait donc « une évolution des procédés plus rapide qu'en son absence » (Weisman, 1886). Cette réponse n'est cependant pas complètement satisfaisante. S'il semble logique qu'à long terme le sexe permet une meilleure adaptation des individus aux éventuels changements environnementaux, à court terme, rien n'est moins sûr. En effet, à court terme, le sexe va casser les combinaisons favorables de gènes qui se sont accumulées par sélection (Williams, 1975). Le sexe n'a donc pas d'avantage sélectif évident à court terme. Sans compter que cela introduit le risque de transmission par voie sexuelle de maladie et d'éléments génétiques parasites. Et ceci est sans compter tous les coûts auxquels il est souvent associé. Par exemple, il existe des coûts importants liés à l'accouplement ou la conjugaison. Chez beaucoup d'espèces animales, l'accouplement implique un investissement en temps et en énergie pour l'acte lui-même et pour le sécuriser. La queue du paon qui a pour but d'attirer la femelle en est une belle illustration. Elle fascinait déjà Darwin à son époque car il se demandait comment la sélection naturelle à elle seule pouvait avoir donné lieu à une queue si grande qu'elle en vient presque à menacer la survie de l'oiseau par son poids. Et le monde animal n'a pas le monopole dans ce phénomène. Beaucoup d'espèce de plantes à fleurs investissent dans des ressources substantielles pour la bonne présentation de la fleur et dans la récompense en nectar afin d'assurer la pollinisation. Chez les espèces avec des sexes séparés, de coûteux conflits sexuels peuvent également apparaître (pour revue Gage, 2004). On recense également ceux liés à la production d'une descendance. Du point de vue de la génétique des populations, on parle ainsi du double coût du sexe car il faut deux individus pour avoir une descendance par reproduction sexuée contre un seul pour la reproduction asexuée, le coût du sexe est donc double (Maynard Smith, 1978).

En somme, le sexe coûte cher à tous les niveaux. On pourrait logiquement penser qu'il constitue une impasse évolutive mortelle, une relique rarement observée. *A contrario*, une vaste majorité des espèces se reproduisent sexuellement et les taxons asexués ne semblent persister que pour des périodes évolutives courtes en comparaison de leurs homologues sexués (Schon et coll., 1998 ; Judson et Nomark, 1996 ; Birky, 1996). Seuls quelques groupes d'eucaryotes comme la classe des *bdelloid rotifers* qui comprend environ 360 espèces ont en effet persisté avec une reproduction asexuée (Judson et Normark, 1996). Pour l'ensemble des vertébrés, on ne compte que 22 poissons, 23 amphibiens et 29 reptiles asexués (Vrijenhoek et coll., 1989). C'est une petite fraction par rapport aux quelques 42300 espèces de vertébrés connues (Wilson, 1992). Même les procaryotes manifestent dans la nature des phénomènes parasexuels occasionnels tels la conjugaison

(Maynard Smith, 1990). Ce sont des éléments qui tendent à prouver que les avantages sélectifs de la reproduction sexuée l'emportent sur les désavantages. Depuis une trentaine d'années, les théories pour expliquer la pertinence du sexe se sont multipliées. Elles s'accordent généralement pour dire que l'avantage majeur de la sexualité découle de la recombinaison. Elles sont maintenant classées en deux catégories non exclusives (Kondrashov, 1993). La première suppose que la recombinaison permet l'association de mutations bénéfiques qui sont apparues dans des lignées différentes augmentant le taux d'évolution adaptative et la deuxième qu'elle permettrait d'éliminer plus efficacement les mutations délétères en libérant les mutations bénéfiques d'interactions génétiques non favorables.

Quelles qu'en soient les raisons, c'est un fait, le sexe est quasi-universel. Paradoxalement, s'il a pu se maintenir au cours des âges grâce à la recombinaison, il est souvent contrôlé par du matériel génétique qui n'a d'existence que parce qu'il y échappe. Les chromosomes sexuels sont en effet des chromosomes dont l'un ne s'apparie pas à la méiose et ne fait par conséquent pas de recombinaison, tout au moins sur une majeure partie de sa longueur. Ils sont répandus dans un grand nombre d'espèces au sein des eucaryotes supérieurs et ils ont été tout particulièrement étudiés chez les insectes, les poissons, les oiseaux, les mammifères et aussi chez certaines espèces de plantes fleurs.

Durant ma thèse, je me suis intéressé au sexe dans le genre *Silene*. Certaines espèces dans ce genre développent des fleurs unisexuées qui sont contrôlées par des chromosomes sexuels, ce qui est très rare dans le règne végétal. J'ai en particulier travaillé sur l'origine et l'évolution des fleurs unisexuées ainsi que des chromosomes sexuels. Cette introduction présente ainsi deux parties. La première porte sur l'origine et l'évolution des chromosomes sexuels chez les différents groupes où ils ont été le plus particulièrement étudiés : la drosophile, les poissons, les oiseaux, les mammifères et les plantes. Cette première partie, sans rentrer dans les détails moléculaires, a pour but de dessiner un profil type de l'évolution des chromosomes sexuels et de mieux comprendre les règles communes qu'ils suivent au-delà des barrières d'espèces. La deuxième partie porte sur le développement précoce de la fleur tel qu'il est connu principalement chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

# 1 ORIGINE ET EVOLUTION DES CHROMOSOMES SEXUELS

## 1.1 Mise en place des chromosomes sexuels

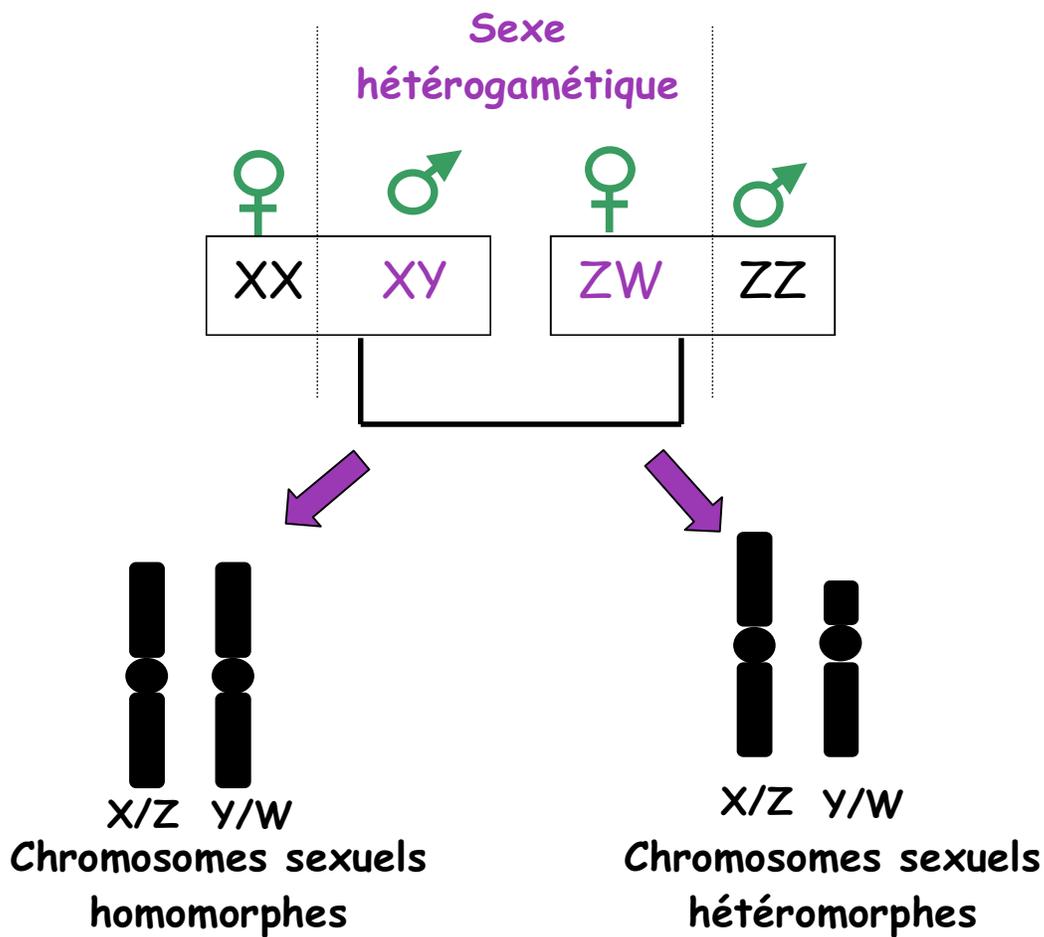
### 1.1.1 Chromosomes sexuels : définition

Les chromosomes sexuels portent un ou plusieurs gènes responsables de la détermination du sexe. Néanmoins, la présence de ces gènes ne suffit pas à définir une paire de chromosomes sexuels. On ne parle réellement de chromosomes sexuels que lorsqu'il est observé une absence de recombinaison entre les deux chromosomes sur au moins une partie des chromosomes qui englobe le ou les loci de la détermination du sexe. Les gènes qui se situent sur cette région non recombinante sont ainsi maintenus dans un état hétérozygote permanent. Les régions qui continuent à s'apparier et à recombiner à la méiose sont appelées les régions pseudo-autosomales (PAR). Elles sont systématiquement subtélomériques. Suivant les espèces, les chromosomes sexuels portent une, deux voire aucune région pseudo-autosomale.

Les chromosomes sexuels fonctionnent généralement par paire comme les autosomes. À la différence de ces derniers, l'un des deux sexes porte deux chromosomes sexuels identiques, il est dit homogamétique car tous les gamètes qu'il produit sont du même type du point de vue de ses chromosomes sexuels. L'autre sexe porte les deux types de chromosomes sexuels et est ainsi dit hétérogamétique. Si les autosomes ont été conventionnellement numérotés, les chromosomes sexuels sont quant à eux identifiés par des lettres. Dans le cas où le mâle est le sexe hétérogamétique, les chromosomes sexuels sont dits de type XY (figure 1). La femelle porte deux chromosomes homologues X et le mâle porte un chromosome X et un chromosome Y. C'est le cas notamment de tous les mammifères, d'un certain nombre de reptiles, des poissons tels le medaka (*oryzia latipes*) ou l'épinoche (*Gasteosteus aculeatus*), d'une majorité d'espèce de drosophiles (*D. melanogaster*, *D. miranda*, *D. affinis*) et des espèces végétales sur lesquelles j'ai travaillé pendant ma thèse : *Silene latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis*. Lorsque la femelle est le sexe hétérogamétique, les chromosomes sont dits de type ZW et c'est en particulier le cas des oiseaux et d'un bon nombre d'espèces de reptiles et d'amphibiens.

D'un point de vue cytogénétique, si les chromosomes XY ou ZW sont distinguables, ces chromosomes sont dits hétéromorphes et dans le cas contraire, ils sont homomorphes (figure 1). Généralement, les chromosomes Y (ou W) sont plus petits que leurs homologues X et Z. C'est le cas des chromosomes Y de mammifères et des chromosomes W d'oiseau. Mais il existe cependant des cas où le chromosome Y a une taille plus importante que le X, notamment chez *Silene latifolia*, *Silene dioica* et *Silene diclinis*. Comme on le verra plus tard, ces différences de taille peuvent être corrélées à l'âge de ces chromosomes et donc à leur état de différenciation.

Pour des gènes homologues présents sur les chromosomes sexuels, on ne parle plus d'allèles étant donné qu'ils ne recombinent plus et évoluent séparément au sein d'une même espèce. On parle de gamétologues X ou Y, Z ou W (Garcia Moreno et Mindell, 2000).



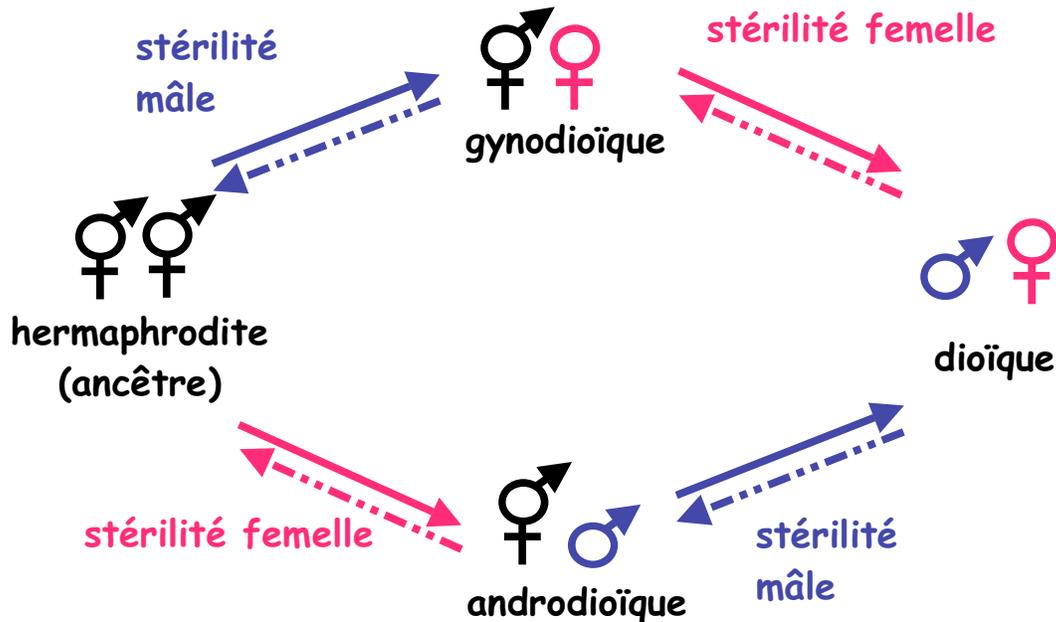
**Figure 1: Nomenclature des chromosomes sexuels.**

Les chromosomes sexuels fonctionnent généralement par paire. L'un des sexes va porter deux mêmes types de chromosomes sexuels. Il est dit homogamétique car il ne va produire que des gamètes du même type d'un point de vue des chromosomes sexuels. L'autre sexe va porter deux chromosomes sexuels différents, il est hétérogamétique. Suivant la nature du sexe hétérogamétique, on parle de système XY ou ZW. Si les deux types de chromosomes sexuels sont morphologiquement semblables, ils sont dits homomorphes. Dans le cas contraire on parle de chromosomes hétéromorphes.

1.1.2 Origine des chromosomes sexuels

D'où proviennent les chromosomes sexuels ? La théorie qui fait depuis longtemps l'unanimité a été émise par Susumo Ohno en 1967. Pour expliquer les différences de l'état de différenciation des chromosomes sexuels dans des familles

de reptiles, il a émis l'hypothèse que les chromosomes sexuels proviennent d'une paire d'autosomes ancestrale. Un chromosome de cette paire aurait acquis au cours de l'évolution les gènes de la détermination du sexe puis l'arrêt de la recombinaison ce qui aurait provoqué la différenciation des deux chromosomes. Chez les animaux, les chromosomes sexuels ont été plus particulièrement étudiés chez les mammifères et les oiseaux. Or chez ces espèces, le sexe et les chromosomes sexuels sont très anciens (plusieurs centaines de millions d'années) et sont à un stade très avancé de leur évolution. Ils ont ainsi généralement perdu les traces des premiers stades de leur évolution. Par contre, chez les plantes à fleurs (les Angiospermes), le sexe et les chromosomes sexuels sont beaucoup plus récents, quelques dizaines de millions d'années (Charlesworth et Guttman, 1999). De cette façon, le modèle actuel d'apparition des chromosomes sexuels est basé sur les études d'évolution du sexe chez les plantes. Il propose une évolution en trois étapes d'après Charlesworth B., 1991. Les deux premières permettent l'émergence d'une espèce dite dioïque où chaque individu est unisexué à partir d'une espèce hermaphrodite ancestrale (figure 2). Pour arriver à la diécie, deux mutations, l'une provoquant une stérilité mâle et l'autre une stérilité femelle, doivent se fixer dans la population. Il existe alors deux possibilités suivant si la stérilité mâle ou femelle apparaît en premier. Chez les Angiospermes, on retrouve de nombreuses espèces qui incluent ainsi des individus hermaphrodites et unisexués dans leur population. La fleur unisexuée est généralement de type femelle ce qui laisse supposer que les pressions de sélection ont favorisé l'apparition de mutations mâle stérile comme premiers événements. Cette préférence est peut-être due au fait que le pollen qui véhicule les gamètes mâles, est moins limitant que le nombre d'ovules, ce qui à court terme est donc moins désavantageux pour l'espèce.



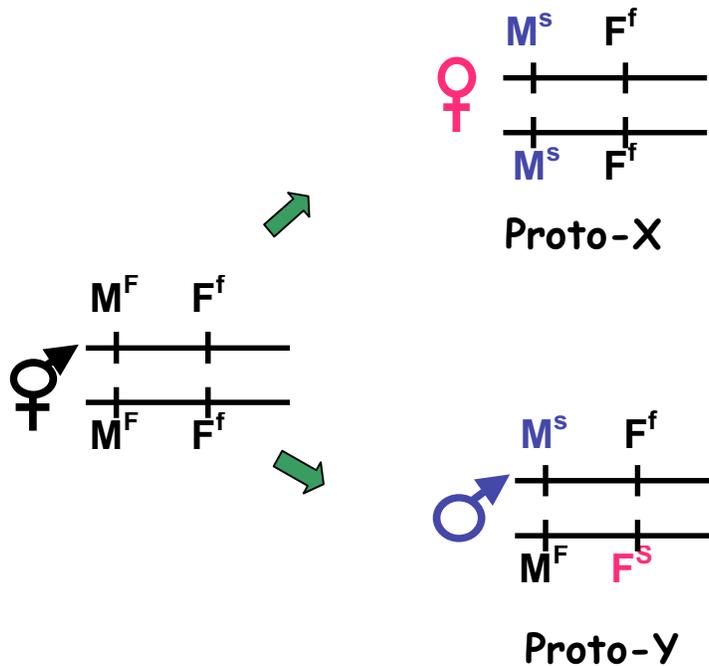
**Figure 2: Théorie de l'évolution de la diécie (Charlesworth, 1991).**

Les espèces dioïques sont unisexuées, chaque individu ne portant qu'un seul type d'organe sexuel. D'après les modèles inspirés des plantes à fleurs, on considère que toute espèce dioïque animale ou végétale provient d'une espèce hermaphrodite ancestrale. Deux mutations vont être nécessaires pour passer de l'hermaphrodisme à la diécie: l'une provoquant une stérilité mâle et l'autre une stérilité femelle. Il semblerait que chez les plantes à fleurs la stérilité mâle ait généralement précédé la stérilité femelle.

D'un point de vue moléculaire, on considère que la stérilité qui va donner le sexe homogamétique serait due à une mutation récessive, par exemple de type perte de fonction (figure 3). Dans les cas de chromosomes de type XY, la stérilité mâle serait donc récessive et le chromosome qui la porte serait appelé proto-X du fait qu'il continue encore à recombiner avec son homologue. Le proto-Y quant à lui porterait le gène de fertilité mâle ainsi que le gène portant une mutation dominante provoquant la stérilité femelle.

Comment ces deux gènes se retrouvent sur la même paire de proto-chromosomes sexuels ? Il s'agit vraisemblablement d'une conséquence de pressions de sélection qui doivent s'exercer sur ces chromosomes. En effet, si les deux mutations affectaient des loci génétiquement indépendants, la recombinaison et le brassage génétique conduiraient à la formation d'individus hermaphrodites et asexués. La production d'asexués dans la descendance pouvant être considérée comme défavorable pour l'espèce, ces proto-chromosomes sexuels sont contre sélectionnés. Seules les mutations se produisant sur des loci proches seraient ainsi en mesure de se fixer. Il se peut également que les deux mutations aient affecté des

loci à la base indépendants, mais que des remaniements chromosomiques auraient rapprochés. Dans tous les cas, une fois les deux gènes de la détermination du sexe génétiquement liés, de nouvelles pressions de sélection favoriseraient alors les mutations ou les réarrangements chromosomiques dont l'effet conduirait à l'arrêt de la recombinaison entre les deux loci.



**Figure 3: Modèle d'évolution moléculaire d'une proto-paire de chromosomes sexuels XY.**

L'espèce hermaphrodite ancestrale possède une paire d'autosomes qui portent un locus responsable de la fertilité des organes mâles ( $M^F$ ) et un locus de fertilité des organes femelles ( $F^f$ ). Au cours de l'évolution, une mutation provoquant une stérilité mâle récessive ( $M^s$ ) va se fixer. Une mutation provoquant une stérilité femelle ( $F^s$ ), dominante cette fois, va également se fixer dans la population. Après fixation de ces deux types de mutations, on obtient deux types de chromosomes. L'autosome qui porte l'allèle conférant la stérilité mâle est appelé proto-chromosome X. Celui permettant de produire des mâles est ainsi le proto-chromosome Y.

### 1.1.3 Les différentes origines indépendantes de chromosomes sexuels

On retrouve des chromosomes sexuels chez tous les eucaryotes pluricellulaires. On en dénombre en effet parmi tous les grands règnes, les plantes, les animaux et même parmi les champignons (Fraser et coll., 2004). Mais ont-ils tous la même origine ? Comme nous venons de le voir, pour qu'il y ait des chromosomes sexuels, il faut d'abord qu'il y ait des espèces dioïques et vraisemblablement des espèces hermaphrodites avant elles. Aux origines de cette évolution du sexe et des

chromosomes sexuels, on retrouve nécessairement les gènes qui interviennent dans la méiose permettant ainsi la production des gamètes. Il semble que l'on retrouve les gènes de la méiose chez l'ensemble des eucaryotes (Ramesh et coll., 2005). Dans ce cas, la reproduction sexuée a pu émerger très tôt au cours de l'évolution, il y a peut-être un milliard d'années. Par extrapolation, si la diécie était apparue très tôt au cours de l'évolution des eucaryotes, on pourrait imaginer une origine précoce des chromosomes sexuels. Or il semble que ce ne soit pas le cas. La diécie et les chromosomes sexuels ont dû apparaître beaucoup plus tard, bien après la mise en place des différents embranchements, des ordres et même parfois des familles d'espèces.

#### 1.1.3.1 Origine dans le règne végétal

Les chromosomes sexuels dans ce règne ont essentiellement été trouvés chez les Angiospermes (embranchement des plantes vasculaires), mais ils ont également été identifiés chez certaines espèces de mousses (sous-règne des bryophytes) tel *Marchantia polymorpha* qui en possède de type XY (Bischler, 1986).

Chez les plantes vasculaires, mis à part quelques espèces comme le *ginkgo biloba*, la majorité des espèces dioïques ne sont apparues que très récemment (Darwin, 1877), après l'émergence des Angiospermes. Les chromosomes sexuels n'ont donc pu apparaître avant dans cet embranchement. Le faible nombre d'espèces dioïques avec des chromosomes sexuels chez les Angiospermes suggère qu'il y a eu plusieurs origines indépendantes de la diécie au sein des Angiospermes. Ces chromosomes ont pris des formes très variées. La plupart sont cependant de type XY. Ils sont soit homomorphes comme c'est le cas pour la papaye (*Carica papaya*) le kiwi (*Actinida deliciosa*) et *S. otites*, soit hétéromorphes comme pour *S. latifolia*. *S. dioica* et *S. diclinis*, *Cannabis sativa* et le houblon (*Humulus lupulus*). Mais il existe certaines espèces avec des chromosomes de type ZW comme par exemple chez la fraise (*Fragaria eliator* ; Kihara, 1930 et pour revue Matsunaga et Kawano, 2001).

#### 1.1.3.2 Origine chez les drosophiles

Pour les différentes espèces de drosophiles, les chromosomes sexuels ont généralement des tailles et des contenus en gènes différents, mais il semblerait que tous aient la même origine (Steinmann M. et Steinmann. S., 1998 ; Carvalho A.B. et Clark A.G., 2004 ; Charlesworth D. et B., 2005). Chez ces espèces, de nombreuses translocations depuis des autosomes se sont produites après la formation de la paire de chromosomes sexuels initiale. Il ne reste plus que des résidus de cette paire originelle ce qui ne permet pas de déterminer avec certitudes son origine potentielle à partir d'une seule paire d'autosome.

#### 1.1.3.3 Origine chez les vertébrés non mammaliens

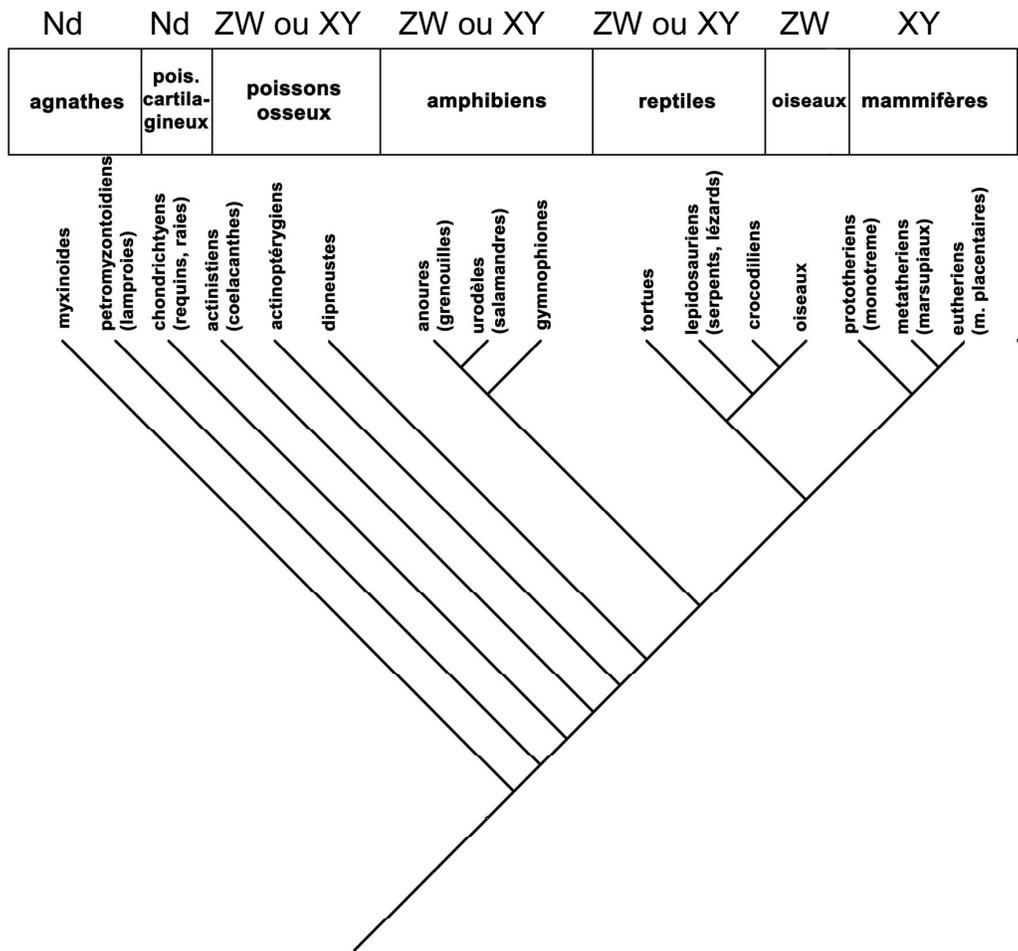
Les vertébrés forment un sous-embranchement dans le règne animal. Chez ce taxon, on retrouve différentes classes de poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (figure 4). Certains gènes intervenant dans la différenciation sexuelle semblent être particulièrement conservés, ce qui suggère une origine commune de la sexualité pour tous ces groupes. Le gène DMRT1 (Double-sex and mab3 related transcription factor 1) a ainsi un rôle dans la

différenciation des testicules chez tous les vertébrés (Schartl, 2004). Ce rôle semble même s'étendre jusqu'aux drosophiles et chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Raymond, 1998). D'autres gènes du développement des organes sexuels mâles comme SOX9, WT1 et SF1 sont également conservés des poissons aux mammifères et le gène de l'hormone anti-Mullérienne (AMH) est retrouvé des reptiles aux mammifères. Devant cette conservation des gènes du développement et de la différenciation des organes sexuels mâles, la présence de chromosomes sexuels monophylétiques chez les vertébrés pourrait être envisagée. Cependant, à l'heure actuelle, les connaissances acquises chez les différents taxons ne montrent concrètement aucune évidence en faveur de cette hypothèse. Chaque classe de vertébrés semble avoir fait l'objet d'une ou plusieurs apparitions indépendantes de chromosomes sexuels.

Les poissons constituent le plus grand groupe de vertébrés. Bon nombre d'espèces sont encore hermaphrodites (Devlin et coll., 2002) ou changent de sexe en fonction de facteurs environnementaux. Lorsqu'ils existent, les chromosomes sexuels sont de types XY ou ZW ce qui laisse supposer plusieurs origines indépendantes au sein des poissons. Chez le poisson platy (*Xiphophorus maculatus*), on retrouve même les deux types de chromosomes sexuels (Kallman, 1984 ; Volff et Schartl, 2001). Pour ce groupe, très peu de gènes ont été isolés sur les chromosomes sexuels ce qui ne permet pas de tester la validité du modèle d'Ohno et d'une origine autosomale. Seuls quelques gènes ou séquences des chromosomes sexuels du poisson medaka (*Oryzias latipes*) et de l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) sont connues. Chez l'épinoche, les séquences d'ADN de la région non recombinante sont suffisamment similaires entre X et Y pour qu'une origine à partir d'une paire d'autosomes soit envisagée (Peichel, 2004), ce qui n'est pas le cas du poisson medaka. Chez cette espèce, le gène de la détermination du sexe est une copie du gène DMRT1 qui a été transloquée sur une nouvelle paire d'autosomes la transformant en paire de chromosomes sexuels (Matsuda, 2002 ; Nanda, 2002). C'est peut-être le seul exemple clairement identifié où un remaniement chromosomique faisant intervenir deux paires d'autosomes est à l'origine des chromosomes sexuels.

Chez les reptiles, bon nombre d'espèces possèdent une détermination du sexe qui n'est pas génétique mais qui dépend plutôt de la température comme c'est le cas pour tous les crocodiliens et les tortues marines. Les serpents par contre possèdent une détermination du sexe strictement génétique. Les chromosomes sexuels sont tous du type ZW (Schartl, 2004).

Les oiseaux, proches phylogénétiquement des reptiles, possèdent également un système de chromosomes sexuels de type ZW. Chez les oiseaux, il a été montré que les 5 gènes identifiés sur le chromosome W du poulet possèdent un homologue sur le chromosome Z (Lawson Handley, 2004). Le chromosome Z de poulet quant à lui montre une synténie conservée avec le chromosome 9 humain (Nanda, 1999). Ces résultats vont donc dans le sens d'une origine à partir d'une seule paire d'autos



**Figure 4: La phylogénie des vertébrés.**

Les vertébrés forment un sous-embanchement de la branche des Cordés. On distingue dans cette partie de l'arbre sept classes. Dans les deux premières classes (agnathes et poissons cartilagineux), les données manquent (Nd). Dans les classes des poissons osseux, des amphibiens et des reptiles, on retrouve des espèces portant des chromosomes sexuels de type XY ou ZW. Chez les oiseaux, ceux-ci sont strictement de type ZW alors que chez les mammifères ils sont tous de type XY. Toutes ces données laissent suggérer que l'origine des chromosomes sexuels est indépendante au moins pour chaque classe.

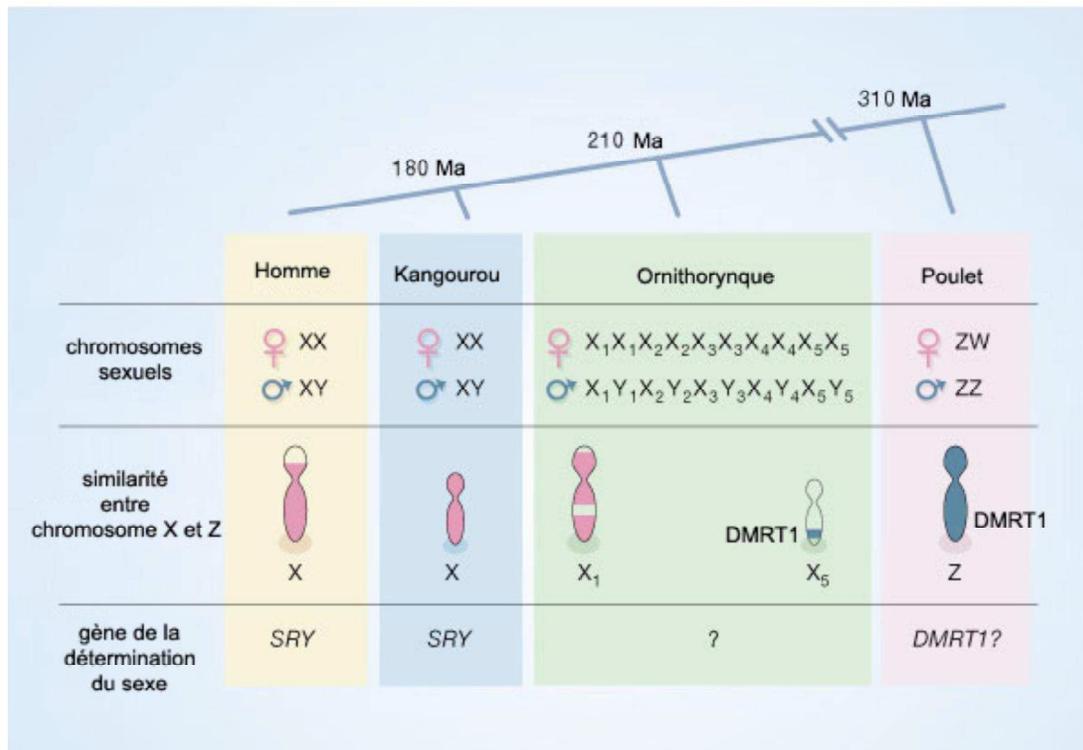
1.1.3.4 Origine chez les mammifères

La classe des mammifères est composée de trois sous-classes (figure 4). On distingue les protothériens, les métathériens et les euthériens. Les protothériens comprennent les monotremes dont les seuls représentants vivants sont l'ornithorynque et deux espèces d'échidnés. Cette sous-classe a divergé la première du reste des mammifères suivis par les métathériens (les marsupiaux). La dernière branche est constituée par tous les mammifères placentaires qui comprend donc les

Hominidés. Tous les mammifères possèdent des chromosomes sexuels de type XY et d'après les études de cartographies de gènes et de « chromosome banding », il existe une forte conservation entre eux (Graves et Watson, 1991 ; Graves, 1995) ce qui suggère une origine commune des chromosomes X et Y chez les mammifères. Chez l'homme, 54 gènes sur les 156 unités de transcription connues sur le chromosome Y possèdent un homologue sur le chromosome X. Ces gènes sont répartis sur l'ensemble des chromosomes X et Y. La centaine d'unités restantes correspondant à des duplications à partir des 54 premiers gènes du Y, la majorité des gènes a donc un homologue sur le X (Skaletsky et coll., 2003 ; Ross et coll., 2005). Ces résultats sont donc cohérents avec le modèle de Ohno. Cependant, les études de synténie, c'est-à-dire de la présence d'un groupe de gènes sur un même chromosome chez différentes espèces, a montré qu'il en existait une entre le chromosome X humain et les chromosomes 1 et 4 du poulet (Nanda, 1999 ; Schmid, 2000) ce qui pourrait remettre en cause une origine à partir d'une seule paire d'autosomes. Seule la partie homologue au chromosome 4 de poulet est conservée chez tous les mammifères (Graves, 1995), l'autre n'est présente que chez les mammifères euthériens et résulte probablement d'une translocation datant de la période de divergence entre les marsupiaux et les mammifères placentaires. Une seule paire d'autosomes est donc bien à l'origine des chromosomes sexuels chez les mammifères.

#### 1.1.3.5 Le cas de l'ornithorynque

Les oiseaux et les reptiles sont les plus proches phylogénétiquement des mammifères (figure 4). D'après les estimations, leurs chromosomes sexuels datent de la même période. Etant donné que les uns ont un système plutôt de type ZW et les autres de types XY et qu'à priori il n'y a pas de synténie entre eux, il a été estimé que ces deux paires de chromosomes sexuels avaient une origine indépendante (Fridolfsson, 1998). Le fait que le chromosome X humain soit homologue aux chromosomes 1 et 4 de poulet (Nanda, 1999 ; Schmid, 2000) et que le chromosome Z de cette espèce soit homologue au chromosome 9 humain (Shetty, 1999 ; Schmid, 2000) va dans le sens de cette hypothèse. Des découvertes récentes faites sur les chromosomes sexuels de l'ornithorynque (sous-classe des monotremes) soulèvent cependant des doutes. En effet, il a été montré récemment que cette espèce possède 5 chromosomes X et 5 Y (figure 5 ; Rens et coll., 2004). L'un de ces chromosomes Y est homologue aux autres Y de mammifère mais l'un d'entre eux porte le gène DMRT1 (Grützner et coll., 2004). Ce gène, dont on a vu qu'il avait un rôle très conservé dans la différenciation des testicules chez les animaux, est également présent sur le chromosome Z des oiseaux. Il est même supposé être le gène de la détermination du sexe chez ces espèces. Il agirait en effet comme gène masculinisant de façon dose dépendante. N'étant présent que sur le chromosome Z et pas sur le W, les individus ZW ne produiraient pas assez de cette protéine pour devenir mâle et se développeraient alors comme femelle. La présence de ce gène sur l'un des chromosomes Y de l'ornithorynque n'est peut-être que fortuite, mais il oblige cependant à s'interroger sur l'origine réelle des chromosomes sexuels du taxon des mammifères et celui des oiseaux, qui est le même que celui des reptiles. Une même paire de chromosomes sexuels ancestrale est peut-être à la base des systèmes XY et ZW des mammifères et des oiseaux.



**Figure 5: La particularité des chromosomes sexuels d'ornithorynque (Grützner et coll., 2004; Rens et al, 2004).**

Les oiseaux ont des chromosomes sexuels de types ZW alors que chez les mammifères ils sont de type XY. L'ornithorynque, qui fait parti du groupe des monotremes qui a divergé le premier dans la classe des mammifères, possède cinq chromosomes X et cinq Y. Parmi ces cinq chromosomes X, l'un est identique à ceux des autres mammifères, ce qui est cohérent avec l'hypothèse commune de ces chromosomes. Par contre le cinquième porte le gène DMRT1 qui est également présents sur le chromosome Z des oiseaux. Ceci soulève un doute sur l'hypothèse d'une origine distinctes des chromosomes sexuels dans ces deux classes ( Fridolfsson, 1998).

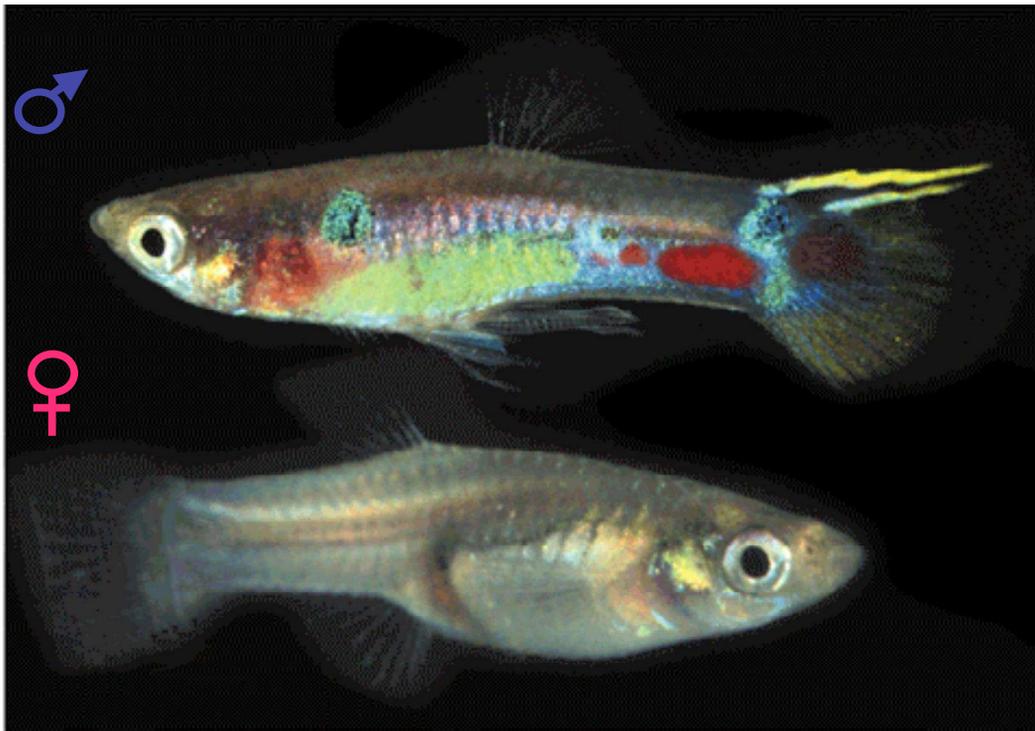
Ma signifie Millions d'années.

#### 1.1.4 L'étalement de la région non-recombinante

Comme nous l'avons vu, les pressions de sélection favoriseraient l'arrêt de la recombinaison entre les chromosomes sexuels pour éviter la production de phénotypes sexuels non avantageux. Cependant, cet arrêt devrait seulement concerner la région de la détermination du sexe en épargnant le reste du chromosome qui constituerait alors une large région pseudo-autosomale. Or, cette région pseudo-autosomale est généralement très courte proportionnellement voire inexistante. Il semblerait que la zone de non-recombinaison s'étende au cours de

l'évolution depuis la région de la détermination du sexe. Une théorie suppose que cette extension est une conséquence de l'action de la sélection naturelle sur les gènes génétiquement proches de ceux de la détermination du sexe (Fisher, 1935 ; Bull, 1983 ; Rice, 1987, 1996). Cette théorie suppose que le chromosome Y ou W se « spécialise » dans le développement du sexe hétérogamétique. Les gènes de la détermination du sexe favoriseraient la fixation d'allèles avantageux pour le sexe hétérogamétique mais désavantageux pour l'autre. Il se créerait alors un nouveau conflit génétique provoquant cet élargissement de la zone non-recombinante.

L'un des plus beaux exemples fourni par la nature est celui du poisson guppi (*Poecilia reticulata* ; figure 6). Ce poisson possède des chromosomes sexuels de type XY. A la manière de la roue du paon, le mâle arbore de nombreuses couleurs vives qui ont pour but d'attirer la femelle en vue d'un accouplement. Ces gènes sont donc très avantageux pour le mâle mais sans intérêt pour la femelle voire même réellement désavantageux. La cartographie de ces gènes a ainsi montré qu'ils étaient liés au chromosome Y (Brooks, 2000). Des exemples pris chez les mammifères viennent également étayer cette hypothèse. Le chromosome Y humain possède ainsi un bon nombre de gènes intervenant spécifiquement dans le développement mâle (Lahn et Page, 1997 ; Lahn et coll., 2000 ; Skaletsky et coll., 2003). Le gène RBMY par exemple est présent sur le chromosome Y humain et possède un gamétologue sur le chromosome X (RMBX). Le gamétologue RMBX a une expression ubiquitaire tandis que RBMY a acquis 3 exons supplémentaires et a une expression spécifique des testicules. La mutation de ce gène provoque une azoospermie et une absence de spermatozoïdes. De la même façon, le gène ATRY chez les marsupiaux possède un gamétologue sur le chromosome X, ATRX dont l'expression est ubiquitaire à la différence d'ATRY dont l'expression est spécifique des testicules.



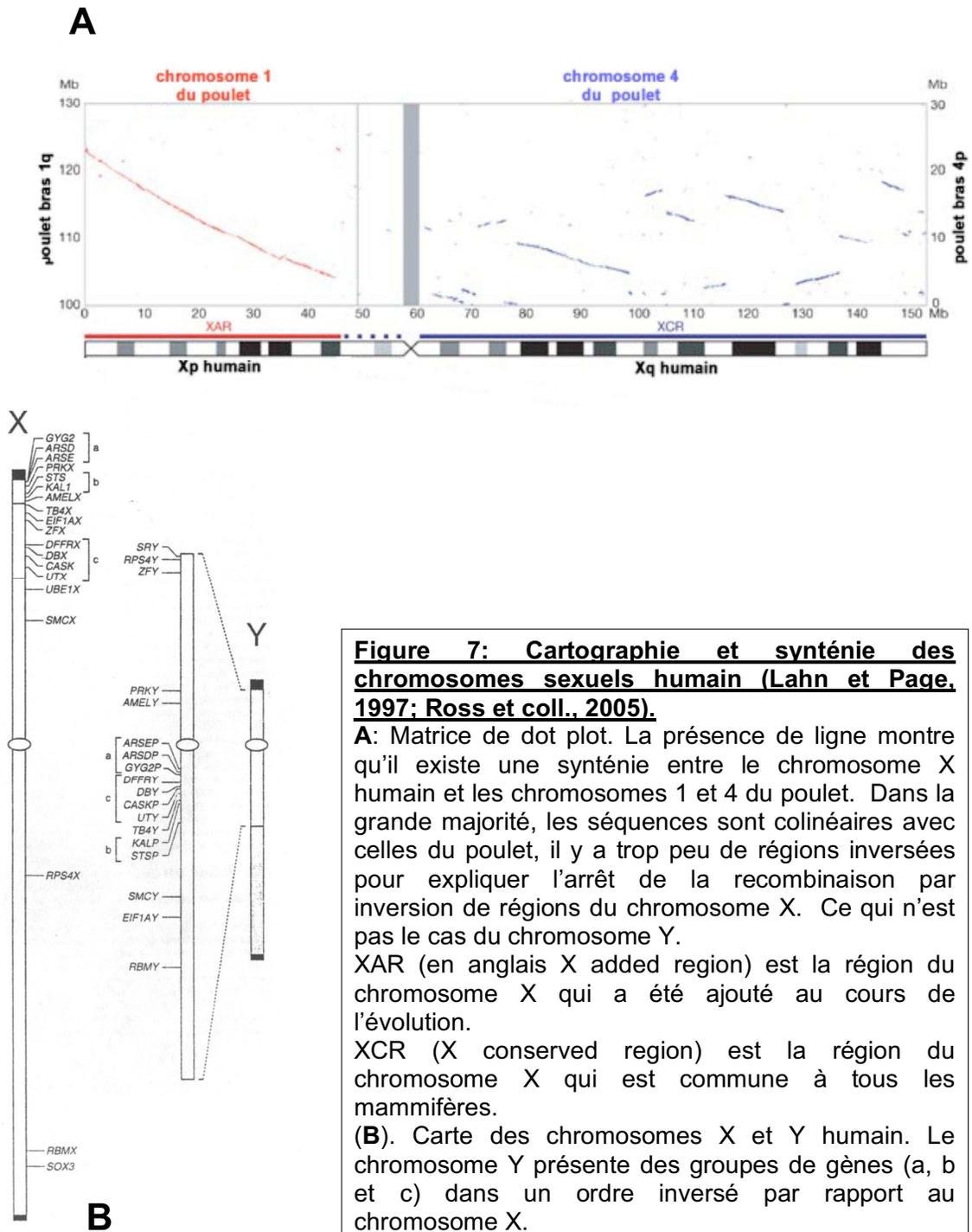
**Figure 6: Exemple de gènes liés au chromosome Y chez le poisson guppy (Brooks R., 2000).**

Les poissons guppy mâles arborent de nombreuses couleurs vives qui lui permet de se faire remarquer des femelles pendant les périodes d'accouplement. Les gènes responsables de ces couleurs sont typiquement avantageux pour le mâle et désavantageux chez la femelle. Les pressions de sélection ont donc favorisé leur fixation sur le chromosome Y ainsi que l'extension de l'arrêt de la recombinaison sur la région qui les porte.

## 1.2 L'arrêt de la recombinaison des chromosomes Y ou W

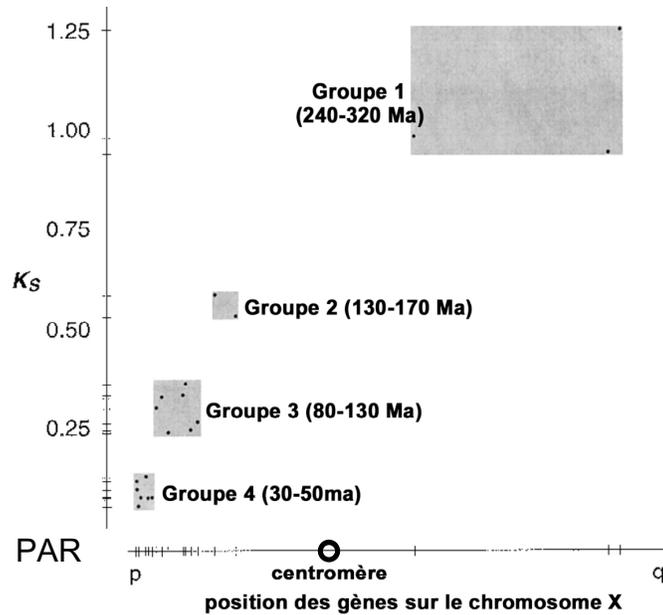
### 1.2.1 Les strates évolutives

L'arrêt de la recombinaison peut être la conséquence de deux grands types d'évènements. Il peut être le résultat de l'action de supresseurs de la recombinaison qui se seraient étalés le long de la région concernée (Brooks ,1988) ou de remaniements chromosomiques tels que des inversions et/ou des translocations qui rendraient la recombinaison physiquement impossible. Le poisson médaka est ainsi un exemple simple d'arrêt de la recombinaison par translocation. Qu'en est-il des autres espèces C'est chez les mammifères et plus spécialement chez les euthériens que cet arrêt à été le plus étudié. Le chromosome X humain présente une synténie avec le chromosome 1 et 4 du poulet (Nanda, 1999 ; Schmid, 2000 ; figure 7A). Plus qu'une synténie, les gènes sur le chromosome X montrent une forte colinéarité avec les orthologues du poulet. L'ordre des séquences sur les chromosomes est le même dans les deux espèces. Cette colinéarité est même conservée avec des autosomes du poisson medaka (Grützner, 2002). Si des remaniements chromosomiques sont à l'origine de l'arrêt de la recombinaison, ils n'ont donc vraisemblablement pas touché le chromosome X. Par contre, ils pourraient bien avoir affecté le chromosome Y. Les études de la localisation des 19 premiers gamétologues XY isolés chez l'homme ont en effet montré que des blocs de gènes présentent un ordre inversé entre le chromosome X et Y (Vollrath et coll., 1992 ; Lahn et Page, 1997, Sun et coll., 1999, Lahn et Page, 1999 ; figure 7B). Ces résultats allaient en faveur de phénomènes d'inversions qui se seraient produits sur le chromosome Y.



Pour compléter ce travail, Lahn et Page en 1999, ont effectué des analyses sur ces mêmes gènes en étudiant si ces inversions étaient visibles au niveau moléculaire. Ils ont calculé la divergence et en particulier le taux de substitutions synonymes entre les séquences des gamétologues X et Y. Ces analyses se basent sur la théorie de l'horloge moléculaire (Zuckerland et Pauling, 1962). Cette théorie suppose que le taux d'accumulation des mutations dans le génome d'organismes différents est du même ordre de grandeur dans des régions homologues (régions soumises à la même pression de sélection). Lorsqu'un gène est présent dans une espèce, ses allèles acquièrent naturellement des mutations qui seront principalement des substitutions synonymes si des pressions de sélection s'exercent sur ce gène. Si un événement de spéciation se produit, ces substitutions vont s'accumuler dans chacune des nouvelles espèces indépendamment l'une de l'autre. Plus le temps passé depuis la divergence des espèces est important, plus la divergence entre les séquences des deux orthologues et donc le taux de substitution synonyme va être important (Li, 1993). Le fait que les gènes sur le chromosome Y ne puissent plus recombiner avec ceux qui sont sur le chromosome X les placent dans la même situation que s'ils étaient dans des espèces différentes. De cette façon, Lahn et Page ont montré que l'on pouvait distinguer quatre groupes de gènes sur le Y en fonction de leur degré de divergence avec leurs homologues sur le X. De façon intéressante, à chaque groupe correspond une région bien précise sur le chromosome X (figure 8). Lahn et Page ont ainsi émis l'hypothèse qu'il y avait 4 strates évolutives sur le Y qui seraient probablement le résultat de quatre événements d'inversion. L'arrêt de la recombinaison aurait ainsi commencé depuis la partie distale du bras q et se serait étendu en trois temps jusqu'à l'extrémité du bras p ne laissant que deux petites régions pseudoautosomales. Grâce aux valeurs de divergence obtenues, ils ont estimé que la strate la plus ancienne se serait formée entre 130 et 350 millions d'années. Si l'on garde l'hypothèse que les oiseaux et les mammifères ont vu leurs chromosomes sexuels apparaître de façon indépendante (Fridolfsson, 1998), les oiseaux et les reptiles ayant divergé des mammifères il y a environ 300 à 350 millions d'années (Kumar et Hedges, 1998), la première strate du chromosome Y se serait formée entre 240 et 320 millions d'années, juste après l'apparition des mammifères. Cette strate serait donc commune à toutes les sous-classes des protothériens aux métathériens. La seconde serait commune aux métathériens (marsupiaux) et euthériens (mammifères placentaires) et les deux dernières ne seraient retrouvées que chez les euthériens.

Depuis, on a retrouvé des degrés de divergence différents entre les gènes du X et du Y chez la souris (Sandstedt et Tucker, 2004) et le poulet (Lawson Handley et coll., 2004). Chez le poulet, l'ordre des gènes sur le chromosome W n'est pas connu. On ne sait donc pas si l'ordre des gamétologues est inversé entre Z et W. Par contre, ces résultats confirment le modèle d'un arrêt graduel de la recombinaison qui se serait étalé depuis la région de la détermination du sexe vers les extrémités télomériques des chromosomes.



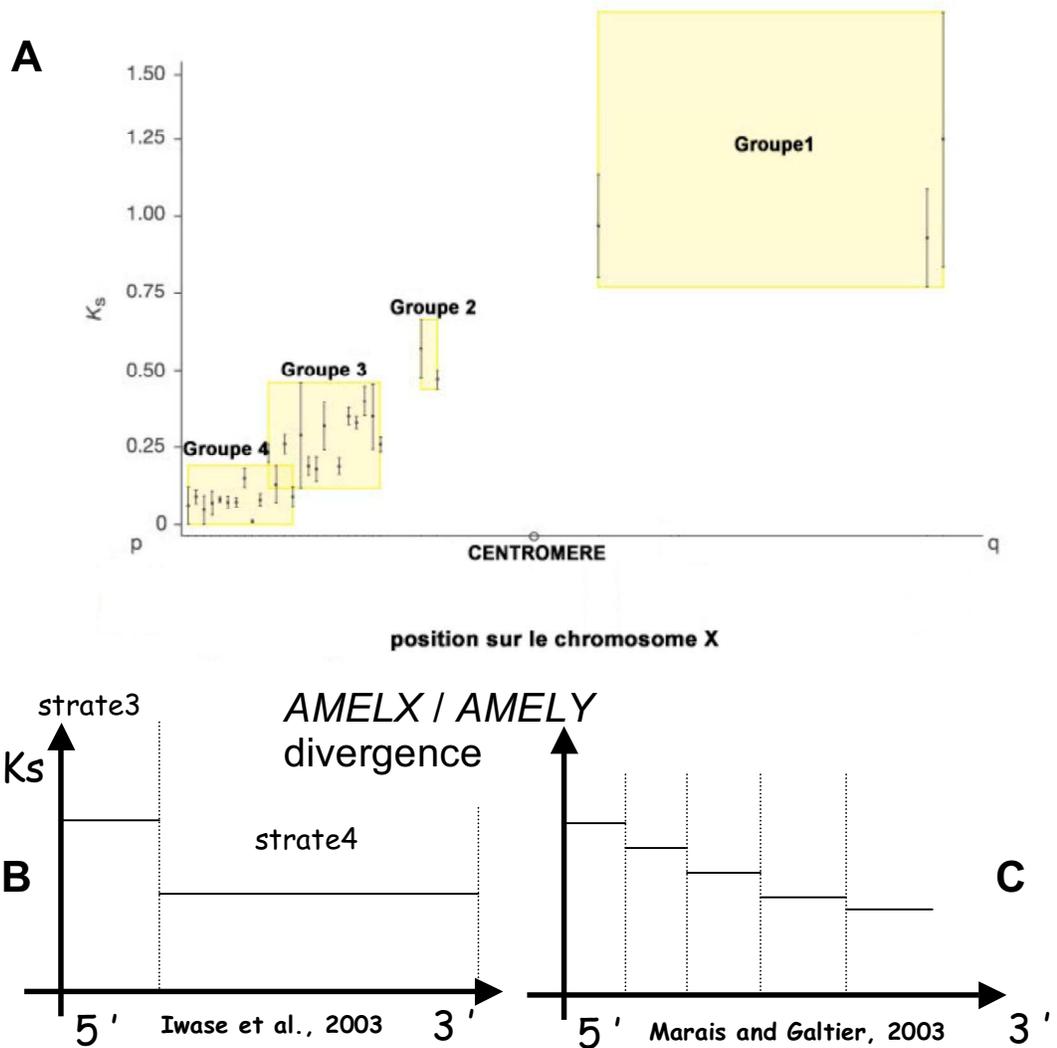
**Figure 8: Les strates évolutives reflètent l'arrêt de la recombinaison (Lahn et Page, 1999).**

Les calculs de divergence entre les gamétologues permettent d'estimer le temps depuis l'arrêt de la recombinaison. Ces calculs chez l'homme ont permis de montrer que l'arrêt se serait produit en quatre temps et depuis le bras q jusqu'à la région pseudo-autosomale (PAR) en partie distale du bras p. Les auteurs ont suggéré que ces « strates évolutives » pourraient bien être la conséquence de quatre événements d'inversion.

### 1.2.2 Les limites du modèle par strates

A l'heure actuelle, les seuls éléments en faveur d'un arrêt de la recombinaison par inversions successives sont ceux qui sont développés par Lahn et Page en 1999. Mais les inversions observées sont-elles des causes ou des conséquences de l'arrêt de la recombinaison ? Lahn et Page avaient utilisé les 19 paires de gènes disponibles à l'époque pour faire leur analyse. Depuis, le séquençage du chromosome Y a permis de poursuivre cette analyse en incluant 12 nouveaux gènes (Skaletsky et coll., 2003). Cette étude a permis de confirmer la corrélation entre le degré de divergence des gamétologues et la position sur le chromosome X et par conséquent l'extension de la zone non recombinante vers la région pseudoautosomale. Par contre, les frontières entre les strates paraissent moins marquées (figure 9A). Les strates 3 et 4 en particulier ne semblent en fait n'en faire plus qu'une. L'arrêt de la recombinaison semble avoir suivi à l'échelle du chromosome une progression plus continue et régulière que ce qui a été décrit par Lahn et Page en 1999. Les quatre strates observées ne seraient donc que le fruit d'une mauvaise résolution du fait d'un nombre insuffisant et d'une répartition non homogène des gamétologues. Dans ce cas, la progression quasi-linéaire est-elle le fruit d'une succession d'inversion plus fine ou d'autres facteurs sont-ils en cause ?

L'exemple du gène XG (antigène de groupe sanguin) chez l'homme est en faveur du modèle par inversions. Sur le chromosome X, il se situe à la frontière entre la région pseudo-autosomale du bras q et la région non recombinante. Sur le chromosome Y, le gamétologue est tronqué et seule la partie sur la région pseudoautosomale est présente (Ellis, 1994). Cette partie tronquée qui commence à la frontière entre la zone non recombinante et la région pseudo-autosomale pourrait bien être une conséquence d'une inversion. Les gènes qui se situent aux frontières entre les strates ne présentent pas tous cette caractéristique. Le gène de l'amélogénine (AMELX/AMELY) a été également bien étudié car il a été émis l'hypothèse qu'il se situerait sur la frontière entre les strates 3 et 4 définis par Lahn et Page en 1999 (Iwase et coll. 2001). Des analyses effectuées chez 8 mammifères dont l'homme ont ainsi montré qu'il y avait une grande différence dans le niveau de divergence entre la 5' et la 3' de ce gène (Iwase et coll., 2003 ; figure 9B). Ce résultat pourrait bien, à première vue, corroborer l'hypothèse d'une inversion qui aurait séparé ce gène en deux parties. Cependant le gamétologue AMELY n'est tronqué chez aucun de ces mammifères, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de l'inversion. Par contre, si l'extension de la zone non recombinante semble avoir été linéaire à l'échelle du chromosome d'après Skaletsky et collaborateurs, les résultats d'Iwase et de ses collaborateurs semblent eux montrer qu'à l'échelle du gène, on retrouve un arrêt stratifié de la recombinaison. Plus récemment, il a été montré que les alignements effectués par Iwase en 2003 pour calculer le degré de divergence entre les gamétologues AMELY ET AMELX n'avaient pas été effectués au mieux. Avec l'alignement corrigé, on retrouve une divergence qui diminue plus progressivement depuis la 5' vers la 3' de ces gamétologues (Marais et Galtier, 2003, figure 9C). Si ces résultats se confirment, l'hypothèse d'un étalement de la zone non recombinante par des événements d'inversion devient difficile à défendre, au moins pour le cas de l'homme.



**Figure 9: Remise en cause de l'existence des strates (Skaletsky et coll., 2003; Iwase et coll., 2003; Marais et Galtier, 2003).**

**A:** La fin du séquençage du chromosome Y humain a permis de caractériser de nouveaux gènes sur les chromosomes sexuels. Les analyses effectuées par Lahn et Page en 1999 (figure 8) ont ainsi été complétées. Les nouveaux résultats confirment la progression de l'arrêt de la recombinaison depuis le bras q vers la PAR du bras p. En revanche, l'existence de strates paraît plus incertaine, la frontière entre les groupes s'étant effacée avec l'addition des nouveaux gènes.

**B:** Des études de divergence effectuées sur les gamétologues *AMELX* et *AMELY*, qui se situent au niveau de la frontière entre la strate 3 et 4 de Lahn et Page, montrent une fracture entre la 5' et la 3' du gène, ce qui va dans le sens d'un arrêt stratifié.

**C:** Les nouveaux alignements et calculs effectués par Marais et Galtier sur *AMEL* montrent que l'arrêt s'est produit de façon plus progressive.

### 1.2.3 Quels autres mécanismes pour l'arrêt de la recombinaison ?

Si l'hypothèse des inversions ne se vérifie pas, il faut alors envisager l'existence de modificateurs supprimant la recombinaison. L'existence de ces supprimeurs pourrait expliquer que chez les drosophiles et les lépidoptères (les papillons), l'arrêt de la recombinaison concerne l'ensemble des chromosomes du mâle (Ellis et Goodfellow, 1989) comme si les supprimeurs agissaient de manière non spécifique. Quelle pourrait bien être la nature de ces modificateurs de la recombinaison ? On peut imaginer plusieurs possibilités non exclusives. Cette restriction de la recombinaison et surtout son étalement pourrait être la conséquence d'éléments transposables qui s'accumuleraient à la frontière des zones recombinante et non recombinante. Il est connu que les éléments transposables s'accumulent rapidement dès l'arrêt de la recombinaison. L'accumulation de séquences répétées se faisant plus rapidement que la perte de matériel génétique, ils empêcheraient alors les régions homologues de s'apparier à la méiose par perte d'homologie.

Des découvertes récentes permettent également d'émettre des hypothèses sur un lien entre l'inactivation des chromosomes sexuels et l'arrêt de la recombinaison. Chez les mammifères, les chromosomes sexuels XY sont inactivés au stade pachytène de la prophase I de méiose pour une raison qui reste inconnue (Lifschytz, 1972). Or, c'est à ce stade que les chromosomes s'apparient et forment les chiasmata. Ce phénomène appelé MSCI pour Meiotic Sex Chromosome Inactivation semble faire intervenir la protéine BRCA1 et l'histone  $\gamma$ -H2AX (Xu et coll., 2003 ; Fernandez Capetillo, 2003). Le plus intéressant est que ce mécanisme est déclenché par les bras non appariés. Ce mécanisme rappelle donc étrangement un autre phénomène nommé MSUD (Meiotic Silencing by Unpaired DNA) qui a été découvert chez *Neurospora crassa* (shiu et coll., 2001). On suppose que ce phénomène joue un rôle contre l'invasion de virus ou d'éléments transposables. Il a été identifié depuis chez *Caenorhabditis elegans* (Bean et coll., 2004) et semble également être présent chez la souris (Turner et coll., 2004 ; Turner et coll., 2005). Ce qui est intéressant, c'est que le mécanisme de MSCI est basé sur celui de MSUD chez la souris car les deux font intervenir les protéines BRCA1 et H2AX (Turner et coll., 2004 ; Turner et coll., 2005). Il a été montré que toute région chromosomique qui s'apparie illégitimement même chez la femelle de la souris est inactivée par ce complexe protéique. Cette inactivation des chromosomes sexuels à la méiose a amené certaines équipes à penser que ces mécanismes interviennent pour la compensation de dose (voir paragraphe 1.3.4) et pour "l'imprinting" des gènes (Huynh et Lee, 2003 et 2005). Mais elle pourrait bien être également liée à l'arrêt de la recombinaison (Mc Kee et Handel, 1993). Ce serait un bel exemple sur la façon dont l'évolution peut exploiter un mécanisme déjà existant pour créer une nouvelle fonction. Cela montre aussi à quel point les mécanismes d'arrêt de la recombinaison, de compensation de dose et "d'imprinting" peuvent être étroitement liés.

## 1.3 Les conséquences de l'arrêt de la recombinaison

### 1.3.1 Accumulation de séquences répétées

L'arrêt de la recombinaison a un impact important sur le chromosome Y. L'effet le plus rapide et le plus facilement détectable est certainement l'accumulation

de séquences répétées. En effet, il semble que, pour une région donnée, le nombre d'insertions d'éléments transposables soit proportionnel à la fréquence de la recombinaison (Langley et coll., 1988 ; Charlesworth B., 1994). Les différentes études sur les chromosomes sexuels fournissent de nombreux exemples en accord avec cette hypothèse. La taille des chromosomes Y de plantes est ainsi généralement plus importante par rapport à celle des chromosomes X, vraisemblablement à cause de cette accumulation d'éléments répétés (Parker, 1990). Les dernières études effectuées chez la papaye ont ainsi montré que la densité en rétroéléments de la région non recombinante du Y est augmentée de 27.6 % par rapport à la région correspondante sur le chromosome X et celle d'éléments hautement répétés de 188.9 % (Liu et coll., 2004). Chez *S. latifolia*, il semble également que ce soit le cas (Filatov, 2000). Chez les drosophiles, ce genre de constatation a été fait depuis longtemps (Steinemann et Steinemann, 1992, 1998 ; Charlesworth B., 1994 ; Bachtrog, 2003 ; Bartolomé et Masside, 2004). Chez *Drosophila miranda*, plus de 50 % du Y est ainsi constitué d'éléments transposables (Bachtrog, 2003). Dans le taxon des poissons, un enrichissement en éléments transposables du chromosome Y a également été mis en évidence chez le platy, le medaka et l'épinoche (Traut, 2001 ; Volff, 2002 ; Nanda, 2002 ; Peichel, 2004). Il en est de même chez les mammifères (Skaletsky, 2003).

Bien que cela soit encore discuté, l'accumulation d'éléments transposables peut être pris comme un premier signe de dégénérescence. En effet, chez les drosophiles, même s'ils n'interrompent généralement pas la fonction du gène du fait qu'ils s'intègrent le plus souvent hors des séquences codantes, il semble que les éléments transposables provoquent cependant la sous-expression des gènes sur le chromosome Y (Steinemann et Steinemann, 1992 ; Bachtrog, 2003). Il a été suggéré que cette sous-expression serait liée à des modifications de la chromatine par interférence d'ARN double brin (dsRNA interference) (Lippman et Martienssen, 2004).

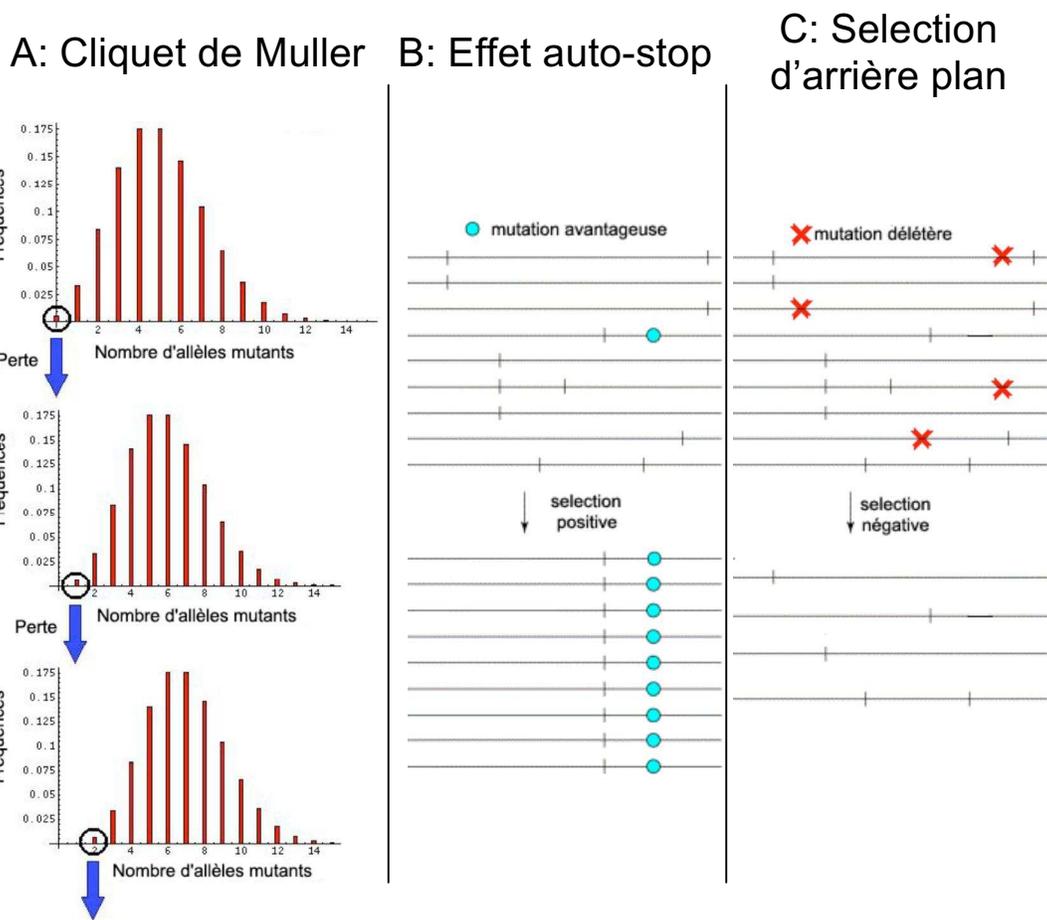
### 1.3.2 La dégénérescence du chromosome Y

La dégénérescence du chromosome Y et de ses gènes peut se produire même sans l'insertion de séquences répétées. Des modèles théoriques ont été élaborés pour rendre compte de l'effet de l'arrêt de la recombinaison sur les séquences d'ADN. Le modèle du cliquet de Müller (Müller, 1964 ; Felsenstein, 1974) explique ainsi que l'accumulation stochastique de mutations délétères récessives dans une région non recombinante est un processus continu. Les mutations permettant le retour à la séquence d'origine étant statistiquement rares, le processus est donc irréversible et chaque mutation constitue un « cran » du cliquet (figure 10A). Ce modèle démontre que la dégénérescence du chromosome Y peut être un processus progressif lent mais inéluctable. D'autres modèles comme l'effet auto-stop (Maynard Smith et Haigh, 1974 ; Rice, 1987) et la sélection d'arrière plan (Charlesworth B. et coll., 1993, Charlesworth B., 1994 ; Rice, 1996) réduisent le taux de polymorphisme dans les régions non-recombinantes soumises à une pression de sélection. L'effet auto-stop, encore appelé effet « coup de balai sélectif » montre que toute mutation avantageuse qui apparaît et est fixée par sélection positive permet la fixation avec elle des mutations neutres ou délétères dans les loci voisins (figure 10B). Tous les gènes sur le chromosome Y qui présentent un avantage pour le mâle vont ainsi permettre la fixation d'allèles délétères à des sites génétiquement proches.

Dans le cas de l'effet par sélection d'arrière plan, les allèles neutres ou faiblement avantageux sont éliminés s'ils sont liés génétiquement à des mutations délétères (figure 10C).

La littérature fournit de nombreux exemples illustrant cette dégénérescence. Une vitesse d'accumulation des substitutions synonymes voire non synonymes plus importante pour les gamétologues Y par rapport à ceux du X a notamment été observée chez les mammifères (Lahn et Page, 1999 ; Skaletsky, 2003), les oiseaux (Lawson Handley, 2004 ; Garcia Moreno et Mindell, 2000 ; de Kloet, 2001), les drosophiles (Steinemann et Steinemann, 1998 ; Bachtog, 2003, 2004) et les plantes (Filatov, 2002 ; Laporte et coll., 2005). Chez le poisson medaka cette différence a également été observée pour le gène de la détermination du sexe *DMY* (Zhang, 2004).

Une autre conséquence de cet arrêt de la recombinaison est l'hétérochromatisation des régions concernées. Ce phénomène se manifeste de plusieurs façons. Tout d'abord, la proportion en bases guanines et cytosines, qui normalement est importante dans les zones euchromatiques, diminue dans la région non-recombinante (bernardi, 1993 ; Kong, 2002 ; Montoya-burgos, 2003 ; Galtier, 2003). De plus, les régions non recombinantes s'appauvrissent considérablement en gènes. Ceux-ci sont soit délétés soit transformés en pseudogènes (Ohno, 1967 ; Charlesworth, 1991). Chez *S. latifolia*, une délétion d'une moitié de l'un des bras du chromosome Y n'a pour effet que de changer le phénotype floral, signe que ce chromosome ne doit pas être très riche en séquences codantes (Lardon et coll., 1999 ; Farbos et coll., 1999). Chez la papaye, la densité en gènes est diminuée de 37.7 % par rapport aux autosomes (Liu et coll., 2004). Chez *Drosophila miranda*, il a été montré qu'un grand nombre de gènes liés au chromosome Y sont devenus non-fonctionnels présentant des délétions jusqu'à 300 pb (bachtrog, 2003). Les meilleurs exemples sont ceux des chromosomes sexuels très anciens comme ceux des mammifères et des oiseaux. Le Y ou le W sont ainsi plus petits et largement hétérochromatiques (Bull, 1983 ; White, 1973 ; John, 1988, Schartl, 2004). Le séquençage des chromosomes X et Y humains a permis de montrer que le chromosome X possède 1098 gènes (Ross et coll., 2005) tandis que le chromosome Y contient 156 unités de transcription qui incluent 78 gènes codant des protéines (Skaletsky et coll., 2003).



**Figure 10: Les différents modèles théoriques pouvant expliquer la dégénérescence du chromosome Y.**

L'arrêt de la recombinaison entraîne une dégénérescence du chromosome Y. Il existe trois grands modèles théoriques pour l'expliquer.

**A:** Le modèle de Müller prédit que chaque apparition d'une mutation est comme un cran sur un cliquet, c'est à dire irréversible. On a donc une accumulation progressive des mutations, le nombre d'allèles mutants augmentant à chaque génération. La valeur du nombre d'allèles mutants le plus faible est ainsi de plus en plus forte.

**B:** L'effet auto-stop. Les lignes horizontales représentent les haplotypes. Une mutation avantageuse (point bleu) apparaît et est fixée par sélection positive, entraînant avec elle les autres variants neutres ou de faible conséquence qui lui sont liés. En l'absence de recombinaison, un tel balayage sélectif conduit à ce que tous les individus possèdent le même haplotype.

**C:** Dans le cas de la sélection d'arrière plan, les mutations délétères qui apparaissent sont éliminés par sélection négative éliminant ainsi les autres variants neutres ou de faible impacte qui leurs sont liés.

### 1.3.3 Vers la fin du chromosome Y ?

Lorsque l'on observe les effets irréversibles de la dégénérescence, on peut se demander si le chromosome Y n'est pas destiné à une fin tragique. Est-il inexorablement un désert fonctionnel en devenir ? Tout d'abord, les gènes de la détermination du sexe peuvent-ils disparaître ? A priori, il semble que ce soit le cas. Le gène SRY par exemple est le gène de la détermination du sexe chez tous les mammifères thériens (Graves, 1995), qu'ils soient placentaires (Gubbay, 1990) ou marsupiaux (Foster, 1992). Ce gène semble avoir été perdu en même temps que son chromosome Y chez deux espèces de petits rongeurs du genre *Ellobius* (Just, 1995). Chez *E. lutescens* les mâles et les femelles sont en effet de type XO, de type XX chez *E. tancrei* alors qu'ils sont de type XX/XY chez *E. fuscocapillus*. Un nouveau système de détermination du sexe a dû se mettre en place chez les deux premières espèces. Il semble que le chromosome Y ait également été perdu chez certaines espèces de drosophiles. Ce doit être en particulier le cas de *D. affinis* dont le génotype des mâles est de type XO (Voelker, 1971). Ces résultats semblent bien montrer que le chromosome Y est condamné. Des prédictions annonçaient même la fin de l'espèce humaine ou une explosion de la spéciation des hominidés dans 5 à 10 millions d'années suite à la disparition du gène SRY (Graves, 2002).

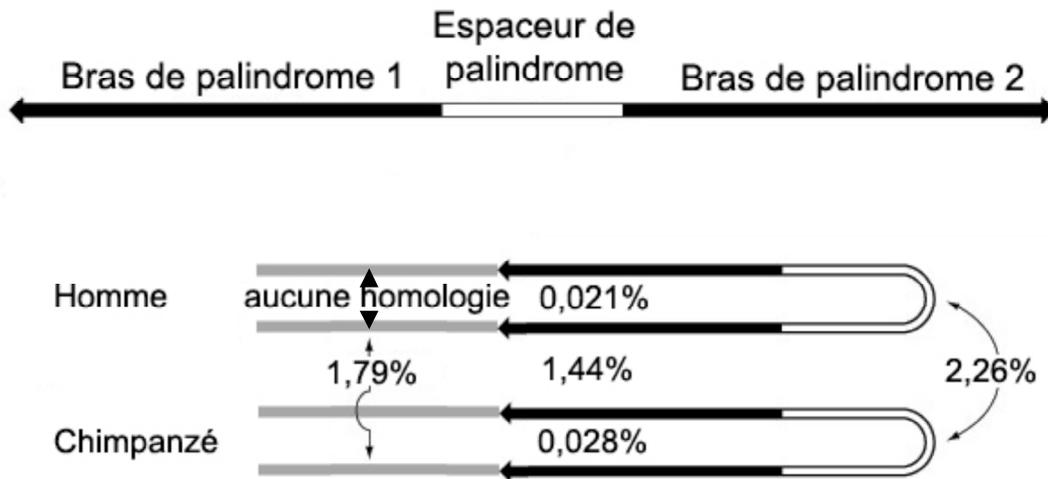
#### 1.3.3.1 Les translocations compensent la perte de matériel génique

Il semblerait que des systèmes de compensation existent qui pallient cette usure du chromosome Y. Des translocations depuis des autosomes vers les chromosomes sexuels ont été rapportées chez de nombreuses espèces. C'est tout particulièrement le cas chez de nombreuses espèces de drosophiles chez qui les chromosomes sexuels dégénèrent dans un temps relativement court. Différents événements indépendants de translocations semblent s'être produits dans les sous-groupes *Drosophila hydei*, *melanogaster* et *pseudo obscura* (Bachtrog et Charlesworth B., 2002). Ces translocations ont dû affecter à la fois les chromosomes X et Y. Un tel événement semble également s'être produit chez les mammifères euthériens qui possèdent en effet une région sur leurs chromosomes sexuels qui est autosomale chez les marsupiaux et les monotremes (Graves, 1995 ; Waters, 2001). Cette région a donc été rajoutée aux chromosomes X et Y il y a une centaine de millions d'années tandis qu'elle est restée autosomale chez les autres mammifères. C'est cette région qui est homologue au chromosome 1 du poulet (Schmid, 2000).

#### 1.3.3.2 La conversion génique

Comme on l'a vu précédemment, en plus des gènes de la détermination du sexe, il existe sur la partie du chromosome Y (ou W) définie comme non recombinante des gènes qui sont avantageux pour le mâle. Ces gènes sont très souvent dupliqués et existent en un grand nombre d'exemplaires sur le chromosome Y formant ainsi des régions dites ampliconiques. Chez l'homme le séquençage de ce chromosome a permis de montrer que ces régions ampliconiques forment 8 palindromes et représentent 25 % de l'euchromatine du chromosome Y (Skaletsky et coll., 2003). Ces régions contiennent beaucoup de gènes spécifiques des testicules (Skaletsky et coll., 2003). Ces palindromes sont étonnamment longs puisqu'ils font de 9kb à 1.5Mb. Les bras appariés sont séparés par des espaceurs non dupliqués de 2 à 170kb. D'après des calculs basés sur la théorie de l'horloge moléculaire, il a

été estimé que la duplication du gène *DAZ* située sur les palindromes P1 et P2 daterait de 200 000 ans (Agulnik et coll., 1998). Or, de multiples copies du gène *DAZ*, liés également au chromosome Y et présentes sur les mêmes palindromes, ont été identifiées chez de nombreuses espèces de singes (Agulnik et coll., 1998 ; Reijo et coll., 1995 ; Glaser et coll., 1998 ; Makova et Li, 2002). Ces duplications dateraient donc d'avant la divergence entre ces espèces, c'est-à-dire il y a plus de cinq millions d'années. Il y a donc une incohérence entre le temps d'évolution estimé et le temps réel. La divergence est plus faible que ce qu'elle devrait être. Cela pourrait correspondre à des événements de conversions géniques se produisant sur chacun des palindromes (Szostak et coll., 1983). Ces phénomènes de conversion permettraient en effet aux deux bras de chaque palindrome d'évoluer de concert et seraient donc en mesure de réduire la vitesse d'évolution de ces séquences palindromiques. Il a de plus déjà été montré que la recombinaison intrachromosomique par conversion génique était possible (Jackson et Fink, 1981). Des études comparatives ont ainsi été menées entre le chimpanzé et l'homme (Rozen et coll., 2003). La moyenne de divergence entre les deux bras est de 0.021 % pour l'homme et de 0.028% pour le chimpanzé (figure 11). La divergence moyenne pour chaque type de palindrome est de 1,44%, contre 2,26% pour les espaceurs et 1,79% pour les régions flanquantes. La fréquence de ces conversions est donc assez importante pour qu'il y ait une faible différence entre les bras. Cette fréquence doit permettre un équilibre entre les nouvelles mutations qui créent des différences entre les bras et les conversions géniques qui les font disparaître. On ne sait pas encore si ces recombinaisons se produisent pendant la mitose, la méiose ou les deux (Rozen et coll., 2003), mais elles constituent un formidable mécanisme de maintien des gènes importants pour la fonction mâle et du chromosome Y lui-même. Par conséquent, il apparaît que le terme « région non recombinante » (NRY) n'est pas approprié. Ce nom a été remplacé par le terme « région mâle spécifique » (MSY ; Skaletsky et coll., 2003 ; Rozen et coll., 2003).



**Figure 11: Comparaison des divergences entre les palindromes des chromosomes Y humains et de chimpanzés.**

Les palindromes sont de longues séquences répétées inversées qui sont séparées par un espaceur. Chez l'homme, la divergence moyenne entre les bras est de 0,021% et de 0,028% chez le chimpanzé. Entre l'homme et le chimpanzé, la divergence moyenne entre chaque type de palindrome est de 1,44% contre 2,26% pour les espaceurs et de 1,79% pour les séquences flanquantes.

#### 1.3.4 La compensation de dose

La perte de gènes sur le chromosome Y se répercute également sur le chromosome X. En effet, si les gamétologues Y de certains gènes ont été perdus, le mâle se retrouve alors avec un seul exemplaire de ces gènes, les gamétologues X, alors que la femelle en porte toujours deux. Des mécanismes nommés mécanismes de « compensation de dose » ont été mis en évidence. Ceux-ci permettent de restituer chez le mâle pour chaque gène un niveau d'expression équivalent à celui de la femelle. Il existe deux moyens d'effectuer la compensation de dose (figure 12). Le premier consiste à doubler le niveau d'expression des gènes portés par le chromosome X chez le mâle par rapport à la femelle. Le deuxième diminue le niveau d'expression des gènes du X chez la femelle.

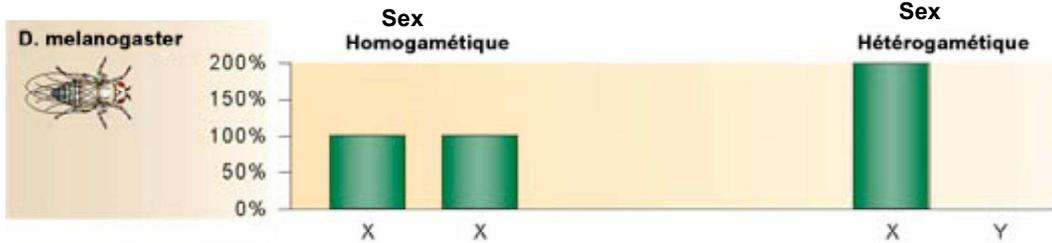
C'est Mary Lyon qui la première a mis en évidence la compensation de dose chez la souris en 1961. Chez cette espèce, la compensation agit en inactivant complètement un chromosome X chez la femelle. C'est donc un cas extrême de sous-expression du chromosome X chez la femelle. Cette inactivation d'un chromosome X semble être commune à tous les mammifères, tout au moins thériens (Lyon, 1974 ; Richardson, 1971 ; Sharman, 1971). Chez les euthériens, l'un des chromosomes X est aléatoirement inactivé alors que pour les métathériens c'est systématiquement le X provenant du père qui est inactivé (Cooper, 1993 ; figure 12C). Dans la nature, c'est ce qui fait notamment que les chats calicots (chats à trois couleurs) sont obligatoirement des femelles. Le gène codant la couleur du pelage est sur le chromosome X alors que celui codant un pelage blanc est autosomal. Si la femelle est hétérozygote pour le gène de la couleur, dans chaque région, suivant le X inactivé on aura l'une ou l'autre des deux couleurs, en plus des parties blanches ne faisant pas intervenir ce locus.

Une inactivation du chromosome X n'a pas encore été démontrée dans la sous-classe des monotrèmes, mais elle est largement suspectée puisqu'il a été mis en évidence de la compensation de dose chez l'ornithorynque (Grützner, 2003). Les mécanismes moléculaires de la compensation de dose ne sont pas encore bien compris. Il semble cependant qu'ils soient cordonnés à partir d'une région sur le chromosome X appelée le centre d'inactivation du X (XIC ; Lyon, 1996). Ce centre serait la source de transcription d'un ARN simple brin non codant (XIST) qui s'enroulerait autour du chromosome comme un manteau ce qui déclencherait son inactivation (Clemson, 1996). Le chromosome prendrait alors une forme hautement condensée qui est connue en microscopie sous le nom de corps de Barr (Bennett, 1963). Chez les mammifères, cette forme hypercondensée du chromosome est une conséquence de la modification covalente de l'ADN et des histones (Jenuwein et Allis, 2001). L'ADN est méthylé et les histones hypoacétylés et méthylés, mais le rôle de l'ARN XIST dans ces modifications est très mal connu. Il semblerait également que les éléments transposables de type L1 soient nécessaires à l'inactivation (Lyon, 1998). De façon intéressante, il a également été montré que l'inactivation du chromosome X chez les mammifères était liée à la date d'arrêt de la recombinaison. En effet, un certain nombre de gène échappe à l'inactivation du chromosome X et cette proportion est liée à la position sur le chromosome et à l'appartenance aux strates (Carrel et Willard, 2005).

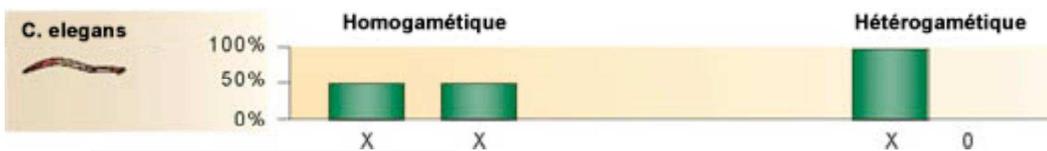
Le ver *Caenorhabditis elegans* montre quant à lui un autre type de compensation de dose par sous-expression des gènes sur les deux chromosomes X (figure 12B). Le niveau d'expression des gènes est diminué de moitié chez la femelle (caryotype XX) pour avoir un niveau d'expression équivalent à l'hermaphrodite (caryotype XO). Le mécanisme ici fait intervenir un complexe multiprotéique qui s'assemble sur les deux chromosomes chez la femelle provoquant la sous-expression (Chuang, 1994).

Chez la drosophile, la compensation de dose s'effectue quant à elle par suractivation du chromosome X chez le mâle (figure 12A). Ce procédé fait appel à un complexe ribonucléoprotéique appelé compensasome et qui inclut les protéines MSL « Male Specific Lethal » (Lucchesi, 1996 ; Amstrong et Emerson, 1998 ; Peterson et Logie ; 2000). Ce complexe tient son nom du phénotype létal associé aux mutations d'au moins un de ses gènes. Il comprend une des hélicases ATP-dépendantes qui doivent probablement rendre plus accessible la chromatine aux facteurs de transcription (Eisen et Lucchesi, 1998).

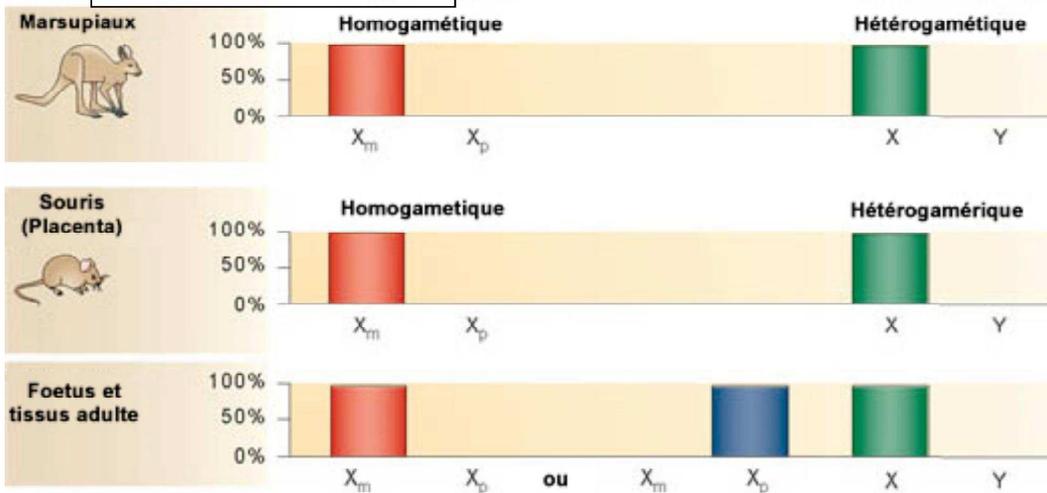
## A Hypertranscription



## B Hypotranscription



## C inactivation du X



### Figure 12: Les différents mécanismes de compensation de dose.

La compensation de dose permet d'égaliser les niveaux d'expression des gamétologues X chez le mâle et chez la femelle après perte des gamétologues Y. Il existe différents moyens pour arriver à l'équilibre: soit une sur-expression des gamétologues X chez les mâles comme pour la drosophile (A), soit une sous-expression des deux gamétologues X chez la femelle comme chez *C. elegans* (B). Chez les mammifères, l'un des chromosomes X est complètement inactivé chez la femelle. Chez les marsupiaux, c'est systématiquement le chromosome X paternel. Chez les mammifères placentaires, le X paternel est inactivé pendant le développement embryonnaire précoce puis, dès le stade foetal, le choix du chromosome devient aléatoire.

## 2 LE DEVELOPPEMENT FLORAL ET LA MISE EN PLACE D'UN DIMORPHISME SEXUEL

Les espèces de plantes à fleurs hermaphrodites portent dans chaque fleur les organes mâles, les étamines, et les organes femelles, les carpelles. C'est notamment le cas des espèces modèle *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* et *Petunia hybrida* qui sont le plus fréquemment utilisées en biologie du développement. Les espèces dioïques présentent des fleurs unisexuées mâles ou femelles portées par des plants distincts. C'est par exemple le cas de *Silene latifolia*, espèce sur laquelle j'ai travaillé pendant ma thèse. Ces espèces dioïques semblent toutes être potentiellement hermaphrodites dans les premiers stades de leur développement (Ainsworth et coll., 1998) ce qui suggère qu'elles proviennent d'espèces hermaphrodites ancestrales (Darwin, 1877, Westergaard, 1958). Les espèces dioïques ont dû acquérir au cours de l'évolution des mutations qui leur ont permis de développer des fleurs unisexuées. Quelles sont les voies du développement floral qui ont été modifiées chez *S. latifolia* pour aboutir au dimorphisme sexuel ? Le but de cette deuxième partie est de mieux comprendre le développement floral tel qu'il est connu chez les espèces modèles hermaphrodites afin de mieux appréhender le choix des gènes candidats que nous avons identifiés puis analysés chez *S. latifolia*.

### 2.1 Le développement végétal : organogenèse à partir des méristèmes

#### 2.1.1 Introduction au développement végétal

Le développement des plantes à fleurs diffère en plusieurs points de celui des animaux. Par exemple, les cellules végétales étant entourées d'une paroi rigide, il n'existe pas de migration cellulaire comme on en observe durant les stades embryonnaires chez les animaux. L'identité des cellules n'est également pas définie en fonction de leur lignage mais en fonction de leur position. Chaque cellule végétale qui, par pression physique lors des divisions cellulaires, est expulsée d'une région est en mesure de se différencier pour retrouver une nouvelle identité suivant celle de la nouvelle région à laquelle elle appartient. Une dernière différence importante concerne le développement lui-même. Contrairement aux animaux où l'organogenèse s'effectue seulement pendant la vie embryonnaire et fœtale, les plantes à fleurs ont en effet la capacité de produire de nouveaux organes tout au long de leur vie. Ceux-ci sont produits à partir de structures bien particulières, les méristèmes.

Au stade embryonnaire deux types de méristèmes se mettent en place. Le premier va être à l'origine de tous les tissus souterrains, c'est le méristème racinaire et le deuxième va permettre la production de tous les organes aériens, c'est le méristème apical caulinaire (MAC). Pendant la période juvénile de la plante, le MAC ne va produire que des organes végétatifs, c'est-à-dire des feuilles et des méristèmes axillaires eux-mêmes à l'origine de tiges secondaires et de nouvelles feuilles. A la floraison, la plante passe à une phase de développement reproductif, le MAC produit alors des méristèmes d'inflorescence (MI) qui vont à leur tour produire les méristèmes floraux (MF).

La bonne compréhension de la production des organes reproducteurs par le méristème floral nécessite tout d'abord de bien comprendre le fonctionnement des MAC avec lequel il partage un grand nombre de similitudes et pour lequel la bibliographie est plus importante.

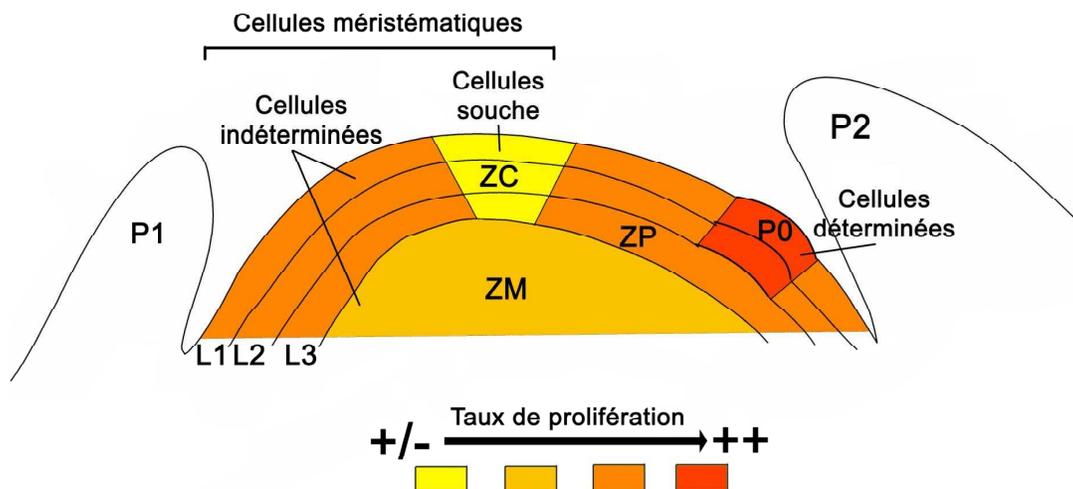
## 2.1.2 Organisation d'un méristème apical caulinaire

### 2.1.2.1 La structure

Le méristème apical possède deux fonctions essentielles: produire des organes et avoir la capacité de se maintenir jusqu'à la mort de la plante. L'organisation de ce méristème doit donc lui permettre de remplir ces deux fonctions (pour revue Steeves et Sussex, 1989, Lyndon, 1998, Vernoux, 2000). On parle alors de méristème indéterminé car il produit un nombre illimité d'organes.

En coupe transversale, le MAC des Angiospermes dicotylédones permet de distinguer trois assises cellulaires (figure 13). Les assises L1 et L2 sont constituées chacune d'une couche de cellules alignées et forment la tunica du méristème. Les divisions dans ces deux couches sont essentiellement anticlines (selon un plan perpendiculaire au méristème). Dans les régions où sont initiés les primordia, quelques divisions périclines (dans un plan parallèle au méristème) au niveau de l'assise L2 sont alors observées, ce qui va se traduire par un aspect bombé de la zone concernée. L'assise L3 quant à elle est formée de plusieurs couches cellulaires et forme le corpus, caractérisé par des plans de division variables.

Selon la structure histologique et le taux de prolifération des cellules, il est également possible de distinguer trois régions (figure 13). La zone centrale est située au sommet du méristème. Elle est constituée de cellules cubiques, vacuolisées, d'assez grande taille et présente un taux de prolifération cellulaire faible. C'est cette zone qui permet au MAC de maintenir une taille constante en maintenant un équilibre entre les cellules qui participent à la formation des primordia et le renouvellement des cellules méristématiques. La zone périphérique est adjacente à la zone centrale. Elle est constituée de cellules cubiques de petite taille très peu vacuolisées et dont le taux de prolifération est important. C'est dans cette zone qu'émergent les primordia. Les cellules qui sont recrutées pour leur formation voient leur taux de prolifération largement augmentée. La zone médullaire est quant à elle constituée de cellules plus aplaties, peu vacuolisées, alignées verticalement et dont le taux de prolifération est généralement intermédiaire entre celui des zones centrale et périphérique. Toutes les cellules présentent dans ces trois zones sont dites méristématiques.



**Figure 13: Organisation et fonctionnement du méristème apical.**

Les méristèmes comprennent trois assises cellulaires (L1 à L3) et trois zones (centrale, périphérique et médullaire). La zone centrale (ZC) contient les cellules souche. C'est la zone qui présente le plus faible taux de prolifération. Lors des divisions, les cellules souche filles sont poussées hors de la zone centrale. Elles prennent alors l'identité de cellules de la zone périphérique (ZP) ou médullaire (ZM) et commencent à proliférer plus fortement. Localement, les cellules de la zone périphérique peuvent être recrutées pour former un nouveau primordia (P0). Pendant ce temps, les anciens primordia (P1, P2) continuent de se développer. Les assises L1 et L2 sont constituées d'une seule couche de cellules et forment la *tunica*. La couche L3 est composée de plusieurs couches et forme le *corpus*. Les cellules des zones centrale, périphérique et médullaire sont dites méristématiques alors que celles des primordia sont dites déterminées.

2.1.2.2 Le fonctionnement

La zone centrale constitue la réserve en cellules de tout le méristème. C'est elle qui alimente les deux autres zones. La taille de cette zone est maintenue constante pour permettre au méristème de garder son caractère indéterminé. Bien que cela soit contestable du fait que toute cellule végétale est capable de se différencier, les cellules de la zone centrale portent le nom de cellules souche. A chaque division cellulaire, les nouvelles cellules formées vont pousser hors de la zone centrale les cellules les plus en périphérie. Comme nous l'avons vu, l'identité des cellules dépend de leur position. Une fois éjectées mécaniquement de la zone centrale vers la zone périphérique ou médullaire, les cellules commencent à proliférer. Cette prolifération permet à la zone périphérique de produire suffisamment de cellules pour que de nouveaux primordia se forment. La zone périphérique voit ainsi sa taille régulièrement varier. A chaque nouvelle initiation, sa taille est réduite au minimum. Une fois que sa taille est revenue à son maximum, de nouveaux organes se forment. Dans la zone médullaire, les cellules servent à la croissance en longueur de la plante.

## 2.2 Principe du fonctionnement du méristème apical caulinaire

### 2.2.1 Définition de l'identité du méristème

Comme nous venons de le voir, le développement des organes aériens requiert la présence d'un méristème. L'identité des cellules méristématiques du MAC leur est conféré par des déterminants moléculaires, indispensables pour que le méristème existe. L'un de ces déterminants clés du méristème apical chez *A. thaliana* semble bien être le gène *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. Les individus portant une mutation forte de ce gène ne développent aucun méristème visible durant le stade embryonnaire (Barton et Poethig, 1993 ; Long et coll., 1996). Dans le cas de mutations faibles de *STM*, le MAC se met en place, mais les cellules méristématiques finissent par se différencier et sont rapidement consommées pour former des organes. Ce gène semble donc être impliqué dans l'initiation et le maintien du MAC (Endrizzi et coll., 1996). Il appartient à une famille de gènes portant un homéodomaine appelé KNOX (knotted-like homeobox ; Long, 1996). Des analyses d'hybridation *in situ* ont montré que ce gène était exprimé dans toutes les cellules méristématiques, c'est-à-dire les cellules des zones centrales, périphériques et est exclu des cellules des primordia. D'autres gènes de la famille KNOX agissent de façon redondante pour définir l'identité du méristème. C'est notamment le cas des gènes *KNAT1* (ou *BREVIPEDICELLUS, BP*) et *KNAT2* dont le patron d'expression est, de façon cohérente, proche de celui de *STM* (Dockx, 1995 et coll. ; Lincoln, 1994, Chuck, 1996).

Les gènes de la famille KNOX ne sont cependant pas les seuls gènes intervenant dans le maintien de l'identité du MAC. Un autre gène a en effet été identifié récemment chez *Petunia hybrida*. Il s'agit du gène *HAIRY MERISTEM (HAM)*. Chez les mutants *ham*, le méristème cesse de former des organes après production de quelques feuilles et se différencie (Stuurman et coll., 2002). Les analyses de ces mutants ont montré que le gène *STM* cessait de s'exprimer. Le gène *HAM* agirait donc en amont de *STM* pour conférer l'identité au MAC. Les analyses *in situ* ont montré que *HAM* s'exprime dans les couches profondes de la L3, dans les tissus pré-vasculaires du méristème ainsi que dans la partie interne des primordia. N'étant pas transcrit dans toutes les cellules méristématiques, il doit probablement agir à distance, de façon non-cellule autonome.

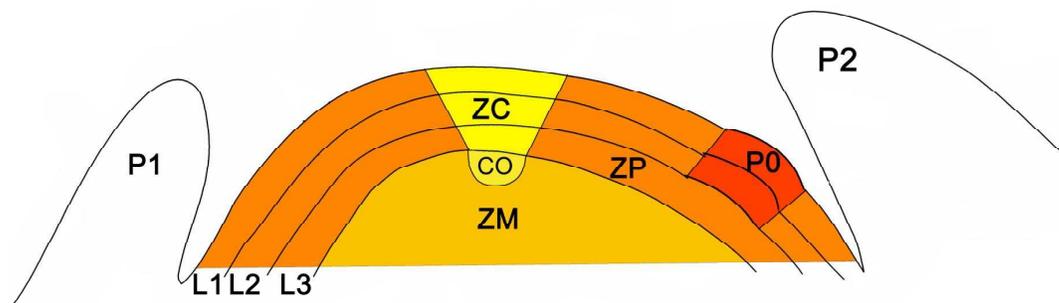
### 2.2.2 Le maintien des cellules souche

Le maintien de l'expression des gènes *STM*, *KNAT1* et *KNAT2* est la première condition pour que le MAC se maintienne. Etant donné qu'ils s'expriment dans les trois zones du méristème, ils ne peuvent pas agir spécifiquement pour maintenir la zone centrale. D'autres gènes doivent donc être impliqués.

#### 2.2.2.1 Le centre organisateur maintient les cellules souche

Il y a une dizaine d'années, un gène dont la mutation provoque également des défauts dans le fonctionnement des méristèmes a été isolés chez *A. thaliana*. Les mutations dans le gène *WUSCHEL (WUS)* provoquent en effet la formation de façon répétée et aléatoire de méristèmes végétatifs défectueux qui se terminent

prématurément (Laux et coll., 1996). La morphologie du méristème est également altérée. La zone centrale perd sa forme convexe et devient plus allongée et aplatie. En microscopie électronique, les cellules souche deviennent indistinguables des cellules de la zone périphérique. Ces résultats montrent que le gène *WUS* n'interviendrait pas pour l'initiation du méristème mais pour son maintien en contrôlant la zone centrale. En son absence, les cellules souche restent méristématiques, mais se différencient en cellules de la zone périphérique. En absence de renouvellement par les cellules souches, les cellules de la zone périphérique sont rapidement consommées lors de la formation des primordia. Ne pouvant plus produire de nouveaux organes, le méristème s'arrête alors. Cet arrêt provoque la formation d'un nouveau méristème pour le remplacer, mais qui est lui aussi défectueux. Les hybridations *in situ* montrent que ce gène s'exprime au centre du méristème, dans les couches de cellules situées juste au-dessous de la zone centrale (Mayer et coll., 1998). *WUS* agit donc lui aussi de façon non-cellule autonome. L'importance de *WUS* a amené à définir sa zone d'expression comme le centre organisateur (figure 14). C'est lui qui permettrait au MAC d'avoir un fonctionnement indéterminé.



**Figure 14: Le centre organisateur contrôle le maintien des cellules souche.**

Le domaine d'expression du gène *WUS* définit le centre organisateur (CO). Il est situé sous la zone centrale (ZC) et au niveau de la zone médullaire (ZM). C'est le centre organisateur qui permet le maintien de la zone centrale.

#### 2.2.2.2 Les gènes *CLAVATA* limitent la taille de la zone centrale

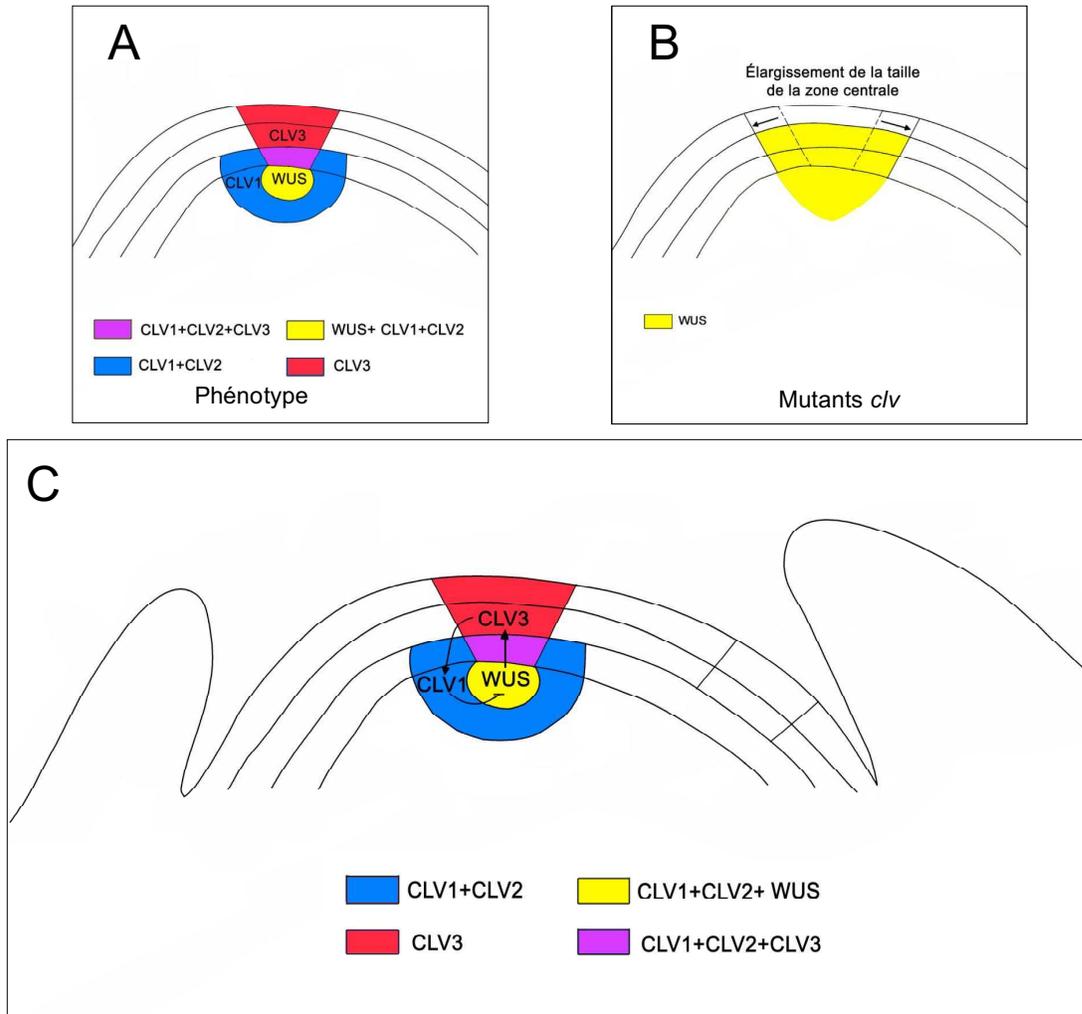
Un groupe de mutants présentant un phénotype opposé à celui de *wus* et *stm* a été isolé chez *A. thaliana*. Ces mutants *clavata* (*clv*) présentent une augmentation anormale de la taille de la zone centrale ce qui se traduit par la production d'un plus grand nombre d'organes latéraux (Clark et coll., 1993 ; Kayes et Clark, 1998). Cette augmentation du nombre de cellules souche pouvait être due soit à une augmentation du taux de prolifération des cellules méristématiques soit à un élargissement de la zone centrale. Des études portant sur l'index mitotique (rapport du nombre de cellules en mitoses par rapport au nombre total de cellules) dans le méristème de la plante sauvage et de plusieurs mutants *clv* a permis de montrer que

le taux de prolifération cellulaire au niveau des méristèmes est moins élevé chez les mutants *clv* que chez la plante sauvage (Laufs, 1998). Les cellules n'ont donc pas augmenté leur taux de prolifération chez les mutants *clv*. C'est donc l'étendue de la zone centrale qui est affectée par les mutations.

Ces mutations concernent trois loci et les analyses des doubles mutants ont montré que ces gènes agissent dans la même voie de développement (pour revue Clark, 2001). Le gène *CLAVATA1* (*CLV1*) code un récepteur kinase (Clark et coll., 1997) et le gène *CLAVATA2* (*CLV2*) un récepteur de la famille *CLAVATA1*, mais sans domaine kinase intracellulaire (Jeong et coll., 1999). Le gène *CLAVATA3* (*CLV3*) code un petit polypeptide qui est en fait le ligand des protéines *CLV1* et *CLV2* (Trotochaud et coll., 2000). Le gène *CLV3* est exprimé dans les cellules souche dont il sert de marqueur (figure 15A) et les gènes *CLV1* et *CLV2* dans les cellules situées sous les cellules souche dans une région qui englobe le centre organisateur (Clark, 1997 et coll. ; Jeong et coll., 1999 ; Fletcher et coll., 1999). Ces gènes qui s'expriment dans ou à proximité des cellules souche agiraient pour limiter l'étendue de la zone centrale.

### 2.2.2.3 Le centre organisateur et la zone centrale s'autorégulent

Le gène *WUS* semble promouvoir le maintien des cellules souche alors que les gènes *CLV* agissent pour limiter leurs nombres. Des analyses génétiques utilisant des doubles mutants *wus clv* ont été effectuées pour déterminer s'il existait un lien entre ces deux groupes de gènes. Le phénotype est indistinguable de celui du simple mutant *wus* (Schoof et coll., 2000). Cette épistasie semble donc indiquer que les gènes *WUS* et *CLV* interviennent dans la même voie de régulation. Ce résultat a été confirmé par des analyses *in situ* qui montrent que le domaine d'expression de *WUS* est plus large dans les mutants *clv* que dans le sauvage (figure 15B ; Schoof et coll., 2000). Les gènes *CLV* contrôlèrent donc le domaine d'expression de *WUS* et de cette façon contrôlèrent l'étendue de la zone centrale attribuée aux cellules souche. Par ailleurs, les expériences d'expression du gène *WUS* sous contrôle du promoteur du gène *CLV1* ont permis de mettre en évidence une surexpression de *CLV3*. Le gène *WUS* qui définit le centre organisateur maintiendrait la présence des cellules souche dans les assises supérieures et activerait de cette manière le gène marqueur des cellules souche *CLV3* qui viendrait réprimer l'expression de *WUS* vraisemblablement *via* les récepteurs *CLV1* et 2 (figure 15C). Ce système dynamique d'autorégulation permettrait de garder une quantité stable de cellules souche tout au long du développement et par là même, une homéostasie.



**Figure 15: Boucle de rétrocontrôle *WUS-CLV*.**

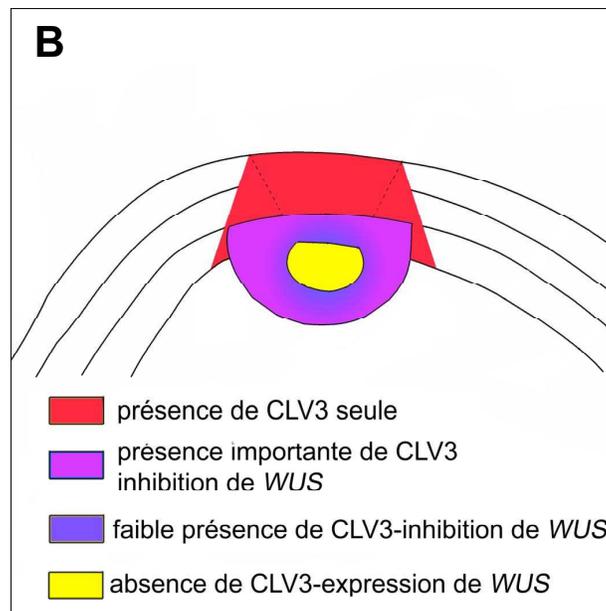
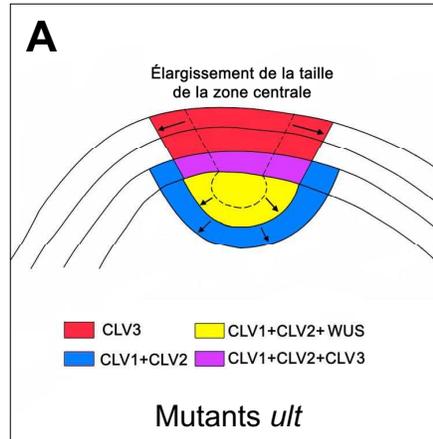
**A:** Chez les plantes sauvages, le gène *WUSCHEL* (*WUS*) s'exprime dans une zone (en jaune) située sous la zone centrale qui exprime *CLV3* (en rouge). Les gènes *CLV1* et *CLV2* s'expriment dans une zone qui inclut celle de *WUS* (en bleue).

**B:** Chez les mutants *clavata* (*clv*), le domaine d'expression de *WUS* s'élargit considérablement. Son domaine d'activité est plus important et la taille de la zone centrale augmente.

**C:** La protéine *WUS* agit pour conférer l'identité des cellules souche dans les couches cellulaires situées au dessus de son domaine d'expression. Le ligand *CLV3* migre alors depuis la zone centrale vers les couches cellulaires en dessous et se fixe sur le complexe de récepteurs *CLV1* et *CLV2* ce qui active un mécanisme d'inhibition de l'expression de *WUS*.

#### 2.2.2.4 Le mécanisme de l'autorégulation

Comme nous l'avons vu, il n'existe pas de colocalisation cellulaire stricte de *WUS* et des gènes *CLV*. Cependant, toutes les cellules qui expriment *WUS* expriment également *CLV1* et *CLV2*. Comment l'expression de *WUS* est-elle possible si ses inhibiteurs sont présents ? Un autre mutant intervenant dans la même voie que les gènes *WUS* et *CLV* a permis de fournir quelques éléments de réponses. Les mutations dans les gènes *ULTRAPETALA1 (ULT1)* ou *ULTRAPETALA2 (ULT2)* entraînent une augmentation de la taille du méristème et du nombre d'organes (figure 16A ; Fletcher, 2001 ; Carles et coll., 2005). Des hybridations *in situ* ont montré que ce phénotype était corrélé à une augmentation du domaine d'expression de *CLV1* qui se manifesterait dans un deuxième temps par une augmentation du domaine d'expression de *WUS* et finalement par celui de la zone de cellules souche. Ces dernières mutations ont donc permis d'élaborer un modèle où la taille du domaine d'expression de *WUS* dépend de l'étendue du champ d'action de *CLV3*. Dans ce modèle, une fois les protéines *CLV3* sécrétées hors de la cellule, elles se répandraient tout autour. Les premières couches de cellules exprimant les récepteurs *CLV1* et *CLV2* à leur surface fixeraient la majorité (75 %) des protéines *CLV3*, ce qui inhiberait l'expression de *WUS* (figure 16B). La quantité de ligand en mesure d'activer les récepteurs diminuerait progressivement avec la progression vers les couches plus internes exprimant *CLV1* et *CLV2* formant un gradient décroissant. Le nombre de protéines *CLV3* finirait pas devenir nul permettant l'expression de *WUS*. Ainsi, plus le domaine de *CLV1* et *CLV2* serait large, plus la fixation de *CLV3* serait précoce ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la taille du domaine de *WUS* et donc du nombre de cellules souche. Ce modèle a depuis été confirmé en microscopie confocale à l'aide de ligand *CLV3* couplé avec la protéine fluorescente GFP (Lenhard et Laux, 2003).



**Figure 16: Mécanisme de la boucle de rétrocontrôle.**

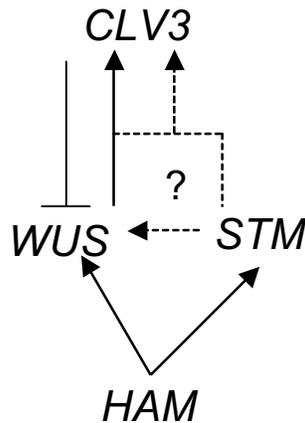
**A:** Dans les mutants *ultrapetala1 (ult1)* et *ult2*, le domaine d'expression de *CLV1* (en bleu) est élargi sans que l'expression de *CLV3* augmente. De cette façon, le domaine d'expression de *WUS* et, par conséquent, la taille de la zone centrale augmente.

**B:** Toutes les cellules exprimant *WUS* présentent les récepteurs *CLV1* et *CLV2* à leur surface. Lorsque le ligand *CLV3* est sécrété hors de la cellule il diffuse tout autour (zone en rouge). Les premières couches de cellules présentant les récepteurs *CLV* vont fixer un maximum de ligand (zone violette). Plus en interne, la quantité de ligand *CLV3* est nettement plus faible (zone bleue). La zone complètement interne ne fixe aucun ligand *CLV3* sur les récepteurs, ce qui permet à *WUS* de s'exprimer.

### 2.2.3 Les relations entre *WUS*, *CLV*, *STM* et *HAM* pour le bon fonctionnement du MAC

Quels sont les liens entre les gènes d'identité du méristème et ceux du maintien des cellules souche ? Bien que ces gènes soient connus depuis une dizaine d'année, leur degré de relation est encore largement méconnu et les résultats sont parfois contradictoires. D'après Brand et coll. (2002), l'induction de la surexpression de *STM* au moment de la germination aboutit à la mise en place de méristèmes ectopiques au sein desquels les gènes *WUS* et *CLV3* s'expriment. L'expression de *CLV3* et *WUS* n'est pas observée en dehors des méristèmes. D'après ces résultats, l'expression de *STM* serait suffisante pour induire la mise en place d'une structure indifférenciée et permettrait alors l'expression de *WUS* au sein de cette structure. Par conséquent *STM* agirait en amont de *WUS* (figure 17), ce qui est cohérent avec l'épistasie des mutations fortes de *STM* sur *WUS* (Endrizzi, 1996). Par contre, selon Gallois et coll. (2002), l'induction de la surexpression de *STM* après la germination ne serait pas suffisante pour permettre la mise en place de méristèmes ectopiques, mais aboutit à un maintien des cellules dans un état indifférencié. La mise en place de structures méristématiques ectopiques ne serait observée que dans un contexte où *WUS* et *STM* sont tous deux exprimés ectopiquement. Ainsi, pour Gallois et ses collaborateurs *WUS* et *STM* ont une action indépendante et seule la combinaison de ces deux gènes permet la mise en place du méristème ce qui diffère des résultats obtenus par Brands et coll. 2002.

Les liens entre *STM* et *CLV3* sont également peu connus (figure 17). Nous avons vu que le maintien du méristème et celui de l'expression de *CLV3* passait par la boucle de rétrocontrôle de *WUS* et des gènes *CLV*. Mais comment est initiée l'expression de *CLV3* ? Selon Brand et coll. (2002), l'expression de *WUS* seule dans le méristème embryonnaire serait suffisante pour induire *CLV3*, mais qu'elle nécessiterait par contre la coexpression de *STM* dans les stades post-embryonnaires. Ces résultats divergent de ceux de Lenhard et coll. (2002), qui ont montré que l'expression ectopique de *WUS* dans les feuilles induisait celle de *CLV3*. En résumé, ce qui reste sûr, c'est que *STM* maintient l'état indifférencié des cellules méristématiques. A un moment ou a un autre, la structure aurait alors besoin de l'action de *WUS* en plus de celle de *STM* pour fonctionner comme méristème. Cette expression de *WUS* serait nécessaire pour l'expression de *STM*. Le gène *HAM* quant à lui agirait en amont de *WUS* et *STM*, tout au moins chez *Petunia hybrida*. En effet, chez les mutants *ham*, le niveau d'expression de ces deux gènes diminue rapidement conduisant à la différenciation du méristème (Stuurman et coll., 2002).



**Figure 17: Les relations entre les gènes du maintien du méristème.**

Les relations entre les gènes qui interviennent dans l'identité du méristème et des cellules souches sont encore méconnues. *WUS* active *CLV3* qui réprime *WUS* (flèche continue). Il est possible que l'activation de *CLV3* sur *WUS* nécessite l'action de *STM* (flèche en pointillée), mais les données sont contradictoires. De la même façon, on ne sait pas encore exactement si *WUS* agit indépendamment de *STM* ou s'il a besoin de l'activation de ce dernier pour fonctionner. Le gène *HAM* quand à lui activerait chez le pétunia aussi bien *STM* que *WUS*.

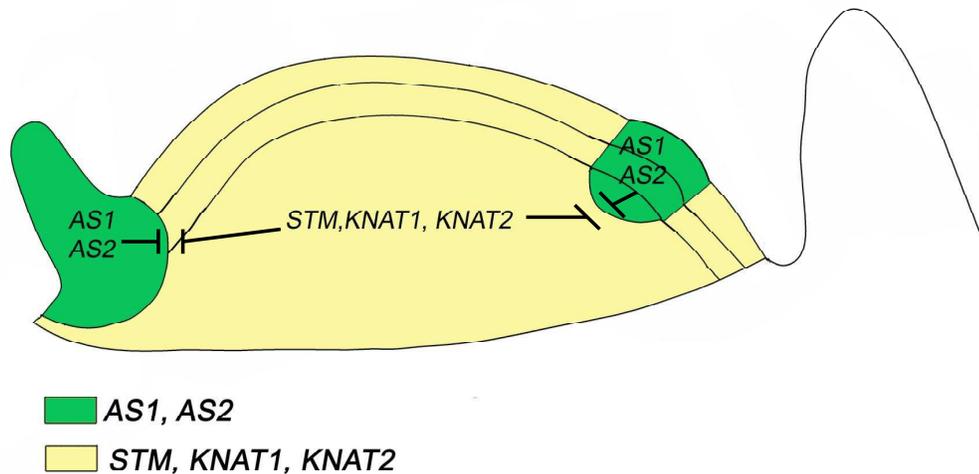
2.2.4 Mise en place des primordia

Nous venons de voir la fonction d'autorégulation du méristème apical caulinaire qui permet son maintien. Ce maintien du méristème lui permet d'accomplir sa deuxième fonction : l'organogenèse. Le développement des organes est initié à partir des cellules fondatrices situées au niveau de la zone périphérique et s'effectue en plusieurs étapes.

2.2.4.1 Définition des cellules fondatrices des primordia

Pour que l'initiation du primordia ait lieu, une région de la zone périphérique doit perdre l'identité méristématique. On observe ainsi la disparition logique de l'expression des gènes *STM*, *KNAT1* et *KNAT2* juste avant le début des divisions péricleines et l'émergence du primordia (Long, 1996). Chez *A. thaliana*, il semblerait que l'exclusion de ces trois gènes après l'émergence des primordia fasse intervenir les gènes *ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1)* ET *ASYMMETRIC LEAVES 2 (AS2)*. Les mutants *as1* et *as2* forment en effet des feuilles désorganisées présentant des excroissances et parfois des méristèmes ectopiques. (Ori et coll., 2000 ; Semiarti et coll. 2001). Il a été montré que cette production de méristèmes ectopiques était corrélée à une expression de *KNAT1* et *KNAT2* dans les feuilles (Ori et coll., 2000). Le double mutant *as1 stm* présente un phénotype proche de celui du mutant *as1*.

Cette épistasie d'*AS1* sur *STM* indique que ces deux gènes agiraient dans la même voie de signalisation. Chez les mutants *stm* au stade embryonnaire, *AS1* s'exprime ectopiquement dans la région où s'exprime normalement *STM* (Byrne et coll., 2000). Les gènes *STM*, *KNAT1* et *KNAT2* d'un côté et les gènes *AS1* et *AS2* de l'autre auraient donc des fonctions antagonistes et s'excluraient mutuellement (figure 18).



**Figure 18: Les différentes interactions génétiques pendant la mise en place des primordia.**

Les gènes *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) et *KNAT1* et *KNAT2* confèrent l'identité des cellules méristématiques. Il s'exprime ainsi dans tout le méristème, mais pas dans les primordia. A l'opposée les gènes *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) et *AS2* ne s'exprime que dans les primordia. Ces deux groupes de gènes sont antagonistes et s'excluent mutuellement.

#### 2.2.4.2 Le contrôle du développement des primordia

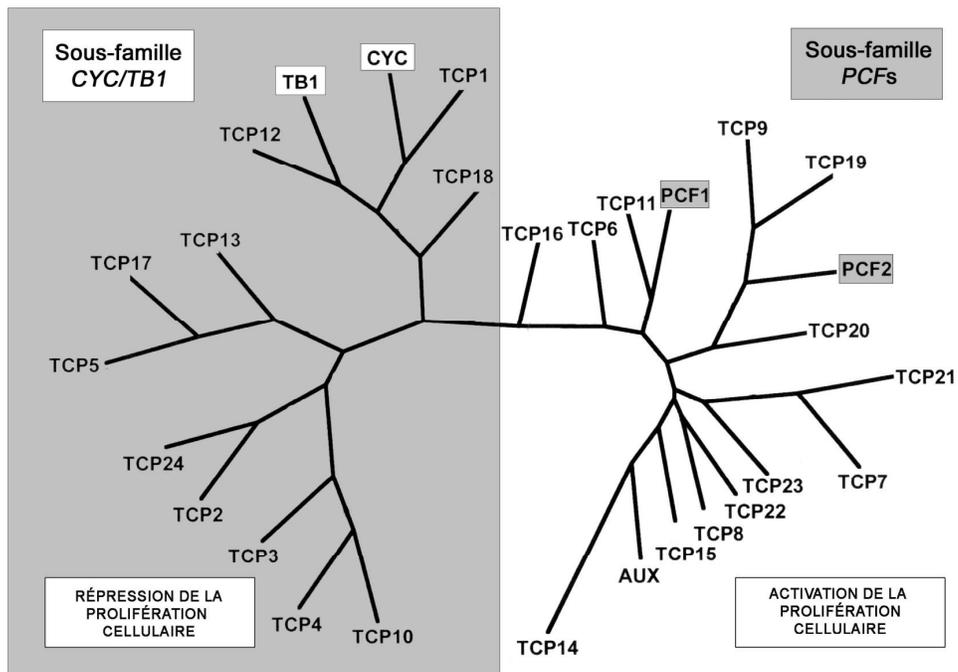
Le bon développement des primordia passe par une phase de prolifération dont la durée et l'intensité doivent être contrôlées. Le mutant *aintegumenta* (*ant*) présente des organes aériens de taille réduite dont la morphologie est normale mais dont le nombre de cellules est réduit (Mizukami et Fischer, 2000). A l'inverse, l'expression constitutive d'*ANT* entraîne la formation de MAC de taille normale mais dont les organes aériens sont plus grands, conséquence d'un plus grand nombre de cellules (Krizek, 1999 ; Mizukami et Fisher, 2000). Ce gène code un facteur de transcription qui s'exprime dans les cellules de la zone périphérique recrutées pour la formation des primordia puis dans les zones en croissance active des primordia de tous les méristèmes aériens. D'après les phénotypes observés, il aurait un rôle dans la prolifération cellulaire des primordia. Des expériences d'hybridation *in situ* ont révélé que le gène de cycline D3, connu comme marqueur des cellules en prolifération, s'exprime plus longtemps dans les organes de plantes où le gène *ANT* est sous promoteur constitutif (Mizukami et Fisher, 2000). Le gène *ANT* contrôlerait donc la

durée de la prolifération plutôt que son taux. Il définirait la période pendant laquelle chaque primordia va pouvoir effectuer des divisions cellulaires pour s'accroître.

#### 2.2.4.3 Le contrôle de la prolifération cellulaire

Chez les plantes à fleurs, une famille de gènes semble particulièrement impliquée dans le contrôle direct de la prolifération cellulaire au niveau des méristèmes. Le premier représentant à avoir été caractérisé est le gène *TEOSINTE BRANCHED 1 (TB1)* chez le maïs. Le maïs est une plante qui n'existe pas à l'état sauvage sous sa forme actuelle. On pense que la téosinte pourrait bien être l'ancêtre du maïs cultivé. La téosinte est plus ramifiée et présente des tiges plus petites que le maïs qui possède une seule tige principale de taille plus importante. La culture de la téosinte aurait amené à la sélection progressive de plants qui ne possèdent plus qu'une seule tige, plus intéressant du point de vue agronomique car produisant des épis plus gros. Les analyses moléculaires ont montré que la différence entre les deux plantes pouvait être la conséquence d'un arrêt du développement des primordia des tiges latérales par arrêt de la prolifération sous l'action de *TB1* (Doebley, 1997).

D'autres gènes de cette famille ont été reconnus pour avoir un rôle dans la prolifération cellulaire. C'est le cas notamment du gène *CYCLOIDEA (CYC)* d'*Antirrhinum majus* et des gènes *PCF1* et *PCF2* du riz. Tous ces gènes semblent contrôler le développement des primordia *via* la prolifération cellulaire (Luo et coll., 1996 ; Gaudin et coll., 2000 ; Kosugi et coll., 1997). Il a en effet été montré que le gène *CYC* agit sur l'inhibition de l'expression des cyclines D (Gaudin et coll., 2000). Pour leurs parts, les gènes *PCF1* et *PCF2* seraient impliqués dans l'expression spécifique du facteur de processivité des ADN polymérases PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans les tissus méristématiques (Kosugi et coll., 1997). Cette famille de gènes porte le nom de TCP (pour TB1 CYC PCF1 ; Cubas et coll., 1999). Depuis, on a recensé un bon nombre de gènes appartenant à cette famille. Les alignements de séquences ont permis de distinguer deux sous-familles (figure 19). La première, qui inclut les gènes *CYC* et *TB1*, regrouperait des gènes de répression de la prolifération cellulaire alors que la seconde, dont font partie les gènes *PCF*, regrouperait des activateurs de la prolifération.



**Figure 19: Arbre phylogénétique des gènes de la famille TCP.**

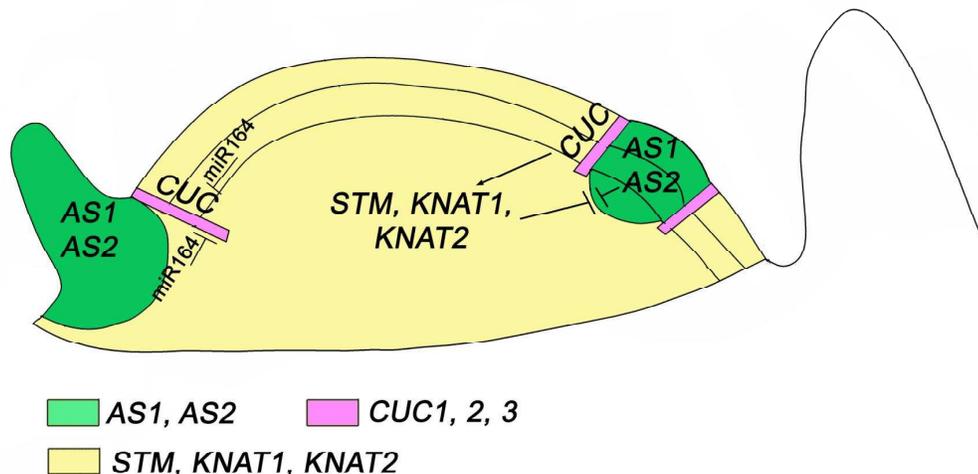
La famille des gènes TCP (TB1 CYC PCF1) intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire. On peut distinguer deux sous-familles, l'une intervient dans la répression de la prolifération et comprend des gènes comme *TB1* et *CYC*, l'autre agit par activation de la prolifération cellulaire comme par exemple les gènes *PCF1* et *PCF2*.

## 2.2.5 Le rôle des bordures

### 2.2.5.1 Des bordures pour contenir la croissance des primordia

Les primordia présentent un très fort taux de prolifération cellulaire. Ils apparaissent dans la zone périphérique qui elle-même est sujette à un taux important de prolifération cellulaire. Il a été montré qu'entre ces deux régions il existait une frontière caractérisée par un très faible taux de prolifération (Callos et Medford, 1994 ; Furner, 1996 ; Breuil-Broyer, 2004). Cette bordure aurait donc pour but de mieux délimiter le primordium de la zone périphérique. Chez le pétunia, la mise en place de la bordure fait intervenir le gène *NO APICAL MERISTEM (NAM)*. Il s'exprime au niveau des frontières entre les primordia ainsi qu'au niveau de la frontière tout autour du MAC pendant le stade embryonnaire (Souer et coll., 1996). Les mutations dans ce gène provoquent des défauts dans l'établissement de nombreuses frontières ce qui se traduit généralement par des fusions d'organes. Chez le pétunia, les frontières entre les primordia et la zone périphérique sont donc

le résultat d'un mécanisme actif faisant intervenir le gène *NAM*. Depuis, des gènes de la famille de *NAM* ayant également un rôle dans le contrôle des frontières ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* et chez *Antirrhinum majus*. Chez *A. thaliana*, les gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON 1, 2* et *3* (*CUC1, 2, 3*) agissent en effet de façon redondante pour établir les frontières dans le méristème de manière similaire au gène *NAM* (Aida et coll., 1997 ; Takada et coll., 2001 ; Vroemen et coll., 2003). Chez *Antirrhinum majus*, il s'agit du gène *CUPULIFORMIS* (*CUP* ; Weir et coll., 2004). De façon intéressante, il a été montré que le gène *CUP* interagit directement avec des membres de la famille *TCP* (Weir et coll., 2004). Il semblerait même que ce gène interagisse avec *CYCLOIDEA*, ce qui serait cohérent avec une répression de la division cellulaire aux niveaux des bordures. Il est probable que de telles interactions avec les gènes de la famille *TCP* existent également chez les autres espèces. Le contrôle du patron d'expression de ces gènes est également intéressant. Il a en effet été montré chez *A. thaliana* que la zone d'activité de *CUC1* et *CUC2* (figure 20) est régulée au niveau post-transcriptionnel par le micro-ARN *miR164* (Laufs et coll., 2004 ; Mallory et coll., 2004). *miR164* permettrait de délimiter la frontière définie par les gènes *CUC* en un sillon de deux à trois rangées de cellules. On peut concevoir que ce rôle de *miR164* sur les frontières est conservé puisque ses homologues ont été retrouvés chez le riz et le tabac (Mallory et coll., 2002, Reinhart et coll., 2002).



**Figure 20: Le rôle des gènes *CUC* à la frontière des primordia.**

Les gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*) *CUC2* s'expriment dans les frontières entre les primordia et la zone périphérique et permet la mise en place de la bordure par arrêt de la prolifération cellulaire à ce niveau. Il semblerait que les gènes *CUC1* et *CUC2* activent l'expression de *STM*. La zone d'expression des gènes *CUC1* et *CUC2* est délimitée par une répression post-transcriptionnelle faisant intervenir le microARN *miR164*.

#### 2.2.5.2 Des bordures pour maintenir l'équilibre dans le MAC

Chez *A. thaliana*, les gènes *CUC* ne semblent pas s'en tenir à un simple rôle de bordure. Il a en effet été montré que la présence de ces gènes est nécessaire à l'expression du gène *STM*. Pendant la période embryonnaire, l'expression des gènes *CUC1* et 2 précède la mise en place du MAC. Ces gènes établiraient donc la zone où le MAC va se former (Aida et coll., 1997, 1999). Sans l'expression des gènes *CUC*, le MAC ne se forme pas (Aida et coll., 1997). Il a donc été suggéré que les gènes *CUC* induiraient l'expression de *STM*. L'expression du gène *CUC2* placé sous promoteur constitutif a ainsi montré une expression ectopique de *STM* (Aida et coll., 1999). Ces résultats ont été confirmés par ceux de Hibara et coll. (2003) qui ont pu mettre en évidence une activation de *KNAT1* et de *STM* par l'expression constitutive de *CUC1*.

L'ensemble de ces résultats indique que les gènes *CUC* ne permettent pas seulement de délimiter le territoire du MAC et promouvoir l'initiation de l'expression de *STM* au stade embryonnaire. On pourrait émettre l'hypothèse que ces gènes peuvent également induire l'expression de *STM* au sein des méristèmes, depuis la bordure des primordia, peut-être pour contenir l'étalement de l'expression des gènes *ASYMMETRIC LEAVES* et ainsi éviter que les cellules différenciées des primordia ne se répandent dans le méristème.

### 2.3 Du méristème apical caulinaire au méristème floral, entre similarité et singularité

#### 2.3.1 Les différences de structures et de fonctionnement

Le méristème floral est un méristème très particulier. S'il fonctionne sur le même principe que le méristème apical ou celui d'inflorescence, il diffère également sur plusieurs points. Il est le seul qui produit des organes sexuels. De plus, la phyllotaxie (l'agencement des organes selon un axe) des organes floraux est différente de celle des autres méristèmes. Dans la fleur d'*Arabidopsis thaliana*, les organes sont disposés selon des territoires concentriques, les verticilles (figure 21). Chaque verticille ne produit qu'un seul type d'organe floral. Par exemple, dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* on observe quatre verticilles qui produisent, de la périphérie vers le centre, un calice de quatre sépales, une corolle de quatre pétales, un androcée de six étamines et un gynécée constitué de deux carpelles. Le nombre d'organes et de verticilles peut varier en fonction des espèces de plantes à fleurs, mais les organes sexuels sont toujours situés dans les verticilles centraux. Les verticilles se mettent en place progressivement depuis la périphérie vers le centre. Les sépales sont donc les premiers organes formés et les carpelles n'apparaissent ainsi qu'en dernier lieu.

La grande particularité du méristème floral est qu'il est déterminé c'est-à-dire qu'il ne va produire qu'un nombre bien défini d'organes. Au début de sa vie, il fonctionne comme un méristème apical, il commence à produire les sépales puis les pétales tout en maintenant des cellules souche dans sa zone centrale. L'ensemble des cellules méristématiques est consommé avec la formation des carpelles. La formation complète des organes reproducteurs nécessite donc que le maintien des

cellules souche dure suffisamment longtemps pour qu'il y ait assez de cellules pour permettre leur développement, mais pas trop pour que ces cellules puissent être consommés par les primordia de carpelle.

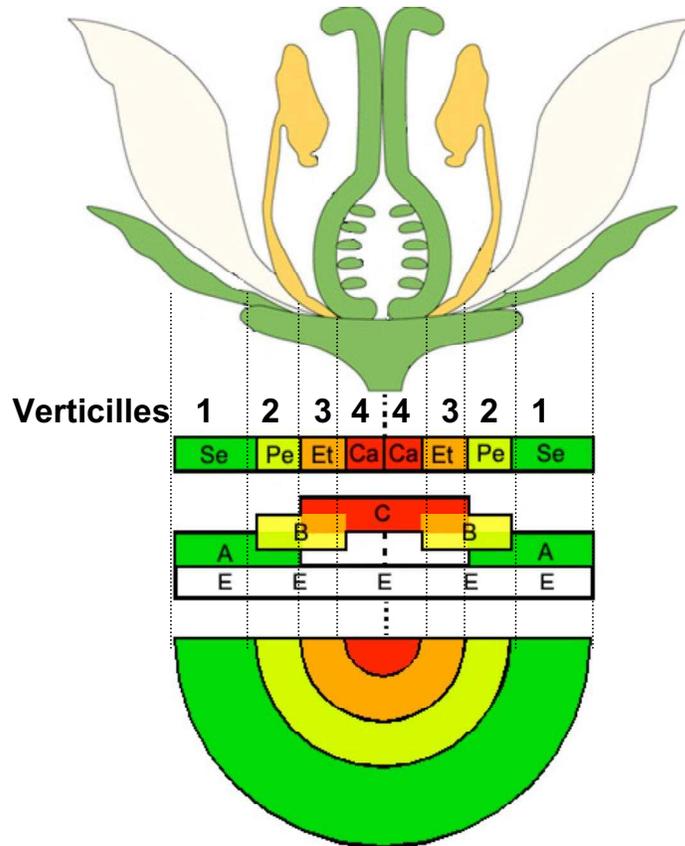
### 2.3.2 Identité florale et croissance des primordia

#### 2.3.2.1 Les gènes de l'identité florale

Le méristème floral, malgré ses particularités, reste un méristème. On retrouve donc logiquement l'expression des gènes *STM*, *KNAT1* et *KNAT2* pour maintenir l'identité des cellules méristématiques. A ces trois gènes, s'associent les gènes *LEAFY* (*LFY*; Weigel et coll., 1992), *APETALA1* (*AP1*; Irish et Sussex, 1990), *UNUSUAL FLOWER ORGAN* (*UFO*; Levin et Meyerowitz, 1995) et *CAULIFLOWER* (*CAL*; Bowman et coll., 1993; Yanofsky, 1995). Ces quatre gènes vont spécifier l'identité florale du méristème. Sans leur présence, les méristèmes d'inflorescence produisent des méristèmes d'inflorescence et très rarement des méristèmes floraux.

#### 2.3.2.2 Le modèle ABC

La plupart des Angiospermes ont des fleurs formées de quatre verticilles à l'image de celles d'*A. thaliana*. Cette identité des organes floraux au niveau de chaque verticille est conférée grâce à la combinaison de quatre classes de gènes homéotiques (A, B, C, E; figure 21). La caractérisation de ces mutants et des profils d'expression a permis l'établissement du modèle ABCE (Meyerowitz et coll., 1991, Okada et Shimura, 1994; Pelaz et coll., 2000 et 2001; Ditta et coll., 2004). Chez *A. thaliana*, la classe A regroupe les gènes *APETALA1* et *APETALA2*, la classe B les gènes *APETALA3* et *PISTILLATA*, la classe C le gène *AGAMOUS* et la classe E les gènes *SEPALLATA 1* à *4* (pour revue, Jack, 2004). D'après ce modèle, l'identité des sépales va nécessiter les gènes de classe A et E, les pétales ceux de classe A, B et E. Pour ce qui concerne les organes sexuels, les étamines résultent de la combinaison des gènes de classe B, C et E et les carpelles de ceux des classes C et E. Les gènes de classe E ne sont donc spécifiques d'aucun organe floral en particulier. Par contre les gènes de classe A sont spécifiques des organes stériles, sépales ou pétales et ceux de classe C des organes sexuels, étamines ou carpelles. Ces deux classes de gènes s'excluent d'ailleurs mutuellement, *AP2* réprimant *AG* et *AP1* étant réprimé par *AG*.



**Figure 21: Le modèle ABCE de l'identité des organes floraux.**

Dans les méristèmes floraux, l'identité des organes est déterminée par la combinaison de trois fonctions: A, B et C. Dans le premier verticille, seuls les gènes de fonction A et E s'expriment pour former les sépales (Se). Dans le deuxième verticille, les gènes de fonction A, B et E s'expriment pour former les pétales (Pe). Dans le troisième verticille, les gènes de fonction B, C et E s'expriment pour former les étamines (Et) et dans le quatrième verticille, ce sont les gènes de fonction C et E qui s'expriment pour former les carpelles (Ca). On notera que la fonction C est primordiale pour l'identité des organes reproducteurs.

### 2.3.2.3 La croissance des primordia

Comme dans le méristème apical, l'émergence des primordia requiert l'expression des gènes *ASYMMETRIC LEAVES 1* et *2*. De la même façon, on retrouve l'expression du gène *AINTEGUMENTA* qui semble également contrôler la période de prolifération cellulaire dans les primordia (Krizek, 1999). Les gènes *TCP* semblent également intervenir dans la prolifération cellulaire des primordia d'organes floraux. Le gène *CYCLOIDEA* est ainsi à l'origine de l'asymétrie florale chez *Antirrhinum majus* (Luo et coll., 1996). Le gène *CYC* et un autre gène *TCP*, le gène *DICHOTOMA*, sont responsables de l'asymétrie dorso-ventrale par répression

différentielle de la prolifération cellulaire dans les primordia de pétales dorsaux (Luo et coll., 1996 et 1999 ; Cubas et coll., 1999).

### 2.3.3 Les frontières au sein du méristème floral

#### 2.3.3.1 Présence et rôle des gènes *CUC*

Les gènes *CUC* semblent avoir conservé leur rôle dans la mise en place des frontières au sein du méristème floral. Les mutants *cuc* montrent en effet des phénotypes floraux où les organes sont en plus petit nombre et fusionnés (Aida et coll., 1997). De plus, l'expression ectopique de miR164 provoque des phénotypes comparables à ceux du double mutant *cuc1 cuc2* dans le MAC (Laufs et coll., 2004, Mallory et coll., 2004). A l'inverse, l'introduction d'un allèle de *CUC1* insensible au miR164 provoque des phénotypes au niveau de la fleur qui se traduisent essentiellement par une augmentation du nombre de pétales et une diminution du nombre de sépales (Mallory et coll., 2004). Une version de *CUC2* résistante à miR164 provoquait également une diminution de la taille des organes floraux et permet la restauration de la démarcation entre les sépales dans les mutants qui surexpriment miR164 (Laufs et coll., 2004).

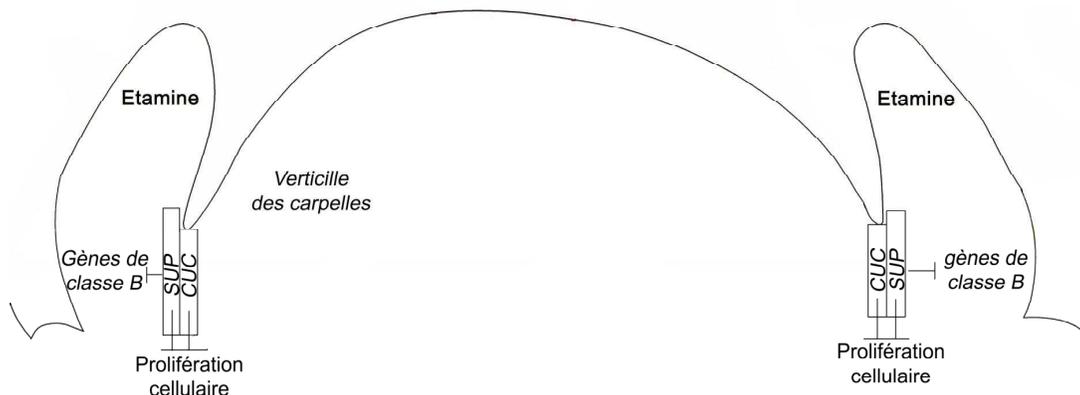
Les gènes *CUC* délimiteraient donc le territoire des organes au sein de chaque verticille, mais il semble qu'ils possèdent également un rôle dans la mise en place des bordures entre chaque verticille (figure 22). Il a en effet été montré que le gène *CUC2* s'exprime entre les verticilles au sein du méristème floral (Ishida et coll., 2000 ; Breuil-Broyer et coll., 2004). Cette expression est de plus corrélée avec une absence de prolifération cellulaire à ce niveau (Breuil-Broyer et coll., 2004). On peut donc supposer que les autres gènes *CUC* sont également présents et agissent de façon redondante pour arrêter la prolifération cellulaire entre chaque verticille.

#### 2.3.3.2 Quand *SUPERMAN* contrôle la frontière entre les organes sexuels

Le respect de la frontière entre le troisième et le quatrième verticille est fondamental pour que les organes sexuels se développent normalement et que la fleur soit féconde. Dans le début des années 90, un gène dont la mutation provoque une augmentation du nombre de verticilles d'étamines, la production d'organes chimères de type étamine/carpelle au centre de la fleur ainsi que la formation de carpelles mal fusionnés, a été caractérisé (Schultz et coll., 1991 ; Bowman et coll., 1992). En raison de la production d'un plus grand nombre d'organes mâles, ce gène a été nommé *SUPERMAN* (*SUP*). Des hybridations *in situ* ont montré que les gènes de classe B sont surexprimés dans le mutant *sup* et s'expriment de façon ectopique dans le quatrième verticille (Sakai et coll., 1995 et 2000). Les fleurs *sup* présentent donc une extension du domaine mâle au détriment du domaine femelle et une frontière mâle/femelle flottante qui n'est pas marquée par un sillon cellulaire. Ce phénotype mutant *sup* est intéressant car il montre que la frontière entre les organes mâles et femelles n'est pas calquée sur la frontière en sillon. Il est donc possible de faire une dichotomie entre la frontière de l'identité des organes et celle des verticilles. On peut imaginer que, d'un côté, les gènes *CUC* interviendraient pour former les sillons et définir physiquement les verticilles dans le méristème. De l'autre, *SUP* agirait indépendamment des gènes *CUC* pour réprimer dans le dernier verticille les gènes homéotiques de la classe B pour que soient produits des carpelles. D'après

les hybridations *in situ*, *SUP* s'exprime dans la partie interne du troisième verticille (figure 22) juste après le début de celle des gènes ABC ce qui est compatible avec un rôle putatif de restriction des gènes de classe B à la frontière entre le troisième et le quatrième verticille (Sakai et coll., 1995). Par contre, ce rôle sur les gènes de classe B n'explique pas pourquoi il existe des verticilles supplémentaires chez les mutants *sup* ce qui suggérerait un rôle dans la prolifération cellulaire (Sakai et coll., 2000). Le fait que l'expression constitutive de *SUP* chez le tabac produise des plantes naines du fait d'un nombre réduit de cellules, va dans le sens de cette hypothèse (Béréterbide, 2001). Mais ce rôle éventuel sur la prolifération reste incertain car l'expression de *SUP* sous contrôle du promoteur de gènes homéotiques de classe B provoque une réduction de l'élongation plutôt qu'une baisse de la prolifération cellulaire (Kater et coll., 2000).

L'expression de *SUP* semble être contrôlée *via* la méthylation des protéines histones H3 et des cytosines. Cette méthylation serait sous contrôle d'*ARGONAUTE4* (*AGO4*) dont il a été montré que la protéine intervient dans les mécanismes de méthylation dirigés par les microARNs (Zilberman, 2003 et 2004).



**Figure 22: Mécanisme du contrôle de la frontière entre les verticilles 3 et 4.**

Les gènes *CUC* s'expriment à la frontière entre tous les verticilles. Entre ceux des organes reproducteurs, les verticilles 3 et 4, ils sont accompagnés par le gène *SUPERMAN* (*SUP*). La fonction de *SUP* n'est pas encore très claire, mais il interviendrait éventuellement pour la restriction des gènes homéotiques de classes B en dehors du quatrième verticille et pour la suppression de la prolifération cellulaire à la frontière entre les deux verticilles, en complément des gènes *CUC*.

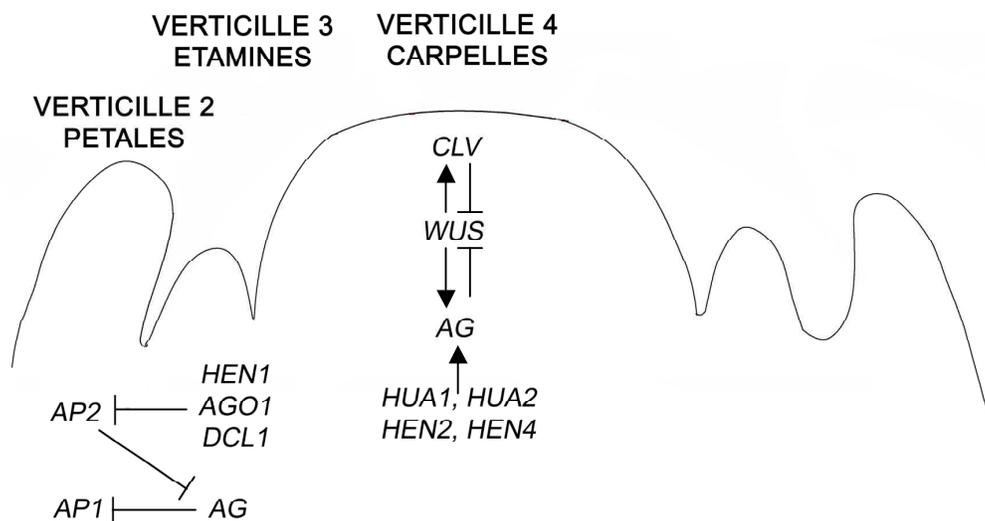
## 2.3.4 Le contrôle du caractère déterminé du méristème floral

### 2.3.4.1 Maintien de la boucle *WUS/CLV* pendant les stades précoces

Lors du début de développement floral, jusqu'à l'établissement du premier et du deuxième verticille, le maintien des cellules souche s'opère de la même manière que pour le méristème apical. On retrouve ainsi les mêmes acteurs. Le gène *WUS* définit la zone confinée des cellules souche suite à une boucle de rétrocontrôle avec les gènes *CLV*. Les gènes *ULTRAPETALA1* et 2 agiraient également sur le domaine d'expression de *CLV1* (Fletcher et coll., 2001 ; Carles et coll., 2005) et le gène *HAIRY MERISTEM* sur l'expression de *WUS* (Stuurman et coll., 2002).

### 2.3.4.2 Une croissance florale déterminée causée par un blocage de la boucle *WUS/CLV*

Une fois les primordia de sépales et de pétales initiés, le contrôle de l'arrêt des cellules souche et donc du méristème va faire l'objet d'une régulation fine. Un arrêt précoce ou tardif va en effet se répercuter directement sur le développement des organes sexuels. Si le stock de cellules souche est moins important, l'arrêt sera plus précoce et inversement. Dans les mutants *wus*, la fleur termine son développement de façon précoce en ne produisant plus qu'une seule étamine centrale (Laux et coll., 1996). A l'inverse, les mutants *clv* provoquent la formation d'étamines et de carpelles surnuméraires (Clark et coll., 1993). De la même façon, on observe un nombre supplémentaire de pétales, d'étamines et de carpelles chez les mutants *ultrapetala* (Fletcher, 2001 ; Carles, 2005). La boucle *WUS/CLV* contrôle donc la détermination florale. Des expériences ont ainsi montré que l'arrêt de la croissance des méristèmes floraux allait de paire avec l'arrêt de l'expression de *WUS* lors de l'apparition des primordia de carpelles (Mayer et coll., 1998 ; Schoof et coll., 2000). Chez *A. thaliana*, *AG* est le gène homéotique de classe C qui définit l'identité des organes sexuels (Meyerowitz et coll., 1991, Okada et Shimura, 1994). La mutation d'*AG* se traduit logiquement par la perte des organes sexuels et leur remplacement par des pétales, mais cette mutation provoque également une croissance indéterminée des méristèmes floraux (Bowman et coll., 1989). *AG* a donc un rôle dans la détermination des organes sexuels en même temps que dans celui de la détermination florale. Des expériences *in situ* ont ainsi montré que chez les mutants *ag*, *WUS* continuait à s'exprimer (Lohman et coll., 2001). De plus, Brand et coll. (2000) ont montré que la surexpression des gènes *CLV* diminuait l'expression d'*AG* en plus de *WUS*. Ces résultats suggèreraient donc qu'il existe une deuxième boucle de rétrocontrôle dans laquelle *WUS* active *AG* qui lui-même réprime *WUS* (figure 23). Cette hypothèse a été confirmée depuis par des analyses d'expression ectopique de *WUS*. L'expression de *WUS* sous contrôle du promoteur d'un gène homéotique de classe B (verticille 2 et 3) provoque en effet l'expression d'*AG* dans le deuxième verticille (Lenhard et coll., 2001). Par contre, l'expression d'*AG* étant maintenue après l'arrêt de *WUS*, il est probable que ce dernier ne serve qu'à initier l'expression d'*AG*. *WUS* activerait donc son propre régulateur négatif. Au moment de l'initiation des carpelles, la répression par *AG* s'ajouterait à celle des gènes *CLV* ce qui déséquilibrerait la balance entre *WUS* et *CLV* provoquant *in fine* l'arrêt de *WUS* et du méristème.



**Figure 23: Les interactions génétiques pour le maintien des cellules souches avant la formation des carpelles.**

Dans les méristèmes floraux, après la formation des étamines, le gène *WUS* fait l'objet d'un double rétrocontrôle. La protéine *WUS* active les gènes *CLV3* et *AGAMOUS* (*AG*), qui vont en retour réprimer *WUS*. Le complexe incluant les protéines *HUA1*, *HUA2* et *HUA ENHANCER2* (*HEN2*) ET *HEN4* agit sur la maturation de l'ARN messager d'*AG*. Les gènes *HEN1*, *ARGONAUTE1* (*AGO1*) ET *DICER-LIKE1* (*DCL1*) agissent sur la répression post-transcriptionnelle du gène homéotique de classe A, *APETALLA2* (*AP2*) dans le troisième et quatrième verticille. *AP2* réprime ainsi *AG* dans le premier et deuxième verticille, ce dernier réprimant *AP1* dans les verticilles des organes sexuels.

#### 2.3.4.3 Un contrôle post-transcriptionnel pour la détermination florale

*AGAMOUS* n'est bien évidemment pas le seul gène à intervenir dans la détermination florale. L'expression ectopique d'*AG* dans le méristème apical ne provoque pas en effet la répression de *WUS* (Mizukami et Ma ; 1997). Il existe donc des gènes qui agissent en collaboration avec *AG* spécifiquement dans le méristème floral pour réprimer *WUS*. Les premiers gènes identifiés sont les gènes *HUA 1* et *2*. La mutation d'un de ces gènes augmente le phénotype d'une mutation faible d'*ag*, que ce soit pour la perte de l'identité des organes sexuels ou pour la perte de la détermination florale (Chen et Meyerowitz, 1999). Les simples mutants *hua1* et *hua 2* n'ont pas de phénotype et le double mutant ressemble à un mutant *ag* faible. Plus récemment, quatre autres gènes nommées *HUA ENHANCER 1* (*HEN1*), *HEN2*, *HEN3* et *HEN4* ont été identifiés (Chen et coll., 2002 ; Cheng et coll., 2003, Wang et Chen, 2004). Comme leur nom l'identifie, ils sont capables d'augmenter le phénotype des mutants *hua* mais seuls, ils ne possèdent pas non plus de phénotype.

Différentes expériences ont permis de montrer que la plupart de ces gènes sont des régulateurs post-transcriptionnels d'AG (figure 23). Les gènes *HUA1*, *HUA2*, *HEN2* et *HEN4* agissent sur la maturation de l'ARN messager d'AG (Cheng et coll., 2003). Ces gènes favoriseraient donc la détermination florale à travers la maturation de l'ARN messager d'AG. De son côté, *HEN1* avec l'aide des protéines *DCL1* et certaines protéines *ARGONAUTE* (*AGO*), comme *AGO1*, agirait *via* le mécanisme des micro-ARNs pour la répression d'*AP2*, gène homéotique de classe A, dans le troisième et le quatrième verticille (Park et coll., 2002, Chen, 2004). Dans ce deuxième cas, le contrôle de la détermination se ferait indirectement. Ces gènes préviendraient l'expression d'*AP2*, antagoniste d'AG, dans le troisième et le quatrième verticille (figure 23). Le rôle d'*HEN3* dans la détermination florale n'est pas encore très clair, *HEN3* codant une cyclin-dépendant kinase (CDK ; Wang et Chen, 2004).

Le rôle exact des gènes *AGO1* et *DCL1* est également encore méconnu. Ces gènes interviennent très probablement dans la production de micro-ARNs intervenant dans des voies de développement très diverses. Il est donc difficile de décrypter le phénotype des simples mutants *ago1* et *dcl1* puisqu'il doit être le résultat d'un certain nombre de défauts de régulation cumulés. Néanmoins les mutations dans ces deux gènes ont des phénotypes intéressants au niveau du méristème. L'indétermination florale observée chez le mutant *dcl1* (Jacobsen et coll., 1999) et l'augmentation de la taille du méristème observée chez certains allèles mutants d'*AGO1* (Kidner, 2005) laisse penser que d'autres interacteurs intervenant dans la détermination florale existent et n'ont pas encore été identifiés.

## 3 SUJET DE THESE

### 3.1 Contexte

La majorité (72 %) des espèces d'Angiospermes, les plantes à fleurs, sont hermaphrodites et présentent donc des fleurs bisexuées. Seul un faible nombre d'espèces (4 %) sont dioïques présentant des fleurs unisexuées mâles ou femelles sur des plants distincts. Les espèces dioïques dont la sexualité est déterminée génétiquement par des chromosomes sexuels sont encore plus rares. Généralement, au début du développement floral, les fleurs dioïques sont potentiellement hermaphrodites ce qui suggère une émergence de ces espèces à partir d'espèces hermaphrodites ancestrales (Charlesworth, 1991 ; Charlesworth et Guttman, 1999). L'émergence de ces espèces dioïques a dû se produire après recrutement de voies du développement floral dont les modifications ont conduit à la formation de fleurs unisexuées. Dans certains cas, le développement des fleurs dioïques serait passé sous le contrôle des chromosomes sexuels. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'évolution du sexe et des chromosomes sexuels chez les plantes à fleurs et en particulier chez certaines espèces du genre *Silene* (famille des Caryophyllacées). Dans ce genre, on distingue au moins deux clades d'espèces dioïques ce qui laisse supposer que la diécie et les chromosomes sexuels sont apparus au moins deux fois indépendamment. Le premier clade comprend *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis* et le deuxième *S. otites* (Desfeux et coll., 1996). Dans le clade de *S. latifolia*, la présence de chromosomes sexuels hétéromorphes de type XY a été clairement mise en évidence. Dans celui de *S. otites*, les chromosomes sexuels sont homomorphes, mais on ignore s'ils sont de type XY ou ZW. Chez ces espèces dioïques du genre *Silene* et notamment chez *S. latifolia*, les gènes de la détermination du sexe et les voies de développement qu'ils utilisent pour produire des fleurs unisexuées sont également inconnus.

Mon sujet de thèse a ainsi été bipartite. J'ai été amené d'un côté à travailler sur l'origine et l'évolution des chromosomes sexuels et de l'autre, à étudier les voies de développement qui ont été recrutées pour la mise en place de la diécie chez *S. latifolia*.

### 3.2 Les objectifs

#### 3.2.1 Origine et évolution des chromosomes sexuels dans le genre *Silene*

Durant ma thèse, je me suis tout d'abord intéressé aux chromosomes sexuels du premier clade d'espèces dioïques du genre *Silene*. Ce clade comprend les trois espèces *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis*. Elles portent toutes des chromosomes sexuels hétéromorphes de types XY. Mon premier objectif a été de déterminer si les chromosomes sexuels dans ces trois espèces avaient la même origine et de comprendre comment l'arrêt de la recombinaison s'était produit. Pour effectuer ce travail, j'ai utilisé quatre gènes qui ont été isolés sur le chromosome Y de *S. latifolia*. J'ai tout d'abord commencé par déterminer si ces quatre gènes étaient également liés au sexe chez les deux autres espèces. J'ai ensuite séquencé les différents

gamétologues X et Y et ai calculé leurs niveaux de divergence. Ce travail s'est fait en collaboration avec différentes équipes en Europe : Gabriel Marais et Dominique Mouchiroud du Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de Lyon, Deborah Charlesworth de l'Institut de la cellule, de l'animal et de la biologie des populations d'Edimbourg et de Vladimira Hykelova, Bohuslav Janousek et Boris Vyskot de l'Institut de Biophysique de Brno en République Tchèque.

J'ai également travaillé sur les conséquences de l'arrêt de la recombinaison sur les gamétologues Y et notamment sur l'augmentation de la taille des gènes par insertion de séquences répétées.

Je me suis également intéressé à l'origine des chromosomes sexuels chez *S. otites* qui appartient au deuxième clade dioïque. J'ai cherché à déterminer si les mêmes gènes étaient présents sur les chromosomes sexuels de cette espèce, afin de voir si une même paire d'autosome a pu être utilisée deux fois indépendamment au cours de l'évolution pour la formation des chromosomes sexuels.

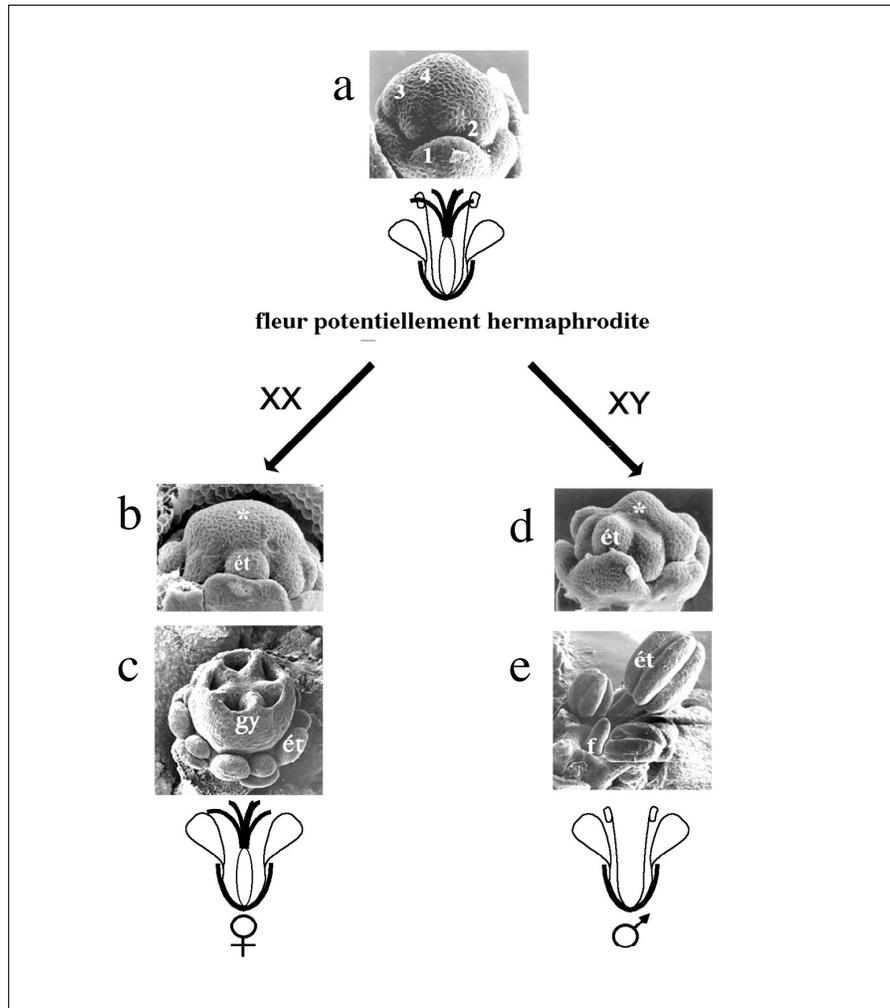
### 3.2.2 Comment produire des fleurs sans carpelles ?

Je me suis ensuite intéressé à la détermination du sexe chez *S. latifolia* et en particulier à la suppression du développement des carpelles chez les fleurs mâles. Pour comprendre quelles voies de développement ont été recrutées pour la formation des fleurs mâles, j'ai utilisé une approche de type gènes candidats basée sur les connaissances du développement des méristèmes floraux acquises chez les espèces hermaphrodites modèles *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* et *Petunia hybrida*.

Dans les stades les plus précoces, les méristèmes des fleurs mâles de *S. latifolia* sont identiques à ceux des femelles (figure 24). Les verticilles des sépales, pétales, étamines et carpelles se forment. Des analyses en hybridation *in situ* ont révélé que le profil d'expression des gènes d'identité d'organes est conservé dans les deux types de fleurs (Hardenack et coll., 1994). Les gènes de la détermination mâle agissent donc soit indépendamment l'identité des organes floraux soit en aval. Dans les stades qui suivent, une structure en forme de filament se développe à la place des carpelles au centre de la fleur mâle (figure 24). Des études en microscopie électronique ont montré que les tissus épidermiques de cette structure possèdent une identité carpellaire ce qui est cohérent avec le profil d'expression inchangée des gènes homéotiques de type ABC. Si l'on observe de plus près ce méristème floral, on se rend compte que la taille de son centre est inférieure à celle des fleurs femelles. De plus, le filament est séparé des étamines par une large région dont on ne connaît pas l'identité.

Par observation du phénotype sexuel et en fonction des connaissances acquises sur le développement des méristèmes floraux des espèces hermaphrodites, nous avons élaboré plusieurs hypothèses pouvant expliquer le développement d'un filament à la place des carpelles. Nous avons ainsi pensé que le filament pouvait être la conséquence d'une perte précoce de l'identité des cellules méristématiques ou encore plus précisément de la perte des cellules souches. Nous avons également imaginé qu'un arrêt ou une baisse de la prolifération cellulaire dans la région du quatrième verticille pouvait être à l'origine de la formation du filament. Cet arrêt de la prolifération pouvant être lié à un élargissement de la frontière inter-

verticilles. Ces hypothèses ont orienté le choix des gènes dont on a recherché les orthologues chez *S. latifolia*. Leur patron d'expression a par la suite été analysé par hybridation *in situ* chez les fleurs mâles et femelles afin d'identifier les voies régulatrices impliquées dans la détermination du sexe dans cette espèce dioïque.



**Figure 24: La détermination du sexe chez *Silene latifolia*.**

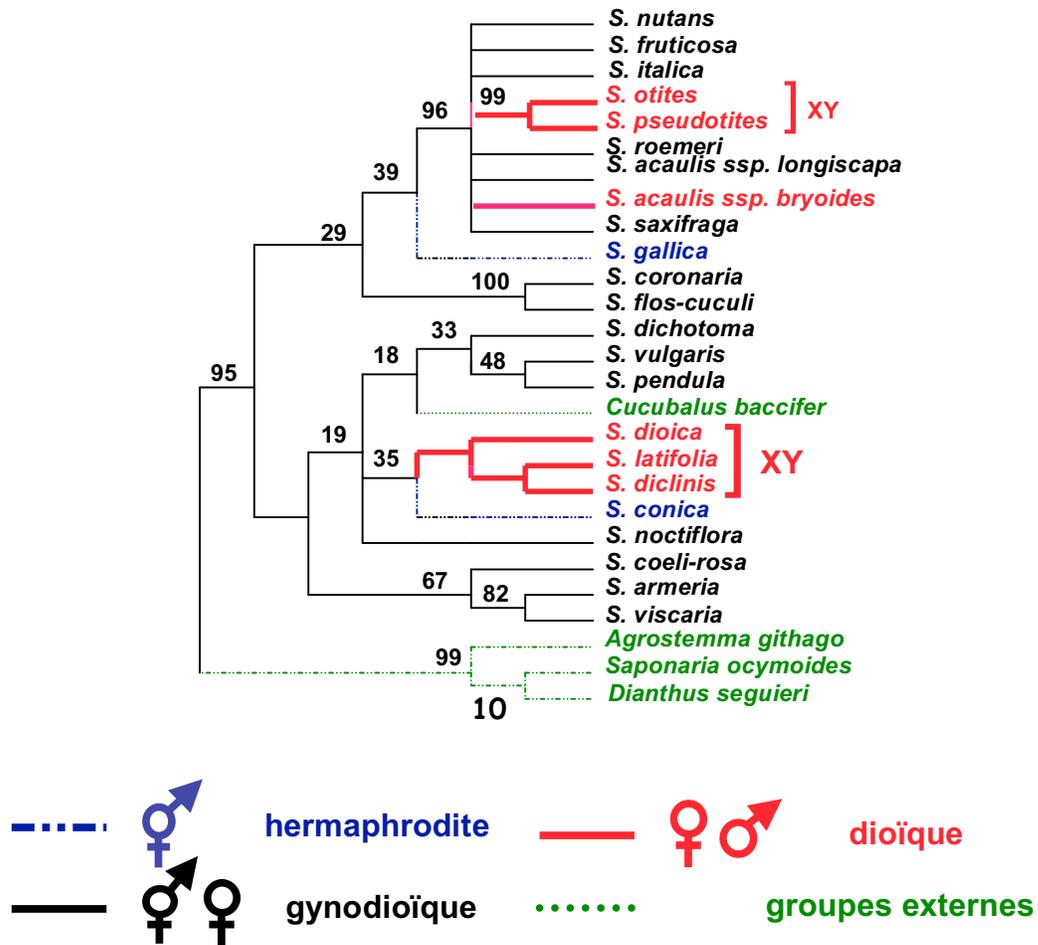
Dans les stades précoces, les méristèmes floraux de *Silene latifolia* sont identiques à ceux d'espèces hermaphrodites (a). Les verticilles de sépales (1), pétales (2), étamines (3) et de carpelles (4) sont présents (a). Par la suite, tout dépend de la présence ou de l'absence du chromosome Y. Chez le mâle, lors de l'apparition des primordia d'étamines (ét), la taille du quatrième verticille est très réduite (d) comparé à celui de la femelle (b) comme indiqué par \*. Ainsi le quatrième verticille va former les carpelles qui donneront le gynécée (gy) seulement chez la femelle (c). Chez le mâle, un filament (f) se forme à la place (d et e). Par contre, les étamines ne se développent pas chez la femelle (c et e)

# **RÉSULTATS DISCUSSION**

## Partie I : Origine et évolution des chromosomes sexuels chez des espèces dioïques du genre *Silene*

Dans le genre *Silene*, appartenant à la famille des Caryophyllacées, la majorité des espèces sont gynodioïques. Les plantes sont alors femelles ou hermaphrodites. On retrouve cependant un certain nombre d'espèces dioïques dont les plantes sont soit mâles soit femelles. Un arbre phylogénétique de ce genre construit à partir de séquences d'espaces ribosomiques (ITS) a mis en évidence l'existence d'au moins deux clades d'espèces dioïques (Desfeux et coll., 1996, figure 1). Le premier clade inclut *S. latifolia*, notre espèce modèle au laboratoire, ainsi que *S. dioica* et *S. diclinis*. De façon intéressante, ces trois espèces portent toutes des chromosomes sexuels hétéromorphes de types XY (Degraeves, 1980). L'autre clade d'espèces dioïques inclut *S. otites* et éventuellement *S. acaulis*. *S. otites* présente également des chromosomes sexuels, mais leur nature (XY ou ZW) n'a pas fait l'objet d'une analyse expérimentale. Pour *S. acaulis*, espèce de haute altitude, il n'existe pas véritablement de données bibliographiques sur ses chromosomes sexuels.

La première partie de ma thèse a consisté à étudier l'origine et l'évolution des chromosomes sexuels dans ces deux clades. Est-ce que les chromosomes sexuels des différentes espèces dioïques proviennent de la même paire d'autosomes ? Dans l'affirmative, s'agit-il du même événement évolutif ? Comment s'est produit l'arrêt de la recombinaison ? Existe-t-il des signes de dégénérescence des gamétologues Y ? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé quatre gènes isolés précédemment sur le chromosome Y de *S. latifolia* : *SIY1*, *SIY3*, *SIY4* et *DD44Y*, qui codent respectivement une protéine à domaine WD, une kinase calcium dépendante, une fructose 2,6 biphosphatase et une protéine mitochondriale de résistance à l'oligomycine. Pour tous ces gènes, il a été montré qu'il existe un gamétologue sur le chromosome X (respectivement *SIX1*, *SIX3*, *SIX4* et *DD44X*). Les couples de gènes 1 (*SIX1/SIY1*), 4 (*SIX4/SIY4*) et DD44 (*DD44X/DD44Y*) avaient déjà été bien caractérisés avant mon arrivée au laboratoire (respectivement Delichère et coll. (1999) ; Atanassov et coll. (2001), Moore et coll. (2003)). Une partie de mon travail a ainsi consisté à mieux caractériser le gène 3 et en particulier d'obtenir les séquences génomiques entières des deux gamétologues de ce gène. Grâce à ces marqueurs moléculaires, j'ai entrepris une analyse des chromosomes sexuels dans le clade de *Silene latifolia*, une étude plus approfondie de la dégénérescence des séquences génomiques du gène 3 du gamétologue *SIY3* chez *S. latifolia* et enfin une analyse de l'origine des chromosomes sexuels chez *S. otites*.



**Figure 1: Arbre phylogénétique du genre *Silene* (Desfeux et coll., 1996 ).**  
 Cet arbre a été construit à partir des séquences d'espaces ribosomiques (ITS). Les numéros indiquent les valeurs des "bootstraps". Les espèces en rose sont sub-dioïques ou dioïques, celles en bleu hermaphrodites et celle en noir gynodioïques.

## 1 Etude dans le clade de *Silene latifolia*

### 1.1 Résumé de l'article

Afin de déterminer si les quatre gènes (1, 3, 4 et DD44) étaient également présents sur les chromosomes X et Y des deux autres espèces dioïques, j'ai effectué des analyses de ségrégation. Cette étude a permis de mettre en évidence que ces quatre loci étaient également liés au sexe chez *S. dioica* et *S. diclinis*. Nous avons alors entrepris d'étudier la divergence entre chaque couple de gamétologues X et Y pour chacun des loci chez les trois espèces. Les séquences des gamétologues X et Y du gène 1, 4 et DD44 de *S. latifolia* étaient déjà disponibles, de même que la séquence codante de *SIX3* de *S. latifolia*. J'ai donc obtenu la séquence codante de *SIY3* ainsi que celle des quatre gènes chez *S. dioica* et *S. diclinis*. Cette analyse a également nécessité le séquençage de l'orthologue de ces gènes chez une espèce ne portant pas de chromosomes sexuels afin de pouvoir comparer les séquences X et Y indépendamment avec une référence autosomale. Les espèces *S. noctiflora* et *S. vulgaris*, proches du clade de *S. latifolia* selon l'arbre de Desfeux et collaborateurs (1996) ont été choisies. En parallèle à ce travail de séquençage, Vladimira Hykelova, (doctorante) et Bohuslav Janousek (post-doctorant) ont cartographié ces quatre gènes sur le chromosome X des trois espèces. Ces différentes données nous ont ainsi permis de comparer le taux de divergence entre gamétologues X et Y en fonction de la position des gènes. Nous avons pu ainsi montrer qu'il y avait une divergence décroissante depuis le bras Xp jusqu'à la partie distale du bras Xq où se trouve la région pseudo-autosomale, ce qui indiquait un arrêt progressif de la recombinaison. Nous avons ensuite recherché si les gamétologues Y présentaient des signes de dégénérescences. Grâce à la séquence autosomale de *S. noctiflora* ou *S. vulgaris* nous avons en particulier recherché si les gamétologues Y accumulent plus de mutations non-synonymes que ceux qui sont localisés sur le chromosome X. Ces analyses ont montré que les gamétologues Y accumulent plus de substitutions synonymes et non synonymes que les gamétologues portés par le chromosome X, mais les valeurs ne sont significatives que pour les taux de substitutions non synonymes. Le rapport entre le taux de substitutions non-synonymes et le taux de substitutions synonymes est également plus important, mais il reste nettement inférieur à un. L'accumulation de substitutions synonymes reste donc majoritaire. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans PLoS Biology.

### 1.2 Article : *A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants*

# A Gradual Process of Recombination Restriction in the Evolutionary History of the Sex Chromosomes in Dioecious Plants

Michael Nicolas<sup>1</sup>, Gabriel Marais<sup>2</sup>, Vladka Hykelova<sup>1,3</sup>, Bohuslav Janousek<sup>1,3</sup>, Valérie Laporte<sup>2</sup>, Boris Vyskot<sup>3</sup>, Dominique Mouchiroud<sup>4</sup>, Ioan Negrutiu<sup>1</sup>, Deborah Charlesworth<sup>2\*</sup>, Françoise Monéger<sup>1</sup>

**1** Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes, ENS Lyon, Lyon, France, **2** Institute of Evolutionary Biology, School of Biological Science, University of Edinburgh, King's Buildings, West Mains Road, Edinburgh, United Kingdom, **3** Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic, **4** Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Bâtiment Gregor Mendel, Villeurbanne Cedex, France

**To help understand the evolution of suppressed recombination between sex chromosomes, and its consequences for evolution of the sequences of Y-linked genes, we have studied four X-Y gene pairs, including one gene not previously characterized, in plants in a group of closely related dioecious species of *Silene* which have an X-Y sex-determining system (*S. latifolia*, *S. dioica*, and *S. diclinis*). We used the X-linked copies to build a genetic map of the X chromosomes, with a marker in the pseudoautosomal region (PAR) to orient the map. The map covers a large part of the X chromosomes—at least 50 centimorgans. Except for a recent rearrangement in *S. dioica*, the gene order is the same in the X chromosomes of all three species. Silent site divergence between the DNA sequences of the X and Y copies of the different genes increases with the genes' distances from the PAR, suggesting progressive restriction of recombination between the X and Y chromosomes. This was confirmed by phylogenetic analyses of the four genes, which also revealed that the least-diverged X-Y pair could have ceased recombining independently in the dioecious species after their split. Analysis of amino acid replacements vs. synonymous changes showed that, with one possible exception, the Y-linked copies appear to be functional in all three species, but there are nevertheless some signs of degenerative processes affecting the genes that have been Y-linked for the longest times. Although the X-Y system evolved quite recently in *Silene* (less than 10 million years ago) compared to mammals (about 320 million years ago), our results suggest that similar processes have been at work in the evolution of sex chromosomes in plants and mammals, and shed some light on the molecular mechanisms suppressing recombination between X and Y chromosomes.**

Citation: Nicolas M, Marais G, Hykelova V, Janousek B, Laporte V, et al. (2004) A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. PLoS Biol 3(1): e4.

## Introduction

Newly evolved sex chromosome systems, such as those in plants [1] and fish [2] allow study of the evolutionary processes causing degeneration of Y chromosomes. The genetic theory of sex chromosome evolution [3] predicts that initially one part of a chromosome pair containing the sex-determining genes evolves reduced recombination. Two questions are then particularly interesting. First, how is recombination suppressed throughout most of the initially homologous X and Y chromosomes, as in mammalian and *Drosophila* sex chromosomes and some plants [1], but not others [4]? Second, why does recombination suppression lead to genetic degeneration? Processes leading to degeneration in large nonrecombining genome regions have been well studied theoretically [5], and empirical data on the first stages of degeneration are starting to be obtained from the plant genus *Silene* [6,7] and from the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda* [8]. Recent neo-sex chromosome systems in *Drosophila* are excellent for studying the rate and causes of degeneration, but cannot shed light on question (i).

Studies of the evolutionary divergence of gene pairs on mammalian X and Y chromosomes suggest that recombination between the X and nonrecombining parts of the Y was successively suppressed. In many X-Y systems, including that in mammals, there is a “pseudoautosomal” region (PAR)

where the X and Y recombine, and it has been found that DNA sequence divergence between homologous X- and Y-linked genes increases with distance from this region. This pattern has been termed “evolutionary strata” [9,10]. Part of the reason for different sequence divergence is that mammalian sex chromosomes are ancient neo-sex chromosomes [11]. In addition, the “strata” suggest a series of Y inversions disrupting X-Y recombination [9]. Strata have also been found in the chicken Z chromosome, which, like the Y, is present only in one sex (females in birds) and does not

Received May 25, 2004; Accepted October 12, 2004; Published December 21, 2004

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004

Copyright: © 2004 Nicolas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abbreviations: CDPK, calcium-dependent protein kinase; cM, centimorgans;  $dN$ , nonsynonymous divergence per site;  $dS$ , synonymous divergence per site;  $dS_X$ ,  $dS$  for the X lineage;  $dS_{X-Y}$ ,  $dS$  between the X and Y sequences;  $dS_Y$ ,  $dS$  for the Y lineage; LR, likelihood ratio; ML, maximum likelihood; MYA, million years ago; NJ, neighbor joining; PAR, pseudoautosomal region; RAPD, rapid amplification of polymorphic DNA;  $R_{syn}$ ,  $dS_Y/dS_X$

Academic Editor: Hans Ellegren, University of Uppsala, Sweden

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Deborah.Charlesworth@ed.ac.uk

©These authors contributed equally to this work.

recombine with its homolog [12]. To further understand the evolution of suppressed recombination between X and Y chromosomes, we describe results from the plant genus *Silene*. This genus is a model for the study of plant sex chromosome evolution, since the sex chromosomes evolved recently [7,13].

One group of closely related dioecious *Silene* species (i.e., species with separate sexes) includes *S. latifolia*, *S. dioica*, and *S. diclinis*, which have an X-Y sex-determination system with a male-determining Y [1,14], while many *Silene* species are hermaphroditic or gynodioecious (i.e., some plants bear hermaphroditic flowers and others female flowers). Dioecy and sex chromosomes thus probably evolved within this genus [13]. All diploid *Silene* species have  $n = 12$  chromosomes [15], so there is no evidence for neo-sex chromosome formation, although an autosomal region of unknown size has been duplicated on the Y [16].

Several sex-linked genes from *S. latifolia* have recently been identified and sequenced (Table 1), allowing progress in understanding the evolution of these sex chromosomes. Four genes have functional X- and Y-linked homologues. Very different X-Y divergence of two gene pairs suggested that different Y chromosome regions probably ceased recombining at different times in these species' evolutionary history [17]; testing this hypothesis requires knowing the genes' locations on the sex chromosomes. We here describe a new gene pair in *S. latifolia*, *SIX3* and *SIY3* (together termed locus 3; Table 1), and present the first genetic map for the X chromosomes in three dioecious species. Divergence between the X and Y chromosomal copies of the different genes indeed correlates with increased distance from the PAR, but the time scale is very different from that in mammals. Three genes (locus 3, the *SIX4-SIY4* pair [termed locus 4], and *DD44*) ceased recombining long before the three dioecious species split, whereas the X and Y copies of *SIX1-SIY1* (termed locus 1) continued to recombine until recently. We discuss the implications of these results for the mechanism of recombination arrest between the sex chromosomes.

## Results

### Characterization of Gene 3

Locus 3 was identified from *S. latifolia* cDNA. The *SIX3* open reading frame of 575 amino acids encodes a protein sequence similar to calcium-dependent protein kinases (CDPKs) from tobacco, rice, and *Arabidopsis thaliana* (the best BLAST hits had

75%–80% amino acid identity, based on more than three-fourths of the length). CDPKs are associated with various kinds of stress responses [18]. Thus, locus 3 is probably a sex-linked housekeeping gene, like the previously characterized X-Y-linked genes in *S. latifolia* [17,19].

### Phylogenetic Analysis of the Four Sex-Linked Genes

Figure 1 shows the estimated phylogenetic relationships based on single X and Y copies of the four loci from each species in which sex linkage has been confirmed. Except for locus 1 (discussed below), each gene falls into distinct X and Y clades, showing that these genes ceased recombining well before the split of the present dioecious species, consistent with large X-Y divergence in both *S. latifolia* and *S. dioica* [17,20]. Not surprisingly for such closely related species [13], the phylogenies of the three dioecious species are inconsistent for these genes. For example, one Y-linked gene supports each of the possible clades *latifolia-dioica*, *latifolia-diclinis*, and *dioica-diclinis* (Figure 1).

Gene 1 X-Y divergence is much less than that of the other genes studied [17]. We therefore tested whether divergence between the X and Y copies started before or after the speciation event. The grouping of this gene by species in Figure 1 suggests independent *X1-Y1* divergence in the three dioecious lineages. For such closely related sequences, however, analysis using single X and Y sequences from each species confounds fixed differences between species with within-species polymorphisms, and can be misleading, given that *S. latifolia* is a highly variable species [21]. Ancestral polymorphisms persisting through the speciation event also obscure close phylogenetic relationships, particularly inferences using X-linked genes, which have large within-species polymorphism [7,22]. Finally, the well-documented introgression between *S. latifolia* and *S. dioica* [23] may contribute to the phylogenetic discrepancies.

We therefore analyzed the *X1-Y1* gene pair separately, using multiple sequences from two species. If *X1-Y1* divergence started sufficiently long before the species split, some sites should share the same fixed differences between X and Y sequences in both *S. latifolia* and *S. dioica*. The number of such sites depends on the amount of time after recombination ceased; for the genes other than gene 1, this number is large (see above), but for gene 1 no such sites were found. If, on the other hand, *X1* and *Y1* diverged after the species split, some sites should differ between the species, but not between X and

**Table 1.** Description of the Four X-Y Gene Pairs and the PAR Marker Used in the Analyses

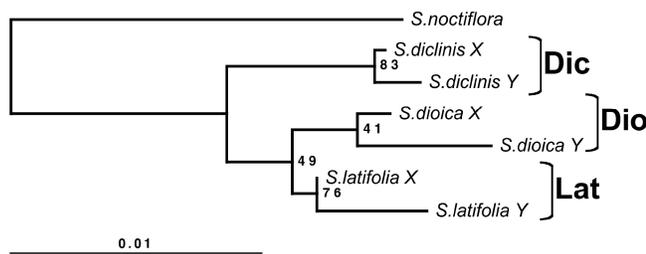
Gene Pair	Gene Designation	Deduced Function	Copy Number	Alignment Length	References for <i>S. latifolia</i> or <i>S. dioica</i> Sequences
SIX1 / SIY1	1	WD repeat proteins	4–5	1,374 (49) <sup>a</sup>	19
DD44X / DD44Y	DD44	Potential oligomycin sensitivity-conferring proteins	1 <sup>b</sup>	651 (75) <sup>a</sup>	20
SIX3 / SIY3	3	Putative CDPK	1	954 (99) <sup>a</sup>	This paper
SIX4 / SIY4	4	Fructose-2,6-bisphosphatases	1	1,089 (126) <sup>a</sup>	17
ScOPA09	OPA	No apparent function	1	–	41

<sup>a</sup> For the four genes, the alignments include coding sequences of both X and Y copies in *S. latifolia*, *S. dioica*, and *S. diclinis*, and the orthologous sequence from a close outgroup (*S. vulgaris* or *S. noctiflora*). The values correspond to the number of sites with no gaps or ambiguous bases. Values in parentheses indicate the numbers of diverged sites.

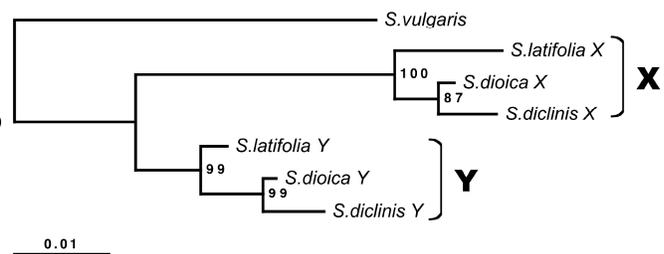
<sup>b</sup> *DD44* is also single-copy in *S. latifolia* [20], but at least two copies are found in other *Silene* species, including *S. dioica* (V. Laporte, unpublished data) and other species (J. Ironside, Univ. of Birmingham, UK, unpublished data). In our *S. dioica* material, there are three tightly linked X-linked copies (B. Janousek, unpublished data). Thus this duplication does not affect our mapping conclusions.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.t001

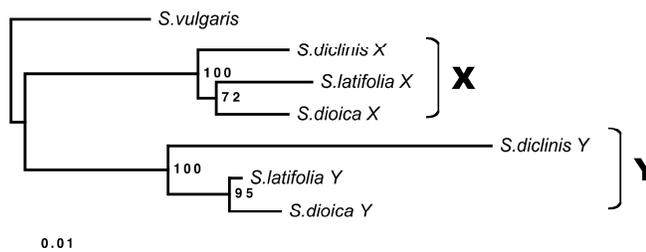
## Gene 1



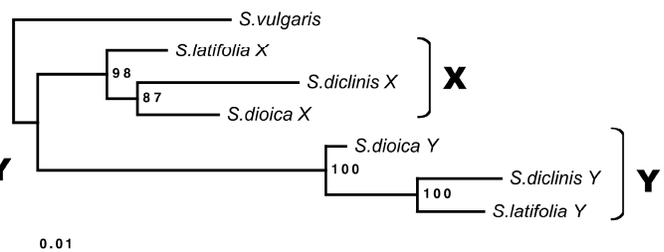
## DD44



## Gene 3



## Gene 4



**Figure 1.** Phylogenetic Trees for *DD44* and Loci 1, 3, and 4

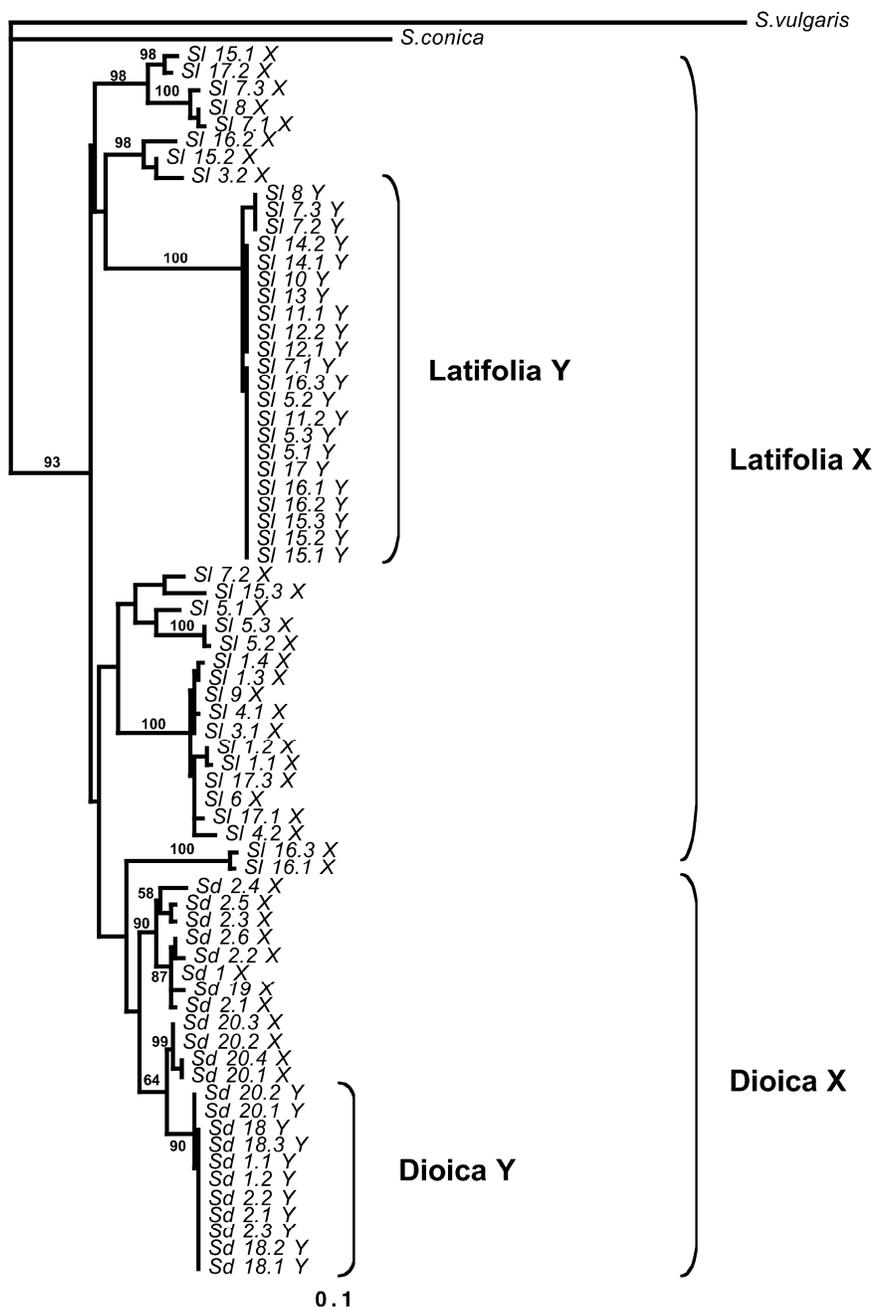
All trees were estimated from coding sequence alignments (using all sites except gaps) under the BIONJ method with Kimura-two-parameters corrected distances, using Phylo\_Win software [43]. Other methods (maximum parsimony and ML) give very similar results. Branch lengths correspond to total sequence divergence under the model assumed (see scale bars). Values indicated at the nodes are bootstrap values exceeding 50% (based on 500 replicates). *S. vulgaris* was used as an outgroup (except for locus 1, for which a closer outgroup, *S. noctiflora*, was used). Dic = *S. diclinis*, Dio = *S. dioica*, Lat = *S. latifolia*. The numbers of sites analyzed are in Table 1. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.g001

Y of the same species. This is found for mammalian and bird sex chromosomes, and phylogenetic analysis suggests that some X and Y (or, in birds, Z and W) genes ceased recombining independently in different taxa [24,25]. However, because the dioecious *Silene* species are very closely related [13], there are few fixed differences, and, using global gap removal to be conservative, none between the *XI* sequences. However, some Y variants are exclusive to each species; we found five nucleotide variants fixed only in the *S. latifolia* Y (plus nine indel variants), and ten fixed only in *S. dioica* Y (plus one indel). Since only 11 *S. dioica* Y sequences were analyzed, the number of fixed Y variants is probably overestimated, however (some may actually be polymorphic in this species). Furthermore, in a tree estimated excluding these sites with fixed differences in the Y-linked sequences (as is appropriate for such closely related species), the Y sequences are nested within those of the X of each species (Figure 2), implying suppression of X-Y recombination within these species. This suggests the possibility of independent cessation of recombination after speciation. However, we cannot exclude the possibility that recombination stopped shortly before the dioecious species split. Under this alternative, if the *YI* genes retained some polymorphism, variants in the *YI* genes would become fixed differences when Y chromosome diversity was lost within each species; according to this hypothesis, however, each species must, by chance, have retained *YI* variants closest to its own X sequences.

### Correlation between X-Y Divergence and Position on the X Chromosome

The gene order is the same in *S. latifolia* and in the *S. diclinis* × *S. latifolia* hybrid (Figure 3A). Locus 1 is closest to the PAR. If the *S. diclinis* and *S. latifolia* maps differed by an inversion or other rearrangement, the map using hybrid parents should contain a non-recombining region; this was not observed. Thus, the gene order determined in the *S. diclinis* × *S. latifolia* hybrid must also apply in *S. diclinis*. In *S. dioica*, however, the map order of locus 1 and *DD44* is reversed relative to the other species (Figure 3A).

Synonymous divergence ( $dS$ ) between the X and Y sequences of *S. latifolia* and *S. diclinis* ( $dS_{X-Y}$ ) correlates with the gene's distance from the PAR in the X chromosome genetic map (Figure 3B). X-Y synonymous divergence in *S. latifolia* does not differ significantly between genes 3 and 4, but these genes' synonymous divergence values differ significantly from that for genes 1 or *DD44* (with  $p < 0.01$ ). X-Y synonymous divergence also differs significantly between genes 1 and *DD44* ( $p = 0.01$ ). These results suggest progressive suppression of the recombination between X- and Y-linked alleles of different genes. In *S. dioica*, the same correlation exists, using the *S. latifolia* or *S. diclinis* gene order; thus, the rearrangement probably arose recently in *S. dioica*, consistent with its absence in the other dioecious species. A recent rearrangement, such as an inversion, after the *DD44*-X and -Y sequences had diverged for some time, would not affect this gene's X-Y divergence relative to that of gene 1. In



**Figure 2.** Phylogenetic Tree for Gene 1, including Within-Species Diversity

The tree was estimated using PHYL software [52] from a DNA alignment including coding sequences and introns of 12 X and 11 Y *S. dioica* alleles, and 26 X and 22 Y from *S. latifolia* [22]. There were 973 sites, excluding gap regions, among which 154 variable sites were used. The estimation used the BIONJ algorithm with global gap removal. The percentage of invariant sites, the transition-transversion ratio, and the  $\alpha$  parameter of a  $\gamma$  distribution of substitution rates, were estimated by the program, and we assumed four categories of evolutionary rates, to take into account the different evolutionary dynamics of coding and intron sites. The HKY substitution model was used. Bootstrap values exceeding 50% (based on 100 replicates) are indicated at the nodes, but some bootstrap values exceeding 50% for terminal nodes are omitted because of lack of space. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.g002

mouse species, where rearrangements have occurred, evolutionary strata corresponding to those on other mammalian X chromosomes are still plainly discernible [26].

#### Comparing Sequence Divergence of X and Y Copies

Analysis of the coding sequences shows that all four Y-linked genes appear to encode functional sequences; in each case, the nonsynonymous divergence ( $dN$ ) was less than  $dS$  for divergence between X and Y sequences ( $dN/dS$  values in Table 2); although  $dN$  is high for the *DD44* gene pair, it is considerably below  $dS$ . These results are consistent with cDNA representation of all sequences except the Y-linked copy of gene 3; despite repeated attempts, this copy never

amplified from leaf cDNA, whereas the X chromosome copy amplified consistently (see Materials and Methods).

The Y copies of all genes have higher  $dS$ ,  $dN$ , and  $dN/dS$  values than the X-linked copies, except for *DD44* (Table 2). However, the differences are significant only for  $dN$ . The differences in the numbers of synonymous differences are also nonsignificant, taking into account diversity within species. Synonymous site evolution is significantly faster in *DD44-X* than in *DD44-Y*, in contrast to the other genes, where the Y tends to evolve faster than X copies (although the differences are nonsignificant; Table 2). Exon 1 of *DD44* is particularly divergent [20], but our results for this gene are similar if we exclude this exon (unpublished data). The results

for gene 1 presented in Table 2 cannot be interpreted reliably because of polymorphisms within the species (see above), which would cause overestimation of numbers of substitutions. Overall, therefore,  $dN$  is clearly higher in the Y copies of genes 3 and 4, but its mutation rate is not higher, since X-Y differences in  $dS$  are nonsignificant; combining the probabilities from the likelihood ratio (LR) tests for these two genes, the  $dN/dS$  difference between Y and X is highly significant ( $\chi^2 = 11.7$ , with 4 degrees of freedom). Our observation of similar  $dS$  values contrasts with previous analyses [27], probably because we used only synonymous sites, rather than synonymous plus noncoding sites. The *S. diclinis* Y3 gene also seems to evolve faster than the other Y3 genes (see Figure 1); for this gene, the difference is seen for both synonymous sites (6-fold increase) and nonsynonymous ones (3.6-fold increase), but it is significant only for synonymous sites.

## Discussion

### Progressive Differentiation of the X and Y Chromosomes

The correlation of  $dS_{X-Y}$  of these dioecious plants with distances from the PAR in the X chromosome genetic map suggests that suppression of recombination between X and Y genes progressed, starting from an “ancient” sex chromosomal region (presumably containing the primary sex determining loci) and moving toward the current PAR. This pattern resembles the “evolutionary strata” for mammalian X-Y gene pairs based on  $K_s$  values, a measure of divergence per site similar to  $dS$  [9,10]. However, the time scale is much shorter for the plant sex chromosomes. The largest  $dS_{X-Y}$  values among our four gene pairs is 26% for locus 3 in *S. diclinis*. This overlaps the values for the mammalian stratum 4 and 3 genes (mean  $K_s$  values 8% and 30%, respectively); these strata are inferred to have ceased recombining between the X and Y 30–50 million years ago (MYA) for stratum 4, and 80–130 MYA for stratum 3, whereas strata 1 and 2 diverged 130–320 MYA [9,11].

The *S. latifolia*, *S. dioica*, and *S. diclinis* X-Y sequence divergence data show that X-Y differentiation was already advanced in the common ancestor of these species, except for locus 1. The maximum synonymous X-Y divergence observed for our genes is approximately 25%, including *SlAp3*, which probably transposed from an autosome onto the Y soon after the sex chromosomes evolved [16]; all these genes appear to be functional. This divergence is also similar to that for *MROS3-X/Y*, whose Y-linked copy is degenerated [6]. Unless genes with higher divergence are discovered in the male-determining region of Y chromosomes of dioecious *Silene* species, the *Silene* sex chromosomes must have evolved much more recently than mammalian sex chromosomes.

There are few reliable absolute molecular clock calibrations in plants [28], and none for *Silene*. For the nuclear genes *Chs* and *Adh* in the family Brassicaceae, estimated rates are, respectively,  $1.4 \times 10^{-8}$  to  $2.2 \times 10^{-8}$  substitutions per synonymous site per year [29], and a similar value was estimated for *Ipomoea* [30]. Using synonymous site divergence values suggests an age estimate of 5–10 MYA for the sex chromosomes of the *S. latifolia* group of species. However, substitution rates for some plant *Adh* genes are almost ten times slower, particularly for plants with long generation times [31]. Thus, a greater age cannot be excluded. It is

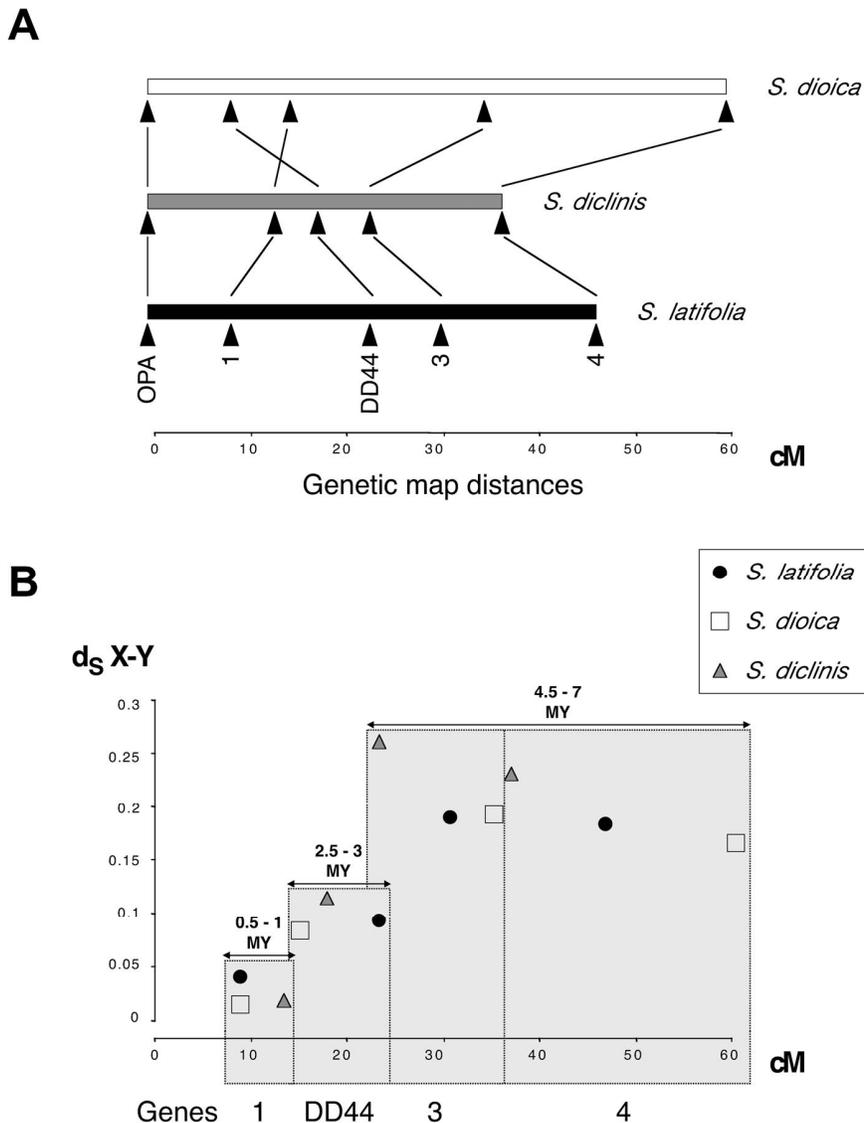
nevertheless clear that the X and Y copies of genes 3, 4, and *DD44* differentiated before the *S. dioica*–*S. latifolia*–*S. diclinis* speciation, whereas gene 1 may have ceased recombining after this, perhaps independently in *S. latifolia* and *S. dioica*; no analysis can be done in *S. diclinis* without diversity data for this species, but suppression of X-Y recombination within this species after its split from the other dioecious species is also possible (Figure 1). If this event occurred shortly before the dioecious species split, our results show that it must have happened in such a way that the Y-linked copy of gene 1 retained some diversity, in other words, by some mechanism other than an inversion (see below). Suppression of X-Y recombination (diminution of the PAR) has occurred quickly, and probably independently, in different mammalian and bird lineages [24,25,32].

The mechanism suppressing X-Y recombination is unknown. Recombination could be reduced either by inversions (or other major recombination rate changes), and/or by modifiers reducing local crossover rates. The “strata” of different divergence in mammalian sex chromosomes may have resulted from a series of Y inversions disrupting X-Y recombination [9]. Inversions exist between human X and Y chromosomes [10], but have not yet been explicitly related to the strata, so they may not be the sole cause of the divergence differences. Moreover, new pairs of X-Y linked genes recently analyzed do not suggest clear-cut boundaries between strata; divergence values for strata 3 and 4 genes are not discontinuous [10]. Finally, the *amelogenin* gene, at the strata 3–4 boundary, is not disrupted by an inversion [25]. Thus, gradual modification of recombination rates may have played a part in reducing recombination in some regions of the X-Y pair, in both *Silene* and mammals. Testing this for the dioecious *Silene* species requires a Y-chromosome map. The present map, based on deletion mutants in *Silene* [20,33], requires further markers and deletions for detailed comparison with the genetic map of the X chromosome. *S. latifolia* Y deletion mutants with altered meiotic X-Y pairing (unpublished data) suggest that the *S. latifolia* Y may carry genes suppressing recombination, and should help test whether mechanisms other than inversions contributed to reduction of the PAR.

The mechanism of recombination reduction between X and Y chromosomes is important for understanding the diversity in loci that recently ceased recombining, such as gene 1 in *Silene*. Recombination suppression may be selectively favored to preserve advantageous Y-linked combinations of alleles at different loci, such as genes that are advantageous in males but not in females [34], although it seems unlikely that all three dioecious species studied here could recently have acquired advantageous Y-linked genes. Involvement of selectively favored inversions causing the formerly pseudoautosomal gene 1 to become Y-linked might be detectable from sequence data, since a selective sweep would be expected. This would contribute to low diversity for all the Y-linked genes, consistent with the long branches in Y lineages (Figures 1 and 2). However, although Y-linked diversity is low, there is no evidence of such events in the frequency spectra of the genes [7,22].

### Degeneration of the Y Chromosome

Our analyses suggest that both reduction of recombination and Y degeneration may be in progress for *Silene* sex



**Figure 3.** X Genetic Maps in the Three Dioecious Species versus Plot of Synonymous Divergence

(A) Gene orders and the map positions of the genes. The PAR is not drawn to scale, as there is only one marker, and the map shows only the portion of the X chromosome containing our marker genes. Vertical lines connect the homologous genes in the three species, and the chromosomal rearrangement in *S. dioica*, are shown by crossed lines for locus 1 and *DD44*. (B) Plot of synonymous divergence between X and Y pairs ( $d_{S_{X-Y}}$ ), estimated using PAML, against the map position using the gene order in *S. latifolia* and *S. diclinis* (see text). Synonymous divergences are statistically significantly distinguished for the following three groups of genes: locus 1, the *DD44* gene, and loci 3 and 4 (see text). The figure also indicates minimum and maximum X-Y divergence time estimates for the genes, assuming a molecular clock and  $1.8 \times 10^{-8}$  synonymous substitutions per synonymous site per year (the mean of the values  $1.4 \times 10^{-8}$  and  $2.2 \times 10^{-8}$  discussed in the text). DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.g003

chromosomes. Degeneration is likely, since genotypes with a Y but no X chromosome are inviable [1,35], but so far, only one degenerated plant Y-linked gene has been found, *MROS3-Y* in *S. latifolia* [6]. The extent of genetic degeneration and gene loss in the *Silene* Y is uncertain, because most currently known sex-linked genes in these plants were ascertained from a cDNA-based search for Y-linked genes. Bacterial artificial chromosome clone sequencing may provide unbiased comparisons of homologous X- and Y-linked regions, and this has been started in papaya [4]. Some degeneration of Y-linked genes in *Silene* can also be inferred when  $dN$  values in the Y are elevated compared with X lineages. This is seen for the two “old” *Silene* Y-linked genes, locus 3 and locus 4 (Table 2). Differences in  $dS$  are systematically lower than in  $dN$  (the ratio of  $dS$  values for X and Y lineages is close to 1, but  $dN$  is roughly 3-fold larger overall for Y lineages). Thus the higher  $dN$  in the Y-linked alleles is not due to a higher mutation rate (higher  $dS$ ) in the Y than the X. Moreover, the Y-linked copy of locus 3 fails to amplify in RT-PCR experiments, and may be degenerated.

These observations, plus those for gene 1 (see Results), suggest that Y copies of genes loci 1, 3, and 4 evolve faster than X copies, due either to a higher rate of fixation of advantageous mutations in the Y copies or to accumulation of slightly deleterious amino acid variants in the Y copies (Y degeneration). To discriminate between these hypotheses, McDonald-Kreitman tests can be done to compare fixed differences (divergence) and polymorphisms and test for an excess of selectively advantageous nonsynonymous substitutions [36]. At present, this is possible only for genes 1 and 4; there were no nonsynonymous polymorphisms for *DD44*, and no diversity data have yet been obtained for gene 3. The result of this test was nonsignificant; there is thus no evidence that *Y1* and *Y4* evolution is driven by selection. There is, however, very low polymorphism in the Y copies, so the test has low power [27].

Genetic degeneration is supported by low levels of polymorphism of Y- compared with X-linked genes, taking into account the lower Y effective population size [7,22]. This difference is predicted in a degenerating Y chromosome,

because various hitchhiking processes leading to degeneration, including selective sweeps, background selection, and weak Hill-Robertson effects [5] reduce diversity, even at loci that are not themselves degenerating.

Why is degeneration so slight for our *Silene* Y-linked genes? Our analyses suggest that degeneration of the genes studied here is partial, at most, consistent with a recent origin of the *Silene* sex chromosomes. However, there has probably been enough time for degeneration, since this occurred rapidly for genes on the neo-Y chromosomes of *D. miranda* [8], which are much younger than the *Silene* Y. *Silene* sex chromosomes are more advanced in sex chromosome evolution than in some other plants. The papaya sex-determining region is just a small nonrecombining part of one chromosome, yet there is evidence for considerable differentiation, including addition of repeat sequences and some evidence for gene loss [4]. More likely, the Y-linked genes we have studied (which are all housekeeping genes) are under selective constraints. The lower effective population size of Y-linked genes, and thus the expected reduced efficacy of selection ([5]) may thus be too slight to allow the Y copies of these genes to lose function, but merely allows higher amino acid substitution. Our findings parallel those for most loci on the *D. miranda* neo-Y chromosome [37], the bird W chromosome [38], and in other situations in which effective population size is reduced, such as protein-coding genes of the endosymbiont *Buchnera* [39]. In all these cases, genes evolving without recombination retain homology with their ancestral copies, but undergo faster amino acid replacement (including several frameshift and deletion mutations in the *D. miranda* neo-Y [37]), suggesting that the common factor is weakened ability of natural selection to preserve adaptation.

## Materials and Methods

**Plants used and nucleic acid extraction.** *S. latifolia* plants were from Edinburgh (D. Charlesworth personal collection) and from Fontainebleau forest (France). *S. dioica* plants were collected in Corrèze (France). *S. dioica* plants from the *Sherringham* population (Sherringham, England), used for isolation of the *ScOpa09* marker, were kindly provided by D.L. Mulcahy (Department of Biology, University of Massachusetts). *S. noctiflora* and *S. vulgaris* were obtained from the seed collection of the Lyon Botanical Garden (Lyon, France). Seeds of *S. diclinis* were obtained from the seed collection of the Institute of Biophysics in Brno (Czech Republic). Interspecific hybrid *Silene diclinis* × *latifolia* plants were generated by pollination of a *S. diclinis* female with pollen of an MAV line male (*S. latifolia*) kindly provided by S.

Matsunaga (Department of Biotechnology, Osaka University). The *S. latifolia* U9 line, which was used for pollination of the interspecific hybrid, was kindly provided by S. Grant (Department of Biology, University of North Carolina).

Genomic DNA was extracted from leaves as described [19]. For RT-PCR from total leaf RNA, first-strand cDNA was reverse transcribed using RevertAid M-MuLV RT (Fermentas, Vinius, Lithuania) and the oligo-dT primer T11VN (5'-TTTTTTTTTTTTVN-3').

**Isolation of *SIX3/SIY3*.** Locus 3 was identified in *S. latifolia* by the approach that yielded loci 1 (*SIX1/SIY1* [19]) and 4 (*SIX4/SIY4* [17]). From an initial partial cDNA sequence of a clone that hybridized to a probe containing Y-linked sequences, both 3' and 5' RACE-PCR were performed [19], and the final coding sequence was obtained by sequencing the RT-PCR product obtained using primers 11S10 (5'-ATCACCATCATCATTTCCACC-3') and 11AS11 (5'-CAGT-GAAATCTTTCATTTACCAGC-3'). Segregation analysis (see below) showed that this sequence corresponds to *SIX3*. The *SIY3* sequence was obtained from genomic DNA by PCR genomic walking [40], using the specific primers 11AS15 (5'-TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTG-CAC-3') and 11AS15C (5'-TGCACAAGATGGACTGGCTACAA-TACG-3') for the first and second PCR, respectively, and Ex Taq polymerase (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) for both PCR reactions. Similarly to gene 4 [17], Southern blot analysis showed that gene 3 is present as a single copy in the *S. latifolia* genome.

**Amplification and sequencing of orthologous sequences.** The orthologs of each of the four gene pairs in Table 1 were amplified in *S. dioica*, *S. diclinis*, and *S. noctiflora* or *S. vulgaris* using primers designed from *S. latifolia* sequences (Table 3, which also provides GenBank accession numbers). All sequences were amplified from cDNA, except for *Y3*, which was amplified from genomic DNA. The PCR conditions, using Taq polymerase (Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey, United States), were as follows. One incubation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at a temperature that depended on the primers for 30 s, and elongation at 72 °C for a time depending on the length of the amplicon (Table 3); and a final extension at 72 °C for 5 min.

All genes, except gene 1, are single-copy (see Table 1). In *S. latifolia*, three or four copies of gene 1 are detected in Southern blots [19], and the *A. thaliana* genome has five copies, *AtMSI4* (GenBank accession number AF028711) being the probable ortholog of *SIYX1*. In *S. latifolia*, some of the copies have been shown not to be sex-linked (F. Monèger, personal communication). Southern blots were not done in *S. dioica* or *S. diclinis*, but RT-PCR reactions in all the dioecious species always amplified a single sequence in the females plus another very similar sequence in males, clearly representing the expected X and Y copies. Thus, for the analyses presented later, this gene can be treated as a single-copy gene, as was also the case in previous mapping work [20].

For locus 3, the 3' two-thirds of the coding sequences of *S. dioica*, *S. diclinis*, and *S. vulgaris* were amplified, either by RT-PCR (X copies) or from genomic DNA (Y copies). PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, United States), and multiple clones were sequenced for each gene. Sequencing reactions were carried out with ABI Big Dye Terminator V1.1 DNA sequencing kit, on an Applied Biosystems 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States).

**Sex linkage and genetic mapping.** Sex linkage of three gene pairs studied here was previously demonstrated in either *S. dioica* or *S. latifolia*. We have now confirmed sex linkage of all four loci by segregation analysis in all three dioecious species (Figure 4), and, for genes 1, 4, and *DD44*, by population studies using allele-specific PCR reactions to show that the putative Y-linked alleles are consistently present only in males, while the X-linked ones amplify in both sexes [17,22] and unpublished data).

Only X-linked genes can be mapped genetically, because the Y chromosome recombines with the X only in the PAR. For each locus, gene-specific primers were used to amplify X alleles from genomic DNA of potential seed parents. The PCR product was directly sequenced and the chromatograms inspected for polymorphisms scorable by restriction enzyme digestion (Table 4). Progeny of heterozygous mapping family females were sexed and genotyped for the maternal alleles. In *S. diclinis*, no suitable polymorphisms were found, so the loci were ordered in a *S. diclinis* × *S. latifolia* hybrid plant pollinated by a *S. latifolia* male.

To orient the X genetic map, we used a pseudoautosomal marker. For this, we cloned and sequenced a RAPD fragment incompletely linked to the X chromosome of the pollen donor of the *S. dioica* family in which this marker was originally developed [41]. The sequence encodes a protein with similarity to an *Oryza sativa* putative non-long terminal repeat reverse transcriptase (E value =  $2.5 \times 10^{-10}$ ; accession

**Table 2.** Comparison of Evolutionary Rates in the X and Y Clades

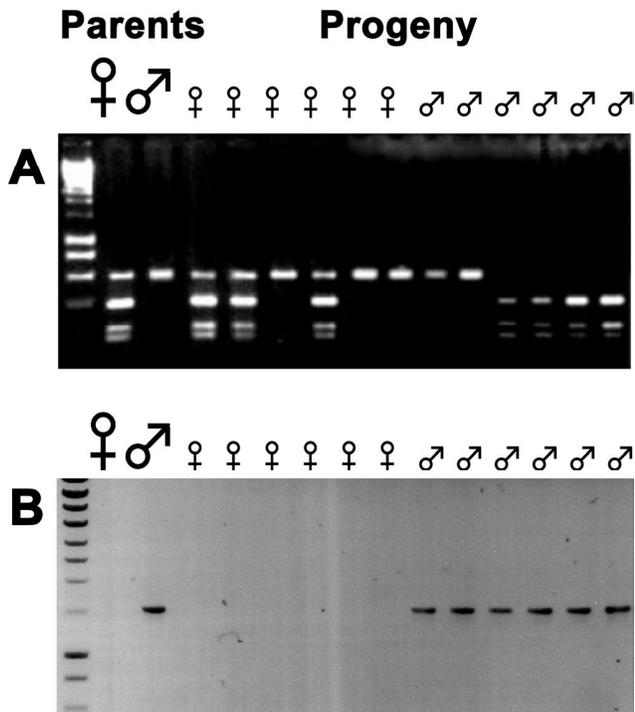
Gene	dS	dN	dN/dS
1	X = Y $R_{YX} = 1.93$	X < Y <sup>a</sup> $R_{YX} = 14.26$	X = Y 0 0.126
DD44	X > Y <sup>b</sup> $R_{YX} = 0.23$	X = Y $R_{YX} = 0.89$	X < Y <sup>a</sup> 0.181 0.738
3	X = Y $R_{YX} = 1.07$	X < Y <sup>a</sup> $R_{YX} = 2.85$	X = Y 0.047 0.142
4	X = Y $R_{YX} = 0.93$	X < Y <sup>a</sup> $R_{YX} = 2.95$	X = Y 0.124 0.277

LR tests between models with X = Y and X ≠ Y were performed using the ML-based software HyPhy.  $R_{YX}$  is the X/Y ratio of dS or dN values. For the dN/dS analyses, the values in the table are the dN/dS values for X and Y lineages. Nonsignificant differences are indicated as "X = Y."

<sup>a</sup> Significance of the LR test is  $p < 5 \times 10^{-2}$ .

<sup>b</sup> Significance of the LR test is  $p < 5 \times 10^{-3}$ .

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.t002



**Figure 4.** Segregation Analysis of Locus 3 in *S. dioica*

To test for sex linkage, the female and male parents of the family and six progeny of each sex were genotyped. Genomic DNA preparations from these plants were used in PCR amplifications. The PCR products were separated by electrophoresis and visualized using ethidium bromide.

(A) With primers specific for the *X3* allele, the restriction enzyme *RsaI* reveals an allelic polymorphism. The maternal plant is heterozygous and has both cut and uncut alleles while the male parent has only the uncut allele. Female progeny always have the uncut allele (like the father), and male progeny have one of the maternal alleles, but never both, corresponding to the expected segregation of the X chromosome.

(B) Primers specific for the Y gametolog. A product amplifies only with male DNA, corresponding to the expected segregation of the Y chromosome.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.g004

number Q9FW98 in the UniProt/TrEMBL database, but contains stop codons. Primers (ScOPA09F1: 5'-GCAATTCACCATCCTCTGCT-3' and ScOPA09R1: (5'-ATGGTCTTGGGCCCTTATC-3') were designed from this sequence. In plants grown from seeds of this family, presence or absence of the expected amplified fragment accords exactly with results using the original pseudoautosomal RAPD

marker primer OPA09. With our primers, *S. dioica* plants from the Corrèze population were genotyped by digesting PCR products with the restriction enzyme *TaqI*; the recombination frequency between the marker locus and sex was approximately 2.5%, confirming the pseudoautosomal location. In *S. latifolia*, genotyping was done using the same primers and an *AluI* site polymorphism. Genotype data were analyzed by both three-point and multipoint mapping, using JoinMap version 1.4 [42]. Thus the gene orders are well established; Table S1 gives estimated genetic distances between markers and their standard errors.

**Phylogenetic analysis.** The primer sequences were removed before sequence analyses. For each gene, the nucleotide sequences were aligned using the corresponding amino acid sequences as a guide, using ClustalW with the Seaview interface (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) [43]. Alignment lengths are given in Table 1.

Phylogenetic trees were estimated including all sites except those with gaps by neighbor joining (NJ), maximum parsimony, and maximum likelihood (ML), using PhyloWin (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) [43]. For NJ trees, we used Kimura two-parameter corrected distances; results with other distances corrected for multiple hits were similar, as the sequences are not highly diverged and have similar GC content (unpublished data). Branches were tested by bootstrapping (500 replicates). Trees were edited with NJplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) [44] and TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) [45].

**Divergence analysis.** Both *dS* and *dN* site divergences were estimated using PAML 3.13 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) [46] and JaDis (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) [47]. Estimates of *dS* and *dN* are similar under various substitution models (namely, Goldman and Yang 1994 [46], Yang and Neilson 2000 [48], and Nei and Gojobori 1986 [49], implemented in PAML; and Li 1993 [50] using JaDis). We report values from the ML approach based on the Goldman and Yang 1994 codon-based model [46].

Values for *dS* or *dN* of X and Y sequences were compared using HyPhy 0.99 (Kosakovsky Pond, personal communication; <http://www.hyphy.org>), using the alignment and NJ tree for each gene, including the outgroup species (Figure 4) to polarize the synonymous and nonsynonymous substitutions between X and Y genes into X-specific and Y-specific lineages, using ML. To build the likelihood function, we used the MG94xHKY85 codon-based substitution model with different transversion and transition rates. We compared *dS* values under two models for each gene. Model 1 ("relative synonymous rates") expresses *dS* values for Y lineages as multiples of values for X lineages:  $R_{syn} = dS_Y/dS_X$ . In model 2 ("equal synonymous rates"),  $R_{syn}$  was constrained to be equal to 1 ( $dS_Y = dS_X$ ). We compared the ML values by a LR test with model 2 as the null hypothesis. We used the same approach to compare *dN* values (with *dN/dS* replacing  $R_{syn}$ ). To compare *dN/dS* using LR tests, we again defined two models. Model 1 assumed two global variables ( $dN/dS_X$  and  $dN/dS_Y$ ) so that the nonsynonymous rates of branches of the X lineage were expressed in terms of the synonymous rate ( $dN/dS_X$ ), and similarly using ( $dN/dS_Y$ ) for Y branches ("shared *dN/dS*"), while model 2 ("shared and equal *dN/dS*") assumed ( $dN/dS_X = dN/dS_Y$ ).

To test whether *S. diclinis* *Y3* evolves faster than other *Y3* sequences, we assumed a common  $R_{syn}$  for *S. dioica* and *S. latifolia*, as in model 1 above, but added a further parameter, the  $dS_Y/dS_X$  ratio for *S. diclinis* (model 1\*). We compared models 1 and 1\* using a LR test as above; we tested *dN* and *dN/dS* differences similarly.

McDonald-Kreitman tests were done using DNAsp software,

**Table 3.** Primers and Annealing Temperatures Used for RT-PCR Amplification of the Genes Listed in Table 1

Gene	Primer Sequences	Annealing Temperature (°C)	Elongation Time
1	57S14 (5'-AGAGATGACGGAGAAAGGAAAGGAGGC-3')	60	1 min 30 s
	57AS37 (5'-TCAAGCAGAATGATTAACGTC-3')		
DD44	11S36 (5'-GACAGCCGATATACAGAGAAAGATGC-3')	55	1 min 40 s
	11AS15 (5'-TCAGTGTCTCCTTGAGTTCTTGAC-3')		
3	11S36 (5'-GACAGCCGATATACAGAGAAAGATGC-3')	55	1 min 40 s
	11AS15 (5'-TCAGTGTCTCCTTGAGTTCTTGAC-3')		
4	95S17 (5'-CAAATGGGTCGAATCAATCAGCCCA-3')	60	1 min 30 s
	95AS4 (5'-CTGCAGCCGAGGATGCCTGTCAA-3')		

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.t003

**Table 4.** Primers Used for Mapping

Locus		<i>S. latifolia</i>	<i>S. dioica</i>	<i>S. latifolia</i> × <i>S. diclinis</i>
1	Primers	57S35: 5'-TGGACTTCCACTGGAATTCGAT-3'	57S1: 5'-ATTCGCTCTTGCAATGTGCTCTTCTGAA-3'	57S1: 5'-ATTCGCTCTTGCAATGTGCTCTTCTGAA-3'
		57vAS12: 5'-AGGGTGCATTTCATTACCTC-3'	57AS34: 5'-GTCAGTGGTGTCAATCCAGCTCTTG-3'	57AS34: 5'-GTCAGTGGTGTCAATCCAGCTCTTG-3'
	Polymorphism	CAPS (HpaI)	CAPS (EarI)	DFLP
	Accession numbers	Y18519, Y18518	AJ631218, AJ631219	<i>S. diclinis</i> AJ631220, AJ631221
3	Primers	11S1: 5'-AGAAATGGCAAGAGCTGTCAAAAGAGC-3'	11S1: 5'-AGAAATGGCAAGAGCTGTCAAAAGAGC-3'	11S18: 5'-ATGTTAAACGAGAAGTGAAGATACTGAA-3'
		11AS2: 5'-CATTCTGGGGGTGAAAGTGAATAACAGC-3'	11AS11: 5'-CAGTGAATCTTTCATTACCAGC-3'	11AS13: 5'-GGTGATGACCCAATACTCC-3'
	Polymorphism	CAPS (EcoRI)	CAPS (RsaI)	DFLP
	Accession numbers	AJ631223, AJ631224	AJ631225, AJ631226	AJ631227, AJ631228
DD44	Primers	DD44F1: 5'-GTGTTGCACATGCCATCAGAACC-3'	DD44F1: 5'-GTGTTGCACATGCCATCAGAACC-3'	DD44S3: 5'-CCAAAGAGGTTTCAGAGCTAAC-3'
		DD44R1: 5'-CCATCACTCTTATTTTATGCAGG-3'	DD44R1: 5'-CCATCACTCTTATTTTATGCAGG-3'	DD44AluR: 5'-TTCCTTCAGTCTTCTCTCA-3'
	Polymorphism	CAPS (AluI)	CAPS (MspI)	CAPS (AluI)
	Accession numbers	AJ631230, AJ631231	AJ631232, AJ631233	AJ631234, AJ631235
4	Primers	95vS11: 5'-GTGGCCTGGGCGTCTATGTG-3'	95S1: 5'-CCACTGGGAAGTTGCCCTGTCT-3'	95S17: 5'-CCAAATGGGTTGGAATCAATCAGCCCA-3'
		95vAS3: 5'-AATTACCGAAGACAGTAAAGCGTC-3'	95AS6: 5'-GGTCAATCACACAGTTGATA-3'	95AS20: 5'-GAATAAACAGCATTAAACCTAACACC-3'
	Polymorphism	DFLP	CAPS (NciI)	CAPS (MwoI)
	Accession numbers	AJ310660, AJ310659	AJ632099, AJ632100	AJ632101, AJ632102
ScOPA09 <sup>a</sup>	Primers	OPASHF1: 5'-GCAATTCACCATCCTCTGCT-3'	OPASHF1: 5'-GCAATTCACCATCCTCTGCT-3'	OPASHF3: 5'-TCCGACCAGTCCCTATCAAG-3'
		OPASHR1: 5'-ATGGTCTTTGGGCCCTTATC-3'	OPASHR1: 5'-ATGGTCTTTGGGCCCTTATC-3'	OPASHR1: 5'-ATGGTCTTTGGGCCCTTATC-3'
	Polymorphism	CAPS (AluI)	CAPS (TaqI)	CAPS (KpnI)
	Accession number	ND	AJ716329	ND

Included here are primers used for mapping the four X-Y gene pairs and the PAR marker; nature of the polymorphisms used as markers (i.e., DFLP indicates length polymorphism of amplified fragments; restriction enzymes used for CAPS analysis are included in parentheses); and accession numbers of either the partial cDNA sequences obtained by RT-PCR (listed as X sequence, Y sequence) or the genomic sequence of the pseudoautosomal sequence. Details of PCR primer annealing temperatures for the different species are available from the authors on request. ND, no data.

<sup>a</sup> The annealing temperature for ScOPA09 was 55 °C, and elongation time was 1 min 30 s.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.t004

version 3.95 [51]. The divergence and polymorphism data used are from previous work and were available only for genes 1 and 4 [17]; there were no nonsynonymous polymorphisms for *DD44*, and no diversity data are yet available for gene 3.

To test for differences in divergence between the X and Y sequences of different genes, we compared numbers of fixed X-Y differences in *S. latifolia* by contingency tests, using DNAsp. To infer fixed differences rigorously, we used diversity data within *S. latifolia* for genes 1, 4, and *DD44*. For gene 3 no diversity data are yet available; however, because this gene pair has high X-Y divergence, raw divergence values should suffice, so for this gene we estimated numbers of differences from single X and Y sequences.

**Analysis of gene 1.** To test whether X and Y sequences of gene 1 continued recombining and started to diverge after the dioecious species split, a C program was written to find fixed differences in a set of multiple *S. latifolia* and *S. dioica* Y and X sequences, plus one sequence from each of two outgroup species, *S. vulgaris* and *S. conica*; this enables us to identify whether the changes were in the X or Y lineages, using parsimony. With global gap-removal, the program unambiguously distinguishes fixed differences, including insertions and deletions, from polymorphisms within species. The outgroup sequences are shorter than the other sequences, so some fixed differences in the *S. dioica* Y could not be analyzed.

As this dataset includes the first approximately 2,000 sites of gene 1, including coding and intron sequences [22], a more sophisticated model for sequence evolution is required for phylogenetic analysis than for the coding sequences analyzed above. We estimated the percentage of invariant sites, and the transition to transversion ratio, and fitted a GAMMA distribution, estimating its ALPHA parameter

with four categories of sites evolving at different rates, using the HKY (Hasegawa, Kishino, Yano [52]) model as the global substitution model. The tree was estimated using NJ (BIONJ) with global gap removal, using a fast ML-based program, PHYML (<http://www.lirmm.fr/guindon/phyml.html>) [53], excluding fixed differences from the multiple alignment (to avoid conflicting phylogenetic signals between fixed and polymorphic differences). The statistical support for the tree was estimated by bootstrapping (100 replicates), using SEQBOOT, followed by CONSENSE to make a consensus tree with the resulting 100 PHYML trees.

## Supporting Information

**Table S1.** Recombination Fractions (Rf) between the Loci, and Standard Errors of Rf Values

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0030004.st001 (36 KB DOC).

## Accession Numbers

The GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) accession number for *AtMSI4* is AF028711; the UniProt/TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/trEMBL/>) accession number the *ScOpa09* marker is Q9FW98.

## Acknowledgments

We thank DL Mulcahy for kindly providing seeds of *S. dioica* used for ScOPA09 marker characterization. We also thank the Jardin Botanique de la ville de Lyon, P Vergne, S Matsunaga, and S Grant

for providing *Silene* seeds. We thank C Trehin, P Chambrier, and S Garcia for help in sequencing locus 3; S Guindon for help with PHYML; SL Kosakovsky Pond for help with HyPhy; and T Johnson and S Glémin for discussions on gene 1. This project was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Ecole Normale Supérieure, Université Lyon I, Institut Federatif de Recherche 128, BV, VH, and BJ were funded by the Grant Agency of the Czech Republic (grant numbers 204/02/0417 and 522/02/1485) and the Institutional Research Plan (AV0Z5004920). VH was also funded by the Ministère des Affaires Étrangères. BJ and GM were funded by European Union (Marie Curie postdoctoral fellowships HPMF-CT-2002-02101 and HPMF-CT-

2002-02010, respectively), and VL was funded by a postdoctoral fellowship from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council of the United Kingdom.

**Competing interests.** The authors have declared that no competing interests exist.

**Author contributions.** GM, BJ, VL, BV, DC, and FM conceived and designed the experiments. MN, VH, BJ, VL, and FM performed the experiments. GM, VH, BJ, and DC analyzed the data. GM, DC, VL, DM, and FM contributed reagents/materials/analysis tools. IN discussed the paper, and GM, DC, and FM wrote the paper. ■

## References

- Westergaard M (1958) The mechanism of sex determination in dioecious plants. *Adv Genet* 9: 217–281.
- Volff JN, Scharl M (2001) Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111: 101–110.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Amer Nat* 112: 975–997.
- Liu Z, Moore PH, Ma H, Ackerman CM, Ragiba M, et al. (2004) A primitive Y chromosome in *Papaya* marks the beginning of sex chromosome evolution. *Nature* 427: 348–352.
- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1563–1572.
- Gutman DS, Charlesworth D (1998) An X-linked gene has a degenerate Y-linked homologue in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Nature* 393: 263–266.
- Filatov DA, Monéger F, Negrutiu I, Charlesworth D (2000) Evolution of a plant Y-chromosome: Variability in a Y-linked gene of *Silene latifolia*. *Nature* 404: 388–390.
- Bachtrog D (2003) Adaptation shapes patterns of genome evolution on sexual and asexual chromosomes in *Drosophila*. *Nat Genet* 34: 215–219.
- Lahn BT, Page DC (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286: 964–967.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825–837.
- Waters PD, Duffy B, Frost CJ, Delbridge ML, Graves JAM (2001) The human Y chromosome derives largely from a single autosomal region added to the sex chromosomes 80–130 million years ago. *Cytogenet Cell Genet* 92: 74–79.
- Lawson-Handley LJ, Ceplitis H, Ellegren H (2004) Evolutionary strata on the chicken z chromosome: Implications for sex chromosome evolution. *Genetics* 167: 367–376.
- Desfeux C, Maurice S, Henry JP, Lejeune B, Gouyon PH (1996) Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263: 409–414.
- Lebel-Hardenack S, Grant S (1997) Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci* 2: 130–136.
- Goldblatt P (1981) Index to Plant Chromosome Numbers 1975–1978. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 553 p.
- Matsunaga S, Isono E, Kejnovsky E, Vyskot B, Kawano S, et al. (2003) Duplicative transfer of a MADS box gene to a plant Y chromosome. *Mol Biol Evol* 20: 1062–1069.
- Atanassov I, Delichère C, Filatov DA, Charlesworth D, Negrutiu I, et al. (2001) A putative monofunctional fructose-2,6-bisphosphatase gene has functional copies located on the X and Y sex chromosomes in white campion (*Silene latifolia*). *Mol Biol Evol* 18: 2162–2168.
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, et al. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* 132: 666–680.
- Delichère C, Veuskens J, Hernould M, Barbacar N, Mouras A, et al. (1999) SIY1, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. *EMBO J* 18: 4169–4179.
- Moore RC, Kozyreva O, Lebel-Hardenack S, Siroky J, Hobza R, et al. (2003) Genetic and functional analysis of DD44, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome evolution. *Genetics* 163: 321–334.
- Vellekoop P, Buntjer JB, Maas JW, van Brederode J (1996) Can the spread of agriculture in Europe be followed by tracing the spread of the weed *Silene latifolia*. A RAPD study. *Theor Appl Genet* 92: 1085–1090.
- Filatov DA, Laporte V, Vitte C, Charlesworth D (2001) DNA diversity in sex linked and autosomal genes of the plant species *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Mol Biol Evol* 18: 1442–1454.
- Goulson D, Jerrim K (1997) Maintenance of the species boundary between *Silene dioica* and *S. latifolia* (red and white campion). *Oikos* 79: 115–126.
- Ellegren H, Carmichael A (2001) Multiple and independent cessation of recombination between avian sex chromosomes. *Genetics* 158: 325–331.
- Iwase M, Satta Y, Hirai Y, Hirai H, Imai H, et al. (2003) The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5258–5263.
- Sandstedt SA, Tucker PK (2004) Evolutionary strata on the mouse X chromosome correspond to strata on the human X chromosome. *Genome Res* 14: 267–272.
- Filatov DA, Charlesworth D (2002) Substitution rates in the X- and Y-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Mol Biol Evol* 19: 898–907.
- Gaut BS (1998) Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evol Biol* 30: 93–120.
- Koch M, Haubold B, Mitchell-Olds T (2000) Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis* and related genera (Brassicaceae). *Mol Biol Evol* 17: 1483–1498.
- Durbin ML, Learn GH, Huttley GA, Clegg MT (1995) Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3338–3342.
- Gaut BS, Morton BR, McCaig BC, Clegg MT (1996) Substitution rate comparisons between grasses and palms: Synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10274–10279.
- Marais G, Galtier N (2003) Sex chromosomes: How X-Y recombination stops. *Curr Biol* 13: R641–643.
- Lebel-Hardenack S, Hauser E, Law TF, Schmid J, Grant S (2002) Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. *Genetics* 160: 717–725.
- Rice WR (1997) The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex-chromosomes. *Evolution* 41: 911–914.
- Ye D, Installé P, Ciuperescu C, Veuskens J, Wu Y, et al. (1990) Sex determination in the dioecious *Melandrium*. I. First lessons from androgenic haploids. *Sex Plant Repr* 3: 179–186.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Accelerated protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 351: 652–654.
- Bachtrog D, Charlesworth B (2002) Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. *Nature* 416: 323–326.
- Fridolfsson A-K, Ellegren H (2000) Molecular evolution of the avian *CHDI* genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* 155: 1903–1912.
- Herbeck JT, Funk DJ, Degnan PH, Wernergreen JJ (2003) A conservative test of genetic drift in the endosymbiotic bacterium *Buchnera*: Slightly deleterious mutations in the chaperonin groEL. *Genetics* 165: 1651–1660.
- Devic M, Albert S, Delseny M, Roscoe TJ (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol Biochem* 35: 331–339.
- DiStilio VS, Kesseli R, Mulcahy DL (1998) A pseudoautosomal random amplified polymorphic DNA marker for the sex chromosomes of *Silene dioica*. *Genetics* 149: 2057–2062.
- Stam P (1993) Construction of integrated genetic-linkage maps by means of a new computer package - JoinMap. *Plant J* 3: 739–744.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) PHYLO\_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12: 543–548.
- Perrière G, Gouy M (1996) WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364–369.
- Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357–358.
- Goldman N, Yang Z (1994) A codon-based model of nucleotide substitution from protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol* 11: 725–736.
- Goncalves I, Robinson M, Perrière G, Mouchiroud D (1999) JaDis: Computing distances between nucleic acid sequences. *Bioinformatics* 15: 424–425.
- Yang ZH, Neilson R (2000) Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol Biol Evol* 17: 32–43.
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418–426.
- Li W-H (1993) Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J Mol Evol* 36: 96–99.
- Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3.0: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174–175.
- Yano, Hasegawa M, Kishino H, Yano TA (1985) Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. *J Mol Evol* 22: 160–174.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.

### 1.3 Conclusions et perspectives

Ces travaux ont tout d'abord permis de montrer que la même paire d'autosome est à l'origine des chromosomes sexuels chez les trois espèces dioïques. Depuis, il a été montré que les gènes 1, 4 et DD44 sont présents sur une même paire d'autosomes chez une espèce non dioïque proche, *S. vulgaris* (Filatov, 2005). Ceci va donc dans le sens d'une origine de ces chromosomes sexuels à partir d'une seule paire d'autosome comme décrit par Ohno. Le résultat majeur de ce travail est la démonstration d'un arrêt progressif de la recombinaison. Il y a un gradient du taux de divergence depuis la région où sont supposés être localisés les gènes de la détermination du sexe, en partie proximale du bras p (Lardon et coll., 1999 ; Farbos et coll., 1999), jusqu'à la partie distale du bras q où est située la région pseudo-autosomale. Ces résultats vérifient donc la théorie de l'étalement de l'arrêt de la recombinaison depuis la région de la détermination du sexe. Nous montrons que ce processus, mis en évidence chez les animaux et en particulier chez les mammifères (Lahn et Page 1999 ; Skaletsky, 2003), existe aussi chez les plantes et qu'il pourrait donc bien être universel. Ce genre de travail a également été effectué chez le poulet, mais il avait seulement permis de montrer l'existence de deux strates, c'est-à-dire de deux niveaux différents de divergence, ce qui n'est pas suffisant pour suggérer un arrêt progressif chez cette espèce. Un minimum de trois strates est essentiel pour supposer sérieusement un arrêt progressif. Comme cela a été évoqué dans l'introduction, la notion de strates est discutable car elle n'est peut-être le reflet que d'une mauvaise résolution due à l'utilisation d'un nombre insuffisant de gènes. L'augmentation du nombre de gènes pourrait révéler un arrêt plus linéaire et non pas par palier. Ne disposant que de quatre gènes, nous ne sommes pas actuellement en mesure de vérifier si l'arrêt de la recombinaison est linéaire ou réellement par palier chez nos espèces. Il serait intéressant d'avoir de nouveaux gènes et en particulier ceux de la détermination du sexe. Situés à l'opposé de la région pseudo autosomale, ils sont d'un intérêt évident aussi bien du point de vue de l'évolution moléculaire des chromosomes sexuels que de celui de la génétique du développement floral. Les mécanismes moléculaires de l'arrêt de la recombinaison restent par ailleurs inconnus aussi bien chez les mammifères que chez le genre *Silene*. Même si l'arrêt progressif est conservé entre les deux taxons, les gènes responsables ne le sont pas forcément. On peut très bien imaginer le recrutement au cours de l'évolution de molécules différentes pour arriver au même résultat, l'arrêt progressif de la recombinaison.

Quels sont les avantages sélectifs de la progression de l'arrêt de la recombinaison chez ces espèces dioïques du genre *Silene* ? Il semble que le chromosome Y chez *S. latifolia* se soit spécialisé dans les gènes avantageux pour le sexe mâle. Au laboratoire, nous avons en effet montré que des gènes intervenant dans le développement des étamines sont présents le long du bras q du chromosome Y (Zluvova et coll., papier soumis). Ce mécanisme d'accumulation des gènes spécifiques de la fonction mâle sur le chromosome Y qui va de pair avec l'étalement de l'arrêt de la recombinaison est donc lui aussi conservé chez *S. latifolia*.

Les analyses des séquences codantes effectuées afin de mettre en évidence des signes éventuels de dégénérescence des gamétologues Y n'ont pas permis de mettre en évidence des signes importants de dégénérescence dans les exons. Les

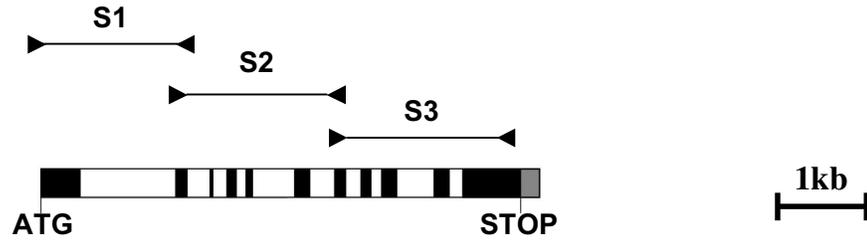
valeurs montrent un plus grand taux de substitutions synonymes et non synonymes pour les gamétologues Y que pour les gamétologues X. Le rapport entre les substitutions non synonymes et synonymes est également plus important pour les séquences liées au Y mais il reste nettement inférieur à un. L'accumulation de substitutions synonymes est donc plus importante que celle de substitutions non synonymes, ce qui signifie que des pressions de sélections doivent toujours s'exercer sur les gamétologues Y et qu'ils sont vraisemblablement toujours fonctionnels. Les signes de dégénérescence sont donc faibles ce qui est cohérent avec une origine récente des chromosomes sexuels chez les trois espèces. Cependant chez *Drosophila miranda*, les chromosomes sexuels sont encore plus récents, mais les signes de dégénérescence sont plus importants. Le temps de génération plus court chez les drosophiles en est peut-être la cause.

## 2 Analyse du gène 3

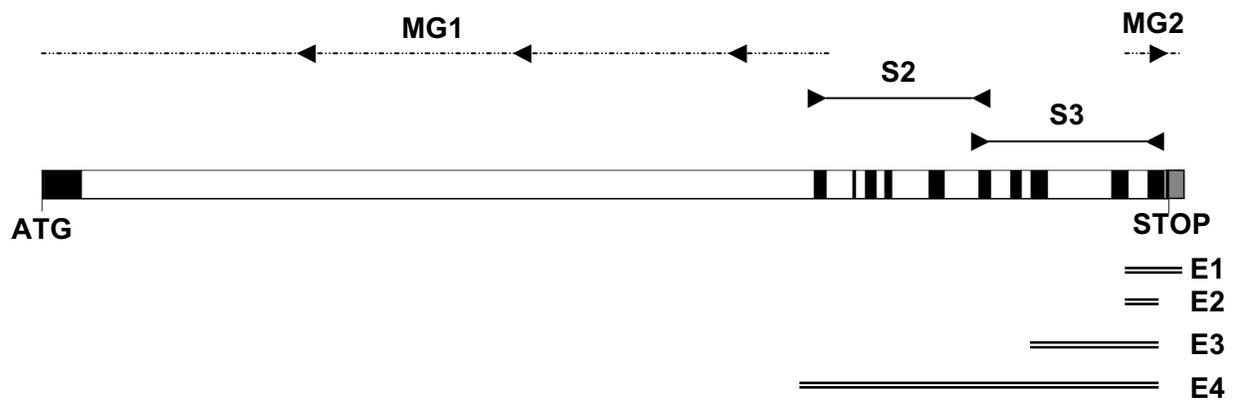
### 2.1 Caractérisation des séquences génomiques du gène 3

*SIY3* a été identifié en même temps que *SIY1* et *SIY4*. Grâce à la méthode de RACE-PCR, il a été possible d'obtenir l'ensemble des séquences d'ADNc des gamétologues X et Y des gènes 1 et 4 (Délachère et coll., 1999 ; Atanassov et coll. (2001) ainsi que celle de *SIX3*. En revanche il n'avait jamais été possible d'amplifier par cette méthode l'ADNc de *SIY3*. Ce gène paraissait donc intéressant car il était possible que seul le gamétologue X s'exprime. D'après les résultats que nous avons publié dans PLoS Biology, la séquence codante de *SIY3* ne présente pas de codon stop supplémentaire par rapport à *SIX3* et il ne semble pas que les exons accumulent plus de substitutions non synonymes que les autres gènes. Nous nous sommes donc intéressés aux introns de ce gène pour voir s'il y avait d'autres signes de dégénérescences moléculaires tels l'insertion d'éléments transposables. J'ai ainsi entrepris d'obtenir la séquence génomique des deux gamétologues *SIX3* et *SIY3*. A l'origine seule la séquence génomique d'un petit fragment de 500pb de *SIY3* situés juste avant le codon stop était connue. Pour *SIX3*, je disposais déjà de la séquence complète de l'ADN complémentaire. Grâce à cette séquence codante, j'ai pu dessiner trois couples d'amorces, que nous appellerons ici S1, S2 et S3 (figure 2). Ces trois couples ont permis d'amplifier l'ensemble de la séquence génomique de *SIX3* depuis le codon ATG jusqu'au codon stop. Les deux couples d'amorces permettant d'amplifier la partie 3' (S2 et S3) du gène *SIX3* m'a également permis d'amplifier la région équivalente de *SIY3*. Par contre, il n'a jamais été possible d'amplifier la première partie du gène en utilisant le couple d'amorce S1, ni même avec d'autres amorces dessinées à partir de la séquence de *SIX3*. Avec l'aide de Pierre Chambrier (technicien au laboratoire), nous avons donc effectué de la marche génomique (région MG1 sur la figure 2), pour amplifier cette dernière partie du gène. Celle-ci s'est avérée être beaucoup plus grande que celle du gamétologue X chez *S. latifolia*, notamment à cause de l'augmentation de la taille du premier intron (figure 2 et 4A).

*SIX3*



*SIY3*



**Figure 2: Structure des deux gamétoques du gène 3.**

Sur ce schéma, les exons apparaissent en noirs et les introns en blanc.

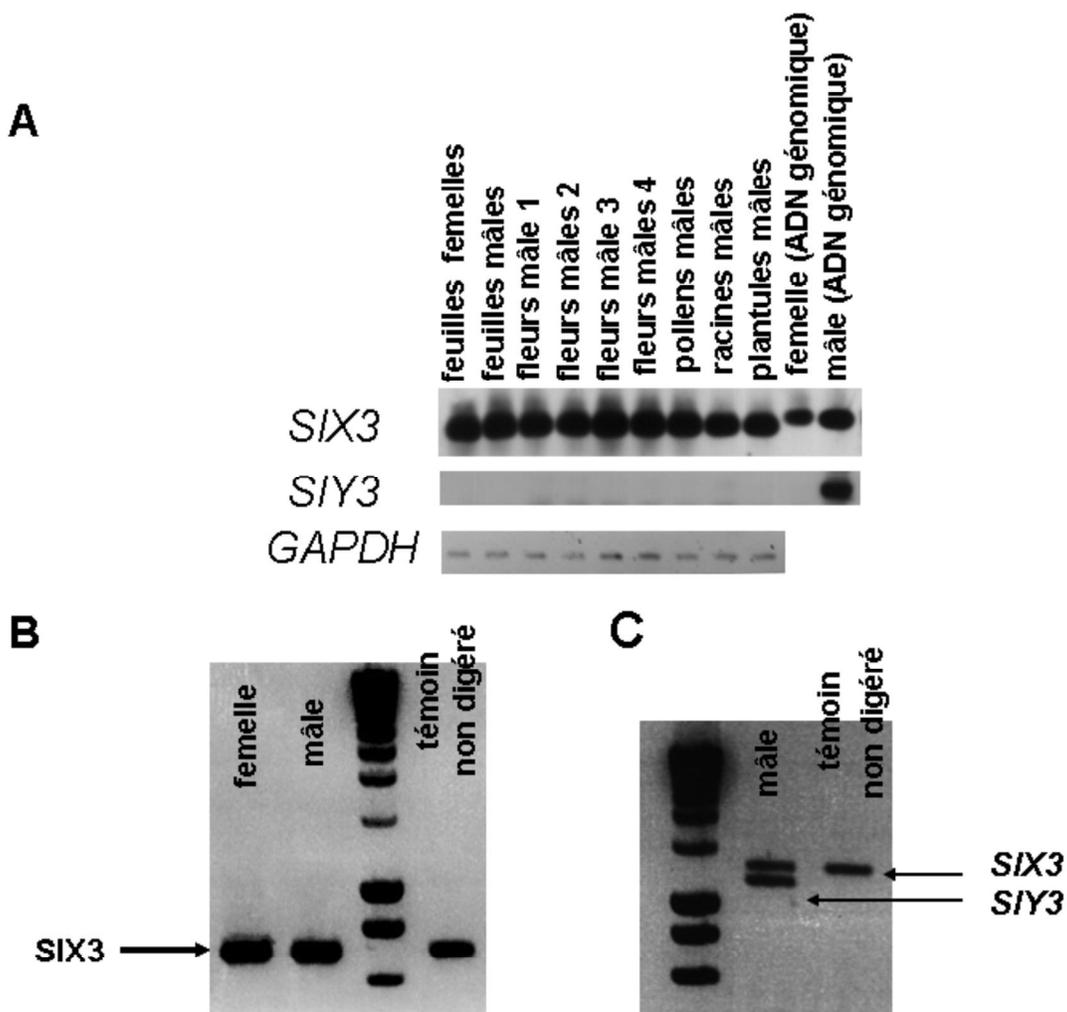
Les traits noirs encadrés par des flèches correspondent aux régions amplifiées par PCR et séquencées à l'aide des couples d'amorces S.

Les traits en pointillés correspondent aux régions qui ont été séquencées par marche génomique.

Les double traits correspondent aux régions qui ont été utilisées pour tester l'expression de *SIY3* à l'aide des couples d'amorces E.

## 2.2 *SIY3* s'exprime-t-il ?

L'obtention de la séquence génomique de *SIY3* m'a permis de dessiner des amorces pour tester l'expression de ce gamétologue. La séquence codante de *SIY3* n'est pas suffisamment divergente de celle de *SIX3* pour permettre son amplification spécifique en RT-PCR. J'ai donc effectué une nouvelle marche génomique (région MG2 sur la figure 2), cette fois dans la partie 3' du gène, région généralement plus divergente dans le but de pouvoir dessiner des amorces spécifiques de *SIY3*. Les séquences ainsi obtenues m'ont effectivement permis de créer une amorce anti-sens spécifique de ce gamétologue. Les analyses en RT-PCR effectuées en utilisant cette amorce (couple E1 sur la figure 2) ne montraient aucune amplification contrairement au contrôle témoin positif fait à partir d'ADN génomique. Pour être sûr que le fragment n'était pas présent en quantité non détectable au bromure d'éthidium, j'ai transféré l'ADN sur membrane de nylon et je l'ai hybridé avec une sonde spécifique. Les résultats obtenus semblaient suggérer qu'il n'y avait aucune expression de *SIY3* (figure 3A). Pour confirmer ces résultats, j'ai utilisé des amorces non-spécifique (couples E2, E3 et E4 sur la figure 2), mais dont il était possible de distinguer les deux gamétologue par polymorphisme de restriction. Les résultats obtenus ont été contradictoires. Les deux couples d'amorces amplifiant la région codante en 3' du gène 3 (E2 et E3) confirmaient les résultats précédents (figure 3B). Par contre, le dernier couple d'amorce (E4) amplifiant une plus grande région incluant tous les exons sauf le premier a révélé une expression de *SIY3* (figure 3C).



**Figure 3: Expression du gamétologue *SIY3*.**

**A:** test de l'expression de *SIY3* en utilisant le couple d'amorce spécifique S1. Les produits amplifiés par RT-PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon et hybridés avec une sonde du gène 3 non gamétologue spécifique. D'après ces résultats le gamétologue *SIX3* a une expression ubiquitaire alors que le gamétologue *SIY3* ne montre aucune expression.

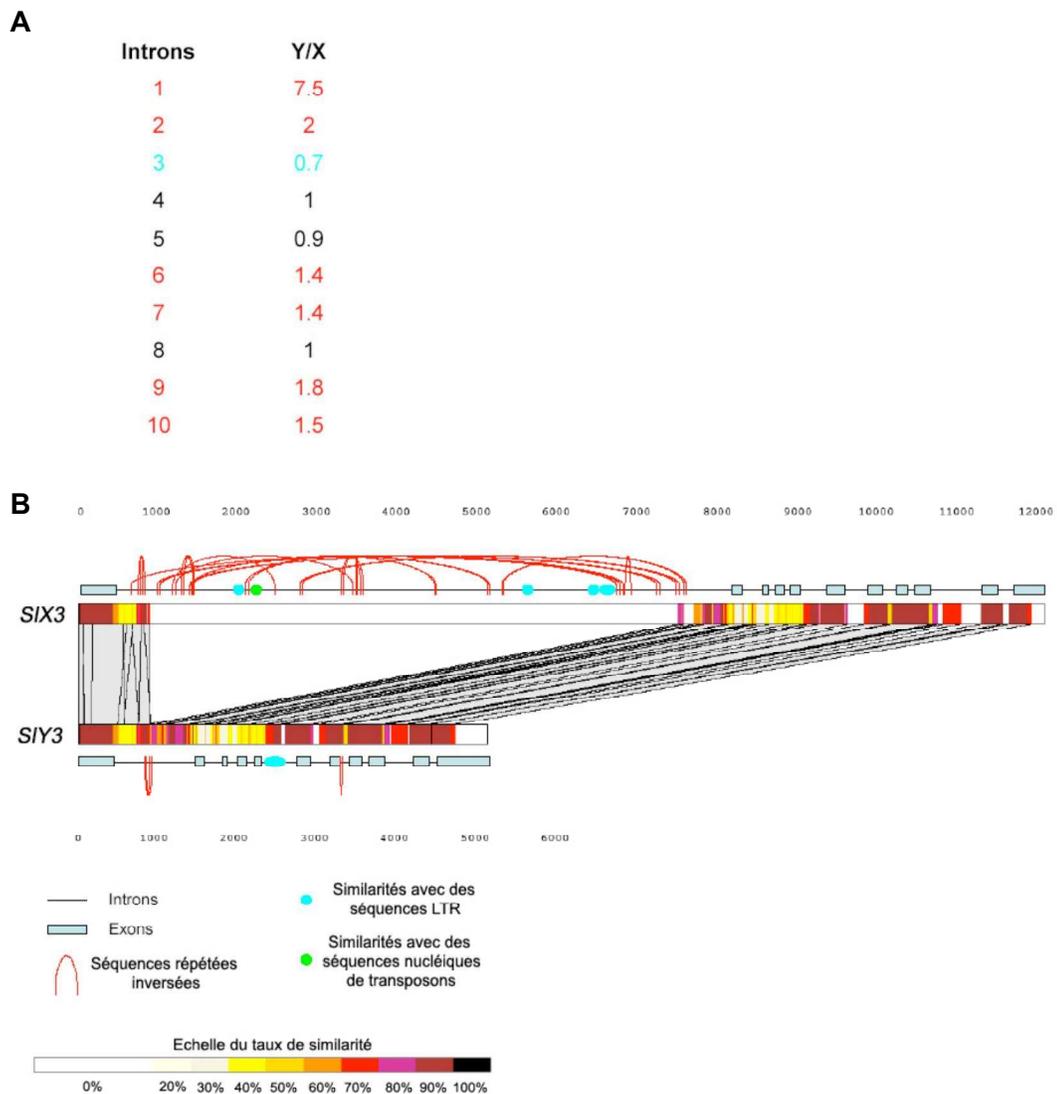
Les fleurs mâles 1 correspondent à des boutons d'une taille d'environ 2 mm, les fleurs de type 2 à des boutons d'une taille entre 2 et 5 mm, les fleurs de types 3 à des boutons d'une taille entre 5 et 10 mm et les types 4 à des fleurs ouvertes.

**B:** test de l'expression de *SIY3* par RT-PCR utilisant le couple d'amorce S3. Après digestion enzymatique par *DraI*, seul la bande non coupée correspond à *SIX3* est visible.

**C:** test de l'expression de *SIY3* par RT-PCR utilisant le couple d'amorce S4. Après digestion enzymatique par *NcoI*, les deux gamétologues *SIX3* et *SIY3* sont visibles.

### 2.3 Analyse des séquences génomiques de *SIY3*

Je me suis donc particulièrement intéressé aux signes de dégénérescence de ce gène. Avec l'aide de Gabriel Marais du laboratoire de Biométrie et Biologie évolutive, nous avons recherché quelles pouvaient être les causes de cette augmentation de taille observés dans bon nombre des introns (figure 4A). Nous avons tout d'abord utilisé le logiciel « RepeatMasker » qui permet de détecter les différents types de séquences répétées. Ce programme n'a permis de mettre en évidence que des répétitions simples de type poly A ou poly T. Nous avons donc effectué différents types de Blast afin de mettre en évidence la présence d'éléments transposables déjà répertoriés dans les bases de données. La recherche par Blastn, recherche des homologues entre séquences nucléotides, n'a pas détecté d'homologie de séquence significative avec les banques de données. Les recherches par la méthode BlastX (séquence nucléotidique traduite et comparaison avec les séquences protéiques de la base de données) et tBlastX (comparaison de la séquence nucléotidique traduite en protéine avec les séquences nucléotidiques de la base de donnée également traduites en protéines) n'ont également donné aucun résultat positif. Nous avons donc effectué des alignements locaux pour détecter spécialement de petites répétitions telles celles les éléments transposables. Cela nous a permis de mettre en évidence un bon nombre de séquences répétées inversées, notamment dans le premier intron qui pourraient bien correspondre à des extrémités d'éléments transposables (figure 4B). D'après les positions de ces séquences répétées, ces éléments transposables se seraient abondamment intégrés en se chevauchant.

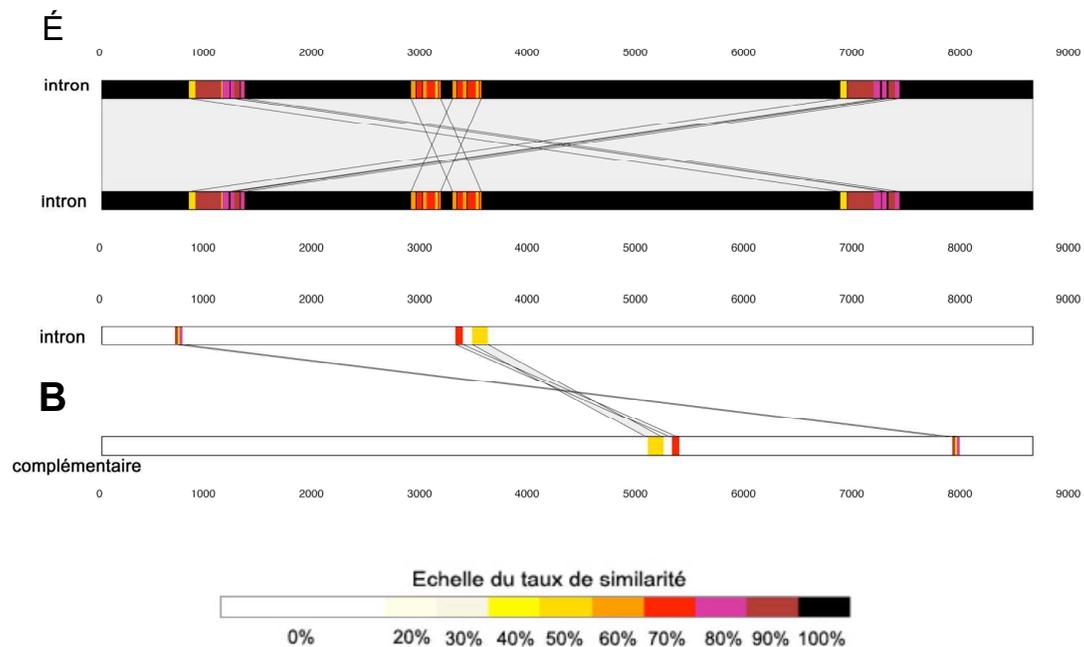


**Figure 4: Analyse des séquences génomiques du gène3.**

**A:** tableau indiquant pour chaque intron le rapport entre la taille de *SIY3* et celle de *SIX3*.

**B:** Schéma indiquant les taux de similarités entre les séquences génomiques de *SIX3* et de *SIY3*. Les différents taux sont représentés par une couleur distincte. Les séquences pouvant correspondre à celle d'éléments transposables ont été indiquées. Les traits rouges relient les séquences répétées inversées. Les points bleus indiquent la position des séquences présentant une similarité avec des séquences répétées inversées de rétroéléments connus. Les points verts, les séquences ayant une similarité avec des séquences de transposons.

Nous avons également recherché si des évènements de duplication ne peuvent pas être à l'origine de l'augmentation de la taille des introns et tout particulièrement du premier. Ce genre de duplication est visible en faisant des alignements locaux de la séquence du premier intron de *S/Y3* contre lui même pour les mettre en évidence. Ces alignements ont permis de mettre en évidence la duplication de deux blocs d'une longueur de quelques centaines de paires de bases (figure 5A). Nous avons également aligné cette séquence contre son complémentaire pour identifier éventuellement des duplications qui se seraient fixées en position inversée. Cette analyse a permis de montrer la duplication de trois blocs d'une taille d'une centaine de paires de bases (figure 5B).



**Figure 5: Analyse moléculaire du premier intron de *S/Y3*.**

Le schéma indique les taux de similarités entre les séquences génomiques du premier intron de *S/Y3* comparé à lui même (A) ou à son complémentaire (B). Les traits noirs relient les régions qui présentent de fortes similarités de séquences et qui peuvent correspondre à des séquences répétées. Les couleurs indiquent alors le pourcentage de similarité calculé pour chaque région répétée.

## 2.4 Conclusion

*SIY3* est particulièrement intéressant pour étudier les signes de dégénérescence moléculaire. D'après les résultats précédents, ce gène présentait avec le gène 4 la plus forte divergence au niveau de sa séquence codante. La différence de taille entre *SIX3* et *SIY3* est elle aussi des plus importantes. Il est d'ailleurs possible de faire une corrélation entre cette différence de taille et la date d'arrêt de la recombinaison. Le gène 1 qui a arrêté de recombiner récemment ne présente pas de différence de taille entre ses deux gamétologues (Délière, 1999). Pour le gène DD44, la différence est de 4000pb. Pour le gène 3 dont l'arrêt est encore plus ancien, j'ai pu montrer qu'elle est de plus de 6000pb. Pour le gène 4, la séquence de *SIY4* n'est pas encore complète, mais la différence semble être au moins aussi importante que pour le gène 3. A quoi est dû cette augmentation de taille ? Pour le gène 3, nous avons pour le moment pu montrer qu'il y avait eu quelques événements de duplication dans le premier intron, mais ceux-ci ne constituent pas la cause principale de l'augmentation de taille. Il semble bien qu'elle soit due à l'insertion d'éléments transposables. Le premier intron, qui est majoritairement responsable de cette augmentation, semble bien avoir été une cible privilégiée pour l'insertion de ces éléments transposables. Malheureusement, ils semblent bien être spécifique du genre *Silene*, car nous n'avons pu mettre en évidence la présence d'éléments connus dans les bases de données. Cependant, nous avons pu montrer la présence de petites séquences répétées inversées, ce qui est un premier élément en faveur de l'hypothèse d'insertion d'éléments transposables ; je suis actuellement en train de finir de séquencer l'orthologue de *SIY3* chez *S. dioica* et *S. diclinis*, les deux autres espèces dioïques proches de *S. latifolia*. Si des éléments transposables se sont intégrés au cours de l'évolution, ils ne se sont pas intégrés au même endroit dans les introns. En alignant les séquences des trois espèces, nous devrions retrouver des petites différences de tailles entre les séquences, qui pourront certaines fois correspondre à des différences d'intégrations. Il sera alors possible de mieux caractériser les séquences de ces éléments.

La caractéristique la plus intéressante du gène 3 est la variation potentielle de l'expression de *SIY3*. Pour les trois autres gènes, les gamétologues Y semblent avoir une expression identique à celle des gamétologues X, bien que des analyses en PCR quantitative n'aient jamais été effectuées. Il serait intéressant de voir s'il n'existe pas là aussi une corrélation entre le niveau d'expression des gamétologues Y et l'arrêt de la recombinaison. Pour le gène 3, les résultats sont contradictoires. La partie 3' du gène ne permet pas de mettre en évidence une expression de *SIY3* à la différence de la partie 5'. Y aurait-il un gradient décroissant du taux de transcrits depuis la région 5' vers la 3' ? Lorsque la rétrotranscription est effectuée à partir d'un oligo dT comme cela a été mon cas, il arrive parfois que le taux de l'ADN complémentaire entier, présentant donc la partie 5' soit inférieur à celui de cDNA plus court ne correspondant qu'à la partie 3'. Ceci est dû au fait que la reverse transcriptase arrête la polymérisation de l'ADN complémentaire avant la fin du transcrit. Etant donné que les séquences codantes de *SIX3* et *SIY3* sont très similaires, il est difficile de dessiner des amorces spécifiques des deux gamétologues pour tester leur niveau relatif en PCR quantitative. Nous allons essayer d'amplifier à l'aide d'amorces non spécifiques les deux gamétologues et estimer après clonage la représentativité du nombre de clones leur correspondant. L'analyse est en cours.

### 3 Sexe et chromosomes sexuels dans le clade de *S. otites*

#### 3.1 Introduction

Dans le genre *Silene*, toutes les espèces portent 12 paires de chromosomes et chez les espèces dioïques, une paire d'autosomes est remplacée par une paire de chromosomes sexuels (Degraeves, 1980). Dans le clade de *S. latifolia*, les chromosomes sexuels sont hétéromorphes et de type XY. Chez *S. otites*, ils sont homomorphes et la nature du sexe hétérogamétique est encore inconnue.

D'après nos résultats, la paire d'autosomes qui porte chez *S. vulgaris* les gènes 1, 4 et DD44 (Filatov, 2005) a été recruté il y a quelques dizaines de millions d'années pour former la paire de chromosomes sexuels présente chez *S. latifolia*, *S. dioïca*, *S. diclinis*. Cette même paire d'autosomes est-elle à l'origine des chromosomes sexuels chez *S. otites*? Cette espèce n'appartenant pas au même clade que *S. latifolia* (Desfeux et coll. 1996), l'apparition des chromosomes sexuels est indépendante et il n'y a donc pas de raison à première vue pour que ce soit le cas. Cependant, la grande majorité des espèces de *Silene* sont gynodioïques, laissant supposer que la gynodiécie est ancestrale chez le genre *Silene* (Desfeux et coll., 1996). De plus, il en est de même chez les genres *Agrostemma*, *Dianthus* et *Saponaria*, proches du genre *Silene* (Knuth, 1908 ; Pomonarev et Demyanova, 1975). La divergence entre ces quatre familles se serait donc produite après l'apparition de la stérilité mâle. Dans ce cas, la paire d'autosomes portant le locus de la stérilité mâle pourrait être prédisposée pour évoluer en chromosomes sexuels. Déterminer si les quatre gènes (1, 3, 4 et DD44) sont également présents sur les chromosomes sexuels de *S. otites* permettrait de vérifier cette hypothèse.

J'ai donc recherché, en collaboration avec Bohuslav Janousek, si les quatre gènes ont également une ségrégation lié au sexe chez cette nouvelle espèce. En parallèle, j'ai refait une phylogénie du genre *Silene* en utilisant le gène 3 et 4 pour confirmer que *S. otites* appartient bien à un clade distant de *S. latifolia*. En effet, l'arbre phylogénétique de Desfeux et collaborateur (1996) n'était pas très bien soutenu, vraisemblablement car les séquences utilisées étaient peu divergentes. J'ai également observé le phénotype floral de cette espèce pour le comparer à celui des trois autres espèces dioïques étudiées.

#### 3.2 Résultats

##### 3.2.1 Nouvelle phylogénie du genre *Silene*

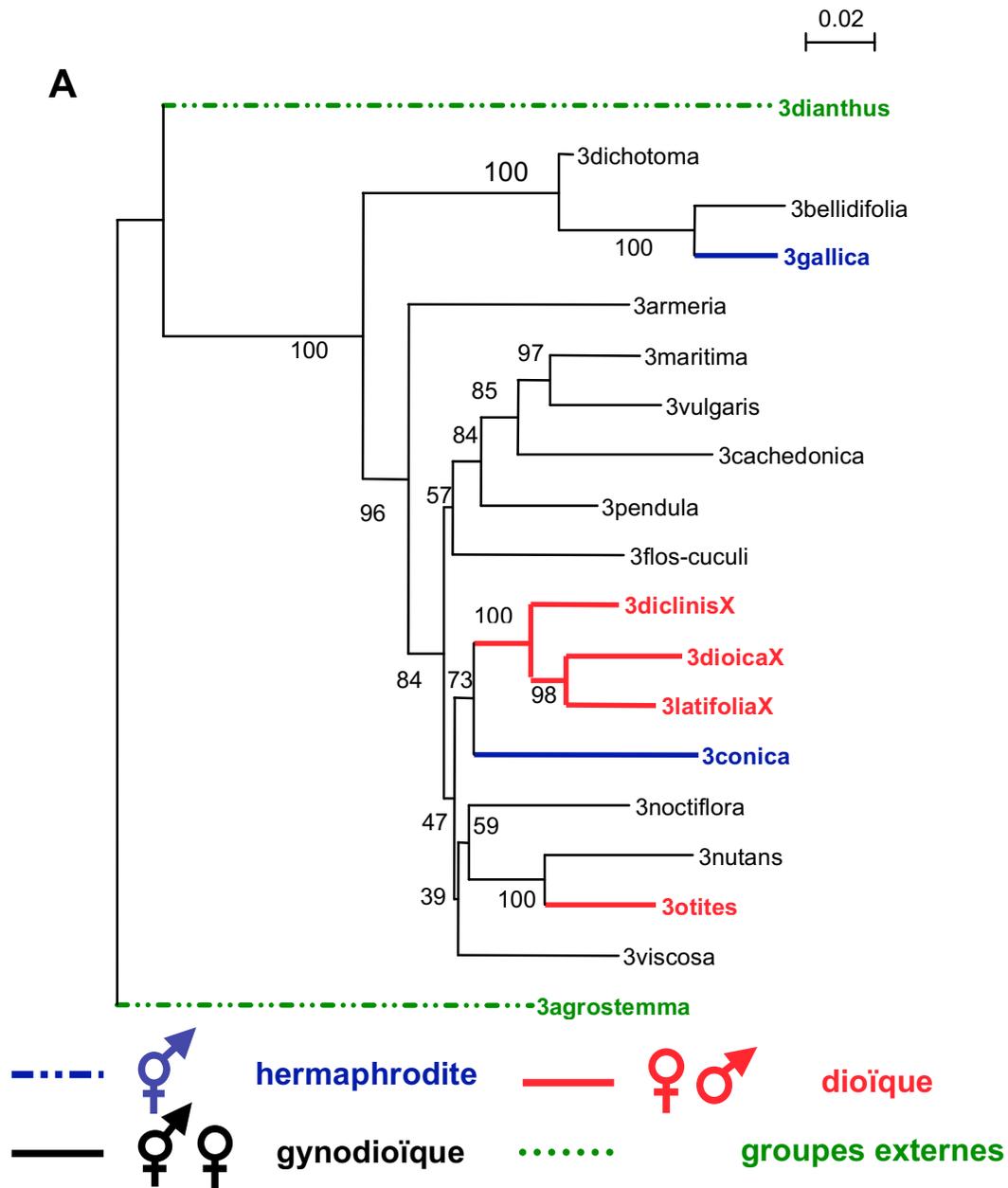
Pour cette étude de phylogénie, j'ai choisi d'utiliser une quinzaine d'espèces, pour la plupart déjà présentes dans les analyses de Desfeux et collaborateurs (1996), ainsi que deux des quatre groupes externes utilisés par cette équipe. Pour les espèces dioïques, seules les séquences des gamétologues X pour *S. latifolia*, *S. dioïca* et *S. diclinis* ont été utilisées ainsi que les séquences provenant d'une plante femelle pour *S. otites*.

Pour le gène 3, j'ai utilisé une région d'environ 1.5kb située au milieu du gène. Elle semblait potentiellement intéressante pour la phylogénie car incluant 7 exons et 6 introns ce qui la rend relativement polymorphe. L'arbre le plus robuste a été obtenu

en utilisant la méthode du "neighbor-joining" en effectuant les calculs par comparaison des espèces deux à deux (voir Matériels et Méthodes). Cependant quatre valeurs de "bootstrap" restent inférieures à 70 % (figure 6A). Sur cet arbre, les deux groupes externes, *Agrostemma ghitago* et *Dianthus seguieri*, sont bien regroupés sur une branche différente des espèces de *Silene*. Il confirme les relations phylogénétiques étroites entre *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis* et qui sont soutenues par de fortes valeurs de "bootstraps". Cet arbre confirme également que *S. otites* n'appartient pas au même clade que les trois autres espèces dioïques.

Le gène 4 est constitué de 3 exons séparés par de grands introns d'une taille supérieure à 2,5kb. Pour effectuer les analyses de phylogénie, j'ai utilisé les deux derniers exons en les amplifiant séparément. C'est l'arbre construit selon la méthode du "neighbor-joining" qui donne, une fois encore, les meilleures valeurs de "bootstraps". Cet arbre basé sur les séquences du gène 4 est moins bien soutenu que celui basé sur les séquences du gène 3 avec 9 valeurs inférieures à 70 % (figure 6B). Les trois espèces dioïques *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis* restent groupées confirmant leur lien de parenté étroit. *S. otites* se positionne de nouveau sur une branche différente.

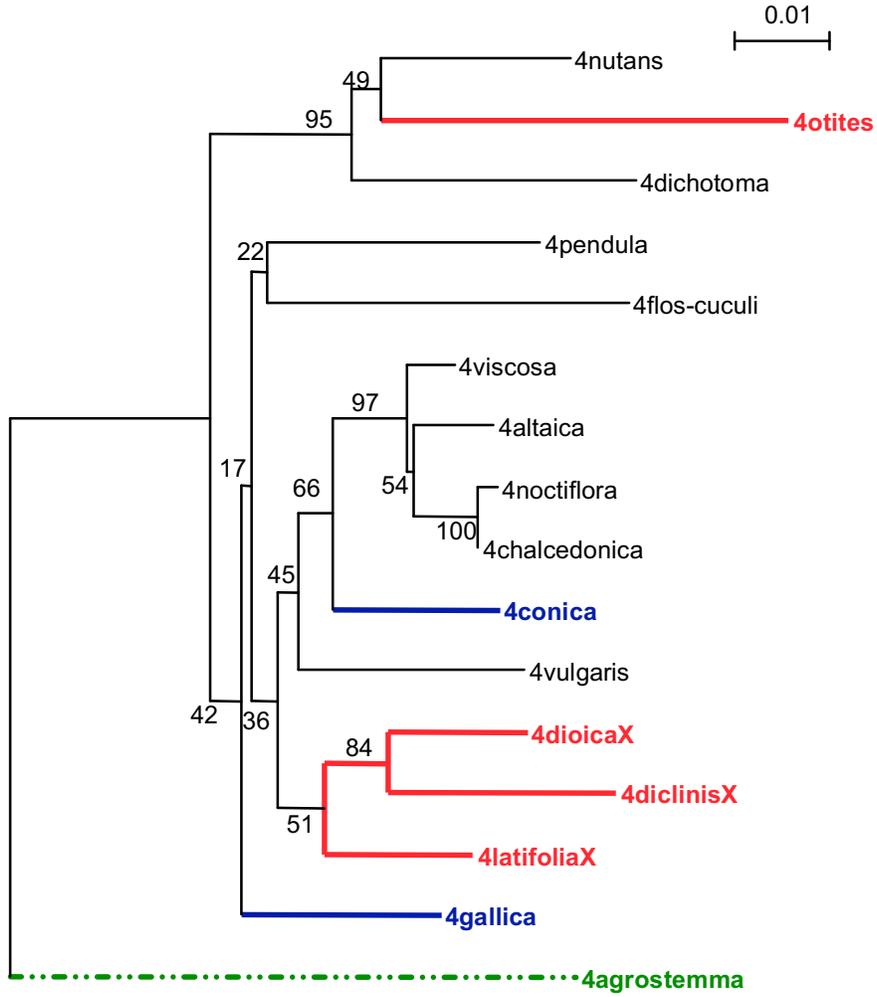
Les fragments séquencés pour le gène 3 ont une taille d'environ 1500 pb. Sur ces 1500 sites, tous ne sont pas forcément informatifs (voir matériels et méthodes). Une bonne partie des sites ne montre pas de polymorphisme entre espèces et fournit donc peu d'informations pour la construction de l'arbre. Pour le gène 4, le constat est le même : sur les 1200 sites présents, seuls 987 sites ont été retenus pour les calculs permettant la formation de l'arbre. Tous ne présentent évidemment pas le même niveau d'information. Étant donné que les deux arbres comportent des "bootstraps" aux valeurs insuffisantes, les alignements des gènes 3 et 4 ont été assemblés pour construire un arbre présentant le maximum de sites informatifs possibles. En théorie, cet arbre devrait être ainsi plus robuste. Pour le construire, n'ont été conservées que les espèces dont les séquences sont disponibles pour les gènes 3 et 4. L'arbre ainsi créé n'apparaît pas plus robuste (figure 6C). Le gène 4 n'apporte vraisemblablement pas suffisamment de sites informatifs supplémentaires pour compenser le manque de polymorphisme entre les séquences de ce gène. Il confirme bien les résultats observés avec les deux premiers arbres.



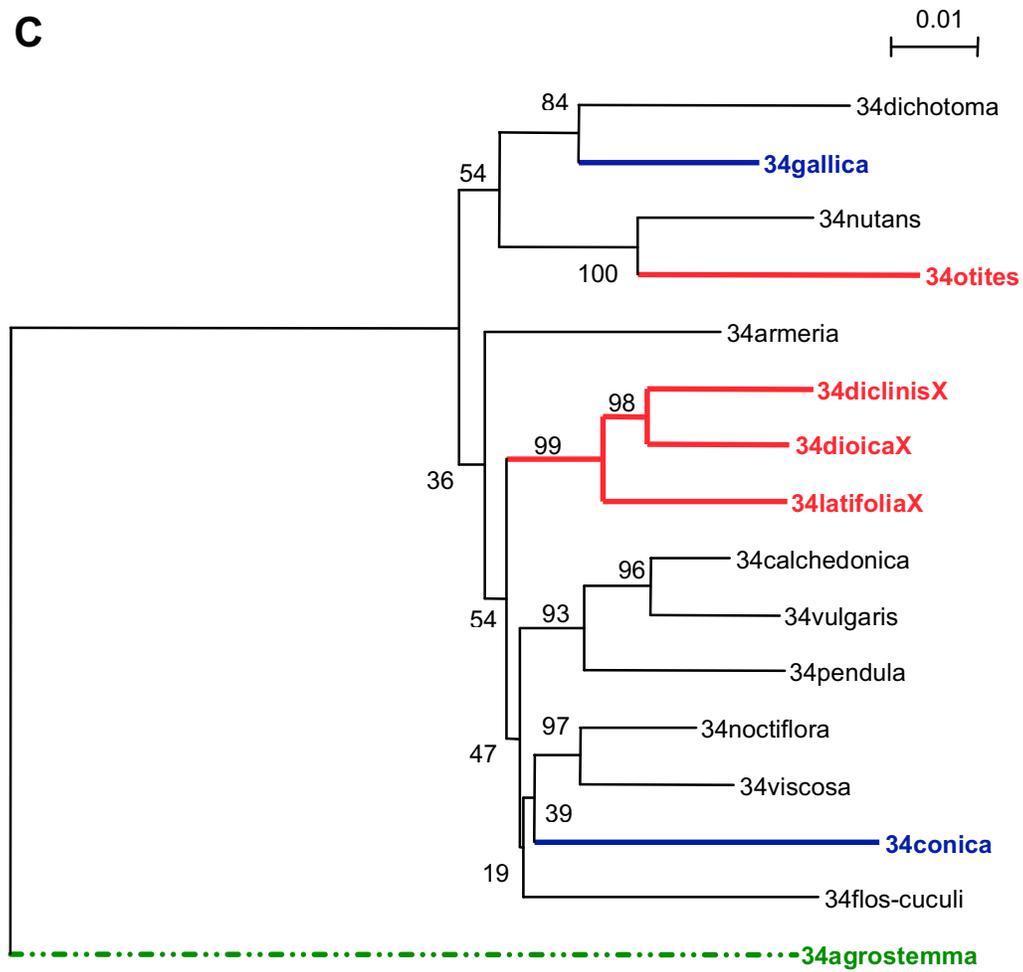
**Figure 6: Arbres phylogénétiques obtenus par l’alignement des séquences des gènes 3, 4 et 3+4 chez différentes espèces de *Silene* et des groupes externes.**

Les alignements de séquences nucléiques ont été effectués avec le programme ClustalW. Les arbres présentés ici ont été construits selon la méthode du “neighbor-joining” (Saitou et Nei, 1987). La longueur des branches est proportionnelle au degré de divergence. Les valeurs de “bootstraps” sont indiquées en pourcentage et ont été calculées sur 500 tirages. La figure 6A représente l’arbre effectué avec le gène3, la figure 6B l’arbre utilisant le gène 4 et la figure 6C l’arbre utilisant les deux gènes 3+4.

**B**



C

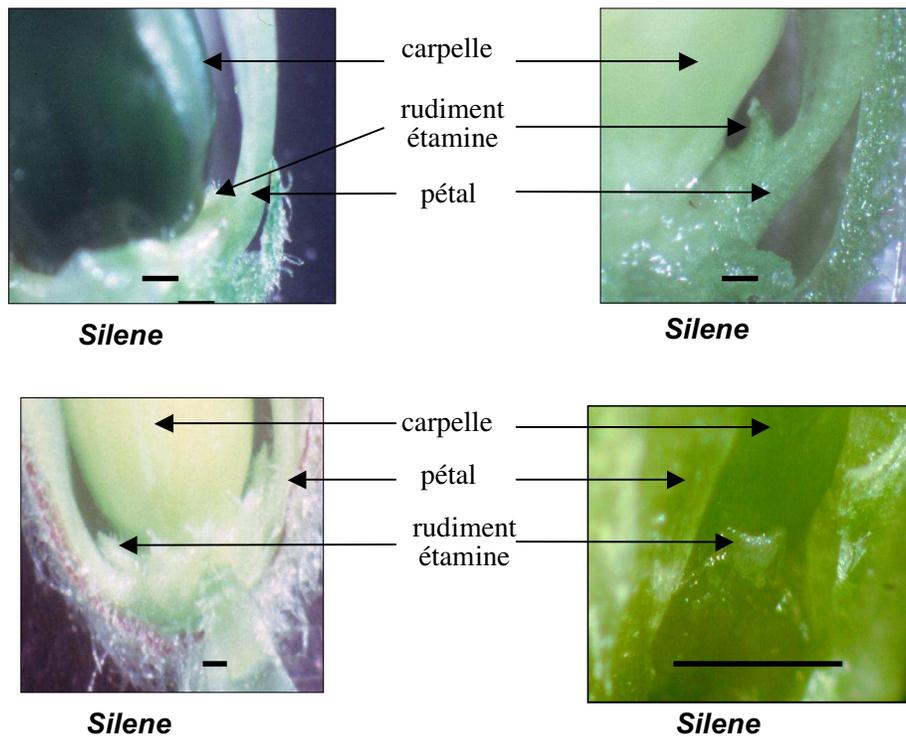


### 3.2.2 Les différences morphologiques florales entre les quatre espèces dioïques.

Les fleurs de *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis* ont le même aspect : les boutons floraux matures ont des dimensions très similaires (environ 15 mm de longueur pour 5 mm de diamètre). Les fleurs femelles ont toutes cinq carpelles et les fleurs mâles 10 étamines. En comparaison, les boutons floraux de *S. otites* sont nettement plus petits (5mm de longueur pour 1 à 2 mm de diamètre). Les fleurs femelles n'ont que trois carpelles et les fleurs mâles 10 étamines.

En ce qui concerne les rudiments d'étamines dans les fleurs femelles (étamines vestigiales), ils sont de forme comparable chez *S. dioica* et *S. diclinis* et *S. latifolia* ce qui est cohérent avec leur relation phylogénétique étroite, mais aussi chez *S. otites*. Ils se présentent sous la forme d'une petite protubérance aplatie suggérant un arrêt très précoce de leur développement chez les quatre espèces (figure 7).

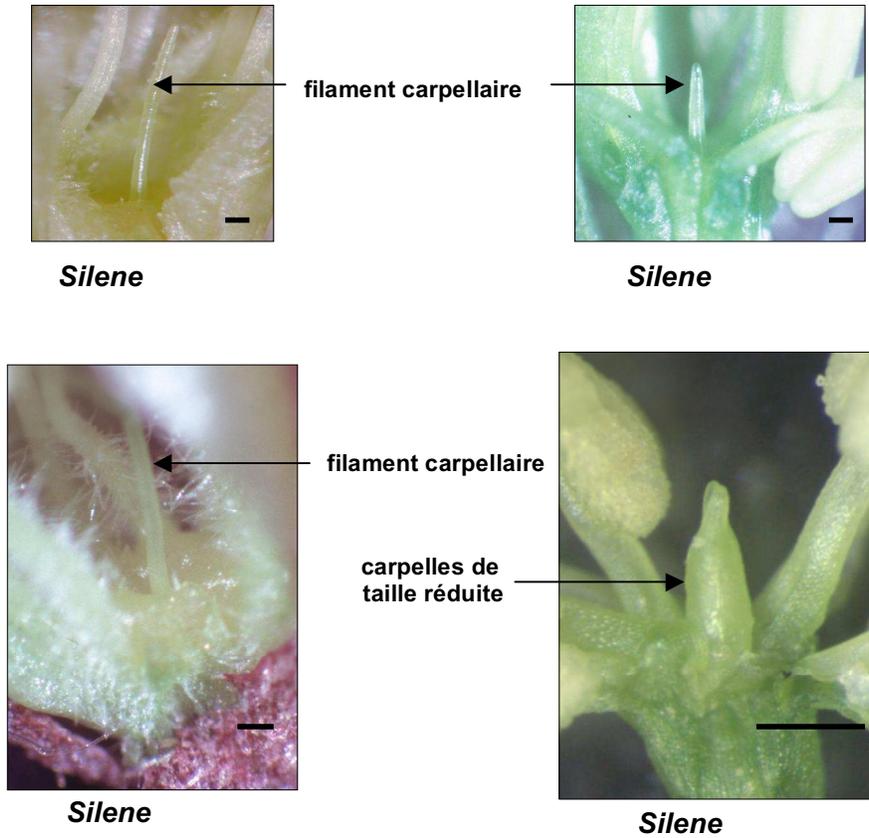
Par contre, il existe des différences importantes entre les rudiments de carpelles des fleurs mâles de *S. otites* d'un côté et ceux de *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis* de l'autre (figure 8). Pour les trois espèces du clade de *S. latifolia*, on retrouve un filament allongé à la place des carpelles situé au centre du territoire femelle. Sa taille semble variable, mais reste de l'ordre de quelques millimètres. Ainsi, chez ces trois espèces, l'arrêt du développement des carpelles se serait produit très précocement, après la formation du territoire femelle, au moment où les carpelles commencent à se former. On retrouve par contre trois carpelles dans les fleurs mâles de *S. otites*, mais leur taille est beaucoup plus réduite que chez la fleur femelle (environ d'un facteur 5) et ils ne possèdent pas d'ovules. L'arrêt du développement des carpelles semble donc être beaucoup plus tardif chez cette espèce que chez les trois autres, ce qui laisse penser que les gènes impliqués dans l'arrêt du développement du carpelle seraient différents dans les deux clades.



**Figure 7: Observation macroscopique des fleurs femelles des espèces dioïques.**

Dans les fleurs femelles matures de ces quatre espèces, les vestiges d'organes mâles se présentent sous formes de protubérances allongées, parfois à peine visibles à la loupe binoculaire.

La barre représente 0.5mm.



**Figure 8: Observation macroscopique des fleurs mâles des espèces dioïques.**

Dans les fleurs mâles de *S. latifolia*, *S. dioica* et *S. diclinis*, les cinq carpelles sont remplacés par un filament de taille réduite. Par contre le territoire femelle au centre de la fleur a gardé sa taille. Pour *S. otites*, les trois carpelles sont présents mais ont une taille très réduite.

La barre représente 0.5mm.

**3.2.3 La même paire d'autosomes à l'origine des chromosomes sexuels chez *S. otites* ?**

Afin de déterminer si les quatre gènes sont présents sur les chromosomes sexuels de *S. otites* en collaboration avec Bohuslav Janousek, nous avons procédé de la même façon que pour *S. dioica* et *S. diclinis*. Nous avons recherché des polymorphismes alléliques permettant de suivre la ségrégation des allèles dans une descendance. Nous avons eu de grandes difficultés pour la faire fleurir. C'est pour cette raison que pour la première analyse de ségrégation, j'ai commencé les analyses en partant d'un croisement dont les plantes utilisées comme parents n'étaient plus disponibles et dont aucun ADN génomique n'avait été extrait. Comme

nous ne disposions pas non plus de marqueur moléculaire pour connaître le sexe des plantes avant la floraison, nous avons dû attendre d'avoir des fleurs pour sexer la descendance.

Ne sachant pas si les chromosomes sexuels étaient de type XY ou ZW, nous avons recherché du polymorphisme indifféremment chez le mâle ou chez la femelle. Pour le gène 3, nous avons mis en évidence un polymorphisme de taille et pour DD44 un polymorphisme par enzyme de restriction. Les analyses de ségrégation effectuées sur 30 plantes nous ont permis de montrer que ces deux gènes étaient liés génétiquement. Par contre, ces analyses ne montraient pas un lien strict au sexe comme c'était le cas pour les espèces dioïques de l'autre clade (tableau 1). Les chromosomes sexuels chez *S. otites* sont homomorphes ce qui laisse supposer que ces chromosomes sont encore très récents. La région pseudo-autosomale est peut-être encore très étendue et inclurait nos gènes marqueurs ce qui expliquerait ces résultats.

Afin de mieux comprendre le profil de ségrégation obtenu et d'augmenter le nombre de descendants, nous avons donc effectué un nouveau croisement à partir d'un mâle et d'une femelle issu du premier croisement. L'analyse est actuellement en cours.

N° plante	sexe	DD44	gene3
3	Femelle	B	H
7	Femelle	B	G
8	Femelle	B	
12	Femelle	B	
19	Femelle	B	H
101	Femelle	B	
119	Femelle	B	
140	Femelle	B	G
158	Femelle	B	G
182	Femelle	B	H
183	Femelle	B	H
187	Femelle	B	G
207	Femelle	B	H
163	Femelle	H	P
195	Femelle	H	P
5	mâle	B	H
23	mâle	B	H
105	mâle	B	H
177	mâle	B	H
178	mâle	B	H
180	mâle	B	G
271	mâle	B	H
357	mâle	B	P
22	mâle	H	
102	mâle	H	H
109	mâle	H	
112	mâle	H	P
151	mâle	H	H
188	mâle	H	P
203	mâle	H	H

**Tableau 1: Résultats des analyses de ségrégation fait avec le premier croisement.**

Pour le gène DD44, H signifie que la plante est hétérozygote et B homozygote.  
 Pour le gène 3, H signifie que la plante est hétérozygote, G que la plante est homozygote pour l'allèle de plus grande taille et P que la plante est homozygote pour l'allèle de petite taille.

## Partie II : Des fleurs mâles chez *S. latifolia*

### 1 Introduction

Les espèces d'Angiospermes dioïques développent le plus souvent des méristèmes floraux qui initient le développement des quatre types d'organes floraux, tout au moins pour les stades les plus précoces. Il a donc été émis l'hypothèse que ces espèces dérivent d'espèces hermaphrodites qui ont évolué en fixant des mutations responsables de stérilités mâles ou femelles (Darwin, 1877 ; Westergaard, 1958). Chez *Silene latifolia*, les quatre verticilles en formation sont visibles aussi bien dans le méristème floral des fleurs mâles que de celui des fleurs femelles (Grant, 1994). De plus, les hybridations *in situ* faites avec les orthologues des gènes d'identité d'organe, (les gènes ABC), ont révélé que leurs profils d'expression sont conservés (Hardenack et coll., 1994) indiquant que l'identité des organes de chaque verticille est respecté aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Chez *S. latifolia*, la détermination du sexe se produit donc en aval ou en parallèle de la mise en place de l'identité des organes. Par la suite, les étamines dégénèrent très tôt chez les fleurs femelles, dès la mise en place des cellules sporogènes (Farbos et coll., 1999). Chez les fleurs mâles, il se forme une structure en filament à la place des cinq carpelles. Ce filament développe parfois des papilles stigmatiques ce qui laisse penser qu'il garde une identité carpellaire, ce qui est en accord avec le patron d'expression des gènes ABC. Le quatrième verticille est plus petit chez le mâle que chez la femelle ou chez le mutant hermaphrodite et contient cinq fois moins de cellules au stade de l'initiation des carpelles (Farbos et coll., 1999 ; figure 24 de l'introduction). On pense que le nombre insuffisant de cellules dans le quatrième verticille chez la fleur mâle aboutirait à la formation d'un filament à la place des carpelles. Dans ce contexte, il nous semble particulièrement intéressant d'identifier les gènes qui ont été recrutés au cours de l'évolution pour inhiber le développement des organes femelles chez les fleurs mâles de *Silene latifolia*.

Par une étude bibliographique, nous avons identifié les voies régulatrices potentiellement impliquées dans la suppression des organes femelles à partir de ce qui est connu, essentiellement chez les espèces modèle hermaphrodites *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* et *Petunia hybrida*. Nous avons envisagé quatre hypothèses pour expliquer la réduction du nombre de cellules dans le quatrième verticille des fleurs mâles aboutissant à l'absence de carpelles.

La première hypothèse suppose que l'arrêt du développement des carpelles se produirait par une perte des compétences du méristème floral. Cette perte de compétence pourrait avoir deux origines. Soit le gène *SHOOT MERISTEMLESS* et dans ce cas l'arrêt du développement est due à un arrêt précoce de l'identité du méristème. Soit cette perte concerne les boucles de rétrocontrôle *WUSCHEL/CLAVATA* et/ou *WUSCHEL/AGAMOUS* et dans ce cas les carpelles complets ne pourraient se développer du fait d'un arrêt trop précoce du renouvellement des cellules souche. Le méristème n'aurait alors assez de cellules que pour former un filament.

Dans la troisième hypothèse, la bordure entre le troisième et le quatrième verticille serait nettement plus large empêchant le développement des carpelles. La zone dans laquelle les carpelles pourraient se développer serait alors très étroite ne permettant le développement que d'un filament. Cette modification pourrait faire

intervenir les gènes de frontières *SUPERMAN* ou *CUP-SHAPED COTYLEDON 1,2* et 3.

La dernière hypothèse expliquerait la formation du filament par un défaut de la prolifération cellulaire par absence des facteurs activant la prolifération ou au contraire pas la présence d'inhibiteurs de la division tels les gènes de la famille TCP (*IB1* *CYC* *PCF1*).

La première partie de ce projet a donc consisté à cloner chez *S. latifolia*, un certain nombre de gènes orthologues à ces gènes candidats. Le travail a été effectué par Jitka Zluvova, post-doctorante de l'équipe. Ma contribution a consisté à analyser en détail les orthologues de STM et CUC avec l'aide d'Adeline Berger, stagiaire en DESS, que j'ai totalement encadré. Les résultats sont présentés ci-dessous sous forme d'un manuscrit en préparation.

## **2 Résultats (manuscrit)**

## ***CUC* and *STM* orthologs are involved in the sex determination pathway leading to carpel arrest in *Silene latifolia***

Jitka Zlucovova\*, Michaël Nicolas, Adeline Berger, Ioan Negrutiu and Françoise Monéger

Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 LYON CEDEX 07

\*present address: Laboratory of Plant Developmental Genetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska str. 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic

### **Abstract**

*Silene latifolia* is a dioecious species and develops male and female individuals. Dioecious species presumably derive from hermaphrodite ancestors. It is highly interesting in the context of flower evolution and diversity, to identify the regulatory pathways which have been modified in the hermaphrodite ancestor and led to the emergence of species with unisexual flowers. We used a candidate gene approach for genes involved in meristem function, and identified both *CUP SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) and *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) homologs in *S. latifolia*. Phylogenetic analysis confirmed that we indeed identified true orthologs of both genes. Detailed expression pattern analyses suggest a conserved function of the corresponding proteins in *S. latifolia* compared to model species. Comparative *in situ* hybridisation experiments reveal that the regulatory pathway involving *SICUC* and *SISTM* is involved in carpel arrest in male flower.

### **Introduction**

*Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* and *Petunia hybrida* are hermaphrodite plant species commonly used for studies on bisexual flower development. They have been particularly useful in the identification of genes involved in different steps of flower development: floral meristem identity, organ identity, organ and whorl boundaries, organ polarity and flower symmetry (for review, see Smyth, 2005). In our group, we are particularly interested in understanding how unisexual flowers develop in dioecious species (species with male and female plants).

Dioecy is widely scattered taxonomically as a large proportion of angiosperm families have dioecious members. As a consequence, it seems that dioecy evolved several times independently in different plant lineages (Charlesworth and Guttman, 1999). It is assumed that dioecy evolved from a hermaphrodite ancestor (Darwin, 1877; Westergaard, 1958). In the dioecious species *Silene latifolia*, we can indeed observe four whorls in both male and female floral meristems (Delichère et al, 1999). As soon as male organ (stamens) primordia are initiated, the space left for the female organs is significantly smaller in male compared to female flower buds. Later on, in male flowers, a filament will develop instead of female organs (carpels). In female flower buds, stamens are initiated but start to degenerate before tapetum differentiation. It has previously been shown that organ identity genes are expressed as expected and in the same manner in both male and female flower buds

(Hardenack et al, 1994). The conclusion was that sex determination genes must act either downstream from these organ identity genes or in parallel. This sexual phenotype is controlled by XY sex chromosomes. Two independent loci are responsible for sex determination and have been shown to be located on the Y chromosome (Lardon et al, 1999; Farbos et al, 1999). The corresponding genes have not been identified, neither are the regulatory pathways involved in sex determination. It would be highly interesting in the context of flower evolution and diversity, to identify the regulatory pathways recruited in the hermaphrodite ancestor, the modification of which led to the emergence of species with unisexual flowers.

We imagined two scenarios, which could explain the lack of carpels in male flowers. The first one is based on the fact that the floral meristem is determined: the carpels, which develop at the end, consume all the stem cells left in the centre of the meristem. If the number of cells available is not sufficient to form carpels, only a filament will be able to develop. The second one supposes that boundary between male and female territories (whorl3/whorl4) could be disturbed. The whorl 4 in male flower buds would then be shrunk. In this paper, we identified putative orthologs from shootmeristemless (*stm*), a central gene in meristem function in *A. thaliana*, and cup shaped cotyledon (*cuc*), a gene that controls boundaries between organs, as well as whorls. We performed *in situ* hybridization on male, female and hermaphrodite flower meristems at early stages when the first differences between male and female become visible. Both orthologs show clear differences in their expression pattern between males and females at a very early stage. These results report the earliest difference ever observed between male and female flower buds in *Silene latifolia* and suggest that we have identified a developmental pathway involved in carpel arrest in *Silene latifolia*.

## Materials and methods

### Plant material

To obtain *S. latifolia* seedlings, seeds were surface-sterilised and germinated for six days in sterile conditions. Wild type *S. latifolia* plants were grown outdoors and flower buds were collected during the flowering season. *S. latifolia* hermaphrodite mutants harbouring deleted Y chromosome (*bsx11*mutant, Lardon et al. 1999) were grown in a greenhouse.

### Cloning

To find orthologs of candidate genes, total RNA was prepared using Trizol® Reagent from shoot apices from six days old seedlings. Single-stranded cDNA was synthesised either by priming the oligo(dT) (for RT-PCR) or GGCCACGCGTCTGACTAGTAC(T)<sub>17</sub> (for RACE-PCR). Primers used to find *S. latifolia* ortholog of *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) were designed according to the nucleotide sequences of the known orthologs in different species, to amplify a region spanning from MEINOX to homeobox sequences conserved between Class I KNOX genes. Primers used to find *S. latifolia* ortholog of *CUP-SHAPED COTYLEDONS* (*CUC*) were designed using CODEHOP program (Rose *et al.* 1998) to amplify the region spanning the conserved NAC domain and the miR164 binding site. The list of primers, as well as the PCR programs are given in the Table 1. Amplified products

were analysed on 1% agarose gel, and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega). The complete 3' sequences of *SISTM1* and *SISTM2* were obtained using 3' RACE. Nucleotide sequences were determined by the dideoxynucleotide chain termination method using ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit V2.

### Phylogenetic analysis

The sequences of the published orthologs of *STM* and *CUC* were obtained from GenBank. List of their accession numbers is given in Table 2 and 3. Nucleic acid sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson et al., 1994) and refined by hand using the graphical multiple sequence alignment editor SeaView (Galtier et al., 1996). Ambiguous positions in the alignment were excluded from the analysis. *AaKNOX1*, *MKN1* and *CrKNOX3* were used as outgroups in order to root the KNOX tree as described by Harrison et al. (2005). The NAC tree was rooted using *NtTERN* and *AtTIP*. Phylogenetic trees were constructed and bootstrapped using neighbour-joining method with 500 bootstrap replicates using the graphical colour interface Phylo\_win (Galtier et al., 1996).

### Expression analyses

To reveal expression pattern of cloned genes, PCR using specific primers for *SISTM1*, *SISTM2*, *SICUC*, (list of primers is given in the Table 1), and for a constitutively expressed *S. latifolia* gene, *eIF4A* (Zluvova et al. 2005) were performed. *In situ* hybridization with *SISTM1* and *SICUC* probes were performed as described by Ferrandiz and Sessions (1996). Pictures were captured under bright-field illumination by using a Zeiss Axiovert 125 inverted microscope.

## **Results**

### Gene cloning and phylogenetic analyses

Our strategy for cloning orthologs from *CUC* and *STM* in *S. latifolia* was based on the presence of highly conserved domains among all the orthologs examined to date in different species. We designed degenerated primers based on the CODEHOPE program (see Materials and Methods). The genes identified were named as in *A. thaliana* preceded by *Sl* for *Silene latifolia*.

### SISTM

Among the clones containing a KNOX-domain, we found two 900 bp long *STM*-like cDNA sequences. We called them *SISTM1* and *SISTM2*. These nucleic acid sequences have been aligned with available KNOX gene sequences already used by Harrison et al (2005). Both *SISTM1* and *SISTM2* contain all typical features of a Class I KNOX gene, including regions encoding the MEINOX, ELK, and homeodomain. The alignment has been used to construct a phylogenetic tree (Figure 1). Both *SISTM1* and *SISTM2* group with the *STM* clade (class I KNOX genes) and the branch is supported by a strong bootstrap value, confirming we indeed cloned two *STM* orthologs.

### SICUC

Among the amplified sequences potentially encoding NAC-domain, we identified one *CUC*-like sequence 500 bp long that we named *SICUC*. The nucleic acid sequence has been aligned with NAC-genes including *CUC* orthologs. The constructed phylogenetic tree is shown in Figure 2 and indicates that *SICUC* groups with *NAM* (*NO APICAL MERISTEM*) from *Petunia hybrida*, *CUP* (*CUPULIFORMIS*) from *Antirrhinum majus* and with both *CUC1* and *CUC2* from *A. thaliana*. The branch is supported by a strong bootstrap value, confirming we indeed cloned a *CUC* ortholog.

In conclusion, *SISTM1*, *SISTM2* and *SICUC* genes are therefore likely to be orthologs of *Arabidopsis thaliana* *STM* and *CUC*.

### RT-PCR analysis

As a first analysis of the expression patterns of *SISTM1*, *SISTM2* and *SICUC*, RT-PCR on different plant tissues were performed. Specific primers were designed for each gene. Transcript accumulation was normalised according to eIF4A. Results are presented in Figure 3. Both *SISTM1* and *SISTM2* are expressed in meristems (shoot apical meristems), petals from male flowers, both young and old gynoecium, young anthers and young and medium flower buds from both males and females (Figure 3). Some differences are also observed between *SISTM1* and *SISTM2*. *SISTM1* is expressed in middle anthers and in stems from both males and females. *SISTM2* is expressed in roots. Apart from its expression in stems, *SISTM1* shows an expression profile very close from what can be deduced from *STM* analyses in *A. thaliana* (Long and Barton, 1996).

*SICUC* is expressed in shoot apical meristems as well as in young flower buds from both males and females (Figure 3). It is also expressed in young gynoecium. This expression pattern is very close from what can be deduced from *CUC1* and 2 analyses in *A. thaliana* (Breuil-Broyer et al, 2004; Aida et al, 1997).

### In situ hybridisation analyses

In order to investigate in more detail the expression pattern of *STM* and *CUC* orthologs in *S. latifolia*, *in situ* hybridisation experiments have been performed. Young flower meristems from males and females, as well as a hermaphrodite mutant (*bsx11*) have been analysed. The *bsx11* mutant is Y-deleted and has lost the portion of Y chromosome responsible for the arrest of gynoecium development (Lardon et al, 1999). Developmental stages of *S. latifolia* flower meristems correspond to those described by Farbos et al. (1997). We decided to focus our analysis on stages around stage 5 for which the first morphological differences between male and female flower meristem become visible. At stage 2, the flower meristem has a round shape and no primordia are visible. At stage 3, the sepal primordia are initiated. During stage 4, petal and stamen primordia are successively initiated and at stage 5, all organ primordia are formed. At stage 6, floral organs start to differentiate (Farbos et al, 1997).

### **SISTM**

We first performed *in situ* hybridisation using gene-specific probes. The pattern of expression was similar for *SISTM1* and *SISTM2* (data not shown). A stronger signal was observed with a longer probe which hybridised on both types of transcripts and was therefore used for further analyses. The pattern of accumulation of both *SISTM1* and *SISTM2* transcripts is shown in Figure 4. At stage 2 (A to C), a strong signal is detected in all the cells of the meristems from male, female and hermaphrodite. In female and hermaphrodite, from stage 3 to 5 (D and E, G and H and J and K), we observe a progressive restriction of *SISTM* expression towards the inner part of the meristem. No signal is detected in organ primordia. When carpel primordia are initiated at stage 5, *SISTM* transcripts are no more detected (J and K). Depending on the plan of the sections, some signal could also be detected around the primordia and in vascular tissues. Strikingly, no transcripts are detected in the centre of the flower meristem in male from stage 3 onwards (F, I and L). This absence of signal is particularly obvious since a signal is still observed in the future petal and stamen primordia at stage 3 (F).

### **SICUC**

The pattern of accumulation of the *SICUC* transcripts is shown in Figure 5. As expected, *SICUC* is detected at the boundaries between whorls before each type of primordia become visible from stage 3 to stage 5. This is observed for male, female and hermaphrodite. An enlarged signal can be observed which probably corresponds, due to the plan of the section, to future primordia boundary within the same whorl (Figure 5B, 5G and 5K). Remarkably at stage 3 in male only, *SICUC* is detected in a region in the centre of the meristem (Figure 5C). Interestingly, the very inner zone of this region, which probably corresponds to the place of the future filament, is devoid of signal. This was reproductively observed on serial sections (data not shown). This expression is transient as it is not observed at later stages.

## **Discussion**

In this paper, we report the cloning of *STM* and *CUC* homologs in the dioecious species *Silene latifolia*. Phylogenetic analyses reveal that both genes respectively belong to the corresponding *STM* and *CUC* clades from *A. thaliana*. In addition, our *in situ* hybridisation data reveal patterns of expression very similar to the corresponding *A. thaliana* homologs. All these results strongly suggest we have indeed identified the orthologs in *S. latifolia* of *STM* and *CUC* from *A. thaliana*.

*STM* is involved in meristem function and is expressed in shoot apical meristem, inflorescence meristem as well as floral meristem. According to mutant phenotypes and expression pattern, *STM* is supposed to confer meristematic identity. In *Arabidopsis thaliana* and *Antirrhinum majus*, *STM* transcripts are downregulated in incipient floral primordia (Long *et al*, 1996; Golz *et al*, 2002). More recently, *STM* orthologs have been characterised in two Papaveraceae species, *Chelidonium majus* and *Eschscholzia californica* and shown by *in situ* hybridisation, to be downregulated in organ primordia, including floral primordia. The signal is also detected in vascular tissues as well as in boundaries between whorls. All these data are consistent with our results and suggest a conserved function in *S. latifolia* meristems. In *S. latifolia*, we have identified two close paralogs, *SISTM1* and *SISTM2*. Interestingly, two paralogs of *STM* have also been identified in *Antirrhinum majus* and in *Streptocarpus*

genus. Our phylogenetic analyses suggest that duplication events are independent in *Silene* and *Antirrhinum* species. Data are missing to draw any conclusion for *Streptocarpus* genus. Although expression pattern is not strictly identical between *SISTM1* and *SISTM2* (see Figure 3, RT-PCR results), similar pattern of expression has been observed in floral meristems (data not shown), as it is the case for *HIRZINA* and *INVAGINATA* from *Antirrhinum majus*. It is likely that in both species, the two paralogs are at least partially redundant, consistently with recent duplication events.

*CUC* genes of *Arabidopsis thaliana*, first identified in *Petunia hybrida* as *NO APICAL MERISTEM* (*NAM*, Souer *et al*, 1996), are involved in the establishment and maintain of organ boundaries (Aida *et al*, 1997; Takada *et al*, 2001; Vroemen *et al*, 2003). Our *in situ* data are consistent with a similar function in *S. latifolia*.

The disappearance of *SISTM* in the centre of the male flower meristem from stage 3 onwards probably reflects an early arrest in meristem function. It is likely that a central region of the meristem including the central zone loses its meristematic identity and therefore, behaves as in a weak *stm* mutant where meristematic cells are rapidly consumed and differentiate. In male floral buds of *S. latifolia*, the meristematic cells differentiate too early and are not sufficiently abundant to form carpels. The filament would then be the sign of a precocious determinacy of the male floral meristem. The formation of a filament associated with a defect in meristem function has already been reported in *Petunia hybrida* and in *A. thaliana*. In *hairy meristem* (*ham*) flower meristems of *P. hybrida*, *PhWUS* and *PhSTM* disappear precociously and the meristematic cells are consumed to form a filament instead of carpels (Stuurman *et al*, 2002). In *ago1-11 stm-2* double mutant in *A. thaliana*, flowers are replaced by filaments (Kidner and Martienssen, 2005).

*SICUC* is detected at stage 3 in the central region of the male floral meristem. This could explain the lack of BrdU incorporation (marker of cell division) observed in this region of the male meristem (data not shown). Indeed, *CUC* genes have been shown to be associated with the absence of cell proliferation, in particular in whorl boundaries (Breuil-Broyer *et al*, 2004). In addition, Weir *et al*, (2004) have shown a direct interaction between *CUPULIFORMIS* (*CUP*), a *CUC* ortholog in *A. majus*, and a TCP transcription factor known to be associated to inhibition of proliferation. This would lead to the reduced number of cells in whorl 4 at stage 5 observed in male compared to female flower meristem.

*CUC* and *STM* relations are not well understood. It seems however that *CUC1* and 2 would act upstream from *STM*, at least in the embryo since *CUC1* and 2 are required for *STM* activation during shoot apical meristem (SAM) establishment (Aida *et al*, 1997 and 1999). In addition, Kidner and Martienssen (2005) suggested that the action of *AGO1* on *STM* would be mediated via *CUC1* and 2. All these data suggest that *CUC* acts upstream from *STM*. In our dioecious species, both *SISTM* and *SICUC* show a first difference between male and female at stage 3 but it is difficult from these observations, to determine which gene is upstream from the other. We can however make two hypotheses to explain what happens in male flower buds in *S. latifolia*. The first one implies that the presence of *SICUC* in a transient manner at stage 3 would disturb the meristem function and, as a consequence, excludes *SISTM* from the centre of the meristem. In this scenario, it is not clear if the arrest of cell proliferation would be the cause or the consequence of *SISTM* downregulation. The

second one supposes that the lack of expression of *SISTM* in the central region of the male flower meristem would allow the inner expansion of *SICUC* which in turn, would inhibit cell proliferation. This implies that *SISTM* would confine *SICUC* in boundaries. MiR164 being known to restrict *CUC1* and 2 genes in the boundaries in a post-transcriptional manner, our results reveal a potential link between *STM*-like genes and miR164 regulation.

We have identified a regulatory pathway involved in sex determination in *S. latifolia*. This pathway affects the central zone of the flower meristem without affecting its female identity since Hardenack et al (1994) have shown that the expression pattern of the ortholog of *AGAMOUS* is not affected in males compared to females. This suggests that floral organ identity genes act independently from *SISTM* and *SICUC*. Key genes involved in sexual dimorphism and located on the Y chromosome are expected to act upstream from this pathway. In order to elucidate the molecular basis of sex determination in *S. latifolia*, the next step would be to perform the same type of analysis with other candidate genes known to act upstream from *CUC* or *STM*. *HAM* ortholog or genes involved in microRNA metabolism (*carpel factory*, *argonaute* genes ...) would be good candidates.

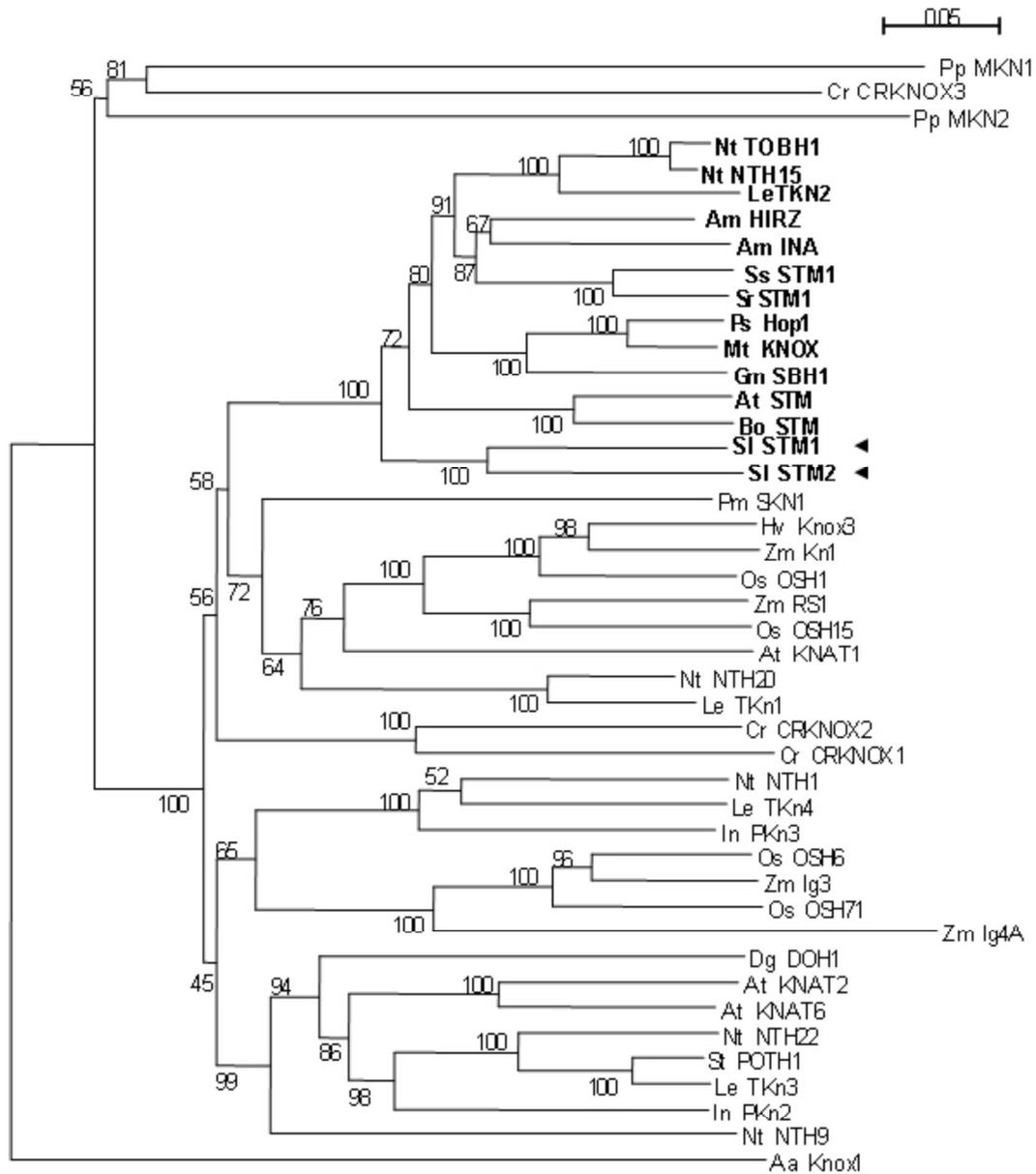
## Acknowledgments

We would like to thank Christophe Trehin for helpful discussion and Frédérique Rozier for assistance with in situ hybridisation. J. Zluvova was funded by NATO and Ecole Normale Supérieure de Lyon. This work has been done within IFR128 BioSciences Lyon-Gerland.

## References

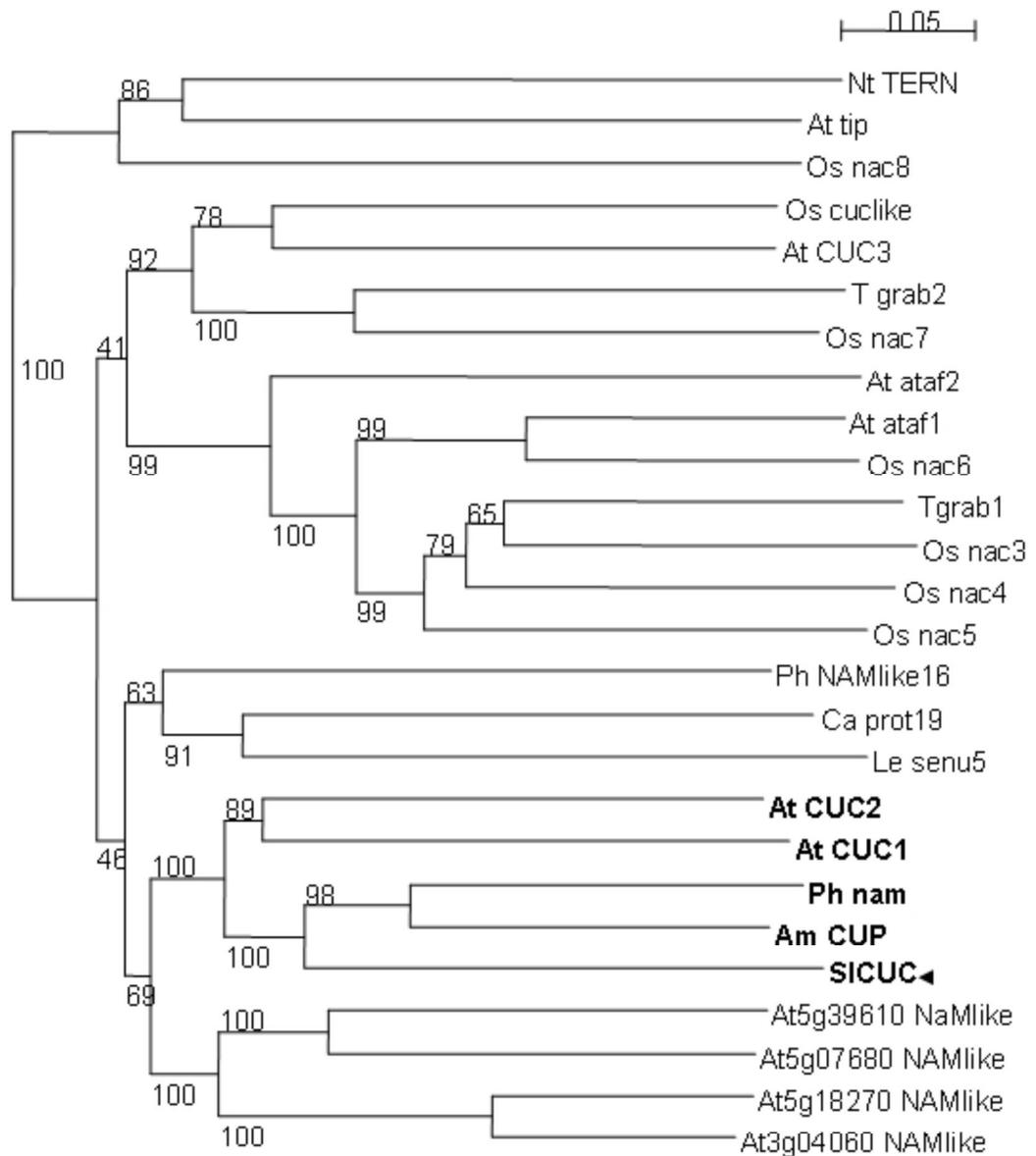
- Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**, 1563-1570.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857.
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I., and Trehin, C.** (2004). High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *Plant J* **38**, 182-192.
- Charlesworth, D., and Guttman, D.S.** (1999). The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems. (Oxford: Bios scientific).
- Darwin, C.R.** (1877). The different form of flowers on plants of the same species. (London).
- Delichere, C., Veuskens, J., Hernould, M., Barbacar, N., Mouras, A., Negrutiu, I., and Moneger, F.** (1999). SIY1, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. *Embo J* **18**, 4169-4179.
- Farbos, I., Veuskens, J., Vyskot, B., Oliveira, M., Hinnisdaels, S., Aghmir, A., Mouras, A., and Negrutiu, I.** (1999). Sexual dimorphism in white campion: deletion on the Y chromosome results in a floral asexual phenotype. *Genetics* **151**, 1187-1196.

- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C.** (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543-548.
- Golz, J.F., Keck, E.J., and Hudson, A.** (2002). Spontaneous mutations in KNOX genes give rise to a novel floral structure in *Antirrhinum*. *Curr Biol* **12**, 515-522.
- Hardenack, S., Ye, D., Saedler, H., and Grant, S.** (1994). Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *Plant Cell* **6**, 1775-1787.
- Harrison, J., Moller, M., Langdale, J., Cronk, Q., and Hudson, A.** (2005). The Role of KNOX Genes in the Evolution of Morphological Novelty in *Streptocarpus*. *Plant Cell* **17**, 430-443.
- Kidner, C.A., and Martienssen, R.A.** (2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Dev Biol* **280**, 504-517.
- Lardon, A., Georgiev, S., Aghmir, A., Le Merrer, G., and Negrutiu, I.** (1999). Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by y chromosome deletions. *Genetics* **151**, 1173-1185.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., and Henikoff, S.** (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* **26**, 1628-1635.
- Smyth, D.R.** (2005). Morphogenesis of flowers--our evolving view. *Plant Cell* **17**, 330-341.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R.** (1996). The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-170.
- Stuurman, J., Jaggi, F., and Kuhlemeier, C.** (2002). Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev* **16**, 2213-2218.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A., and de Vries, S.C.** (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., and Davies, B.** (2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* **131**, 915-922.
- Westergaard, M.** (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv Genet* **9**, 217-281.
- Zlucova, J., Lengerova, M., Markova, M., Hobza, R., Nicolas, M., Vyskot, B., Charlesworth, D., Negrutiu, I., and Janousek, B.** (2005). The inter-specific hybrid *Silene latifolia* x *S. viscosa* reveals early events of sex chromosome evolution. *Evol Dev* **7**, 327-336.



**Figure 1. Phylogenetic tree of KNOX genes using cDNA sequences.**

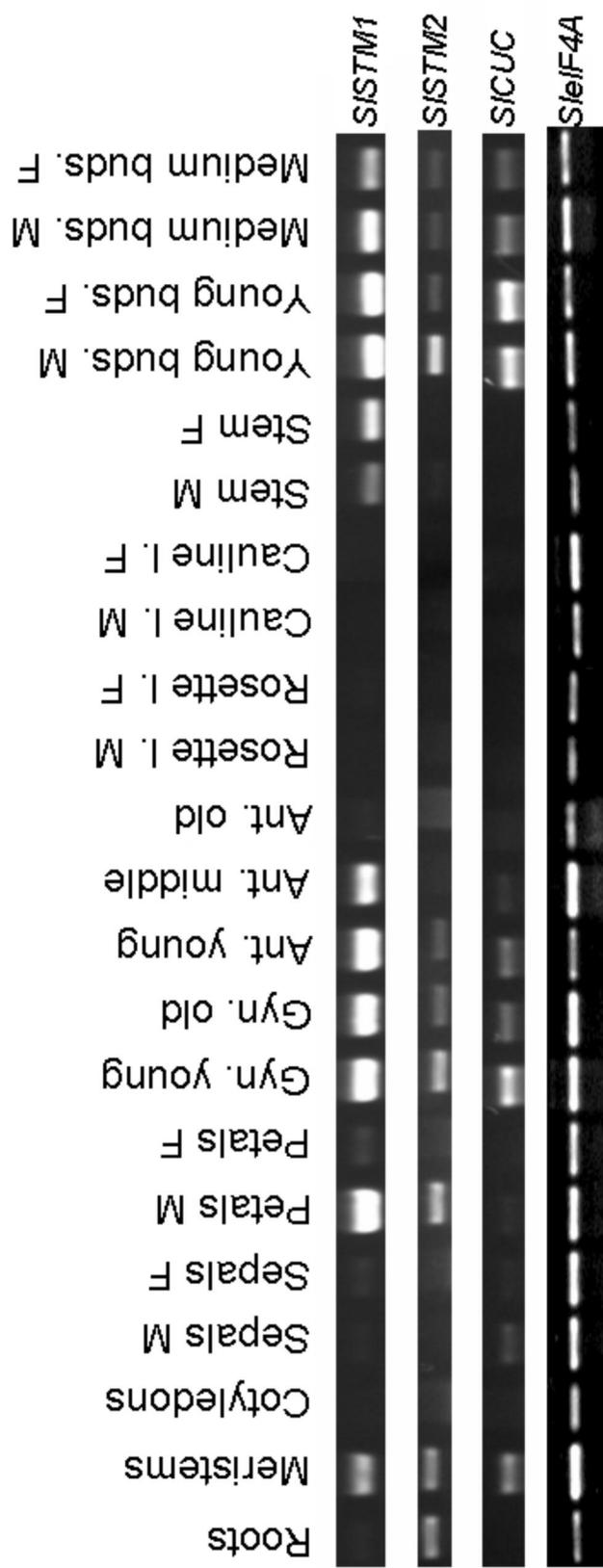
Phylogenetic tree was constructed using neighbor joining method. The numbers beside the branches represent bootstrap values based on 500 replicates. STM-like genes from dicotyledones are highlighted in bold and *Silene* genes are indicated with arrowheads. AaKnox1, Pp MKN1 and CrKnox3 were included as outgroups.



**Figure 2. Phylogenetic tree of NAC genes using cDNA sequences.**

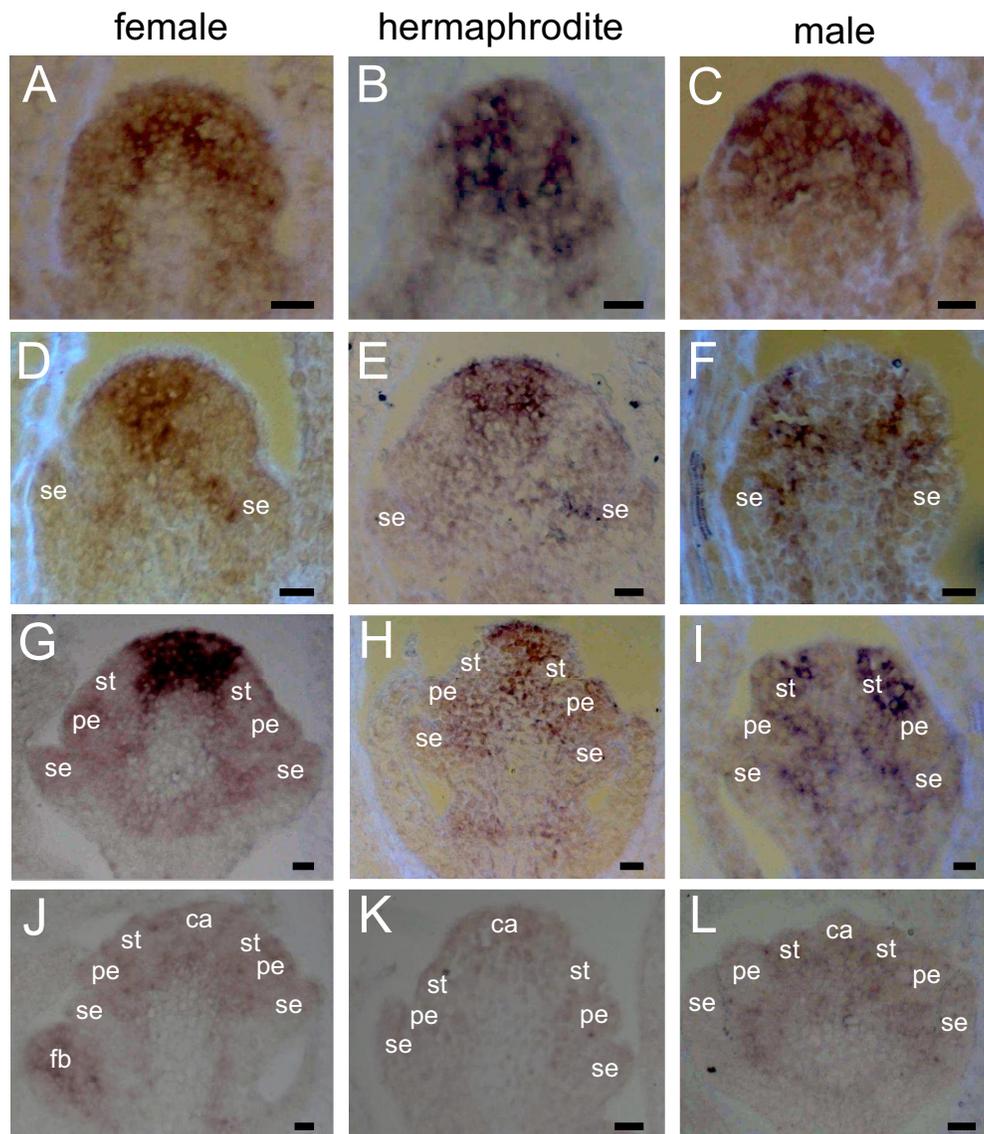
Sequences were aligned using ClustalW program (Thompson et al., 1994) and the phylogenetic tree was constructed with neighbor joining method. The numbers beside the branches represent bootstrap values based on 500 replicates. *Silene* genes are indicated with arrowheads. The members of the *CUC* clade are highlighted in bold.

1.



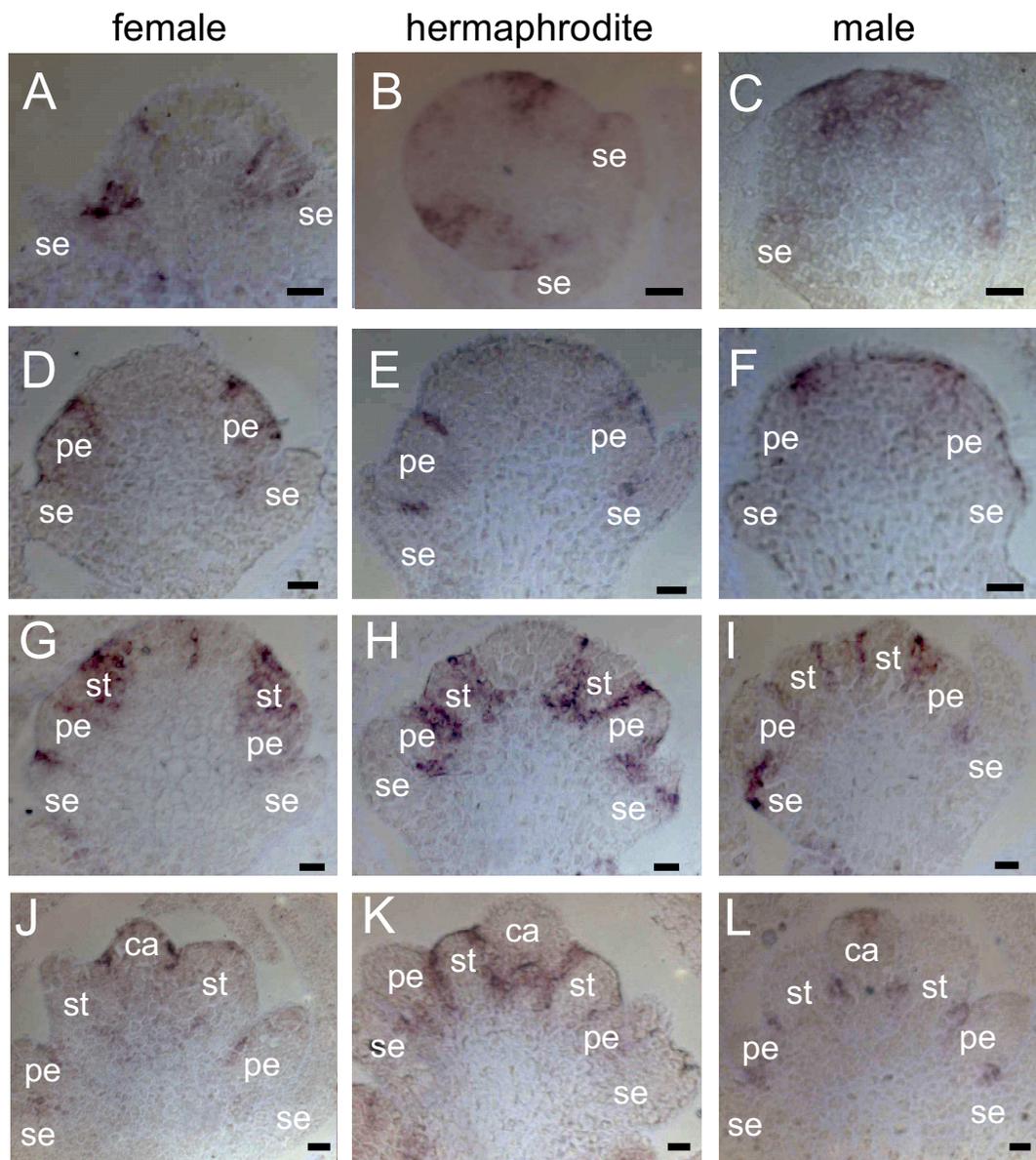
**Figure 3. RT-PCR analyses of *SISTM1*, *SISTM2* and *SICUC* in *Silene latifolia* tissues.**

The expression patterns of *SISTM1*, *SISTM2* and *SICUC* were investigated by RT-PCR analysis. The tissues used for the analyses are indicated above. Abbreviations are as follow: male (M), female (F), gynoeceium (gyn.), anther (ant.), leaves (l). The genes amplified are indicated on the right of each lane. *SlEIF4A* is used as an internal reference. PCR products were separated on agarose gel and visualized under UV light in the presence of ethidium bromide.



**Figure 4: In situ hybridisation of *SISTM***

A to C correspond to stage 2, D to F to stage 3, G to I to stage 4 and J to L to stage 5. The sex of the individuals is indicated above each column. Abbreviations are as follow: sepal primordia (se), petal primordia (pe), stamen primordia (st), carpel primordia (ca), flower meristem (FM). The scale bars correspond to 20µm.



**Figure 5: In situ hybridisation of *SICUC***

A to C correspond to stage 3, D to F to stage 4, G to I to stage 5 and J to L to stage 6. The sex of the individuals is indicated above each column. Abbreviations are as follow: sepal primordia (se), petal primordia (pe), stamen primordia (st), carpel primordia (ca). The scale bars correspond to 20µm.

# **CONCLUSION PERSPECTIVES**

## La quête de nouveaux gènes sur le chromosome Y

Pendant ma thèse, j'ai utilisé les quatre gènes qui étaient les mieux caractérisés pour effectuer les analyses d'évolution moléculaire sur l'arrêt de la recombinaison entre X et Y, la première du genre pour une espèce végétale. Il serait véritablement intéressant d'inclure un plus grand nombre de gènes, peut-être une vingtaine dans une prochaine analyse sur l'arrêt de la recombinaison afin de la rendre plus résolutive. Le plus intéressant serait qu'elle inclut également les gènes de la détermination du sexe qui sont, a priori, les premiers à avoir arrêté de recombiner. Cette entreprise n'est pas aisée. Comment isoler de nouveaux gènes dont ceux de la détermination du sexe ? Au laboratoire, les gènes 1,3 et 4 ont été isolés en effectuant des PCR avec des amorces dégénérées à partir de chromosomes Y isolés par micromanipulation. Une banque d'ADN complémentaires produite à partir de boutons mâles aux stades précédant celui où l'on retrouve une différence morphologique entre les méristèmes floraux mâles et femelles (stade 5) a ensuite été criblée avec ces produits PCR. Le gène DD44 a lui été isolé par un crible différentiel entre une banque d'ADN complémentaires mâle et une de femelle de boutons floraux pris au stade 5. Un nouveau gène, la spermidine synthase a récemment été isolé par Filatov (2005) par un séquençage au hasard de clones issus d'une banque d'ADN complémentaires mâle. C'est la méthode que nous avons utilisée qui a finalement donné les meilleurs résultats puisqu'elle a permis d'isoler cinq gènes (les gènes 2 et 5 sont encore en cours de caractérisation). De plus les deux dernières méthodes ne sont pas forcément judicieuses pour isoler de nouveaux gènes, y compris ceux de la détermination du sexe. En effet, la méthode de criblage différentiel permet surtout d'isoler les gènes qui sont en aval dans les voies de différenciation à l'origine de la suppression des organes sexuels. Pour que cette méthode soit efficace, il faudrait prendre des boutons au stade où il y a une différence au niveau moléculaire de l'expression des gènes entre les fleurs mâles et femelles et non pas au stade où il y a une différence morphologique, stade qui est forcément plus tardif. Le problème est que ce stade où les premières différences d'expression se produisent est inconnu. La méthode utilisée par Filatov n'est également pas très efficace. Il est en effet très laborieux de tester un à un si des gènes pris au hasard sont liés au sexe. Certes, les plantes de *S. latifolia* possèdent 12 paires de chromosomes et la paire de chromosomes sexuels est la plus grande. Le chromosome Y faisant à lui tout seul  $5 \times 10^5$  pb (Matsunaga et coll., 1994). Il est vrai que statistiquement, on a une forte probabilité pour que sur une dizaine de gènes isolés, l'un soit porté par les chromosomes sexuels. Cependant, cela reste statistique. Il est probable qu'en conséquence de l'arrêt de la recombinaison, la densité en gènes soit moins importante sur ces chromosomes et en particulier sur le Y.

Quelles pourraient donc être les stratégies pour isoler de nouveaux gènes ? Séquencer le chromosome Y reste coûteux et laborieux, même avec les progrès du séquençage. Ce chromosome porte vraisemblablement beaucoup de séquences répétées, ce qui rendrait le travail difficile. Il serait par contre possible de construire une banque BAC et de séquencer des clones BAC criblés avec des ADN complémentaires de fleurs mâles voire criblés avec les gènes déjà isolés. Nous avons également envisagé d'identifier les gènes transcrits localisés sur le chromosome Y en effectuant des hybridations *in situ* préparatives (prepISH ; Hozier et coll., 1994). Cette technique consiste à hybrider une banque d'ADN complémentaires sur une préparation de chromosomes métaphasiques. Le

chromosome ou la portion de chromosome d'intérêt est ensuite récupéré sous le microscope par micromanipulation et les ADNc hybridés sont amplifiés par PCR. Le produit PCR est cloné. Chaque clone représente en théorie un ADNc sur le chromosome d'intérêt, dans notre cas le Y. Cette technique pourrait même être optimisée en utilisant des chromosomes Y issus de plantes mutantes qui possèdent des délétions sur ce chromosome.

En parallèle de ce travail, il serait intéressant de pouvoir localiser les gènes sur le chromosome Y pour identifier d'éventuels événements d'inversion par rapport au X. Deux méthodes sont possibles. La première consiste à effectuer du FISH (Fluorescent in situ hybridisation) avec les différents gènes ce qui permet de les localiser directement sur le chromosome. L'autre solution, développée au laboratoire par Bohuslav Janousek, consiste à utiliser des plantes qui présentent deux chromosomes Y. Dans ces plantes, la recombinaison entre les deux chromosomes Y est possible, ce qui permet donc de cartographier les gènes de façon classique en mesurant la fréquence de recombinaison. Ces résultats permettraient de fournir des renseignements complémentaires pour déterminer si des événements d'inversion peuvent ou non être mis en cause dans l'arrêt de la recombinaison.

## **La dégénérescence et ses conséquences chez *S. latifolia***

Concernant le gène 3, l'objectif le plus important est de déterminer si *SIY3* s'exprime ou non. Il est possible que la forte augmentation de taille du premier intron, éventuellement due à des insertions d'éléments transposables, ait pour conséquence un problème de maturation de l'ARNm, ce qui peut se traduire par un plus faible taux de transcrits matures. Quel qu'en soit la raison, si le plus faible niveau de transcrit de *SIY3* se confirme, il sera intéressant de regarder si un mécanisme de compensation de dose est en train de se mettre en place. En premier lieu, il serait intéressant de savoir quel type de mécanisme de compensation de dose se met en place. S'agit-il d'une surexpression de *SIX3* chez le mâle, d'une sous-expression des deux allèles de *SIX3* chez la femelle voire une inactivation d'un des deux allèles chez la femelle. J'ai déjà essayé d'identifier une inactivation d'un des deux allèles chez la femelle à partir d'ADNc issus de feuilles. Cela m'a permis de montrer que les deux allèles s'expriment. Cependant, on ne peut rien conclure car on ne sait pas quand l'inactivation d'un des allèles peut avoir lieu. Chez les mammifères, elle est mise en place dès les stades embryonnaires, mais chez les plantes, elle pourrait se produire au niveau des méristèmes et à la mise en place des primordia. La feuille pourrait donc contenir un ensemble de cellules qui possèdent une inactivation de l'un des allèles, le reste des cellules étant inactivé pour le deuxième allèle. Dans cette configuration, le seul moyen de mettre en évidence, une inactivation de l'un des allèles chez la femelle serait de faire du RNA-FISH, c'est-à-dire de l'hybridation *in situ* des transcrits naissants sur tissu végétal. Si la compensation de dose s'effectue par surexpression de *SIX3* chez le mâle, des analyses en PCR quantitative devrait permettre de le mettre en évidence. Le mécanisme de compensation de dose le plus difficile à identifier est celui par sous expression des deux allèles de *SIX3* chez la femelle comme c'est le cas pour *Caenorhabditis elegans*. Le RNA-FISH et la PCR quantitative ne seront pas forcément suffisamment assez sensibles pour le mettre en évidence. Cependant, si les analyses en PCR quantitative et le RNA-FISH ne mettent en évidence ni une inactivation de *SIX3* chez la femelle ni une surexpression

chez le mâle, par défaut, cela suggèrera une sous-expression des deux allèles chez la femelle.

## Quels sont les chromosomes sexuels de *S. otites* ?

Pour le moment, les résultats des analyses de ségrégation ne montrent pas clairement que les gènes 3 et DD44 sont liés au sexe, tel que l'on pouvait le voir pour les trois autres espèces dioïques. Cela doit pouvoir s'expliquer par le fait que les chromosomes sexuels sont récents chez cette espèce et que la région pseudo-autosomale est encore très étendue, incluant nos gènes. Les nouvelles plantes devraient permettre d'avoir une meilleure vision de la ségrégation de ces gènes chez cette espèce. Si ces gènes sont liés au sexe comme semblent l'indiquer nos résultats préliminaires, ce sera alors la première fois qu'il sera mis en évidence qu'une paire d'autosomes peut-être prédisposée à former des chromosomes sexuels. Dans ce cas, il sera intéressant de tester tous les autres gènes afin de voir dans quelle région, non recombinante ou pseudo-autosomale, ils se trouvent. Il sera également intéressant de déterminer si les chromosomes sexuels sont en fait de type ZW ou XY chez *S. otites*.

## Le méristème en perspective

Les orthologues chez *Silene latifolia* des gènes *CUP-SHAPED COTYLEDON* et *SHOOTMERISTEMLESS* nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois une différence d'expression, pour des gènes du développement, entre les méristèmes de fleurs mâles et ceux de fleurs femelles. Ce qui est intéressant, c'est que cette différence apparaît plus tôt que la différence morphologique. Ces gènes ne sont probablement pas les gènes maître de la détermination mâle du sexe, situés sur le chromosome Y et à l'origine de la suppression des carpelles. Nos premières expériences de Southern génomique ne semblent en effet pas indiquer qu'ils soient liés au sexe, au moins pour *SICUC*. Du fait qu'ils ont un patron d'expression différent entre mâle et femelle avant que cette différence soit morphologiquement visible, ils agissent en fait assez tôt dans la voie de développement à l'origine de l'absence de carpelles. Nous avons donc identifié une des voies de régulation impliquée dans la détermination du sexe chez *S. latifolia*. En parallèle, il serait intéressant de continuer à approfondir nos connaissances sur les mécanismes mis en cause dans la suppression des carpelles. En particulier il serait intéressant d'effectuer du double marquage en utilisant *SICUC* et *SISTM* pour voir si ces deux gènes présentent un patron modifié chez les mâles par rapport aux femelles au même moment ou si, par exemple, *CUC* s'exprime dans le centre du méristème des fleurs mâles juste avant l'extinction de *STM* à ce niveau. Cela pourrait nous renseigner sur les liens qui existent entre *STM* et *CUC* dans les méristèmes floraux chez *S. latifolia*. Pourquoi *STM* arrête de s'exprimer au centre du méristème ? Cet arrêt est peut-être dû à un arrêt du maintien des cellules souche au centre du méristème, conséquence de l'expression ectopique de *CUC*. Il serait donc également intéressant de tester l'expression de *WUSCHEL*, gène clé du maintien des cellules souche, et *CLAVATA3*, marqueur de ces mêmes cellules, au stade 3, stade pendant lequel la différence entre mâle et femelle est observé pour *SICUC* et *SISTM*. Concernant le gène *CUC*, il faut nous pencher sur les raisons de son expression élargie au stade 3. L'obtention

de la séquence complète de son ADN complémentaire pourrait déjà nous renseigner sur la présence et l'intégrité des sites de fixation des micro ARN notamment miR164 qui est connu pour réguler l'expression des gènes *CUC1* et *CUC2* (Laufs et coll., 2004). Etant donné les liens qui ont été mis en évidence entre *CUPULIFORMIS*, orthologue de *CUC1* et *CUC2* chez *Antirrhinum majus*, et les gènes TCP qui contrôlent la prolifération cellulaire, le clonage de gènes de cette famille pourrait nous renseigner sur les acteurs agissant en aval de *SICUC* au centre du méristème floral des fleurs mâles.

L'approche de type « gènes candidats » que nous avons initié ou encore celle de prepISH pour cloner les gènes présents sur le chromosome Y pourra peut-être à terme permettre l'identification des gènes de la détermination du sexe. Comment s'assurer que les gènes isolés sont ceux de la détermination du sexe ? La première possibilité sera de tester si les gènes sont présents chez les mutants de délétion hermaphrodites. L'idéal serait de pouvoir transformer les plantes de *Silene*, ce qui pour le moment n'a jamais pu être effectué. En inactivant les gènes par ARN interférence ou en les exprimant de façon constitutive, il serait alors possible de tester si le phénotype sexuel est modifié.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

# 1 Matériels

## 1.1 Matériel végétal

Les plantes de *S. latifolia* utilisées pour les analyses moléculaires des chromosomes sexuels proviennent de la forêt de Fontainebleau ou de la collection personnelle de Deborah Charlesworth à Edimbourg. Les plantes de *S. latifolia* utilisées pour les hybridations *in situ* proviennent des espaces verts situés autour de Lyon. Les graines de *S. dioica* ont été collectées en Corrèze et celles de *S. diclinis* proviennent de la collection de l'Institut de Biophysique de Brno.

Les graines des différentes espèces non dioïques utilisées ont été fournies par le jardin botanique de la ville de Lyon. L'espèce dioïque *Silene acaulis* n'a pu être incluse dans l'analyse car cette plante de haute altitude ne peut être cultivée à Lyon. De plus, selon le jardin botanique de la ville de Lyon, *Silene pseudotites* serait une sous-espèce de *Silene otites*. Seule *Silene otites* a donc été analysée.

La germination des graines se fait par un traitement à l'eau de javel 10 % de 10 mn ramollissant et perméabilisant les téguments externes de la graine. Les graines sont ensuite rincées trois fois et mises à germer dans quelques millimètres d'eau. Toutes les plantes sauf celles de l'espèce *S. otites* ont été cultivées en serre. La température était de 14°C la nuit et de 18°C la journée d'octobre à mars, et de 18°C la nuit et 22°C le jour d'avril à septembre. Les plantes de *S. otites* ont été cultivées à l'extérieur afin que les basses températures de l'hiver induisent la floraison à l'arrivée du printemps. Les croisements ont été effectués manuellement en mettant en contact les étamines d'une fleur mâle mature avec les parties femelles d'une autre plante. Pour chaque espèce dioïque, des croisements ont été effectués afin d'obtenir des familles, c'est-à-dire deux parents et leur descendance. Le sexe des plantes issues du croisement a été déterminé à la floraison. Les membres de cette famille ont été utilisés pour suivre la ségrégation de nos marqueurs moléculaires.

## 1.2 Bactéries compétentes

Les bactéries utilisées pour les clonages moléculaires sont des bactéries *Escherichia coli* de la souche DH5 $\alpha$ . Ces bactéries sont rec-. Il ne peut donc y avoir de recombinaison entre l'insert et le génome de la bactérie. Elles sont également LacZ- et ampicilline sensibles. En absence de vecteur, elles restent blanches en présence de Xgal et ne peuvent pousser sur des milieux sélectifs contenant de l'ampicilline. Ces bactéries sont également mutées pour le répresseur du gène LacZ. Si le vecteur contient le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase, il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) pour induire l'expression de ce gène rapporteur.

## 2 Méthodes

### 2.1 Extraction d'ADN génomique de *Silene*

Trois ou quatre boutons floraux ou feuilles sont broyés dans l'azote liquide. Deux millilitres de tampon d'extraction (133mM Tris pH8, 6.7 mM EDTA pH8, 0.95mM NaCl, 1.33 % final de Na Sarcosyl,  $\beta$  mercaptoéthanol à 1.33% final ajouté juste avant utilisation) sont ajoutés au broyat. Les échantillons sont incubés 30 mn à 65°C. Une première extraction est effectuée par addition d'un volume de solution de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Après 5 mn de centrifugation à 2500g, le surnageant est transféré dans un tube propre et l'ADN est précipité par 2/3 de volume d'isopropanol. Les pelotes d'ADN sont transférées dans un tube propre à l'aide d'une pointe jaune et lavées 30 mn dans une solution d'éthanol 76 % avec 0.2M de Na Acétate pH7, puis 30 s dans une solution d'éthanol 76 % avec 10mM de NH<sub>4</sub> Acétate. Après séchage à l'air libre, le culot est repris dans du TE (10mM Tris pH7.6, 1mM EDTA pH8) associé à de la RNase (1mg/ml final) pour dégrader les molécules d'ARN. Le traitement à la RNase s'effectue à 4°C sur la nuit ou à température ambiante pendant 2h. Pour éliminer les protéines résiduelles, une extraction est effectuée en ajoutant 1 volume de phénol/chloroforme. Après agitation puis centrifugation 5 mn à 12000g, la phase aqueuse est prélevée et l'ADN est précipité par 2.5 volumes d'éthanol 100 % avec 1/10<sup>e</sup> de volume de Na Acétate (3M). Après 5 mn de centrifugation à 18000g, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70 %, séché puis repris dans 100  $\mu$ l de TE.

### 2.2 Extraction d'ARNs totaux de plante

Tout le matériel utilisé ainsi que les solutions sont traités de manière à travailler dans des conditions dépourvues d'activité RNase. Comme pour les extractions d'ADN génomique, trois ou quatre boutons floraux ou feuilles sont broyés dans l'azote liquide. A la poudre, il est ajouté 1ml de réactif Trizol (Invitrogen). L'ensemble est vortexé pendant environ 20s et laissé sur la paillasse pendant 5 mn. 0,2 ml de chloroforme est alors ajouté à la solution. Après agitation 15 s au vortex, les échantillons sont de nouveau laissés sur la paillasse pendant 5mn. Ils sont centrifugés 15 mn à 13000g et à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et les ARNs sont précipités par addition de 500 $\mu$ l d'isopropanol, vortexés et laissés incuber sur la paillasse pendant 10mn. Après centrifugation à 13000g pendant 10mn, les culots sont lavés à l'éthanol 75 % et repris dans 100 $\mu$ l d'eau millipore et conservés à -80°C.

### 2.3 Transcription reverse

Les ARNs totaux sont dosés au spectrophotomètre à 260nm. 5 $\mu$ g d'ARNs totaux sont dénaturés 5 mn à 65°C puis mis dans la glace. Ensuite, la réaction de rétrotranscription s'effectue dans les conditions suivantes : 5  $\mu$ g d'ARNs totaux, tampon In Vitrogen 1X, 10  $\mu$ M de DiThioThrétole (DTT), 10  $\mu$ M de dNTP, 1,3 unités de RNAsin, 2  $\mu$ M d'oligodT, volume final 20  $\mu$ l. La solution est laissée 5 mn à température ambiante avant d'ajouter 200 unités de rétrotranscriptase (In vitrogen).

La réaction s'effectue à 42°C pendant 1h, puis les enzymes sont inactivées en chauffant à 95°C pendant 5 mn.

## 2.4 Amplification PCR (Polymerase Chain Reaction)

### 2.4.1 PCR pour l'amplification du gène 3

Les différents couples d'amorces utilisés sont référencés dans le tableau 2. Toutes les PCR concernant ce gène ont été effectuées avec la Taq polymérase de la société Qbiogen. Les réactions de PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes : 150ng d'ADN génomique, tampon QBiogen 1X, dNTP à 0,15 mM, 0,4 µM de chaque amorce, 0,5 U de Taq polymérase.

Pour les couples S1, S2 et S3, les conditions de PCR sont 5mn à 94°C ; (30s à 94°C, 30s à 55°C puis 2mn à 72°C) 35 cycles.

Les RT-PCR ont été effectuées en utilisant 1 µl de produit de transcription inverse. Pour les couples E1 et E2, le programme de la PCR est : 5 mn à 94°C ; (30s à 94°C, 30s à 60°C puis 30s à 72°C) 35 cycles. Pour le couple E3 et E4, les conditions sont les mêmes, seul le temps d'élongation est changé. Il est de 1 mn pour E3 et 1mn30 pour E4.

### 2.4.2 PCR pour les analyses phylogénétiques chez *S. otites*

Les amorces dessinées à partir des gènes de *Silene latifolia* ont pu être utilisées pour toutes les espèces étudiées du fait d'une bonne conservation des séquences.

Les réactions de PCR ont été réalisées en mode "touch down", ce qui consiste à diminuer graduellement la température d'hybridation pendant les 10 premiers cycles afin d'obtenir une spécificité d'hybridation optimale des amorces. Cette technique nous a permis d'amplifier les fragments homologues des différentes espèces de *Silene* et des groupes externes, alors que les températures optimales d'hybridation ne sont pas connues et diffèrent probablement d'une espèce à l'autre. Nous avons utilisé la Taq polymérase, le tampon et les dNTP de la société Amersham Pharmacia. Les réactions de PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes : 150ng d'ADN génomique, tampon Pharmacia 1X, dNTP à 0,1mM, 0,34µM de chaque amorce, 0,5 U de Taq polymérase dans un volume final de 30µl.

Pour le gène 3, le couple d'amorces utilisé est indiqué dans le tableau 2. Les conditions de PCR ont été les suivantes : 10 cycles en mode "touch down" de (30s à 94°C, 30s à 62°C moins 1°C à chaque cycle, 2mn à 72°C) suivis de 30 cycles de (30s à 94°C, 30s à 55°C, 2mn à 72°C).

Pour le gène 4, l'intron étant de taille trop importante, les deux exons sont amplifiés séparément et les séquences assemblées par la suite afin d'obtenir un nombre de sites informatifs suffisants. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 2. Les conditions de PCR ont été les mêmes que pour le gène 3 sauf que le mode "touch down" a été fait à partir de 65°C et les incubations à 72°C ont duré 1mn.

#### 2.4.3 PCR pour l'amplification des gènes 3 chez *S. otites*

Les PCR ont été effectuées avec la Taq polymérase de Qbiogen et dans les mêmes conditions que pour l'amplification avec les amorces S1, S2 et S3 du gène 3.

#### 2.4.4 Marche génomique

La marche génomique permet d'amplifier des fragments d'ADN génomique flanquant une séquence connue. L'une des amorces est complémentaire de la séquence d'ADN connue, l'autre se fixe à un d'adaptateur préalablement ligé aux extrémités de fragments d'ADN génomiques digérés par des enzymes de restrictions laissant des bouts francs.

20 à 40 µg d'ADN génomique de *Silene* sont digérés par une enzyme de restriction. Il s'agit généralement de DraI, EcoRV, PvuI, ScaI ou SspI. L'ADN digéré est alors précipité à l'éthanol et resuspendu dans un tampon Tris 10mM à pH 8. 5 µg d'ADN digéré est utilisé pour la ligation avec 4µl des adaptateurs ADAP1 et ADAP2 (25µM). Les adaptateurs auront préalablement été dénaturés à 95°C pendant 1mn et renaturés lentement à température ambiante. La ligation est effectuée sur la nuit à 16°C dans un volume final de 20 µl en utilisant la ligase de la société Biolabs. L'ADN ligé est dilué avant utilisation en PCR à une concentration de 6 ng/µl.

Les PCR sont ensuite effectuées en utilisant l'ExTaq polymérase. La première PCR est effectuée en utilisant 1µl de produit de ligation. Les conditions sont tampon Takara 1X, dNTP à 0,1mM, 0,4 µM de chaque amorce, 0,5 U de Taq polymérase dans un volume final de 30 µl et le programme PCR : 5mn à 94°C ; (30s à 94°C, 30s à 68°C puis 3mn à 72°C) 35 cycles. La deuxième PCR est effectuée dans les mêmes conditions que la première en utilisant 1µl du produit de la première PCR dilué 100 fois.

Séquences des Adaptateurs :

ADAP1 :

CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGGAAGT

ADAP2

ACCTCCCA

Séquence de l'amorce AP1 servant à la première PCR :

GTAATACGACTCACTATAGGGC

Séquence de l'amorce AP2 de la deuxième PCR :

ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC

## 2.5 Clonage des produits PCR

Les produits PCR sont insérés dans le vecteur pGEM-T Easy à l'aide du kit de ligation pGEM-T Easy de Promega. Le kit pGEM-T Easy a été conçu pour le clonage de produits PCR puisque le vecteur est fourni linéarisé et possède la base nucléotidique T à chacune de ses extrémités. Les TAQ polymérases non fidèles ajoutent un nucléotide A à chaque fin d'élongation. Les extrémités du vecteur sont donc compatibles avec les extrémités des produits PCR à cloner. Le vecteur pGEM-T Easy contient la séquence codante du gène de la β-galactosidase et un gène de résistance à l'ampicilline comme gène de sélection. Le site de clonage est intégré à l'intérieur du gène de la β-galactosidase. Ainsi, après transformation, les colonies qui

possèdent le vecteur avec un insert codant une  $\beta$ -galactosidase non fonctionnelle et apparaissent blanches en présence de X-Gal (substrat de la  $\beta$ -galactosidase). Les colonies qui contiennent le vecteur sans insert sont bleues en présence de X-Gal. Il existe également un site de restriction EcoRI de chaque côté du site d'insertion. Une digestion de plasmide par EcoRI permet de vérifier la présence et la taille de l'insert.

Pour une ligation en conditions optimales, le ratio insert/vecteur doit être de trois. La réaction de ligation s'effectue dans un volume final de 10  $\mu$ l et nécessite la présence de deux unités de ligase T4 (fournie dans le kit). La réaction s'opère en 4h à température ambiante. Les produits PCR ainsi insérés dans le vecteur doivent alors être introduits dans les cellules compétentes.

Pour la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , nous avons utilisé la méthode de choc thermique (Sambrook et coll. 1989) pour les fragments de petite taille (inférieur à 1kb), et la méthode d'électroporation (Sambrook et coll. 1989), plus efficace pour les fragments de grande taille.

Les préparations de plasmides se font selon un protocole de lyse alcaline. Une colonie blanche est utilisée pour inoculer 3ml de LB+ampicilline (50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>). Les inoculi sont incubés une nuit à 37°C avec agitation (230rpm). 2ml de chaque culture est centrifugé 1 mn à 16000g. Le surnageant est prélevé et le culot de bactéries est resuspendu dans 200 $\mu$ l de TE (10mM Tris pH7.6, 1mM EDTA pH8) avec de la RNase (100 $\mu$ l.ml<sup>-1</sup> final). La lyse bactérienne est provoquée par addition de 200 $\mu$ l d'une solution de NaOH (0.2N) et de SDS 1 %. Le tout est mélangé par inversion. La solution est ensuite neutralisée par addition d'acétate de potassium (3M, pH5) puis mélangé par inversion. L'ensemble est centrifugé 15 mn à 4°C à 18000g. Le surnageant est récupéré et l'ADN plasmidique est précipité par addition de deux volumes d'éthanol 100 % froid puis laissé à 4°C pendant 15mn. Après centrifugation à 4°C pendant 15mn à 18000g, les culots d'ADN sont rincés à l'éthanol 70 %, séchés et repris dans 20 $\mu$ l de TE. 1  $\mu$ l de plasmide est ajouté à 3,25 $\mu$ l d'eau millipore et 0.5 $\mu$ l de tampon 3 (Gibco) ainsi qu'à 0.25 $\mu$ l d'enzyme EcoRI (Gibco). Les digestions s'effectuent à 37°C pendant 1h. La présence de l'insert est vérifié par migration en électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et visualisation sous UV en présence de bromure d'éthidium.

## 2.6 Séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit de séquençage "DNA Sequencing Mix-Big Dye Terminator cycle sequencing V2.0 ready reactions" et selon le protocole fourni par Applied Biosystem, puis analysées par un système automatisé développé par Perkin Elmer (ABI-PE) et Hitachi. Les chromatogrammes ont alors été analysés à l'aide du logiciel Sequencher. Le logiciel Mapdraw de Dnastar permet de déterminer les sites de restriction potentiellement révélateurs d'un polymorphisme allélique.

## 2.7 Analyse phylogénétique

Les arbres phylogénétiques des gènes 3 et 4 ont été effectués en collaboration avec Gabriel Marais et Dominique Mouchiroud du laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive de l'Université Lyon I.

### Alignements multiples :

La construction d'un arbre phylogénétique nécessite au préalable d'avoir aligné toutes les séquences à analyser. L'alignement consiste à rechercher les similitudes et les différences entre toutes les séquences, c'est-à-dire toutes les substitutions entre les bases, mais aussi les événements d'insertions ou de délétions qui se produisent préférentiellement au niveau des introns soumis à une moindre pression de sélection. Lors des alignements, si une base a été délétée ou insérée chez une ou plusieurs espèces, il y a formation de trous pour optimiser l'alignement global. L'alignement multiple a été réalisé par le logiciel ClustalW (Thompson et coll. 1994) par l'intermédiaire de l'éditeur d'alignement multiple Seaview (Galtier et coll., 1996) qui permet une présentation plus claire des séquences. On appelle un site une position de l'alignement. Le site est dit informatif si on ne retrouve pas le même nucléotide pour chaque séquence de l'alignement.

### Arbres phylogénétiques :

La construction des arbres a été réalisée par le logiciel Phylo\_Win (Galtier et coll., 1996). Un arbre phylogénétique peut être construit en se focalisant sur les événements d'insertion ou de délétion, ou en considérant uniquement les événements de substitution. À l'heure actuelle, il n'existe aucun algorithme permettant de traiter les deux types d'événements à la fois. Les substitutions étant plus fréquentes, le logiciel Phylo\_Win ne traite que les événements de substitution et permet de construire un arbre phylogénétique selon trois méthodes différentes :

\*la méthode de maximum de parcimonie (Fitch, 1971) : c'est la méthode la plus ancienne. Elle permet de construire l'arbre dont la topologie implique le moins de mutations possibles pour passer d'une séquence à une autre.

\*la méthode du "neighbor-joining" (Saitou et Nei, 1987) : cette méthode crée des arbres dont la topologie reflète l'évolution la plus courte possible. Des trois méthodes, c'est la seule qui prend en compte les inégalités de vitesse d'évolution (vitesse d'accumulation des mutations synonymes et non synonymes). La longueur des branches est ainsi proportionnelle à la vitesse d'évolution.

\*la méthode du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1985 ; Olsen et coll., 1994) : cette méthode identifie l'arbre le plus probable. Elle donne plus de poids aux transversions (substitution d'une base purique par une base pyrimidique et inversement) car elles sont plus fréquentes que les transitions (substitution par une base du même type).

Les arbres construits selon les trois méthodes permettent également d'estimer la distance évolutive séparant les espèces entre elles. Cette valeur de distance tient compte de la date de divergence entre les espèces et de la divergence entre leurs séquences. Chaque branche porte ainsi une valeur. Pour connaître la distance évolutive séparant deux espèces, il suffit d'additionner les distances des branches les séparant.

Pour construire un arbre, les séquences peuvent être traitées d'une manière globale ou en faisant des comparaisons deux à deux. Si les calculs sont effectués en traitant les séquences de manière globale, les sites ne sont conservés pour calculer l'arbre que si aucun trou n'est présent parmi toutes les espèces. Pour trois méthodes (maximum de parcimonie, "neighbor-joining" et maximum de vraisemblance) le calcul peut-être fait de cette façon. Si les calculs sont effectués en faisant des comparaisons deux à deux, pour chaque paire, les sites conservés sont ceux où il

n'y a pas de trous entre les deux espèces. Ainsi le nombre de sites conservés pour effectuer les calculs varie entre chaque paire. Cela permet d'augmenter le nombre de sites pris en compte pour construire l'arbre. Seule la méthode de "neighbor-joining" permet de construire des arbres de cette façon.

Les indices de fiabilités des branches ou "bootstraps" indiquent la solidité des branches (Efron, 1982 ; Felsenstein, 1985) et permettent donc d'estimer la robustesse de l'arbre. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage au hasard des sites avec remise. Dans chaque réplication de bootstrap certains sites peuvent donc être présents plusieurs fois. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne, on calcule le pourcentage des arbres "artificiels" contenant cette branche. On considère généralement que les branches soutenues par une valeur de bootstrap supérieure à 70% sont fiables. Ces valeurs sont calculées par le logiciel Phylo\_Win. Un autre critère de robustesse est "l'enracinement" de l'arbre. Des espèces que l'on sait éloignées des espèces étudiées sont utilisées comme groupes externes. Une fois l'arbre construit, ces espèces doivent effectivement se retrouver en dehors du groupe des espèces étudiées.

## **2.8 Analyses bioinformatiques**

Les analyses faites avec le logiciel RepeatMasker ont été effectuées en soumettant la séquence en ligne au serveur de l'adresse suivante :

[www.repeatmasker.org/](http://www.repeatmasker.org/)

Les analyses de Blast ont été effectuées sur le site NCBI :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Les alignements locaux ont été effectués à partir du serveur du Pôle Bioinformatique Lyonnais (PBIL) : [pbil.univ-lyon1.fr/](http://pbil.univ-lyon1.fr/)

## **2.9 Hybridation sur membrane nylon**

Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du TAE (Tris-acétate 40M ; EDTA 1mM), les molécules d'ADN sont transférées sur la nuit sur membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) à l'aide d'une solution de NaOH 0,4M. Le lendemain, la membrane est rincée dans une solution de 2X SSC (SSC 1X= NaCl 150mM, citrate de sodium 15mM, pH7).

L'hybridation est effectuée avec le système AlkPhos d'Amersham. Ce kit contient un système de production de sondes froides par marquage direct de produits PCR ainsi que l'ensemble des produits permettant la révélation.

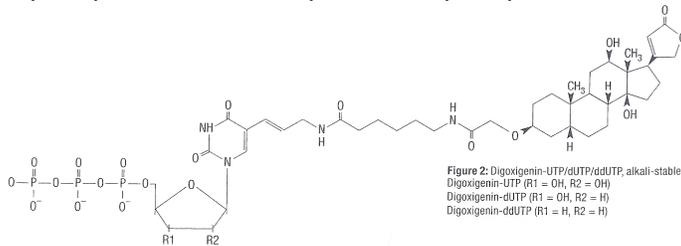
## **2.10 Hybridation *in situ***

### **2.10.1 Préparation des ribosondes pour l'hybridation *in situ***

Principe

La sonde réalisée est une séquence nucléotidique complémentaire à l'ARNm recherché, cette séquence correspond à un ARN antisens obtenu par transcription *in*

*in vitro* d'un produit PCR. Cet ARN antisens marqué à la digoxigénine (DIG) est détecté par un anticorps anti-digoxigénine (anti-DIG) couplé à la phosphatase alcaline (AP), permettant la mise en évidence de l'hybridation. En effet, en présence de NBT/BCIP, la phosphatase alcaline produit un précipité bleu.



### Réalisation de la ribosonde

Pour préparer les ribosondes, il faut dessiner des amorces, puis réaliser la matrice. Les amorces sont dessinées à partir de la séquence des gènes d'intérêt.

#### Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

SICUC F : 5' GGAAGGCTCCAATGGGNGARAA 3'

SICUC R : 5' TTGGAGAAGCAGGACACGT 3'

SICUC RT7 : 5' ATGTAATACGACTCACTATAGTTGGAGAAGCAGGACACGT 3'

H4 F : 5' ATGTCAGGCCGCGGAAAGGGAGGAA 3'

H4 R : 5' AACAACAAGATATTGATTACTAGAA 3'

H4 RT7 : 5' ATGTAATACGACTCACTATAGAACAACAAGATATTGATTACTAGAA 3'

SIM2 F : 5' ACCCAACCTTCAAGACAGGATGTAA 3'

SIM2 R : 5' GAAAATTGCATCAAGATCTTGCTTA 3'

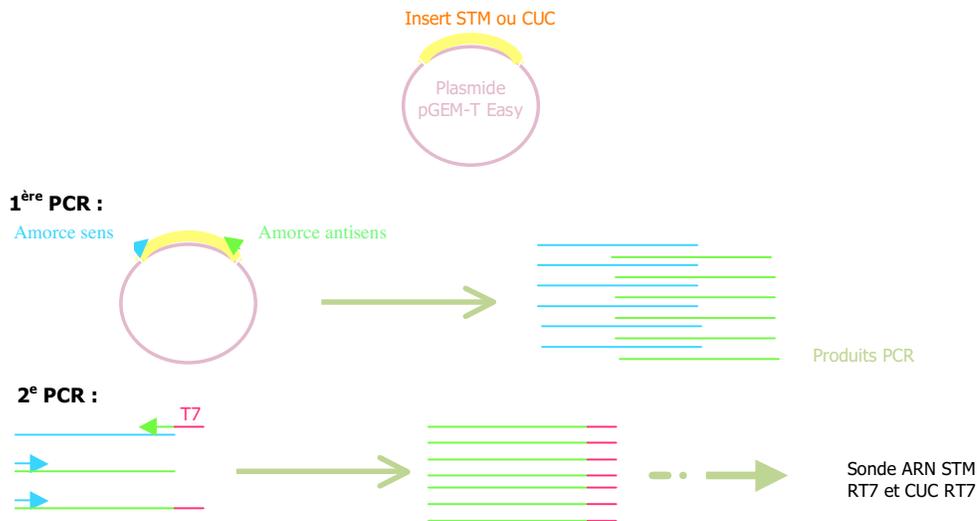
SIM2 RT7 : 5' ATGTAATACGACTCACTATAGGAAAATTGCATCAAGATCTTGCTTA 3'

SISTM F : 5' GAAGATCCAGSDCTDGATCAGTTCATGGA 3'

SISTM R : 5' GGCCACGCGTCTGACTAGTAC 3'

SISTM RT7 : 5' ATGTAATACGACTCACTATAG GGCCACGCGTCTGACTAGTAC3'

La préparation de la matrice : une première PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée à partir d'un plasmide contenant le gène d'intérêt, avec des amorces spécifiques. Cette PCR permet d'isoler le gène d'intérêt du plasmide, afin de limiter le bruit de fond dû à la présence du « polylinker » dans la ribosonde. Une deuxième PCR est effectuée à partir du produit PCR précédent, les amorces utilisées sont les mêmes que pour la première PCR, mais la séquence du promoteur T7 a été ajoutée à l'amorce antisens. De cette façon, la transcription s'effectuera de manière à obtenir un ARN sens ou antisens. Le produit PCR obtenu est quantifié sur gel d'agarose 1%. Selon la taille du fragment la quantité utilisée pour servir de matrice sera différente, entre 0,2 et 1µg (pour des fragment de 200bp et 1kb, utilisation de 0,2µg et 1µg de matrice respectivement). La matrice est obtenue de la manière suivante :



La transcription :

Produits	Référence	Quantité
Matrice	/	0,2 à 1µg
Tampon de transcription (5X)	Promega	4µl
DIG RNA labelling mix (10X)	Roche	2µl
H2O DEPC		18µl qsp
RNAsine	Promega	1µl
RNA polymerase T7	Promega	1µl

Incubation 1 heure à 37°C

Purification de la sonde : cette étape consiste à éliminer les nucléotides non incorporés et les ARN tronqués, qui pourraient induire du bruit de fond. Pour cela la réaction est ajustée à 48µl, puis passée sur une colonne d'exclusion (Sigma Spin 100). Enfin 2µl de tRNA à 100µg/ml sont ajoutés pour améliorer la précipitation.

Une hydrolyse est éventuellement réalisée lorsque la taille des ARN synthétisés est importante. La taille idéale étant située entre 200 et 300pb, pour une meilleure pénétration dans les coupes. Cette hydrolyse est réalisée par ajout de 50 µl d'un tampon d'hydrolyse carbonique (NA2CO3 120mM, pH10 + NaHCO3 80mM), à 60°C selon un temps déterminé par l'équation suivante :

$$T = (Li - Lf) / (K \cdot Li \cdot Lf)$$

Li : longueur initiale du transcrit

Lf : longueur requise

K : taux constant (0,11kb/mn)

L'ARN est ensuite immédiatement précipité à -80°C pendant 30mn, en ajoutant de l'acide acétique 10% (10µl), de l'acétate de sodium 3M, pH 4,8 (12µl) et de l'éthanol 100% (312µl).

Une centrifugation à 4°C de 10mn à 15000rpm permet de récupérer l'ARN.

Le culot est lavé à l'éthanol 70%, puis séché au Speed Vac et resuspendu dans 50µl d'eau et conservé à -20°C.

Les sondes sont testées sur membrane pour savoir si elles ont intégrés la DIG et si elles sont spécifiques du gène d'intérêt. Pour cela 1µl de produit PCR issu de la

première PCR, donc sans le promoteur T7 est déposé puis fixé sur une membrane Hybond N+ par irradiation aux UV pendant 5mn. Sur une membrane les produits PCR de H4, SIM2, CUC et STM sont fixés. Ils se servent mutuellement de témoins négatifs selon la sonde utilisée pour l'hybridation. La membrane est ensuite hybridée avec la sonde à tester (1µl) dans 75µl de tampon d'hybridation, sous lamelle, en chambre humide, au bain marie à 55°C pendant la nuit. Le lendemain la membrane est humidifiée dans du SSC 2X, puis lavée dans du TBS. La membrane est ensuite bloquée par la même solution de blocage que lors des lavages de post hybridation, 15mn, puis elle est lavée dans une solution de BSA 1%, Triton X-100 0,3% dans TBS, quelques minutes, puis l'anticorps anti DIG est ajouté pendant 1h30 (dilution 1/3000 dans BSA 1%, Triton X-100 0,3% dans TBS), suivi de 3 lavages de 20 mn dans BSA 1%, Triton X-100 0,3% dans TBS. Enfin elle est plongée dans un bain de tampon 5, puis dans le Nitro-Blue Tetrazolium (NBT, Roche)/5-Bromo-4-Chloro-3-IndolylPhosphate (BCIP, Roche), 34µl de chaque dans 10ml de tampon 5. En présence de NBT/BCIP et de chlorure de magnésium (MgCL<sub>2</sub>), catalyseur de la réaction, la PA couplée à la ribosonde transforme le NBT/BCIP en précipité bleu. Un spot bleu est observé lorsque la sonde est fixée au produit PCR correspondant. En principe, un seul spot apparaît indiquant que la sonde est bien spécifique de la séquence d'intérêt.

#### 2.10.2 Hybridation *in situ*

Le protocole d'hybridation *in situ* (HIS) que j'ai utilisé est inspiré de celui décrit par C. Ferrándiz (Ferrandiz C and Sessions A, 2002) et a été adapté par Frédérique Rozier au laboratoire.

Le but de l'HIS est de visualiser à l'échelle cellulaire la présence d'un ARNm codant spécifiquement une protéine. La présence de cet ARNm témoigne de l'activation du gène correspondant dans la cellule. Cette technique repose sur la propriété qu'ont 2 séquences nucléotidiques complémentaires de s'apparier de façon spécifique et avec une forte affinité. C'est une méthode très sensible, qui permet la détection de quelques molécules d'ARNm par cellule.

#### Fixation du matériel

Les jeunes boutons floraux (quelques millimètres) de pieds mâles, femelles et hermaphrodites (mutants de délétion sur le chromosome Y) sont prélevés et fixés dans le FAA (Formaldéhyde 3,7%, Ethanol 50%, Acide acétique glacial 5%). Dans cette solution, l'éthanol et l'acide acétique perméabilisent les tissus et fixent les noyaux, alors que le formaldéhyde fixe le cytoplasme. L'infiltration est réalisée sous vide, à 4°C, jusqu'à ce que les échantillons tombent au fond du tube. La solution de FAA est ensuite remplacée par une solution fraîche et la fixation se poursuit sur la nuit à 4°C.

Les échantillons sont ensuite déshydratés à température ambiante (RT) dans l'éthanol 70% (1 heure), puis 90% (1 heure). La coloration des tissus est assurée par l'éosine (Eosine Y 0,2% dans éthanol 90%), une nuit à 4°C. La déshydratation se poursuit par 2 bains d'éthanol 100% de 1 à 2 heures à RT.

L'imprégnation des tissus consiste à remplacer l'éthanol par l'histoclear (VWR), puis l'histoclear par le paraplaste (Kendall) de la manière suivante :

75% éthanol 100% / 25% histoclear → 1 à 2 heures

50% éthanol 100% / 50% histoclear → 1 à 2 heures

25% éthanol 100% / 75% histoclear → 1 à 2 heures  
 2x 100% histoclear → 1 à 2 heures  
 75% histoclear / 25% paraplaste → 2 heures minimum  
 50% histoclear / 50% paraplaste → 2 heures minimum  
 25% histoclear / 75% paraplaste → 2 heures minimum  
 3x paraplaste 100% de 3 – 4 heures à 3 – 4 jours

} 62°C

Des coupes de 9µm des échantillons sont réalisées à l'aide du microtome (M355S Microm). Les séries de coupes sont placées sur une lame chargée ioniquement positivement (Microm) recouverte d'eau, qui reposent sur une plaque chauffante à 37°C. Une fois sèches, elles sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Hybridation des lames

### Prétraitement

Le déparaffinage consiste à éliminer la paraffine qui se trouve autour et dans les tissus. Pour cela les lames sont plongées dans 2 bains d'histoclear de 10mn chacun. L'hydratation se fait comme suit : un bain d'éthanol 100% pendant 1mn, puis éthanol 100%, un de 96%, un de 85%, de 70%, de 50% et de 30% (6 x 30s) et 2 bains d'H<sub>2</sub>O de 2mn chacun. L'hydrolyse acide des tissus (HCl 0,2M pendant 20mn) permet une meilleure pénétration de la sonde. Le lavage dans H<sub>2</sub>O, 5mn, permet d'éliminer les traces d'HCl. Puis 2 bains, de 5mn, de SSC 2X (Standard Sodium Citrate) augmentent la stringence et, un rinçage dans l'H<sub>2</sub>O de 5mn élimine le SSC.

La digestion des protéines entourant les acides nucléiques (ARNs) cibles permet d'augmenter l'accessibilité de la sonde. Pour cela les lames sont, dans un premier temps, équilibrées 2mn par trempage dans le tampon de la protéinase K. Dans un deuxième temps, elles sont plongées dans la protéinase K (tampon protéinase K + protéinase K 1µg/ml, GibcoBRL), 15mn à 37°C (bain marie) avec agitation. L'arrêt de l'activité de la protéinase K est assuré par un bain dans la glycine (2mg/ml glycine dans PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X).

Les lavages dans le PBS 1X (Gibco), 2 x 2mn, permettent de maintenir un pH neutre de manière à conserver l'intégrité des tissus.

La post-fixation dans le formaldéhyde 4% dans PBS, 10mn, a pour but de maintenir les tissus fixés sur la lame.

Les lavages dans le PBS 1X, 2 x 5mn permettent d'éliminer les traces de formaldéhyde.

La déshydratation des tissus s'effectue par plusieurs bains : de l'H<sub>2</sub>O (x2) à l'éthanol 100% (x2), en passant par un bain d'éthanol 30%, un de 50%, un de 75%, un de 85% et un de 96%, de 30s chacun. Cette déshydratation permet d'obtenir des lames parfaitement sèches, sans trace d'eau, qui pourront ensuite être hybridées.

### Hybridation

La sonde utilisée est diluée dans un tampon d'hybridation. Ce dernier contient :

- SSC 6X,
- SDS 3% (Sodium Dodecyl Sulfate), détergent qui perméabilise les tissus.
- Formamide désionisée 50%, qui augmente la spécificité des ARN entre eux et permet de baisser la température d'hybridation.
- ARNt 100µg/ml (Roche), pour saturer les sites de fixation non spécifique, afin que la sonde ne s'hybride pas n'importe où.

De manière arbitraire 1µl de sonde est dilué dans 75µl de tampon d'hybridation, le mélange (sonde + tampon d'hybridation) est dénaturé à 80°C pendant 2mn. Pendant ce temps les lames sont préchauffées à 50°C, pour éviter la précipitation du SDS contenu dans le tampon d'hybridation. Chaque lame est recouverte de 75µl de mélange et ensuite d'une lamelle stérile, puis les lames sont placées dans une boîte humide. La boîte est ensuite placée dans un bain marie avec agitation, pendant une nuit, de manière à ce qu'elle flotte. La température est en général de 50°C, sauf pour le gène *SICUC* où l'hybridation s'est faite à 45°C.

#### Lavages après l'hybridation

Les rinçages se font comme suit :

Rinçage pendant 15mn à 50°C dans SSC 0,1X + SDS 0,5%, pour ôter les lamelles sans léser les tissus.

2 lavages de 90mn dans SSC 2X + formamide 50% avec agitation, à la même température que celle utilisée lors de l'hybridation. Ces lavages permettent d'augmenter la spécificité. En effet les sondes marquées peuvent s'hybrider à des séquences non spécifiques, qui sont partiellement similaires à la séquence de la sonde, la dissociation de ces brins est possible grâce à ces lavages.

Lavage 5mn dans du TBS 1X (Tris Buffered Saline), afin d'éliminer la formamide et de conserver une certaine stringence.

Incubation dans l'agent bloquant (Boering blocking agent 0,5% dans du TBS 1X, Roche). Les lames sont déposées dans une boîte et recouvertes de l'agent bloquant pendant 1 heure avec agitation à température ambiante. Cet agent bloquant sature certains sites protéiques permettant de supprimer un important bruit de fond.

Lavage dans BSA 1% (Bovine Serum Albumine ; Qbiogene) + triton X-100 0,3% (Sigma) dans TBS 1X, 30mn avec agitation. La BSA combinée au NaCl à 0,4M peut aider à prévenir le bruit de fond. Le triton X-100 est un agent mouillant qui perméabilise les tissus.

Dilution de l'anticorps anti-DIG couplé à l'AP (Roche) au 1/3000 dans BSA 1% + triton X-100 0,3% dans TBS 1X, chaque lame est recouverte de 500µl de mélange, pendant 1h30, en boîte humide.

Lavages dans BSA 1% + triton X-100 0,3% dans TBS 1X, 3 x 20mn avec agitation. Au cours de ces 3 lavages, l'excès d'anticorps est éliminé ainsi que ceux mal fixés.

La détection permet de visualiser la fixation de la sonde sur les tissus. En effet la sonde, marquée à la DIG, reconnaît l'ARNm ayant une séquence complémentaire à la sienne et se fixe à celui-ci. La sonde est reconnue par l'anti-DIG couplé à une AP. L'AP transforme le substrat NBT/BCIP en présence de MgCl<sub>2</sub> (catalyseur de cette réaction) et produit un précipité bleu, selon la réaction : AP + NBT/BCIP + MgCl<sub>2</sub> → précipité bleu

Pour cela les lames sont d'abord équilibrées dans le tampon 5, 5mn. Puis elles sont placées dans la solution de détection : tampon 5 + NBT + BCIP (34µl de NBT et de BCIP dans 10ml de tampon 5) et à l'obscurité.

Après quelques heures (variables selon la quantité d'ARNs cibles, de 24 à 48 heures), la réaction est arrêtée par des bains successifs d'eau millipore, d'éthanol 70% 1mn, éthanol 100% 1mn, éthanol 70% 1mn, eau millipore quelques minutes. Les bains d'éthanol permettent d'éliminer le marquage non spécifique. Les lames sont ensuite plongées dans du calcofluor (fluorescent brightner, Sigma) à 1mg/ml 10mn. Ce réactif se fixe aux parois des tissus et les rend fluorescentes lorsqu'ils sont excités par les UV, puis un rinçage à l'eau millipore (quelques minutes) élimine l'excédent de calcofluor. Les lames sont ensuite séchées et montées dans l'Entellan

(Merck). Ce composé polymérise entre la lame et la lamelle, fixant ainsi la lamelle de manière irréversible sur la lame et permettant de conserver le marquage des tissus. Les lames peuvent ensuite être observées au microscope.

## Couples d'amorces des différentes analyses du clade de *S. latifolia*

	Noms /sequences amorces sens	Noms/sequences amorces anti-sens
S1	11S14 AACAAAGTGTCAAGATCAAACAGCAAC	11AS8 TTATGAAGTCTGATAGTCCAAAGTCGG
	11S18 ATGTTAAACGAGAAGTGAAGATACTGAA	11AS5 CAATAGTTTCTCAACAAAATCTTTGGC
S2	11S29 CCATGGCTAGTATAAGCAACAGTG	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC
	11S1 AGAAATGGCAAGAGCTGTCAAAAGAGC	11AS57 CCTCCCTTCCCTCCTAAAATTGTCTCA
E1	11S1 AGAAATGGCAAGAGCTGTCAAAAGAGC	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC
	11S43 TGATCAGGCATTAGCTAGTACACT	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC
E2	11S18 ATGTTAAACGAGAAGTGAAGATACTGAA	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC
	11S18 ATGTTAAACGAGAAGTGAAGATACTGAA	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC

## Amorces de la marche génomique du gène 3 chez *S. latifolia*

amorces sens	amorces antisens
11S2 TATTTAATTTTCTTTTCTGTTATTT	11AS31 TCTCTCAAGTTCCAAAATAGTATGGTTC
11S5 GAGGTAGTGTAAAGAAATATGGGTCTA	11AS32 CAAGATAATGGGAGCTGAAAATAGATCA
	11AS39 TTCCTTAGTAAACGGATCCGAAAATGGAGTT
	11AS42 AATGGAGTTTGTAAACATGTATAGTTGACAC

## Couples d'amorces des analyses phylogénétiques de *S. oites*

	Nom/sequences amorces sens	Nom/sequences amorces sens
Gene 3	11S18 ATGTTAAACGAGAAGTGAAGATACTGAA	11AS13 GGTGATGACGCCAATACTCC
	95S17 CCAAATGGGTTTGAATCAATCAGCOCA	95AS20 GAATAAACAGCATTAAACCTAACACC
Gene 4 exon 1	95S1 CCACTGGAAGGTTGCCCTCGTTCT	95AS4 CTGCAGCOGAGGATGCCTGTCAA

## Couples d'amorces des analyses de ségrégation de *S. oites*

	Nom/sequences amorces sens	Nom/sequences amorces sens
Gene 3	11S43 TGATCAGGCATTAGCTAGTACACT	11AS15 TCAGTGTCTCCTTGAGTTTCTTGAC
	S2 CCATCACTTCTTATTTTATGCAGG	AS3 GTGTTGACA TGTCATCAG AAC

Tableau 2 : listes des amorces utilisés

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Agulnik, A.I., Zharkikh, A., Boettger-Tong, H., Bourgeron, T., McElreavey, K., and Bishop, C.E.** (1998). Evolution of the DAZ gene family suggests that Y-linked DAZ plays little, or a limited, role in spermatogenesis but underlines a recent African origin for human populations. *Hum Mol Genet* **7**, 1371-1377.
- Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**, 1563-1570.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-857.
- Ainsworth, C., Parker, J., and Buchanan-Wollaston, V.** (1998). Sex determination in plants. *Curr Top Dev Biol* **38**, 167-223.
- Armstrong, J.A., Bieker, J.J., and Emerson, B.M.** (1998). A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* **95**, 93-104.
- Atanassov, I., Delichere, C., Filatov, D.A., Charlesworth, D., Negrutiu, I., and Moneger, F.** (2001). Analysis and evolution of two functional Y-linked loci in a plant sex chromosome system. *Mol Biol Evol* **18**, 2162-2168.
- Bachtrog, D.** (2003a). Protein evolution and codon usage bias on the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda*. *Genetics* **165**, 1221-1232.
- Bachtrog, D.** (2003b). Adaptation shapes patterns of genome evolution on sexual and asexual chromosomes in *Drosophila*. *Nat Genet* **34**, 215-219.
- Bachtrog, D., and Charlesworth, B.** (2002). Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. *Nature* **416**, 323-326.
- Barton, M.K., and Poethig, R.S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shootmeristemless mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Bean, C.J., Schaner, C.E., and Kelly, W.G.** (2004). Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **36**, 100-105.
- Bell, G.** (1982). *The master peace of nature: The evolution and genetics of sexuality.* (Berkeley: Univ. California Press).
- Bennett, J.H.** (1963). Random mating and sex linkage. *J Theor Biol* **4**, 28-36.
- Bereterbide, A., Hernould, M., Castera, S., and Mouras, A.** (2001). Inhibition of cell proliferation, cell expansion and differentiation by the Arabidopsis SUPERMAN gene in transgenic tobacco plants. *Planta* **214**, 22-29.
- Bernardi, G.** (1993). The vertebrate genome: isochores and evolution. *Mol Biol Evol* **10**, 186-204.
- Birky, C.W., Jr.** (1996). Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**, 427-437.
- Bischler, H.** (1986). *Marchantia polymorpha*: Karyotype analysis. J. Hattori Bot. lab.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., and Smyth, D.R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *Apetal1* and interacting genes. *Development* **119**, 721-743.
- Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U., and Meyerowitz, E.M.** (1992). SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in Arabidopsis. *Development* **114**, 599-615.

- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M., and Simon, R.** (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 565-575.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I., and Trehin, C.** (2004). High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *Plant J* **38**, 182-192.
- Brooks, L.D.** (1988). The evolution of recombination rates. (Sunderland).
- Brooks, R.** (2000). Negative genetic correlation between male sexual attractiveness and survival. *Nature* **406**, 67-70.
- Bull, J.J.** (1983). Evolution of sex determining mechanism. (Menlo park).
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-971.
- Callos, J.D., and Medford, J.I.** (1994). Organ positions and pattern formation in the shoot apex. *Plant Journal* **6**, 1-7.
- Carles, C.C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K., and Fletcher, J.C.** (2005). ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in Arabidopsis. *Development* **132**, 897-911.
- Carrel, L., and Willard, H.F.** (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* **434**, 400-404.
- Carvalho, A.B., and Clark, A.G.** (2005). Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* **307**, 108-110.
- Charlesworth, B.** (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**, 1030-1033.
- Charlesworth, B., Morgan, M.T., and Charlesworth, D.** (1993). The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* **134**, 1289-1303.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., and Stephan, W.** (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**, 215-220.
- Charlesworth, D., and Guttman, D.S.** (1999). The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems. (Oxford: Bios scientific).
- Charlesworth, D., and Charlesworth, B.** (2005). Sex chromosomes: evolution of the weird and wonderful. *Curr Biol* **15**, R129-131.
- Chen, X., and Meyerowitz, E.M.** (1999). HUA1 and HUA2 are two members of the floral homeotic AGAMOUS pathway. *Mol Cell* **3**, 349-360.
- Chen, X., Liu, J., Cheng, Y., and Jia, D.** (2002). HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Development* **129**, 1085-1094.
- Cheng, Y., Kato, N., Wang, W., Li, J., and Chen, X.** (2003). Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Dev Cell* **4**, 53-66.
- Chuang, P.T., Albertson, D.G., and Meyer, B.J.** (1994). DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell* **79**, 459-474.

- Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S.** (1996). KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 1277-1289.
- Clark, S.E.** (2001). Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 276-284.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**, 575-585.
- Cooper, D.W., Johnston, P.G., Graves, J.A.M., and Watson, J.M.** (1993). X-inactivation in marsupials and monotremes. *Semin. Dev. Biol.* **4**, 117-128.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E.** (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J* **18**, 215-222.
- Darwin, C.R.** (1877). *The different form of flowers on plants of the same species.* (London).
- de Kloet, S.R.** (2001). Loss of the gene for the alpha subunit of ATP synthase (ATP5A1) from the W chromosome in the African grey parrot (*Psittacus erithacus*). *J Mol Evol* **53**, 135-143.
- Degraeve, N.** (1980). Etude de diverses particularités caryotypiques des genres *Silene*, *Lychnis* et *Melandrium*. *Biol. Soc. Brot. Ser.*, 595-643.
- Delichere, C., Veuskens, J., Hernould, M., Barbacar, N., Mouras, A., Negrutiu, I., and Moneger, F.** (1999). SIY1, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. *Embo J* **18**, 4169-4179.
- Desfeux, C., Maurice, S., Henri, J.P., Lejeune, B., and Gouyon, P.H.** (1996). Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc R Soc Lond [Biol]*, 409-414.
- Devlin, R.H., and Nagana, Y.** (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191-364.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., and Yanofsky, M.F.** (2004). The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol* **14**, 1935-1940.
- Dockx, J.** (1995). On homeobox genes and plant development. In *The Netherlands* (University of Utrecht).
- Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L.** (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485-488.
- Efron, B.** (1982). *The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans.* Monograph **38**.
- Eisen, A., and Lucchesi, J.C.** (1998). Unraveling the role of helicases in transcription. *Bioessays* **20**, 634-641.
- Ellis, N., and Goodfellow, P.N.** (1989). The mammalian pseudoautosomal region. *Trends Genet* **5**, 406-410.
- Ellis, N.A., Ye, T.Z., Patton, S., German, J., Goodfellow, P.N., and Weller, P.** (1994). Cloning of PBDX, an MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp. *Nat Genet* **6**, 394-400.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z., and Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of

- undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**, 967-979.
- Farbos, I., Veuskens, J., Vyskot, B., Oliveira, M., Hinnisdaels, S., Aghmir, A., Mouras, A., and Negrutiu, I.** (1999). Sexual dimorphism in white campion: deletion on the Y chromosome results in a floral asexual phenotype. *Genetics* **151**, 1187-1196.
- Felsenstein, J.** (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* **78**, 737-756.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fernandez-Capetillo, O.** (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**, 497-508.
- Ferrandiz, C., and Session, A.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*.
- Filatov, D.A.** (2005). Substitution rates in a new *Silene latifolia* sex-linked gene, *SlssX/Y*. *Mol Biol Evol* **22**, 402-408.
- Filatov, D.A., and Charlesworth, D.** (2002). Substitution rates in the X- and Y-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Mol Biol Evol* **19**, 898-907.
- Filatov, D.A., Moneger, F., Negrutiu, I., and Charlesworth, D.** (2000). Low variability in a Y-linked plant gene and its implications for Y-chromosome evolution. *Nature* **404**, 388-390.
- Fisher, R.A.** (1935). *Am. Nat.* **69**, 446.
- Fitch, W.M.** (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 406-416.
- Fletcher, J.C.** (2001). The ULTRAPETALA gene controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Development* **128**, 1323-1333.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Foster, J.W., Brennan, F.E., Hampikian, G.K., Goodfellow, P.N., Sinclair, A.H., Lovell-Badge, R., Selwood, L., Renfree, M.B., Cooper, D.W., and Graves, J.A.** (1992). Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* **359**, 531-533.
- Fraser, J.A., and Heitman, J.** (2004). Evolution of fungal sex chromosomes. *Mol Microbiol* **51**, 299-306.
- Fridolfsson, A.K., Cheng, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Liu, H.C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J., and Ellegren, H.** (1998). Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8147-8152.
- Furner, I.J.** (1996). Cell fate in the development of the Arabidopsis flower. *Plant J* **10**, 645-654.
- Gage, M.** (2004). Evolution: sexual arms races. *Curr Biol* **14**, R378-380.
- Gallois, J.L., Woodward, C., Reddy, G.V., and Sablowski, R.** (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development* **129**, 3207-3217.
- Galtier, N.** (2003). Gene conversion drives GC content evolution in mammalian histones. *Trends Genet* **19**, 65-68.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C.** (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543-548.

- Garcia-Moreno, J., and Mindell, D.P.** (2000). Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): a case study using avian CHD. *Mol Biol Evol* **17**, 1826-1832.
- Gaudin, V., Lunness, P.A., Fobert, P.R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A., Coen, E., and Doonan, J.H.** (2000). The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol* **122**, 1137-1148.
- Glaser, B., Grutzner, F., Willmann, U., Stanyon, R., Arnold, N., Taylor, K., Rietschel, W., Zeitler, S., Toder, R., and Schempp, W.** (1998). Simian Y chromosomes: species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY. *Mamm Genome* **9**, 226-231.
- Grant, S., Hunkirchen, B., and Saedler, H.** (1994). Developmental differences between male and female flowers in the dioecious plant in *Silene latifolia*. *Plant Journal* **6**, 471-480.
- Graves, J.A.** (1995). The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**, 305-311; discussion 311-302.
- Graves, J.A.** (2002). Evolution of the testis-determining gene--the rise and fall of SRY. *Novartis Found Symp* **244**, 86-97; discussion 97-101, 203-106, 253-107.
- Graves, J.A., and Watson, J.M.** (1991). Mammalian sex chromosomes: evolution of organization and function. *Chromosoma* **101**, 63-68.
- Grutzner, F., and Graves, J.A.** (2004). A platypus' eye view of the mammalian genome. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 642-649.
- Grutzner, F., Deakin, J., Rens, W., El-Mogharbel, N., and Marshall Graves, J.A.** (2003). The monotreme genome: a patchwork of reptile, mammal and unique features? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **136**, 867-881.
- Grutzner, F., Crollius, H.R., Lutjens, G., Jaillon, O., Weissenbach, J., Ropers, H.H., and Haaf, T.** (2002). Four-hundred million years of conserved synteny of human Xp and Xq genes on three Tetraodon chromosomes. *Genome Res* **12**, 1316-1322.
- Grutzner, F., Rens, W., Tsend-Ayush, E., El-Mogharbel, N., O'Brien, P.C., Jones, R.C., Ferguson-Smith, M.A., and Marshall Graves, J.A.** (2004). In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* **432**, 913-917.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R.** (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250.
- Handley, L.J., Ceplitis, H., and Ellegren, H.** (2004). Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics* **167**, 367-376.
- Hardenack, S., Ye, D., Saedler, H., and Grant, S.** (1994). Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *Plant Cell* **6**, 1775-1787.
- Hibara, K., Takada, S., and Tasaka, M.** (2003). CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J* **36**, 687-696.

- Hozier, J., Graham, R., Westfall, T., Siebert, P., and Davis, L.** (1994). Preparative in situ hybridization: selection of chromosome region-specific libraries on mitotic chromosomes. *Genomics* **19**, 441-447.
- Huynh, K.D., and Lee, J.T.** (2005). X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. *Nat Rev Genet* **6**, 410-418.
- Irish, V.F., and Sussex, I.M.** (1990). Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* **2**, 741-753.
- Ishida, T., Aida, M., Takada, S., and Tasaka, M.** (2000). Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**, 60-67.
- Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H., and Takahata, N.** (2003). The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5258-5263.
- Iwase, M., Satta, Y., and Takahata, N.** (2001). Sex-chromosomal differentiation and amelogenin genes in mammals. *Mol Biol Evol* **18**, 1601-1603.
- Jack, T.** (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* **16 Suppl**, S1-17.
- Jackson, J.A., and Fink, G.R.** (1981). Gene conversion between duplicated genetic elements in yeast. *Nature* **292**, 306-311.
- Jacobsen, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**, 5231-5243.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.
- John, B.** (1988). *The biology of heterochromatin.* (Cambridge: Cambridge University Press).
- Judson, O.P., and Normark, B.B.** (1996). Ancient asexual scandals. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 41.
- Just, W., Rau, W., Vogel, W., Akhverdian, M., Fredga, K., Graves, J.A., and Lyapunova, E.** (1995). Absence of *Sry* in species of the vole *Ellobius*. *Nat Genet* **11**, 117-118.
- Kallman, K.D.** (1984). *A new look at sex determination in poeciliid fishes.* (Penum publishing corporation).
- Kater, M.M., Franken, J., van Aelst, A., and Angenent, G.C.** (2000). Suppression of cell expansion by ectopic expression of the *Arabidopsis* SUPERMAN gene in transgenic petunia and tobacco. *Plant J* **23**, 407-413.
- Kayes, J.M., and Clark, S.E.** (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-3851.
- Kidner, C.A., and Martienssen, R.A.** (2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Dev Biol* **280**, 504-517.
- Kihara, H.** (1930). Karyologische studien an *fragaria* mit besonderer berücksichtigung der geschlechtschromosomen. *Cytologia* **1**, 345-357.
- Kondrashov, A.S.** (1993). Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *J Hered* **84**, 372-387.
- Kong, A., Gudbjartsson, D.F., Sainz, J., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Richardsson, B., Sigurdardottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., Shlien, A., Palsson, S.T., Frigge, M.L., Thorgeirsson, T.E., Gulcher, J.R.,**

- and Stefansson, K.** (2002). A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* **31**, 241-247.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**, 1607-1619.
- Krizek, B.A.** (1999). Ectopic expression of AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Dev Genet* **25**, 224-236.
- Kumar, S., and Hedges, S.B.** (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**, 917-920.
- Lahn, B.T., and Page, D.C.** (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* **278**, 675-680.
- Lahn, B.T., and Page, D.C.** (1999). Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* **286**, 964-967.
- Langley, C.H., Montgomery, E., Hudson, R., Kaplan, N., and Charlesworth, B.** (1988). On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number. *Genet Res* **52**, 223-235.
- Laporte, V., Filatov, D.A., Kamau, E., and Charlesworth, D.** (2005). Indirect evidence from DNA sequence diversity for genetic degeneration of the Y-chromosome in dioecious species of the plant *Silene*: the SIY4/SIX4 and DD44-X/DD44-Y gene pairs. *J Evol Biol* **18**, 337-347.
- Lardon, A., Georgiev, S., Aghmir, A., Le Merrer, G., and Negrutiu, I.** (1999). Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by y chromosome deletions. *Genetics* **151**, 1173-1185.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., and Traas, J.** (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**, 4311-4322.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K., and Traas, J.** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1375-1390.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Lee, J.T.** (2003). Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? *Curr Biol* **13**, R242-254.
- Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195-3206.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**, 805-814.
- Levin, J.Z., and Meyerowitz, E.M.** (1995). UFO: an Arabidopsis gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* **7**, 529-548.
- Li, W.H.** (1993). So, what about the molecular clock hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* **3**, 896-901.
- Lifschytz, E., and Lindsley, D.L.** (1972). The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis (*Drosophila*-allorecy-chromosome evolution-male sterility-dosage compensation). *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 182-186.
- Lippman, Z., and Martienssen, R.** (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-370.

- Liu, Z., Moore, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Stiles, J.I., Zee, F.T., Paterson, A.H., and Ming, R.** (2004). A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* **427**, 348-352.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.
- Lucchesi, J.C.** (1996). Dosage compensation in Drosophila and the "complex" world of transcriptional regulation. *Bioessays* **18**, 541-547.
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., and Coen, E.** (1996). Origin of floral asymmetry in Antirrhinum. *Nature* **383**, 794-799.
- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., and Coen, E.** (1999). Control of organ asymmetry in flowers of Antirrhinum. *Cell* **99**, 367-376.
- Lyndon, R.F.** (1998). The shoot apical meristem, its growth and development. (Cambridge university press).
- Lyon, M.F.** (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372-373.
- Lyon, M.F.** (1974). Evolution of X-chromosome inactivation in mammals. *Nature* **250**, 651-653.
- Lyon, M.F.** (1996). X-chromosome inactivation. Pinpointing the centre. *Nature* **379**, 116-117.
- Lyon, M.F.** (1998). X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* **80**, 133-137.
- Makova, K.D., and Li, W.H.** (2002). Strong male-driven evolution of DNA sequences in humans and apes. *Nature* **416**, 624-626.
- Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P., and Bartel, B.** (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* **14**, 1035-1046.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B., and Bowman, L.H.** (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15228-15233.
- Marais, G., and Galtier, N.** (2003). Sex chromosomes: how X-Y recombination stops. *Curr Biol* **13**, R641-643.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M.** (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* **417**, 559-563.
- Matsunaga, S., and Kawano, S.** (2001). Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. *Plant Biol* **3**, 481-488.
- Matsunaga, S., Hizume, M., Kawano, S., and Kuroiwa, T.** (1994). Cytological analyse in *Melandrium album*: genome size, chromosome size and fluorescence in situ hybridization. *Cytologia* **59**.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.

- Maynard Smith, J.** (1978). *The evolution of sex.* (Cambridge: cambridge university press).
- Maynard Smith, J.** (1990). *Annu Rev. Ecol. Syst.*
- McKee, B.D., and Handel, M.A.** (1993). Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* **102**, 71-80.
- Meyerowitz, E.M., Bowman, J.L., Brockman, L.L., Drews, G.N., Jack, T., Sieburth, L.E., and Weigel, D.** (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Suppl* **1**, 157-167.
- Mizukami, Y., and Ma, H.** (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by AGAMOUS. *Plant Cell* **9**, 393-408.
- Mizukami, Y., and Fischer, R.L.** (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 942-947.
- Montoya-Burgos, J.I., Boursot, P., and Galtier, N.** (2003). Recombination explains isochores in mammalian genomes. *Trends Genet* **19**, 128-130.
- Moore, R.C., Kozyreva, O., Lebel-Hardenack, S., Siroky, J., Hobza, R., Vyskot, B., and Grant, S.R.** (2003). Genetic and functional analysis of DD44, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome evolution. *Genetics* **163**, 321-334.
- Muller, H.J.** (1964). The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutat Res* **106**, 2-9.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M., and Scharl, M.** (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11778-11783.
- Nanda, I., Shan, Z., Scharl, M., Burt, D.W., Koehler, M., Nothwang, H., Grutzner, F., Paton, I.R., Windsor, D., Dunn, I., Engel, W., Staeheli, P., Mizuno, S., Haaf, T., and Schmid, M.** (1999). 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet* **21**, 258-259.
- Nicolas, M., Marais, G., Hykelova, V., Janousek, B., Laporte, V., Vyskot, B., Mouchiroud, D., Negrutiu, I., Charlesworth, D., and Moneger, F.** (2005). A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *PLoS Biol* **3**, e4.
- Okada, K., and Shimura, Y.** (1994). Genetic analyses of signalling in flower development using *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **26**, 1357-1377.
- Olsen, G.J., Matsuda, H., Hagstrom, R., and Overbeek, R.** (1994). fastDNAmL: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* **10**, 41-48.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L., and Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-5532.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X.** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **12**, 1484-1495.
- Parker, K.E., Carter, C.A., and Fabre, J.W.** (1990). A rat class I cDNA clone with an Alu-like sequence and mapping to two genes in RT1.C/E. *Immunogenetics* **31**, 211-214.
- Peichel, C.L., Ross, J.A., Matson, C.K., Dickson, M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Mori, S., Schluter, D., and Kingsley, D.M.** (2004). The master

- sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr Biol* **14**, 1416-1424.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Pelaz, S., Gustafson-Brown, C., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L., and Yanofsky, M.F.** (2001). APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant J* **26**, 385-394.
- Peterson, C.L., and Logie, C.** (2000). Recruitment of chromatin remodeling machines. *J Cell Biochem* **78**, 179-185.
- Ramesh, M.A., Malik, S.B., and Logsdon, J.M., Jr.** (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in Giardia and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol* **15**, 185-191.
- Raymond, C.S., Shamu, C.E., Shen, M.M., Seifert, K.J., Hirsch, B., Hodgkin, J., and Zarkower, D.** (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* **391**, 691-695.
- Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O., and et al.** (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* **10**, 383-393.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P.** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**, 1616-1626.
- Rens, W., Grutzner, F., O'Brien P, C., Fairclough, H., Graves, J.A., and Ferguson-Smith, M.A.** (2004). Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 male sex chromosome constitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16257-16261.
- Rice, W.R.** (1987). Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* **116**, 161-167.
- Rice, W.R.** (1996). Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature* **381**, 232-234.
- Richardson, B.J., Czuppon, A.B., and Sharman, G.B.** (1971). *Nat. New Biol.* **230**, 154-155.
- Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., Frankish, A., Lovell, F.L., Howe, K.L., Ashurst, J.L., Fulton, R.S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M.C., Hurler, M.E., Andrews, T.D., Scott, C.E., Searle, S., Ramser, J., Whittaker, A., Deadman, R., Carter, N.P., Hunt, S.E., Chen, R., Cree, A., Gunaratne, P., Havlak, P., Hodgson, A., Metzker, M.L., Richards, S., Scott, G., Steffen, D., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Worley, K.C., Ainscough, R., Ambrose, K.D., Ansari-Lari, M.A., Aradhya, S., Ashwell, R.I., Babbage, A.K., Bagguley, C.L., Ballabio, A., Banerjee, R., Barker, G.E., Barlow, K.F., Barrett, I.P., Bates, K.N., Beare, D.M., Beasley, H., Beasley, O., Beck, A., Bethel, G., Blechschmidt, K., Brady, N., Bray-Allen, S., Bridgeman, A.M., Brown, A.J., Brown, M.J., Bonnini, D., Bruford, E.A., Buhay, C., Burch, P., Burford, D., Burgess, J., Burrill, W., Burton, J., Bye, J.M., Carder, C., Carrel, L., Chako, J., Chapman, J.C., Chavez, D., Chen, E., Chen, G., Chen, Y., Chen, Z., Chinault, C., Ciccociola, A., Clark, S.Y., Clarke, G., Clee, C.M., Clegg, S., Clerc-Blankenburg, K., Clifford, K., Cobley, V., Cole, C.G., Conquer, J.S., Corby, N., Connor, R.E., David, R., Davies, J., Davis, C., Davis, J., Delgado, O., Deshazo, D., Dharni, P., Ding, Y., Dinh, H.,**

- Dodsworth, S., Draper, H., Dugan-Rocha, S., Dunham, A., Dunn, M., Durbin, K.J., Dutta, I., Eades, T., Ellwood, M., Emery-Cohen, A., Errington, H., Evans, K.L., Faulkner, L., Francis, F., Frankland, J., Fraser, A.E., Galgoczy, P., Gilbert, J., Gill, R., Glockner, G., Gregory, S.G., Gribble, S., Griffiths, C., Grocock, R., Gu, Y., Gwilliam, R., Hamilton, C., Hart, E.A., Hawes, A., Heath, P.D., Heitmann, K., Hennig, S., Hernandez, J., Hinzmann, B., Ho, S., Hoffs, M., Howden, P.J., Huckle, E.J., Hume, J., Hunt, P.J., Hunt, A.R., Isherwood, J., Jacob, L., Johnson, D., Jones, S., de Jong, P.J., Joseph, S.S., Keenan, S., Kelly, S., Kershaw, J.K., Khan, Z., Kioschis, P., Klages, S., Knights, A.J., Kosiura, A., Kovar-Smith, C., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leversha, M., Lewis, L., Liu, W., Lloyd, C., Lloyd, D.M., Louseged, H., Loveland, J.E., Lovell, J.D., Lozado, R., Lu, J., Lyne, R., Ma, J., Maheshwari, M., Matthews, L.H., McDowall, J., McLaren, S., McMurray, A., Meidl, P., Meitinger, T., Milne, S., Miner, G., Mistry, S.L., Morgan, M., Morris, S., Muller, I., Mullikin, J.C., Nguyen, N., Nordsiek, G., Nyakatura, G., O'Dell, C.N., Okwuonu, G., Palmer, S., Pandian, R., Parker, D., Parrish, J., Pasternak, S., Patel, D., Pearce, A.V., Pearson, D.M., Pelan, S.E., Perez, L., Porter, K.M., Ramsey, Y., Reichwald, K., Rhodes, S., Ridler, K.A., Schlessinger, D., Schueler, M.G., Sehra, H.K., Shaw-Smith, C., Shen, H., Sheridan, E.M., Shownkeen, R., Skuce, C.D., Smith, M.L., Sotheran, E.C., Steingruber, H.E., Steward, C.A., Storey, R., Swann, R.M., Swarbreck, D., Tabor, P.E., Taudien, S., Taylor, T., Teague, B., Thomas, K., Thorpe, A., Timms, K., Tracey, A., Trevanion, S., Tromans, A.C., d'Urso, M., Verduzco, D., Villasana, D., Waldron, L., Wall, M., Wang, Q., Warren, J., Warry, G.L., Wei, X., West, A., Whitehead, S.L., Whiteley, M.N., Wilkinson, J.E., Willey, D.L., Williams, G., Williams, L., Williamson, A., Williamson, H., Wilming, L., Woodmansey, R.L., Wray, P.W., Yen, J., Zhang, J., Zhou, J., Zoghbi, H., Zorilla, S., Buck, D., Reinhardt, R., Poustka, A., Rosenthal, A., Lehrach, H., Meindl, A., Minx, P.J., Hillier, L.W., Willard, H.F., Wilson, R.K., Waterston, R.H., Rice, C.M., Vaudin, M., Coulson, A., Nelson, D.L., Weinstock, G., Sulston, J.E., Durbin, R., Hubbard, T., Gibbs, R.A., Beck, S., Rogers, J., and Bentley, D.R. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**, 325-337.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Marszalek, J.D., Minx, P.J., Cordum, H.S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., and Page, D.C.** (2003). Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* **423**, 873-876.
- Saitou, N., and Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sakai, H., Medrano, L.J., and Meyerowitz, E.M.** (1995). Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries. *Nature* **378**, 199-203.
- Sakai, H., Krizek, B.A., Jacobsen, S.E., and Meyerowitz, E.M.** (2000). Regulation of SUP expression identifies multiple regulators involved in arabidopsis floral meristem development. *Plant Cell* **12**, 1607-1618.
- Sandstedt, S.A., and Tucker, P.K.** (2004). Evolutionary strata on the mouse X chromosome correspond to strata on the human X chromosome. *Genome Res* **14**, 267-272.
- Schartl, M.** (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 634-641.

- Schmid, M., Nanda, I., Guttenbach, M., Steinlein, C., Hoehn, M., Schartl, M., Haaf, T., Weigend, S., Fries, R., Buerstedde, J.M., Wimmers, K., Burt, D.W., Smith, J., A'Hara, S., Law, A., Griffin, D.K., Bumstead, N., Kaufman, J., Thomson, P.A., Burke, T., Groenen, M.A., Crooijmans, R.P., Vignal, A., Fillon, V., Morisson, M., Pitel, F., Tixier-Boichard, M., Ladjali-Mohammedi, K., Hillel, J., Maki-Tanila, A., Cheng, H.H., Delany, M.E., Burnside, J., and Mizuno, S.** (2000). First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet* **90**, 169-218.
- Schon, I., Butlin, R.K., Griffiths, H.I., and Martens, K.** (1998). *Proc R Soc Lond* **265**, 235.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., and Laux, T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Schultz, E.A., Pickett, F.B., and Haughn, G.W.** (1991). The FLO10 Gene Product Regulates the Expression Domain of Homeotic Genes AP3 and PI in Arabidopsis Flowers. *Plant Cell* **3**, 1221-1237.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y.** (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Sharman, G.B.** (1971). Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* **230**, 231-232.
- Shetty, S., Griffin, D.K., and Graves, J.A.** (1999). Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res* **7**, 289-295.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D., and Metzberg, R.L.** (2001). Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell* **107**, 905-916.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S., and Page, D.C.** (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**, 825-837.
- Smith, M.J., Hough, B.R., Chamberlin, M.E., and Davidson, E.H.** (1974). Repetitive and non-repetitive sequence in sea urchin heterogeneous nuclear RNA. *J Mol Biol* **85**, 103-126.
- Steeves, T.A., and Sussex, I.M.** (1989). *Pattern in plant development*, C.u. press, ed (
- Steinemann, M., and Steinemann, S.** (1992). Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7591-7595.
- Steinemann, M., and Steinemann, S.** (1998). Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica* **102-103**, 409-420.

- Stuurman, J., Jaggi, F., and Kuhlemeier, C.** (2002). Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev* **16**, 2213-2218.
- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., Oates, R., and Page, D.C.** (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet* **23**, 429-432.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W.** (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M.** (2001). The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-1135.
- Trotochaud, A.E., Jeong, S., and Clark, S.E.** (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* **289**, 613-617.
- Turner, J.M., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.X., and Burgoyne, P.S.** (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* **37**, 41-47.
- Turner, J.M., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G.V., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S., and Deng, C.X.** (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* **14**, 2135-2142.
- Vernoux, T., Autran, D., and Traas, J.** (2000). Developmental control of cell division patterns in the shoot apex. *Plant Mol Biol* **43**, 569-581.
- Voelker, R.A., and Kojima, K.I.** (1971). *Evolution* **25**, 119.
- Volff, J.N., and Schartl, M.** (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* **111**, 101-110.
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L.G., Beer-Romero, P., Bogan, J.S., and Page, D.C.** (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* **258**, 52-59.
- Vrijenhoek, R., Dawley, R., Cole, C., and Bogart, J.** (1989). In evolution and cytology of unisexual vertebrates. (New York: Univ. state New York).
- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A., and de Vries, S.C.** (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.
- Wang, W., and Chen, X.** (2004). HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in Arabidopsis. *Development* **131**, 3147-3156.
- Waters, P.D., Duffy, B., Frost, C.J., Delbridge, M.L., and Graves, J.A.** (2001). The human Y chromosome derives largely from a single autosomal region added to the sex chromosomes 80-130 million years ago. *Cytogenet Cell Genet* **92**, 74-79.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**, 843-859.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., and Davies, B.** (2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in Antirrhinum. *Development* **131**, 915-922.
- Weisman, A.** (1886). Die bedeutung der sexuellem fortpflanzung für die selektionstheorie. (Jena).
- Westergaard, M.** (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv Genet* **9**, 217-281.

- White, M.J.D.** (1973). *Animal Cytology and Evolution*. (Cambridge: Cambridge Univ. Press).
- Williams, G.C.** (1975). Sex and evolution. *Monogr Popul Biol*, 3-200.
- Wilson, E.O.** (1992). *The diversity of life*. (New York).
- Xu, X., Aprelikova, O., Moens, P., Deng, C.X., and Furth, P.A.** (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* **130**, 2001-2012.
- Yanofsky, M.F.** (1995). Floral meristems to floral organs: Gene controlling early events in Arabidopsis flower development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 167-188.
- Zhang, J.** (2004). Evolution of DMY, a newly emergent male sex-determination gene of medaka fish. *Genetics* **166**, 1887-1895.
- Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E.** (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716-719.
- Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E.** (2004). Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* **14**, 1214-1220.
- Zuckerland, E., and Pauling, L.** (1965). *Evolving genes and protein*. (New York: New York acad.).