



Evolution de la gynodioécie-gynomonoécie : approches expérimentales chez *Silene nutans* & approche théorique

Claire Garraud

► To cite this version:

Claire Garraud. Evolution de la gynodioécie-gynomonoécie : approches expérimentales chez *Silene nutans* & approche théorique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112014 . tel-00668797

HAL Id: tel-00668797

<https://theses.hal.science/tel-00668797>

Submitted on 10 Feb 2012

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

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



Université Paris Sud XI, UFR scientifique d'Orsay.
École doctorale Sciences du Végétal.

THÈSE

Présentée par

Claire Garraud

pour obtenir le
Diplôme de Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud XI.
Spécialité : Biologie

Évolution de la gynodioécie-gynomonoécie

**Approches expérimentales chez *Silene nutans*
& approche théorique**

Soutenue le 11 Mars 2011 devant le jury composé de :

DAVID MCCAULEY, Professor at Vanderbilt University, Nashville, TN
SYLVAIN GLÉMIN, Chargé de Recherche CNRS, Université Montpellier II
SANDRINE MAURICE, Maître de conférences à l'Université Montpellier II
JOËL CUGUEN, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1
PIERRE CAPY, Professeur à l'Université de Paris-Sud 11, Orsay
JACQUI SHYKOFF, Directeur de recherche, CNRS, Orsay

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Le doute est un état mental
désagréable, mais la certitude est
ridicule.

Voltaire

Avertissement

ou comment trouver ce que l'on cherche dans
cette thèse sans être obligé de tout lire

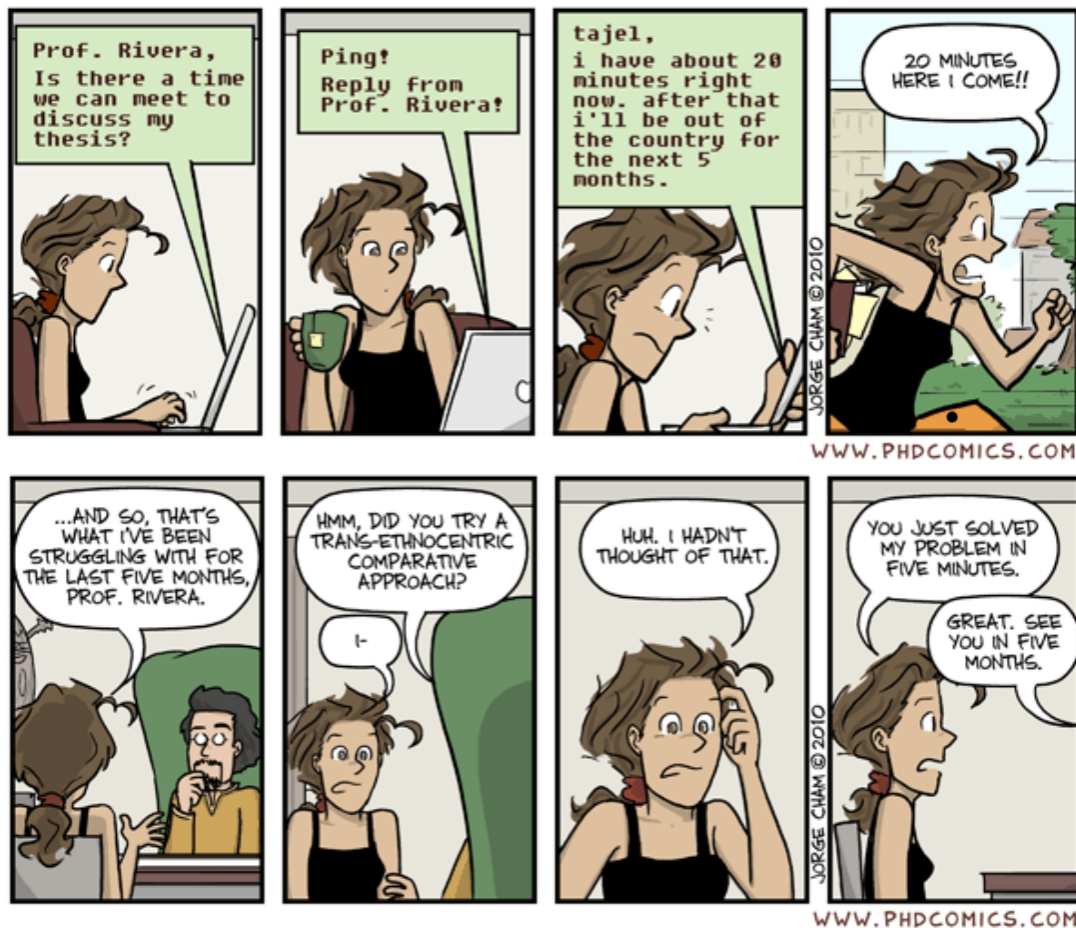
Dans cette thèse vous trouverez :

- Une table des matières.
- Une introduction générale dont le contenu, fidèle au titre, insère mon sujet de thèse dans le cadre plus général de l'évolution des sexes et des conflits génomiques. La dernière partie présente le minimum vital à savoir sur la gynodioécie pour pouvoir lire cette thèse.
- Le chapitre 2 introduit la gynodioécie de façon plus détaillée et met l'accent sur le maintien de la gynodioécie et du polymorphisme génétique sous-jacent et le déterminisme génétique du sexe.
- Le chapitre 3 traite exclusivement du phénotype gynomonoïque chez les espèces gynodioïques.
- Le chapitre 4 porte sur l'évolution de l'hérédité des organites, avec une introduction générale et des travaux spécifiques aux espèces gynodioïques.
- Ces trois chapitres centraux comprennent une **synthèse bibliographique**, un ou plusieurs **articles** en anglais (parfois insérés dans la synthèse) et un **résumé du chapitre** en dernière page.
- Une conclusion générale.
- Un glossaire.

Bonne lecture.

Remerciements

Tout d'abord un grand merci à Jacqui d'avoir su guider ma thèse tout en me laissant la plus grande liberté. Merci pour les nombreuses choses apprises, des statistiques aux recettes de confiture. Merci pour toutes les discussions, parfois écourtées, mais toujours passionnantes et efficaces.



"Piled Higher and Deeper" by Jorge Cham — www.phdcomics.com

Merci à tous ceux qui participent au dynamisme scientifique et social du labo. Cela tient en une ligne, mais à la volonté de beaucoup de personnes. Un très très grand merci à tous !

Une énorme merci à Lionel, Ferreol, Marie et Amandine, qui m'ont donné de sacré coup de main à la serre, et m'ont empêché de sécher au soleil (à coup de batailles d'eau...). Merci à Joséphine pour son aide précieuse l'été 2008.

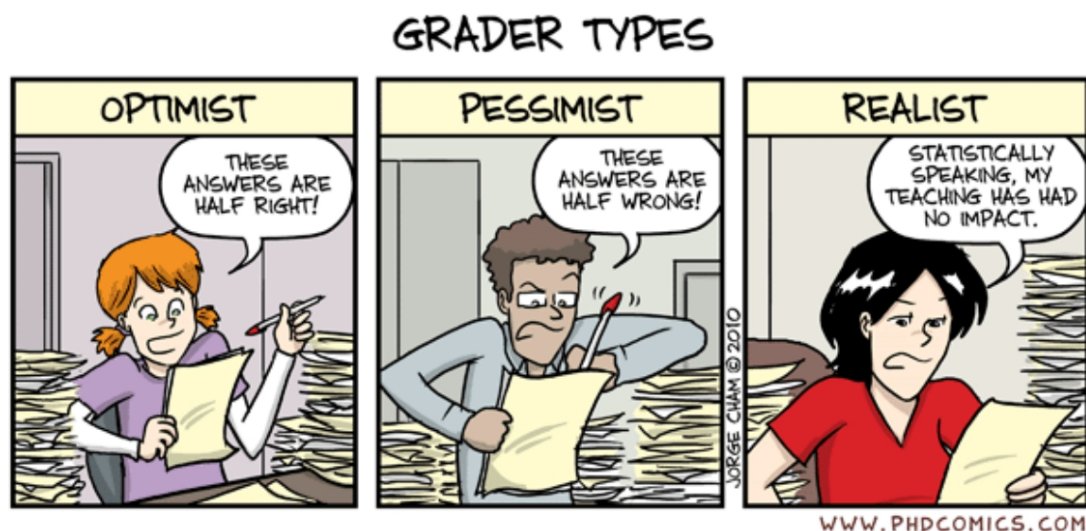
Merci au laboratoire GEPV à Lille, où j'ai été merveilleusement accueillie (sur le plan scientifique et social) à chacun de mes passages. Merci à tous, et tout particulièrement à Mathilde, Pascal, Adeline et Sylvain.

Merci à Bengt Bengtsson, Rolf Hoekstra, Sylvain Billiard et Tatiana Giraud, qui ont accepté d'assister aux balbutiements de cette thèse lors de mon premier comité de thèse.

Merci aux membres de mon jury, qui ont accepté de juger mon travail.

Merci à ceux qui ont contribué à améliorer ce manuscrit : Mathilde, Pascal, Pierre, Antonin, Christine et Jacqui.

Merci aux équipes pédagogiques, celle de PCEM et celle de Biol 103, de m'avoir fait découvrir et aimer l'enseignement. Merci aux étudiants de m'avoir appris la patience et peut-être un peu de pédagogie.



Merci à ces instits et ces profs qui ont su me donner depuis le goût du jardinage jusqu'à celui de la biologie et du questionnement scientifique. J'espère un jour pouvoir moi aussi transmettre un peu de tout cela.

Merci à Denise de m'avoir appris à (mieux) travailler (« si tu n'es pas efficace, autant aller faire du patin à roulette »).

Merci aux cobureaux pour toutes ces choses insignifiantes qui vous donnent envie d'aller travailler le matin : Luis-Miguel (pour les échanges musicaux et pour son enthousiasme à toute épreuve, enfin presque... « un jour j'aimerais bien savoir ce que ça fait de faire de la recherche en n'étant pas un crétin »), Quique (pour les expériences aquatiques), Pierre (pour sa bonne humeur bien mal cachée), Amandine (pour les craquages partagés avec GeneMapper), Gwendal (pour les soirées de fin de thèse en musique), Élodie (pour ses encouragements) et Jürgen (pour sa vision acerbe de l'administration française).

Merci aux “bios” : Alice, Thomas, Florence, Romain et Chloé. Un merci particulier à Florence pour nos moments musicaux, nos questionnements métaphysiques de thésardes, et pour son aide précieuse avec $\text{\LaTeX}$.

Merci au COGE d'avoir été la soupape de sécurité de ma thèse. Merci aux chefs, chanteurs et amis, et tout particulièrement merci à Silvio, Inès et Guillaume.

Merci à mes parents de m'avoir aidée à trouver et faire ce que j'aime. Merci à mon petit frère de n'avoir pas copié sa soeur et d'enrichir les harmoniques de la famille.

Et merci Antonin.

Table des matières

Table des matières	ix
1 Introduction générale	1
1.1 L'évolution des sexes	2
1.2 Les noces végétales	10
1.3 Évolution des éléments égoïstes mitochondriaux et de la stérilité mâle	15
1.4 Objectifs et démarche de la thèse	27
2 Maintien et déterminisme génétique de la gynodioécie	29
2.1 Les bases moléculaires de la stérilité mâle cytoplasmique	29
2.2 Les conditions du maintien de la gynodioécie : modèles et validations expérimentales	32
2.3 Déterminisme génétique de la gynodioécie (Article 1)	42
3 Le phénotype gynomonoïque	69
3.1 Rencontre du troisième type	69
3.2 Traits floraux et reproducteurs du phénotype gynomonoïque (Article 2)	73
3.3 Détermination du phénotype gynomonoïque (Article 3)	99
4 Évolution de l'hérédité mitochondriale et gynodioécie	117
4.1 Pourquoi ? Causes et conséquences de l'évolution de l'hérédité unipa- rentale des organites	118
4.2 Comment ? Les mécanismes et le contrôle génétique de l'hérédité des organites	120
4.3 Quelques cas d'uniparentalité hors normes	123
4.4 L'héréoplasmie	124
4.5 Les espèces gynodioïques, un cas particulier pour l'hérédité des mito- chondries ? (Articles 4 et 5)	130
5 Conclusion	171
Bibliographie	183
Glossaire	203

Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur le sexe . . . sans jamais oser le demander¹

De par l'intérêt qu'elles suscitent, les questions de l'évolution de la sexualité et de ses caractéristiques bénéficient d'une littérature impressionnante, dans laquelle on se perd aisément (et avec délice). Une des difficultés de cette littérature repose sur quelques malentendus sémantiques que je souhaite éclairer. Qu'on ne s'y trompe pas : je ne prétends pas définir dans cette introduction les termes de la sexualité de façon exhaustive et absolue. De nombreux ouvrages et publications se sont déjà penchés sur la question et il serait inutile d'y revenir longuement. Je proposerai plutôt quelques définitions simples et utilitaires, afin d'éviter toute confusion sur des termes essentiels de ce manuscrit.

Le sexe (ou la sexualité) se définit par l'échange d'informations génétiques (ou épigénétiques) entre des individus. Chez les Eucaryotes, le sexe est rythmé par l'alternance de la méiose, qui divise par deux le niveau de ploïdie, et de la fécondation qui le double, en rassemblant le génome de deux cellules haploïdes, les gamètes. Les caractéristiques des phases haploïdes (gamétophyte) et diploïdes (sporophyte), et par conséquent le contexte dans lequel s'effectuent la méiose et la fécondation, sont en revanche très variables. Par exemple, si la fécondation implique souvent la fusion de deux gamètes, il arrive que le matériel génétique soit échangé entre les deux cellules mères sans qu'une fusion ne soit impliquée (p. ex. la conjugaison de la paramécie). Dans le premier cas, le sexe génère un nouvel individu génétiquement inédit ; dans le second cas, les nouveaux génotypes sont portés par les deux individus parents. Il convient donc de distinguer sexualité et reproduction. La reproduction (avec ou sans sexualité) implique une transmission verticale d'informations d'une génération à la suivante, alors que la sexualité sans reproduction est une transmission horizontale d'information, provenant d'organismes de même génération. Plus connu

1. Allen W. et al, 1972.

chez les bactéries, le sexe sans reproduction n'est cependant pas négligeable chez les Eucaryotes (p. ex. conjugaison chez les ciliés, transferts de gène horizontaux entre espèces, échanges de gènes entre noyau et symbiotes ou organites).

Le mot « sexe » proviendrait du latin *secare*, qui signifie « couper, diviser » (Gouyon, 2009). Cette origine met l'accent sur la séparation des sexes. Il convient pourtant de distinguer le terme « sexe », au sens sexualité, du terme « sexe (sing.), sexes (plur.) », qui désigne des catégories d'individus dont les caractéristiques relatives à la sexualité diffèrent (par exemple, mâles et femelles). En l'absence de sexes, n'importe quel individu est un partenaire potentiel. Au contraire, s'il existe plusieurs sexes, les deux partenaires doivent être de sexes différents. L'existence de sexes est donc plutôt contre-intuitive, puisque qu'elle réduit le nombre de partenaires sexuels compatibles et ce, d'autant plus que le nombre de sexes est faible. La prédominance (au moins apparente) d'espèces ayant deux sexes exacerbe ce paradoxe. L'évolution du sexe et l'évolution des sexes, bien qu'intimement liées, doivent donc être distinguées afin d'éviter les malentendus. L'exemple du double coût du sexe, un des piliers des théories d'évolution du sexe, reflète combien évolution du sexe et des sexes sont souvent considérés concomitamment. En effet, on oublie trop souvent de mentionner que ce coût ne s'applique qu'aux espèces anisogames : c'est parce que seul le gamète femelle apporte des nutriments au futur zygote qu'une reproduction à deux parents ne produit pas plus de descendants qu'une reproduction à un parent ².

Au cours de cette thèse, il sera question de l'évolution des sexes (un peu), des systèmes de reproduction (beaucoup), mais pas de l'évolution du sexe à proprement parler. Dans ce chapitre, vous découvrirez quelques notions clé de l'évolution des sexes et des systèmes de reproduction, particulièrement ceux des plantes. Des informations plus détaillées et plus spécifiques à mon système d'étude seront données dans les chapitres suivants, au fur et à mesure de la présentation de mes travaux de thèse.

1.1 L'évolution des sexes

La question de l'évolution des sexes, moins explorée que celle de l'évolution du sexe, a tout de même fait l'objet de nombreux modèles, qui diffèrent sensiblement selon la définition de « sexes » utilisée. Ces définitions sont basées sur trois types d'arguments (non exclusifs) :

- la taille relative des gamètes
- l'hérédité des mitochondries
- les mécanismes de reconnaissance et de fusion cellulaires (p. ex. système phéromone-récepteur des types sexuels des champignons)

Même si à l'échelle d'une espèce, un seul critère peut suffire à définir les catégories de gamètes compatibles, la combinaison de plusieurs critères est indispensable pour définir les sexes à l'échelle des Eucaryotes. Hurst and Hamilton (1992) ont proposé

2. On négligera ici l'investissement post-natal maternel ou paternel, qui peut également influencer ce coût.

une classification des espèces en fonction de l'hérédité du cytoplasme, qui caractérise ce qu'ils appellent sexes dans leur publication, et du nombre d'*incompatibility types* (cf. TABLE 1.1). Par cette classification, Hurst and Hamilton (1992) montrent

	Incompatibility types<1	Incompatibility types>1
0 sexe		conjugaison des ciliés, certains basidiomycètes
1 sexe		basidiomycètes
2 sexes	la plupart des organismes (p. ex. animaux, végétaux, ascomycètes)	Angiospermes autoincompatibles, tuniciers
>2 sexes		<i>Physarum polycephalum</i> (13 sexes)

TABLE 1.1 – Sexes et *incompatibility types*, d'après Hurst and Hamilton (1992). Les sexes sont définis en fonction de l'hérédité des mitochondries : 0 sexe signifie qu'il n'y a pas de fusion des gamètes, 1 sexe que l'hérédité est biparentale, 2 sexes (ou plus) que l'hérédité est uniparentale et contrôlée par 2 sexes (ou plus). Les *incompatibility types* représentent des types de gamètes non différenciés morphologiquement. Deux gamètes d'*incompatibility types* différents sont compatibles pour le sexe, deux gamètes de même type ne le sont pas. Ce tableau n'est pas exhaustif et ne tient pas compte des nombreuses exceptions au sein de chaque groupe (p. ex. chez les champignons, cf. Billiard et al., 2010).

que les deux critères utilisés sont pertinents pour définir des sexes et peuvent se combiner. Chez les Angiospermes, par exemple, les deux sexes représentent les fonctions mâle (pollen) et femelle (ovules), et les *incompatibility types* le système d'auto-incompatibilité.

Voyons à présent comment ont évolué ces traits qui peuvent caractériser les sexes.

1.1.1 Évolution de l'anisogamie

Chez de nombreux eucaryotes, appelés anisogames, mâles et femelles diffèrent par la taille de leurs gamètes, le gamète mâle étant petit et généralement mobile, et le gamète femelle gros, car riche en ressources, et immobile. Chez ces espèces, l'évolution des sexes pourrait donc être la conséquence de l'évolution de l'anisogamie. Les modèles d'évolution de l'anisogamie sont de loin la catégorie de modèle la plus explorée parmi les modèles d'évolution des sexes. J'exposerai ici les travaux de Parker et al. (1972), considéré comme le modèle de référence, et les principaux points de discussion qui ont émergé lors de futurs développements.

1.1.1.1 Le modèle PBS (Parker, Baker & Smith)

Si l'on comprend assez intuitivement l'avantage de produire de petits gamètes en grand nombre et à peu de frais, on comprend moins comment la production de

gamètes riches en réserves et coûteux a pu évoluer et se maintenir. Autrement dit, pourquoi les gamètes femelles acceptent-ils de se laisser parasiter par les gamètes mâles, qui ne font que transmettre leurs gènes sans apporter de réserves nutritives pour le futur zygote ? C'est une réponse à ce paradoxe qu'ont apportée Parker, Baker & Smith en 1972. Leur modèle, qui vise à expliquer l'évolution des sexes via l'évolution de l'anisogamie, repose sur deux idées simples :

- La quantité totale de ressources allouée par un individu à la production de gamètes est constante et il existe plusieurs stratégies de répartition de ces ressources, dont les deux extrêmes sont produire beaucoup de petits gamètes et produire quelques gros gamètes.
- La fitness du zygote résultant de la fusion des deux gamètes dépend de la quantité de réserves disponibles, c'est à dire du volume du zygote. La fonction de fitness du zygote est définie par la fonction suivante : $f = V^x$, où f est la fitness du zygote, V son volume, et x un paramètre du modèle.

Le volume et le nombre des gamètes produits sont supposés être héréditaires, et la fusion des gamètes aléatoire. On suppose également une variabilité initiale dans le volume des gamètes.

Les auteurs démontrent que l'évolution du volume des gamètes dépend essentiellement de la fonction de fitness du zygote ($f = V^x$). Si la fitness du zygote est peu dépendante de son volume (x petit), les petits gamètes sont avantagés. Au contraire, si la fitness augmente fortement avec le volume (x grand), les gros gamètes sont avantagés. Cependant, pour certaines valeurs de x intermédiaires ($x \approx 2$ selon les conditions), on observe une sélection disruptive : les producteurs de gros et de petits gamètes sont sélectionnés au détriment des producteurs de gamètes de volume intermédiaire et on obtient à l'équilibre un ratio équilibré entre les deux types de producteurs. En d'autres termes, le maintien de deux types de gamètes est permis lorsque l'avantage d'un zygote de volume optimal (rencontre de deux gamètes de volume maximal) par rapport aux zygotes de volume plus réduit s'équilibre avec la forte productivité des producteurs de petits gamètes. Les auteurs montrent qu'une forte variabilité dans la population initiale augmente la plage de valeurs de x compatibles avec la sélection disruptive.

Bien que les conditions favorables à la sélection disruptive soient relativement restreintes ($x \approx 2$), les auteurs démontrent que ces conditions sont sélectionnées par sélection naturelle. Considérons la relation entre le volume et la fitness du zygote. Chez les métazoaires, les premières étapes du développement sont assurées grâce aux réserves de l'œuf. On s'attend donc à ce qu'une augmentation du volume du zygote ait un effet positif majeur sur sa fitness lorsque le zygote est de volume réduit (volume critique), mais que cet effet soit réduit lorsque le zygote est de volume plus important (cf. FIGURE 1.1). Ainsi, si dans une population les zygotes sont de volume réduit, la sélection sur le volume du zygote sera très forte (x grand), ce qui avantagera les producteurs de gros gamètes et augmentera *in fine* le volume des zygotes. Au contraire, si les zygotes sont de volume presque optimal (x petit), les producteurs

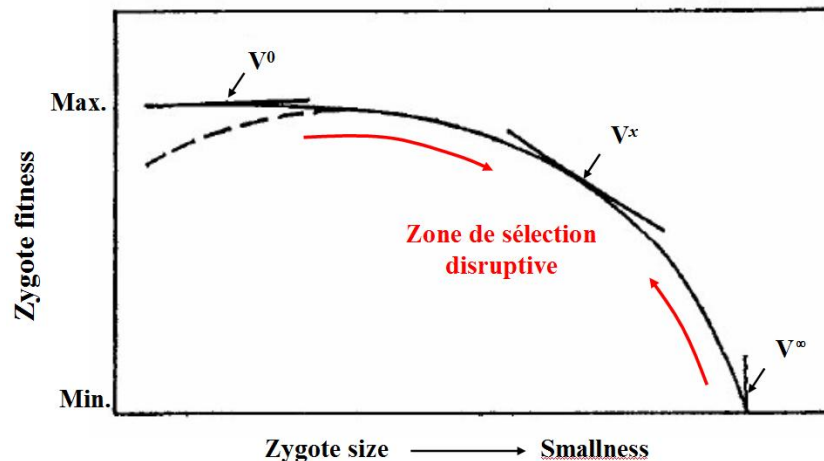


FIGURE 1.1 – Relation entre la fitness du zygote et son volume, d'après Parker et al. (1972). La relation entre la fitness du zygote et son volume est défini en chaque point par $f = V^x$, x variant avec V . Quand le volume du zygote est optimal, les variations de volume ont peu d'effet sur la fitness du zygote et la courbe est définie localement par $f = V^0$. Au contraire, quand le volume est très réduit, les variations de volume ont un très fort effet sur la fitness et la courbe est définie localement par V^∞ .

de petits gamètes seront sélectionnés et le volume des zygotes diminuera. Dans les deux cas, la sélection modifie le volume des zygotes (et des gamètes) jusqu'à arriver au point où la sélection est disruptive c'est-à-dire où les deux stratégies extrêmes sont favorisées.

Cependant, l'anisogamie n'implique pas l'existence de sexes car la notion de sexes suppose que la fusion ait toujours lieu entre un gros et un petit gamète (*disassortative mating*). Cette évolution n'est pas triviale puisque qu'il est *a priori* plus avantageux, pour un petit ou un gros gamète, de fusionner avec un gros gamète afin de bénéficier de plus de ressources pour le futur zygote. Les auteurs suggèrent que le régime d'appariement pourrait avoir été sélectionné plus efficacement chez les gamètes mâles et proposent deux raisons à cela :

- Le coût de la fusion avec un petit gamète pourrait être plus important pour un petit gamète que pour un gros gamète, selon la relation entre fitness et volume du zygote. De ce fait, la sélection favorisant la fusion avec un gros gamète aurait été plus forte chez les petits gamètes.
- La population de petits gamètes est susceptible de présenter une plus grande variabilité génétique grâce à son effectif plus important et à son taux de mutation plus fort (plus de division dans la lignée germinale). Ainsi, dans une situation de compétition, on devrait trouver plus de mutants capables de forcer la fusion avec un gros gamète parmi les petits gamètes, que de mutants capables de l'empêcher parmi les gros gamètes.

1.1.1.2 Quelques développements ultérieurs du modèle PBS

Le modèle de Parker et al. (1972) a été à l'origine d'un foisonnement de travaux sur l'évolution de l'anisogamie. Certains modèles ultérieurs l'ont simplement reformulé et clarifié, d'autres ont amorcé des discussions plus ou moins vives sur certains aspects du modèle. Voici deux des points qui ont fait l'objet de controverses.

- Le modèle de Parker et al. (1972) nécessite que la relation entre volume et fitness du zygote respecte certaines conditions (cf. FIGURE 1.1). Les auteurs précisent que cette relation est plausible dans le cas des Métazoaires dont le développement précoce dépend des réserves présentes dans l'œuf, et peu réaliste dans le cas des unicellulaires. La prédominance de l'anisogamie chez les multicellulaires et de l'isogamie chez les unicellulaires est en faveur de leur hypothèse. Les vertébrés sont peu adaptés à la validation expérimentale de cette hypothèse, le développement des amniotes ne se faisant pas sur les réserves de l'œuf, et la taille des œufs étant relativement constante chez les vertébrés anamniotes. L'attention s'est donc concentrée sur les algues, en particulier les Volvocales (Bell, 1978), et les échinoïdes (p. ex. Levitan, 2000). Beaucoup d'études ont apporté un soutien à la théorie de Parker et al. (1972), mais l'interprétation des résultats a parfois été vivement contestée (Randerson and Hurst, 2001) et aucun consensus n'est encore établi à ce sujet.
- Parker et al. (1972) suggèrent que l'évolution vers une mobilité différentielle entre les deux types de gamètes pourrait stabiliser les deux catégories de producteurs et leur mode d'appariement. Ils invoquent le rôle de la compétition spermatique dans cette évolution mais leur démonstration reste purement verbale. Des modèles plus récents ont proposé que l'anisogamie puisse être, non pas la cause, mais la conséquence de l'évolution de la motilité (pour une synthèse voir Randerson and Hurst, 2001). En effet, dans des conditions de limitation spermatique, la motilité différentielle entre gamètes mâles et femelles permettrait d'augmenter la probabilité de rencontre tout en gardant une taille de zygote suffisamment importante. Dans ces modèles, ce n'est donc plus la compétition spermatique qui permet l'évolution de la motilité mais la limitation spermatique. Il existe également de nombreux modèles d'évolution conjointe de l'anisogamie et de la motilité basés sur l'idée que le gamète femelle est une « cible » et que tout élément rendant la cible plus facilement atteignable (augmentation de taille, émission de phéromones, etc.) devrait être sélectionné.

1.1.2 Évolution de l'hérédité mitochondriale

Un deuxième critère pour définir les sexes est d'utiliser les lois d'hérédité des mitochondries. Contrairement au génome nucléaire dont la transmission lors de la sexualité est contrôlée par la méiose, les génomes cytoplasmiques sont très généralement transmis uniparentalement³ et on peut donc définir les sexes en fonction

3. Les exceptions à cette règle seront évoquées dans le chapitre 4.

du partenaire qui transmet le cytoplasme. Chez les anisogames, c'est presque toujours le gamète femelle qui transmet les génomes cytoplasmiques, une observation assez intuitive si l'on considère l'écart de volume entre les deux types de gamètes. Mais considérer que l'hérédité maternelle du cytoplasme n'est qu'une conséquence de l'anisogamie est un raccourci très contestable. En effet, il existe de très nombreuses espèces isogames dont l'hérédité des organites est uniparentale, la mieux étudiée étant l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*⁴ (Ferris and Goode-nough, 1997; Nishimura et al., 2002).

L'idée que l'évolution des sexes puisse résulter de l'évolution de l'hérédité uniparentale des organites a été à l'origine d'une nouvelle vague de modèles dans les années 1990. Ceux-ci suggèrent que l'hérédité uniparentale des organites ait évolué en réponse à l'invasion d'éléments cytoplasmiques égoïstes.

En plus des gènes contenus dans le noyau, la grande majorité des eucaryotes possèdent un génome mitochondrial, et pour les organismes photosynthétiques, un génome chloroplastique. Mitochondries et chloroplastes sont issus de deux événements d'endosymbiose de bactéries par la future cellule eucaryote, et cette origine explique bon nombre des caractéristiques des deux organites. Entre autres, les deux bactéries devenues organites ont conservé une partie de leur ADN ainsi qu'une réplique et une transmission des gènes fondamentalement différente de celles des gènes nucléaires. La transmission du génome nucléaire lors des mitoses est en effet hautement contrôlée : la réplication de l'ADN permet de dupliquer le génome de façon strictement conforme, et lors de la division, chaque cellule fille récupère une version du génome. Exception faite des éventuelles erreurs, le génome est donc transmis à l'identique de cellule mère en cellule fille. Au contraire du génome nucléaire qualifié de strict (*stringent* en anglais) par Birky (2001), les organites ont des génomes « relâchés ». Chaque cellule possède en général plusieurs organites, qui contiennent souvent eux-mêmes plusieurs copies du génome. Les organites se répliquent de façon autonome et indépendamment du cycle cellulaire, et sont répartis plus ou moins au hasard entre les deux cellules filles au moment de la mitose. Ainsi, si la cellule contient plusieurs génomes mitochondriaux différents, les fréquences des allèles sont susceptibles de varier avec le temps dans une même cellule. Cette transmission peu contrôlée a pour conséquence une sélection intra-individuelle favorable à l'émergence d'éléments égoïstes mitochondriaux. Par exemple, un mutant mitochondrial capable de se répliquer plus vite, par exemple grâce à un ADN délété (donc plus court), sera sélectionné au niveau intra-individuel, même s'il a un impact négatif sur la fitness de l'individu qui le porte. L'existence de tels éléments égoïstes a été mise en évidence chez la levure et sera détaillée plus loin (cf. p.16). Cette sélection entraîne une course à l'armement entre génomes mitochondriaux (conflit inter-cytoplasmes).

La sexualité des eucaryotes implique presque toujours une fusion des deux gamètes qui offre la possibilité aux éléments cytoplasmiques de se transmettre horizon-

4. On ne parle plus de mâles et de femelles dans ce cas-là, le terme étant réservé aux gamètes anisogames. On parlera par exemple de type sexuel α et β .

talement (entre lignées). Un tel mélange de cytoplasmes est favorable aux éléments mitochondriaux égoïstes qui peuvent se transmettre plus efficacement, mais hautement délétère pour l'organisme dans son ensemble qui subit le coût de ces éléments égoïstes. On peut donc s'attendre à ce que, en présence de tels éléments, toute mutation nucléaire capable d'imposer une hérédité uniparentale des organites soit favorisée. En effet, ce type de transmission génère *in fine* des lignées de cellules aux mitochondries génétiquement identiques, sur laquelle la sélection intra-individuelle n'a pas de prise.

Les modèles d'évolution de l'uniparentalité des organites décrivent l'évolution conjointe d'un élément égoïste mitochondrial et d'un mutant nucléaire codant la destruction de son propre cytoplasme ou du cytoplasme du partenaire (Hastings, 1992; Hurst, 1994; Hurst et al., 1996; Randerson and Hurst, 1999, 2001; Yamauchi, 2003). Quels que soient les détails de modélisation, l'invasion du mutant nucléaire se produit grâce à sa liaison génétique avec le cytoplasme normal (non égoïste). Au contraire, si cette liaison ne peut pas être maintenue, par exemple quand le gène nucléaire code la destruction de son propre cytoplasme, ou quand l'hérédité n'est pas strictement uniparentale, les conditions d'évolution de l'uniparentalité deviennent extrêmement strictes. De plus, Yamauchi (2003) a montré plus récemment que des invasions régulières d'éléments égoïstes étaient nécessaires pour maintenir le mutant uniparental. Plus généralement, les éléments égoïstes cytoplasmiques (parasites, plasmides, etc.) pourraient avoir également participé à l'évolution du sexe (et plus seulement des sexes), celui-ci augmentant leur fitness en ajoutant une composante de transmission horizontale (Hoekstra, 1990). Un exemple intéressant de plasmide mitochondrial (non délétère) capable de contrer l'hérédité uniparentale afin d'augmenter sa transmission a d'ailleurs été publié (Sakurai et al., 2004).

Il existe aussi des modèles, qui, au lieu de considérer le coût des éléments égoïstes, supposent qu'un mélange de mitochondries d'origines différentes induit un coût en soi pour l'organisme (Frank, 1996; Hurst and Hamilton, 1992). Une incompatibilité moléculaire est invoquée pour expliquer ce coût mais, à ma connaissance, il n'existe qu'une validation expérimentale (Ziegler and Davidson, 1981) dont les résultats, obtenus à partir de croisement inter-spécifique, sont peu généralisables.

D'autres aspects de l'hérédité des mitochondries seront abordés dans le chapitre 4.

1.1.3 Évolution des sexes via la reconnaissance cellulaire

Si l'évolution de l'anisogamie et de l'hérédité de mitochondrie exposées plus haut sont souvent, *in fine*, soutenue par l'évolution d'une reconnaissance moléculaire, certains modèles ne font appel qu'à ce dernier point pour expliquer l'évolution des sexes, notamment chez les espèces isogames et/ou à hérédité biparentale.

1.1.3.1 Le modèle « by-product »

Dans ce modèle, l'émergence des sexes est liée à l'organisation moléculaire du système de reconnaissance moléculaire responsable de la fusion des gamètes (Hoekstra, 1982). Le modèle suppose un mécanisme originel symétrique, où chaque individu porte à la fois une phéromone et un récepteur de phéromone à la surface de ses cellules. L'apparition des sexes serait la conséquence de la suppression du récepteur chez certains gamètes et de la phéromone chez d'autres. Le modèle suppose que cette spécialisation rendrait la reconnaissance plus efficace, en évitant l'auto-saturation des récepteurs par exemple.

1.1.3.2 Le modèle d'évitement de la dépression de consanguinité

Si la consanguinité et la dépression de consanguinité sont importantes dans une population, des sexes peuvent évoluer parce qu'ils empêchent la fécondation entre deux gamètes portant le même allèle au locus sexuel, et limitent ainsi la consanguinité. Cette catégorie de modèles explique aussi bien l'évolution des sexes que celle des systèmes d'incompatibilité chez les plantes (Charlesworth and Charlesworth, 1979).

1.1.3.3 Les sexes, un catalyseur des avantages du sexe

Parmi les hypothèses formulées pour expliquer l'évolution du sexe, la majorité implique que le sexe ait lieu entre des gamètes génétiquement différents (rupture des associations génétiques défavorables, reine rouge, etc.). Les sexes, en favorisant l'association de gamètes génétiquement différents, maximisent l'effet des facteurs précédemment cités. Ils amplifient ainsi les avantages du sexe et pourraient avoir été sélectionnés pour cette raison.

1.1.4 À quand un modèle unificateur ?

Aucun des modèles présentés ne peut répondre universellement à la question de l'apparition des sexes. Chacun apporte une solution pour des espèces répondant à certaines caractéristiques et rares sont les modèles qui ont considéré l'évolution conjointe de différents traits (anisogamie, motilité, hérédité des organites, système de reconnaissance phéromonal, etc.). Pourtant, les sexes cumulent souvent plusieurs de ces caractéristiques et il est difficile de savoir quel caractère a été à l'origine des sexes et quel caractère n'a fait que renforcer des sexes préexistants. De plus, les plantes et les animaux, presque tous anisogames et à hérédité maternelle du cytoplasme, sont peu informatifs pour répondre à cette question. Il existe une variabilité beaucoup plus intéressante chez d'autres groupes, tels que les algues ou les champignons, mais les données sont souvent incomplètes (pour une synthèse chez les champignons voir Billiard et al., 2010). Aujourd'hui, il semble que de plus en plus de chercheurs aient abandonné l'idée d'une explication universelle à l'existence des sexes et considèrent que cette question devrait plutôt être considérée à l'échelle des groupes taxonomiques.

1.2 Les « noces végétales »⁵

Les plantes à fleurs ont la particularité de présenter une immense diversité de systèmes de reproduction (=ensemble des caractéristiques qui influencent le choix des partenaires pour la reproduction sexuée), un point qui n'a pas manqué d'intéresser les plus grands biologistes et naturalistes (Linné et Darwin, pour ne citer que les plus célèbres). Pourtant, contrairement à des groupes tel que les champignons, où l'on trouve presque toutes les combinaisons de gamètes en terme de taille, nombre, hérédité de mitochondries, etc., les plantes à fleurs présentent toutes une sexualité standard, avec deux sexes anisogames, mâle et femelle, et une hérédité cytoplasmique maternelle. Pourquoi fait-on donc si grand cas des systèmes de reproduction des plantes ?

1.2.1 Sexes et phénotypes sexuels chez les plantes à fleur

Les sexes sont par définition des catégories d'individus compatibles pour la sexualité. Chez les plantes à fleurs, la distinction d'un sexe mâle (dont les gamètes sont portés par le pollen) et d'un sexe femelle (dont les gamètes sont portés par les ovules) ne suffit pas à définir les partenaires compatibles et d'autres caractéristiques doivent être considérées.

Contrairement aux animaux, la plupart des espèces de plantes à fleurs sont hermaphrodites (cf. TABLE 1.2), c'est-à-dire que chaque individu est capable de produire les gamètes mâles et femelles. Cependant, cela ne signifie pas qu'une plante est capable de se reproduire seule car beaucoup d'espèces possèdent un système d'auto-incompatibilité, qui empêche l'autofécondation et la fécondation avec des individus génétiquement proches au(x) locus(i) d'auto-incompatibilité. Ce système qui doit donc être pris en compte pour définir les partenaires compatibles. Il est très variable selon les espèces (nombre d'allèles, système de détermination génétique, etc.) et peut être extrêmement complexe. D'autre part, chez les espèces auto-compatibles, le régime de reproduction (autofécondation et/ou allofécondation) fait l'objet de stratégies très diversifiées dont dépendent les partenaires compatibles. Enfin, la manière dont les fonctions mâles et femelles sont réparties dans le temps, au sein des différentes structures reproductrices, et entre les individus est extrêmement variable. Des morphes, parfois appelés genres ou phénotypes sexuels, peuvent être définis en fonction de cette répartition. En voici quelques exemples :

- *L'hétérostylie*. Bien connue chez des espèces des genres *Primula* et *Lythrum*, elle se définit par deux ou trois morphes qui diffèrent par la position des anthères et du stigmate et qui présentent souvent une certaine symétrie (cf. FIGURE 1.2). Ce polymorphisme est responsable d'un ramassage et d'un dépôt du pollen par les pollinisateurs qui est spécifique du morphe, et favorise une reproduction entre morphes différents. L'évolution de ce polymorphisme est

5. Expression employée par Linné au XVIII^e siècle. Il fut le premier à proposer un classement des plantes en fonction du nombre de leurs pièces florales.

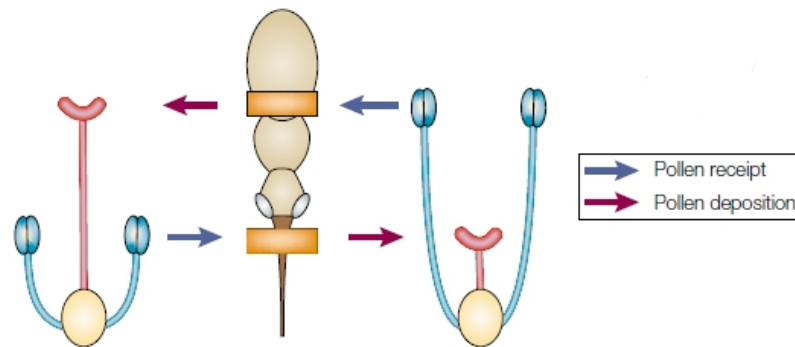


FIGURE 1.2 – Distylie (hétérostylie à deux morphes) : le schéma illustre la position des stigmates et des anthères chez les deux morphes et les transferts de pollen réalisés par les pollinisateurs (flèches). D’après Barrett (2002).

souvent expliquée par l’évitement de l’autofécondation, mais d’autres facteurs tels que l’optimisation du transfert de pollen sont au moins aussi importants (Barrett, 2002).

- *L’hétérodichogamie*. La dichogamie est un décalage temporel des fonctions mâle et femelle, la fonction mâle pouvant être plus précoce (protandrie) ou plus tardive (protogynie) que la fonction femelle. Chez les espèces hétérodichogames, deux morphes, l’un protandre et l’autre protogyne, coexistent dans les populations (Kimura et al., 2003) et les croisements ne sont possibles qu’entre ces deux morphes. Dans certains cas, le système est encore plus complexe, et les fleurs fonctionnent alternativement en mâles ou femelles selon le moment du jour (p.ex. chez des espèces de gingembre). Une partie des plantes est femelle le matin et mâle l’après-midi, tandis que l’autre morphe fait l’inverse. Ce changement temporel est assuré par un mouvement du style (la flexistylie) qui permet de favoriser le dépôt ou le ramassage du pollen. Ici encore, les croisements entre morphes sont favorisés.
- *La séparation des sexes*. La majorité des plantes à fleurs sont hermaphrodites, c’est-à-dire que leurs fleurs possèdent à la fois des organes mâles (étamines) et femelles (pistil). Cependant, l’allocation vers les fonctions mâle et femelle peut varier au sein de chaque fleur et de chaque individu. Théoriquement, on peut donc envisager toutes les combinaisons de répartition des sexes entre les fleurs et les individus, la seule contrainte étant d’assurer la production des deux types de gamètes à l’échelle de la population. C’est à cette diversité que nous allons nous intéresser à présent.

1.2.2 Les systèmes sexuels des plantes à fleurs

Le tableau 1.2 récapitule les principaux systèmes sexuels des plantes à fleurs⁶. L’hermaphrodisme est de loin la généralité, mais on compte de nombreuses espèces monoïques (dont beaucoup de gymnospermes), dioïques, et gynodioïques, chacun de ces systèmes étant réparti au sein de différentes familles (pour la répartition de la dioécie au sein des familles, cf. Charlesworth, 2002). On classe souvent ces systèmes en deux types : les monomorphes, qui ne contiennent qu’un seul phénotype sexuel par système, et les polymorphes, qui en contiennent généralement deux, parfois plus.

Systèmes sexuels	Phénotypes des individus	Types de fleurs		
		pistillée	staminée	parfaite
hermaphrodisme (80%)	hermaphrodites			X
monoécie (5%)	monoïque	X	X	
gynomonoécie	gynomonoïques	X		X
andromonoécie	andromonoïques		X	X
dioécie (6%)	mâles		X	
	femelles	X		
gynodioécie (7%) (ou gynodioécie-gynomonoécie)	hermaphrodites			X
	femelles	X		
	(gynomonoïques)	X		X
androdioécie (ou androdioécie-andromonoécie)	hermaphrodites			X
	mâles		X	
	(andromonoïques)		X	X
trioécie	mâles		X	
	femelles	X		
	hermaphrodites			X

TABLE 1.2 – Principaux systèmes sexuels chez les plantes à fleurs. Le tableau décrit pour chaque système les différents phénotypes de plante et le sexe des fleurs produites par chaque phénotype. Afin d’éviter toute confusion, la terminologie utilisée est différente pour les fleurs et les individus. Les fleurs sont parfaites (hermaphrodites), pistillées (femelles) ou staminées (mâles), et les individus hermaphrodites, femelles, mâles, gynomonoïques, etc.

1.2.3 Évolution des sexes séparés

La faible fréquence des systèmes polymorphes et leurs distributions taxonomiques éparses tendent à montrer que l’hermaphrodisme, et plus généralement les systèmes monomorphes, sont ancestraux dans l’évolution des systèmes sexuels des plantes.

6. En réalité, il existe une diversité encore plus grande et on peut trouver presque toutes les combinaisons des types d’individus décrits dans le tableau 1.2.

Chez certaines familles présentant une diversité de systèmes sexuels, on a pu comparer les informations phylogénétiques avec celles relatives aux systèmes sexuels et retracer l'apparition des différents systèmes au sein des familles. Par exemple, l'apparition de la dioécie dans deux lignées indépendantes a été montrée chez le genre *Silene* (cf. FIGURE 1.3). La synthèse de ces travaux permet d'estimer le nombre

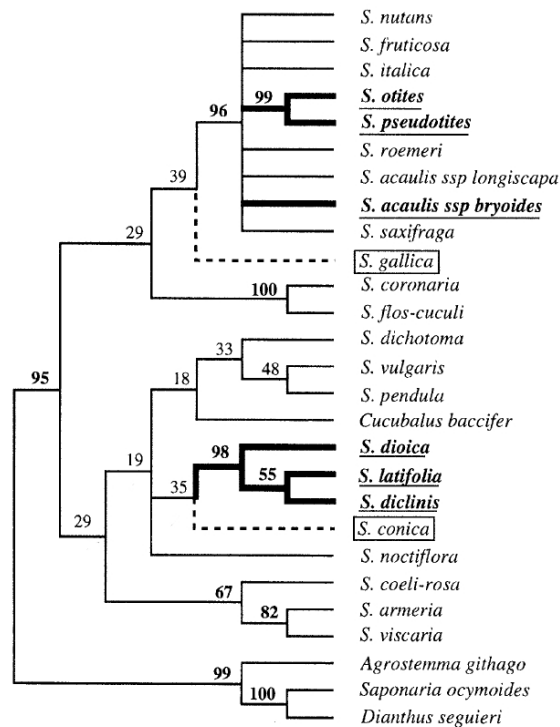


FIGURE 1.3 – Phylogénie des espèces du genre *Silene*, d'après Desfeux et al. (1996). Les espèces dioïques sont indiquées en gras et soulignées, et les espèces hermaphrodites sont encadrées. Toutes les autres espèces peuvent être considérées comme étant gynodioïques. Les valeurs indiquées sur les nœuds sont les valeurs de bootstrap. Chez ce genre, il semble que la gynodioécie soit ancestrale et que la dioécie ait évolué deux fois indépendamment.

de transition entre les systèmes, et de formuler des hypothèses sur les conditions favorables aux transitions.

Actuellement, c'est l'évolution de la dioécie qui est la plus débattue. L'hypothèse principale est celle d'une évolution via la gynodioécie (voie a, FIGURE 1.4). La première étape (hermaphrodisme → gynodioécie) implique l'apparition et le maintien d'un gène de stérilité mâle et sera traitée dans la section 1.3. La gynodioécie pourrait ensuite évoluer vers la dioécie grâce à la spécialisation des hermaphrodites dans la fonction mâle. Cette deuxième étape est possible grâce à une sélection fréquence-dépendante en faveur de la fonction mâle, d'autant plus forte que la fréquence de femelles est élevée. Elle nécessite que l'allocation vers la fonction mâle soit héri-

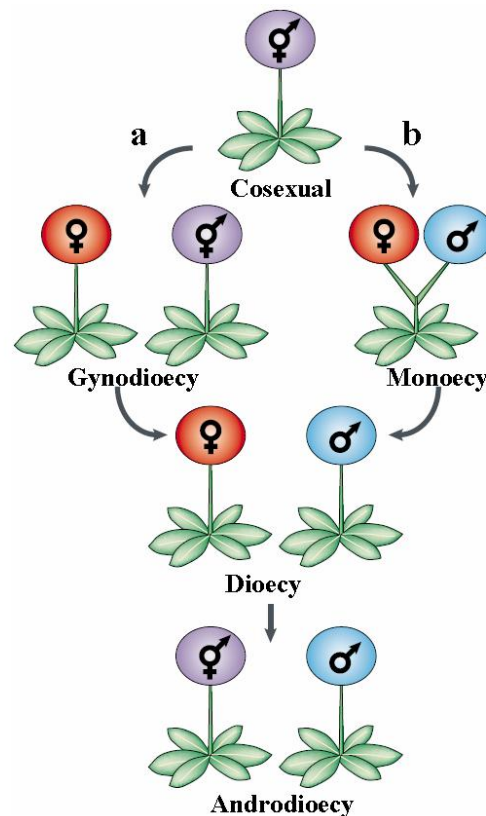


FIGURE 1.4 – Évolution des systèmes sexuels chez les plantes à fleurs, d'après Barrett (2002).

table et que l'investissement mâle soit négativement corrélé à l'investissement femelle (existence d'un trade-off). Cette hypothèse est notamment soutenue par la forte occurrence d'espèces dioïques dans les clades majoritairement gynodioïques (Maurice, 1993).

Il existe une autre hypothèse, moins étudiée, dans laquelle la dioécie évolue via la monoécie (voie b, FIGURE 1.4). Il a été démontré que la transition de l'hermaphrodisme vers la monoécie s'était produite de nombreuses fois, grâce à des mutants stériles produisant des fleurs unisexuées. Le passage de la monoécie à la dioécie impliquerait une sélection disruptive qui favoriserait la séparation des fonctions au sein d'individus distincts.

Les quelques cas étudiés d'androdioécie montrent que celle-ci ne dériverait pas de mutations femelle-stérile apparues dans une population hermaphrodite, au contraire de la gynodioécie. Il semblerait plutôt que la (ré)apparition de plantes hermaphrodites, capables de s'autoféconder, à partir de populations dioïques, ait été favorisée lors d'évènements de colonisation. L'androdioécie résulterait du remplacement des femelles par des hermaphrodites, et la trioécie de l'ajout du phénotype hermaphrodite aux deux phénotypes préexistants (FIGURE 1.4).

1.2.4 Déterminisme génétique du sexe chez les plantes à fleurs

Chez les plantes à fleurs, les systèmes de déterminisme génétique du sexe sont presque aussi variés que les systèmes sexuels. Le système standard des animaux, où le sexe est déterminé par une paire de chromosomes sexuels hétéromorphes, ne se retrouve que chez certaines espèces de plantes dioïques, qui présentent un système XY (p.ex. *Silene latifolia*). Leurs chromosomes sont très similaires à ceux des animaux, par leur structure et leur hérédité, et leur formation semble être passée par les mêmes étapes (liaison des locus sexuels, et arrêt progressif de la recombinaison). Cependant, toutes les espèces de plantes dioïques ne portent pas de chromosomes sexuels morphologiquement distinguables, et on peut trouver des chromosomes sexuels plus ou moins différenciés, qui pourraient refléter des étapes intermédiaires de la formation des chromosomes sexuels. C'est d'ailleurs grâce aux multiples évolutions indépendantes et relativement récentes de la dioécie que les plantes dioïques sont particulièrement adaptées à l'étude de la formation des chromosomes sexuels. Le déterminisme de l'androdioécie, plus simple, semble n'impliquer qu'un unique locus nucléaire, l'allèle mâle étant le plus souvent dominant (Pannell, 2002). Quant aux espèces gynodioïques, le déterminisme peut être nucléaire, ou nucléo-cytoplasmique. Ce système de reproduction sera présenté à la fin de ce chapitre (p.21) et le déterminisme génétique sera traité en détail dans le chapitre 2 (p.42).

1.3 Évolution des éléments égoïstes mitochondriaux et de la stérilité mâle

Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'évolution de la stérilité mâle cytoplasmique dans le cadre plus général de l'évolution des éléments égoïstes cytoplasmiques. Le cas de l'évolution de la gynodioécie en sera l'illustration principale.

1.3.1 Théorie du gène égoïste et conflits génomiques

Si les quelques milliers de gènes qui composent un organisme ont souvent l'air d'interagir en bonne harmonie, c'est précisément parce qu'en général, ces gènes ont été sélectionnés grâce à leur effet positif sur la fitness de l'organisme. Mais les intérêts des gènes ne se rejoignent pas toujours, et tout gène capable d'augmenter sa propre transmission peut être sélectionné, même si cela doit se faire au détriment d'autres gènes (non liés) et/ou de l'organisme dans son ensemble. Ajoutons un brin d'anthropomorphisme à cela, et la théorie du gène *égoïste* était née⁷. En réalité, il ne s'agit pas seulement de gène car un élément égoïste peut être un fragment de gène, un groupe de gènes, une portion de chromosome, un chromosome entier, etc. Il existe une très grande diversité d'éléments égoïstes, et certains, comme les éléments trans-

7. Cette théorie a été brillamment expliquée et vulgarisée par Richard Dawkins dans son livre *The selfish gene*.

posables sont devenus quasi-universels. La majorité des éléments égoïstes suivent l'une de ces stratégies :

- l'interférence : l'élément égoïste empêche la transmission de l'élément (allèle, etc.) alternatif, par exemple en détruisant les gamètes qui ne contiennent pas l'élément égoïste.
- la sur-réplication : l'élément échappe, par des mécanismes souvent complexes, au contrôle de la réplication conforme. ex : éléments transposables, certains gènes égoïstes mitochondriaux.
- « gonotaxie » : ces éléments choisissent préférentiellement la lignée germinale plutôt que la lignée somatique.

Souvent, l'apparition d'un élément égoïste entraîne la sélection, au sein de la partie lésée du génome, de gènes appelés supresseurs, capables de contrer l'action de l'égoïste. Pour cette raison, on parle de conflit intra-génomique lorsque « la propagation d'un gène crée un contexte favorable à la propagation d'un autre gène, exprimé au sein du même individu, mais ayant un effet opposé » (Hurst et al., 1996). On peut noter que la notion de conflit génomique ne préjuge pas de l'existence de l'égoïste ou du supresseur, qui ne font que révéler le conflit. Les conflits génomiques sont considérés comme une force évolutive majeure, et pourraient être impliqués dans l'évolution du sexe, des sexes, du déterminisme sexuel, de l'isolement reproducteur, de la structure du génome, et de la recombinaison (Hurst and Werren, 2001; Hurst et al., 1996).

Dans cette partie, il ne sera question que de l'évolution d'éléments égoïstes mitochondriaux, qui profitent du caractère « relâché » du génome mitochondrial, et des conflits liés à ces éléments. Nous avons déjà abordé leur importance dans l'évolution de l'hérédité uniparentale des organites (cf. p.6). La section suivante illustre les éléments mitochondriaux égoïstes par trois exemples de mutants aux stratégies de transmission variées.

1.3.2 Quelques exemples d'éléments égoïstes mitochondriaux

1.3.2.1 La mutation « petite » chez la levure

Il existe chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) un type de mutant illustrant parfaitement les éléments mitochondriaux égoïstes. Chez la levure, la transmission de l'ADN mitochondrial (ADNmt) est biparentale. La fusion des deux gamètes (de type α et a) donne naissance à une cellule hétéroplasmique, c'est-à-dire possédant plusieurs génomes mitochondriaux. Cette cellule ne reste pas longtemps hétéroplasmique car les mitochondries ségrègent rapidement lors des mitoses, donnant en quelques générations des cellules strictement homoplasmiques.

On connaît chez la levure des mutants incapables de réaliser la respiration à cause d'un génome mitochondrial défectueux (Taylor et al., 2002). Bien qu'ils puissent survivre et se répliquer grâce à la fermentation, ils souffrent d'un fort désavantage de croissance en milieu aérobie, une caractéristique qui leur a valu le nom de « petite ».

En réalisant des croisements entre des lignées normales et des lignées « petites » et en laissant les cellules se diviser jusqu'à ce que les mitochondries ségrègent et que chaque cellule ne possède plus qu'un seul génome mitochondrial, on observe jusqu'à 95% de levures « petites » dans les descendants. Cette observation démontre qu'en dépit d'un fort coût sur la cellule, le mutant est capable de se transmettre très efficacement. Chez un de ces mutants, il a été démontré que cet avantage résulterait d'une plus forte densité d'origines de réplication dans le génome mitochondrial, permettant une réplication plus rapide (MacAlpine et al., 2001). Malgré leur avantage, on trouve rarement ces mutants dans les populations naturelles⁸ et plusieurs raisons peuvent être avancées :

- la consanguinité importante limite la dispersion du mutant « petite ».
- le mutant impose un coût trop fort pour l'organisme.
- la ségrégation très rapide des mitochondries après la fusion réduit la période pendant laquelle la sélection intra-individuelle est possible.

Malgré tout, les levures « petites » restent l'exemple par excellence du mutant égoïste mitochondrial, et sont fréquemment citées pour justifier les modèles d'évolution de l'uniparentalité de la transmission des organites.

1.3.2.2 Mutants mitochondriaux pathogéniques chez la souris et l'homme

Même lorsque l'hérédité est strictement uniparentale, des mutants égoïstes peuvent profiter du caractère « relâché » du génome mitochondrial. En effet, l'hétéroplasmie n'est pas toujours due à une hérédité biparentale des organites et elle peut apparaître par mutation au cours du développement. Un mutant mitochondrial peut donc augmenter en fréquence au sein de l'individu (et en particulier dans la lignée germinale) pendant la durée de sa vie.

Le devenir des mutants mitochondriaux, et particulièrement ceux induisant une pathologie, a été étudié chez la souris et chez l'homme. L'analyse d'individus hétéroplasmiques montre que la proportion d'ADNmt muté augmente au cours du développement dans la plupart des tissus (mais diminue dans d'autres) et que l'expression de la pathologie est corrélée à la quantité d'ADNmt muté dans l'organe (Chinnery et al., 2000; Sato et al., 2007). La raison de l'accumulation de l'ADNmt muté n'est pas connue avec certitude. Il a été proposé que cet ADN ait un avantage de réplication au niveau de la molécule d'ADN, comme dans le cas des levures « petites ». Il est également possible que les mitochondries portant l'ADNmt muté se répliquent plus vite que les mitochondries normales. En effet, la réplication des mitochondries est stimulée par le noyau lorsque la quantité d'ATP est faible dans la cellule. Les mitochondries mutantes étant moins performantes dans la production de l'ATP, la réplication des mitochondries serait favorisée dans les cellules ayant une majorité de mitochondries mutantes (Burt and Trivers, 2006), entraînant l'augmentation de

8. On les détecte plus souvent en milieu anaérobie, où ils ne sont que légèrement moins performants que le phénotype normal.

la proportion d'ADNmt muté. D'autre part, il semblerait que l'ADNmt muté ne s'accumule que dans des organes où les divisions cellulaires sont peu fréquentes, et soit plutôt éliminé des organes très prolifératifs. Cette élimination serait permise par les mitoses répétées, qui, en favorisant la ségrégation des mitochondries, augmenteraient la variabilité entre cellules et permettraient une sélection inter-cellule plus forte, défavorable à l'ADNmt muté (Roze et al., 2005).

La question primordiale reste cependant celle du passage de l'ADNmt muté dans la lignée germinale femelle. La dérive, plus importante dans la lignée germinale à cause du nombre restreint de mitochondries par cellule dans cette lignée (bottleneck), semble fortement impliquée dans la ségrégation des mutants mitochondriaux et pourrait permettre une contre-sélection plus efficace de ces mutants (Jenuth et al., 1996). Par ailleurs, Sato et al. (2007) ont montré que la proportion d'ADNmt muté dans les ovules diminuait au cours de la vie, probablement grâce à une élimination sélective des ADNmt muté à l'intérieur des ovules.

1.3.2.3 L'échange non réciproque des noyaux chez les homobasidiomycètes

Un type d'élément égoïste mitochondrial tout à fait original a été découvert chez *Hebeloma crustuliniforme*, un champignon homobasidiomycète⁹. Chez ce groupe, la reproduction se passe en général de la façon suivante : deux hyphes monocaryotiques (un seul noyau haploïde), issus de la germination de spores haploïdes, échangent leurs noyaux, sans fusionner ni échanger de cytoplasme, pour donner un dicaryon (deux noyaux par cellule). Les noyaux hérités migrent ensuite au sein des deux hyphes parentaux grâce à l'ouverture de pores dans le septum, assurant ainsi que toutes les cellules du dicaryon possèdent le même génome nucléaire. En revanche, une moitié du dicaryon porte les mitochondries d'un parent et l'autre moitié les mitochondries du deuxième parent, formant une « mosaïque cytoplasmique » (cf. FIGURE 1.5). Les cellules étant homoplasmiques, il n'existe pas de conflit intracellulaire, mais à l'échelle du dicaryon, les deux types mitochondriaux sont en compétition pour la formation des carpophores (les « champignons », au sens culinaire), où se forment les spores. On s'attend donc à ce qu'un mutant mitochondrial capable d'augmenter ses chances d'être dans les spores soit sélectionné, même si cela réduit le nombre de spores totales produites par l'individu et représente un coût pour le génome nucléaire.

La surveillance systématique du transfert de noyaux a montré que des transferts non-symétriques, où seul l'un des monocaryons donne son noyau, étaient fréquents chez quelques homobasidiomycètes (p. ex. Hintz et al., 1988). Ce phénomène est appelé stérilité mâle cytoplasmique, la fonction « mâle » (le transfert de noyau) n'étant pas réalisée. La stérilité mâle augmente la transmission des mitochondries

9. Les homobasidiomycètes sont un groupe de champignons dont les spores sont formées à l'extrémité de cellules spécialisées non cloisonnées, les basides. Ce sont les champignons à carpophore macroscopique, c'est à dire ceux que l'on nomme champignons dans le langage courant.

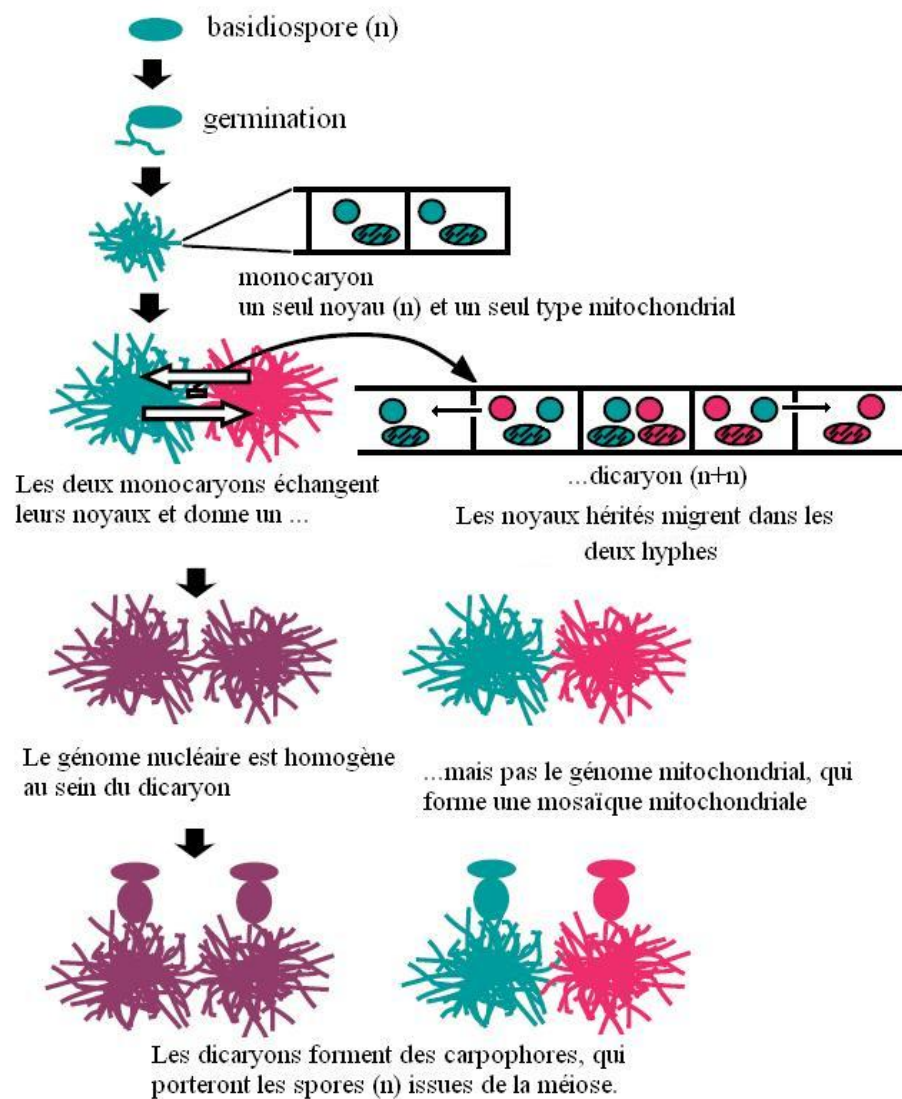


FIGURE 1.5 – Cycle de vie standard d'un homobasidiomycète, d'après Aanen et al. (2004).

du monocaryon qui ne donne pas son noyau, celles-ci monopolisant toutes les spores du dicaryon. Elle est au contraire coûteuse pour le noyau parce qu'elle rend une partie du dicaryon inapte à la reproduction (cf. FIGURE 1.5).

Aanen et al. (2004) ont développé un modèle génétique dans lequel l'échange des noyaux est contrôlé par :

- les mitochondries, qui peuvent être mâle-stérile (S, comme selfish) ou mâle fertile (F, comme fair).
- le noyau, qui peut contenir des gènes de résistance (R, résistant vs. N, non résistant) sélectionnés lorsque la fréquence de mitochondries mâle-stériles est élevée.

Les transferts non-réciproques se produisent lorsque l'un des partenaires porte S et l'autre porte N, à l'exception des fusions SN-SN qui ne donne pas de dicaryon. Ce modèle permet d'expliquer la majorité des résultats de croisements chez *Hebeloma crustuliniforme* (Aanen et al., 2004).

La stérilité mâle chez les homobasidiomycètes constitue donc un très bel exemple de conflit, incluant des éléments égoïstes (la stérilité mâle) et des supprimeurs (gènes de résistance nucléaire). Elle présente des analogies évidentes avec la stérilité mâle cytoplasmique chez les plantes (stérilité mâle $\leftrightarrow$ CMS; gènes de résistance nucléaire $\leftrightarrow$ restaurateurs, cf. section suivante). Cependant, dans le cas des homobasidiomycètes, les mitochondries égoïstes biaisent en leur faveur le système d'hérédité des mitochondries, tandis que, chez les plantes, les mitochondries égoïstes ne contrôlent pas les lois d'hérédité des mitochondries mais biaisent le sex-ratio afin de rendre ces lois plus favorables à leur transmission.

1.3.3 Évolution de la stérilité mâle cytoplasmique

Jusqu'à présent, nous avons montré que l'hérédité uniparentale des organites permettait de limiter l'invasion par des éléments égoïstes mitochondriaux. Parce qu'elle permet de contrôler la transmission des gènes lors de la sexualité, l'uniparentalité des organites peut être considérée comme l'analogue de la méiose pour les gènes cytoplasmiques (voir FIGURE 1.6). La résolution du conflit inter-cytoplasme ne règle cependant pas le problème des éléments égoïstes cytoplasmiques puisque l'hérédité uniparentale des organites génère un autre conflit, cette fois entre le noyau et le cytoplasme. En effet, puisque les gènes cytoplasmiques ne sont transmis que par un sexe, très généralement la mère, la production de descendants mâles devient une impasse évolutive. Les gènes cytoplasmiques trouvent donc leur intérêt dans un sex-ratio biaisé en faveur des femelles (ou plus généralement, en faveur du sexe qui transmet le cytoplasme) tandis que les gènes nucléaires, aussi bien transmis par les mâles que les femelles, le trouvent dans un sex-ratio équilibré (cf. FIGURE 1.7). Ce conflit pour le sex-ratio entre le cytoplasme et le noyau est appelé conflit nucléo-cytoplasmique.

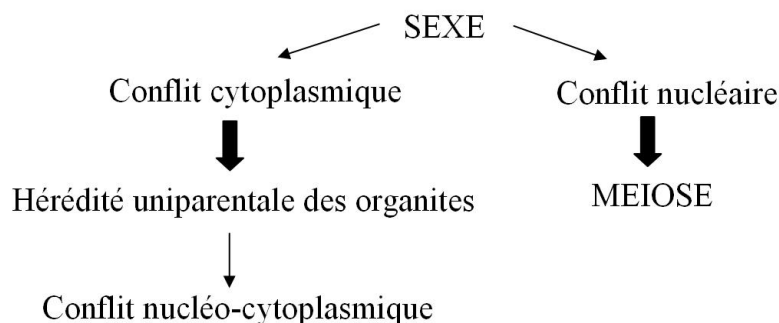


FIGURE 1.6 – Sexe et gestion des conflits.

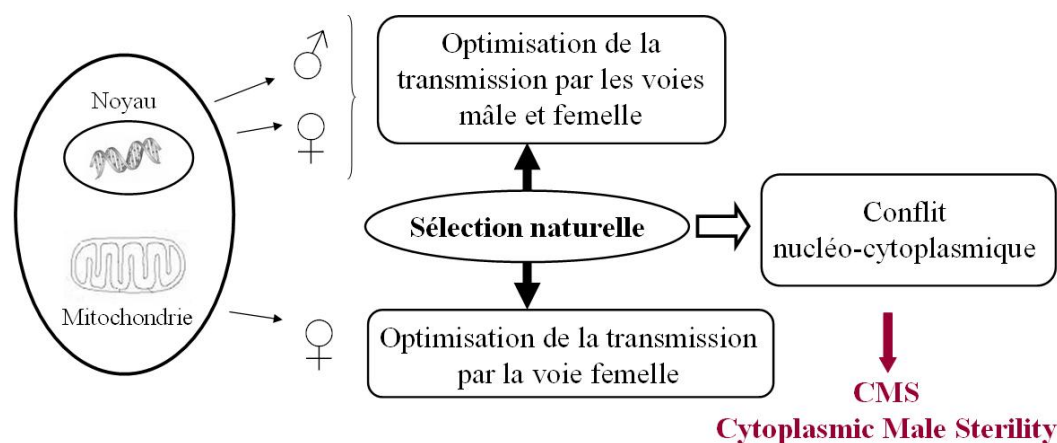


FIGURE 1.7 – Le conflit nucléo-cytoplasmique, d'après Saumitou-Laprade et al. (1994).

1.3.3.1 Évolution de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) chez les plantes

La stérilité mâle cytoplasmique (CMS) chez les plantes est la plus connue des illustrations de ce conflit. Chez environ 7% des espèces d'Angiospermes réparties dans 39 familles, on trouve dans les populations naturelles des individus femelles, ou mâle-stériles, en coexistence avec des individus hermaphrodites. Bien que des cas de stérilité mâle nucléaire soient connus (p. ex. chez la fraise, voir Ashman, 1999), la stérilité mâle est généralement induite par des gènes mitochondriaux. Ces gènes étant transmis maternellement, la production de descendants par la voie mâle (production de pollen) n'a aucun impact sur leur transmission et seule la transmission par la voie femelle (production de graines) a une influence. Ainsi, ils sont positivement sélectionnés dès que le nombre de graines produites par les femelles est supérieur à celui des hermaphrodites. Chez de nombreuses espèces gynodioïques, l'avantage des femelles dans la production de graines (appelé avantage femelle, et noté s) a été

démontré expérimentalement (synthétisé dans Shykoff et al., 2003) et s'explique par les deux phénomènes suivants :

- Chez les femelles, les ressources normalement allouées à la production de pollen sont réallouées à la production d'ovules, qui devient plus importante.
- Les femelles ne pouvant pas être auto-pollinisées, elles ne souffrent pas de la dépression de consanguinité, et produisent de descendants de meilleure qualité (fitness) que les hermaphrodites.

On définit habituellement l'avantage femelle (s) tel que les femelles produisent $s\%$ plus d'ovules que les hermaphrodites (cf. TABLE 1.3). Ainsi, quand s est positif, le gène mitochondrial de stérilité est positivement sélectionné (Lewis, 1941), et si aucun autre évènement n'intervient (comme de la limitation pollinique), il envahit entièrement la population, provoquant son extinction (Lewis, 1941). Sous un tel modèle, la gynodioécie ne persiste que le temps de l'invasion du gène de stérilité.

	hermaphrodites	femelles
ovule	1	$1 + s$
pollen	1	0

TABLE 1.3 – Fitness mâle et femelle des hermaphrodites et des femelles.

Si l'invasion du gène de stérilité mâle profite aux gènes mitochondriaux, elle est en revanche coûteuse pour les gènes nucléaires car, chez les femelles, ceux-ci ne sont plus transmis par le pollen. Par conséquent, si un mutant capable de rétablir la fertilité mâle apparaît dans le génome nucléaire, il sera positivement sélectionné. Ces gènes sont appelés restaurateurs et sont sélectionnés de deux façons. Tout d'abord, ces gènes bénéficient de la sélection fishérienne, ou sélection du sexe rare, qui favorise les allèles présents chez le sexe minoritaire, ici la fonction mâle, assurée uniquement par les hermaphrodites (cf. encadré 1). Cette sélection est fréquence-dépendante et le restaurateur ne sera sélectionné que si la fréquence de femelles est assez élevée, et plus précisément quand :

$$s(P_h - P_f) < 1$$

avec P_h , fréquence des hermaphrodites et P_f , fréquence des femelles (Jacobs and Wade, 2003).

Deuxièmement, si $s < 1$, les hermaphrodites produisent plus de gamètes que les femelles (2 vs. $1+s$, cf. TABLE 1.3), et la transmission des gènes nucléaires est donc plus efficace chez les hermaphrodites que les femelles. Les restaurateurs sont donc sélectionnés par sélection fishérienne uniquement quand $s > 1$, et par sélection fishérienne et avantage dans le nombre total de gamètes quand $s < 1$.

Deux exemples de dynamiques simples sont présentés dans la FIGURE 1.8. On peut noter que l'invasion du restaurateur ralentit l'invasion de la CMS, les hermaphrodites restaurés (ceux qui portent l'allèle mâle-stérile et le restaurateur) transmettant la CMS sans l'avantage s . L'invasion de la CMS ne s'arrête que quand

La sélection fishérienne, ou sélection du sexe rare, avantage les allèles portés par le sexe rare par rapport à ceux portés par le sexe majoritaire.

La voici illustrée dans un exemple simple. On considère que dans une population, il y a un rapport de 1 mâle pour x femelle(s) (avec $x > 1$) et on suppose que tous les mâles portent le génotype AA et toutes les femelles le génotype aa. On fait l'hypothèse que ce locus est neutre, que la dérive est négligeable, que les accouplements sont panmictiques et que les générations ne sont pas chevauchantes.

	mâles	femelles
effectif	1	x
génotype à 1 locus nucléaire neutre	AA	aa

À la génération suivante, tous les individus sont Aa au locus considéré car résultent de la reproduction entre un mâle AA et une femelle aa. La fréquence de l'allèle A, initialement porté par le sexe rare (mâle), sera donc passée en une génération de $\frac{1}{1+x}$ à $\frac{1}{2}$. Les allèles A ont donc été avantagés par le seul fait d'être portés par le sexe rare, et ce d'autant plus que le sex-ratio est déséquilibré (c.a.d. que x est grand). La sélection fishérienne est donc fréquence-dépendante.

Cet exemple caricatural illustre un principe qui s'applique également aux espèces gynodioïques, la fonction mâle étant assurée par la production de pollen par les hermaphrodites, et la fonction femelle par la production d'ovules par les femelles et les hermaphrodites. Voici un exemple dans un cas de gynodioécie cytonucléaire. Comme dans le premier exemple, on néglige l'autofécondation, et on suppose que les croisements se font au hasard (e.g. pas de structure géographique). On suppose également que les restaurateurs ne sont pas coûteux. Les femelles possèdent 100% d'allèles non restaurateurs r , et les hermaphrodites 70% d'allèles restaurateurs R , et 30% d'allèles non restaurateurs r (hermaphrodites non restaurés ne portant pas de gène CMS). Les femelles et les hermaphrodites sont en proportions égales dans la population.

	hermaphrodites	femelles
effectif	1	1
fréquence des allèles au locus de restauration	$R(70\%), r(30\%)$	$r(100\%)$

Initialement, la fréquence de R est : $0.7 \times 0.5 = 0.35$.

À la génération suivante, sa fréquence sera (avec $s=0.4$) :

$$\frac{0.7^2 + 0.7 \times 0.3 + (1 + s) \times 0.7 \times 0.5}{2 + s} = 0.496$$

Évidemment, le régime de reproduction est susceptible de modifier l'effet de la sélection fishérienne.

Encadré 1: La sélection fishérienne

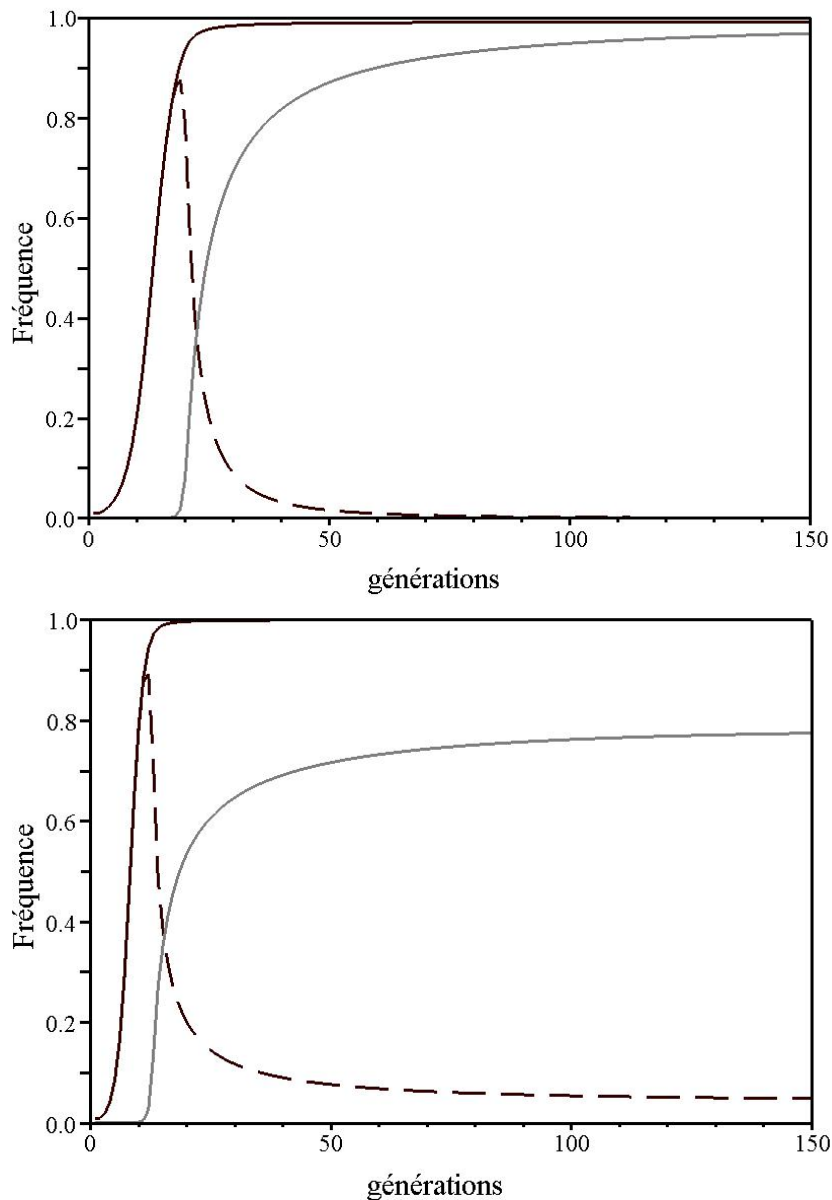


FIGURE 1.8 – Dynamique d'un modèle de gynodioécie avec un locus de CMS mitochondrial et un locus de restauration nucléaire biallélique. La fréquence de l'allèle mâle-stérile mitochondrial est représentée en noir, celle de l'allèle restaurateur en gris, et celle des femelles en pointillée. Les fréquences initiales de l'allèle mâle-stérile et de l'allèle restaurateur sont respectivement de 0.01 et 0.01. **En haut** : Dynamique quand $s < 1$ (ici $s = 0.5$). L'allèle mâle-stérile et l'allèle restaurateur se fixent. Dans cet exemple, l'allèle mâle-stérile se fixe avant le restaurateur. Pour des valeurs de s plus petites, le restaurateur se fixe avant l'allèle mâle-stérile, qui devient neutre et se stabilise à une fréquence intermédiaire. Dans les deux cas, la population ne passe que par une gynodioécie transitoire avant de revenir à un système hermaphrodite (CMS cryptique). **En bas** : Dynamique quand $s > 1$ (ici $s = 1.1$). Au contraire de la dynamique représentée en haut, l'allèle restaurateur n'est sélectionné que si $s \times (P_h - P_f) < 1$. Sa fréquence va donc augmenter, puis se stabiliser à une fréquence intermédiaire telle que $s \times (P_h - P_f) = 1$. La population à l'équilibre sera donc gynodioïque avec un déterminisme nucléaire (CMS fixée).

le restaurateur est fixé. On reviendra sur des dynamiques plus complexes dans le chapitre 2.

La seule observation des espèces gynodioïques sous-estime probablement l'importance des éléments égoïstes mitochondriaux biaisant le sex-ratio chez les plantes. Chez des espèces hermaphrodites, il est fréquent d'observer des individus mâle-stériles dans les descendance de croisement interspécifiques (ou même intraspécifiques entre populations différentes). Chez ces hybrides, la stérilité est le plus souvent héritée maternellement, suggérant un mécanisme de type CMS. Dans la plupart des cas, on suppose que l'espèce possède une CMS cryptique, cachée par la fixation des restaurateurs, que l'hybridation avec des populations où le restaurateur n'est pas présent ne fait que révéler.

D'autre part, la CMS n'est que l'extrême d'une stratégie consistant à biaiser le sex-ratio en faveur des femelles mais des gènes à l'action plus modérée (p. ex. augmentant la production d'ovules de $x\%$ et réduisant celle de pollen de $y\%$) sont également susceptibles d'avoir été sélectionnés. De tels gènes ne sont pas connus, mais les changements quantitatifs de phénotype étant plus délicats à détecter que des changements qualitatifs, il est possible qu'une partie des éléments égoïstes mitochondriaux exploitant le conflit cytonucléaire soit encore inconnue. On verra d'ailleurs au cours du chapitre 3 que les espèces gynodioïques présentent parfois des phénotypes intermédiaires.

Une des conséquences de la stérilité mâle cytoplasmique est qu'elle entraîne la sélection d'allèles nucléaires de restauration, qui réduisent l'impact de la stérilité, parfois jusqu'au retour de l'hermaphrodisme. Il existe cependant d'autres réponses de la part du noyau pour contrer l'action des gènes de stérilité. En particulier, le sex-ratio étant biaisé en faveur des femelles, il existe une sélection pour masculiniser les hermaphrodites, c'est-à-dire augmenter leur allocation dans la fonction mâle. Ce phénomène a pu être montré chez des espèces de thym, chez *Hebe subalpina*, ou encore chez *Fragaria virginiana*, où la moitié des « hermaphrodites » sont en fait des mâles (Burt and Trivers, 2006). Si cette évolution est poussée à son terme, les hermaphrodites deviennent purement mâles et le système devient dioïque. L'évolution de la dioécie ne résout cependant pas le conflit cytonucléaire pour le sex-ratio et on pourrait attendre des gènes cytoplasmiques « tueurs de mâle ». On trouve de tels gènes chez la bactérie *Wolbachia* (cf. section suivante), qui parasite le cytoplasme de nombreux nématodes et arthropodes. On a également observé chez des espèces de *Silene* dioïques des populations biaisées en faveur des femelles mais on ne sait pas si le déterminisme de cette distortion est cytoplasmique (Taylor, 1994).

1.3.3.2 La stérilité mâle cytoplasmique, une spécificité des mitochondries des plantes ?

Il existe un cas bien étudié de stérilité mâle cytoplasmique chez les animaux qui présente beaucoup d'analogies avec la CMS chez les plantes. Cette stérilité n'est pas

mitochondriale, mais elle est réalisée par la bactérie endosymbiotique *Wolbachia*. Cette bactérie, qui infecte des nématodes et des arthropodes (dont près de 25% des insectes), se développe dans le cytoplasme des cellules et se transmet maternellement. Ses stratégies pour augmenter sa transmission sont très variées, et certaines d'entre elles impliquent un biais du sex-ratio en faveur des femelles (Werren et al., 2008) :

- Les tueurs de mâles. Cette stratégie consiste à tuer les embryons mâles, et à réallouer l'énergie qui leur était dédiée dans le développement d'embryons femelles.
- La féminisation diploïde. Chez certains crustacés (p. ex. *Armadillidium*), les bactéries féminisent les mâles génétiques et les transforment en femelles fonctionnelles. Les femelles infectées produisent ainsi des descendance très fortement biaisées en faveur des femelles.
- La féminisation haplo-diploïde. Le principe de cette stratégie est identique à la précédente mais le mécanisme diffère. Chez certaines espèces haplo-diploïdes, dont les mâles sont haploïdes et les femelles diploïdes, la bactérie provoque un doublement chromosomique chez les mâles, les transformant en femelles diploïdes.

On reviendra sur les analogies entre la stérilité mâle des plantes et l'action de *Wolbachia* dans l'ARTICLE 5 (cf. p.148).

En revanche, il n'existe, à ma connaissance, qu'un seul cas de stérilité mâle mitochondriale chez les animaux. En effet, chez les espèces hermaphrodites, et même chez certains vers androdioïques ou gynodioïques, aucune mutation de stérilité mâle mitochondriale n'a pu être trouvée. De même, chez les espèces dioïques, aucun gène mitochondrial capable de biaiser le sex-ratio en faveur des femelles n'a jamais été décrit, alors qu'on connaît de nombreux distorceurs de sex-ratio nucléaires, par exemple chez *Drosophila*. L'unique exemple de stérilité mâle mitochondriale chez les animaux a été découvert chez l'homme grâce à une étude sur l'infertilité. Celle-ci a montré qu'un haplotype mitochondrial relativement fréquent (l'haplotype « T ») était responsable d'une mobilité spermatique réduite, due à une phosphorylation oxydative moins efficace (synthétisé dans Burt and Trivers, 2006). Cet haplotype mutant serait responsable d'une activité réduite des mitochondries, qui affecterait en premier lieu la motilité spermatique, celle-ci étant probablement l'une des fonctions les plus sensibles à la production de l'ATP.

Pourquoi trouve-t-on si peu de cas de stérilité mâle mitochondriale chez les animaux ? De même, chez les plantes, pourquoi connaît-on tant d'exemples de stérilité mâle mitochondriale et pas un seul de stérilité mâle chloroplastique, alors que le conflit entre noyau et cytoplasme s'applique en théorie aussi bien aux mitochondries qu'aux chloroplastes des plantes ?

L'une des difficultés des modèles de conflits génomiques repose sur la probabilité d'apparition des mutations : il ne suffit pas de savoir que telle mutation, si elle apparaissait, serait sélectionnée car il faut aussi que la mutation puisse se produire. Une faible probabilité d'apparition des mutations de stérilité mâle pourrait expli-

quer aussi bien leur absence dans le génome chloroplastique des plantes que dans le génome mitochondrial des animaux. En effet, on sait que les gènes de stérilité mitochondriaux sont des gènes chimères issus de réarrangements du génome par recombinaison (cf. p.29). Or, chez les animaux, le génome mitochondrial est beaucoup plus compact que chez les plantes (15-20 kb vs. 200-2500 kb chez les plantes), et peu sujet aux recombinaisons¹⁰ (Budar et al., 2003). De même, chez les plantes, le taux de recombinaison du génome chloroplastique est plus faible que celui du génome mitochondrial. De plus, il est possible que les gènes mitochondriaux sont plus intimement liés à des fonctions sensibles pour la formation des anthères et du pollen (p. ex. lié à la forte demande en ATP de ces fonctions, cf. Budar et al., 2003).

Plus généralement, l'absence d'éléments égoïstes cytoplasmiques là où on pourrait les attendre révèle que le noyau gagne souvent le conflit cytonucléaire, une observation qui pourrait s'expliquer par les possibilités plus larges du noyau en terme de mutations (génome plus grand et plus riche en régions non codantes).

1.4 Objectifs et démarche de la thèse

Dans ce manuscrit, il sera question de l'évolution et du maintien de la gynodioécie chez les espèces où la stérilité mâle est cytoplasmique (les cas de gynodioécie purement nucléaire ne seront pas abordés). Trois aspects seront traités en détail. Nous aborderons d'abord le déterminisme génétique de la gynodioécie et ses implications évolutives (chapitre 2). Les modèles théoriques d'évolution de la gynodioécie seront présentés à cette occasion. Dans le chapitre 3, l'accent sera mis sur le phénotype gynomonoïque, où fleurs pistillées et parfaites sont présentes sur une même plante. Les caractéristiques reproductrices de ces individus seront comparées à celles des femelles et des hermaphrodites, et les conséquences pour l'évolution de la gynodioécie seront discutées. Le contrôle génétique et environnemental du phénotype gynomonoïque sera traité en deuxième partie de chapitre. Enfin, dans le chapitre 4, nous discuterons de l'hérédité mitochondriale chez les espèces gynodioïques, à la lumière des derniers résultats obtenus chez *Silene vulgaris*.

Ces questions seront étudiées par une approche expérimentale sur l'espèce gynodioïque *Silene nutans* et une approche théorique dans le chapitre 4. Au cours de chaque chapitre, un état de l'art sera dressé avant de traiter des résultats obtenus pendant ma thèse.

10. Le taux de mutations des mitochondries animales est pourtant 20 fois plus important que celui des plantes ce qui pourrait favoriser l'apparition de nouveaux mutants. On peut expliquer ce faible effet par le fait que les CMS résultent, chez les plantes, d'événements de recombinaison et pas de mutations ponctuelles.

Maintien et déterminisme génétique de la gynodioécie

2.1 Les bases moléculaires de la stérilité mâle cytoplasmique

Grâce à son utilité dans la production d'hybrides, la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) a été explorée et caractérisée chez de nombreuses plantes cultivées, telles que le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), le colza (*Brassica napus*), le maïs (*Zea mays*), le pétunia (*Petunia hybrida*), le riz (*Oriza sativa*), la betterave (*Beta vulgaris*), etc. Chez la majorité de ces espèces, les plantes sont habituellement hermaphrodites et la CMS n'apparaît que lors de croisements interspécifiques, suggérant une fixation des CMS et des restaurateurs associés au sein des espèces. La nature des gènes et les mécanismes moléculaires de la stérilité mâle cytoplasmique sont pratiquement inconnus chez les espèces sauvages, mais on commence à en avoir une description assez précise chez les espèces cultivées (voir les synthèses de Budar et al., 2003; Chase, 2007; Fujii and Toriyama, 2008; Hanson and Bentolila, 2004; Saumitou-Laprade et al., 1994; Schnable and Wise, 1998; Touzet and Budar, 2004; Touzet and Delph, 2009). Nous verrons dans cette section les généralités qui se dégagent de ces études.

2.1.1 Les gènes de stérilité mâle cytoplasmique

2.1.1.1 Des gènes chimériques

Les gènes de CMS sont généralement des gènes chimériques, créés *de novo* à partir d'événements de recombinaison. Ils sont un assemblage de petites portions de gènes mitochondriaux bien connus (atp8, cox2, atp6, atp9, etc.), de zones non codantes mitochondriales, et de séquences dont l'origine est inconnue (Schnable and Wise, 1998). Les gènes de CMS n'ont en général aucune similarité dans leurs séquences, aussi bien entre qu'au sein d'espèces, et lorsque plusieurs gènes de CMS coexistent, ils sont rarement alléliques (Delph et al., 2007). Ils sont situés à proximité

de gènes mitochondriaux essentiels et co-transcrits avec eux (Budar et al., 2003) et il semblerait que le gène de CMS soit rapidement éliminé si son association avec le gène essentiel est rompue (Bellaoui et al., 1998). La co-transcription des gènes de CMS avec des gènes essentiels pourrait refléter non seulement le recrutement d'un signal d'expression par le gène de CMS mais également l'avantage que procure la liaison génétique avec un gène essentiel (Budar et al., 2003).

2.1.1.2 Mécanismes cellulaires de la stérilité mâle cytoplasmique

Les changements morphologiques associés à la stérilité mâle sont extrêmement variés. Les plantes mâle-stériles peuvent être pourvues d'étamines plus ou moins avortées, voire absentes, avoir des étamines à l'aspect normal mais ne produisant pas de pollen ou un pollen incapable de germer, ou encore présenter des étamines modifiées (p. ex. étamines pétaloïdes chez la carotte). On peut donc s'attendre à ce que ces différentes morphologies soient associées à des mécanismes différents. On trouve cependant quelques points communs à de nombreuses espèces, comme la dégénérescence prématurée des cellules du tapetum¹, souvent associée à la dégradation des mitochondries dans ces cellules. Il semble également que la majorité des protéines codées par les gènes de CMS comportent de larges domaines hydrophobes et soient associées à la membrane interne de la mitochondrie.

Les gènes de CMS sont exprimés constitutivement² mais n'induisent un phénotype que localement, au niveau des étamines. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce paradoxe, mais celles-ci restent assez spéculatives, le mode d'action des protéines codées par les gènes de CMS étant encore largement inconnu :

- *Le modèle perte de fonction.* Dans ce modèle, le polypeptide codé par le gène de CMS modifie la physiologie de la mitochondrie, le plus souvent en réduisant l'efficacité de la respiration et la production d'ATP. La modification du métabolisme serait constitutive, mais la fabrication du pollen étant très coûteuse en ATP, les dysfonctionnements n'auraient de conséquence qu'au niveau de la gamétogenèse mâle. Cette hypothèse est appuyée par l'existence de mutants mitochondriaux touchants des gènes impliqués dans la respiration qui stérilisent les plantes (stérilité mâle et/ou femelle). Malheureusement, ces mutants souffrent d'une croissance végétative réduite et ne peuvent pas être considéré comme de véritables CMS. En revanche, la sélection pourrait n'avoir maintenu, parmi ces mutants, que ceux ayant une fitness femelle normale. Cette hypothèse tend à être abandonnée en tant que modèle général, bien qu'elle s'applique à certaines CMS (Chase, 2007).
- *Le modèle gain de fonction.* Dans ce modèle, on suppose qu'un facteur présent uniquement dans le tissu cible, le « facteur X », interagirait avec la protéine codée par le gène de CMS, provoquant une cascade de réactions ayant pour

1. Couche cellulaire à rôle nutritif qui entoure les grains de pollen dans l'anthère.

2. À l'exception de *Phaseolus*, dont la protéine codée par le gène de CMS est dégradée dans les tissus végétatifs.

conséquence la stérilité mâle. Ce modèle est le modèle dominant actuellement, mais il souffre du peu de validations expérimentales de l'existence du « facteur X ». Il existe néanmoins un mécanisme bien décrit correspondant à ce modèle chez les espèces où la stérilité mâle est associée à une modification de la morphologie florale³ (identité des organes modifiée, organes fusionnés, etc.). Chez ces espèces, l'expression du gène de CMS diminuerait la production d'ATP, ce qui empêcherait la protéolyse ATP-dépendante de protéines régulant l'expression de gènes nucléaires impliqués dans le développement floral (Chase, 2007).

Par ailleurs, on sait que la mitochondrie influence la mort cellulaire programmée (apoptose) par des changements dans la production d'ATP ou la production de ROS (reactive oxygen species). Ces deux facteurs pourraient être modifiés par les gènes de CMS (Chase, 2007), et entraîner une mort prématurée des cellules du tapetum.

2.1.2 Les restaurateurs de fertilité

La restauration peut être assurée soit par quelques gènes ayant un impact majeur soit par une multitude de gènes à faible effet, additifs, mais pour des raisons pratiques, la majorité des études se sont penchées sur la première catégorie de restaurateurs et ont généralement trouvé qu'un ou deux gènes suffisaient à assurer une restauration complète. On connaît beaucoup mieux le mode d'action des restaurateurs que celui des gènes de CMS. Les restaurateurs sont généralement dominants (cf. TABLE 2.4 p.37) et peuvent agir de façon sporophytique (action indirecte sur le pollen via les tissus diploïdes de la mère) ou gamétophytique (action directe dans les microspores ou le pollen). Tous les restaurateurs agissent en empêchant la bonne expression du gène de CMS, à l'unique exception du premier restaurateur découvert, *rf2*, chez le maïs, qui code une aldéhyde déshydrogénase détruisant l'aldéhyde toxique produit par le gène de stérilité, *urf13*. Ils agissent généralement en post-transcription, en coupant ou déstabilisant l'ARN codé par le gène de CMS, mais peuvent également agir directement sur l'ADN (p. ex. chez *Phaseolus*), ou en post-traduction, sur la protéine.

Le séquençage récent de plusieurs restaurateurs a permis de montrer que les protéines codées par les gènes de restauration appartenaient toutes à une même famille de protéines, les protéines PPR (pentatricopeptide-repeat). Les protéines de cette famille sont adressées à la mitochondrie ou au chloroplaste par une séquence signal, et contrôlent l'expression du génome mitochondrial ou chloroplastique, chaque protéine étant spécifique d'un locus donné (Budar et al., 2003; Chase, 2007; Touzet and Budar, 2004). Ces protéines ont la capacité de se fixer sur l'ARN mais n'agissent pas directement et seraient plutôt des adaptateurs permettant le recrutement d'autres enzymes qui modifieraient l'ARN. Le séquençage des zones adjacentes aux loci de restauration a montré la présence d'autres gènes codant des protéines PPR et il a

3. Il s'agit le plus souvent de cas de CMS alloplasmiques, c'est-à-dire révélées par des croisements interspécifiques.

été suggéré que les gènes de restauration soient issus de la duplication de ces gènes voisins (Fujii and Toriyama, 2008; Touzet and Budar, 2004). Le fait que les restaurateurs appartiennent à une même famille de protéines devrait faciliter l'identification d'autres gènes de restauration dans le futur.

2.2 Les conditions du maintien de la gynodioécie : modèles et validations expérimentales

Déterminer les conditions de maintien de la gynodioécie cytonucléaire et du polymorphisme génétique sous-jacent a été l'enjeu d'une part importante des études sur la gynodioécie. En effet, les modèles les plus simples tels que ceux présentés en introduction ne permettent pas d'expliquer le maintien et la stabilité de la gynodioécie. De nombreux travaux théoriques ont donc exploré les conditions nécessaires au maintien du polymorphisme cytonucléaire, et certaines de ces conditions ont pu être validées expérimentalement. Nous récapitulerons ici les principales de ces conditions, d'un point de vue théorique et expérimental. Dans une première partie, nous examinerons l'influence des caractéristiques des restaurateurs et des gènes de CMS sur l'évolution de la gynodioécie, grâce à des modèles en population infinie et panmixique (sections 2.2.1 et 2.2.2). Les effets de la structure génétique et la limitation par le pollen seront traités dans la section 2.2.3. Enfin, nous discuterons des dynamiques de la gynodioécie grâce aux indices donnés par l'observation de la diversité génétique mitochondriale.

2.2.1 Les caractéristiques des restaurateurs

2.2.1.1 Définitions

Les restaurateurs peuvent être distingués par de nombreuses caractéristiques qui doivent être clairement définies afin de ne pas mélanger leurs effets respectifs dans les modèles. La restauration d'un gène de CMS est très généralement assurée, dans les modèles, par un locus de détermination biallélique, pouvant porter l'allèle restaurateur ou l'allèle non restaurateur. L'allèle restaurateur peut être dominant, récessif, ou partiellement dominant mais la quasi-totalité des modèles supposent que l'allèle restaurateur est dominant (les données expérimentales soutiennent ce choix, voir p.35). Pour cette raison, l'allèle restaurateur est couramment noté en majuscule (R) et l'allèle non restaurateur en minuscule (r).

Nous avons vu en introduction que, sans coût associé à la restauration, il n'était pas possible de maintenir un polymorphisme cytonucléaire. Des coûts de toutes sortes ont donc été introduits dans les modèles pour expliquer le maintien de ce polymorphisme et se distinguent par :

- *La dominance du coût* (à ne pas confondre avec la dominance du restaurateur!) : le coût peut s'appliquer chez tous les individus qui portent l'allèle

restaurateur, ou uniquement chez ceux qui sont homozygotes pour l'allèle restaurateur.

- *Le coût exprimé/silencieux/constitutif* : un coût est exprimé s'il s'applique lorsque le restaurateur est associé à la CMS qu'il restaure, silencieux s'il s'applique lorsque le restaurateur n'est pas associé à la CMS qu'il restaure et constitutif s'il s'applique chez tous les individus qui portent le restaurateur.
- *Le coût sur les ovules ou sur le pollen* : le coût du restaurateur peut s'appliquer sur la fitness femelle, c'est-à-dire sur la production d'ovules, ou sur la fitness mâle, c'est-à-dire sur la production de pollen.

Les tables 2.1 et 2.3 illustrent ces différences.

2.2.1.2 L'impact des caractéristiques des restaurateurs sur le maintien de la gynodioécie : études théoriques

Avant de regarder l'impact des caractéristiques des restaurateurs, il convient de présenter les deux grands types de déterminisme génétique du sexe qui ont été utilisés dans les modèles et qui modifient considérablement les dynamiques et l'impact des paramètres. La première catégorie de modèles suppose l'existence d'un cytoplasme mâle-fertile (C_f) et d'un cytoplasme mâle-stérile (C_s), ce dernier étant restauré par l'allèle restaurateur au locus biallélique de restauration (Dufay et al., 2007; Jacobs and Wade, 2003; Ross and Gregorius, 1985). Dans la deuxième catégorie de modèles, deux cytoplasmes mâle-stériles (C_1 et C_2) sont restaurés par deux locus de restauration dont l'allèle restaurateur est dominant et spécifique d'un cytoplasme, R_1 pour C_1 et R_2 pour C_2 (Bailey et al., 2003; Gouyon et al., 1991; Ross and Gregorius, 1985). Les tables 2.1 et 2.3 illustrent la correspondance génotype/phénotype dans les deux types de modèles.

L'influence de la dominance du restaurateur a été explorée analytiquement dans un modèle de la première catégorie (C_s vs. C_f). Jacobs and Wade (2003) démontrent que, dans un contexte de restauration sans coût, le restaurateur se fixe mieux s'il est dominant que s'il est récessif. Ce résultat s'explique par le fait que le restaurateur est en grande partie sélectionné grâce à son association avec le gamète rare (via la sélection fishérienne) et que l'association entre l'allèle restaurateur et le pollen est plus forte dans le cas d'un restaurateur dominant (Jacobs and Wade, 2003).

Voyons à présent l'influence des coûts de restauration dans les modèles de type C_s vs. C_f . Dans ces modèles, le maintien de la gynodioécie cytonucléaire est possible si la CMS et l'allèle restaurateur sont soumis à de la sélection fréquence-dépendante. Le cytoplasme mâle-stérile étant avantagé en l'absence du restaurateur grâce à l'avantage femelle, sa fixation ne peut être empêchée que s'il est contre-sélectionné lorsque l'allèle restaurateur est en forte fréquence. De la même façon, l'allèle restaurateur étant avantagée en présence du cytoplasme mâle-stérile, sa fixation n'est empêchée que s'il est contre-sélectionné lorsque le cytoplasme mâle-fertile est en forte fréquence. En d'autres termes, le polymorphisme cytonucléaire est maintenu si :

- la hiérarchie des fitness femelles respecte : C_s associé à $r > C_f > C_s$ associé à R (maintien du polymorphisme au locus CMS)
- la hiérarchie des fitness mâles ou femelle respecte : r associé à $C_f > R$ associé à C_f (maintien du polymorphisme au locus de restauration)

Sous ces conditions, la dynamique est la suivante : (1) le cytoplasme mâle-stérile se répand dans la population grâce à l'avantage femelle ; (2) quand le cytoplasme mâle-stérile est en fréquence suffisante, le restaurateur est avantageé et se répand dans la population ; (3) la fréquence de femelles diminue, et le cytoplasme mâle-stérile devient majoritairement porté par des hermaphrodites restaurés ; (4) le cytoplasme mâle-fertile, avantageux lorsque le restaurateur est en forte fréquence, augmente en fréquence au détriment du cytoplasme mâle-stérile ; (5) chez les plantes portant le cytoplasme mâle-fertile, le restaurateur est contre-sélectionné et diminue en fréquence. Ces étapes peuvent être répétées lors d'oscillations, qui peuvent être amorties (point d'équilibre) ou non (cycles limites).

Pour remplir ces conditions, deux coûts doivent être appliqués. Le premier doit être un coût exprimé sur les graines afin que le cytoplasme mâle-stérile soit contre-sélectionné quand le restaurateur est fréquent (cf. TABLE 2.1). Le deuxième est un

Cytoplasme	C_s			C_f		
Génotype au locus de restauration	RR	Rr	rr	RR	Rr	rr
Phénotype sexuel	H	H	F	H	H	H
Fitness femelle	$1 - a_1$	$1 - a_1$	$1 + s$	1	1	1
Fitness mâle	1	1	0	$1 - a_2$	1	1

TABLE 2.1 – Fitness mâle et femelle des différents génotypes dans un modèle avec un cytoplasme mâle-fertile (C_f) et un cytoplasme mâle-stérile (C_s), ce dernier étant restauré par un allèle restaurateur dominant (R) ayant un coût dominant exprimé sur les graines (noté a_1) et un coût récessif silencieux sur le pollen (noté a_2). De tels coûts permettent le maintien du polymorphisme cytonucléaire dans le cas d'un modèle C_f vs. C_s mais d'autres coûts sont également possibles (voir détails dans le texte). s : avantage femelle ; H : hermaphrodite ; F : femelle.

coût silencieux ou constitutif (il doit s'appliquer au moins sur les individus portant le cytoplasme mâle-fertile) et permet que l'allèle restaurateur soit contre-sélectionné quand le cytoplasme mâle-fertile est fréquent (cf. TABLE 2.1). Ce dernier coût peut s'appliquer sur les ovules ou le pollen et être récessif ou dominant, mais soutient le polymorphisme cytonucléaire dans une gamme plus large de paramètres lorsque le coût est récessif et sur le pollen (Dufay et al., 2007). En effet, un coût récessif est responsable d'un avantage aux hétérozygotes (superdominance) au locus de restauration qui permet de maintenir le polymorphisme plus efficacement. Quant au coût sur les ovules, il est moins favorable au coût sur le pollen car il diminue la fitness du cytoplasme mâle-fertile et favorise la fixation du cytoplasme mâle-stérile.

L'influence des coûts de restauration est différente dans les modèles avec deux cytoplasmes mâle-stériles (C_1 et C_2) (Bailey et al., 2003; Gouyon et al., 1991). Le facteur prépondérant est la dominance du coût. Si le coût est récessif, le polymorphisme est maintenu grâce à la superdominance qui résulte de la dominance du restaurateur et de la récessivité du coût (cf. TABLE 2.2). Si le coût est dominant, le maintien du polymorphisme est possible grâce aux sélections fréquence-dépendantes (cf. FIGURE 2.1). Dans ce cas, il est indispensable qu'une composante du coût du restaurateur touche les individus qui ne portent pas la CMS qu'il restaure (coût silencieux ou constitutif) pour maintenir un polymorphisme cytonucléaire (cf. TABLE 2.3). Cette composante de coût silencieux facilite également le polymorphisme cy-

R/R	R/r	r/r
hermaphrodite	hermaphrodite	femelle
1-coût	1	0

TABLE 2.2 – Fitness mâle des individus portant un cytoplasme mâle-stérile restauré par l'allèle restaurateur R. Si le restaurateur est dominant et le coût de restauration récessif (dans ce cas, exprimé et sur le pollen), le polymorphisme au locus de restauration est maintenu par superdominance car les hétérozygotes ont la plus forte fitness.

tonucléaire quand le coût est récessif. Le fait que le coût s'applique sur les graines ou le pollen est de moindre impact. Cependant, dans certains cas, le coût sur les graines peut limiter le polymorphisme cytoplasmique. En effet, les simulations démarrant avec une CMS restaurée majoritaire dans la population, le coût sur les graines que subissent ces hermaphrodites restaurés amplifie l'avantage relatif des femelles issues de la nouvelle CMS. Celle-ci peut alors envahir si vite qu'elle se fixe.

2.2.1.3 Études expérimentales

Les études expérimentales montrent que la majorité des restaurateurs sont dominants. Chez les plantes cultivées, la totalité des restaurateurs connus sont dominants (cf. TABLE 2.4), et la réalisation de croisements chez des espèces sauvages tend à confirmer cette tendance (cf. TABLE 2.6 p.46).

Les caractéristiques du coût de restauration ont pu être déduites des mécanismes de restauration, bien connus chez certaines plantes cultivées (voir la synthèse de Delph et al., 2007, et la TABLE 2.4 tirée de la publication). Une majorité d'espèces présente des coûts silencieux ou constitutifs, compatibles avec le maintien du polymorphisme dans le cas des modèles avec deux cytoplasmes mâle-stériles. Ce coût semble s'appliquer soit sur le pollen exclusivement, soit sur le pollen et les ovules simultanément. Pour l'instant, on ne dispose pas d'assez d'information pour déterminer si les coûts de restauration sont plutôt dominants ou récessifs.

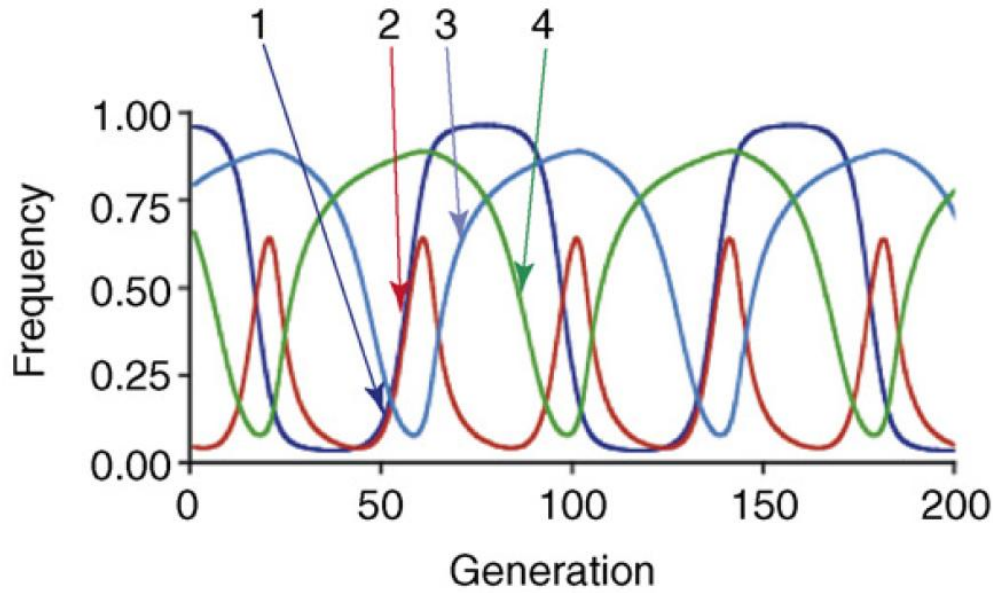


FIGURE 2.1 – Sélection fréquence-dépendante et maintien du polymorphisme dans un modèle à deux cytoplasmes mâle-stériles, C_1 (en bleu foncé) et C_2 (non représenté, fréquence complémentaire de celle de C_1). Les fréquences de R_1 et R_2 sont en bleu clair et en vert respectivement. La fréquence de femelles est en rouge. (1) Initialement, C_1 est rare ainsi que son restaurateur R_1 ; (2) C_1 est avantage grâce à l'avantage femelle s_1 et la fréquence de femelles augmente; (3) Le restaurateur R_1 se répand dans la population car il est avantage quand C_1 est fréquent; (4) C_2 étant rare, le restaurateur R_2 est contre-sélectionné et diminue en fréquence; Puis un nouveau cycle dans lequel 1 et 2 sont inversés peut recommencer : C_2 est favorisée grâce à s_2 et remplace progressivement C_1 ; R_2 se répand et R_1 est contre-sélectionné et diminue en fréquence; etc. Des oscillations peuvent se produire, et être ou non amorties. D'après Delph et al. (2007).

Cytoplasme	C_1			C_2		
Génotype aux loci de restauration	$R_1/-$ r_2/r_2	$R_1/-$ $R_2/-$	r_1/r_1 -/-	$R_2/-$ r_1/r_1	$R_2/-$ $R_1/-$	r_2/r_2 -/-
Phénotype sexuel	H	H	F	H	H	F
Fitness femelle	1	1	$1 + s_1$	1	1	$1 + s_2$
Fitness mâle	1	$1 - a_2$	0	1	$1 - a_1$	0

TABLE 2.3 – Fitness mâle et femelle des différents génotypes dans un modèle avec deux cytoplasmes mâle-stériles (C_1 et C_2), chacun étant restauré par un locus de restauration dont l'allèle restaurateur est dominant (R_1 et R_2) et a un coût silencieux dominant sur le pollen (noté a_1 pour R_1 et a_2 pour R_2). « - » signifie que cet allèle n'a pas d'importance. H : hermaphrodite ; F : femelle.

Species	CMS gene (cytotype)	Restorer	Restorer dominance	Predicted mode of cost ^c	Predicted effects based on tissue expression ^d
Brassica <i>Brassica napus</i>	<i>orf224</i> (<i>pol</i>)	<i>Rfp</i> ^a	Dominant	Silent	Pollen
	<i>orf222</i> (<i>nap</i>)	<i>Rfn</i> ^a	Dominant	Constitutive	Pollen
Maize <i>Zea mays</i>	<i>urf13</i> (CMS-T)	<i>Rf1</i>	Dominant	Silent	Seed and pollen
	<i>orf355/orf77</i> (CMS-S)	<i>Rf3</i>	Dominant	Constitutive	Seed and pollen
Bean <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>orf239</i> (<i>pvs</i>)	<i>Fr₂</i>	Dominant	Silent	Pollen
Sunflower <i>Helianthus annuus</i>	<i>orf522</i> (PET1)	<i>Rf1</i> ^b	Dominant	Silent	Pollen
		<i>Rf2</i> ^b	Dominant	Silent	Pollen
Petunia <i>Petunia x hybrida</i>	<i>pcf</i>	<i>Rf</i>	Dominant	Silent	Seed and pollen
Radish <i>Raphanus sativus</i>	<i>orf138</i>	<i>Rfo</i>	Dominant	Silent	Pollen
Rice <i>Oryza sativa</i>	<i>orf79</i> (CMS-BT)	<i>Rf-1a</i> ^b	Dominant	Constitutive	Seed and pollen
		<i>Rf-1b</i> ^b	Dominant	Silent	Seed and pollen
Sorghum <i>Sorghum bicolor</i>	<i>orf107</i> (IS1112C)	<i>Rf3</i> ^b	Dominant	Insufficient data	Seed and pollen
		<i>Rf4</i> ^b	Dominant	Insufficient data	Insufficient data

a Les restaurateurs sont alléliques.

b Les restaurateurs sont épistatiques.

c Le coût est considéré constitutif quand le restaurateur altère l'expression de gènes mitochondriaux essentiels qui ne sont pas co-transcrit avec le gène de CMS. Il est silencieux quand le restaurateur n'a pas d'effet pleiotropique connus autre que de produire une protéine inutile quand il est silencieux.

d On suppose que le coût s'applique dans les tissus où le restaurateur est exprimé. Ainsi, *pollen* signifie que le restaurateur est exprimé seulement dans les tissus des anthères et *seed and pollen* que le restaurateur s'exprime plus largement dans la plante.

TABLE 2.4 – Caractéristiques des coûts de restauration chez les plantes cultivées, d'après Delph et al. (2007).

Chez les plantes sauvages, les gènes de restaurations sont inconnus et la détection des coûts nécessite de pouvoir différencier les hermaphrodites portant le restaurateur des hermaphrodites ne le portant pas. Il existe deux preuves directes (Bailey, 2002; de Haan et al., 1997a) et deux indirectes (Del Castillo and Trujillo, 2009; Dufay et al., 2008) de l'existence de coûts de restauration chez des espèces gynodioïques sauvages. Dans les deux premières études, la nature des CMS et des restaurateurs des individus étudiés a été établie grâce à des croisements préalables tandis que les deux autres études ont utilisé des approches corrélatives. Les quatre études démontrent l'existence d'un coût silencieux, s'exerçant sur la production de graines (de Haan et al., 1997a; Del Castillo and Trujillo, 2009) ou sur la qualité du pollen (Bailey, 2002; Dufay et al., 2008).

2.2.2 CMS et avantage femelle

Pour expliquer le maintien du polymorphisme, beaucoup de modèles ont introduit des coûts de restauration et une structure spatiale de population (cf. sections 2.2.1 et 2.2.3) mais, à ma connaissance, il n'existe qu'un seul modèle ayant intégré un coût de la CMS. Dans ce modèle, Dufay et al. (2007) supposent que le cytoplasme mâle-stérile impose un coût sur la fitness femelle de tous les individus qui la portent, quel que soit leur phénotype. Ce coût a donc pour effet de diminuer un peu l'avantage femelle, mais surtout de pénaliser les hermaphrodites restaurés (qui portent la CMS) par rapport aux hermaphrodites non restaurés (qui ne la portent pas). De ce fait, le coût de la CMS a un effet équivalent sur la dynamique du modèle qu'un coût de restauration exprimé sur les ovules (cf. section 2.2.1) : il permet à la CMS d'être positivement sélectionnée quand le restaurateur est rare et contre-sélectionnée quand le restaurateur est en forte fréquence. Grâce à cette sélection fréquence-dépendante, le polymorphisme au locus CMS peut être maintenu.

L'existence d'un coût de la CMS implique que la fitness femelle varie en fonction de l'haplotype mitochondrial, ce qui a été démontré chez *Plantago lanceolata* (van Damme, 1984) et *Silene vulgaris* (McCauley and Olson, 2003). Cependant, démontrer formellement l'existence du coût de la CMS demanderait de pouvoir discriminer les hermaphrodites non restaurés des hermaphrodites restaurés afin de pouvoir comparer leurs fitness. De plus, par cette méthode, un coût de la CMS resterait indistinguable d'un coût de restauration exprimé sur les ovules.

Nous avons vu en introduction que l'avantage femelle s était la clé de l'évolution de la CMS, celle-ci ne pouvant envahir que lorsque $s > 0$, c'est à dire lorsque les femelles font plus de graines que les hermaphrodites ($1 + s$ vs. 1). Cette invasion est d'autant plus rapide que s est grand. Il faut cependant noter qu'une valeur de s trop importante peut empêcher le maintien du polymorphisme cytonucléaire. C'est le cas dans les modèles qui incluent un cytoplasme mâle-fertile et un cytoplasme mâle-stérile. Dufay et al. (2007) ont montré par simulations que, même lorsque les coûts de restauration étaient adéquats, il était impossible de maintenir une gynodioécie cytonucléaire lorsque $s > 1$, la CMS se fixant toujours. Jacobs and Wade (2003)

ont confirmé ce résultat analytiquement en démontrant que le polymorphisme au locus CMS ne pouvait être maintenu que si $k > s$, s étant l'avantage femelle et k un coût de restauration exprimé sur les ovules. k étant inférieur à 1 par définition, la condition ne peut pas être vérifiée si $s > 1$. Au contraire, dans les modèles incluant deux cytoplasmes mâle-stériles, $1 + s > 1$ semble être l'unique condition sur s pour le maintien du polymorphisme cytonucléaire. Bailey et al. (2003) se sont limités aux valeurs de $1 + s$ comprises entre 1 et 2, mais Gouyon et al. (1991) ont montré que toutes les valeurs de 1 à 5 étaient compatibles avec la gynodioécie cytonucléaire.

L'avantage femelle a pu être démontré expérimentalement chez un grand nombre d'espèces gynodioïques (synthétisé par Shykoff et al., 2003). Les estimations de $1 + s$ sont généralement comprises entre 1 et 2 (p. ex. Agren and Willson, 1991; Asikainen and Mutikainen, 2003; Lafuma and Maurice, 2006; Olson et al., 2006; Poot, 1997), et peuvent parfois dépasser 3 (Morris and Doak, 1998; Ramsey et al., 2006; Thompson and Tarayre, 2000). Cependant, peu d'études ont pris en compte toutes les composantes de la fitness femelle (le taux de fructification, le nombre de graines par fruit, le taux de germination, la survie précoce, etc.). D'autre part, le régime de reproduction (allofécondation vs. autofécondation) et la structure génétique de la population ne sont pas toujours pris en compte, en particulier quand les mesures ont lieu en populations artificielles, et sont pourtant susceptibles de modifier la valeur de l'avantage femelle de manière importante (Ramsey et al., 2006). Enfin, les conditions environnementales peuvent également modifier l'avantage femelle (p. ex. l'humidité, voir Barr, 2004). Au contraire, chez d'autres espèces, il n'a pas été possible de déterminer un avantage femelle (p. ex. chez *Beta vulgaris* spp. *maritima*, voir Boutin et al., 1988 ou chez *Daphne laureola*, voir Alonso and Herrera, 2001). Il est probable que, chez ces espèces, l'avantage soit trop faible pour être détecté expérimentalement mais suffise pour que la CMS soit sélectionnée.

J'ai pu identifier un avantage femelle chez *Silene nutans*. Cet aspect sera traité dans l'ARTICLE 2 (p.78).

2.2.3 Influence de la structure géographique sur l'évolution de la gynodioécie

Les modèles présentés ci-dessus négligent les effets de la structuration spatiale des populations. Or, chez les espèces gynodioïques, cette hypothèse semble rarement être vérifiée, et il a été montré que les populations naturelles montraient une hétérogénéité spatiale génotypique et phénotypique (proportion de femelles). Cette structuration peut être observée entre les populations ou à l'intérieur des populations mais la première a fait l'objet de la majorité des études. On résumera ici les structures observées, leurs causes et leurs conséquences sur l'évolution de la gynodioécie.

2.2.3.1 Différentiation entre populations : causes et conséquences

Très souvent, il a été observé que la proportion de femelles variait grandement entre les populations (Bailey and Delph, 2007a), reflétant une variation spatiale dans

les fréquences d'un ou plusieurs gènes impliqués dans le phénotype sexuel. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces variations entre populations.

Tout d'abord, les variations peuvent être dues à la dérive (c.-à-d. au hasard), en particulier dans les petites populations ou chez les espèces sujettes à des dynamiques de type extinction/recolonisation (p. ex. chez le thym, Manicacci et al., 1996). Chez ces dernières, l'installation d'une nouvelle population peut se faire grâce à quelques graines seulement et l'on attend un fort effet fondateur, particulièrement pour le cytoplasme, qui ne bénéficie pas des flux de pollen potentiels et du brassage de gènes qui en résulte. On observe d'ailleurs généralement une forte structuration des génomes cytoplasmiques par rapport aux génomes nucléaires (Petit et al., 2005). Ensuite, de nombreux modèles de gynodioécie montrent que les fréquences des gènes de CMS et des restaurateurs sont soumises à des oscillations. Ces oscillations peuvent être progressivement amorties (cela peut prendre des centaines de générations), ou perdurer dans des cycles limites (p. ex. Dufay et al., 2007; Gouyon et al., 1991). Sous ces conditions, deux populations soumises aux mêmes conditions peuvent présenter des fréquences de femelles très différentes selon le moment du cycle ou des oscillations. Les données de Dufay et al. (2009) sur *Beta vulgaris* spp. *maritima* suggèrent sur les variations de sex-ratio observées entre 33 populations bretonnes (France) pourraient résulter de ces oscillations fréquence-dépendantes. Par ailleurs, le sex-ratio peut varier en réponse à la sélection naturelle si la fitness relative des femelles et des hermaphrodites varie entre les populations. Il a été démontré que certains facteurs (humidité, température, etc.) pouvaient influencer la valeur de l'avantage femelle (McCauley and Bailey, 2009, et références incluses) et que la variation de l'avantage femelle entre les populations pouvait expliquer, au moins en partie, la fréquence de femelles dans les populations (Nilsson and Agren, 2006). Enfin, il a été montré que l'allocation relative vers les fonctions mâles et femelles chez les hermaphrodites était un trait plastique, la fonction femelle étant en général délaissée dans les environnements difficiles. Cette plasticité est susceptible de modifier la fitness femelle des hermaphrodites par rapport à celle des femelles et ainsi l'évolution du sex-ratio (synthétisé par McCauley and Bailey, 2009).

La variation de sex-ratio entre populations a des conséquences importantes pour l'évolution de la gynodioécie, en particulier si les populations subissent une limitation pollinique. La structuration tend à augmenter la variation de sex-ratio entre les populations et à regrouper les femelles dans certaines populations, et les hermaphrodites dans d'autres. Les hermaphrodites ont donc tendance à donner leur pollen à d'autres hermaphrodites, au détriment de la pollinisation des femelles. Cet effet négatif sur la fréquence de femelles a été démontré théoriquement (McCauley and Taylor, 1997) et expérimentalement (McCauley et al., 2000). La structure peut également avoir des effets négatifs sur les hermaphrodites. À mesure que certaines populations deviennent biaisées en faveur des femelles, le pollen devient rare et les hermaphrodites tendent à s'autoféconder. On s'attend donc à ce que les descendants des hermaphrodites souffrent plus de la dépression de consanguinité lorsque les hermaphrodites sont rares. McCauley et al. (2000) ont validé cette hypothèse chez

Silene vulgaris en observant une corrélation négative entre le taux de germination des graines produites par les hermaphrodites et le sex-ratio des populations.

2.2.3.2 Structuration spatiale à petite échelle

Il a été montré chez quelques espèces gynodioïques que la structuration n'était pas seulement observable entre les populations, mais également au sein des populations. Chez *Silene vulgaris* et *Silene acaulis*, le génome mitochondrial montre une structuration à très petite échelle, de l'ordre du mètre (Klaas and Olson, 2006; Olson et al., 2006; Olson and McCauley, 2002; Storchova and Olson, 2004), mais qui n'est pas toujours associé à une structure spatiale des phénotypes sexuels (Klaas and Olson, 2006; Olson et al., 2006). Cette structuration est amenée à se conserver au cours des générations, la dispersion des graines se faisant sur de courtes distances (dispersion par gravité). De même, la structure des phénotypes a tendance à s'auto-entretenir, les femelles (resp. hermaphrodites) produisant des descendance biaisées en faveur des femelles (resp. des hermaphrodites). Une conséquence possible de la structuration à petite échelle est que les patches femelles ne reçoivent pas assez de pollen pour assurer la reproduction. Ainsi, il a été montré que la proportion d'individus hermaphrodites dans le voisinage était corrélée positivement à la fitness des femelles (De Cauwer et al., 2010; Graff, 1999; Olson et al., 2006) et parfois à celle des hermaphrodites (Graff, 1999).

2.2.4 Dynamiques évolutives de la gynodioécie et diversité du génome mitochondrial

On classe traditionnellement les dynamiques de gynodioécie en deux catégories pour lesquelles les attendus concernant la diversité du génome mitochondrial diffèrent. La première catégorie fait intervenir des invasions récurrentes de nouveaux gènes de CMS, avec des dynamiques de type endémique. La sélection positive sur le locus de stérilité entraînant tout le génome mitochondrial avec lui (pas de recombinaison), on s'attend dans ce cas à trouver une variabilité réduite dans le génome mitochondrial des espèces gynodioïques par rapport aux autres espèces. Au contraire, dans les autres modèles, les différentes CMS sont maintenues par fréquence-dépendance pendant des périodes de temps assez longues, qui permettent l'accumulation de mutations et la divergence progressive des lignées mitochondriales. On attend alors une diversité mitochondriale plus importante chez les espèces gynodioïques.

Depuis dix ans, de nombreuses études se sont intéressées à la variabilité mitochondriale des espèces gynodioïques afin de répondre à cette question et il existe des arguments expérimentaux en faveur des deux hypothèses. Städler and Delph (2002) ont les premiers montré que *Silene acaulis*, une espèce gynodioïque, présentait un polymorphisme mitochondrial très important. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études sur *Silene vulgaris*, une autre espèce gynodioïque du genre (Houliston and Olson, 2006; Storchova and Olson, 2004) et des signatures de sélection

fréquence-dépendance ont été détectées sur deux gènes mitochondriaux (Houliston and Olson, 2006). Plus récemment, Touzet and Delph (2009) ont comparé la diversité mitochondriale aux loci *cob* et *cox1* entre trois espèces gynodioïques et sept espèces non-gynodioïques du genre *Silene* et ont montré que la diversité chez les espèces gynodioïques était très supérieure, conformément aux attendus de la sélection fréquence-dépendance. Cependant, en étudiant la diversité chloroplastique⁴, Ingvarsson and Taylor (2002) ont montré que le génome de *Silene vulgaris* n'était pas plus polymorphe que celui qu'une espèce dioïque proche (*Silene latifolia*), et présentait au contraire des preuves de sélection purifiante.

Des publications récentes ont mis l'accent sur la prudence avec laquelle ces résultats devaient être interprétés. En effet, les études citées plus haut supposent que le taux de mutation est identique dans les différentes lignées et que les différences observées ne résultent que de l'effet de la sélection. Or, l'étude de la divergence de séquences non codantes montre que le taux de mutation n'est pas constant, ni entre gènes (Barr et al., 2007), ni entre espèces (Mower et al., 2007; Sloan et al., 2008). La relation entre divergence génotypique et sélection pourrait être plus compliquée que prévu (voir aussi Charlesworth, 2010).

2.3 Déterminisme génétique de la gynodioécie

Des études théoriques il ressort que le déterminisme génétique du sexe (composante cytoplasmique et/ou nucléaire, nombre de gènes de CMS, nombre et caractéristiques des restaurateurs) a une forte influence sur les dynamiques d'évolution de la gynodioécie et les états d'équilibre. Connaître le déterminisme génétique du sexe est donc indispensable pour comprendre l'évolution de la gynodioécie.

Dans cette section, nous décrirons les méthodes utilisées pour déterminer si le déterminisme du sexe est cytonucléaire et combien de CMS et de restaurateurs sont impliqués. Puis nous résumerons l'état des connaissances chez les espèces gynodioïques sauvages, avant de décrire les résultats de mes travaux de thèse chez *Silene nutans*.

2.3.1 Les méthodes de l'exploration du déterminisme génétique

2.3.1.1 Déterminer une composante cytoplasmique du déterminisme sexuel et le nombre de cytoplasmes stérilisants

Chez certaines espèces, les individus mâle-stériles présentent des différences morphologiques dans le niveau d'avortement des anthères, leurs couleurs, etc., qui suggèrent une différence dans la nature des gènes de stérilité mâle cytoplasmique (p. ex. chez *Silene vulgaris*, voir Charlesworth and Laporte, 1998, et chez *Plantago lanceolata*, voir de Haan et al., 1997c). Malheureusement, la morphologie n'est pas toujours représentative de la CMS portée, plusieurs CMS pouvant exprimer un même phénotype et plusieurs phénotypes pouvant exister pour une même CMS et le phénotype

4. La diversité chloroplastique est liée à la diversité mitochondriale, ces deux génomes cytoplasmiques étant hérités maternellement.

est donc insuffisant pour distinguer les CMS. Deux méthodes ont été développées pour démontrer le rôle d'une composante cytoplasmique dans le déterminisme du sexe et déterminer le nombre de cytoplasmes mâle-stériles présents. Toutes deux sont basées sur l'hérédité maternelle qui caractérise les gènes cytoplasmiques⁵.

La première méthode, la plus couramment utilisée, fait appel à la réalisation de croisements réciproques, c'est-à-dire des croisements dans lesquels les deux parents sont alternativement utilisés en tant que mère ou père du croisement (les parents doivent être hermaphrodites). Une différence entre les descendance des croisements réciproques dans la ségrégation des phénotypes sexuels indique que les deux cytoplasmes portent des CMS différentes. En effet, les descendants des deux croisements possèdent, en moyenne, le même génome nucléaire, mais les descendants d'un croisement possèdent le cytoplasme d'un des parents et les descendants de l'autre croisement le cytoplasme de l'autre parent. Ainsi, si le sex-ratio diffère, c'est que les deux cytoplasmes se sont pas restaurés identiquement par ce fond nucléaire c'est-à-dire que les cytoplasmes sont différents et restaurés par des restaurateurs différents (cf. TABLE 2.5, en haut). Dans le cas contraire, si l'on observe pas de différence de ségrégation entre les croisements réciproques, cette méthode ne permet pas de conclure car deux CMS différentes peuvent donner des ségrégations identiques dans les croisements réciproques (en particulier si les restaurateurs sont distribués de façon « symétrique » entre les parents, cf. TABLE 2.5, en bas). Afin de s'affranchir des effets maternels, van Damme et al. (2004) conseillent de vérifier les résultats en refaisant les croisements à partir de parents issus de la F1, ou en répliquant les croisements en utilisant des frères des parents.

La deuxième méthode est moins utilisée car elle nécessite de faire des croisements sur plusieurs générations. La méthode est basée sur la réalisation de backcross répétés : on croise un individu mère mâle-stérile avec un individu père hermaphrodite, puis on croise les individus mâle-stérile de la F1 avec le père, puis les individus mâle-stérile de la F2 avec le père, etc. (cf. FIGURE 2.2). Tous les descendants (F1, F2, etc.) portent donc le génome mitochondrial de la mère, mais au fur et à mesure des croisements, leur génome nucléaire (un mélange des deux parents initiaux) devient de plus en plus proche de celui du père. Si l'on répète les croisements assez longtemps, on obtient des individus portant le cytoplasme de la mère et le génome nucléaire du père. Le père étant hermaphrodite, il possède les restaurateurs capables de restaurer son propre cytoplasme. Si le père porte le même cytoplasme que la mère, la proportion d'individus restaurés (hermaphrodites) devra donc augmenter au cours des générations. S'il porte un cytoplasme différent de celui de la mère, la proportion d'individus restaurés restera identique ou augmentera selon que le père porte ou non les restaurateurs capables de restaurer le cytoplasme maternel. Une augmentation du nombre d'individus restaurés ne permettra donc pas de conclure. En revanche, si au bout de plusieurs générations, la proportion d'individus restaurés

5. On considère d'ailleurs souvent, par raccourci, que les composantes cytoplasmiques sont mitochondriales, mais ces méthodes ne démontrent en fait pas si la composante est chloroplastique ou mitochondriale.

Mère/Père	Parent 1 $CMS_1 R_1r_1 r_2r_2$	Parent 2 $CMS_2 R_2R_2 r_1r_1$
Parent 1 $CMS_1 R_1r_1 r_2r_2$		50% $CMS_1 R_1r_1 R_2r_2$ H 50% $CMS_1 r_1r_1 R_2r_2$ F
Parent 2 $CMS_2 R_2R_2 r_1r_1$	50% $CMS_2 R_2r_2 R_1r_1$ H 50% $CMS_2 R_2r_2 r_1r_1$ H	

Mère/Père	Parent 1 $CMS_1 R_1r_1 r_2r_2$	Parent 2 $CMS_2 R_2r_2 r_1r_1$
Parent 1 $CMS_1 R_1r_1 r_2r_2$		25% $CMS_1 R_1r_1 R_2r_2$ H 25% $CMS_1 R_1r_1 r_2r_2$ H 25% $CMS_1 r_1r_1 R_2r_2$ F 25% $CMS_1 r_1r_1 r_2r_2$ F
Parent 2 $CMS_2 R_2r_2 r_1r_1$	25% $CMS_2 R_2r_2 R_1r_1$ H 25% $CMS_2 R_2r_2 r_1r_1$ H 25% $CMS_2 r_2r_2 R_1r_1$ F 25% $CMS_2 r_2r_2 r_1r_1$ F	

TABLE 2.5 – Exemples de croisements réciproques où les parents portent deux cytoplasmes différents (CMS_2 ou CMS_1), restaurés chacun par un locus de restauration spécifique où le restaurateur (R_1 ou R_2) est dominant. **En haut** : On observe une différence de ségrégation des phénotypes sexuels entre les deux croisements et on peut en déduire que les deux cytoplasmes sont différents. **En bas** : On n’observe pas de différence de ségrégation des phénotypes sexuels entre les deux croisements alors que les deux cytoplasmes sont différents. H : hermaphrodites ; F : femelles.

n’augmente pas, on pourra conclure que le père et la mère ne portaient pas la même CMS (Koelewijn and van Damme, 1995a).

2.3.1.2 Exploration du système de restauration

L’étude du nombre de restaurateurs associés à une CMS est plus complexe et plus spéculative que celle des CMS, le nombre de modèles génétiques de restauration à tester étant potentiellement infini. La TABLE 2.7 (p.48) donne les sex-ratios de ségrégation attendus dans la descendance (mâle-stérile:hermaphrodites) pour quelques modèles génétiques simples. Pour savoir combien de restaurateurs sont impliqués dans la restauration d’une CMS (celle des descendants, c’est-à-dire celle de la mère du croisement), on regarde si le sex-ratio observé dans la descendance est différent des sex-ratios théoriques sous les différents modèles génétiques. On choisit en général le modèle le plus simple dont les attendus sont compatibles avec les observations. Si on utilise un petit nombre de descendants, des modèles à peu de gènes permettront

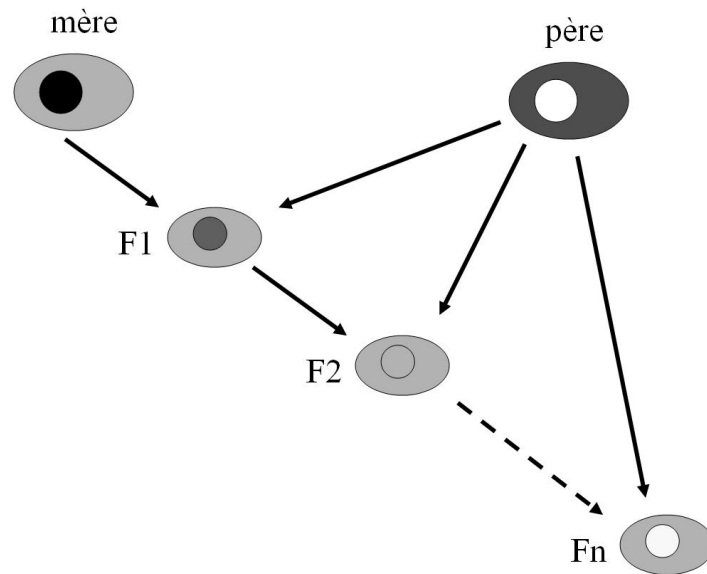


FIGURE 2.2 – Principe des backcross répétés. Le génome cytoplasmique de la mère est représenté en gris clair, celui du père en gris foncé, le génome nucléaire de la mère en noir, celui du père en blanc. Ce procédé revient à transférer le génome nucléaire paternel dans le génome cytoplasmique maternel.

souvent d'expliquer les données. Plus le nombre de descendants sera élevé, plus on pourra distinguer des sex-ratios précis et éventuellement éliminer des modèles à peu de gènes au profit de modèles plus complexes. Il est important de noter que ces modèles ne considèrent que les locus de restauration impliqués dans la restauration du cytoplasme maternel et que les éventuels autres restaurateurs ne sont envisagées (ils ne sont pas représentés dans la TABLE 2.7). Il est donc possible que le père ne porte pas les bons allèles pour restaurer le cytoplasme d'intérêt (celui de la mère), mais possède les restaurateurs adéquats pour restaurer son propre cytoplasme.

2.3.2 Déterminisme génétique du sexe chez les espèces gynodioïques sauvages

On considère généralement que la majorité des espèces gynodioïques a un déterminisme du sexe cytonucléaire. Pourtant, les preuves de ce déterminisme n'ont été apportées que chez une poignée d'espèces sauvages. Les principaux résultats obtenus ont été résumés dans la TABLE 2.6. On note que le plus souvent, deux à trois CMS différentes ont été détectées, allant jusqu'à quatre pour des études très exhaustives réalisées chez *Plantago*. Certaines études ont relevé la coexistence de plusieurs CMS au sein d'une même population, soutenant l'hypothèse de dynamiques fréquence-dépendantes entre les CMS. Des restaurateurs récessifs et dominants semblent être impliqués dans la restauration, avec un léger biais en faveur de ces derniers, et des relations d'épistasie entre les restaurateurs sont souvent invoquées pour expliquer

Espèce	CMS	Restaurateurs	Réfs
<i>Plantago lanceolata</i>	4 CMS (dont 3 dans la même population)	1 à 3 loci de restauration par CMS ; restaurateurs dominants et récessifs ; épistasie	1,2
<i>Plantago coronopus</i>	4 CMS (dont 3 dans la même population)	2 à 5 loci de restauration par CMS ; restaurateurs dominants (majoritaires) et récessifs ; épistasie ; restauration quantitative possible	3,4,5,6
<i>Silene vulgaris</i>	2 ou 3 CMS (dans la même population)	au moins 2 restaurateurs dominants épistatiques et un restaurateur récessif indépendant ; restauration quantitative possible	6,7
<i>Thymus vulgaris</i>	3 CMS	au moins 2 restaurateurs récessifs et un dominant ; épistasie ; restauration quantitative possible	6,7,8
<i>Origanum vulgare</i>	2 CMS		9
<i>Beta vulgaris</i> spp <i>maritima</i>	3 CMS	au moins 2 restaurateurs épistatiques	10,11
<i>Lobelia siphilitica</i>	2 CMS	une CMS restaurée par un restaurateur dominant ; restauration complexe de la 2 ^e CMS	12

TABLE 2.6 – CMS et systèmes de restauration chez les espèces gynodioïques sauvages. Références : 1. de Haan et al. (1997c) ; 2. de Haan et al. (1997b) ; 3. van Damme et al. (2004) ; 4. Koelewijn and van Damme (1995a) ; 5. Koelewijn and van Damme (1995b) ; 6. Ehlers et al. (2005) ; 7. Charlesworth and Laporte (1998) ; 8. Belhassen et al. (1991) ; 9. Kheyr-Pour (1981) ; 10. Cuguen et al. (1994) ; 11. Touzet et al. (2004) ; 12. Dudle et al. (2001).

les sex-ratios de ségrégation obtenus dans les croisements. Il a également été montré qu'une restauration quantitative, assurée par de nombreux gènes à faibles effets, pouvait expliquer les sex-ratios obtenus chez *Plantago coronopus*, *Thymus vulgaris* et *Silene vulgaris* (Ehlers et al., 2005). Ces observations révèlent quelques lacunes des travaux théoriques, en particulier concernant l'évolution de restaurateurs épistatiques et de la restauration quantitative, même si cette dernière a récemment fait l'objet d'une publication (Bailey and Delph, 2007b).

Durant ma thèse, j'ai étudié le déterminisme génétique du sexe chez *Silene nutans*. Les résultats sont présentés dans l'ARTICLE 1 (cf. p.50).

number of loci	relation between loci	dominance	Expected sex segregation (female:hermaphrodite)							
one locus	-	dominant	0:1	1:3	1:1					
	-	$R/R \times -/-$		$R/+ \times R/+$	$R/+ \times +/+$					
	-	recessive	0:1	1:1	1:0					
		$r/r \times r/r$		$r/r \times r/+$	$r/r \times +/+$					
independent	one dominant and one recessive	both dominant	0:1	1:7	3:13	1:3	3:5	1:1	1:0	
		$R1/R1 \ -/- \times -/- \ -/-$ or $-/- \ R2/R2 \times -/- \ -/-$		$R1/+ \ R2/+ \times R1/+ \ R2/+$	$R1/+ \ R2/+ \times R1/+ \ R2/+$	$R1/+ \ +/+ \times R1/+ \ -/-$ or $R1/+ \ R2/+ \times +/+ \ R2/+$ or $R1/+ \ +/+ \times +/+ \ R2/+$ or $R1/+ \ R2/+ \times +/+ \ +/+$	$R1/+ \ +/+ \times +/+ \ -/-$ or $R1/+ \ -/- \times +/+ \ +/+$ or $+/+ \ R2/+ \times +/+ \ R2/+$	$R1/+ \ +/+ \times +/+ \ -/-$ or $+/+ \ R2/+ \times +/+ \ +/+$	$R1/+ \ -/- \times +/+ \ +/+$ or $+/+ \ R2/+ \times +/+ \ +/+$	
		both recessive	0:1	1:3	3:5	1:1	3:1	1:0		
two loci	both dominant	$r1/r1 \ -/- \times r1/r1 \ -/-$ or $-/- \ r2/r2 \times -/- \ r2/r2$		$r1/r1 \ r2/r2 \times r1/+ \ r2/+$ or $r1/r1 \ r2/+ \times r1/+ \ r2/r2$	$r1/+ \ r2/+ \times r1/r1 \ r2/+$ or $r1/+ \ r2/+ \times r1/+ \ r2/r2$	$-/- \ r2/+ \times +/+ \ r2/r2$ or $+/+ \ r2/+ \times -/- \ r2/r2$ or $r1/r1 \ -/- \times r1/r1 \ +/+$ or $r1/+ \ +/+ \times r1/r1 \ -/-$	$r1/r1 \ r2/+ \times +/+ \ r2/+$ or $r1/+ \ r2/r2 \times r1/+ \ +/+$	$r1/r1 \ -/- \times +/+ \ -/-$ or $+/+ \ r2/r2 \times -/- \ +/+$ or $-/- \ r2/r2 \times +/+ \ +/+$		
		both dominant	0:1	1:3	7:9	1:1	5:3	3:1	3:1	
		$R1/R1 \ R2/R2 \times -/- \ -/-$ or $R1/R1 \ R2/+ \times -/- \ R2/R2$ or $R1/+ \ R2/R2 \times R1/R1 \ -/-$		$R1/R1 \ R2/+ \times -/- \ R2/+$ or $R1/+ \ R2/+ \times R1/+ \ R2/+$	$R1/+ \ R2/+ \times R1/- \ r2/+$ or $R1/+ \ R2/+ \times R1/+ \ r2/r2$	$R1/- \ R2/+ \times R1/R1 \ +/+$ or $-/- \ +/+ \times R1/R1 \ R2/+$ or $R1/+ \ R2/+ \times +/+ \ -/-$ or $R1/+ \ R2/+ \times R1/+ \ +/+$	$R1/+ \ R2/+ \times +/+ \ R2/+$	$R1/+ \ R2/+ \times +/+ \ +/+$		
with epistasy	one dominant and one recessive	both dominant	0:1	1:3	1:1	5:3	3:1	1:0		
		$R1/R1 \ r2/r2 \times -/- \ r2/r2$		$R1/+ \ r2/r2 \times R1/+ \ r2/r2$	$R1/R1 \ r2/r2 \times -/- \ r2/+$ or $+/+ \ r2/r2 \times R1/+ \ r2/r2$ or $R1/R1 \ r2/+ \times R1/- \ r2/r2$	$R1/+ \ r2/r2 \times R1/+ \ r2/+$	$R1/+ \ r2/r2 \times +/+ \ r2/+$	$R1/- \ r2/r2 \times -/- \ +/+$		
		both recessive	0:1	1:1	3:1	1:0				
		$r1/r1 \ r2/r2 \times r1/r1 \ r2/r2$		$r1/r1 \ r2/r2 \times r1/+ \ r2/+$	$r1/r1 \ r2/r2 \times r1/+ \ r2/+$	$r1/r1 \ r2/r2 \times +/+ \ -/-$ or $r1/r1 \ r2/r2 \times -/- \ +/+$				

TABLE 2.7 – Modèles génétiques de restauration et sex-ratios attendus. Les sex-ratios attendus dans la descendance (femelle : hermaphrodite) et les génotypes des parents pouvant donner ces sex-ratios sont présentés pour plusieurs modèles de restauration, incluant un à deux restaurateurs, avec des relations de dominance et d'épistasie différentes. Si les deux restaurateurs sont indépendants, alors un locus suffit à restaurer la CMS. Au contraire, s'ils sont épistatiques, la restauration aux deux locus est indispensable pour exprimer le phénotype restauré. Les cas en gras sont des croisements dans lesquels un des parents n'est pas restauré par les restaurateurs considérés ici. Ce parent n'est pas forcément femelle et peut être hermaphrodite s'il possède un autre cytoplasme que celui restauré par les restaurateurs d'intérêt. « - » signifie que cet allèle n'a pas d'importance.

ARTICLE 1

Genetic determination of male sterility in gynodioecious *Silene nutans*

CLAIRE GARRAUD, BENJAMIN BRACHI, MATHILDE DUFAY, PASCAL
TOUZET ET JACQUI SHYKOFF

(Heredity, 2011, 106, p.757-764)

Abstract

Gynodioecy, the coexistence of female and hermaphrodite plants within a species, is often under nuclear–cytoplasmic sex determination, involving cytoplasmic male sterility (CMS) genes and nuclear restorers. A good knowledge of CMS and restorer polymorphism is essential for understanding the evolution and maintenance of gynodioecy, but reciprocal crossing studies remain scarce. Although mitochondrial diversity has been studied in a few gynodioecious species, the relationship between mitotype diversity and CMS status is poorly known. From a French sample of *Silene nutans*, a gynodioecious species whose sex determination remains unknown, we chose the four most divergent mitotypes that we had sampled at the cytochrome b gene and tested by reciprocal crosses whether they carry distinct CMS genes. We show that gynodioecy in *S. nutans* is under nuclear–cytoplasmic control, with at least two different CMSs and up to four restorers with epistatic interactions. Female occurrence and frequency were highly dependent on the mitotype, suggesting that the level of restoration varies greatly among CMSs. Two of the mitotypes, which have broad geographic distributions, represent different CMSs and are very unequally restored. We discuss the dynamics of gynodioecy at the large-scale meta-population level.

Keywords : cytoplasmic male sterility; reciprocal crosses; gynodioecy; gynomonoecey; restorer genes.

Introduction

Gynodioecy, the coexistence of hermaphrodite and female plants in natural populations, is one of the most common plant-breeding systems after hermaphroditism (Richards, 1997). Male sterility is often under nuclear–cytoplasmic control (Charlesworth and Laporte, 1998; Taylor et al., 2001; van Damme et al., 2004) although purely nuclear determination exists (for example Ashman, 1999). Cytoplasmic male sterility (CMS) genes in the mitochondrial genome cause male sterility and nuclear restorer genes block their action and restore male fertility (Chase, 2007). As mitochondrial genes are usually maternally inherited, a CMS gene that confers female advantage will invade the population (Lewis, 1941). This female advantage can result from reallocation of the energy not used in pollen production and/or avoidance of inbreeding depression and both have experimental support (Poot, 1997; Shykoff et al., 2003). As CMS invades the population, any nuclear mutation that restores male fertility will be associated with the rare gamete type (that is, pollen) and is selected by the Fisherian selection (Jacobs and Wade, 2003). The molecular mechanisms of male sterility and restoration, as well as the nature of CMS and restorer genes, have been documented in some crops (Delph et al., 2007), but CMS and restorer genes remain unknown in wild species.

The equilibrium state and dynamics of gynodioecy depend on the genetics of sex determination. Nuclear gynodioecy can only be maintained if females produce at least twice as many seeds as hermaphrodites, whereas, under cyto-nuclear determination, male sterilizing cytoplasms are selected if females have any seed production advantage over hermaphrodites (Lewis, 1941). Conditions that can give rise to stable sex polymorphism within populations have been explored in detail under nuclear–cytoplasmic sex determination and two types of situations can be distinguished. Frank (1989) found transient polymorphisms due to regular invasions of new sterilizing cytoplasms that then go to fixation, and such dynamics can lead to polymorphism at the metapopulation level (Couvét et al., 1998). On the other hand, cytoplasmic polymorphisms can be maintained over long periods by frequency-dependent selection (Bailey et al., 2003; Dufay et al., 2007; Gouyon et al., 1991), resulting in the coexistence of several different cytoplasmic types in each population. The conditions for polymorphism differ between models with two sterilizing cytoplasms (Bailey et al., 2003; Gouyon et al., 1991), and models with one sterilizing and one fertile cytoplasm (Dufay et al., 2007; Jacobs and Wade, 2003). Characteristics of restorers, such as dominance (Jacobs and Wade, 2003), cost of restoration (Bailey et al., 2003; Dufay et al., 2007) and number of loci (quantitative vs qualitative restoration, see Bailey and Delph, 2007b) are also important. Thus, studying the genetic basis of sex determination is essential for understanding the evolution and maintenance of gynodioecy.

Considerable mtDNA polymorphism has been found in gynodioecious *Silene* species (Houlston and Olson, 2006; Olson et al., 2006; Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009), but the associations between mitotypes and sex phenotypes are

not perfect (Klaas and Olson, 2006; Olson and McCauley, 2002; Storchova and Olson, 2004) and crosses are necessary to determine the number of functionally distinct CMS types. In the gynodioecious species *Silene nutans*, nuclear–cytoplasmic sex determination is suspected. Genotyping studies found high polymorphism in the cytochrome b (*cob*) and the cytochrome oxidase (*cox1*) mitochondrial genes (Touzet and Delph, 2009) that could be related to CMS types. We set up a crossing experiment to assess this and to answer the following questions :

- i Is sex determination nuclear–cytoplasmic in *S. nutans* ?
- ii How many CMS types and restorers are involved in sex determination ?

Materials and methods

Plant material

S. nutans (Caryophyllaceae) is a diploid, long-lived perennial rosette plant, growing in non-acidic open grass communities on hills or forest edges. Its range extends from North-Western Europe to Siberia and the Caucasus. It has been described as gynomonoecious–gynodioecious : female, hermaphroditic and gynomonoecious individuals (with a mixture of perfect (hermaphroditic) and pistillate (female) flowers) are found in natural populations (Dufay et al., 2010). Perfect flowers are protandrous, but self-pollination can occur by geitonogamy. Seeds are dispersed over a short distance from an aperture at the top of the ripe capsule when the stalk is agitated by wind or animals.

Previous studies showed that the mitochondrial genes *cob* and *cox1*, but particularly the former, are highly polymorphic in *S. nutans* (Touzet and Delph, 2009). These two genes are involved in the respiratory chain and probably not directly in male sterility. For our crossing experiment, we chose four divergent sequences at the *cob* locus in an attempt to encompass the maximal variation in CMS types. Three of them were chosen from a previous study (Touzet and Delph, 2009) to be as distant as possible from one another in the haplotype tree. The last one was a divergent sequence from additional sampling from a survey of 13 populations across Belgium and France. All information about the sequences we used is available in Supplementary Table 1. We refer to these four sequences as mitotypes, even if linkage disequilibrium could be incomplete between the *cob* and the CMS loci. One mitotype (AMB) was collected in Ambleteuse (N 50°48' E 1°37'), another (AU) in Auvergne (N 44°43' E 2°21'), and the two others (Q1 and Q9) in Queyras (N 44°46' E 6°44'). The two mitotypes from Queyras were specific to this population, whereas the two others (AMB and AU) were found in several French populations. The Ambleteuse population is located about 700 km from the two other populations. The Auvergne and Queyras populations are 350 km apart. Rosette plants were transplanted from the Ambleteuse population to the greenhouse in March 2006 and used as parents in 2007 (TABLE 2.8). In Auvergne and Queyras, seeds were harvested from open-pollinated plants in 2002 and 2003, respectively, and sown in autumn 2006, giving rise to in-

dependent maternal full- or half-sibling families. TABLE 2.8 shows the identity of parents used for reciprocal crosses and their verified *cob* genotype. The Queyras population presented intrapopulation mtDNA polymorphism, so we used two different mitotypes (Q1 and Q9) to test for the coexistence of different CMS factors within this population.

Population	GPS coordinates		Origin of parents	Parents	Mitotype of parents
	North	East			
Ambleteuse	50°48'	1°37'	Field-collected plants	AMB 5, AMB 9, AMB 13	AMB
Auvergne	44°43'	2°21'	Maternal descent of two plants	AU4.4, AU3.16, AU3.22	AU
Queyras	44°46'	6°44'	Maternal descent of one plant	Q1.2, Q1.1, Q1.7	Q1
			Maternal descent of one plant	Q9.8, Q9.5, Q9.11	Q9

TABLE 2.8 – Origin of plants used as parents in the crossing experiment. Parents were either directly field collected, or grown from seeds collected from open-pollinated plants. Plants were named by their population of origin, a first number identifying the field-collected plant or the mother of the maternal line, and, when necessary, a progeny number in maternal lines. Thus, AMB5, AMB9 and AMB13 are *a priori* unrelated field-collected plants. Q1.2, Q1.1 and Q1.7 are half- or full-siblings of the same maternal line, as are Q9.8, Q9.5 and Q9.11 from a different maternal line from the same population. Similarly, AU4.4 is from a different maternal line than AU3.16 and AU3.22.

Crossing procedure

A difference in sex segregation of progenies from reciprocal crosses means that the two mitotypes tested have distinct CMS types with different specific restorers. CMS types that are poorly restored maximize the probability to find sex segregation differences between reciprocal crosses and are easiest to distinguish. On the other hand, a lack of difference in sex segregation between progenies of reciprocal crosses is ambiguous, because reciprocal crosses between two different CMS types could still lead to similar sex segregation if there is some symmetry in the restorer genotypes of the two parents (van Damme et al., 2004). A complete diallele design was set up, in which each pairwise comparison between our four mitotypes was tested in reciprocal crosses between hermaphrodites (12 crosses). This diallele was replicated three times, using three different parents of each mitotype (TABLE 2.8). These replicates increase the power for detecting the different CMSs and limit the risk of misinterpretation owing to the potential maternal effects (van Damme et al., 2004). A total of 36 (12x3) crosses were performed.

Each cross was performed on a single flower. Buds were isolated to avoid accidental pollination. A removable mesh cover allowed access to the flower for pollination and seed harvesting. As *S. nutans* is selfcompatible, flowers were emasculated by cutting the stamens as soon as they emerged from the corolla. Pollen was collected

just before pollination and placed on the receptive sticky stigma with a toothpick. Seeds were harvested at maturity. Within each of the three replicates, all crosses were performed within less than a week. Some crosses failed to produce fruits, and we obtained no seed for the following three crosses : AMB9 x Q1.2, AMB9 x AU4.4 and Q9.5 x Q1.1 (mother x father).

Growing conditions

Seeds were germinated in October 2007, in 9 cm diameter Petri dishes on 0.8% agar-containing medium. The germination rate was close to 100% for all crosses. Seedlings were transplanted 10 days later into multipots (4.5 cm diameter each) containing a soil mixture of $\frac{1}{2}$ compost and $\frac{1}{2}$ calcareous sand, and placed in the greenhouse with natural light and a daily temperature ranging between 15 and 20°C. In late February, plants were transplanted to individual pots (7 x 7 cm) filled with compost supplemented with a controlled release fertilizer (Osmocote, 110 g/10 l) and placed in a vernalization chamber, at 13°C for 1 week of acclimation and then at 6°C (day length 8h). Plants were planted in the experimental garden in mid-April. Flowering started in mid-May.

Offspring were sexed during the first two flowering seasons, in 2008 and 2009. One-third (339/1113) of the plants flowered in the first year and two-thirds (788/1113) in the second year. About 200 plants did not flower at all. In 2008, newly opened flowers on each plant were sexed every 4 or 5 days during the entire flowering season. The sex phenotype was quantified as the proportion of pistillate flowers. Most gynomonoecious plants were strongly hermaphrodite, bearing more than 80% perfect flowers (data not shown), but some few plants bore few perfect flowers with a majority of pistillate ones. In 2009, the large number of flowering plants made quantitative sex phenotype measurement impossible, so we used a discrete description of sex. Plants were assigned to the female (F), hermaphrodite (H) or gynomonoecious (GM) category by two to five observations during the flowering period. Therefore, in 2009, the number of gynomonoecious plants was underestimated. Indeed, in 2008, about one-third of the plants were found to be gynomonoecious. To take account of the difference in procedure between the 2 years, gynomonoecious plants with fewer than 10% or more than 90% pistillate flowers in 2008 were classified as hermaphrodites or females, respectively. Sex phenotypes, including proportion of pistillate flowers in gynomonoecious individuals, were mostly stable over the years (C. Garraud, unpublished data). Although 19 plants out of the 207 that flowered both the years changed their sex phenotype, all changes involved plants that were assigned to the gynomonoecious category during one of the two years and therefore represent a quantitative and not a qualitative change in sex. These plants were excluded from further analysis.

Genetic models for restoration

We generated expected segregation ratios for crosses between two restored hermaphrodite plants for all cases with one or two restorer loci. These are presented in Supplementary Table 2. We tested the segregation ratios from our crosses against these expected ratios. As different mitotypes may represent different CMSs, the number and nature of restorers were studied independently for each mitotype. Heterogeneity was tested with a G-test (1 degree of freedom) with Yates correction for continuity (Sokal and Rohlf, 1995). When several genetic models of restoration gave sex segregation ratios that differed non-significantly from offspring sex segregation ratios, we chose the model with fewer restorer genes. If several models with the same number of genes but different dominance or epistasis characteristics fit the data, we chose the one that minimized the total number of loci involved over all the crosses. When equivalent models predicted several ratios, none of which differed significantly from the observed ratio, the ratio with the best fit was selected. Restorer genotypes were attributed to the parents, taking into consideration that each parent was involved in different crosses, and the total number of restorer loci was calculated for each mitotype. Gynomonoecious plants were classified as females or hermaphrodites according to their proportion of pistillate flowers. The few gynomonoecious plants for which the proportion of pistillate flowers was close to 0.5 or was not estimated were classified alternatively as females or hermaphrodites and the segregation ratio was tested against different genetic models. For 7 out of 36 crosses, the chosen model depended on how gynomonoecious plants were classified. In those cases, the model that had fewer loci was chosen.

Results

Gynodioecy in *S. nutans* is under nuclear–cytoplasmic control. Reciprocal crosses differed in sex segregation of progenies (TABLE 2.9) ; therefore, cytoplasmic genes are involved in sex determination. Moreover, a nuclear component must also be involved because some hermaphrodite parents generated female offspring.

Sex phenotype segregation

A majority of hermaphrodites was observed in the progenies, with only 17% of females and 7% of gynomonoecious individuals. A few unexpected phenotypes were observed. In 2008, we found three males, one from the cross AU3.16 x Q9.5 and two from the cross Q9.8 x AMB9 (data not shown). Except for the aborted carpels, flower morphology was normal. These plants did not flower again in 2009. We also detected four fully sterile plants, with abnormally small petals and flowers that did not open, but normal vegetative growth. All were from cross AU3.22 x Q9.11, and the two of these that flowered the second year were again sterile. Cytonuclear incompatibilities could be responsible for these phenotypes. These plants were excluded from the following analyses.

Parent 1	Parent 2	Direct cross			Reciprocal cross			P-value
		F	H	GM	F	H	GM	
		Mitotype AU			Mitotype Q1			
AU4.4	Q1.2	1	27	0	0	10	0	1
AU3.16	Q1.1	0	5	0	0	21	0	1
AU3.22	Q1.7	3	18	5	0	29	4	0.096
		Mitotype AU			Mitotype Q9			
AU4.4	Q9.8	22	3	9	1	26	1	<1e-10
AU3.16	Q9.5	5	15	1	0	15	4	0.041
AU3.22	Q9.11	12	3	3	0	3	0	0.029
		Mitotype AU			Mitotype AMB			
AU4.4	AMB9	40	0	2	—	—	—	—
AU3.16	AMB13	36	1	1	0	32	0	<1e-16
AU3.22	AMB5	27	2	4	0	43	1	<1e-16
		Mitotype Q1			Mitotype Q9			
Q1.1	Q9.5	0	28	1	—	—	—	—
Q1.2	Q9.8	0	30	0	0	30	2	0.492
Q1.7	Q9.11	0	34	2	0	31	1	1
		Mitotype Q1			Mitotype AMB			
Q1.1	AMB13	0	30	0	2	31	3	0.122
Q1.2	AMB9	0	30	1	—	—	—	—
Q1.7	AMB5	0	26	2	0	14	1	1
		Mitotype Q9			Mitotype AMB			
Q9.8	AMB9	0	22	3	4	14	0	0.013
Q9.5	AMB13	0	29	0	0	28	0	1
Q9.11	AMB5	0	19	4	0	20	3	1

TABLE 2.9 – Sex segregation in progenies of direct and reciprocal crosses. Abbreviations : F, female ; GM, gynomonoecious ; H, hermaphrodite. Numbers of F, H and GM individuals are given in a single row for each cross and its reciprocal. In direct crosses, parent 1 was used as mother and parent 2 as father and conversely in reciprocal crosses. Crosses were performed between three representatives of each mitotype but three crosses failed, leaving only two replicates for three mitotype combinations. Heterogeneities between direct and reciprocal crosses were tested with Fisher tests. Significant probability P-values are indicated in boldface.

Cytoplasmic differences and reciprocal crosses

TABLE 2.9 presents the numbers of females (F), hermaphrodites (H) and gynomonoecious (GM) individuals segregating in each pair of reciprocal crosses. Differences in sex segregation between reciprocal crosses were tested by Fisher's exact tests. Our results show that the AU mitotype is clearly functionally distinct from Q9 and AMB (TABLE 2.9). Although Q1 cannot be distinguished from any other mitotype in our crosses, because almost no females segregate from crosses involving this mitotype as either mother or father, Q1 cannot be the same CMS as both AU and Q9. The Q1 parents (Q1.1, Q1.2 and Q1.7) must therefore carry all restorers needed to restore male sterility induced by the three other mitotypes. The AMB and Q9 mitotypes probably carry different CMS factors, because one of the three replicates showed sex segregation differences between reciprocal crosses. Indeed, it is not inconsistent to find significant heterogeneity between reciprocal progenies for some but not all replicates because two distinct CMSs can give similar sex segregation in reciprocal crosses. However, as this difference was no longer significant when gynomonoecious plants were grouped with hermaphrodites or females according to their proportion of pistillate flowers, this result must be interpreted carefully.

Female frequencies in our families depended on the cytoplasmic background (TABLE 2.10; $\chi^2 = 452$, degree of freedom=6, $p < 0.0001$). Very few females ap-

Mitotype	Number (proportions within rows) of		
	F	H	GM
AMB	6 (0.03)	182 (0.93)	8 (0.04)
AU	146 (0.60)	74 (0.30)	25 (0.10)
Q1	0 (0.00)	238 (0.96)	10 (0.04)
Q9	1 (0.01)	175 (0.91)	15 (0.08)

TABLE 2.10 – Total number of F, H and GM plants carrying each of the four mitotypes. Abbreviations : F, female ; GM, gynomonoecious ; H, hermaphrodite. Heterogeneity between mitotypes was tested by a chi-square test (6 degrees of freedom) and found to be significant ($P < 0.0001$).

peared in cytoplasms other than AU. No females were found on the Q1 background, which may represent a fertile or a very well restored cytoplasm. The sterilizing ability of the AMB mitotype was confirmed by field observation : seven females carrying this mitotype were found in different populations in France and Belgium (data not shown). Q9 must be sterilizing, even if very well restored, because we found one female, two gynomonoecious plants with a majority of pistillate flowers and a labile plant that shifted from female in 2008 to gynomonoecious in 2009 (data non shown) in our progenies carrying this mitotype. Gynomonoecious plants were found in all mitotypes.

Restoration of CMS types

Different levels of restoration can result from different numbers of restorer loci with different dominance and epistasis relationships. The genetic models, involving the fewest loci that give theoretical segregation ratios consistent with our observations, are listed for each cross in TABLE 2.11. Our results suggest at least two independent dominant restorers of the Q9 and AMB mitotypes (TABLE 2.11). As we obtained no females in the Q1 mitotype, any model of restoration can fit the data for this mitotype. Restoration of the AU mitotype is much more complex. Explaining a 7:1 ratio requires a genetic model with three epistatic loci that can be either recessive or dominant. Taking all progenies carrying the AU mitotype into account, four restorers are necessary to explain our results : one dominant independent locus, and three epistatic loci with at least one dominant and one recessive locus among them. Our estimates of the number of restorer loci are minimum because (i) we chose the fitted model with the fewest loci and not the model with the best fit ; (ii) our offspring sample size did not allow us to test very complex models ; and (iii) information on the segregation of gynomonoecious plants cannot be used, as the genetic basis of this sex phenotype remains unknown.

Discussion

Cytoplasmic types

We found at least two distinct CMS types that were involved in sex determination in *S. nutans*. Two to three CMSs have often been found to coexist at the species level (Belhassen et al., 1991; Charlesworth and Laporte, 1998; Delph et al., 2007; Dufay et al., 2009) and only extensive studies managed to collect genetic evidence for four distinct CMSs (de Haan et al., 1997c; van Damme et al., 2004). Indeed, demonstrating the differences between CMSs suffers from methodological limitations (see Materials and methods) that can explain why so few CMSs were found. Coexistence of different CMSs within populations has been shown, with two CMSs in *Silene vulgaris* (Charlesworth and Laporte, 1998) and three in *Plantago coronopus* and *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (Dufay et al., 2009; van Damme et al., 2004). Unfortunately, our crossing design did not permit us to test within-population polymorphism efficiently.

We showed that all cytoplasms but Q1 segregated females and were thus potentially sterilizing. However, this mitotype segregated one gynomonoecious individual with 85% pistillate flowers, demonstrating that suppression of male function occurs at the flower level. Nonetheless, we cannot rule out that other non-CMS mutations or environmental effects may have generated such a plant and the very small number of female plants we found for the Q9 mitotype. To date, fertile cytoplasms have been demonstrated mainly in gynodioecious crops (*Brassica napus*, *Zea mays* and *Beta vulgaris* ; reviewed in Delph et al., 2007) and in some wild species (Cuguen et al., 1994; de Haan et al., 1997c; Miyake et al., 2009), but are still unknown in the *Silene*

Mother	Father	Offspring		Heterogeneity			Genetic model for restoration
		F	H	Fitted ratio	G(1)	P-value	
Mitotype AMB							
AMB13	Q1.1	2	34	1:15	0.029	0.865569	2 dominant restorers without epistasy
AMB9	Q9.8	4	14	1:3	0	1	1 dominant restorer
Mitotype AU							
AU3.16	Q9.5	5	16	1:3	0.016	0.900	1 dominant restorer
AU3.16	AMB13	36	2	7:1	1.440	0.230	3 epistatic restorers (either recessive or dominant)
AU3.22	Q1.7	4	22	1:3	0.889	0.346	1 dominant restorer
AU3.22	AMB5	29	4	3:1	2.586	0.108	2 loci, either 2 recessive restorers with or without epistasy, either 1 recessive and 1 dominant or 2 dominant with epistasy
AU4.4	Q1.2	1	27	1:15	0.04	0.842	2 dominant restorers without epistasy
AU4.4	Q9.8	30	4	3:1	2.873	0.090	2 loci, either 2 recessive restorers with or without epistasy, either 1 recessive and 1 dominant or 2 dominant with epistasy
AU4.4	AMB9	42	0	1:0	0	1	1 recessive restorer
Mitotype Q9							
Q9.8	AU4.4	2	26	1:15	0.04	0.842	2 dominant restorers without epistasy

TABLE 2.11 – Offspring sex ratio and fitted genetic models for restoration. Abbreviations : F, female ; H, hermaphrodite. Fitted ratio is the expected ratio of females :hermaphrodites according to the genetic model. We chose the genetic model with the fewer genes over the several models having an expected ratio non-significantly different from the offspring ratio. Heterogeneity was tested with a G-test with Yates correction for continuity (1 degree of freedom). Gynomonoecious individuals were classified as females or hermaphrodites according to their majority sex ratio. Sex ratio of 0 :1 and 1 :1 can fit any genetic model. For this reason, crosses that present a sex ratio of 0 :1 or 1 :1 were not informative and are not represented here.

genus. Self-crosses would help us to determine whether Q1 is a fertile or a very well restored cytoplasm.

Restoration of CMS types

The different mitotypes that we found present great variation in restoration level, as has already been shown in *P. coronopus* (Koelewijn and van Damme, 1995b), and show different genetic systems of restoration. Multiple-restorer systems seem to be common in gynodioecious species, with up to five different restorers acting on the same CMS (Koelewijn and van Damme, 1995b), and quantitative restoration fits well to data on sex segregation in cross progenies of several species (Ehlers et al., 2005). Dominant restorers seem to be more frequent than recessive ones (reviewed in Delph et al., 2007) and benefit from an increased selective advantage because of a stronger association with the minority gamete (Jacobs and Wade, 2003). Epistatic interactions between restorers are often invoked in crossing studies (Charlesworth and Laporte, 1998; Koelewijn and van Damme, 1995b) and have been found in molecular studies of maize (Chase, 2007). But evolution of such restorers remains difficult to understand as they would produce hermaphrodites, and would therefore benefit from a selective advantage, only when all epistatic factors are present. Their role in the dynamics of gynodioecy has never been studied theoretically. Variation in the number of restorers between CMS types (de Haan et al., 1997b) and even between the populations carrying the same CMS (Charlesworth and Laporte, 1998) has already been reported.

Gynomonoecious individuals

Gynomonoecious individuals are a common feature in gynodioecious species (Guitian and Medrano, 2000; Maurice, 1999; Talavera et al., 1996). The frequency of such individuals is difficult to estimate because of sex phenotype plasticity (for example Klaas and Olson, 2006; Koelewijn and van Damme, 1996) and is frequently underestimated because of phenotyping procedures. Two main hypotheses have been proposed for their genetic determination : quantitative or incomplete restoration (Glaettli and Goudet, 2006; Koelewijn and van Damme, 1995b, 1996) and heteroplasmy, which is the coexistence of mitochondria of different genomes in the same individual (Andersson, 1999; Erickson and Kemble, 1993). The most likely mechanism that generates heteroplasmy is paternal transmission of mitochondria, as has been found for *Silene vulgaris* (McCauley et al., 2005; Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006). We checked the mitotypes of progenies from our crosses and found no cases suggesting paternal transmission of mitochondria (unpublished data).

As sex determination of gynomonoecious plants remains uncertain, we tried to minimize their influence on the choice of the genetic model for restoration. We classified them by their majority flower type, whereas most previous studies have excluded them, classified them as hermaphrodites (Charlesworth and Laporte, 1998; van Damme et al., 2004) or built genetic models with the assumption that they are

heterozygous at restorer loci (Koelewijn and van Damme, 1995b). Information on the sex determination of gynomonoecious individuals is lacking, though it is needed for interpreting sex segregation in progenies of controlled crosses (Charlesworth and Laporte, 1998; Koelewijn and van Damme, 1995b). Moreover, the role of gynomonoecious individuals in the maintenance of gynodioecy is still unknown, and theoretical developments for addressing this question will require understanding the genetic basis of such individuals. Unfortunately, this study is unable to provide new insights into their genetic determination or their role in breeding-system evolution.

Geographical pattern in CMS diversity and restoration

Our study found well-differentiated CMSs at a large geographic scale and differences in restoration capacities of the different populations. Although studies on mtDNA polymorphism have sometimes been carried out at the continental scale (Houliston and Olson, 2006; Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009), differentiation of CMSs has generally been studied in very nearby populations (Belhassen et al., 1991; Charlesworth and Laporte, 1998; Koelewijn and van Damme, 1995a). Here, we demonstrated that the AU mitotype is clearly distinct from the Q9 and AMB mitotypes. Preliminary results on the mitotypes' geographical distributions suggest that the AU and AMB mitotypes are common in Europe and exhibit wide geographic distributions that are largely overlapping (S. Le Cadre, unpublished data). On the other hand, the Q1 and Q9 mitotypes are specific for the Queyras population, which showed extreme mtDNA polymorphism (Touzet and Delph, 2009). Interestingly, the AU and AMB mitotypes were found to coexist in one population in Belgium and in the Queyras population, meaning that two different CMSs may coexist in these populations. However, as mitotypes were defined only by the *cob* sequence, it should be checked by further reciprocal crosses or sequencing.

As our tested mitotypes were chosen from distant populations and were highly differentiated at our marker loci, we expected to find more females in our progenies. Indeed, crosses between distant individuals are expected to yield higher proportions of female offspring than crosses between moderately related individuals, because of spatial correlations between CMS types and their associated restorers (Bailey and McCauley, 2005). Such a structure can be achieved when restorers suffer a silent cost of restoration, that is, a cost expressed only when the restorers are not active (silent) in sex determination. Indeed, these restorers are expected to co-occur with the CMS they restore, because they are counter-selected when the CMS is absent. Such costs have found experimental support in some gynodioecious species (for example Bailey, 2002; Del Castillo and Trujillo, 2009; Dufay et al., 2008), but spatial match between CMS and associated restorers is still debated. Better restoration is found in within-compared with between-population crosses in *Thymus vulgaris* (Belhassen et al., 1991; Gigord et al., 1998) but not *Silene vulgaris* (Bailey and McCauley, 2005; Emery and McCauley, 2002), and the level of restoration does not decrease with geographic distance in between-population crosses (Bailey and McCauley, 2005; Gigord et al.,

1998). Moreover, restorers were found to be maintained outside of the geographical distribution of their associated CMS in *P. coronopus* (van Damme et al., 2004) and no correlation was found between CMS and restorer frequencies in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (Dufay et al., 2009).

We found some evidence for co-occurrence between CMSs and their associated restorers at a large geographical scale, which could suggest the existence of a silent cost of restoration. Restorers of the AU mitotype are present in Queyras but not in Ambleteuse, at least in the sample of nuclear genotypes used for the current study, since individuals from Queyras (especially Q1 but also Q9) were able to restore the AU mitotype, whereas parents from Ambleteuse were not (TABLE 2.9). This is consistent with the geographical distributions of the AU mitotype, which was found in the Queyras but not in the Ambleteuse population (S. Le Cadre, unpublished results). On the other hand, restorers of the AMB mitotype must present a wide geographic distribution : both Auvergne and Queyras individuals were able to restore it (TABLE 2.9).

Therefore, restorers associated with the two more frequent and widely distributed mitotypes that we found in Europe (AMB and AU) have not been equally successful in their expansion. This variation could be explained by the differences in the expansion dynamics of the two mitotypes, or by different costs and molecular constraints that can affect restorer evolution and maintenance, but genetic drift could also have a role. Although we found the Q9 mitotype in only one population, it was well restored in all crosses, suggesting that its restorers are widely distributed, which is unexpected for a rare CMS. However, we cannot be completely sure that the Q9 and AMB mitotypes represent different CMS, so Q9 could be well restored as AMB is widespread. If, on the other hand, Q9 were a different CMS than AMB, its high degree of restoration would be more difficult to explain (but see the case of CMS Sv in beet ; Dufay et al., 2009). The identity of the Q9 mitotype should be confirmed by further crosses. To understand the dynamics of restorer distributions and frequencies, the proportion of females in the populations and the association between mtDNA mitotype and sex phenotype need to be determined in the field. The better knowledge of large-scale geographical distributions of CMSs and restorers will offer new perspectives for the study of gynodioecy.

Acknowledgements

We thank Joséphine Piffaretti for field assistance, Solenn Le Cadre for providing unpublished data and Fabienne van Rossum for providing seeds. This study was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-JCJC-0074) to MD and PT and a French Ministry of Education and Research (MENRT) PhD grant to CG.

References

See References at the end of the Thesis p.202.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1 : Polymorphic nucleotide sites on *cob* and *cox1* among the 4 cytoplasms

<i>cob</i>										
Haplotype	GeneBank	Ref in Touzet and Delph (2009)	223	735	768	841	927	981	987	997
AMB	EU883274	cob_25	A	T	C	C	A	T	C	T
AU	EU883279	cob_30	C	T	C	T	A	G	C	T
Q1	EU883278	cob_29	C	T	C	T	G	T	A	T
Q9	EU883277	cob_28	A	G	A	T	A	T	A	G

<i>cox1</i>										
Haplotype	GeneBank	Ref in Touzet and Delph (2009)	199	751	763	775	940	954	957	1000
AMB	HM775207	-	A	A	T	G	T	G	G	G
AU	EU883306	cox1_19	A	A	G	T	C	G	C	C
Q1	EU883299	cox1_12	C	A	G	G	C	C	C	G
Q9	EU883301	cox1_14	A	G	T	G	C	G	C	G

Supplementary Table 2 : Models of restoration and expected sex segregation

Supplementary Table 2 is available p.48 as TABLE 2.7.

Bilan du chapitre 2

- * Chez la majorité des espèces gynodioïques, le déterminisme du sexe est cytonucléaire : des gènes de stérilité mitochondriaux (CMS) transforment les hermaphrodites en mâle-stériles (femelles) tandis que des restaurateurs nucléaires contrecarrent l'effet des gènes de stérilité en restaurant la fertilité.
- * Les femelles bénéficient d'un avantage s dans la production de graines qui permet au gène de CMS, maternellement transmis, de se répandre dans la population. Le restaurateur est sélectionné par sélection fishérienne grâce à son association avec le gamète rare, porté par le pollen.
- * Des travaux théoriques ont montré que la stabilité de la gynodioécie pouvait reposer sur des coûts associés aux restaurateurs et/ou aux gènes de stérilité ou sur une structure spatiale des populations.
- * Les dynamiques d'évolution de la gynodioécie dépendent du nombre de gènes impliqués dans le déterminisme du sexe et de leurs caractéristiques, et laissent sur les gènes mitochondriaux des signatures qui peuvent être étudiées expérimentalement.
- * Les bases moléculaires de la stérilité et de la restauration sont inconnues chez les espèces sauvages mais ont été bien explorées chez les espèces cultivées. Les gènes de stérilité mâle sont des gènes chimériques, co-transcrits avec des gènes essentiels, mais leur mode d'action reste incertain. La restauration est assurée par quelques restaurateurs, indépendants ou épistatiques, qui agissent sur l'expression du gène de CMS.
- * Chez les quelques espèces sauvages chez lesquelles le déterminisme du sexe a été étudié, il semble que plusieurs gènes de CMS et plusieurs restaurateurs soient impliqués dans la détermination du sexe. Chez *Silene nutans*, nous avons pu détecter 2 à 3 CMS différentes, et jusqu'à 4 restaurateurs associés à une seule CMS. Deux de ces CMS ont une distribution géographique large en Europe et présentent des niveaux de restauration très différents.

Le phénotype gynomonoïque

3.1 Rencontre du troisième type

Dans le chapitre 2, nous avons décrit la gynodioécie comme la coexistence d'individus femelles et hermaphrodites dans les populations. Il existe pourtant chez certaines espèces gynodioïques un autre phénotype sexuel, intermédiaire car composé de fleurs pistillées (femelles) et de fleurs parfaites (hermaphrodites), appelé gynomonoïque (cf. FIGURE 3.1). Il existe des espèces gynomonoïques pures, comme *Silene noctiflora* (Davis and Delph, 2005) ou beaucoup d'espèces d'Asteracées (Bertin and Kerwin, 1998), dont tous les individus sont gynomonoïques, mais nous nous limiterons ici à la description du phénotype gynomonoïque dans les cas où il coexiste avec des femelles et des hermaphrodites, c'est-à-dire chez les espèces gynodioïques.

Le phénotype gynomonoïque est souvent décrit comme un phénotype minoritaire et de faible importance pour l'évolution du système de reproduction et peu de publications attestent de sa réelle observation en dehors des Caryophyllacées. Pourtant, l'existence d'individus gynomonoïques pourrait être générale aux espèces gynodioïques et il est probable que la fréquence des individus gynomonoïques ait été largement sous-estimée (Koelewijn and van Damme, 1996). Les procédures classiques de phénotypage ne se basent en effet que sur l'observation d'une partie des fleurs de l'individu alors que toutes les fleurs doivent être sexées pour déterminer si un individu est femelle, hermaphrodite ou gynomonoïque. Ce phénotypage exhaustif est coûteux en temps et n'a été effectué que chez un petit nombre d'espèces. L'estimation de l'importance de la gynomonoécie reste donc approximative, aussi bien en terme de proportion d'individus gynomonoïques au sein des populations, que du nombre d'espèces gynodioïques présentant des individus gynomonoïques.

Les données disponibles dans la bibliographie sur la fréquence du phénotype gynomonoïque ont été résumées dans la TABLE 3.1. Elles montrent que la fréquence d'individus gynomonoïque est en réalité élevée, souvent plus élevée que celle des femelles. Dans beaucoup d'études, le phénotypage exhaustif des plantes a permis de relever les proportions de fleurs pistillées et parfaites chez les gynomonoïques et de

Espèce	Pourcentage de gynomonoïques	Sex-ratio des gynomonoïques	Réfs
<i>Silene littorea</i>	50% (vs. 6% de femelles)		1
<i>Silene italica</i>	13 à 39% selon les populations		2
<i>Silene nutans</i>	34-47% (vs. 18-28% de femelles) selon les années	sex-ratio variés mais majorité de « presque hermaphrodites »	3,4
<i>Silene vulgaris</i>	11%	en général, majorité de fleurs parfaites	5
<i>Silene acaulis</i>	jusqu'à 35% (vs. 23% de femelles)	15% de fleurs pistillées maximum	6,7
<i>Silene stockenii</i>	40% (vs. 7% de femelles)		8
<i>Plantago coronopus</i>	2 à 37% selon les populations (20% en moyenne)	sex-ratio variés mais biais pour les fleurs parfaites	9,10
<i>Plantago lanceolata</i>	0 à 25% selon les populations (6 à 18% en moyenne selon les études)		11,12
<i>Glechoma hederacea</i>	30% en moyenne (0 à 100% selon les populations)	sex-ratio variés mais 50% de « presque hermaphrodites »	13
<i>Dianthus sylvestris</i>		60 à 70% des gynomonoïque portent moins de 40% de fleurs pistillées	14
<i>Geranium maculatum</i>	environ 20% (plus fréquent que les femelles)	majorité de « presque hermaphrodites »	15

TABLE 3.1 – Espèces gynodioïques chez lesquelles la présence d'individus gynomonoïques a été reportée. Le pourcentage d'individus gynomonoïques a été relevé en populations naturelles ou dans des descendances de croisements selon les études. Dans certains cas, le sex-ratio (proportion de fleur pistillées) des individus gynomonoïques a également été estimé. Pour des études antérieures aux années 1980, se reporter à la table 6 de Koelewijn and van Damme (1996). Références : 1. Guitian and Medrano (2000) ; 2. Maurice (1999) ; 3. Dufay et al. (2010) ; 4. Desfeux (1996) ; 5. Charlesworth and Laporte (1998) ; 6. Shykoff (1992) ; 7. Delph and Mutikainen (2003) ; 8. Talavera et al. (1996) ; 9. Koelewijn and van Damme (1995b) ; 10. Koelewijn and van Damme (1996) ; 11. van Damme and van Delden (1982) ; 12. Poot (1997) ; 13. Widén and Widén (1999) ; 14. Collin and Shykoff (2003) ; 15. Agren and Willson (1991).



FIGURE 3.1 – Deux individus gynomonoïques chez *Silene nutans*. Chez cette espèce, les fleurs sont protandres et possèdent deux rangs de cinq étamines qui sortent de la corolle à un ou deux jours d'intervalle. La sortie du style avant celle des étamines est donc le signe que la fleur est femelle (on peut vérifier la présence d'étamines avortées dans la fleur en la disséquant). Sur les deux photos, on peut voir une fleur femelle (en bas) et une ou plusieurs fleurs parfaites à des niveaux de maturité différents (stade mâle ou femelle).

déterminer la distribution du sex-ratio (proportion de fleurs pistillées, ou *femaleness* dans les articles en anglais) chez ces individus (cf. TABLE 3.1). Les études sont assez unanimes sur ce point et montrent que la proportion de fleurs pistillées est très variable selon les individus ($]0 ; 100\%$) mais qu'un biais en faveur des fleurs parfaites est souvent observé (cf. TABLE 3.1). L'origine de ce biais, ainsi que ces éventuelles implications évolutives, sont inconnues.

Ces études révèlent que le phénotype gynomonoïque n'est en fait pas un phénotype unique, mais doit plutôt être défini de façon quantitative. En outre, la variation quantitative du sex-ratio chez ces individus n'est pas uniquement fonction de la proportion de fleurs pistillées car des phénotypes intermédiaires peuvent également être observés à l'échelle des fleurs. Chez *Plantago lanceolata* et chez *Plantago coronopus*, deux espèces gynodioïques chez lesquelles la gynomonoécie a bien été décrite, le sex-ratio d'un individu gynomonoïque dépend du nombre de fleurs parfaites et pistillées, du nombre d'étamines contenu par chaque fleur et du niveau d'avorte-

ment des anthères (cf. FIGURE 3.2). Koelewijn and van Damme (1995a) ont montré qu'on pouvait trouver à peu près toutes les combinaisons d'avortement d'étamine, de nombre d'étamine et de répartition de ces étamines entre les différentes fleurs et hampes florales.

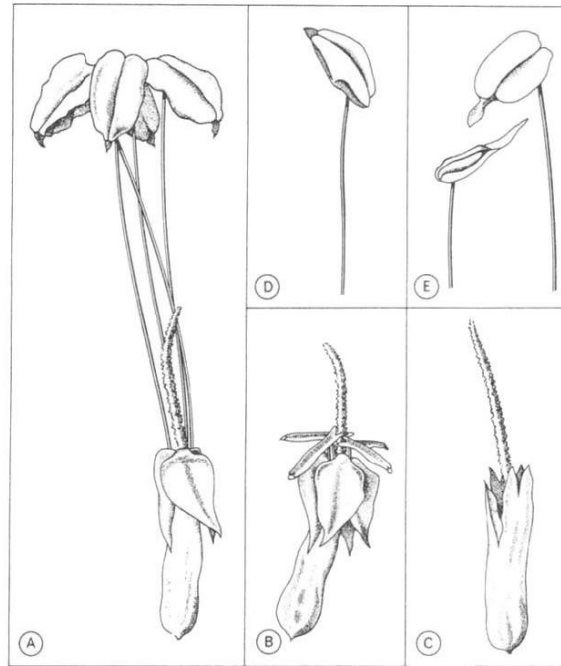


FIGURE 3.2 – Fleurs et anthères chez *Plantago lanceolata*, d'après van Damme and van Delden (1982). (A) Fleur d'une plante hermaphrodite comprenant 4 anthères normales; (B) fleur d'une plante mâle-stérile de type MS1; (C) fleur d'une plante mâle-stérile de type MS2; (D) anthère anormale typique d'une fleur intermédiaire de type IN1; (E) anthère anormale typique d'une fleur intermédiaire de type IN2. Malgré des différences morphologiques discrètes, ces anthères partiellement avortées ont effectivement une production de pollen viable inférieure à la normale (van Damme and van Delden, 1982). La description précise des types MS1, MS2, IN1 et IN2 est disponible dans la publication originale

Chez les autres espèces (en particulier les *Silènes*), les études reportent plutôt des gynomonoïques dont les fleurs sont soit parfaites soit pistillées, avec peu de variation dans le nombre d'anthères et le niveau d'avortement de celles-ci (p. ex. Maurice, 1999). Chez *Silene nutans* cependant, j'ai observé de nombreuses fleurs dont le nombre d'étamines était compris entre 1 et 9 (au lieu de 10, cf. FIGURE 3.3), ainsi que des anthères partiellement avortées. À titre d'exemple, les fleurs comportant de 1 à 5 étamines représentaient 5% des fleurs des individus gynomonoïques. Ces observations restent relativement marginales en comparaison de ce qui a été décrit chez *Plantago* mais l'importance de ces fleurs intermédiaires pourrait toutefois avoir été sous-estimée chez d'autres espèces, à cause du phénotypage particulièrement

attentif que requiert leur détection.



FIGURE 3.3 – Fleur de *Silene nutans* ayant une seule étamine normale (en vert clair, dirigée vers le haut). Les étamines sortant de la corolle par rang de cinq, on ne peut pas voir si la fleur possèdera une seule étamine ou si un second rang d'étamines s'apprête à sortir.

3.2 Traits floraux et reproducteurs du phénotype gynomonoïque

De plus en plus d'études montrent que les individus gynomonoïques représentent une part non négligeable des populations gynodioïques et sont donc susceptibles d'intervenir dans l'évolution du système de reproduction. Pour comprendre leur impact évolutif, il est nécessaire de connaître leurs caractéristiques florales et reproductrices ainsi que leur déterminisme génétique. Cette section sera consacrée au premier point et la section suivante au contrôle génétique et environnemental du phénotype gynomonoïque.

Les résultats des études sur les caractéristiques florales et reproductrices des gynomonoïques ont été rassemblés par traits dans la TABLE 3.2. Globalement, peu de généralités se dégagent, les informations étant parcellaires et parfois contradictoires entre espèces. Chez *Silene italica*, *Plantago lanceolata* et *Geranium maculatum*, il a été montré que les gynomonoïques bénéficiaient d'un avantage dans la production de graines par rapport aux hermaphrodites mais que cet avantage était réduit par rapport à celui des femelles (cf. TABLE 3.2). Agren and Willson (1991) ont quantifié cet avantage et ont montré que les gynomonoïques avaient une production d'ovules 1,4 fois plus élevée que celle des hermaphrodites (1,6 pour les femelles). Cet avantage peut se manifester à différents niveaux (nombre de fleurs, taux de fructification, nombre de graines par fruit) dont les effets peuvent se combiner et varier selon les populations (Agren and Willson, 1991; Poot, 1997). Contrairement à ce que l'on observe parfois chez les femelles, il ne semble pas qu'un taux d'autofécondation réduit puisse expliquer l'avantage dans la production de graines des gynomonoïques mais une seule étude s'est penchée sur cet aspect (cf. TABLE 3.2). La production de pollen des gynomonoïques se différencie de celle des hermaphrodites par une qualité différente, plutôt moindre (viabilité du pollen réduite). La quantité de pollen produite

par fleur semble être identique chez les deux phénotypes mais les gynomonoïques portant un nombre réduit de fleurs parfaites, leur production de pollen à l'échelle individuelle serait réduite.

Au-delà de la caractérisation du phénotype gynomonoïque, certaines études ont comparé les différents types de fleurs produites par les gynomonoïques entre elles et/ou avec celles produites par les femelles et les hermaphrodites. Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'un continuum entre les fleurs pistillées des femelles et les fleurs parfaites des hermaphrodites, en passant par les fleurs pistillées et parfaites des gynomonoïques, mais très peu d'études ont pu montrer des différences significatives pour toutes les étapes de ce gradient.

Durant ma thèse, j'ai étudié les traits floraux et reproducteurs du phénotype gynomonoïque chez *Silene nutans*. Les résultats en sont présentés dans l'ARTICLE 2 (cf. p.78).

Espèce	Nb de fleurs	Taille des fleurs	Début de floraison	Nb de graines, tx de fructification	Tx de germination, survie précoce	Pollen	Taux d'autofécondation	Ref
<i>Silene littorea</i>	$GM > H = F$			tx fruct : $H = GM = F$ et $H_{GM} = F_{GM}$				1
<i>Silene italica</i>	$H \geq GM \geq F$; GM : corrélation négative nb fleurs/sex-ratio	$F_F = F_{GM} < H_{GM} = H_H$		tx fruct : $F \geq GM > H$ et $H_H = H_{GM} \leq F_{GM} = F_F$ poids/fruit : $F \geq GM \geq H$		qté/fl : $H = GM$ taille : $H > GM$ ou $GM > H$ selon les familles		2,3
<i>Silene nutans</i>	GM : pas de corrélation sex-ratio/nb fl	$F_F \leq F_{GM} \leq H_{GM} \leq H_H$ GM : corrélation négative taille fleur/sex-ratio		tx fructif : $F_F = F_{GM}$ et $H_{GM} = H_H$	germination : alloF H>autoF H= alloF GM=autoF GM	taille : $H > GM$ qté/fl : $H = GM$ qté/ind : $H \geq GM$		4,5
<i>Silene acaulis</i> ^a				poids/graine : $H = F_{GM} \geq F_F$ (tendance NS)	germination : $H = F_{GM} = F_F$ survie précoce : $H = F_{GM} < F_F$			6
<i>Dianthus sylvestris</i>		$F_F = F_{GM} < H_{GM} = H_H$		nb graines/fruit : NS poids/graine : $F_F \geq F_{GM} \geq H_{GM} > H_H$	germination et survie précoce : NS		$F < GM = H$ (plante) $F_F < H_{GM} < F_{GM} = H_H$ (fleurs)	7,8
<i>Plantago lanceolata</i>	$F \geq GM \geq H$ (nb hampes)		$F = GM \leq H$	qté graines/ind : $F \geq GM > H$		qté pollen viable corrélée au niveau d'avortement des anthères		9,10
<i>Geranium maculatum</i>	$GM > H = F$	$F < GM < H$	$F = GM < H$	tx fruct : $F \geq GM \geq H$ nb graines/fruit : $F > GM = H$ nb graines/ind : $F > GM > H$ taille graines : $H = GM = F$				11
<i>Glechoma hederacea</i>		$F < GM < H$						12

TABLE 3.2 – Traits floraux et reproducteurs des plantes gynomonioïques (GM). Le sex-ratio des gynomonioïques est défini par la proportion de fleurs pistillées et la taille du pollen par le pourcentage de gros grains de pollen (supposés viables). H : individus hermaphrodites ; F : individus femelles ; F_F fleurs pistillées des femelles ; H_H : fleurs parfaites des hermaphrodites ; H_{GM} : fleurs parfaites des GM ; F_{GM} : fleurs pistillées des GM ; qté : quantité ; alloF : autofécondation ; autoF : autofécondation ; ind : individu ; NS : non significatif ; tx fruct : taux de fructification ; fl : fleurs ; nb : nombre. a : les fleurs parfaites des H et des GM n'ont pas été distinguées dans cette étude. Références bibliographiques : 1. Guitian and Medrano (2000) ; 2. Maurice (1999) ; 3. Lafuma and Maurice (2006) ; 4. Desfeux (1996) ; 5. Dufay et al. (2010) ; 6. Delph and Mutikainen (2003) ; 7. Collin and Shykoff (2003) ; 8. Collin et al. (2002) ; 9. Poot (1997) ; 10. van Damme and van Delden (1982) ; 11. Agren and Willson (1991) ; 12. Widén and Widén (1999).

ARTICLE 2

Characterisation of sex phenotypes in the gynomono-gynodioecious *Silene nutans*

CLAIRE GARRAUD, MATHILDE DUFAÏ AND JACQUI SHYKOFF

(in prep.)

Abstract

Gynodioecy, the coexistence of female and hermaphrodite plants in populations, is often associated with the occurrence of mixed individuals carrying both perfect (hermaphrodite) and pistillate (female) flowers, a phenotype called gynomonoecy. Although quite common, these individuals are poorly characterized for both reproductive traits and genetic determination. We used the progenies of controlled crosses between parents from three French populations to characterize some floral and reproductive traits of female, hermaphrodite and gynomonoecious plants of *Silene nutans*. Our phenotyping procedure revealed that gynomonoecious individuals were more frequent than females. Their proportion of pistillate flowers varied greatly although plants with a high proportion of perfect (hermaphrodite) flowers were predominant. Gynomonoecious plants often displayed reproductive traits that were intermediate between those of females and hermaphrodites but more interestingly, some of these traits depended on the proportion of pistillate flowers of the plant. Pistillate and perfect flowers on gynomonoecious plants differed significantly for none of the traits measured. Gynomonoecious presented reduced compensation (i.e. female advantage) compared with females and lower male fitness than hermaphrodites, a consequence of their reduced number of perfect flowers. Implications for the evolution of gynodioecy are discussed.

Introduction

In gynodioecy, a breeding system in which hermaphrodite and female (male-sterile) plants coexist within the same species, sex phenotype is often determined by both cytoplasmic male sterility (CMS) genes, carried by the mitochondrial genome, and nuclear restorer genes that restore the male function (Belhassen et al., 1993; Charlesworth and Laporte, 1998; Cuguen et al., 1994; Garraud et al., 2011; Taylor et al., 2001; van Damme et al., 2004). The maintenance of females and of the underlying genetic polymorphism has puzzled evolutionary biologists since the 19^e century (Darwin, 1877). Addressing this question requires a careful comparison of reproductive traits between sex phenotypes. Females generally produce more but smaller flowers compared to hermaphrodites (reviewed in Shykoff et al., 2003), benefit from a higher outcrossing rate (Collin and Shykoff, 2003) and higher seed production (Lafuma and Maurice, 2006; Olson et al., 2006; Shykoff et al., 2003), and produce heavier seeds that germinate better (Collin et al., 2002; Olson et al., 2006; Shykoff et al., 2003). These traits contribute to the advantage of females in seed fitness (called female advantage or compensation), a condition required for the invasion of maternally inherited CMS genes (Lewis, 1941).

Both experimental and theoretical studies have focused on the dimorphism between females and hermaphrodites, although many gynodioecious species also contain individuals carrying a mixture of pistillate (female) and perfect (hermaphrodite) flowers, called gynomonoecious. Because their detection require intensive phenotyping procedures, their frequency must be usually underestimated (Koelewijn and van Damme, 1996), though, gynomonoecious plants can be at least as common as females, with frequencies varying from 10% to 50% among populations (Guitian and Medrano, 2000; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999; Shykoff, 1992; Talavera et al., 1996; Widén and Widén, 1999).

Gynomonoecious plants usually bear a majority of perfect flowers, but proportion of pistillate flowers from almost zero to almost one have been found (Agren and Willson, 1991; Collin and Shykoff, 2003; Dufay et al., 2010; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999; Shykoff, 1992; Widén and Widén, 1999). Flowers with intermediate phenotype (e.g. reduced number of anthers) have also been recorded in *Plantago coronopus* (Koelewijn and van Damme, 1996). In addition to detection difficulties, studying gynomonoecious plants is hampered by their high phenotypic plasticity, compared with females and hermaphrodites (Delph and Mutikainen, 2003; Klaas and Olson, 2006; Maurice, 1999; Shykoff, 1988). Most plasticity involves only small changes in the proportion of pistillate flowers (Agren and Willson, 1991), and because of the high proportion of gynomonoecious plants with only few pistillate flowers, this can occasionally lead to a change in sex category, mainly between hermaphrodites and gynomonoecious plants (Agren and Willson, 1991; Delph and Mutikainen, 2003; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999). Despite the strong influence of environmental factors on phenotype, gynomonoecy is thought to be at least partially genetically determined, involving quantitative restoration (Ehlers

et al., 2005; Glaettli and Goudet, 2006; Koelewijn and van Damme, 1995b, 1996) or heteroplasmy, which is the coexistence of different mitochondrial genomes within the same individual (Andersson, 1999; Erickson and Kemble, 1993).

Floral and reproductive traits of gynomonoecious individuals tend to be intermediate between pure females and hermaphrodites (Agren and Willson, 1991; Dufay et al., 2010; Lafuma and Maurice, 2006; Widén and Widén, 1999 but see Guitian and Medrano, 2000). In detail, gynomonoecious plants have been shown to enjoy only reduced compensation in *Geranium maculatum* and *Plantago lanceolata*, with seed production per plant higher than hermaphrodites but lower than females (Agren and Willson, 1991; Poot, 1997). In *Silene nutans* and *Silene italica*, per flower pollen production appears independent of the sex phenotype (Dufay et al., 2010; Lafuma and Maurice, 2006) but the proportion of viable pollen can be higher in hermaphrodite than in gynomonoecious plants (Dufay et al., 2010), although not for all sibships (Lafuma and Maurice, 2006). As expected under sex-allocation theory (Charnov, 1982), a trade-off between investment in male and female functions was sometimes found in hermaphrodite and gynomonoecious individuals indicating reallocation of saved resources (Agren and Willson, 1991; Kikuzawa, 1989; Koelewijn, 2003 but see Glaettli and Goudet, 2006). Furthermore, sex ratio within families sometimes covaries with reproductive traits of hermaphrodites (Gigord et al., 1999; Glaettli and Goudet, 2006; Koelewijn, 2003) suggesting that genes responsible for male fertility may also influence sex allocation, through pleiotropic effects or genetic linkage to those genes directly controlling sex allocation.

Because gynomonoecious individuals can represent a large proportion of the population, their reproductive potential will influence the dynamics of cytoplasmic male sterility factors and nuclear restorers in populations. Therefore, studies of maintenance of sex polymorphism cannot be complete without including the gynomonoecious contribution. Here we investigate the reproductive characters of all three sex phenotypes of *Silene nutans*, a species described as gynomonoecious-gynodioecious (Desfeux, 1996; Dufay et al., 2010; Jurgens et al., 1996) and whose sex is under cytonuclear determination (Garraud et al., in press). To date, there is no evidence of female advantage for this species. As in most gynodioecious species, pistillate flowers are smaller than perfect flowers, here for both female and gynomonoecious plants (Dufay et al., 2010), which could lead to reduced pollinator attractiveness but also allow for reallocation of saved resources to seed production at the plant or flower level. For this reason, we characterized pollen and seed production of gynomonoecious plants at both the plant and flower levels and we looked for trade-offs between male and female functions. We used a large sample of individuals from controlled crosses in order to answer the following questions :

- i How frequent are gynomonoecious plants? How are pistillate flowers distributed in terms of frequency and timing in these plants?
- ii How do gynomonoecious plants compare with females and hermaphrodites in terms of pollen and seed production?

- iii Do reproductive traits covary with the proportion of pistillate flowers in gynomonoecious plants? Do pistillate and perfect flowers of gynomonoecious plants differ in seed production?
- iv Does the mean sex ratio in a family, a measure of the degree of restoration of that family, influence pollen or seed production of gynomonoecious and hermaphrodite plants?
- v Is there a trade-off between investment in male and female functions within plants and within families?

Material and Methods

Plant material

Silene nutans (Caryophyllaceae) is a diploid, self-compatible long-lived perennial rosette plant, growing in non-acidic open grass communities on hills or forest edges. Its range extends from North-Western Europe to Siberia and the Caucasus. Perfect (hermaphrodite) flowers possess ten anthers and are protandrous. Seeds are dispersed over a short distance from an aperture at the top of the ripe capsule when the stalk is agitated by wind or animals. We used seeds issued from controlled crosses using parents from three French populations (Ambleteuse N 50°48' E 1°37', Auvergne N 44°43' E 2°21', Queyras N 44°46' E 6°44'), distant of 350 km to 700 km from each other. Parents were collected as seeds in Auvergne and Queyras and as rosettes in Ambleteuse, between 2002 and 2006. From four hermaphrodite plants (one from Auvergne, one from Ambleteuse and two from Queyras), we set up a diallele crossing design, in which each pairwise comparison was tested in reciprocal crosses (twelve crosses). This diallele was replicated three times, using different parents from the same populations (for details about the crossing design see Garraud et al., in press). A total of 36 (12×3) crosses were performed. Each cross was performed on a single flower and 30 to 40 seeds were generally obtained. Three crosses failed to produce fruits. Seeds were germinated in October 2007 on 0.8% water-agar and the germination rate was close to 100% for all crosses. Seedlings were transplanted 10 days later, placed in the greenhouse at 20°C until late February, and then in a vernalization chamber at 6°C (day length 8h). Plants were planted in the experimental garden in mid-April and started to flower at the end of May.

Sex phenotype

All flowering plants were sexed during the two first flowering seasons, in 2008 and 2009. In 2008, all flowers of each plant were sexed, by screening newly opening flowers every four or five days during the entire flowering season, and were classified as perfect (hermaphrodite), pistillate (female) or intermediate (1 to 5 normal anthers). Flowers on gynomonoecious plants were marked according to their sex with a small piece of coloured thread tied around the pedicel. Then, we defined the sex of each plant by a quantitative sex measurement (hereafter called femaleness) calculated as

follows :

$$\text{Femaleness} = \frac{\text{number of pistillate flowers} + 0.5 \times \text{number of intermediate flowers}}{\text{total number of flowers}}$$

In 2009, the large number of flowering plants made quantitative sex phenotype measurement impossible and we used a discrete description of sex phenotype. Plants were sexed by two to five observations during flowering and assigned to one of the following categories : females (F), hermaphrodites (H), gynomonoecious with fewer than 10% pistillate flowers, more than 90% pistillate flowers or from 10% to 90% pistillate flowers. Therefore the number of gynomonoecious plants was underestimated in 2009 because a rare floral sex phenotype could have been missed.

Floral and reproductive traits measurement

In 2008, the number of flowering spikes, the total number of flowers, the first flowering day and the proportion of flowers that set fruits (fruit set) were measured on all flowering plants. Fruit set of gynomonoecious plants was calculated not only for the entire plant, but also separately for pistillate, intermediate and perfect flowers. In 2009, because plants produced up to 300 flowers, we only recorded the number of flowering spikes (as a proxy of the number of flowers) and the first flowering day. The number of seeds per fruit, seed weight and germination rate were recorded in 2009 for a subset of plants that were transplanted into the greenhouse after the 2008 flowering season. These plants were manually pollinated with an excess of pollen from unrelated donors. Because *Silene nutans* is self-compatible, flowers were emasculated to avoid self pollination. Because we had cloned these plants by splitting up the rosette for other purposes, crosses were performed indiscriminately on one or another clone. Fruit set was close to 100%. In total, fruits were obtained for 62 flowers from 5 females, 8 flowers from 5 hermaphrodites and 42 pistillate flowers, 23 perfect flowers and 17 intermediate flowers from 10 gynomonoecious plants. Seeds were harvested at maturity, counted and weighed. Except for those from intermediate flowers that were for other purposes, seeds were germinated on 0.8% water-agar and the germination rate was recorded.

Pollen production for almost all plants producing pollen (96 gynomonoecious and 178 hermaphrodite plants) was analyzed in 2008. The protocol was identical to the one described in an earlier study on *Silene nutans* (Dufay et al., 2010) but we used a larger sample size from a number of different families and included the number of normal anthers in our analyses. For each plant, one bud was collected during the two first weeks of flowering. All anthers from each bud were collected and stored in ethanol at 95%. When the bud did not contain 10 normal anthers, aborted anthers were also collected and the number of normal anther was recorded. The ethanol was then evaporated and samples were placed at 56°C for 24 hours to force anther dehiscence. One mL of distilled water was added to each pollen sample and sonicated to separate pollen grains and remove them from the anthers. Samples were diluted in isotonic CASY®ton, and the number of pollen grains was estimated using

a particle counter CASY®model TT (Innovatis, Bielefeld). The number of detected particles was determined for 400 size classes ranging from 0.125 to 100µm using the software CASY®excel 2.1. Appropriate corrections for dilution were applied in order to obtain the total quantity of pollen grains in each class for each sample. Our measurement showed that pollen grains clearly fell into two size classes : from 23 to 35µm (hereafter called small pollen grains) and from 35 to 60µm (large pollen grains). A previous study on *Silene nutans* showed that the proportion of large pollen grains is positively correlated with the proportion of viable pollen grains, estimated with Alexander stain ($R=0.89$; see Dufay et al., 2010). We thus used the number of large pollen grains as a proxy for the number of viable pollen grains.

Because the sequence of opening of perfect vs. pistillate flowers may be important for plant fitness, e.g. by affecting the probability of self-pollination by geitonogamy or pollen limitation, we decided to record the sequence of newly opening flowers in gynomonoecious plants in order to determine if pistillate flowers open generally before or after perfect flowers. For each gynomonoecious plant phenotyped in 2008, days of observation were numbered from 1 (first observation) to n (last observation). The average opening day of perfect flowers was calculated as follows :

$$R_h = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{i}{n} \times \text{number of newly opened perfect flowers on day } i}{\text{total number of perfect flowers}}$$

where i is the day of observation.

The distribution of this variable under random opening of flowers of the different sexes (null hypothesis) was obtained for each plant by calculating R_h on 100 000 random permutations of the sequence of opening flowers (respecting the number of newly opened flowers of each observation day and the total number of flowers of each sex). The null hypothesis was rejected when the two-tailed P-value (probability of obtaining R_h values at least as extreme as the R_h calculated from the data) was inferior to 0.05. In those cases, perfect flowers were described as early-perfect, when $R_h < \text{mean}(\text{simulated } R_h)$, or late-perfect, when $R_h > \text{mean}(\text{simulated } R_h)$. Although identical measurements can be done for pistillate and intermediate flowers, analyses were performed on perfect flowers because almost all gynomonoecious plants had at least one perfect flower. Repeatability of R_h values was tested on a subset of 88 cuttings (clones) from 25 plants, for which the sequence of flowering was recorded again in 2009.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using the JMP statistical program (JMP® 8.0.2, SAS Institute Inc.). Since the phenotyping procedure differed between the two years, analyses were conducted independently for 2008 and 2009 data. We defined sex phenotype as a qualitative variable with four categories : females (F), hermaphrodites (H), gynomonoecious with less than 10% of pistillate flowers ($GM_{<10\%}$), and gynomonoecious with more than 10% of pistillate flowers ($GM_{>10\%}$). The rationale was to use a similar definition of sex phenotype for both years and to take into

account the distribution of the femaleness in gynomonoecious plants (see results). We used general linear models (ANOVA) to test the effect of sex phenotype on the number of flowers and flowering spikes, the fruit set, the first flowering day and the quantity of pollen grains. Family was included in these models as a block effect but since the distribution of sex phenotypes among families was very unequal (see results), we were generally not able to test the interaction between sex phenotype and family. The number of seeds per fruit, seed weight and germination rate were compared for the different plant sexes and for flower sex nested within plant sex. Because of the reduced sample size, the effect of family was not considered in these latter analyses. Transformations were performed for some variables to ensure homoscedasticity (see TABLE 3.5 for details). Correlations were calculated using the Pearson correlation coefficient (r), except when data were far from normal. In these cases, we used the Spearman correlation coefficient (ρ), calculated on ranks (Zar, 1984). Intra-class correlations coefficients (R_I) were calculated to test for the repeatability of pollen measurements (Zar, 1984).

Results

Sex phenotype

Of the 1113 plants, 339 flowered in 2008 and 788 in 2009. We phenotyped 29 females, 189 hermaphrodites and 113 gynomonoecious in 2008 and 131 females, 567 hermaphrodites and 70 gynomonoecious individuals, including 31 with fewer than 10% of pistillate flowers, in 2009. Of all plants that flowered at least once, more hermaphrodites than females flowered in 2008 (36.3% vs. 23.4%; $\chi^2 = 9.14$, $p = 0.003$), thereby gaining a head start on reproduction. The proportion of females varied greatly over the 36 families, ranging from 0% to 70%, and almost all females belonged to six families (Garraud et al., in press). Sex phenotypes were mostly stable over the 207 plants that flowered both years : considering those gynomonoecious plants from 2008 with fewer than 10% (resp. more than 90%) of pistillate flowers as hermaphrodites (resp. females) in order to limit detection artefacts, 8 plants shifted from hermaphrodite to gynomonoecious, 9 from gynomonoecious to hermaphrodite and 2 from gynomonoecious to female. These changes of category mainly represented small modification in the plant femaleness. We also noticed a few unexpected phenotypes : in 2008, three males that exhibited aborted carpels but normal flower morphology, and four fully sterile plants, with abnormal flowers that did not open but normal vegetative growth, were detected. Apart from two of the sterile plants that flowered, also sterile, in 2009, these plants did not flower again in 2009. These plants were excluded from the following analyses.

Gynomonoecious plants

Altogether, gynomonoecious plants bore 15% pistillate flowers and 5% intermediate flowers, leading to an average femaleness of 0.23. Half of the gynomonoecious

plants had a femaleness lower than 0.1, though the entire range of femaleness was found (FIGURE 3.4). No correlation was found between the proportions of gynomonoecious and female plants in the different families in 2008 ($\rho = 0.08$, $n = 33$, $p = 0.64$) or in 2009 ($\rho = 0.30$, $n = 33$, $p = 0.09$) but the femaleness of gynomonoecious plants tended to increase with the proportion of females in 2008 ($\rho = 0.36$, $n = 28$, $p = 0.057$). Almost half of the analysed sequences of flower opening deviated from a random distribution of pistillate and perfect flowers across the sequence, far more than the 5% expected by chance. Perfect flowers appeared more often late than early in the flowering sequences allowing us to reject the hypothesis that females are always late (60 random, 17 early-perfect and 35 late-perfect individuals). The timing of anthesis of perfect flowers, R_h , was repeatable among clones within genotypes ($R_I = 0.38$, $F_{24,63} = 3.10$, $p = 0.0002$).

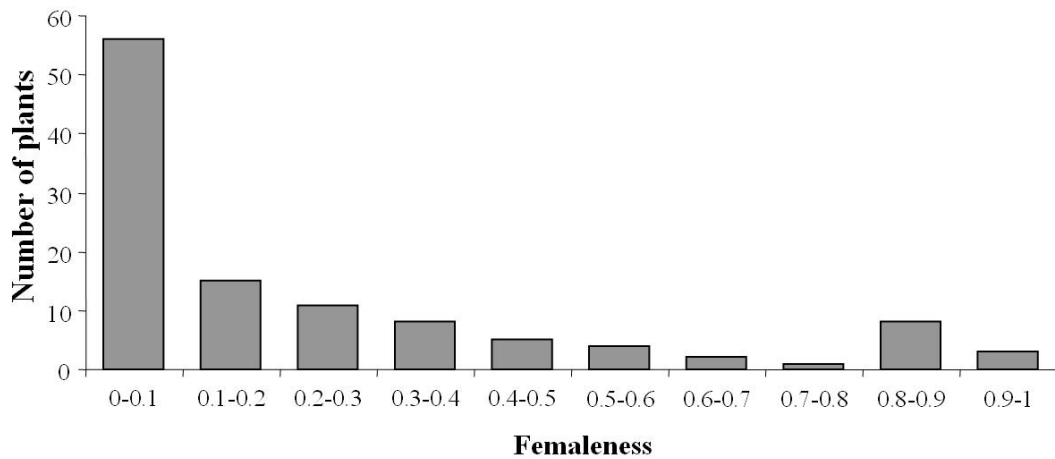


FIGURE 3.4 – Distribution of the sex ratio of gynomonoecious plants in 2008. The femaleness was defined as (number of pistillate flowers + 0.5 x number of intermediate flowers)/total number of flowers; $n = 113$. We defined $GM_{<10\%}$ (resp. $GM_{>10\%}$) as gynomonoecious plants having a sex ratio lower (resp. higher) than 0.1.

We showed that among gynomonoecious plants having a femaleness higher than 0.1 ($GM_{>10\%}$), none of the traits measured in 2008 (first flowering day, number of flowers, fruit set and pollen production per flower) covaried with plant femaleness. However $GM_{>10\%}$ differed from gynomonoecious plants with a femaleness lower than 0.1 ($GM_{<10\%}$) for some floral and reproductive features. Thus, we chose to consider mainly hermaphrodite gynomonoecious plants ($GM_{<10\%}$) and others gynomonoecious plants ($GM_{>10\%}$) as two different phenotypes in our analyses of floral and reproductive traits. We did not define a symmetrical category with plants having a femaleness higher than 0.9 because these plants were too rare to provide enough power in statistical analyses.

Trait measurement

All traits tested varied among the families (TABLE 3.5), revealing high genetic variation among families. Unfortunately, almost all female plants were found in only 6 families, confounding the effect of sex phenotype and the genetic effect of family. Since these effects are inseparable in this study, below we describe mean effects of sex phenotype without considering variation due to family. Sex phenotypes differed for first flowering day, fruit set, number of flowers and flowering spikes, number of seeds per fruit and germination rate (TABLE 3.5). Flowering started earlier in 2009 than in 2008 (131 vs. 180 julian days, $F_{1,1088} = 2650$, $p < 0.0001$), and both years, hermaphrodite and $GM_{<10\%}$ flowered earlier than $GM_{>10\%}$ and female plants (FIGURE 3.4). In 2008, females produce marginally more flowers than hermaphrodites while gynomonoeocious plants carried either many ($GM_{<10\%}$ category) or only few flowers ($GM_{>10\%}$ category) (FIGURE 3.4). In 2009, females produce more spikes than hermaphrodites, gynomonoeocious being intermediate (FIGURE 3.4). Furthermore the proportion of females within a family and the number of flowers (or spikes) of females from this family were positively correlated (FIGURE 3.3). Plants, and particularly females, produced more spikes in 2009 than in 2008 (year

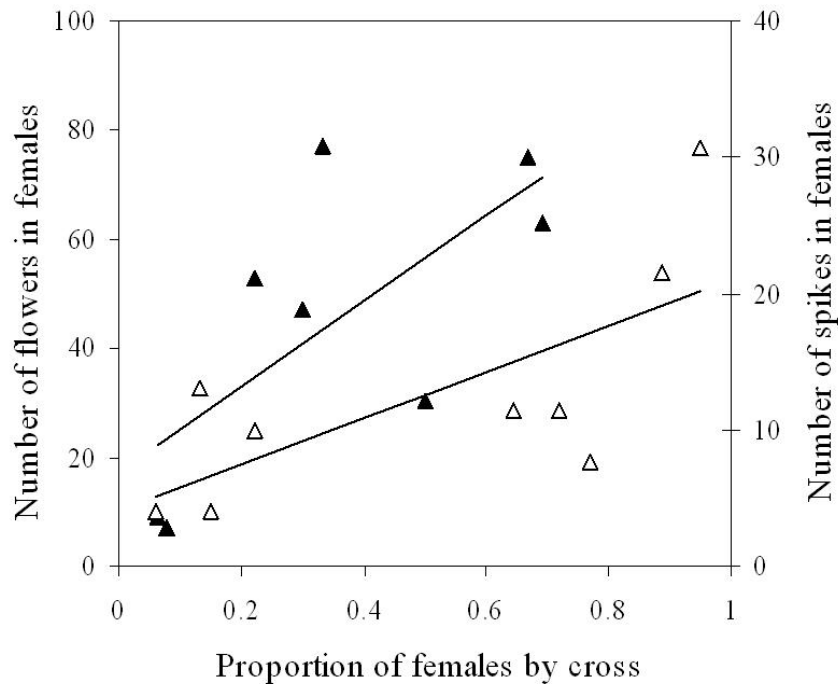


TABLE 3.3 – Correlation between the mean number of flowers (2008) or spikes (2009) of females and the proportion of females in each cross. 2008 and 2009 data are represented by full and empty triangles respectively. The Pearson correlation coefficient was marginally significant in 2008 ($r = 0.6944$; $n = 8$, $p = 0.0560$) and significant in 2009 ($r = 0.7020$; $n = 9$, $p = 0.0350$).

effect : $F_{1,1060} = 471$, $p < 0.0001$; interaction year*sex phenotype : $F_{3,1060} = 4.58$, $p = 0.003$). Among plants that flowered in 2009, plants that had not flowered in 2008 produced globally more spikes than those that had already flowered in 2008, but this effect was significant only for females and $GM_{>10\%}$ (significant interaction sex phenotype*2008 flowering, see TABLE 3.5). For plants that flowered the two years, flowering time varied among individuals ($F_{198,192} = 1.76$, $p < 0.0001$) when year was included in the analysis but number of spikes did not ($F_{198,197} = 1.19$, $p = 0.11$).

Females showed higher fruit set and seed number per fruit than hermaphrodites. For fruit set, $GM_{>10\%}$ were intermediate and $GM_{<10\%}$ not significantly different from hermaphrodites while for seeds per fruit all gynomonoecious plants were intermediate. Pistillate and perfect flowers on gynomonoecious plants did not differ in fruit set (paired t-test, $t_{87} = 0.92$, $p = 0.36$) or seed number per fruit (paired t-test, $t_5 = 1.30$, $p = 0.24$), although pistillate (resp. perfect) flowers from gynomonoecious plants tended to resemble pistillate (resp. perfect) flowers from female (resp. hermaphrodite) plants (FIGURE 3.4). No effect of sex phenotype or flower sex was detected on seed weight and germination rate (TABLE 3.5).

We tested the repeatability of our pollen measurements on a few individuals for which repeated measurements were done. For a given sample, measurements were found to be repeatable for both quantities of all and large pollen grains (total pollen grains : $R_I = 0.75$, $F_{20,25} = 6.91$, $p < 0.0001$; large pollen grains : $R_I = 0.75$, $F_{20,25} = 7.69$, $p < 0.0001$). Similarly, pollen quantities per normal anther were repeatable between buds from the same plant (total pollen grains : $R_I = 0.52$, $F_{29,32} = 3.26$, $p = 0.0007$; large pollen grains : $R_I = 0.55$, $F_{29,32} = 3.52$, $p = 0.0004$). Quantities of both all and large pollen grains varied among families (TABLE 3.5). We found no correlation between the total quantity of pollen grains per bud and the proportion of large pollen grains ($r = 0.022$, $n = 274$, $p = 0.72$). The number of normal anthers in buds varied with the sex of the plant (Wilcoxon's rank test : $p < 0.0001$; means : H : 9.9, $GM_{<10\%}$: 9.4, $GM_{>10\%}$: 8.3). The number of normal anthers had no effect on the total quantity of pollen per bud ($F_{1,270} = 0.20$, $n = 272$, $p = 0.66$), but buds with more normal anthers had more large pollen grains ($F_{1,270} = 4.96$, $n = 272$, $p = 0.027$). This suggests that aborted anthers contained as many pollen grains as did normal ones but that they were immature or aborted. The sex phenotypes did not differ in total quantity of pollen grains per bud but $GM_{>10\%}$ tended to produced fewer large pollen grains than $GM_{<10\%}$ and hermaphrodites, although this effect was not significant (TABLE 3.5). This tendency was not found for the number of large pollen grains per normal anther (TABLE 3.5).

No correlations were found between pollen and seed production, viewed here as proxies for male and female fitness. In hermaphrodites, the fruit set and the quantity of large pollen grains were not significantly correlated either at the individual or at the family level ($r = 0.064$, $n = 178$, $p = 0.40$; $r = 0.24$, $n = 27$, $p = 0.42$ respectively). Similarly, in gynomonoecious plants, we found no correlation at the flower level between the number of normal anthers and the number of seeds produced

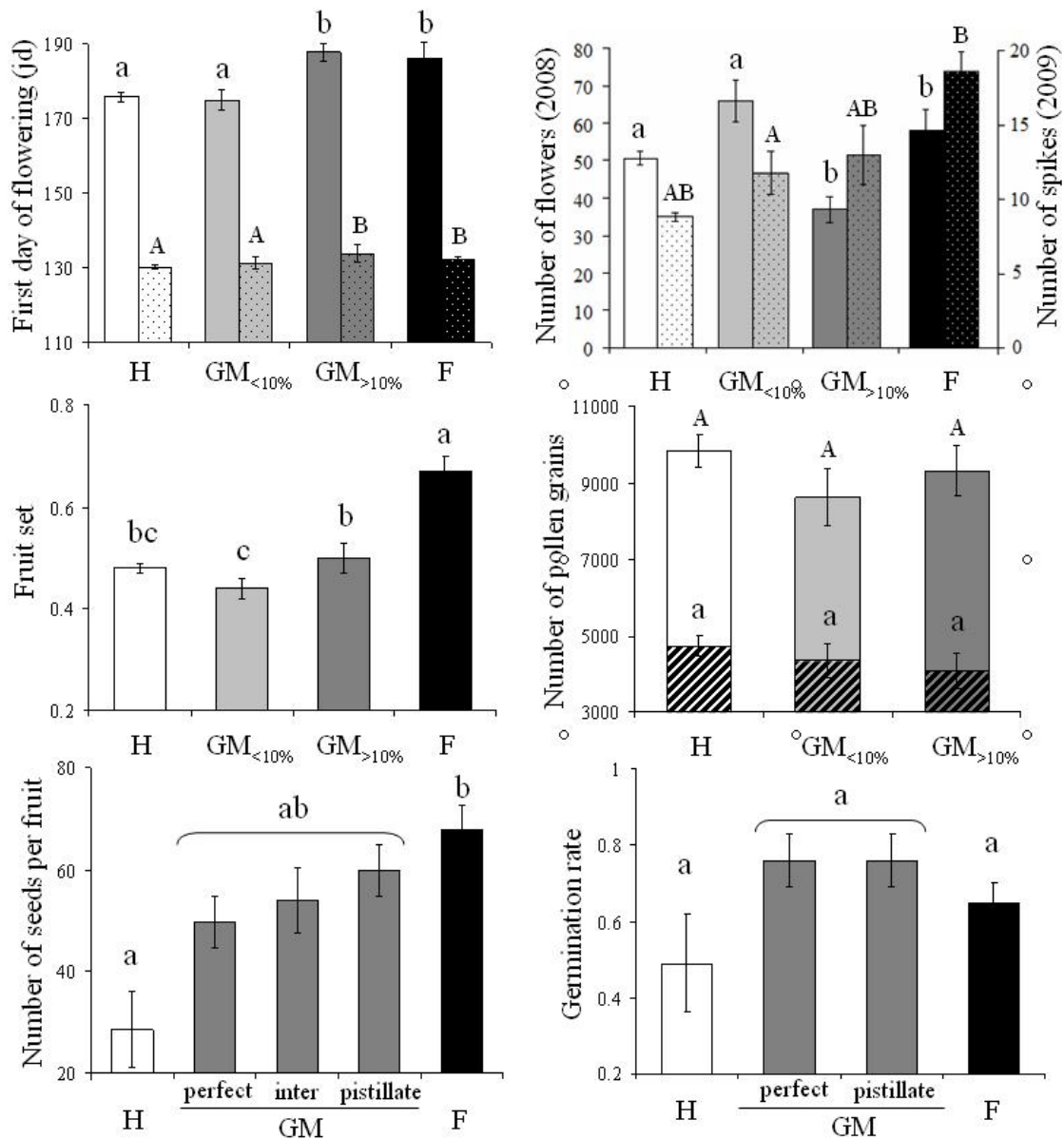


TABLE 3.4 – Floral and reproductive traits by sex phenotype (mean $\pm$ SE). The results of the full statistical analyses are given in TABLE 3.5 and in the text. When data were collected during the two flowering seasons, 2008 and 2009 data are represented in the same graph by full and dotted area respectively. The total number of pollen grains and the number of large pollen grains are in full and hatched area respectively. Flowers of different sexes (perfect, intermediate and pistillate) from gynomonoecious plants were graphed separately for the number of seeds per fruit and the germination rate. Results of post-hoc Tukey tests are mentioned by letters and refer to ANOVAs presented in TABLE 3.5. H : hermaphrodites ; F : females ; GM_{<10%} (resp. GM_{>10%}) : gynomonoecious plants (GM) with a sex ratio lower (resp. higher) than 0.1 ; Inter : intermediate ; jd : julian day.

Variable	Source of variation	dF	MS	F	p
First flowering day in 2008 ^a	cross	32	0.037	5.15	<0.0001
	sex phenotype	3	0.093	13.00	<0.0001
	error	293	0.007		
First flowering day in 2009 ^a	cross	32	0.089	23.01	<0.0001
	sex phenotype	3	0.023	5.89	0.0006
	error	725	0.004		
Number of flowers (2008) ^a	cross	32	0.886	2.78	<0.0001
	sex phenotype	3	6.255	19.51	<0.0001
	error	295	0.321		
Number of flowering spikes (2009) ^b	cross	32	1.711	7.04	<0.0001
	sex phenotype	3	1.121	4.62	0.0033
	2008 flowering	1	2.002	8.24	0.0042
	2008 f. x sex phenotype	3	1.298	5.34	0.0012
	error	697	0.248		
Fruit set	cross	32	0.104	4.50	<0.0001
	sex phenotype	3	0.186	8.07	<0.0001
	error	295	0.023		
Number seeds per fruit	sex phenotype	2	4152	4.19	0.0264
	flower sex (sex phenotype)	2	786	0.79	0.4627
	error	26	12873		
Seed weight	sex phenotype	2	0.011	0.25	0.7833
	flower sex (sex phenotype)	2	0.003	0.06	0.9411
	error	26	0.559		
Germination rate ^c	sex phenotype	2	0.189	0.65	0.5340
	flower sex (sex phenotype)	1	0.001	0.00	0.9472
	error	15	2.169		
Total pollen quantity per bud ^d	cross	31	3148	6.11	<0.0001
	sex phenotype	2	508	0.99	0.3743
	error	240	515		
Quantity of pollen grains >35 μ m per bud ^d	cross	31	1933	4.89	<0.0001
	sex phenotype	2	994	2.51	0.0832
	error	240	396		
Quantity of pollen grains >35 μ m per normal stamen ^d	cross	31	211	5.06	<0.0001
	sex phenotype	2	14.984	0.36	0.6983
	error	239	41.656		

a : ln transformation ; b : cube root transformation ;

c : arcsine(square root) transformation ; d : square root transformation.

TABLE 3.5 – Analysis of variance of floral and reproductive traits. For all analyses but the number of seeds per fruit, the seed weight and the germination rate, sex phenotype was defined as a qualitative variable with four categories : females, hermaphrodites, $GM_{<10\%}$ and $GM_{>10\%}$. For the three remaining analyses, the sex of the plant (sex phenotype) was defined as female, hermaphrodite or gynomonoeious, and the sex of the flower was nested within the sex phenotype. Significant p-values are in bold. Results of post-hoc Tukey tests are available in FIGURE 3.4.

($r = -0.14$, $n = 82$, $p = 0.21$) nor at the individual level between the femaleness and the fruit set of the plant ($r = 0.14$, $n = 113$, $p = 0.15$). We also tested for a correlation between the mean sex ratio by family (sum of quantitative sex measurement of all plants divided by the number of plants) and the mean male or female fitness by family. For hermaphrodite as for gynomonoecious plants, no correlations were found between the fruit set and the family sex ratio ($r = 0.036$, $n = 27$, $p = 0.86$ for hermaphrodites and $r = 0.24$, $n = 28$, $p = 0.23$ for gynomonoecious plants) nor between the quantity of large pollen grains per normal anthers and the family sex ratio ($r = 0.28$, $n = 26$, $p = 0.17$ for hermaphrodites and $r = 0.21$, $n = 26$, $p = 0.31$ for gynomonoecious plants).

Discussion

We observed a clear female advantage in the number of flowers and flowering spikes, the fruit set and the number of seeds per fruit. Combining these three traits, females produced 3.7 (2008) to 6.9 (2009) more seeds than hermaphrodites. These estimations are consistent with female advantage estimates for other species of *Silene* (Lafuma and Maurice, 2006; Morris and Doak, 1998; Shykoff, 1988) and more than suffice to explain the maintenance of females in sex-polymorphic populations. However, we may have over-estimated compensation for two reasons : First, pollen limitation may occur in the field especially since females produce smaller flowers (Dufay et al., 2010) that are expected to be less attractive for pollinators (Delph, 1996). Our plants grew at high plant density and a sex ratio largely biased toward hermaphrodites, so females did not lack for pollen. Moreover, we observed that, as in others gynodioecious species (Agren and Willson, 1991; Collin et al., 2002 but see Poot, 1997), females and hermaphrodites differed in their phenological traits, with females initiating flowering after hermaphrodites. Since the larger females flowered for longer than the hermaphrodites (data not shown) late-produced female flowers may bloom when no more pollen is available, so sexual differentiation in phenology may affect reproductive success. Second, we noticed that hermaphrodites flowered better than females from the first year, which could have a strong impact on their lifetime fitness though females may live longer than hermaphrodites (van Damme and van Delden, 1984 but see Morris and Doak, 1998). A comprehensive estimation of compensation in *Silene nutans* would require additional information on survival and flowering during the entire lifetime.

In accordance with the study of Dufay et al. (2010), gynomonoecious plants, and particularly those with a high proportion of perfect flowers, were frequent. We showed that intensive phenotyping can treble the detection of gynomonoecious plants compared with a standard phenotyping procedure with only a few observations during flowering. Gynomonoecious plants were very heterogeneous, not only for plant femaleness but also for floral and reproductive traits. This has rarely been studied although it has been suggested for fruit set (Philipp, 1980), number of flowers (Maurice, 1999) and flower size (Dufay et al., 2010). We found that $GM_{<10\%}$ were

generally more similar to hermaphrodites and $GM_{>10\%}$ to females but surprising results were found for the number of flowers in 2008, with $GM_{<10\%}$ producing the most flowers and $GM_{>10\%}$ the fewest. Thus, only large plants successfully expressed the minority pistillate phenotype, possibly because, if the probability of each flower being pistillate is low, such flowers will only be seen on plants with many flowers. We only observed this phenomenon in the first year of flowering, during which plants may not yet have fully developed their proper flowering phenotype, particularly in long lived perennials such as *Silene nutans*. Indeed, the first flowering was highly delayed and reduced compared with the two following years (data for 2010 not shown). The literature reveals all patterns for the relative number of flowers of female, hermaphrodite and gynomonoecious plants : gynomonoecious plants have either more flowers than both females and hermaphrodites (Agren and Willson, 1991; Guitian and Medrano, 2000) or are intermediate (Lafuma and Maurice, 2006; Poot, 1997) and within the gynomonoecious class, inconsistent effects of the femaleness on the number of flowers have been found (Desfeux, 1996; Maurice, 1999).

Previous studies on gynodioecious-gynomonoecious species have found that flower characteristics depend both on the plant and the flower sex, and suggested a continuum from perfect flowers of hermaphrodites to pistillate flowers of females through perfect flowers and pistillate flowers of gynomonoecious for traits such as fruit set and flower size (Agren and Willson, 1991; Collin and Shykoff, 2003; Desfeux, 1996; Dufay et al., 2010; Lafuma and Maurice, 2006; Maurice, 1999; Widén and Widén, 1999). We found such a tendency, albeit non-significant, for seed number per fruit. Unfortunately we have not the statistical power to conclude with confidence about the relative performance of pistillate and perfect flowers of gynomonoecious plants. They did not differ for fruit set, nor did fruit set covary with plant femaleness. In particular, pistillate flowers that were produced early in flowering on mainly hermaphrodite gynomonoecious plants set fruit normally, contrary to what has been suggested in other species (Koelewijn and van Damme, 1996; Philipp, 1980).

We showed that the number of normal anthers in buds was a reliable estimation of the quantity of large (i.e. viable) pollen grains. Buds from gynomonoecious plants contained (nonsignificantly) fewer large pollen grains than buds from hermaphrodite plants, similar to Dufay et al. (2010), but this difference was totally explained by the reduced number of normal anthers in gynomonoecious buds. The production of viable pollen by gynomonoecious plants was thus proportional to the number of normal anthers produced by the entire plant. We calculated the total production of viable pollen grains per plant for the flowering season of 2008 as the number of normal anthers per plant times the quantity of viable pollen grains per normal anther. $GM_{<10\%}$ produced a factor 1.23 more viable pollen than hermaphrodites thanks to their higher total number of flowers, and $GM_{>10\%}$ produced 0.47 as many viable pollen as hermaphrodites due to their small overall number of flowers of which several were female flowers. Obviously, pollen counting is only a proxy of male fitness and additional information on the contribution to the pollen cloud

(Philipp et al., 2009), pollen competition success for fertilization (Morand-Prieur et al., 2003), and the fine scale spatial structure of sex phenotypes (Olson et al., 2006) would be necessary to provide a reliable estimate of the relative male fitness of gynomonoecious and hermaphrodite plants.

Some gynomonoecious plants ($GM_{>10\%}$) thus presented a reduction in potential male fitness compared with hermaphrodites and all of them benefited from a reduced compensation compared with females, with a seed production only 1.3 to 3 times higher than hermaphrodites. This result is consistent with the reallocation of the resources saved from pollen production and reduced petal size (Dufay et al., 2010) into the production of seeds, as is supposed to occur in females. This hypothesis rests on the existence of a trade-off between male and female functions, demonstrated in hermaphrodites of some gynodioecious species (Agren and Willson, 1991; Koelewijn, 2003 but see Glaettli and Goudet, 2006) but we found no evidence for such a trade-off in *Silene nutans*. Alternatively, the compensation of gynomonoecious plants observed in fruit and seed production could result from the avoidance of self-pollination (geitonogamy) and associated inbreeding depression. Collin and Shykoff (2003) showed that the selfing rate was similar in hermaphrodite and gynomonoecious plants of *Dianthus sylvestris*. In fact, perfect flowers on gynomonoecious plants showed lower selfing rates than those from hermaphrodites but pistillate flowers on gynomonoecious plants had the highest selfing rates. The authors suggested that this pattern could be due to preferences of pollinators that visit perfect (larger) flowers before pistillate (smaller) flowers on gynomonoecious plants. We showed that, in *Silene nutans*, pistillate flowers tend to appear early in flowering and that this trait is at least partially genetically determined. Precocity of pistillate flowers has already been reported in gynomonoecious plants, although the trait was not quantified (Dufay et al., 2010; Maurice, 1999; Philipp, 1980; Widén and Widén, 1999). This trait may be involved in the avoidance of geitonogamy, particularly in *Silene nutans*, that has moderate to severe inbreeding depression (Dufay et al., 2010; Thiele et al., 2010). However the impact of selfing could be limited by maternal discrimination against self-pollen (Hauser and Siegmund, 2000). Further investigations will be needed to estimate the consequences of selfing rate on the compensation of female and gynomonoecious plants.

The influence of compensation and potential restoration costs on the evolution of gynodioecy has been the subject of many theoretical studies (e.g. Bailey et al., 2003; Dufay et al., 2007) but to our knowledge, gynomonoecious plants have never been included in such models. Bailey and Delph (2007b) investigated the evolution of gynodioecy under quantitative restoration but, since sex determination was a threshold trait, the gynomonoecious phenotype was not considered. Our study provides essential input on the relative fitness of female, hermaphrodite and gynomonoecious plants, but information on the genetic determination of gynomonoecious individuals is still lacking in order to predict their influence on the dynamics of genes involved in sex determination. Koelewijn and van Damme (1995b) suggested that gynomo-

noecious individuals could be heterozygous at restorer loci, inducing incomplete restoration, and could maintain polymorphism at restorer loci through overdominance if these plants were good females and good hermaphrodites. However, we and other studies of gynodioecious species found no evidence for overdominance of gynomonoecy (Agren and Willson, 1991; Lafuma and Maurice, 2006; Poot, 1997). On the other hand, we showed that the mean femaleness of gynomonoecious plants within a family was correlated with the proportion of females in the family, as has already been found in *Plantago coronopus* (Koelewijn and van Damme, 1995b) and *Silene vulgaris* (Glaettli and Goudet, 2006). This suggested a quantitative restoration of male fertility implying many restorer loci, a hypothesis that is also upheld by data on sex segregation in cross progenies of several species (Ehlers et al., 2005). Under that case, gynomonoecy could be a simple by-product of the quantitative determination of sex. On the other hand, Desfeux (1996) proposed that gynomonoecy could represent a bet-hedging strategy, because gynomonoecious individuals might benefit from compensation while ensuring fertilisation by selfing in case of pollen limitation. However there is no evidence for differential pollen limitation of females in gynodioecious species (Lopez-Villavicencio et al., 2003; Shykoff et al., 2003 but see Alonso, 2005) though highly female patches can suffer reduced seed production (McCauley and Brock, 1998; Widén and Widén, 1990).

We remain with a number of unanswered questions :

1. Do gynomonoecious individuals represent a strategy or a developmental error ? Distinguishing between strategy and developmental error is not an easy task : One might predict more developmental errors under more stressful conditions, for example, and here we found that only our most vigorous plants fell in the category of highly hermaphrodite gynomonoecious individuals, which we would not predict were this a response to stress. On the other hand, the ability to flexibly express different phenotypes as a response to environmental variation may itself be a strategy, so it may not be useful to attempt to differentiate between strategy and developmental error.
2. Is gynomonoecy an expression of heteroplasmy or of partial restoration ? Our data on the repeatability of sex ratio and reproductive characters within genotypes are, in fact, consistent with both genetic models for the determination of gynomonoecy. These data indicate a genetic basis, which could be due to a particular cytoplasm or particular combination of nuclear genes, or their interaction, for all these traits.
3. Is it useful to group all gynomonoecious individuals as a single category ? We find a clear bimodality in the expression of gynomonoecy, with strongly hermaphrodite individuals behaving differently than the others, suggesting that gynomonoecy is not a single phenomenon. On the other hand, the gynomonoecious category is different from the female or hermaphrodite one, and it would be adequate to consider the overall contribution of all gynomonoecious individuals to future generations in order to predict the dynamics of cytoplasmic

factors and nuclear restorer genes. For such a prediction, however, we need a clear understanding of the genetic basis of this phenotype. Additional controlled crossing studies and testing for heteroplasmy will be necessary before we can answer this question.

References

See References at the end of the Thesis p.202.

3.3 Détermination du phénotype gynomonoïque

3.3.1 Plasticité du phénotype gynomonoïque

Chez la majorité des espèces gynodioïques comportant des individus gynomonoïques, il a été démontré que ces individus montraient un niveau de plasticité particulièrement élevé par rapport aux individus femelles et hermaphrodites (Agren and Willson, 1991; Andersson, 1999; de Haan, 1996; Desfeux, 1996; Klaas and Olson, 2006; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999). Cette plasticité a été détectée grâce au phénotypage répété de mêmes individus, en populations naturelles, en jardin expérimental ou en serre. Ces études dégagent trois généralités dans la plasticité phénotypique du phénotype gynomonoïque :

- Les gynomonoïques peuvent changer de phénotype sexuel d’une année à l’autre en devenant femelle ou hermaphrodite mais ces changements qualitatifs de phénotype sont en général le reflet d’une petite variation quantitative dans la proportion de fleurs pistillées (Agren and Willson, 1991; Andersson, 1999; Desfeux, 1996; Widén and Widén, 1999). Cet aspect n’a été quantifié que chez *Glechoma hederacea* (Lamiacées) par Widén and Widén (1999) qui ont montré qu’il existait chez cette espèce une forte corrélation entre le phénotype sexuel quantitatif (quantifié par le nombre d’étamines normales) mesuré sur des individus gynomonoïques en populations naturelles et celui mesuré sur des clones transplantés en jardin expérimental. Il est également intéressant de noter que chez *Thymus vulgaris*, des conversions entre les phénotypes femelle et hermaphrodite ont parfois lieu mais concernent uniquement les femelles ayant les plus grosses fleurs (caractéristique hermaphrodite) et les hermaphrodites ayant les plus petites fleurs (caractéristique femelle) (Atlan, 1991). Là encore, les événements de plasticité les plus fréquents sont donc ceux qui impliquent les plus petites modifications phénotypiques.
- La plasticité des gynomonoïques consiste essentiellement en des conversions entre les phénotypes hermaphrodite et gynomonoïque et plus rarement entre femelle et gynomonoïque (Agren and Willson, 1991; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999). Le fait que les gynomonoïques portent majoritairement une faible proportion de fleurs pistillées (cf. TABLE 3.1) pourrait expliquer ce biais, une petite modification du phénotype étant alors plus susceptible de produire une conversion hermaphrodite $\leftrightarrow$ gynomonoïque qu’une conversion femelle $\leftrightarrow$ gynomonoïque.
- L’observation de plantes à la fois en extérieur (populations naturelles) et en milieu plus ou moins contrôlé (jardin expérimental ou serre) a montré que les plantes produisaient en général plus de fleurs pistillées en milieu contrôlé, avec pour conséquence une plus forte proportion de gynomonoïques, au détriment des hermaphrodites (de Haan, 1996; Koelewijn and van Damme, 1996; Maurice, 1999). Les effets de la température et de la qualité du sol ont été évoqués.

Afin de mieux comprendre l'origine des variations de l'expression du phénotype gynomonoïque, quelques rares études ont testé l'influence de facteurs environnementaux tels que la lumière, l'apport en nutriment ou la température. Chez *Plantago coronopus*, Koelewijn and van Damme (1996) ont montré qu'une augmentation de température n'avait pas d'influence sur les phénotypes femelle et hermaphrodite mais rendait les gynomonoïques plus femelle, en diminuant le nombre d'anthères par fleur ou en augmentant la proportion de fleurs pistillées. Cet effet n'a pas été testé chez d'autres espèces gynodioïques mais un résultat similaire a été obtenu chez *Silene noctiflora*, une espèce purement gynomonoïque (Folke and Delph, 1997). L'influence de la disponibilité en nutriments dans le sol a clairement été démontré chez des espèces purement gynomonoïques, pour lesquelles un milieu pauvre favorise en général la production de fleurs pistillées (Olesen et al., 1998; Wise et al., 2008). Chez *Solidago altissima*, il a même été montré que cette plasticité serait adaptative, les individus les plus mâles étant les plus fit (fitness femelle) en milieu riche et les individus les plus femelles les plus fit en milieu pauvre (Wise et al., 2008). En revanche, chez l'espèce gynodioïque *Plantago lanceolata* aucun effet ni des qualités nutritives du sol ni de la lumière (photopériode et longueur d'onde) n'a pu être détecté dans les différentes combinaisons de traitements (de Haan, 1996). À ma connaissance, il n'existe pas d'autres études ayant regardé l'influence de facteurs environnementaux sur la plasticité du phénotype gynomonoïque chez des espèces gynodioïques. Par ailleurs, on sait que l'application d'hormones ou d'éthylène sur les méristèmes peut influencer la formation d'une fleur d'un sexe ou d'un autre et il a été suggéré que certains facteurs environnementaux pourraient agir via des modifications hormonales (Folke and Delph, 1997).

3.3.2 Déterminisme génétique du phénotype gynomonoïque

Même si les plantes gynomonoïques présentent une grande plasticité, la variabilité phénotypique présentée par un individu gynomonoïque serait inférieure à la variabilité observée entre les individus gynomonoïques (Widén and Widén, 1999). Cette observation suggère une composante génétique dans la détermination du phénotype gynomonoïque et du sex-ratio. Actuellement, il n'existe aucune preuve formelle de ce contrôle génétique, ni à fortiori de la façon dont ce contrôle s'effectue (emplacement et nombre de gènes, etc.). Deux hypothèses de déterminisme génétique ont néanmoins été formulées et l'on dispose d'arguments plus ou moins directs en faveur des deux hypothèses.

3.3.2.1 Hypothèse de l'hétéroplasmie

Sous cette hypothèse, les individus gynomonoïques seraient porteurs de deux génomes mitochondriaux différents, l'un mâle-stérile, l'autre mâle-fertile, et le génome mitochondrial déterminerait localement le sexe des fleurs produites. Les branches contenant une majorité de mitochondries mâle-stériles produiraient donc des fleurs pistillées, et les branches contenant une majorité de mitochondries mâle-fertiles des

fleurs parfaites. Cet état de mélange de génomes cytoplasmiques différents au sein d'un même individu est appelé hétéroplasmie et sera traité plus généralement dans le chapitre 4.

Deux études soutiennent cette hypothèse. La première a été réalisée sur *Silene vulgaris* et a consisté en la réalisation de croisements entre d'une part, des fleurs parfaites et pistillées d'une plante gynomonoïque, et d'autre part, un individu père non apparenté (Andersson, 1999). Les résultats montrent que les deux types de croisements, fleurs pistillées x père et fleurs parfaites x même père, produisent des descendants femelles, hermaphrodites et gynomonoïques mais que les fleurs parfaites produisent plus de descendants gynomonoïques que les fleurs pistillées, au détriment des descendants femelles. Les gènes nucléaires étant a priori transmis à l'identique par une fleur pistillée et par une fleur parfaite, on est obligé pour expliquer ces résultats d'admettre que les deux types de fleurs ne transmettent pas la même information génétique cytoplasmique. L'étude suggère ainsi que les fleurs pistillées produisent plus de descendants femelles car les branches contenant ces fleurs contiennent essentiellement des mitochondries mâle-stériles alors que les branches contenant des fleurs parfaites contiennent plutôt des mitochondries mâle-fertiles. Par ailleurs, l'étude montre que les fleurs pistillées portées par des branches chimériques (contenant à la fois des fleurs parfaites et pistillées) produisent plus de descendants femelles que des fleurs parfaites, mais moins que les fleurs pistillées portées par des branches non chimériques. Cette observation suggère que les branches ne portant que des fleurs pistillées contiendraient une proportion de mitochondries mâle-stérile plus importante que les branches chimériques. Les auteurs mentionnent toutefois que l'action d'autres mécanismes, tels que des effets maternels ou une hérédité épigénétique, pourrait également expliquer leurs résultats.

La deuxième étude est moins connue. Elle a été réalisée chez *Brassica napus* en croisant deux lignées de laboratoires, l'une, utilisée comme père dans les croisements, ayant un cytoplasme mâle-stérile (restauré par un restaurateur connu) et l'autre, utilisée comme mère, ayant un cytoplasme mâle-fertile et ne portant pas le restaurateur associé au cytoplasme mâle-stérile porté par le père (Erickson and Kemble, 1993). Le but de l'étude était d'étudier la transmission du cytoplasme dans ces croisements, grâce à l'observation du phénotype de stérilité mâle, indiquant une transmission paternelle du cytoplasme, couplée avec un génotypage par RFLP (Restriction fragment length polymorphism). Le génotypage n'a permis de détecter que trois descendants présentant un mélange des cytoplasmes mâle-stérile et mâle-fertile (sur 290 descendants au total). Un de ces descendants était entièrement mâle-fertile, un autre entièrement mâle-stérile, et le dernier présentait un mélange de fleurs pistillées et parfaites. Les auteurs expliquent les deux premiers phénotypes par une stoechiométrie déséquilibrée entre les deux cytoplasmes, qui ne permettrait l'expression que du cytoplasme majoritaire. Chez l'individu mixte, des croisements ont montré que les fleurs pistillées (respectivement parfaites) produisaient des descendants femelles (respectivement hermaphrodites), suggérant un lien entre le phénotype des fleurs et le génome mitochondrial présent localement.

Ces études apportent toutes deux des arguments en faveur de l'hypothèse de l'hétéroplasmie, mais sont malheureusement basées sur des échantillons de petite taille et la validation de cette hypothèse sera fonction de la répétabilité de telles observations dans de futures études. D'autre part, le fait que l'hétéroplasmie soit considérée comme un phénomène rare (cf. chapitre 4) est peu compatible avec la forte proportion de gynomonoïques observée dans certaines populations.

3.3.2.2 Hypothèse de la restauration quantitative

La deuxième hypothèse de déterminisme génétique des individus gynomonoïques est celle de la restauration quantitative. Jusqu'à présent, dans ce manuscrit, nous n'avons évoqué que des restaurateurs ayant un mode de restauration qualitatif (restauré vs. non restauré). En effet, presque tous les travaux théoriques sur la gynodioécie supposent qu'un seul locus est nécessaire pour restaurer une CMS, et même si les études expérimentales ont souvent été obligées d'invoquer l'action conjointe (avec ou sans épistasie) de plusieurs restaurateurs pour expliquer les ségrégations obtenues dans les descendance de croisement, elles utilisent rarement des modèles à plus de trois loci. Or, il existe un certain nombre d'arguments en faveur d'une restauration quantitative, contrôlée par une multitude de gènes à faible effet. Sous cette hypothèse, les individus gynomonoïques posséderaient une portion des allèles restaurateurs seulement, ce qui leur permettrait de produire du pollen mais serait insuffisant pour exprimer un phénotype entièrement hermaphrodite. Toutefois, la restauration quantitative n'implique pas nécessairement l'existence d'individus gynomonoïques et cette hypothèse est soutenue par des arguments ayants ou non trait au phénotype gynomonoïque.

Restauration quantitative et ségrégation en croisements contrôlés

Koelewijn and van Damme (1995b) sont parmi les premiers à avoir proposé l'idée d'une restauration quantitative, qu'ils nomment dans la publication originale restauration incomplète. Lors d'une étude sur le nombre de restaurateurs impliqués dans la restauration, ils ont montré qu'il était possible de construire un modèle génétique expliquant non seulement la proportion de femelles et d'hermaphrodites dans les descendance (comme cela est généralement fait), mais également la proportion de gynomonoïques. En supposant que les individus gynomonoïques étaient hétérozygotes au locus de restauration, donc seulement partiellement restaurés, ils ont pu expliquer leurs résultats dans environ 50% des croisements considérés.

Plus récemment, Ehlers et al. (2005) ont publié un modèle génétique de restauration quantitative plus général, dans lequel le niveau de restauration est une variable quantitative (fonction du nombre d'allèles restaurateurs) mais résultant dans un phénotype discret, femelle ou hermaphrodite, déterminé par une valeur seuil. En ré-analysant des données déjà publiées, ils ont montré que ce modèle permettait d'expliquer la proportion de femelles et d'hermaphrodites dans les descendance aussi bien que les modèles de restauration qualitative utilisés dans les études originales (Belhassen et al., 1991; Charlesworth and Laporte, 1998; Koelewijn and van

Damme, 1995b). Afin de prendre en compte la proportion de gynomonoïques, les auteurs ont généralisé leur modèle en incluant deux seuils définissant trois phénotypes (femelles, gynomonoïque et hermaphrodite), et l'ont appliqué avec succès sur les données obtenues chez *Plantago coronopus* (Koelewijn and van Damme, 1995b).

Restauration quantitative et consanguinité

Toujours via l'étude de croisements contrôlés, Glaettli and Goudet (2006) ont fourni une preuve supplémentaire dans une étude testant les effets de la consanguinité chez *Silene vulgaris*. On sait qu'en général, la proportion de femelles est plus élevée dans les croisements consanguins (dont les auto-fécondations) que dans les croisements non consanguins (Bailey and McCauley, 2005; Emery and McCauley, 2002; Glaettli and Goudet, 2006), une observation expliquée par l'augmentation de l'homozygotie, qui, si les allèles restaurateurs sont dominants, provoque une augmentation de la fréquence de femelles. Glaettli and Goudet (2006) ont montré que, dans les descendance de croisements réalisés chez *Silene vulgaris*, la proportion de femelles, celle de gynomonoïques, et la proportion de fleurs pistillées des gynomonoïques augmentaient avec le degré d'apparentement des deux parents. Ces résultats sont en accord avec une restauration quantitative assurée par une multitude de loci de restauration dont les allèles restaurateurs seraient dominants. La consanguinité augmentant l'homozygotie, la proportion de loci homozygotes récessifs augmenterait et le niveau de restauration diminuerait, expliquant à la fois la plus forte proportion de femelles et de gynomonoïques et la plus forte proportion de fleurs pistillées chez les gynomonoïques. Les auteurs soulignent cependant que cette observation pourrait résulter de l'effet de la dépression de consanguinité (Bailey and McCauley, 2005). Dans tous les cas, ces résultats sont incompatibles avec l'hypothèse de l'hétéroplasmie si l'on admet que celle-ci est générée par la transmission du génome mitochondrial via le pollen (cf. chapitre 4). En effet, on s'attendrait à trouver moins d'hétéroplasmie (et donc moins de gynomonoïques) chez les descendants consanguins, l'hétéroplasmie ne pouvant être générée que lorsque les deux parents portent des cytoplasmes différents.

Restaurateurs et allocation reproductrice mâle/femelle

De nombreuses études suggèrent que les gènes restaurateurs pourraient être impliqués dans des variations quantitatives d'allocation mâle/femelle chez les gynomonoïques et les hermaphrodites. Une étude de Philipp (1980) chez *Stellaria longipes* a montré que les individus gynomonoïques issus de mère hermaphrodite avait un sex-ratio biaisé vers la production de fleurs parfaites, tandis que ceux de mère femelle présentaient un sex-ratio équilibré. Ce résultat suggère que les gènes impliqués dans la restauration agiraient aussi sur l'allocation relative mâle/femelle chez les gynomonoïques ou seraient génétiquement liés à des gènes ayant cet effet. De plus, il a été montré chez *Plantago coronopus* que la proportion de femelles et le sex-ratio moyen des gynomonoïques au sein des descendance de croisements (familles) étaient fortement corrélés (Koelewijn and van Damme, 1995b). Cette corrélation n'a cependant pas été retrouvée chez *Silene italica* (Maurice, 1999).

Le lien entre gènes restaurateurs et gènes ayant une action quantitative sur l'allocation vers la fonction mâle a également été observé chez les hermaphrodites de quelques espèces gynodioïques. En effet, une observation plus attentive des hermaphrodites montre qu'en réalité, ceux-ci présentent un continuum d'allocation relative mâle/femelle (Koelewijn, 2003). Or il semble que cette allocation soit corrélée au niveau de restauration au sein des familles, suggérant encore une fois le lien entre restauration et allocation reproductrice. Chez *Thymus vulgaris*, il a été montré que les hermaphrodites issus des familles les mieux restaurées (forte proportion d'hermaphrodites au sein de la famille) avaient des fitness mâle et femelle plus élevées que ceux issus de familles mal restaurées (Gigord et al., 1999). Au contraire, chez *Plantago coronopus*, les hermaphrodites des familles le mieux restaurés investissaient plus dans la fonction mâle au détriment de la fonction femelle par rapport à ceux des familles moins bien restaurées (Koelewijn, 2003). Enfin, chez *Silene vulgaris*, une corrélation positive entre le niveau de restauration de la famille et la fertilité mâle des hermaphrodites a été observée mais aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau de restauration et la fertilité femelle (Glaetli and Goudet, 2006). Ainsi, même si la nature de la corrélation reste ambiguë, ces études suggèrent toutes une action épistatique des restaurateurs sur l'allocation reproductrice vers les fonctions mâle et/ou femelle.

Arguments génétiques et moléculaires

Peu de restaurateurs à effet quantitatif ont été détectés chez les plantes cultivées, chez lesquelles les loci de restauration et le mode d'action des restaurateurs sont pourtant assez bien connus. À ma connaissance, le seul exemple publié est celui du riz (*Oryza sativa* L.), chez lequel trois restaurateurs ayant des actions de restauration partielles et additives ont été mis en évidence (Tada, 2007). Ce biais observé en faveur d'un mode de restauration qualitatif pourrait cependant être le résultat d'un artefact de détection, les gènes à faible effet étant moins facilement détectables que les gènes à fort effet.

En conclusion, de nombreuses études soutiennent l'idée d'une restauration quantitative mais les preuves directes du lien entre gynomonoécie et restauration quantitative restent rares. Par ailleurs, cette hypothèse, si elle explique élégamment le continuum de phénotype sexuel observé dans les populations naturelles¹, ne permet pas de comprendre pourquoi chez les gynomonoïques, les fleurs sont entièrement mâle-stériles ou mâle-fertiles et rarement intermédiaires (à l'exception de *Plantago*).

Les travaux de ma thèse ayant trait à la détermination environnementale et génétique du phénotype gynomonoïque sont présentés dans l'ARTICLE 3 (p.106).

1. Le fait que le phénotype sexuel soit quantitatif a souvent été invoqué comme un argument en faveur de l'hypothèse de restauration quantitative (en général, les traits quantitatifs sont effectivement contrôlés par une multitude de gènes à faibles effets), mais l'hypothèse de l'hétéroplasmie est tout aussi compatible avec cet aspect quantitatif, si l'on suppose que la proportion relative de mitochondries mâle-stérile et mâle-fertile détermine la proportion de fleurs pistillées de la plante.

ARTICLE 3

**Environmental and genetic factors controlling
the sex determination of the gynomonoecious
phenotype in the gynomono-gynodioecious
*Silene nutans***

(ongoing work)

Introduction

In gynodioecious species, the gynomonoeocious phenotype has been reported to be very plastic. Gynomonoeocious plants often change into hermaphrodites (and sometimes into females) from one year to another, but these changes are generally due to small modifications in the proportion of pistillate flowers. The environmental factors controlling this phenotype remain largely unknown although some effect of temperature and nutrient availability have been detected in the gynodioecious *Plantago coronopus* and some purely gynomonoeocious species. Moreover, the relative impact of genetic and environmental factors has been poorly studied and even if genetic control has been suggested, its nature remains controversial.

In this study, we set out to determine some of the genetic and environmental factors that control the gynomonoeocious phenotype in *Silene nutans*. First, we compared the quantitative phenotype (proportion of pistillate flowers) of clones over two years and under two different environmental conditions in order to determine whether there is phenotypic plasticity and to detect of possible genetic control of the phenotype. We tested two environmental conditions that differed in soil nutrient availability since this factor has already been suggested to modify sex ratio in some purely gynomonoeocious species but has not been confirmed in gynodioecious species (de Haan, 1996). Then, we set up two crossing experiments to determine the main features of sex determination and inheritance of the gynomonoeocious phenotype. More particularly, these experiments were designed to disentangle the two main hypothesis of sex determination, *i.e.* the heteroplasmy and the quantitative restoration hypotheses.

Material and Methods

Plant material

The plants we used in the plasticity experiment and as parents in the genetic determination experiments were offspring from 36 inter-populations crosses performed in 2007 for other purposes (see ARTICLE 1 p.50). These offspring were first grown as seedlings in the greenhouse at 20°C, then vernalized for two months and finally transplanted as young rosettes into an experimental garden in spring. They were sexed in the summer of 2008 by screening newly opening flowers every four or five days during the entire flowering season. Flowers were classified as perfect (hermaphrodite), pistillate (female) or intermediate (1 to 5 normal anthers) and the sex of each plant was defined by a quantitative sex measurement (hereafter called femaleness) calculated as follows :

$$\text{Femaleness} = \frac{\text{number of pistillate flowers} + 0.5 \times \text{number of intermediate flowers}}{\text{total number of flowers}}$$

Gynomonoeocious individuals have been shown to represent up to 33% of offspring and about 50% of them were mainly hermaphrodite although all proportion of pistillate flowers were found (see Article 2).

Plasticity experiment

In this experiment, we tested whether the gynomonoecious phenotype is stable under different soil nutrient conditions. Among the 113 gynomonoecious plants phenotyped in 2008, we selected individuals with a femaleness higher than 0.1 in 2008 from as many families as possible. The rationale was to exclude almost hermaphrodite gynomonoecious, for which even very small changes in the sex phenotype could lead to sex change to hermaphrodite individuals, and to represent as broad a range of genotypes as possible in the tested plants.

Forty-one individuals were transplanted from the experimental garden to the greenhouse in November 2008 but only 30 survived the transplantation. After three weeks of recovery, plants were cloned by taking rosette cuttings that included a piece of the central tap root. These cuttings were placed in pots filled with compost. In February, cuttings were randomly assigned to the low or high soil nutrient treatment. The low nutrient treatment was defined by a soil mixture of 1 part compost and 2 parts calcareous sand and the high nutrition treatment by a soil mixture of 3 parts compost and 2 parts calcareous sand, supplemented with a controlled release fertilizer (Osmocote, 200 g/65 l). After transplantation to their new soil substrate, plants were randomized and vernalized for six weeks in order to enhance further flowering. Plants were placed at 20°C for flowering in early April and phenotyped using the same protocol as previously described.

Genetic determination experiments

In order to determine the genetic determination of gynomonoecious individuals, we carried out two crossing experiments. In the first one, we crossed female individuals with pollen from gynomonoecious and hermaphrodite plants to test whether restoration abilities of gynomonoecious plants are reduced compared with those of hermaphrodites. Different flowers on three female plants were pollinated with pollen from full-sibling plants, some flowers using pollen from hermaphrodite pollen donors, others using pollen from their gynomonoecious full-siblings. In one case we used two gynomonoecious plants of different femaleness (TABLE 3.6). If the female and the pollen donors carry the same cytoplasm, we expect that progenies from female x hermaphrodite crosses will be better restored than progenies from female x gynomonoecious crosses under the quantitative restoration hypothesis, but not under the heteroplasmy hypothesis. If cytoplasms differ between the female and the pollen donors, we expect on average no difference in progenies, whatever the hypothesis of sex determination of gynomonoecy. Thus, we crossed each female genotype with a group of donors carrying the same cytoplasm as the female and a group of donors carrying a different cytoplasm (see TABLE 3.6).

In the second experiment, we crossed pistillate and perfect flowers of gynomonoecious plants with pollen from an unrelated hermaphrodite donor, in a crossing design similar to the one of Andersson (1999). As far as possible, several pollen donors were

mother \ father	27#15 f08 : 0.55 f09 : 0.5	27#29	29#33 f08 : 0.1 f09 : 0.22	29#29	9#14 clone 1 f08 : 0.58 f09 : 0.51	9#16 f08 : 0.12 f09 : 0.32	9#5
2#3	183	320	80	113			
3#11 clone 1 3#11 clone 2	115	143			29	86	92

TABLE 3.6 – First sex determination experiment. Each female was crossed with two groups of full-sibling plants, each group containing one hermaphrodite plant and one or two gynomonoecious plant(s). One group bore the same cytoplasm as the mother, the other, a different one. Families 2, 3, and 27 carry the same cytoplasm, which is different from the cytoplasm of families 29 and 9. The number of seeds obtained for each cross is indicated. Parents are numbered by their family of origin and a plant number within family (e.g. 27#15 is the 15th offspring of the 27th family). 27#15 and 27#29, 29#33 and 29#29, and 9#14, 9#16 and 9#5 are thus groups of full-sibling plants. 27#29, 29#29 and 9#5 are hermaphrodite plants. Femaleness (f) of gynomonoecious plants used as parents is indicated for both 2008 and 2009 flowering seasons. 3#11 was cloned by taking cuttings and two clones were used in the crosses.

used for each gynomonoecious plant, and pollen donors were used to pollinate several gynomonoecious plants (see TABLE 3.7). This experiment tested whether the sex phenotype of gynomonoecious plants was determined by a factor that varied within plants. Indeed, if progenies of pistillate and perfect flowers of gynomonoecious individuals segregate different proportions of the three sex phenotypes, sex determination should be at least partly determined at the flower or branch level. This would be consistent with the heteroplasmy hypothesis or with other complex systems such as maternal effects or epigenetic inheritance but would be inconsistent with the quantitative restoration hypothesis. If, on the contrary, no difference can be detected between the progenies of perfect and pistillate flowers, no conclusion can be drawn. Indeed, under the heteroplasmy hypothesis, a pollen donor could be equally able to restore the two cytoplasmic systems carried by the heteroplasmic gynomonoecious plant.

For both sex determination experiments, parents were transplanted from the experimental garden to the greenhouse during the 2008-2009 winter, and some of them were cloned by taking cuttings to ensure sufficient ovules and pollen supply for the crosses. Plants were transplanted into a soil mixture of 3 parts compost and 2 parts calcareous sand supplemented with a controlled release fertilizer (Osmocote, 200 g/65 l), put in a vernalization chamber for six weeks, and placed at 20°C for flowering in early April.

Crosses were performed from late May to early July. In order to synchronize the flowering of parents, we cut the early flowering spikes of some hermaphrodite plants to enhance further flowering. Each cross was performed on several flowers and these replicates were performed within ten days. Buds were isolated to avoid accidental

GM (ovule donor) \ H (pollen donor)		17#19	23#36	33#5	1#21	34#32
27#34 clone 1 f08 : 0.58, f09 : 0.43	pistillate fl.	225				
	perfect fl.	73				
27#34 clone 2 f08 : 0.58, f09 : 0.41	pistillate fl.		64			
	perfect fl.		171			
27#34 clone 3 f08 : 0.58, f09 : 0.70	pistillate fl.			213		
	perfect fl.			119		
9#14 clone 2 f08 : 0.58, f09 : 0.56	pistillate fl.				97	104
	perfect fl.				109	43
27#25 f08 : 0.33, f09 : 0.62	pistillate fl.				111	
	perfect fl.				102	
3#31 f08 : 0.44, f09 : 0.42	pistillate fl.			77		
	perfect fl.			10		
3#25 clone 1 f08 : 0.14, f09 : 0.45	pistillate fl.			56		
3#25 clone 2 f08 : 0.14, f09 : 0.49	perfect fl.			36		

TABLE 3.7 – Second sex determination experiment. Pistillate and perfect flowers (fl.) were crossed with the same pollen. Number of seeds obtained for each cross are indicated. Parents are numbered by their family of origin (first number) and a plant number within family (second number). Some gynomonoecious (GM) parents were cloned by taking cuttings and different clone members were sometimes used for the crosses. Femaleness (f) of gynomonoecious plants used as parents is indicated for both 2008 and 2009 flowering seasons.

pollination. As *Silene nutans* is self-compatible, flowers were emasculated by cutting the stamens as soon as they emerged from the corolla. Pollen was collected just before pollination and placed on the receptive sticky stigma. Seeds were harvested at maturity.

Seed were germinated in September 2009, in 9cm diameter Petri dishes on 1% water agar. The germination rate was about 85% for most of the crosses but germination was slow and the Petri plates became contaminated with fungi for the following crosses : 9#14 x 1#21, 9#14 x 34#32, 2#3 x 27#15, 2#3 x 27#29, 3#11 x 9#14, 3#11 x 9#16, 3#11 x 9#5. After germination, seedlings were transplanted into multipots (4.5cm diameter each) filled with compost, and placed in the greenhouse at 20°C with natural light for six weeks. Then, plants were vernalized at 5°C (day length 8h) for three months, transplanted in individual pots (8cm diameter) filled with compost supplemented with a controlled release fertilizer (Osmocote, 500 g/60 l) and placed randomly in the greenhouse (daily temperature : 15-20°C, natural light).

Results

Plasticity experiment

Among the 163 clones, 90 flowered in 2009 and the rate of flowering was significantly higher in the high soil nutrient treatment than in the low soil nutrient treatment (61.9% vs. 42.3%, $\chi^2 = 5.41$, $df = 1$, $p = 0.02$). Moreover, in the low treatment, the number of flowers per plant was much reduced than in the high nutrition treatment (6 vs. 50 flowers, $F_{1,40} = 61$, $p < 0.0001$) and the flowering was delayed (179 vs. 149 julian days, $F_{1,40} = 24.5$, $p < 0.0001$).

We showed that the femaleness of gynomonoecious plants did not differ between 2008 and 2009 (paired t-test, $t_{25} = 0.99$, $p = 0.33$). Nor was the difference between 2008 and 2009 femaleness significant when the two treatments were analyzed separately. The level of plasticity between years, calculated as the difference between 2008 and 2009 femaleness, varied among genotypes ($F_{18,61} = 3.2$, $p = 0.0004$). However, this effect was attributable to only one plant, that was mainly female in 2008 (femaleness 2008 : 0.88) and mainly hermaphrodite in all clones in 2009 (femaleness 2009 : 0→0.25). Overall, the femaleness was repeatable over years within genotypes (intra-class correlation coefficient : 0.73, $F_{25,26} = 3.53$, $p = 0.0011$).

The soil nutrient treatment had no influence on the femaleness of plants (paired t-test, $t_{16} = -0.62$, $p = 0.54$, cf. FIGURE 3.5) although plants bore more pistillate flowers in the high soil nutrient treatment ($t_7 = -2.55$, $p = 0.0436$) when we excluded plants with fewer than 7 flowers, for which the estimation of femaleness is rather uncertain. Considering all genotypes for which more than one clone flowered in 2009, degree of femaleness was repeatable among clones within genotype (intra-class correlation coefficient : 0.56, $F_{18,64} = 6.41$, $p < 0.0001$).

Genetic determination experiments

Almost no plants flowered during their first summer (2010 summer) so we were not able to collect enough data to analyze the results on segregation of sex phenotypes from experimental crosses. *Silene nutans* is a long-lived perennial and as such, few individuals flower in their first season. We had managed to obtain quite a high flowering rate in the first season in a previous study (see Article 1), by placing rosettes outside at the end of winter when they experienced late frosts and snow-fall. However, even under these conditions only about $\frac{1}{3}$ of plants flowered in the first season. In this study, with plants in the greenhouse, appropriate environmental cues that allowed the triggering of flowering appear to have been lacking. Data will hopefully be collected next summer (2011).

Conclusion

We found that, although the gynomonoecious phenotype in *Silene nutans* exhibited some phenotypic plasticity over years and among clones, the level of plasticity was limited for all but one genotype. Degree of femaleness was repeatable over years

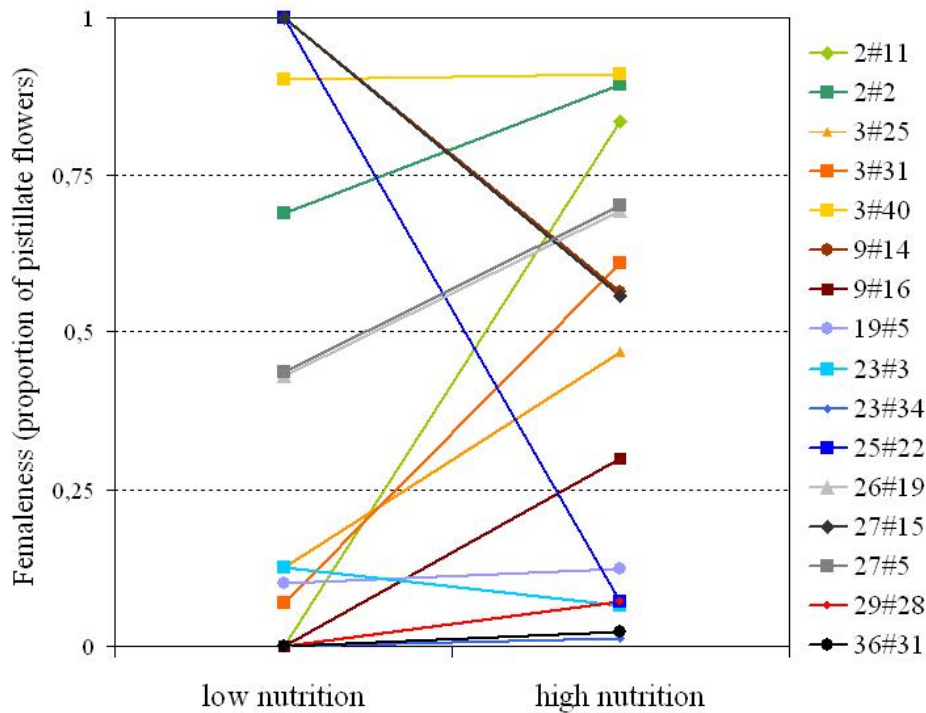


FIGURE 3.5 – Mean femaleness of clones in the low and high soil nutrient treatments. Data are given for the 16 genotypes for which some clones flowered in both treatments.

and among clones of the same genotype, which suggests that the proportion of pistillate flowers of gynomonoecious plants is under some genetic determination. To our knowledge, such an effect of the genotype on the proportion of pistillate flowers in gynomonoecious plants have been demonstrated in only one another gynodioecious species (Widén and Widén, 1999). More information on the genetic determination of gynomonoecious plants will be available next summer.

Sex-allocation theory predicts that environmental stresses, such a low nutrient availability, will increase the sex allocation towards the male function because male gametes are cheaper than female gametes (Charnov, 1982). This expectation has been supported in many monoecious and andromonoecious species but little attention have been paid to gynodioecious or gynomonoecious species (see Wise et al., 2008, and references included). Nevertheless, expectations in species having pistillate and perfect flowers are not straightforward since the smaller pistillate flower type is likely to be cheaper. Thus, one can expect that stresses will either increase the production of the cheaper flower type by increasing the proportion of pistillate flowers, or increase the production of the cheaper gamete (pollen production) by increasing the proportion of perfect flowers (and decreasing the total number of flowers to ensure adequate resources). Shift toward the production of pistillate flowers under nutrient

stress have been demonstrated in some purely gynomonoecious plants (Olesen et al., 1998; Wise et al., 2008) and have been shown to be adaptive in *Solidago*.

In *Silene nutans*, we found no effect of nutrient availability on the proportion of pistillate flowers of gynomonoecious plants, and plants responded to the low nutrition treatment by a reduction in flower number. This resulted in our femaleness estimation on these plants being imprecise because of the small number of flowers on which it was based. Thus the imprecision in the femaleness estimate could have hampered our detection of a soil nutrient effect. On the other hand, de Haan (1996) also found no effect of nutrient availability on sex phenotype in the gynodioecious *Plantago lanceolata*. Again, this suggests a strong genetic control of femaleness in gynomonoecious plants. Because phenotypic plasticity appears quite low in gynomonoecious individuals of *Silene nutans*, it seems unlikely that plasticity, by allowing fine adjustment of the floral sex ratio to local conditions, could provide a selective advantage to gynomonoecious plants compared with females and hermaphrodites. However, further experiments will be needed to better estimate the influence of other factors and their potential interactions on phenotypic plasticity in the gynomonoecious phenotype.

References

See References at the end of the Thesis p.202.

Bilan du chapitre 3

- * De nombreuses espèces gynodioïques comportent dans leurs populations, en plus des individus femelles et hermaphrodites, des individus intermédiaires, portant des fleurs parfaites et pistillées, appelés gynomonoïques.
- * La proportion de fleurs pistillées au sein des individus gynomonoïques peut varier de 0 à 1 (non compris), mais un biais en faveur de la production de fleurs parfaites est souvent observé.
- * Les informations concernant les traits floraux et reproducteurs de ces individus sont parcelaires. Il semblerait que les gynomonoïques aient une production de graines intermédiaire entre celle des femelles et celle des hermaphrodites et le pollen pourrait être de qualité inférieure à celui des hermaphrodites (viabilité réduite). Chez *Silene nutans*, nous avons montré que les gynomonoïques bénéficiaient d'un avantage dans la production de graines par rapport aux hermaphrodites et que cet avantage était plus réduit que celui des femelles. Aucune différence dans la production de pollen (quantité et qualité) n'a été détectée au niveau anthère entre hermaphrodites et gynomonoïques. En revanche, à l'échelle des individus, les gynomonoïques produiraient moins de pollen, à cause de la présence de fleurs femelles et d'anthères avortées sur des fleurs parfaites.
- * Chez les espèces gynodioïques, les individus gynomonoïques semblent être caractérisés par une plasticité phénotypique importante, avec des variations dans la proportion de fleurs pistillées, entre années et en fonction des conditions environnementales. Nos observations chez *Silene nutans* nous poussent à relativiser l'importance de cette plasticité, la variation plastique observée au sein des individus, entre années ou dans des conditions environnementales différentes, étant de plus faible amplitude que la variabilité entre les individus. Ces données suggèrent un contrôle génétique du phénotype sexuel.
- * Deux hypothèses de déterminisme génétique des individus gynomonoïques ont été formulées : l'hypothèse de l'hétéroplasmie, qui suppose que deux cytoplasmes, l'un mâle-fertile, l'autre mâle-stérile, ségrégent dans les individus gynomonoïques, et l'hypothèse de la restauration quantitative qui considère que la restauration est un trait quantitatif, contrôlé par une multitude de restaurateurs à faibles effets, et que les individus gynomonoïques ne sont que partiellement restaurés.
- * Afin d'étudier l'impact des individus gynomonoïques sur l'évolution de la gynodioécie, une meilleure connaissance du déterminisme génétique et des fitness mâle et femelle des gynomonoïques est indispensable. On ne sait actuellement pas si le phénotype gynomonoïque est adaptatif ou s'il ne représente qu'une conséquence du déterminisme génétique de la gynodioécie.

Évolution de l'hérédité mitochondriale et gynodioécie

Depuis quelques années, l'étude détaillée de l'hérédité des mitochondries chez *Silene vulgaris*, une espèce gynodioïque du genre *Silene*, a révélé quelques surprises. Ces résultats remettent en cause des vérités supposées acquises de l'hérédité des mitochondries et plus généralement des organites. Bien que ces résultats soient pour l'instant très spécifiques, la porte est ouverte à d'autres études plus détaillées. Si ces observations devaient être généralisées, quelques grands principes de l'évolution du génome mitochondrial et de l'évolution de la gynodioécie pourraient bien nécessiter une révision. Dans ce chapitre, nous ferons état des connaissances actuelles sur l'hérédité des organites, en insistant sur les données disponibles chez les plantes. Les spécificités des espèces gynodioïques feront l'objet de la dernière section.



De l'importance des mitochondries dans la vie de tous les jours.

4.1 Pourquoi ? Causes et conséquences de l'évolution de l'hérédité uniparentale des organites

Historiquement, c'est l'hérédité non-mendélienne des génomes cytoplasmiques qui a trahi leur présence aux sein des organites, d'abord en 1909, avec l'observation indépendante de Baur et Correns de la transmission des chloroplastes verts et blancs des plantes panachées chez *Pelargonium* et *Mirabilis*, puis, en 1933, celle de la transmission de gènes de stérilité mitochondriaux chez le maïs par Rhoades. Depuis, les exceptions à l'hérédité uniparentale des génomes cytoplasmiques se sont multipliées, mais celle-ci reste la règle. Pourtant, il n'existe pas de consensus sur les causes de ce trait ubiquiste dont les conséquences sur l'évolution des génomes cytoplasmiques sont primordiales.

4.1.1 Évolution de l'hérédité uniparentale des organites : encore quelques modèles...

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'évolution des sexes pourrait être une conséquence de l'évolution de l'hérédité uniparentale des organites (cf. p.6). Selon ces modèles, l'uniparentalité serait imposée par le noyau pour éviter le coût induit par la course aux armements entre les cytoplasmes, dont l'intérêt est d'être le mieux transmis possible, quels que soient les coûts pour l'organisme. Ces modèles, s'ils proposent une explication séduisante, présentent l'inconvénient d'être dépendants des mutations « autorisées » dans le modèle. Par exemple, si une fois l'uniparentalité contrôlée par un gène nucléaire, on autorise l'apparition d'une nouvelle mutation mitochondriale capable de briser l'uniparentalité pour augmenter sa transmission, elle s'étendra dans la population et l'hérédité mitochondriale sera à nouveau biparentale. Ainsi, le conflit entre noyau et cytoplasme est analogue à une Reine Rouge hôte-parasite, sauf qu'un des protagonistes, en l'occurrence le noyau, réussirait presque systématiquement à prendre le dessus. La question de l'uniparentalité peut donc être reformulée ainsi : pourquoi le gagnant du conflit est-il généralement le noyau ? À ma connaissance, il n'a pas été formulé de réponse claire à cette question¹. On évoque généralement la taille plus importante du génome nucléaire et ses opportunités de mutation plus élevées mais ces explications restent très spéculatives.

Les modèles le plus souvent invoqué pour expliquer l'évolution de l'uniparentalité font appel à des éléments mitochondriaux égoïstes. Cependant, il en existe quelques autres, dont voici deux exemples :

- *La spécialisation de la transmission par un sexe* (Godelle and Reboud, 1995).
Ce modèle requiert l'existence préalable de deux sexes. Les auteurs supposent que l'efficacité de la transmission des gènes cytoplasmiques peut différer en fonction des facilités de réplication dans les lignées germinales mâle et femelle.

1. Plus souvent, on a essayé de répondre à la question : quels sont les facteurs (p. ex. le niveau de consanguinité) qui influent sur l'issue du conflit ?

Sous certaines conditions (forme du trade-off entre la réplication dans la lignée mâle et celle dans la lignée femelle), le modèle prédit une spécialisation de la transmission des gènes cytoplasmiques dans une des lignées. Cette spécialisation nécessite une asymétrie dans les conditions de réplication au sein des deux lignées. L'anisogamie est ainsi particulièrement propice à une spécialisation de la transmission via la lignée germinale femelle, plus adaptée à une réplication efficace des organites. Ce modèle pourrait également s'appliquer aux espèces isogames mais l'existence d'une asymétrie entre les gamètes reste à démontrer.

- *Le modèle STOR - Salvage, TurnOver, Repair* (Sears and VanWinkle-Swift, 1994). Ce modèle propose que la dégradation de l'ADN des organites soit une source de nutriments pour le métabolisme et de nucléotides pour la recombinaison, la réparation de l'ADN et la synthèse d'ARN. Ce modèle, initialement conçu à partir de données chez *Chlamydomonas*, ne s'applique qu'à des espèces isogames chez lesquelles la destruction de l'ADN apporte une quantité de ressources substantielle.

4.1.2 Conséquences de l'hérédité uniparentale des organites

Nous ne parlerons pas ici des conséquences de l'hérédité uniparentale des organites sur les conflits intra-génomiques (déjà traitées en introduction, cf. p.15) mais plutôt des conséquences sur l'évolution du génome mitochondrial lui-même. En un mot, l'uniparentalité des organites a pour effet de rendre le génome mitochondrial asexué. L'uniparentalité, alliée à la ségrégation aléatoire des mitochondries lors des mitoses, produit des individus homoplasmiques, c'est-à-dire possédant un seul génome mitochondrial. La recombinaison, si elle a lieu, n'est plus efficace car elle n'a lieu qu'entre génomes identiques. Les génomes cytoplasmiques devraient donc être incapables de d'éliminer leurs mutations délétères et devenir de moins en moins fonctionnels (cliquet de Müller). De plus, le déséquilibre de liaison entre les gènes mitochondriaux étant presque total (le génome entier ne comprend qu'un seul groupe de liaison), la sélection est peu efficace. En outre, l'uniparentalité et l'haploïdie du génome mitochondrial réduisent l'effectif efficace de la population, ce qui favorise l'accumulation de mutations délétères (Neiman and Taylor, 2009).

Pourtant, l'étendue de l'uniparentalité chez les Eucaryotes et son caractère ancestral, au moins dans certains taxons, suggèrent que l'uniparentalité n'est pas un handicap si lourd (Birky, 1995). Beaucoup d'hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer ce paradoxe :

- Les gènes mitochondriaux ne subissent pas de pressions adaptatives changeantes car ils sont liés au fonctionnement de base de la cellule. Ils peuvent donc supporter une vitesse d'adaptation plus faible (Birky, 1995).
- Les fonctions de ces gènes étant primordiales, les mutations mitochondriales sont souvent létales ou très délétères et ont une forte probabilité d'être éliminées presque immédiatement (Birky, 1995).
- Même sans sexe, les génomes cytoplasmiques sont capables de réparer leur

ADN grâce aux multiples copies présentes dans chaque cellule (voire dans chaque organite).

- Chez les mitochondries des plantes, des polymérases de haute fidélité assurent un taux de mutation presque dix fois plus faible que celui des gènes nucléaires et pourraient compenser en partie l'absence de recombinaison. Ce dispositif n'existe cependant pas chez les animaux.
- Un très faible taux de recombinaison suffit à éviter le cliquet de Müller (Neiman and Taylor, 2009). Or de plus en plus d'études démontrent que les mitochondries des plantes, des champignons et, à moindre échelle des animaux, subissent une recombinaison occasionnelle, le plus souvent due à une fuite de mitochondries d'origine paternelle. Selon Barr et al. (2005), les taux de recombinaison généralement trouvés dans ces études permettraient d'éliminer efficacement les mutations délétères tout en ayant peu d'effet sur la sensibilité aux éléments égoïstes.
- Les génomes cytoplasmiques sont soumis à de la sélection intra- et inter-cellulaire qui peut éliminer les mutations délétères. Cette sélection n'est bien sûr pas efficace si les individus sont homoplasmiques mais elle pourrait jouer dans les premiers stades de l'apparition d'une mutation.
- Selon certains auteurs, le goulot d'étranglement (*bottleneck*) dans la population de mitochondries de la lignée germinale, phénomène bien décrit chez les mammifères en particulier, augmenterait la variance inter-cellulaire et permettrait de mieux contre-sélectionner les mutations délétères (Roze et al., 2005). Cependant, selon d'autres, le goulot augmenterait également la dérive, rendant la sélection peu efficace (Neiman and Taylor, 2009). L'importance relative des deux effets, qui dépend de l'intensité du goulot et des coefficients de sélection des mutations, est encore discutée.

Malgré tout, on observe que chez les plantes, les animaux et les champignons, les génomes mitochondriaux accumulent plus de mutations délétères que les génomes nucléaires (Lynch and Blanchard, 1998). Le transfert des gènes des organites vers le noyau pourrait avoir été favorisé pour cette raison.

4.2 Comment ? Les mécanismes et le contrôle génétique de l'hérédité des organites

4.2.1 Les mécanismes de l'hérédité des organites

Si l'anisogamie est évidemment en faveur d'une hérédité asymétrique des organites, elle est insuffisante pour assurer une hérédité strictement uniparentale (cf. p.123). Des mécanismes d'exclusion très divers et plus ou moins actifs, ont été mis en évidence (Birky, 2001; Korpelainen, 2004; Xu, 2005). Le blocage des mitochondries d'origine paternelle peut s'effectuer à tous les niveaux, de la formation des gamètes aux premières étapes du développement et l'on peut, sur ce critère, distinguer trois catégories de mécanismes :

- *Ceux qui agissent pendant la gamétogenèse.* Chez les pluricellulaires, la gamétogenèse implique de nombreuses divisions, mitotiques et/ou méiotiques. Durant ces divisions, la répartition des organites est parfois asymétrique et peut mener à l'exclusion des organites des futurs gamètes. Le rôle du cytosquelette est essentiel et les gènes qui le contrôlent sont donc potentiellement impliqués dans l'hérédité des organites. On oppose à cette exclusion passive les exclusions actives basées sur une dégradation active des organites pendant la gamétogenèse, dont les mécanismes précis sont inconnus.
- *Ceux qui agissent au moment de la fécondation.* Il s'agit en général d'une destruction active des mitochondries dont les mécanismes sont connus chez quelques espèces unicellulaires (p. ex. *Chlamydomonas reinhardtii*).
- *Ceux qui agissent au cours des premières étapes du développement.* Comme pendant la gamétogenèse, ces mécanismes peuvent impliquer une exclusion physique par ségrégation contrôlée ou stochastique des organites lors des divisions, ou une dégradation active visant spécifiquement les organites d'un des deux parents.

Ces différents mécanismes sont plus ou moins fréquents selon les taxons. Chez les unicellulaires, les espèces étudiées (*Cryptococcus neoformans*, *Physarum polycephalum*, *Chlamydomonas reinhardtii*) montrent une destruction active de l'ADN mitochondrial (ADNmt) d'un des parents peu après la fusion. Des nucléases sont impliquées dans la dégradation de l'ADNmt (cf. déterminisme génétique ci-dessous), mais les causes de la dégradation spécifique de la moitié des ADNmt seulement sont inconnues. Chez les animaux, les mitochondries du spermatozoïde ayant réussi à passer dans le cytoplasme de l'ovule dégénèrent petit à petit pendant les premières étapes du développement. Cette dégradation est activée par l'ubiquitination de l'ADNmt d'origine paternelle, réalisée pendant la spermatogénèse. Chez les Angiospermes, il semble que ce soit la combinaison de plusieurs mécanismes qui permette d'assurer une hérédité strictement uniparentale. On trouve des mécanismes d'exclusion physique pendant la formation des deux gamètes dans le grain de pollen², particulièrement étudiés chez *Nicotiana tabacum* et *Plumbago zeylanica*, ainsi que des mécanismes actifs, faisant intervenir des enzymes de digestion (Mogensen, 1996). Contrairement à ce qui se passe chez les unicellulaires, cette digestion semble toujours avoir lieu avant la fécondation. Chez certaines espèces, on a pu montrer que les mitochondries présentes dans le tube pollinique ne contenaient plus d'ADNmt et Corriveau and Coleman (1991) et Nagata et al. (1999) ont montré qu'il y avait une bonne corrélation entre la présence d'ADNmt dans les gamètes mâles et l'hérédité des organites. Il est cependant peu probable que toutes les espèces chez lesquelles la présence d'ADNmt a été détectée dans les gamètes mâles aient une hérédité biparen-

2. Rappel sur la double fécondation des angiospermes : le grain de pollen est composé de deux cellules, la cellule végétative (2n, qui donnera le tube pollinique) et la cellule génératrice (n) qui donnera par mitose deux gamètes. Lors de l'arrivée du tube pollinique dans le sac embryonnaire, l'un des gamètes mâles fusionne avec la cellule-œuf pour donner le zygote et l'autre avec les noyaux polaires (2 ou plus) pour donner le futur endosperme.

tale (Zhang et al., 2003) et celle-ci doit être vérifiée à l'aide de marqueurs génétiques. Chez les gymnospermes, c'est le plus souvent la localisation des organites dans la cellule-œuf qui détermine l'hérédité des organites (Mogensen, 1996) et un mécanisme unique semble être impliqué pour chaque espèce. Chez les algues pluricellulaires, la destruction des ADN mitochondriaux et chloroplastiques semble s'effectuer pendant la spermatogenèse et non à la fusion comme chez les algues vertes unicellulaires (voir l'exemple de *Bryopsis maxima*, Kuroiwa and Hori, 1986).

4.2.2 Déterminisme génétique de l'hérédité des organites

Contrairement à ces mécanismes, le déterminisme de l'hérédité des organites est presque totalement inconnu. En dehors de quelques espèces unicellulaires pour lesquelles on dispose d'informations assez précises, les études restent parcellaires et donnent parfois des résultats contradictoires, probablement le signe d'un déterminisme complexe.

Chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, le type sexuel (*mating type*; mt+ ou mt-) détermine le parent qui transmet les organites. L'exclusion des organites de l'autre parent se fait par dégradation de l'ADN dans les quelques heures qui suivent la fusion. On sait qu'une nucléase Ca^{2+} dépendante, produite par le type sexuel mt+ et ciblant spécifiquement l'ADN chloroplastique (ADNcp) du parent mt- est impliquée, mais on ne connaît pas encore sa position dans le génome ni son lien avec le locus de type sexuel (Nishimura et al., 2002). Il a été proposé que l'ADN du parent transmettant ses mitochondries soit protégé par méthylation. Chez le myxomycète *Physarum polycephalum*, la digestion de l'ADN est similaire à celle décrite chez *Chlamydomonas*; mais *Physarum* possédant non pas deux mais treize sexes, la capacité d'un parent à transmettre ses mitochondries dépend du sexe de son partenaire (Moriyama and Kawano, 2003). Chez cette espèce, la digestion fait intervenir au moins deux nucléases (l'une Ca^{2+} dépendante, l'autre Mn^{2+} dépendante) qui sont importées dans les mitochondries pour dégrader l'ADNmt (Moriyama et al., 2005). Chez le basidiomycète *Cryptococcus neoformans*, où le type sexuel détermine également l'hérédité des organites, Yan et al. (2007) ont pu déterminer deux gènes, SXI1 α , exprimé chez le type sexuel α et SXI2a, exprimé chez le type sexuel a, qui coordonnent le contrôle de l'hérédité mitochondriale. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dont l'hérédité est biparentale, la ségrégation des mitochondries lors du bourgeonnement de la levure est liée au cytosquelette d'actine et la totalité des gènes impliqués dans la ségrégation seraient en rapport avec le cytosquelette (Frederick et al., 2008). Plus généralement, les gènes du cytosquelette pourraient être impliqués dans l'hérédité des organites chez les espèces où l'hérédité est déterminée par la ségrégation des organites lors des mitoses pré- ou post-fécondation.

À ma connaissance, on ne connaît presque rien au déterminisme génétique de l'hérédité des organites chez les animaux, l'hérédité étant soumise à très peu de variation, et suscitant donc un intérêt modéré. Chez les plantes, en revanche, les espèces montrant des écarts à la règle de l'uniparentalité sont plus nombreuses (sur-

tout pour les chloroplastes) et ont parfois fait l'objet d'études génétiques. Les plantes panachées constituent un modèle historique pour étudier l'hérédité des chloroplastes. Ces plantes, qui présentent un feuillage mi-vert mi-blanc, sont hétéroplasmiques et possèdent des chloroplastes verts normaux et des chloroplastes blancs. Elles représentent un des rares exemples où la fuite paternelle d'organites est phénotypiquement remarquable et ont pour cela été étudiées assez tôt. Chez *Pelargonium*, il a été montré que l'hérédité du chloroplaste dépendait du génome du plaste (Tilney-Bassett and Birky, 1981), du génome nucléaire maternel (Tilney-Bassett and Birky, 1981), et du génome nucléaire paternel, agissant sur un mode gamétophytique (Derepas and Dulieu, 1992; Dulieu et al., 1990). L'influence du génome du plaste et du génome nucléaire a également été trouvée chez *Oenothera* (Chiu and Sears, 1993) mais dans ce cas, c'est le niveau de compatibilité entre les chloroplastes et le noyau qui déterminerait quel chloroplaste est conservé. La transmission des plastes paternels serait également négativement corrélée à la longueur du style (c.-à-d. au temps nécessaire à l'élongation du tube pollinique). Les informations concernant le génome mitochondrial sont plus rares. Cependant, des études récentes chez *Silene vulgaris* ont montré que le taux de fuite paternelle de mitochondries était très dépendant du croisement (McCauley et al., 2005; Welch et al., 2006), avec un rôle prédominant du donneur de pollen (Bentley et al., 2010). Au contraire, chez *Brassica napus*, les génomes maternel et paternel semblent impliqués, suggérant un contrôle coordonné par le pollen et les ovules (Erickson and Kemble, 1993).

4.3 Quelques cas d'uniparentalité hors normes

Avant de passer aux exceptions à l'uniparentalité, nous allons voir quelques cas d'uniparentalité assez étonnants. Reprenons tout d'abord le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*. Si les mécanismes et la génétique de cette espèce sont assez conformes à ce qui se passe chez les autres unicellulaires bien étudiés, elle présente quand même une particularité. En effet, l'hérédité des organites est uniparentale mais l'ADNmt est transmis par le parent de type mt− et l'ADNcp (ADN chloroplastique) par le parent de type mt+. On ne sait malheureusement pas encore si les deux mécanismes de dégradation ont évolué de façon indépendante, ni si cette hérédité croisée a une valeur adaptative. Ce mode d'hérédité croisée se retrouve chez la majorité des gymnospermes, chez qui les chloroplastes sont transmis paternellement alors que les mitochondries sont généralement transmises maternellement (avec quelques exceptions comme le Séquoia, qui présente une hérédité paternelle des mitochondries et des plastes). Cet exemple illustre à quel point l'anisogamie peut être dissociée de l'hérédité des organites.

Si les animaux présentent peu de variabilité dans l'hérédité des organites, c'est aussi chez eux que l'on trouve des choses parmi les plus étranges. Chez quelques bivalves (p. ex. *Mytilus edulis* ou *Anodonta grandis*), les femelles portent l'ADNmt de leur mère tandis que les mâles portent l'ADNmt de leur mère dans les tissus somatiques et l'ADNmt de leur père dans les cellules de la lignée germinale (syn-

thétisé par Korpelainen, 2004; Xu, 2005). L'ADNmt est ainsi hérité de mère en fille et de père en fils et les deux lignées de génomes mitochondriaux évoluent de façon plus ou moins indépendante et présentent jusqu'à 30% de divergence (des événements de recombinaison se produisent de façon occasionnelle). Le mécanisme de ce phénomène, appelé hérédité uniparentale double, n'est pas encore entièrement élucidé mais il semble qu'une ségrégation hétérogène contrôlée des mitochondries au cours des premières divisions soit impliquée (Cao et al., 2004; Cogswell et al., 2006). Quant à l'éventuelle valeur adaptative de ce système, elle reste inconnue même si l'existence de deux lignées de mitochondries pourrait avoir favorisé une spécialisation de chacune des deux lignées à un sexe, par exemple, via la sélection de mutations bénéfiques pour un sexe mais défavorable à l'autre (Burt and Trivers, 2006).

Ces observations soulèvent la question de l'hérédité maternelle : puisque l'anisogamie ne semble pas être une contrainte insurmontable pour la transmission des organites, pourquoi celle-ci est-elle presque toujours maternelle et pas paternelle ? Une première hypothèse réside dans les besoins énergétiques des deux gamètes : le gamète nécessitant l'activité mitochondriale (et chloroplastique) la plus importante serait plus adapté à la transmission du cytoplasme car la présence d'organites dans le gamète serait nécessaire à son fonctionnement. Le gamète femelle étant le gamète de réserve, il est possible que celui-ci soit plus dépendant de l'activité mitochondriale que le gamète mâle (même si cette affirmation est discutable chez les animaux où la motilité du gamète mâle requiert beaucoup d'ATP). Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi les gymnospermes transmettent plus souvent leurs organites paternellement. En effet, la croissance très longue (un à deux ans) du tube pollinique, caractéristique de ce groupe, pourrait nécessiter une activité métabolique élevée chez le gamétophyte mâle. Une autre hypothèse invoque la variation du taux de mutation dans les deux lignées germinales. On sait que chez les animaux, les génomes hérités paternellement sont sujet à un taux de mutation plus élevé que les génomes hérités maternellement. Le nombre de divisions plus important dans la lignée mâle, menant à une accumulation d'erreurs au fur et à mesure des réplifications, est souvent invoqué pour expliquer cette observation. De plus, cette tendance a été confirmée chez les gymnospermes, chez lesquelles il a été montré que les ADN cytoplasmiques hérités paternellement étaient soumis à un taux de mutation plus élevé que les ADN cytoplasmiques hérités maternellement³ (Whittle and Johnston, 2002). Sous cette hypothèse, la transmission maternelle des génomes cytoplasmiques permettrait de limiter l'accumulation des mutations délétères, déjà importante dans ces génomes.

4.4 L'héréroplasmie

Nous avons vu dans le début de ce chapitre que très souvent chez les Eucaryotes, les organites étant transmis uniparentalement. Pourtant, l'hérédité biparentale est

3. Cette variation est plutôt surprenante chez les plantes dont les lignées germinales ne se distinguent que très tard des lignées somatiques.

courante dans certains taxons et constitue même la règle chez certaines espèces. D'autre part, même chez des espèces dont l'hérédité maternelle était supposée acquise, de plus en plus d'exceptions sont détectées. La conséquence immédiate de l'hérédité biparentale des organites, qu'elle soit occasionnelle ou régulière, est la co-existence au sein d'un individu de deux génomes qui peuvent être différents. Ce phénomène, appelé hétéroplasmie, est assez mal connu, en partie parce que les espèces les mieux étudiées ont très majoritairement une hérédité uniparentale des organites et sont donc presque toujours homoplasmiques. Pour cette raison et afin d'avoir une vision plus complète de ce phénomène, j'ai inclus dans cette section les cas d'hétéroplasmie issue de l'hérédité biparentale et des cas d'hétéroplasmies ayant d'autres origines. D'autres origines ? Commençons par là.

4.4.1 Les origines de l'hétéroplasmie

Lorsque de l'hétéroplasmie est détectée chez une espèce, l'une de ces quatre origines est généralement invoquée :

- La transmission biparentale, régulière ou occasionnelle, des génomes cytoplasmiques. Le niveau d'hétéroplasmie résultant dépend des règles d'appariement des partenaires, de la présence ou non d'autofécondation, de la proportion d'ADN transmis par chacun des parents, etc.
- L'apparition de mutations ponctuelles, au moment de la réplication ou de la réparation de l'ADN. Ces mutations peuvent a priori toucher des zones codantes ou non codantes mais seront plus rapidement éliminées – et donc moins probablement détectées – si elles touchent des zones codantes.
- Des modifications de l'organisation du génome par recombinaison, pouvant entraîner des duplications ou des délétions (pour les détails, voir plus bas).
- Le maintien d'une hétéroplasmie préexistante. Même si ce n'est pas une origine en soi, le maintien de l'hétéroplasmie d'une génération à l'autre est souvent invoqué pour expliquer des cas d'hétéroplasmie lorsque la véritable origine n'est pas accessible car trop ancienne. Cet aspect sera traité en détail dans la section 4.4.3.

Chez les animaux, l'hétéroplasmie est le plus souvent imputée à l'apparition de mutations ponctuelles. En effet, le taux de mutation dans le génome mitochondrial des animaux est 15 à 20 fois plus élevé que celui du génome nucléaire, les composés oxydants présents dans les mitochondries ayant une forte responsabilité dans cette différence. Au contraire, chez les plantes, les taux de mutation des génomes mitochondriaux et chloroplastiques sont respectivement 6 et 2 fois plus faibles que celui du noyau, grâce à des polymérases spécifiques permettant une grande fidélité dans la réplication⁴. L'apparition de mutations ponctuelles explique donc assez peu de cas d'hétéroplasmie chez les plantes (mais voir l'exemple d'*Olea europaea*, Garcia-Diaz et al., 2003). En contrepartie, le génome mitochondrial des plantes a une structure

4. De ce fait, les zones codantes du génome mitochondrial végétal présentent un polymorphisme très réduit par rapport à celles des animaux.

labile et morcelée, entrecoupée de nombreuses zones intergéniques non-codantes et d'introns qui expliquent sa taille très importante (200 à 2500kb versus 15-20kb chez les animaux). Parmi ces séquences inter-géniques non codantes figurent de longues séquences répétées, typiques des végétaux, au niveau desquelles ont lieu de fréquents événements de recombinaison (Backert et al., 1997). À cause de ces recombinaisons, le génome mitochondrial est souvent réparti dans plusieurs molécules d'ADN, parfois redondantes, et ce morcellement peut conduire à un contenu différent des cellules en ADN mitochondrial (Kmiec et al., 2006). Pour cette raison, on lit parfois que les plantes présente un taux très fort d'hétéroplasmie mais cette hétéroplasmie n'a rien à voir avec une éventuelle fuite de mitochondries par le pollen.

Chez les champignons, l'hérédité biparentale des mitochondries est presque aussi fréquente que l'hérédité uniparentale mais ne résulte en général qu'en une hétéroplasmie transitoire, les cellules (i.e. les individus pour les unicellulaires) devenant assez vite homoplasmiques grâce à la ségrégation des mitochondries lors des mitoses. Au contraire, la détection de cas de transmission paternelle du génome mitochondrial chez les plantes comme chez les animaux reste exceptionnelle bien que les observations se soient multipliées ces dernières années (voir les synthèses de Barr et al., 2005; Kmiec et al., 2006; Korpelainen, 2004; White et al., 2008; Xu, 2005). Les exceptions les plus fréquentes sont celles qui concernent l'hérédité chloroplastique des plantes (p. ex. *Medicago sativa*, *Pelargonium zonale*). Chez les animaux, des cas ont été relevés chez des espèces aussi diverses que l'homme, la souris, le saumon, des lézards, et divers insectes et arachnides dont la drosophile, une espèce de cigale, une espèce de Bombyx, des acariens et des scorpions. Il faut cependant noter que, chez les animaux, la majorité de ces observations ont été faites lors de croisements interspécifiques (cf. Barr et al., 2005, et en particulier la figure 1), une tendance qui pourrait s'interpréter de deux manières :

- Pour détecter de la fuite paternelle, il faut que les génomes mitochondriaux des deux parents soient différents. La variabilité intraspécifique du génome mitochondrial chez les animaux étant très faible, il est plus facile de détecter de la fuite paternelle lors de croisements inter-spécifiques.
- Les mécanismes d'hérédité pourraient être spécifiques et ne pas être fonctionnels en cas de croisements interspécifiques. On ne dispose pas pour l'instant d'assez d'informations sur le contrôle de l'hérédité des organites pour pouvoir faire des comparaisons entre espèces. Cependant, on sait que les régulations entre le noyau et les organites sont nombreuses, presque ubiquitaires chez les Eucaryotes, mais assurée par des protéines et des mécanismes très peu conservés pouvant expliquer un dérèglement en cas de croisement interspécifique (Woodson and Chory, 2008).

4.4.2 Les différents niveaux d'hétéroplasmie

L'hétéroplasmie peut être observée à chaque niveau d'organisation contenant plusieurs copies du génome cytoplasmique, c'est-à-dire les organites, les cellules et

les individus. Même si très peu d'études ont pu déterminer expérimentalement à quel niveau se situait l'hétéroplasmie observée, il convient de distinguer ces niveaux (au moins conceptuellement) car leurs conséquences évolutives diffèrent.

- *Hétéroplasmie au sein des organites*. Chaque organite contient plusieurs copies du génome qui peuvent différer. Les différents ADN sont potentiellement soumis à la sélection (p. ex. via une vitesse de réplication différente des ADN). Chez les plantes, ces ADN peuvent recombinaison entre eux (chez les animaux, ce point fait encore débat, cf. Barr et al., 2005).
- *Hétéroplasmie au sein des cellules*. La composition en ADN peut varier entre les organites lorsque la cellule en possède plusieurs, ce qui est majoritairement le cas (p. ex. les plantes possèdent en moyenne 200 mitochondries par cellule). Ces différences sont essentiellement dues à une répartition inégale de l'ADN lors des divisions des organites ou à des événements de fusion/scission des organites, connus chez les plantes (Arimura et al., 2004; Sheahan et al., 2005). Ce niveau est sujet à la dérive et à la sélection.
- *Hétéroplasmie au sein des individus*. Les cellules composant un organisme pluricellulaire peuvent porter des génomes cytoplasmiques différents, principalement à cause de la répartition stochastique des organites au moment des mitoses. Ce niveau est également sujet à la dérive et à la sélection mais contrairement à la sélection intracellulaire (inter-molécules ou inter-organites), cette dernière favorisera a priori l'ADN fonctionnel.

Il est important de noter que seul le premier niveau – et éventuellement le deuxième niveau en cas d'évènement de fusion entre organites – peut donner lieu à une recombinaison entre différents génomes. L'hétéroplasmie peut exister simultanément à plusieurs niveaux, comme cela a été montré chez un mutant de coton panaché comportant des cellules aux plastides normaux, des cellules aux plastides blancs, et des cellules avec un mélange de plastides (Lax et al., 1987).

4.4.3 Le maintien et la transmission de l'hétéroplasmie

Chez l'homme, les mutations mitochondriales sont associées à de nombreuses maladies (cécité, myopathie, maladie de Parkinson et Alzheimer, etc.) et ces mutations pathogéniques sont presque toujours portées à l'état hétéroplasmique, la mutation étant létale à l'état homoplasmiq. À l'exclusion d'un cas d'hétéroplasmie par fuite paternelle chez l'homme (Schwartz and Vissing, 2002), ces hétéroplasmies pathogéniques sont expliquées par l'apparition de mutations somatiques ou germinales et/ou par le maintien de l'hétéroplasmie d'une génération à l'autre. L'étude de la transmission de ses pathologies a donc stimulé de nombreuses recherches sur les variations du niveau d'hétéroplasmie entre tissus, au cours de la vie et entre générations, chez l'homme et quelques modèles de mammifères. Dans cette section, je présenterai ces données, ainsi que celles, plus rares, obtenues chez les autres animaux et les végétaux, en distinguant les variations du niveau d'hétéroplasmie à l'échelle de l'individu et la transmission de l'hétéroplasmie à la descendance.

4.4.3.1 Variation du niveau d'hétéroplasmie au cours de la vie et entre tissus

Malgré les nombreuses études ayant étudié la variation du niveau d'hétéroplasmie au cours de la vie chez les animaux, il n'existe pas de consensus. Chez l'homme, il semblerait que l'ADNmt muté ait tendance à s'accumuler avec l'âge (White et al., 2008), tandis que chez les autres animaux, certains tissus montreraient une augmentation de la proportion d'ADNmt muté et d'autres une diminution. Cette ségrégation des ADNmt pourrait être sous le contrôle de gènes nucléaires (Battersby et al., 2003, et références incluses). La majorité des mutants hétéroplasmiques étudiés portant des mutations a priori neutres, l'importance de la sélection a été négligée jusqu'à récemment (Chinnery et al., 2000). Cependant, des souris hétéroplasmiques pour une mutation délétère ont permis de montrer que l'ADNmt mutant s'accumulait dans la plupart des tissus au cours de la vie, sauf dans la lignée germinale femelle, où une sélection intra-cellulaire permettrait d'éliminer progressivement les ADNmt mutés (Sato et al., 2007). L'existence d'une sélection entre ADNmt a également été démontrée chez le genre *Drosophila* grâce à des individus hétéroplasmiques générés par fuite paternelle lors de croisements inter-spécifiques. Il semblerait que l'ADNmt favorisé soit celui offrant la meilleure compatibilité avec le fond génétique nucléaire (voir la synthèse de Korpelainen, 2004). Au contraire, chez l'acarien *Tetranychus urticae*, Van Leeuwen et al. (2008) ont montré qu'il n'existait pas de sélection intra-individuelle entre les différents ADNmt d'individus hétéroplasmiques pour une mutation de résistance à des insecticides. Cette mutation, présente dans les populations naturelles à l'état hétéroplasmique est en revanche positivement sélectionnée à l'échelle individuelle (avantage des résistants).

Chez les plantes, le niveau d'hétéroplasmie serait susceptible de varier entre les tissus mais cela n'a été démontré que chez *Senecio vulgaris*, grâce à l'observation dans les populations d'individus hétéroplasmiques pour une mutation chloroplastique induisant une résistance à la triazine (Frey et al., 2005). Le rôle de la dérive et de la sélection dans ces variations est inconnu. Cependant, des expériences réalisées à partir de cellules dérivées de protoplastes ont permis d'aller plus loin dans les mécanismes cellulaires impliquées. On peut par exemple citer les travaux de Albert et al. (2003) qui démontrent chez *Nicotiana* que les différents ADNmt sont soumis à des sélections différentes et que le génome nucléaire aurait un rôle dans la régulation de leur réplication.

4.4.3.2 Transmission de l'hétéroplasmie lors de la reproduction

Les études sur la transmission de l'hétéroplasmie de générations en générations sont un peu plus unanimes. Chez la vache, la souris et l'homme, il a été montré qu'une mère hétéroplasmique pour un mutant a priori neutre produisait des descendants avec des niveaux d'hétéroplasmie très variables, allant jusqu'à la fixation ou la perte du mutant en une génération (synthétisé par Chinnery et al., 2000; Kmiec et al., 2006). Ces variations seraient la conséquence d'un bottleneck dans la popula-

tion de mitochondries au niveau de la lignée germinale et de la forte dérive associée. L'existence d'un tel bottleneck est avérée chez les mammifères, même si le moment précis de cet événement reste discuté (Cao et al., 2007; Cree et al., 2008). Il pourrait résulter d'une réduction de la quantité d'ADNmt par cellule mais aussi de l'agrégation de l'ADNmt en nucléoïdes, qui réduirait le nombre d'unités de ségrégation, ou d'une réplication préférentielle de certaines mitochondries (on sait par exemple que les mitochondries proches du noyau se répliquent mieux, cf. Davis and Clayton, 1996). La moyenne du taux d'hétéroplasmie chez les descendants étant souvent proche du niveau d'hétéroplasmie de la mère, le rôle de la sélection serait minime par rapport à celui de la dérive (Chinnery et al., 2000; Jenuth et al., 1996). Des résultats équivalents ont été trouvés chez l'acarien *Tetranychus urticae*, où les individus hétéroplasmiques transmettent les haplotypes résistants et sensibles à leurs descendants dans des proportions très variables mais en moyenne équivalentes à celles de la mère. Van Leeuwen et al. (2008) estiment l'existence d'un bottleneck à environ 180 copies.

Théoriquement, l'hétéroplasmie devrait être moins bien transmise chez les plantes que chez les animaux du fait de la séparation tardive entre lignée germinale et lignée somatique chez les plantes permettant une ségrégation plus efficace des organites. Cet attendu a été confirmé chez *Medicago truncatula* et des cultivars de *Pelargonium*, où la ségrégation des chloroplastes semble être (quasi)totale en une génération (Matsushima et al., 2008; Tilney-Bassett and Birky, 1981). Tilney-Bassett and Birky (1981) suggèrent un fort rôle de la dérive lors des premières divisions du zygote et en particulier lors de la séparation de la cellule basale (futur suspenseur) qui ne participe pas au pool génétique de l'embryon. Au contraire, chez *Senecio vulgaris*, Frey (1999) a observé que l'hétéroplasmie était très bien maintenue d'une génération à l'autre, même lorsque les plantes n'étaient pas traitées à la triazine (ce maintien est étonnant car la mutation résistante est associée à un fort coût et devrait donc être rapidement contre-sélectionnée). Un cas de transmission intermédiaire a également été observé chez un mutant panaché du coton. Lax et al. (1987) ont montré que l'hétéroplasmie était transmise de mère en descendants mais qu'il était peu probable que l'hétéroplasmie puisse être maintenue pendant de nombreuses générations, les variations inter-générationnelles dans la proportion des deux types de chloroplaste étant trop importantes. Par ailleurs, le rôle de la reproduction sexuée dans la ségrégation de l'hétéroplasmie a été démontré dans deux études, l'une sur l'hétéroplasmie mitochondriale chez l'olivier (*Olea europaea*) et l'autre sur l'hétéroplasmie chloroplastique chez le kiwi (*Actinia deliciosa*). Ces deux études montrent que les arbres issus de la reproduction asexuée d'un arbre hétéroplasmique présentent des taux d'hétéroplasmie beaucoup plus élevés que les arbres issus de la reproduction sexuée du même arbre (Chat et al., 2002; Garcia-Diaz et al., 2003). Les auteurs expliquent leurs résultats par l'existence d'un bottleneck au niveau de la lignée germinale femelle.

Enfin, il existe un cas particulier d'hétéroplasmie chez les plantes qui mérite attention. Le génome mitochondrial des plantes est composé d'une molécule d'ADN principale et d'une multitude d'ADN circulaires plus courts, appelés molécules sub-

génomiques, issus d'évènements de recombinaison réversible. En plus de cette molécule principale et des molécules subgénomiques, on trouve également de courts segments d'ADN, nommés sublimons, qui sont issus d'évènements de recombinaison irréversible de la molécule principale (Kmiec et al., 2006). En général, les sublimons sont présents en petit nombre de copies (environ 1 copie pour 100 cellules) mais ils peuvent atteindre, à la suite de brusques variations dans les proportions de molécules génomiques, un grand nombre de copies. Ces variations seraient contrôlées par des gènes nucléaires qui favoriseraient ou empêcheraient la réplication de certaines des molécules (Shedge et al., 2007; Zaegel et al., 2006). Chez *Brassica napus* et *Phaseolus vulgaris*, il a été montré que les sublimons portaient des gènes de stérilité mâle (CMS) et que les variations brutales de la fréquence des sublimons étaient responsables des réversions du phénotype sexuel (Bellaoui et al., 1998; Janska et al., 1998).

4.5 Les espèces gynodioïques, un cas particulier pour l'hérédité des mitochondries ?

Les espèces gynodioïques ne sont pas tout à fait des espèces comme les autres concernant l'hérédité mitochondriale (McCauley and Olson, 2008). Tout d'abord, la stérilité mâle est un marqueur phénotypique et c'est le phénotype gynomonoïque qui a ouvert la porte aux études sur l'hétéroplasmie mitochondriale (Andersson, 1999; Erickson and Kemble, 1993), tout comme le phénotype panaché avait attiré l'attention sur l'hérédité particulière des chloroplastes. La gynomonoécie pourrait donc être une conséquence spécifique aux espèces gynomonoïques de l'hétéroplasmie résultant d'une transmission biparentale des mitochondries. D'autre part, en plus des conséquences déjà mentionnées ci-dessus (taux d'évolution, absence de recombinaison, etc.), l'hérédité mitochondriale conditionne chez les espèces gynodioïques l'hérédité du phénotype sexuel et potentiellement la stabilité de la gynodioécie. Cette aspect sera traité dans la dernière partie de ce chapitre (cf. p.145). Troisièmement, l'hérédité biparentale occasionnelle, en favorisant une recombinaison efficace, est susceptible de favoriser l'apparition de gènes de stérilité mâle cytoplasmique⁵ et d'expliquer la forte variabilité génétique mitochondriale observée chez plusieurs espèces gynodioïques (Touzet and Delph, 2009). Enfin, d'un point de vue plus pratique, la totalité des études sur le déterminisme génétique chez les espèces gynodioïques sauvages supposent que l'hérédité des mitochondries est strictement maternelle. Si tel n'était pas le cas, ces données devraient être réinterprétées.

5. On rappelle que ces gènes sont des chimères issus de l'assemblage par recombinaison de portions de génome mitochondrial et de séquences non identifiées.

4.5.1 Les preuves expérimentales de la fuite paternelle de mitochondries chez les espèces gynodioïques

Depuis 10 ans, les preuves directes et indirectes d'hétéroplasmie et de la transmission paternelle occasionnelle du génome mitochondrial (=fuite paternelle) se sont accumulées chez les espèces gynodioïques, en particulier au sein du genre *Silene*.

La première preuve, indirecte, a été donnée par Andersson (1999) qui a montré que le phénotype gynomonioïque résultait de la ségrégation de mitochondries mâle-fertiles et mâle-stériles au sein des individus (cf. chapitre 3 p.100). La deuxième preuve, toujours indirecte mais confirmée par de nombreuses études, repose sur la présence de signatures de recombinaison intra- et inter-géniques dans les génomes mitochondriaux de *Silene acaulis* (Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009), *Silene vulgaris* (Houliston and Olson, 2006; McCauley et al., 2005; McCauley and Ellis, 2008; Touzet and Delph, 2009) et *Silene nutans* (Touzet and Delph, 2009)⁶. Ces signatures indiquent que chez ces espèces, une hétéroplasmie transitoire se produit à l'échelle évolutive et permet une recombinaison effective entre les différents génomes mitochondriaux. L'origine de l'hétéroplasmie a été suggérée par des incongruences entre les phylogénies chloroplastiques et mitochondriales chez *Silene vulgaris* (Houliston and Olson, 2006, mais voir aussi Olson and McCauley, 2000), incompatibles avec une hérédité mitochondriale et chloroplastique purement maternelle.

Récemment, une série d'études chez *Silene vulgaris* a permis de démontrer plus directement l'occurrence de la fuite paternelle et son lien avec l'hétéroplasmie. En 2005, McCauley et al. ont génotypé 318 descendants issus de 23 croisements contrôlés, grâce à des polymorphismes RFLP aux loci mitochondriaux *atp1* et *cox1*. Une hérédité maternelle n'a été trouvée que dans 96% des cas, avec des exceptions réparties dans 4 des 23 croisements. Parmi elles, les descendants portaient parfois l'haplotype paternel, et parfois, plus étonnamment, des génotypes n'appartenant à aucun des deux parents. Les auteurs suggèrent que l'apparition mystérieuse de ces génotypes pourrait provenir d'une mère « hétéroplasmique cryptique », c'est-à-dire possédant deux génomes en stoechiométrie si déséquilibrée que l'un d'entre eux ne serait pas détectable. Le ratio entre les deux génomes pourrait être modifié d'une génération à l'autre, par dérive et/ou sélection, expliquant la détection chez les descendants d'un haplotype majoritaire différent de celui de la mère. Afin de détecter l'hétéroplasmie et de résoudre certains de ces cas d'hérédité surprenante, McCauley et al. ont développé une méthode astucieuse qu'ils ont appelé la méthode *knockback*. La méthode profite du fait que seuls certains haplotypes parentaux présentaient des sites de restriction pour une enzyme de restriction donnée. Supposons par exemple que A et B sont deux haplotypes et que la séquence de A possède un site de res-

6. La majorité de ces études reposent sur la règle des quatre gamètes : en l'absence de recombinaison et d'évolution convergente, on s'attend, en étudiant le polymorphisme à deux locus A et B, à trouver trois des combinaisons d'allèles, par exemple, A1B1, A2B1 et A1B2. À l'exception de l'apparition d'une mutation dans deux lignées indépendantes, seule la recombinaison peut générer la quatrième combinaison A2B2. L'observation répétée des 4 combinaisons d'allèles pour plusieurs couples de loci polymorphiques constitue donc une preuve de la recombinaison.

triction pour l'enzyme utilisée mais que celle de B n'en possède pas. Grâce à cette méthode, on pourra vérifier si un individu auquel on a attribué l'haplotype A lors d'un génotypage préalable ne porte pas l'haplotype B en quantité minime et n'est pas un individu hétéroplasmique cryptique. Pour cela, il suffira de digérer l'ADN de l'individu avec l'enzyme de restriction avant de faire le génotypage par PCR-RFLP : si l'individu est homoplasme, l'ADN de l'haplotype A sera digéré et on obtiendra un nul. Si l'individu est hétéroplasmique, l'haplotype A sera digéré, seul l'haplotype B sera amplifié par PCR et le génotype détecté sera B. Tous les haplotypes ne différenciant pas par leurs sites de restriction, cette méthode ne révèle qu'une partie de l'hétéroplasmie. Malgré cela, sur 99 descendants testés par cette méthode, McCauley et al. ont trouvé 23 individus hétéroplasmiques, retrouvant parfois l'haplotype maternel chez des descendants portant un haplotype majoritaire non maternel.

À la suite de ces premiers résultats, Welch et al. (2006) ont étudié la fréquence de l'hétéroplasmie dans trois populations naturelles de *Silene vulgaris*. 18 plantes mères et 106 de leurs descendants ont d'abord été génotypés par PCR-RFLP aux loci *cox1* et *atp1*. Aucun polymorphisme n'a été détecté dans deux des populations, mais dans la troisième, polymorphique, 40% des descendants ne portaient pas l'haplotype de la mère (14% toutes populations confondues). Grâce à un autre génotypage, par PCR quantitative cette fois, Welch et al. ont détecté 15% de descendants hétéroplasmiques dans la population polymorphique. Dans cette même population, l'association de la PCR quantitative et de la méthode *knockback* a permis de détecter 57% de mères hétéroplasmiques (n=7) et 54% de descendants hétéroplasmiques (n=39).

L'étude de Pearl et al. (2009) a confirmé ces résultats sur un échantillon plus important comprenant 408 individus issus de 22 populations de la côte Est des États-Unis. L'analyse par PCR quantitative + *knockback* a mis en évidence 61 individus hétéroplasmiques à l'un des deux loci au moins, répartis dans 18 populations. Selon les auteurs, ce taux sous-estimerait au moins de moitié le taux réel d'hétéroplasmie, la structure géographique et l'autofécondation pouvant augmenter les croisements entre individus au génome mitochondrial identique, croisements dans lesquels l'hétéroplasmie n'est pas détectable. Pearl et al. ont également étudié la transmission de l'hétéroplasmie et ont montré que plus de 50% des cas d'hétéroplasmie résultaient d'une fuite paternelle lors de la dernière fécondation, les autres cas s'expliquant par la transmission de l'hétéroplasmie par la mère. En cas de fuite paternelle, le génome paternel représenterait en moyenne 12% du génome des descendants, avec cependant une distribution bimodale (majorité de transmissions paternelles minimales ou presque totales).

La dernière étude publiée, chez *Silene vulgaris* toujours, dresse une description très complète du lien entre fuite paternelle et hétéroplasmie (Bentley et al., 2010). Cette étude utilise, comme celle de 2005, des croisements contrôlés, mais inclut cette fois des croisements entre parents d'haplotypes différents (pour tester la fuite paternelle), des parents de même haplotype (témoin) et des croisements impliquant une mère hétéroplasmique (pour tester la transmission de l'hétéroplasmie). Cette étude

a montré que la transmission n'était pas maternelle dans 2,5% des cas (n=1200 descendants génotypés), dont 0,2 à 1% pourrait être imputable à des faux engendrés par des pollinisations parasites, des erreurs d'étiquetage, des contaminations de l'ADN, etc. (n=500 descendants témoins). Dans cette étude comme dans toutes les précédentes, le taux de fuite est très dépendant du croisement mais ici, Bentley et al. (2010) démontrent que la population d'origine du donneur de pollen a un effet tandis que celle du donneur d'ovule n'en a pas. L'étude de la transmission de l'hétéroplasmie donne des résultats cohérents avec ceux obtenus par Pearl et al. (2009), avec une transmission de l'hétéroplasmie de la mère aux descendants dans environ 17% des cas et une contribution paternelle moyenne en cas de fuite de 28%.

En parallèle de ces études sur l'hérédité des mitochondries, McCauley et al. (2007) ont étudié l'hérédité des chloroplastes, toujours chez la même espèce, et ont détecté une hérédité non maternelle chez 5% des descendants de croisements contrôlés et 2% des individus testés en populations naturelles. Aucun lien entre les occurrences de fuite paternelle de chloroplastes et de mitochondries n'a pour l'instant pu être établi.

La quasi-totalité des études ayant été réalisés chez *Silene vulgaris*, nous avons voulu voir si le fort taux de fuite paternelle observé chez cette espèce était un phénomène très spécifique ou plus général chez les espèces gynodioïques. Nous avons donc testé l'hérédité des mitochondries chez *Silene nutans* et les résultats (préliminaires) sont présentés dans le court article suivant.

ARTICLE 4

Mitochondrial inheritance in *Silene nutans*

(ongoing work)

Introduction

In angiosperms, the mitochondrial genome is generally thought to be maternally inherited but the occurrence of non-maternal inheritance and heteroplasmy and their evolutionary consequences have been reconsidered recently (see Barr et al., 2005; Kmiec et al., 2006; Korpelainen, 2004; White et al., 2008; Xu, 2005 and section p.119 for further details).

Inheritance of the mitochondrial genome is of particular importance in gynodioecious species for several reasons (McCauley and Olson, 2008). First, mitochondrial genes are implicated in sex determination and their transmission should influence the evolution of gynodioecy. More precisely, paternal transmission of mitochondria is expected to reduce the advantage of the male-sterile cytoplasm (see Wade and McCauley, 2005 and section p.145). Second, heteroplasmy and recombination could enhance the emergence of new CMS genes, that result from recombination, and could explain why gynodioecious species present a higher mitochondrial diversity than closely related non-gynodioecious species (Touzet and Delph, 2009). Third, lots of crossing studies have assumed maternal inheritance and paternal leakage can provide a new framework for interpreting empirical results. Lastly, heteroplasmy could be implicated in gynomonoeacy, the co-occurrence of pistillate and perfect flowers on the same plant (Andersson, 1999). Therefore a good knowledge of the transmission of the mitochondrial genome is needed to understand the evolutionary dynamics of gynodioecy (McCauley and Olson, 2008).

Recently, evidence for paternal leakage and heteroplasmy has been found in the genus *Silene*. Particularly in *Silene vulgaris* paternal transmission of mitochondria has been clearly demonstrated (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006) and because this is a gynodioecious species, this poses important questions about the role of mitochondrial transmission, recombination and heteroplasmy in the evolution and maintenance of this plant reproductive system. Furthermore, evidence of mitochondrial recombination, which can only occur if there is heteroplasmy, has been found in *Silene acaulis* and *Silene nutans* (Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009), making these species logical models for testing for the occurrence of non-maternal mitochondrial transmission. Here we characterise the mitochondrial genotypes of offspring from a series of crosses between parents of *Silene nutans* that differ in mitochondrial markers to investigate the occurrence and frequency of paternal mitochondrial transmission.

Material and methods

In order to determine the transmission of the mitochondrial genome in *Silene nutans*, we genotyped offspring from crosses between parents of different *cox1* (cytochrome oxidase) haplotypes in a crossing procedure described in ARTICLE 1 (p.50). If the inheritance of the mitochondrial genome is maternal and if the mother carries a unique mitochondrial genome, mother and offspring should carry the same haplotype, excluding mutation. Moreover, we were able to distinguish paternal inheritance

from mutation because parents differed by at least 3 sites (all information about the sequences we used is available in the Supplementary Table 1 of ARTICLE 1, p.65).

Paternal leakage is expected to be a rare event and was shown to be highly cross-dependent or population-dependant when detected (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Welch et al., 2006). For this reason, we used a large sample ($n=1113$) of offspring from 36 different crosses. Assuming that paternal leakage occurs at a rate of 4%, which is consistent with most of studies on paternal leakage in *Silene vulgaris* (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006), our sample size allowed us to detect with a 95% probability paternal leakage rates higher than 0.3% (Milligan, 1992). However, if paternal leakage occurs only in some crosses, we should considered the probability of detection independently for each cross and paternal leakage rate would need to be higher than 8.5% to be detected with a 95% probability (cross sample size is approximately $n=35$). The crossing design and the number of offspring obtained for each cross are summarized in TABLE 4.1. Detailed description of the crossing protocol and growing conditions are available in ARTICLE 1. Offspring were named by a first number identifying the cross (see TABLE 4.1) and a progeny number within crosses.

We collected one leaf per plant on young rosettes of approximately 7 cm diameter and stored them in Silica gel (desiccant). Because mitochondrial heteroplasmy has been suggested to be linked with gynomonoeicy (Andersson, 1999), we also collected leaves from different spikes of 16 gynomonoeicous plants during the first flowering season (44 samples). For each sample ($n=1113+44=1157$), total genomic DNA was extracted from a leaf piece using Chelex® (Biorad). Samples were frozen at -80°C for at least two hours and then immediately mixed with $100\mu\text{l}$ of a boiling 5% Chelex® (Biorad) suspension. Samples were vortexed and incubated at 96°C for 10 min, twice. Then samples were put on ice and spun down for 10 min at 6000rpm. $50\mu\text{l}$ of supernatant were taken and stored at -20°C . The *cox1* gene was amplified by polymerase chain reactions (PCR) on the genomic DNA using the primers described in TABLE 4.2. PCR was performed in a total volume of $15\mu\text{l}$ containing 1XPCR buffer with 2mM MgCl_2 , 0.2mM of each dNTP, $0.2\mu\text{M}$ of reverse and forward primers, 0.2mg/mL BSA, 0.375U Taq polymerase (Biolabs) and 6ng of template DNA. PCR conditions were 5 min at 95°C ; 30 cycles of 40s at 95°C , 45s at 58°C and 60s at 72°C ; followed by 10min at 72°C .

Samples were genotyped by the CE-SSCP technique – Single Strand Conformation Polymorphism on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems – on a ABI3100 DNA Sequencer. Denaturation and CE-SSCP fractionation were as described in the ABI3100Avant Reference Guide (Applied Biosystems). The labelled fragments were visualized on an Applied Biosystems DNA analyzer (see Figure 4.1). The GeneScanTM-500 LIZ size standard used in all samples served as an internal ladder to align data from different capillaries and eliminate capillary-to-capillary variability. Parents were included as samples in all runs in order to eliminate run-to-run variability. Samples that were not assigned to the mother haplotype (outliers or assignation to another haplotype) or were not successfully visualized were genotyped

Mother/Father	AU4.4	Q1.2	Q9.8	AMB 9
AU4.4		1 (n=38)	2 (n=38)	3 (n=43)
Q1.2	4 (n=11)		5 (n=36)	6 (n=35)
Q9.8	7 (n=31)	8 (n=39)		9 (n=38)
AMB 9	10 (n=0)	11 (n=0)	12 (n=39)	

Mother/Father	AU3.16	Q1.1	Q9.5	AMB 13
AU3.16		13 (n=5)	14 (n=33)	15(n=38)
Q1.1	16 (n=22)		17 (n=31)	18 (n=35)
Q9.5	19 (n=29)	20(n=0)		21 (n=38)
AMB 13	22 (n=38)	23 (n=39)	24 (n=37)	

Mother/Father	AU3.22	Q1.7	Q9.11	AMB 5
AU3.22		25 (n=36)	26 (n=38)	27 (n=38)
Q1.7	28 (n=37)		29 (n=38)	30 (n=38)
Q9.11	31 (n=5)	32 (n=35)		33 (n=38)
AMB 5	34 (n=45)	35 (n=37)	36 (n=35)	

TABLE 4.1 – Crossing design. Each of the three replicates include twelve reciprocal crosses between four parents carrying four different haplotypes : AU, Q1, Q9 and AMB (self-replications were not performed). Parents are named by their population of origin (Auvergne AU, Queyras Q, and Ambleteuse AMB), a first number identifying the field collected plant or the mother of the maternal line, and, when necessary, a progeny number in maternal lines. Thus, AMB5, AMB9 and AMB13 are a priori unrelated field collected plants. Q1.2, Q1.1 and Q1.7 are half or full-siblings of the same maternal line, as are Q9.8, Q9.5 and Q9.11 from a different maternal line from the same population. Similarly AU4.4 is from a different maternal line than AU3.16 and AU3.22. Crosses were numbered and the number of offspring we genotyped for each cross is indicated. Three crosses failed to produce fruits.

	primer sequence 5' to 3'	fluorescent dyes
cox1-sscp-F (763)	GTGGTTGCACATTTCCATTATGTA	HEX
cox1-sscp-R (763)	TGCATCGGGAAGAAGGTAAG	6-FAM

TABLE 4.2 – Primers for *cox1* amplification by PCR.

again.

Samples that were not assigned to the maternal haplotype by SSCP-genotyping were sequenced at the *cox1* locus. *Cox1* was amplified with two pairs of primers, *cox1F1/cox1R663* and *cox1F473/cox1R1077* (described in Touzet and Delph, 2009), generating overlapping fragments. PCR conditions were similar to those used for SSCP-genotyping except that the total volume was 25 μ L and TM was 53°C. PCR products were purified using a NucleoFast 96 PCR Kit (MACHEREY-NAGEL) and directly sequenced on both strands, using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an ABI3130Avant DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Results

Of the 1157 samples, 111 were not assigned to the mother's haplotype (outlier or misassignment) by the first SSCP-genotyping run, and among them, 21 were misassigned again by the second run. For both runs, the samples that were not assigned to the mother's haplotype were mostly outliers, not corresponding to any of the parental haplotypes, but a few plants were assigned to an existing parental haplotype that was not the mother's. The first individual, 31#1, had a Q9-mother and a AU-father and was assigned to the Q1 haplotype by the two SSCP-genotyping runs. Because of this unexpected result, a new DNA-extraction was performed on the leaf sample, and another leaf was collected on the plant at the end of the first flowering season. These two additional samples were SSCP-genotyped and assigned to the Q9 maternal haplotype. The second individual, 27#24, was assigned to the Q1 haplotype instead of the AU haplotype, expected under maternal inheritance. This plant was phenotyped as gynomonoecious during the first flowering year, and three additional leaves from three spikes were taken and genotyped. One of them (27#24(1)) was assigned to the AU haplotype, another (27#24(3)) to the Q1 haplotype and the last one (27#24(2)) was a null. On the second SSCP-genotyping run, Q1 and AU haplotypes were not clearly distinguishable and we were able to analyze none of the four samples of 27#24.

We decided to sequence at the *cox1* locus all 21 individuals that had not been assigned to their mother's haplotype on the second SSCP-genotyping run, as well as the four 27#24 samples and the second leaf sample from 31#1. Among the 20 samples that were successfully sequenced, four samples carried a haplotype that differed from the mother's (see TABLE 4.3). Paternal transmission of the mitochondrial genome was shown on one offspring from cross number 21 (21#19) that carried the paternal haplotype AMB. Consistent with what we found by SSCP-genotyping, the first DNA extraction of 31#1 carried the Q1 haplotype and the other leaf carried the Q9 haplotype. Finally, the 27#24 individual gave surprising results. 27#24(1) was shown to carry the maternal haplotype AU but 27#24 and 27#24(3) carried new haplotypes that could have resulted from recombination between the AU and the Q1 haplotypes or mutation. 24#24(2) was not successfully sequenced.

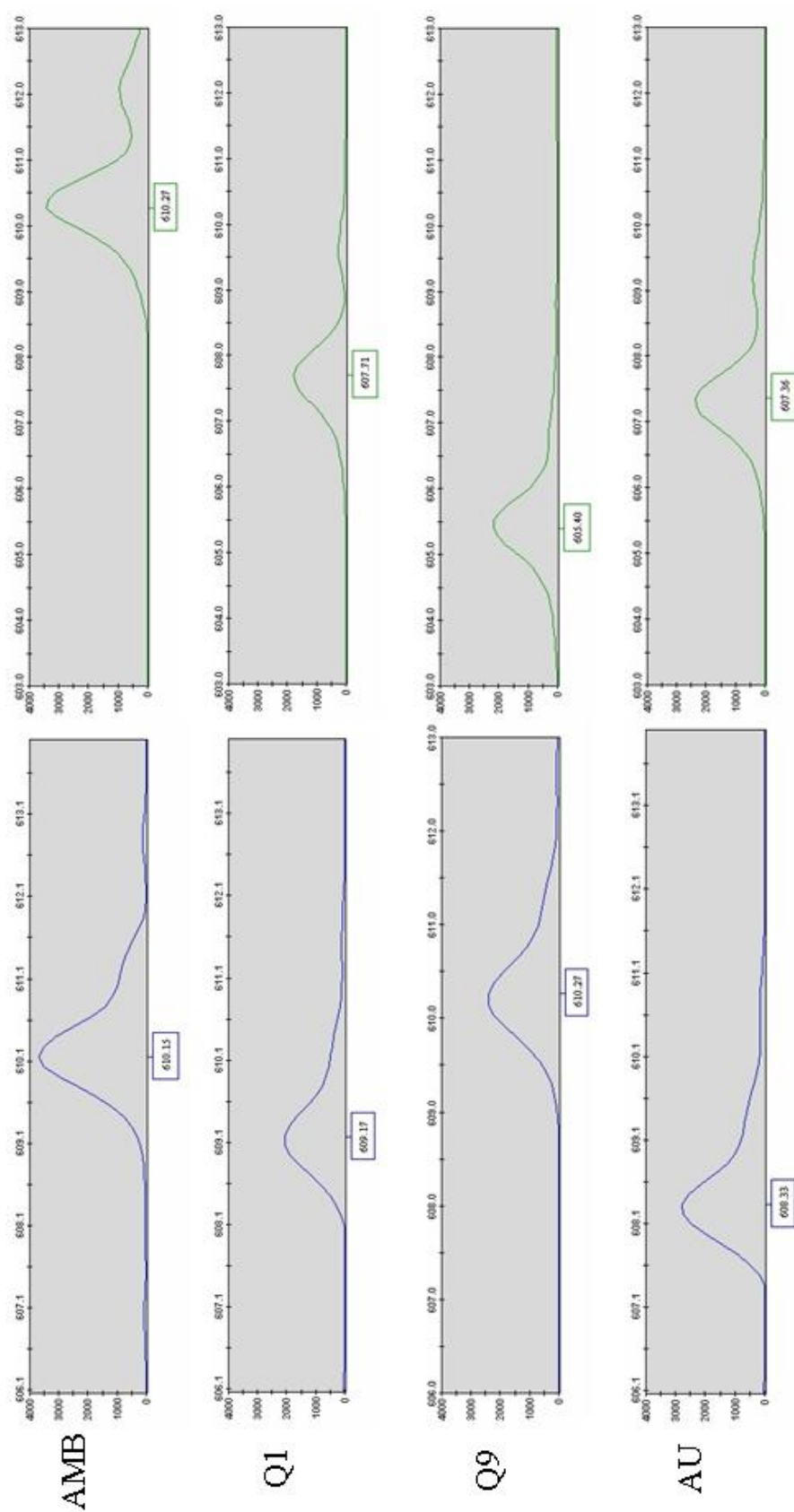


FIGURE 4.1 – Examples of chromatograms obtained from SSCP. Both fluorescent dyes (blue and green) are needed to distinguish the four parental haplotypes.

Haplotype	199	751	763	775	940	954	957	1000	Samples
Q1	C	A	G	G	C	C	C	G	5#23, 6#1, 6#5, 31#1a
AMB	A	.	T	.	T	G	G	.	34#28, 34#29, 34#45, 36#2, 21#19
Q9	A	G	T	.	.	G	.	.	31#1b, 7#13
AU	A	.	.	T	.	G	.	C	1#3, 2#3, 2#8, 3#30, 15#17, 15#22, 27#24(1)
27#24	.	.	.	T	.	.	.	.	
27#24(3)	.	.	.	.	.	G	.	.	

TABLE 4.3 – *Cox1* sequences of samples that were misassigned by SSCP genotyping. 31#1a represent the first DNA extraction performed on one leaf and 31#1b a DNA-extraction performed on a second leaf. 27#24 represent the leaf sampled at the rosette stage and 27#24(1), 27#24(2) and 27#24(3) the leaves sampled on different flowering spikes. We failed to sequence 6 samples (5#6, 5#10, 21#15, 27#12, 27#24(2), 36#22).

Discussion & Future work

We detected only very few cases of non-maternal inheritance. First, 21#19 was shown to carry the paternal haplotype AMB (instead of the maternal Q9 haplotype). Second, 31#1 was shown to carry different sequences on different leaves and different SSCP genotypes for different DNA-extractions from the same leaf, and could therefore be heteroplasmic. Third, a complex case of heteroplasmy was detected on a gynomonoecious plant, 27#24, which carried a mix of the maternal haplotype and two new, original haplotypes. These new haplotypes are likely to result from recombination between the maternal haplotype AU and the Q1 haplotype although mutation cannot be ruled out.

We showed in a previous study (ARTICLE 1) that the AU haplotype and the three other haplotypes represent two distinct CMS. We can thus expect that, in some crosses, non-maternal inheritance would lead to a different sex phenotype than what is expected under maternal inheritance and we looked for such phenotype abnormalities in the three cases of non-maternal inheritance. Unfortunately, for 21#19 and 31#1, the detected haplotype and the maternal haplotype did not carry distinct CMS and we were not able to detect sex phenotype modification due to non-maternal inheritance. However, the individual 27#24 carried a mixture of the AU haplotype and recombinants between the AU and the Q1 haplotypes, that were shown to be two distinct CMS with very different level of restoration (AU was poorly restored and Q1 well restored, see Garraud et al., 2011, in press). Therefore, we could expect that, in the 27#24 individual, heteroplasmy would result in gynomonoecy, and that spikes containing mitochondria with different sequences would vary in sex phenotype. Spikes were roughly similar in their proportion of pistillate flowers. However, 27#24 was mainly hermaphrodite (femaleness : 0.09) whereas females were largely

predominant within the 27th family, which can reflect the presence of the well restored CMS corresponding to the Q1 haplotype. We observed among the 32 offspring belonging to the 27th family three other mainly hermaphrodite gynomonoecious plants and one hermaphrodite and we will examine in the future if they could not reflect other cases of non-maternal inheritance. Indeed, two of them were outliers in at least one SSCP-genotyping run and one of these two was 27#12 that we planned but failed to sequence.

This work is still in progress and the cases of non-maternal inheritance that we detected need to be checked by further samples on plants (if these are still alive) or at least by new DNA extractions. In particular, the result obtained for 31#1 should be reexamined carefully since it could be explained by contamination of the first DNA-extraction. On the other hand, these preliminary analyzes could have missed some cases on non-maternal inheritance. Indeed, the second run of SSCP-genotyping, performed on individuals that were not clearly assigned to the maternal haplotype by the first run, suffered from some technical problems, probably linked to PCR-product age. Analyzes were still possible but the AU and Q1 haplotypes were not clearly distinguishable, which could have led us to miss some cases on non-maternal inheritance. Therefore, SSCP-genotyping will be repeated on these individuals and sequencing will be performed on potential new outliers as well as on the 6 individuals that we failed to sequence the first time.

Our second perspective is to evaluate if our SSCP-genotyping method can detect heteroplasmy. Indeed, in this study, only the most frequent fragment was recorded by the DNA analyzer (higher fluorescent peak). However, several fluorescent peaks can sometimes be visualized and could represent different haplotypes coexisting within individuals. In order to know how to interpret multiple peaks, we mixed DNA from different parents (12 different mixes), and performed the PCR and SSCP-genotyping as usual. For some mix, we were able to visualize double peaks that clearly reflect heteroplasmy. For others, only one haplotype was detected which suggests that either the stoichiometry was under the detection threshold or one haplotype was preferentially amplified during the PCR. We plan to determine the detection threshold by measuring the concentrations of the parents DNA-solutions (NanoDropTM) and mixing parents DNA in controlled stoichiometry (e.g. 1:1, 1:4 and 1:10). Mix of DNA would be performed before and after PCR to disentangle the detection threshold of SSCP-genotyping and possible PCR bias.

References

See References at the end of the Thesis p.202.

4.5.2 Études théoriques sur l'hérédité des mitochondries chez les espèces gynodioïques

Lors de la présentation du conflit nucléo-cytoplasmique (cf. p.20), nous avons vu que la stérilité mâle cytoplasmique pouvait induire plusieurs réponses de la part du génome nucléaire, incluant l'apparition de restaurateurs de fertilité et une masculinisation des hermaphrodites. Cette thèse se termine sur la réponse nucléaire conceptuellement la plus évidente à la stérilité mâle cytoplasmique, celle qui modifie la raison d'être de la CMS : l'hérédité uniparentale maternelle. Dans une population touchée par la stérilité mâle cytoplasmique, la transmission des mitochondries via le pollen est à l'avantage de la fertilité mâle, les hermaphrodites étant les seuls à produire du pollen et les mitochondries du pollen portant donc plus souvent un haplotype mâle-fertile que les mitochondries des ovules. Le noyau pourrait donc en principe sélectionner une hérédité biparentale, ou même paternelle, des mitochondries pour freiner l'invasion des gènes de stérilité (Burt and Trivers, 2006). En terme de conflit, ceci aurait pour effet de réduire le conflit cytonucléaire (les lois d'hérédité des génomes nucléaires et mitochondriaux sont plus proches), mais de réactiver le conflit entre cytoplasmes et de risquer l'invasion par des éléments mitochondriaux égoïstes (cf. FIGURE 4.2). Cette prédiction n'ayant été étayée que très récemment par des données expérimentales (cf. p.131), seul un modèle a été publié sur le sujet. Les principaux résultats en sont déjà présentées dans la publication qui suit (p.148), mais je le présenterai ici plus en détails.

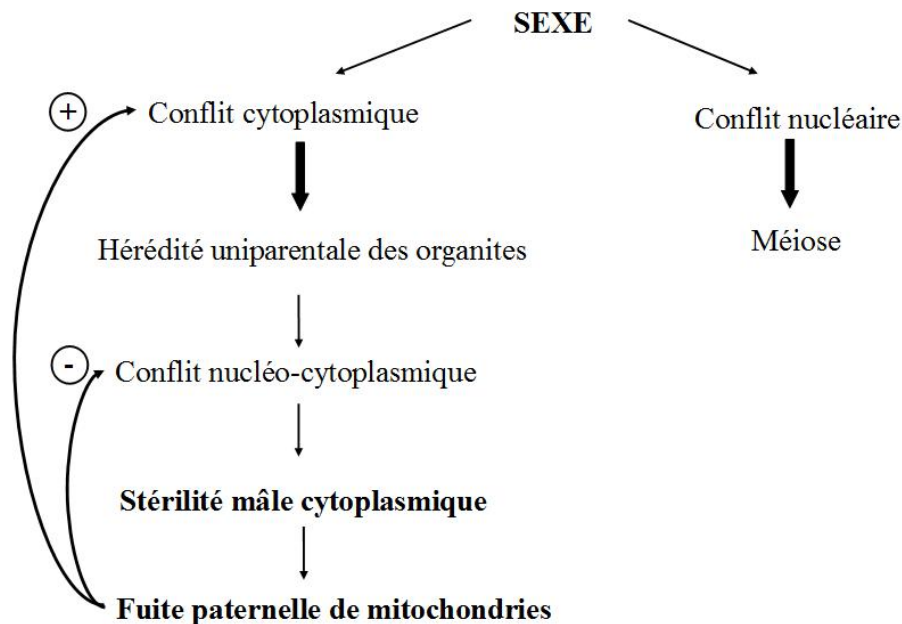


FIGURE 4.2 – Conflits intra-génomiques et évolution de la fuite paternelle de mitochondries chez les espèces gynodioïques.

En réponse aux premiers résultats expérimentaux obtenus chez *Silene vulgaris*, Wade and McCauley (2005) ont construit un modèle visant à comprendre l'influence de la fuite paternelle sur la dynamique de la gynodioécie. En effet, tous les modèles publiés jusqu'à présent supposaient une hérédité mitochondriale strictement maternelle, et s'il est évident que la fuite paternelle peut modifier ces dynamiques, quantifier son effet était nécessaire. Dans leurs modèles, Wade and McCauley ont supposé que la fuite paternelle se caractérisait par une hérédité purement paternelle, dont le taux est un paramètre du modèle. L'évolution de la fuite paternelle n'étant pas le sujet du modèle, ils ont supposé que ce taux était identique chez tous les individus et constant dans le temps. L'influence de la fuite paternelle a été étudiée dans trois modèles avec des déterminismes génétiques de la gynodioécie différents. Dans le modèle le plus simple comprenant uniquement un gène de stérilité mâle mitochondrial, ils ont montré qu'un faible taux de fuite paternelle suffisait à empêcher la fixation de la CMS et stabilisait le gène de stérilité mâle à une fréquence intermédiaire. En ajoutant un locus nucléaire de restauration dont l'allèle restaurateur était dominant et sans coût, aucun effet de la fuite paternelle sur l'état d'équilibre n'a été détecté, bien que la fixation de la CMS et de l'allèle restaurateur aient été ralenties. Enfin, les auteurs ont testé un modèle *matching alleles*, dans lequel deux gènes de CMS indépendants étaient restaurés par deux allèles restaurateurs dominants et sans coût, présents sur un même locus nucléaire biallélique. Ils ont montré que la fuite paternelle ne modifie pas l'état d'équilibre mais accélère la convergence vers cet état, en diminuant l'amplitude et la durée totale des oscillations. De ce fait, en présence de fuite paternelle, la population présente des fréquences alléliques extrêmes pendant un temps plus réduit, ce qui pourrait limiter la perte de polymorphisme liée à la dérive.

Globalement, les travaux de Wade and McCauley démontrent que la fuite paternelle pourrait contribuer au maintien de la gynodioécie. En revanche, l'évolution de la fuite paternelle n'est pas considérée dans ce modèle et c'est pourquoi j'ai développé un modèle permettant d'expliquer pourquoi la stérilité mâle cytoplasmique pourrait constituer un contexte favorable à l'évolution de la fuite paternelle.

ARTICLE 5

**Does cytoplasmic male sterility (CMS)
enhance the evolution of occasional
transmission of mitochondria through pollen ?
A theoretical approach.**

CLAIRE GARRAUD AND JACQUI A. SHYKOFF

(submitted to American Naturalist)

Abstract

Gynodioecy, the coexistence of female and hermaphrodite plants within a species, is generally under cytonuclear sex determination, involving cytoplasmic male sterility (CMS) and nuclear restorers. Many models assuming strict maternal inheritance of mitochondrial genes explain the maintenance of gynodioecy and of the underlying polymorphism. However, occasional transmission of mitochondria through pollen, paternal leakage, has been observed recently in some gynodioecious species. A previous theoretical study showed that a fixed rate of paternal leakage can sustain polymorphism at the CMS locus but the evolution of paternal leakage itself was not considered. We tested whether CMS can select for paternal leakage of mitochondria. We modeled the evolution of a mutant that allows paternal leakage under pure cytoplasmic sex determination. We showed that (i) a population containing a CMS gene is susceptible to invasion by a nuclear gene allowing paternal transmission of mitochondria; (ii) paternal leakage maintains male-fertile mitochondria by allowing their transmission via pollen. The results were robust for four different underlying systems of inheritance we tested. We discuss our results in terms of genetic conflict. We compare the way by which paternal leakage and restorer genes are selected and propose analogies with other sterilizing cytoplasmic elements, such as *Wolbachia* bacteria.

Introduction

Genetic conflicts, an important evolutionary force, are implicated in a large number of fundamental evolutionary processes including the evolution of sex, sex determination, reproductive isolation, species extinction, genome structure, recombination, and uniparental inheritance of organelles (Hurst and Werren, 2001; Hurst, 1992; Hurst et al., 1996). Genetic conflict is caused by divergent interests between genes, and occurs when « the spread of one gene creates the context for the spread of another gene, expressed in the same individual, and having the opposite effect » (Hurst et al., 1996). Genes that are not genetically linked are more susceptible to come into conflict and genes with different inheritance systems are particularly favourable to the emergence of conflicts. In eukaryotes, nuclear genes are inherited in a Mendelian way, following the segregation rules of mitosis and meiosis. These two stringent mechanisms, by constraining the transmission of the genome, reconcile the interests of all nuclear genes and limit conflicts among those genes. On the contrary, there is no control for the segregation of organelles during mitosis and meiosis and the multiple copies of cytoplasmic DNA of each cell replicate independently of the cellular cycle. Cytoplasmic genes are thus submitted to drift and selection, both within and among individuals. If selection acts in opposite ways on the different levels of selection, which can be viewed as sets of genes sharing the same interest, selfish genes that follow their own interest at the expense of others genes can evolve. For instance, any cytoplasmic mutant with an increased transmission rate (increased replication, segregation advantage, cytoplasm killer at syngamy, etc.) would be selected at the organelle level, even if it were costly for the host cell (for a example of mitochondrial selfish element see MacAlpine et al., 2001).

Inheritance of cytoplasmic genes is constrained, however, by uniparental inheritance of organelles, maternal inheritance being the most common case. Uniparental inheritance of cytoplasmic genes is very widespread and applies to most anisogamous species including animals, plants, fungi (Barr et al., 2005; Korpelainen, 2004; Xu, 2005) and algae (Adams et al., 1990; Kuroiwa et al., 1991; Miyamura and Nagumo, 2007). However uniparental inheritance cannot be considered merely as a by-product of anisogamy. Indeed, numerous examples of uniparental inheritance in isogamous species are known, for example in fungi (Barroso and Labarere, 1995; Nishimura et al., 2002; Yan and Xu, 2003), algae (Hamaji et al., 2008; Kuroiwa et al., 1985), and protists (Moriyama and Kawano, 2003), and active mechanisms by which the mtDNA of the non-transmitting sex is eliminated have been demonstrated (Moriyama and Kawano, 2003; Nishimura et al., 2002). Furthermore some anisogamous species show paternal inheritance of organelles (*e.g.* gymnosperms, see Reboud and Zeyl, 1994). Models have been developed to explain why uniparental inheritance has evolved and why it is so widespread. The most widely accepted suggests that uniparental inheritance was driven by genomic conflicts. Under this hypothesis, nuclear genes enforcing uniparental inheritance evolved in order to prevent the spread of selfish cytoplasmic elements (Hastings, 1992; Hurst and Hamilton, 1992; Rander-

son and Hurst, 1999). Other models have been proposed, such as the specialization of organelle transmission in the germ-line of one of the two pre-existing sexes or mating types (Godelle and Reboud, 1995), or the STOR model (Salvage-TurnOver-Repair) in which the degradation of a part of the DNA is advantageous by providing nutriment for the development of the zygote (Sears and VanWinkle-Swift, 1994). However, these models are unlikely to apply for both isogamous and anisogamous species.

While uniparental inheritance of cytoplasmic genes solves the conflict between cytoplasmic genes, it creates a new and different conflict between cytoplasmic and nuclear genes. Production of male offspring is an evolutionary dead-end for mitochondrial genes that are maternally inherited. Mitochondrial genes therefore would profit from a sex-ratio biased toward females whereas a 1:1 sex-ratio profits nuclear genes. The best known illustration of the nucleo-cytoplasmic conflict is cytoplasmic male sterility (CMS) in plants (Cosmides and Tooby, 1981). Cytoplasmic male sterility (CMS) genes are present in the mitochondrial genome and cause male sterility (*i.e.* generate females by suppressing male function of hermaphrodites). Because of its maternal inheritance, a CMS gene that allows females to produce more seeds than hermaphrodites will invade the population (Lewis, 1941). As CMS invades the population, any nuclear mutation that restores male fertility will be associated with the rare gamete type (*i.e.* pollen) and selected by Fisherian selection (Jacobs and Wade, 2003). This conflict results in gynodioecy, the coexistence of hermaphrodite and female plants in natural populations, which is the most common mating system after hermaphroditism in angiosperms.

Recently, strict maternal inheritance of cytoplasmic organelles has been questioned in a few gynodioecious species. Signatures of recombination in the mitochondrial genome have been observed in several species of *Silene* (Houliston and Olson, 2006; McCauley et al., 2005; McCauley and Ellis, 2008; Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009), indicating that heteroplasmy (*i.e.* the coexistence of different cytoplasmic genomes within an individual) must have occurred at the evolutionary scale. Phylogenetic patterns of mitochondrial and chloroplastic genes were found to be incongruent in *Silene vulgaris*, suggesting exceptions in the strict maternal inheritance of these two genomes (Houliston and Olson, 2006). Gynomonoecious individuals, a phenotype described in many gynodioecious species, that present both pistillate and perfect flowers within a plant, provide additional evidence for heteroplasmy. Using controlled crosses, Andersson (1999) showed that pistillate and perfect flowers of gynomonoecious plants crossed with pollen from the same non-related individual produced full-siblings of the three sexes (females, hermaphrodites and gynomonoecious) but in different proportions. Since nuclear genes are transmitted to ovules in the same way by a pistillate or a perfect flower, this suggests that the two flower sexes of gynomonoecious plants bore different, more or less male-fertile and male-sterile cytoplasms. A link between heteroplasmy and gynomonoecy has also been suggested by heteroplasmic hybrids obtained by crossing experiments on laboratory lines of rapeseed (Erickson and Kemble, 1993). Some heteroplasmic hybrids were

shown to exhibit both perfect and pistillate flowers and those pistillate (respectively perfect) flowers produced male-sterile offspring (respectively male-fertile), suggesting that only local mitochondria determine the local phenotype. However, the association between heteroplasmy and gynodioecy was not perfect and the sample size limited. More recently, genetic marker studies revealed transmission of mitochondrial genes via the pollen, a process called paternal leakage. In *Silene vulgaris*, 2.5 to 14% of offspring presented a haplotype that differed from the mother's (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Welch et al., 2006) and 15% to 23% were shown to be heteroplasmic using q-PCR (Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006) or a method that amplified low-copy number haplotypes (McCauley et al., 2005). Pearl et al. (2009) demonstrated that heteroplasmy in *S. vulgaris* was mainly due to paternal leakage, other cases being explained by the transmission of heteroplasmy from a heteroplasmic mother. When leakage did occur, the paternal contribution ranged from 0.5% in some offspring (minimal threshold for detection) to 100% in others, with an average of 12 to 28% (Bentley et al., 2010; Pearl et al., 2009). The distribution was bimodal with many occurrences of very low leakage or complete paternal inheritance.

Since paternal leakage and heteroplasmy in the mitochondrial genome has been described only very recently, their treatment in theoretical studies is almost nonexistent to date. However, Wade and McCauley (2005) studied the influence of paternal leakage on a gynodioecious system, assuming a low percentage of paternal transmission and no heteroplasmy. They showed that paternal leakage can prevent the invasion of CMS and sustain a stable mitochondrial polymorphism when restorers are not present. With some mechanisms of nuclear restoration, paternal leakage also enhances the stability of joint cytonuclear polymorphism by reducing oscillations to extreme frequencies. Although these results indicate the influence of paternal leakage on CMS and restorer genes, they do not explore the evolution of paternal leakage itself, since the rate of leakage was a constant parameter of each simulation and had no genetic basis. It has already been proposed that paternal leakage could be favoured in populations with CMS as a way of reducing the transmission of the selfish male-sterile cytoplasm (Burt and Trivers, 2006; McCauley and Bailey, 2009; McCauley and Olson, 2008) but no theoretical framework has been proposed so far.

In this paper, we explore whether cytoplasmic male sterility can enhance the evolution of paternal leakage of mitochondria. Because our model assumes that mitochondrial inheritance is under genetic control and can generate heteroplasmy when paternal leakage occurs, it requires a wealth of information on the mechanisms and the genetics of organelle inheritance that are briefly summarized here. In plants, uniparental transmission of organelles is ensured by one or several mechanisms including physical exclusion by controlled segregation, active degradation or differential replication, and can occur from gametogenesis to the first stages of post-zygotic development (Mogensen 1996; Zhang et al. 2003; Xu 2005). Most assumptions concerning heteroplasmy in this model were inspired by data on fungi, in which biparental inheritance is common and more data are available (Birky 2001; Barr et al. 2005). In yeast

and some basidiomycetes with biparental inheritance of mitochondria, fusion of gametes results in heteroplasmic individuals but mitochondria segregate rapidly, giving rise to homoplasmic individuals in yeast (Birky 2001), and heteroplasmic mycelia composed of homoplasmic cells in multicellular fungi (Barr et al. 2005; Xu 2005). In plants, simple mathematical models showed that, when heteroplasmy occurs, vegetative sorting of organelles should be complete within one plant generation (Birky 2001). But experimental studies are rare and results are controversial: Some showed a complete sorting in one generation that occurred during development (Erickson and Kemble 1993; Matsushima et al. 2008) or from a bottleneck in the germ line (Chat et al. 2002) but heteroplasmy could also be maintained, by drift or selection, and transmitted to offspring (Lax et al. 1987; Frey 1999). In *Silene vulgaris*, heteroplasmic mothers produced on average 17% of heteroplasmic offspring, showing that vegetative sorting occurred but was not always complete in one generation (Pearl et al. 2009; Bentley et al. 2010). When transmission occurred, heteroplasmy level tended to decrease from one generation to the next.

The genetic determination of mitochondrial inheritance remains poorly understood, and the underlying genes have been identified for only a few species, such as *Chlamydomonas reinhardtii* (Nishimura et al., 2002) or *Cryptococcus neoformans* (Moriyama and Kawano, 2003). In Angiosperms, few data are available and concern mainly chloroplasts, whose inheritance is less strict. The historical case of variegated plants (Baur, 1909) that are heteroplasmic with green and white plastids, remains one of the best studied cases of heteroplasmy in plants. For instance, in *Pelargonium*, chloroplast inheritance depends on the plastid genome (Tilney-Bassett and Birky, 1981), the maternal nuclear genome (Tilney-Bassett and Birky, 1981), or the paternal nuclear genome, acting in a gametophytic way (inheritance depends only on the pollen genome and not on the diploid parent genome, see Derepas and Dulieu, 1992; Dulieu et al., 1990). Information is rarer on mitochondrial inheritance, probably because of the lack of phenotypic markers compared to chloroplasts. However, the degree of paternal leakage is highly cross-dependent in *Silene vulgaris* (McCauley et al., 2005; Welch et al., 2006), and the population from which the pollen donor was collected had an effect on the leakage rate whereas the origin of the ovule donor had no effect (Bentley et al., 2010). In *Brassica napus*, both paternal and maternal genomes were involved in the control of mitochondrial inheritance, suggesting a mechanism operating in both pollen and ovule (Erickson and Kemble, 1993). The compatibility between the plastid and the nuclear genomes of the progeny also modified the transmission of paternal plastid (Chiu and Sears, 1993). More generally, nuclear genes that control the replication of sublimons and other small fragments of mtDNA might influence the transmission and expression of mtDNA (Battersby et al., 2003; Kmiec et al., 2006; Mackenzie and McIntosh, 1999; Woodson and Chory, 2008; Zaegel et al., 2006). Overall, data on the genetics of organelle inheritance remain scarce and are sometimes contradictory, and for this reason we tested several systems of genetic control for the inheritance of mitochondria in our model.

The model

We considered a diploid out-crossed species with non-overlapping generations. The population is infinite, panmictic and without pollen limitation. We modeled the evolution of a gene that controls the inheritance of mitochondria in a gynodioecious population with pure cytoplasmic sex determination. Plants that carry the male-sterile allele (C1) at the CMS locus of their mitochondrial genome are females, and those that carry the male-fertile allele (C0) are hermaphrodites. Females benefit from a female advantage (s) that increases their ovule production relative to hermaphrodites from 1 to $1 + s$. We also defined a biallelic B locus that controls mitochondrial inheritance, and that will be either mitochondrial or nuclear depending on the scenario tested. The maternal inheritance allele (b) codes for strict maternal inheritance whereas the paternal leakage allele (B) allows transmission of the mitochondrial genome through pollen. When paternal leakage, *i.e.*, biparental inheritance, occurs, the proportion of mitochondria from paternal origin in the zygote is set to a parameter (α), hereafter called paternal leakage rate. Since females cannot produce pollen, paternally transmitted mitochondria are always male-fertile at the CMS locus. We thus expect that the B allele will slow down and maybe prevent the invasion of the male-sterile cytoplasm C1 (Wade and McCauley, 2005).

Assumptions on heteroplasmy

Because of paternal leakage of mitochondria, zygotes can be heteroplasmic. We assumed complete vegetative sorting during plant development such that heteroplasmic zygotes develop into heteroplasmic plants with homoplasmic cells. Since gametes are formed late in plant development, all gametes must then be strictly homoplasmic. We assumed no selection between mitochondrial genomes within individuals at the CMS locus. Thus, a zygote with a proportion α of mitochondria from paternal origin will give rise to a plant with a proportion α of homoplasmic cells carrying mitochondria of paternal origin. Heteroplasmic individuals that carry both male-sterile and male-fertile mitochondria are considered to be gynomonoeious, with pistillate flowers produced on branches bearing the male-sterile mitochondria, and perfect flowers on branches bearing the male-fertile mitochondria. We also assumed that pistillate (respectively perfect) flowers on gynomonoeious plants have the same fecundity and fertility phenotype as do pistillate (respectively perfect) flowers on female (respectively hermaphrodite) individuals (TABLE 4.6), as has been observed in *Silene nutans* and *Silene italica* (Desfeux, 1996; Lafuma and Maurice, 2006).

Adding a cost of heteroplasmy should render more stringent the conditions under which biparental mitochondrial inheritance can evolve. The existence of such a cost is supported by three main arguments : First, if biparental mitochondrial inheritance occurs regularly, individuals are susceptible to invasions by selfish elements that can be transmitted between maternal lines (see introduction). Then, on the shorter term, cytoplasmic mixing could be detrimental to host fitness *per se* because of negative interactions between cytoplasmic elements (Ziegler and Davidson, 1981).

In our model, this cost would be limited to early development, when cells are still heteroplasmic. Finally, recombination between mitochondrial genomes might generate deleterious associations of alleles (Birky, 1995). A cost of heteroplasmy was added as a third parameter (Φ), independent from α , such that male and female fitness of all heteroplasmic individuals was reduced by a factor $1 - \Phi$ (with $\Phi > 0$, see TABLE 4.6). For instance, the fitness of a gynomonocious (heteroplasmic) individual will depend on α , the proportion of mitochondria of paternal origin (male-fertile mitochondria), on the female advantage s , and on the cost of heteroplasmy, Φ :

$$\text{Female fitness} = (1 - \Phi)((1 - \alpha)(1 + s) + \alpha)$$

$$\text{Male fitness} = \alpha(1 - \Phi)$$

Note that heteroplasmic individuals with two mitochondrial types that bear the same CMS allele also suffer this cost (TABLE 4.6) since their mitochondria can differ at other loci, and be vectors of selfish elements. A summary of all parameters of the model is available in TABLE 4.4.

Parameters	Description
C1	Male-sterile allele at the CMS mitochondrial locus
C0	Male-fertile allele at the CMS mitochondrial locus
B	Paternal leakage allele at the locus that determines mitochondrial inheritance
b	Maternal transmission allele at the locus that determines mitochondrial inheritance
f(C1), f(C0), f(B), f(b)	Frequencies of C1, C0, B and b, respectively, in the population
s	Female advantage in ovule production (the relative ovule production of females compared with hermaphrodites is $1+s$)
Φ	Cost of heteroplasmy
α	Paternal leakage rate : proportion of mitochondria from paternal origin in zygotes when paternal leakage occurs
d	Dominance of the B allele in sporophytic models
r	Recombination rate (in mitochondrial models only)

TABLE 4.4 – Parameters of the model of gynodioecy with paternal leakage.

Genetic determination of mitochondrial inheritance

The main novelty of this model compared to the analytical developments of Wade and McCauley (2005) is the introduction of genetic control for mitochondrial inheritance. Because little is known about the genetics of mitochondrial inheritance, we developed six models with different genetic determination systems. Two models with mitochondrial determination were considered. The first one assumes that the

mitochondrial gene acts in pollen by enforcing mitochondrial transmission (mitochondrial pollen model, see TABLE 4.5). The mitochondrial genotype of pollen at the B locus determines whether there is paternal leakage or not. In the second one, the gene acts in ovules by increasing susceptibility to invasion by pollen mitochondria, so the mitochondrial genotype of the ovule determines whether paternal leakage can occur (mitochondrial ovule model, see TABLE 4.5). Because recombination has been described between mitochondria of heteroplasmic cells (Belliard et al., 1979; Mackenzie and McIntosh, 1999; Raineri et al., 1992), the rate of recombination between the B and the CMS loci (r) was included as a parameter in mitochondrial models. In addition, four models with nuclear control of mitochondrial inheritance were developed, considering that (i) as in mitochondrial models, the gene can act in pollen by enforcing mitochondrial transmission or in ovules by allowing invasion by paternal mitochondria; (ii) genetic determination can be gametophytic (the genotype of the gamete determines mitochondrial inheritance) or sporophytic (the genotype of the parent determines mitochondrial inheritance). In this last case, we added a dominance parameter (d). All combinations were studied in four nuclear models (TABLE 4.5). All of these models present the advantage of being consistent with several mechanisms of mitochondrial inheritance, even if ovule models require the presence of functional mitochondria in the pollen.

Paternal leakage locus	Paternal gene expression		Model
Mitochondrial	Pollen	-	Mitochondrial pollen model
	Ovule	-	Mitochondrial povule model
Nuclear	Pollen	Gametophytic	Gametophytic pollen model
		Sporophytic	Sporophytic pollen model
	Ovule	Gametophytic	Gametophytic ovule model
		Sporophytic	Sporophytic ovule model

TABLE 4.5 – Summary of the different models of paternal leakage.

Simulations

For each generation, the allelic frequencies in the gametes were calculated by adding the contributions of each adult genotype, using its frequency and its female and male fitness (TABLE 4.6). Allelic frequencies in zygotes of the next generation were calculated based on the frequencies of all ovule and pollen genotypes, taking into account paternal leakage and assuming random mating. Initial conditions for simulations were set to 1% of male-sterile cytoplasm C1 and 0.1% of the paternal leakage allele B, with no linkage disequilibrium. These conditions simulate the arrival of a mutant that allows paternal leakage in a gynodioecious population susceptible to female invasion. Other possible initial conditions were examined and provided the same results at equilibrium and so are not presented here. Simulations were

run for about 4000 combinations of parameters, with $s \in [-0.1, 2.5]$, $\Phi \in [0, 1]$, and $\alpha \in]0, 1[$. Indeed, estimates of female advantage in the literature range from 0 to 1 (*e.g.* Agren and Willson, 1991; Asikainen and Mutikainen, 2003; Lafuma and Maurice, 2006; Olson et al., 2006; Poot, 1997), exceptionally reaching 2.5 (Thompson and Tarayre, 2000). Strict maternal and paternal inheritance ($\alpha=0$ and $\alpha=1$ respectively) were not considered because the existence of a cost of heteroplasmy is inconsistent with uniparental inheritance. When $\Phi = 0$, α could also be considered as the frequency of offspring that inherit paternal mitochondria in a model with strict uniparental inheritance and no heteroplasmy. In mitochondrial models, simulations were run for $r=0.1$, $r=0.01$ and $r=0.001$. Simulations were run for at least 10000 generations. We considered that frequencies were stable when they varied less than 0.01% over the 2000 last generations. All simulations led to stable equilibria. At equilibrium, we considered that an allele was fixed (respectively lost) when its frequency was higher than 99% (respectively lower than 1%). In particular, the population was considered gynodioecious when female frequency fell between 1% and 99%.

	Hermaphrodites				Females		Gynodioecious	
	C0 bb	C0 Bb	C0C0 Bb	C0C0 BB	C1 bb	C1 Bb	C0C1 Bb	C0C1 BB
Ovules								
C1b	-	-	-	-	1+s	(1+s)/2	(1- Φ)(1- α)(1+s)/2	-
C1B	-	-	-	-	-	(1+s)/2	(1- Φ)(1- α)(1+s)/2	(1- Φ)(1- α)(1+s)
C0b	1	0.5	(1- Φ)/2	-	-	-	α (1- Φ)/2	-
C0B	-	0.5	(1- Φ)/2	(1- Φ)	-	-	α (1- Φ)/2	α (1- Φ)
Pollen								
C0b	1	0.5	(1- Φ)/2	-	-	-	α (1- Φ)/2	-
C0B	-	0.5	(1- Φ)/2	(1- Φ)	-	-	α (1- Φ)/2	α (1- Φ)

TABLE 4.6 – Genotypic contributions to pollen and ovule gamete frequencies in the gametophytic pollen model.

Results

Mitochondrial determination of mitochondrial inheritance

Calculations with the mitochondrial pollen model showed that the paternal leakage allele (B) was able to spread in the population and led to maintenance of polymorphism at the CMS locus, except when $\Phi = 1$ where B was lost and the male-sterile mitochondria invaded the population. At equilibrium, B was always fixed in the male-fertile background, and, if mitochondria were allowed to recombine ($r \neq 0$), invaded the entire population. These results were expected since B is neutral in females and advantageous in hermaphrodites because of its additional transmission through pollen. When recombination occurred ($r \neq 0$), the B allele was able to invade the male-sterile background and went to fixation. The value of the recomb-

nation rate (when $r \neq 0$) did not influence the equilibrium state but determined the time needed for the B allele to become fixed in the male-sterile background. Similarly, the cost of heteroplasmy (Φ) did not influence the equilibrium state (except when $\Phi = 1$) but only modified the selection coefficient of B and thus, the dynamics of invasion. Equilibrium at the CMS locus depended on the female advantage (s) and the paternal leakage rate (α) : When $s > 0$ and $1 + s > \frac{1}{1-\alpha}$, polymorphism at the CMS locus was maintained and the population consisted of hermaphrodite and gynomonoecious individuals (there were no females because B was fixed in the male-fertile background and all hermaphrodites transmitted their mitochondria through pollen). Otherwise, the male-sterile allele C1 was lost and the population evolved to hermaphroditism. The mitochondrial ovule model gave contrasting results : All simulations showed the invasion of the male-sterile mitochondrion (C1) and the loss of B, leading to purely female populations (and then, to extinction). Indeed, in this model, the B allele allowed its own mitochondria to be invaded by mitochondria from pollen and thus had reduced transmission through ovules. Values of parameters did not influence equilibrium states and only modified the dynamics of fixation or loss : As expected, increased values of s accelerated the fixation of C1 whereas increased values of α and Φ accelerated the loss of B.

Nuclear determination of mitochondrial inheritance

Since the results of the four nuclear models (TABLE 4.5) differed only quantitatively and not qualitatively, we will present those of the gametophytic pollen model in detail and only mention deviations from this model for the three others. Simulations generally proceeded as follows : (i) If there was a female advantage ($s > 0$), the male-sterile mitochondrion (C1) began to spread ; (ii) when the frequency of C1 became high enough, the paternal leakage allele (B) started to spread because of its association with pollen that bears the rare male gametes (see explanations below) ; (iii) the spread of the paternal leakage allele B prevented further spread of the male-sterile mitochondrion C1 because some females produced gynomonoecious heteroplasmic individuals with a proportion $(1 - \alpha)$ of male-sterile mitochondria instead of producing only female individuals (see Supplementary Figure 1). This led to a reduction in frequency of the male-sterile mitochondrion C1, this reduction being greater for higher values of α ; (iv) because the frequency of the male-sterile mitochondrion decreased, the advantage of the paternal leakage allele B decreased and further spread of B is prevented or slowed down. For some parameter values, we observed oscillations and steps (i) to (iv) occurred several times before equilibrium. The range and duration of oscillations were shown to increase with Φ and α , and when s decreased. However, oscillations were always damping and no limit cycles were found.

Depending on the parameters values, the dynamics described above led to different equilibrium states (FIGURE 4.3). In most simulations, the CMS locus was polymorphic at equilibrium and the mitochondrial inheritance locus was either po-

lymorphic or fixed for the paternal leakage allele (zones (2) and (3) in FIGURE 4.3a). This corresponds to a gynodioecious population including a number of gynomonoeious individuals that depends on the frequency of B (when B is fixed, only gynomonoeious and hermaphrodite individuals are found in the population). As expected, populations were hermaphroditic when $s < 0$, and neither C1 nor B were able to spread (zone (1) in FIGURE 4.3a). These simulations ($s < 0$) will not be considered further. A very high cost of heteroplasmy prevented the spread of B and led to the fixation of C1 (such pure female populations are of course destined to extinction, zone (4) in FIGURE 4.3a). On the contrary, when $\Phi = 0$, B was maintained at intermediate frequencies but C1 was lost, leading to hermaphroditism (zone (5) in FIGURE 4.3a).

As already demonstrated by Wade and McCauley (2005), paternal leakage allowed the maintenance of male-fertile mitochondria by allowing their transmission through pollen (FIGURE 4.4). Here, we also showed that the spread of B relies on the presence of female flowers and occurs only when the male-sterile mitochondrion (C1) is common enough. Then, B can go to fixation or remain polymorphic, depending on parameter values (FIGURE 4.3). As restorers of fertility, the paternal leakage allele spreads because of its genetic association with the rare gamete (*i.e.* pollen). Indeed, the transmission of male-fertile mitochondria through pollen is enforced by hermaphrodites carrying B, leading to linkage disequilibrium between the paternal leakage allele B and the male-fertile mitochondrion C0 (Supplementary Figure 1). This linkage increases with the proportion (α) of paternal mitochondria transmitted. B thus takes advantage of Fisherian selection, and, when $s < 1$, of the higher total gamete production of hermaphrodites compared with females. Because Fisherian selection is frequency-dependent, the more females there are, the more B is advantageous (FIGURE 4.4).

Both dynamics and equilibria were influenced by female advantage (s), cost of heteroplasmy (Φ) and paternal leakage rate (α). As expected, increasing Φ delayed the spread of B (data not shown) and reduced its frequency at equilibrium, leading to a higher frequency of C1 (FIGURE 4.5a and 4.5c). Because of the linkage disequilibrium between B and C0, Φ also favors the male-sterile mitochondrion directly (FIGURE 4.4). The effect of α was more complex : Higher α led to an earlier spread of B but decreased frequencies of B and C1 at equilibrium. Although increasing α increased the linkage disequilibrium between C0 and B (data not shown), which should facilitate the spread of B, a higher α also prevented the spread of C1, that in turn limited the spread of B (FIGURE 4.4). This indirect effect of α via the decreasing of the frequency of C1 seemed to be stronger than the direct effect. The total amount of leakage in the population at equilibrium, defined by ($\alpha \times$ the frequency of B in the C0 background), was shown to increase with α (data not shown), explaining the decrease in the C1 frequency. Finally, when s increased, C1 and B showed earlier spread and both frequencies at equilibrium generally increased (FIGURE 4.5). However, in some rare cases with low Φ and high α and s , the frequency of B slightly decreased when s increased (see FIGURE 4.5d). Indeed, we expected contrasting ef-

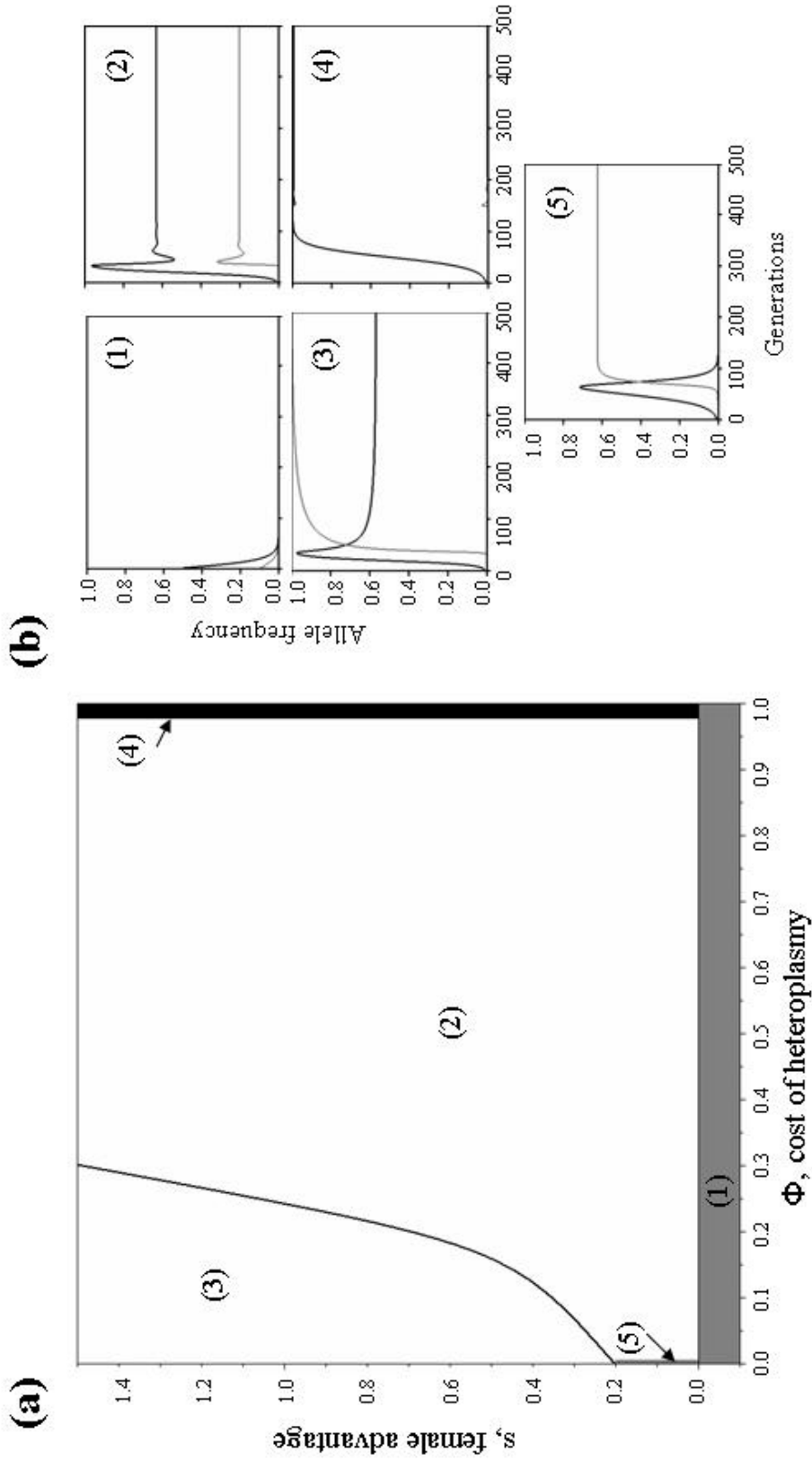


FIGURE 4.3 – (a) Equilibrium states of the gametophytic pollen model, for $\alpha = 0.1$. Five main scenarios can be defined, based on the frequencies of the male-sterile mitochondrial (C1) and of the paternal leakage allele (B) at the equilibrium : (1) C1 and B alleles are lost ; (2) both loci are polymorphic; (3) the B allele is fixed and the CMS locus is polymorphic; (4) B is lost and C1 is fixed ; (5) C1 is lost but the B locus is polymorphic. Increasing α reduces zone (3) and extends zone (5). Female populations are in black, hermaphrodite populations in grey and gynodioecious and/or gynomonocious populations in white. (b) For each scenario, we give an example of the dynamics of the frequencies of the male-sterile mitochondrial C1 (in black) and of the paternal leakage allele B (in grey). Simulations were run with the following parameter values : (1) $s = -0.1$; $\Phi = 0.2$; $\alpha = 0.2$; for illustration purposes initial frequencies were exceptionally set to 0.5 for C1 and to 0.1 for B, in order to show the decrease in the frequencies of B and C1 alleles (2) $s = 0.3$; $\Phi = 0.4$; $\alpha = 0.4$ (3) $s = 0.3$; $\Phi = 0.1$; $\alpha = 0.1$ (4) $s = 0.1$; $\Phi = 0.95$; $\alpha = 0.1$ (5) $s = 0.1$; $\Phi = 0$; $\alpha = 0.3$.

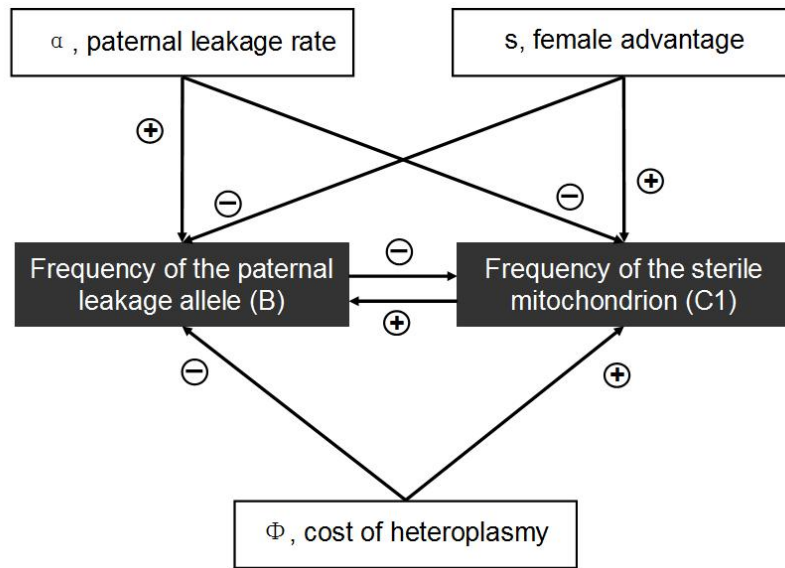


FIGURE 4.4 – Direct effects of the three parameters s , α , and Φ on the frequencies of the paternal leakage allele B and the male-sterile mitochondrion C1 and frequency-dependent relationships between the two. Positive effects are denoted by a (+) and negative effects by a (-).

effects of s on the frequency of B : First, s should help the spread of paternal leakage because it increases the frequency of C1. But increasing s has also a negative impact on B because of the linkage disequilibrium between C0 and B. Lastly, when $s > 1$, the total number of gametes produced by females is higher than by hermaphrodites, so B does not benefit from a higher gamete production thanks to its linkage with C0 and benefit only from Fisherian selection. FIGURE 4.4 summarizes the complex dynamics of B as a function of s , Φ and α .

The gametophytic ovule model gave very similar results with only quantitative differences. Dynamics followed the same steps as the gametophytic pollen model : Invasion of male-sterile mitochondria because of female advantage, spread of the paternal leakage allele thanks to its association with the male-fertile mitochondrion C0 (Fisherian selection and higher total gamete production when $s < 1$), decrease in the frequency of the male-sterile mitochondrion C1, and weaker selection of the paternal leakage allele B when C0 is common. However, B spread more efficiently and frequencies of B at equilibrium were always higher in the ovule model than in the pollen model (mean difference over all parameter combinations=0.24). Frequencies of C1 at equilibrium were similar, although on average slightly higher in the pollen model (mean difference=0.009). These differences between pollen and ovule models were largely due to the fact that the B alleles that prevented the spread of the male-sterile mitochondrion, by either transmitting through pollen or accepting by ovules male-fertile mitochondria, were those associated with C0 in the pollen model but with C1 in the ovule model. Thus, because linkage disequilibrium arises between

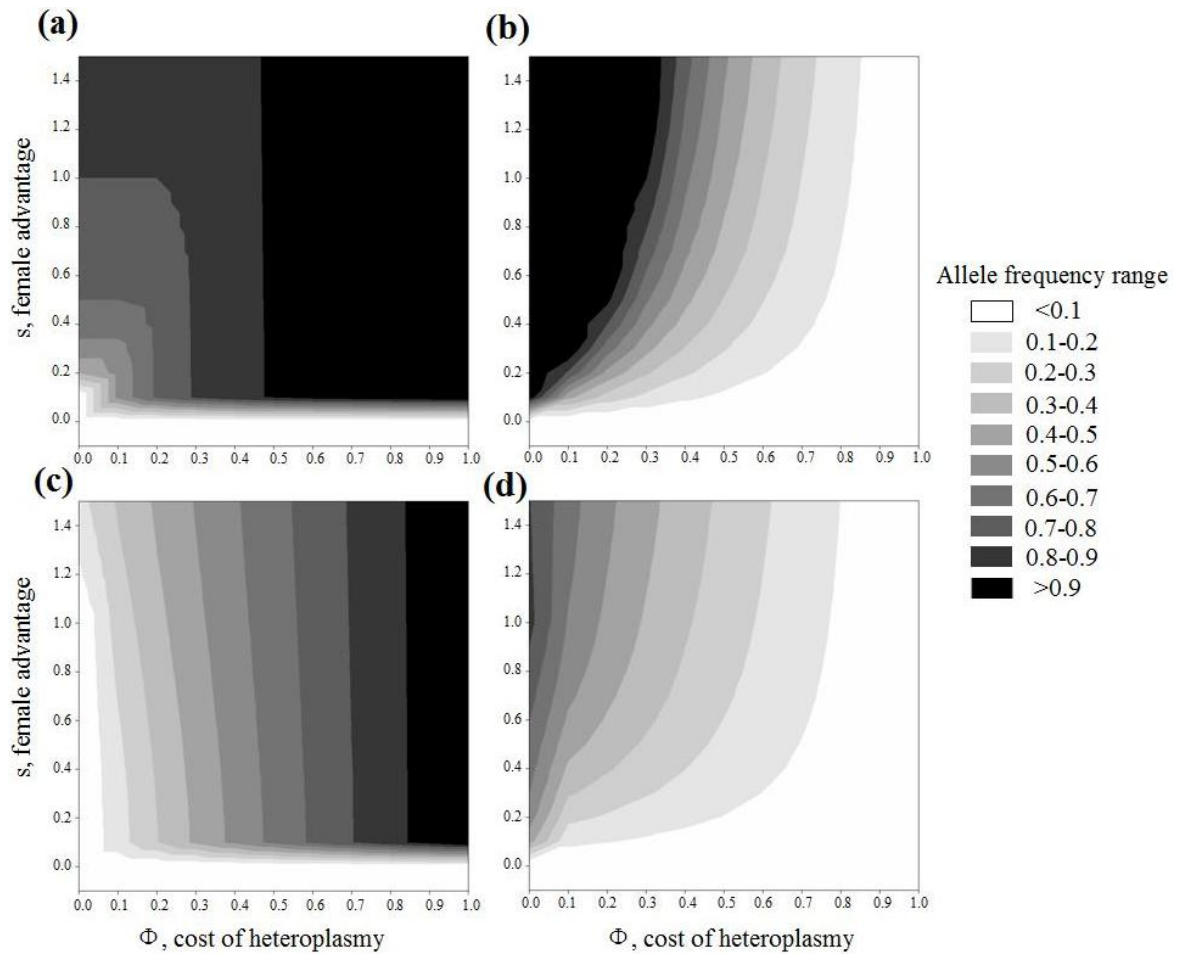


FIGURE 4.5 – Frequencies of the male-sterile mitochondrion C1 (a and c), and of the paternal leakage allele B (b and d) at equilibrium, for $\alpha = 0.1$ (a and b) and $\alpha = 0.6$ (c and d) in the case of the gametophytic pollen model. Equilibrium frequencies are represented as a function of s , the female advantage and Φ , the cost of heteroplasmy.

B and C0 in both models, at the same population frequency of B, those B alleles that actively contribute to paternal leakage (associated with C0 in the pollen model but C1 in the ovule model) are necessarily more common in the pollen model. As a consequence, B limited its own spread by decreasing the frequency of C1 (thereby decreasing its own advantage) more strongly in the pollen model, thus explaining why B reached higher frequency in the ovule model. However, at equilibrium, the frequency of B in the C0 background in the pollen model was still slightly lower than the frequency of B in the C1 background in the ovule model (mean difference=0.07), which requires further exploration. Oscillations were larger in the ovule model. The effects of Φ , α and s were similar except from some cases where the frequency of C1 decreased with increasing s , probably because of the more efficient spread of B. The sporophytic (dominant and recessive) and gametophytic pollen models all led to

the same frequency of C1 at equilibrium, and the frequencies of pollen transmitting mitochondria were the same in the three models. We did not find an equivalent relationship between the three ovule models, but, again, no qualitative changes in the dynamics nor in the influence of parameters existed.

Discussion

Despite some superficial similarities, nuclear and mitochondrial models provided very different results. In mitochondrial models, paternal leakage behaved as a selfish element and was selected only when it increased its own transmission, *i.e.*, when the gene enforced transmission by pollen (mitochondrial pollen model). The allele allowing self-invasion in ovules (mitochondrial ovule model) was always lost because it allowed its own invasion by paternal mitochondria. A model with mitochondrial determination of mitochondrial inheritance proved inadequate for explaining the evolution of paternal leakage in a population being invaded by a male-sterile mitochondrion because : (i) The model did not account for the presence of females at equilibrium ; (ii) our models account for either fixation of the paternal leakage allele (in the pollen model) or its loss (in the ovule model), which is inconsistent with the intermediate rates of paternal leakage that have been observed in crossing studies (see introduction) ; (iii) The invasion of the paternal leakage allele in the mitochondrial pollen model does not require the presence of male-sterile mitochondria, and should then evolve in all species having uniparental mitochondrial inheritance ; (iv) Uniparental inheritance is usually considered to have evolved as a nuclear control of the arms race between mitochondria (Hastings, 1992; Hurst and Hamilton, 1992; Randerson and Hurst, 1999). Under this hypothesis, mitochondrial mutants that break the rules of uniparental inheritance should not be maintained in the long term, because we expect that the nucleus will counteract and enforce uniparental inheritance again.

The results of nuclear models were shown to be very robust to changes in the genetic determination of paternal leakage (gametophytic/sporophytic action on pollen/ovule). All models demonstrated that a population containing a CMS gene is susceptible to being invaded by a nuclear gene allowing paternal transmission of mitochondria through pollen over a wide range of parameters. The evolution from strict uniparental inheritance to paternal leakage (*i.e.* partial biparental inheritance) when CMS is present can be understood in the light of genetic conflicts. Paternal leakage renders the laws of inheritance of the mitochondrial genome closer to the ones of the nuclear genome. As a consequence, it partially reconciles the interests of the two sets of genes and limits the invasion of CMS but, in return, increases the risk of invasion by other mitochondrial selfish elements (a cost represented by the cost of heteroplasmy in our models). Paternal leakage could thus imply a trade-off between two conflicts, by reducing the cost of the conflict between the cytoplasm and the nucleus but reactivating the conflict between cytoplasms. Importantly, the final outcome of the conflict strictly depends on the stochastic occurrence of mutations, as

in all genetic conflicts (Hurst et al., 1996). Despite our model having demonstrated that paternal leakage can be selected because of CMS, this will occur only if a paternal leakage mutant can appear within the time window of CMS spread. Indeed, in a stochastic model in finite population, the male-sterile cytoplasm sometimes became fixed before paternal leakage began to spread (particularly for certain values of α and Φ such that a very high proportion of females is necessary for the invasion of the paternal leakage allele).

Our model did not attempt to obtain precise predictions of rates of paternal leakage or female frequencies in natural populations and our purpose was only to demonstrate that CMS induces a selective pressure for the evolution of paternal leakage of mitochondria. Considering the increasing number of studies on paternal leakage of mitochondria, and particularly in gynodioecious species (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006), better knowledge of paternal leakage (genetic determination, frequency in natural populations) and heteroplasmy (sex phenotype, fitness, vegetative sorting and inheritance) are likely to be available soon and will allow testing the underlying assumptions of this model as well as the construction of more predictive models. Indeed, our models make strong assumptions related to heteroplasmy. Heteroplasmic individuals were assumed to complete vegetative sorting early in development, such that at flowering they were gynomonocious, the sex of each flower being determined by its resident mitochondrion. Although it is possible that vegetative sorting might sometimes be incomplete in one generation, experimental data are too rare to justify including alternative modes of heteroplasmy inheritance in our models. Nonetheless other ideas for how heteroplasmic mitochondria segregate do exist. For example, a quantitative determination based on the stoichiometry of male-sterile versus male-fertile mitochondria, in the flower or in the entire individual, cannot be ruled out. Quantitative models of restoration fit data on sex segregation in progenies of controlled crosses in several species (Ehlers et al., 2005) but these data may also be consistent with quantitative male sterilization.

Nuclear restorer and paternal leakage alleles are quite similar in the mechanism of their spread. Both allow females to produce at least some hermaphrodite offspring, leading to a genetic linkage between restorer/paternal leakage and pollen production. Thus, both benefit from Fisherian selection and a higher total gamete production than females if $s < 1$. However, paternal leakage always limits the spread of the male-sterile mitochondria by replacing them by male-fertile mitochondria, whereas restorers only disable male-sterile mitochondria (male-sterility segregates when the association between the restorer and the CMS is broken). However male-sterility mitochondria may still decrease in frequency if they impose a cost or if there is a cost associated with restoration (Bailey et al., 2003; Dufay et al., 2007). Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility has been clearly demonstrated in numerous gynodioecious species and paternal leakage to date in one. Indeed, the initial appearance of new restorer mutants is probably more common than that of paternal leakage mutants. For instance, there may be more nuclear genes controlling mito-

chondrial gene expression (that are the putative precursors of restorers, see Delph et al., 2007) than genes controlling mitochondrial inheritance. On the other hand, paternal leakage may occur more often than it is detected, particularly when the paternal contribution of mitochondria is very low. Lastly, differences in evolutionary dynamics of restoration versus paternal leakage and potential interactions between the two phenomena may favor restoration, but this last point deserves future theoretical development. Wade and McCauley (2005) have shown that a fixed rate of paternal leakage cannot prevent the invasion of the CMS and its restorer. A positive effect of paternal leakage in maintaining polymorphism applied only when two CMSs and two restorers were modeled under the matching allele assumption (specificity between CMS and restorers). Future developments should also consider the influence of spatial structure of CMS and restorer genes on the evolution of paternal leakage (for experimental demonstration of structure see Olson et al., 2006; Olson and McCauley, 2002; Storchova and Olson, 2004). Complex results can be expected because : (i) Paternal leakage will be less efficient because of inbreeding, since it will occur more often between individuals having the same mitochondrial genome ; (ii) because the spread of the paternal leakage allele is based on the production of gynomonocious plants by female plants (*i.e.* on crosses between females and hermaphrodites), the patchiness of females will make the spread of paternal leakage more difficult because hermaphrodites will more probably pollinate other hermaphrodites ; (iii) inbreeding might increase female advantage if hermaphrodites suffer inbreeding depression ; (iv) Pollen limitation will occur in female patches and will prevent the invasion by the male-sterile mitochondria.

Our model of paternal leakage invasion presents some analogies with host-pathogen models. Mitochondria are very similar to parasites or symbionts that live in the cytoplasm of their host, and are even sometimes considered as such. While biparental transmission of mitochondria is supposed to be responsible for an arms race between mitochondria, horizontal, compared with vertical transmission of parasites is expected to increase virulence (Stewart et al., 2005). With vertically-transmitted parasites (or symbionts) as with maternally transmitted mitochondria, female-biased sex-ratio distortion is often observed in hosts and we discuss whether a phenomenon analogous to paternal leakage of mitochondria in plants can be found in those symbionts. Because a non perfect vertical transmission of the parasite would have an equivalent effect and may be selected in an equivalent manner to the leakage of some male-fertile mitochondria in the descent of a female plant, we examined information about the vertical-transmission rate of such symbionts. One of the best-known examples of sex-ratio distortion by symbionts is the case of the alphaproteobacteria *Wolbachia*, which is the most widespread symbiont of arthropods and nematodes. *Wolbachia* is maternally transmitted and its transmission is increased by various mechanisms including feminization, which turns genetic males into functional females, called neo-females (Werren et al., 2008). *Wolbachia* is analogous to the male-sterile mitochondria in plants and the paternal leakage of mitochondria would be equivalent to a non-perfect vertical transmission of the symbiont. Rigaud and

Juchault (1992) showed that, in *Armadilidium vulgare*, most neo-females produce highly female-biased progenies but a few produce male-biased progenies. The high rate of males was attributed to a low vertical transmission rate of the bacteria, this rate being influenced by the host genome. Further investigations will tell us whether paternal leakage in plants and non-perfect vertical transmission of *Wolbachia* are two congruent responses to similar selfish sterilizing elements.

More generally, in addition to its direct influence on CMS dynamics, paternal leakage could have interesting evolutionary consequences. Because paternal leakage increases the occurrence of heteroplasmy, it also raises the potential of intragenomic recombination. Fusion and fission of mitochondria in plants are commonly admitted (Arimura et al., 2004; Sheahan et al., 2005) and intragenomic recombination within the mitochondrial genome is facilitated by the presence of large (> 4kb) direct repeats. Evidence for both intra- and inter-genic recombination at the evolutionary scale have been found in the genus *Silene* (Houliston and Olson, 2006; McCauley and Ellis, 2008; Städler and Delph, 2002; Touzet and Delph, 2009) and intergenomic mtDNA recombination has been shown in protoplast-derived plants (Belliard et al., 1979; Raineri et al., 1992). Just as does sexual reproduction, heteroplasmy and recombination are expected to accelerate the evolution of the genome. Particularly, recombination could increase the rate at which new genotypes, and particularly potential CMS, are generated. Indeed, CMS is often caused by chimeric genes that are thought to arise from recombination within the mitochondrial genome (for a review, see Delph et al., 2007). However, efficient recombination requires intra-individual variation at the recombining loci, *i.e.* paternal leakage between individuals with different cytoplasms. Recombination within the mitochondrial genome of *Silene vulgaris* was shown to generate new multilocus genotypes (McCauley and Ellis, 2008), but its effect was limited by the strong spatial population structure. More generally, the very high diversity of the mitochondrial genome in gynodioecious species (*e.g.* Touzet and Delph, 2009), often attributed to balancing selection at CMS loci (Städler and Delph, 2002), might also be due to paternal leakage and recombination.

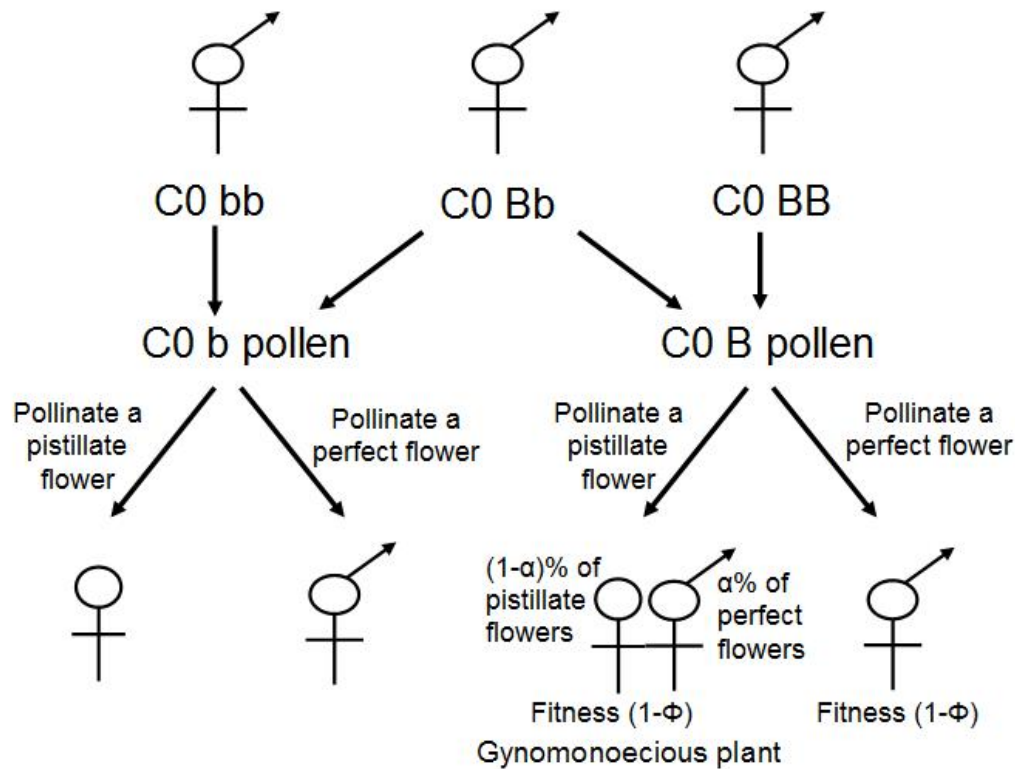
Acknowledgements

The authors thank Christine Vassiliadis and Mathilde Dufaÿ for their comments on the model and manuscript.

References

See References at the end of the Thesis p.202.

Supplementary Table 1 : Transmission of the paternal leakage allele (B) in the gametophytic pollen model



Supplementary Figure 1 : Transmission of the paternal leakage allele (B) in the gametophytic pollen model. Since the B allele acts in pollen, it has an effect when carried by hermaphrodites and only pollen grains that carry the paternal leakage allele (C0B) are able to transmit their mitochondria. When these pollen grains pollinate a perfect (hermaphrodite) flower, they give rise to hermaphrodite heteroplasmic individuals carrying mitochondria that are similar at the CMS locus but can differ at other loci. When these pollen grains pollinate a pistillate (female) flower, offspring are gynomonoecious individuals, which are heteroplasmic with $\alpha\%$ of male-fertile mitochondria associated with the production of perfect flowers and $(1-\alpha)\%$ of male-sterile mitochondria associated with the production of pistillate flowers. Therefore, the B allele rapidly develops linkage disequilibrium with the C0 background and is selected by Fisherian selection (rare gamete advantage). On the contrary, when females are rare, Fisherian selection is weak and the B allele is counter-selected because of the cost of heteroplasmy (Φ).

Bilan du chapitre 4

- * Chez la quasi-totalité des plantes et des animaux et chez beaucoup d'Eucaryotes, les génomes cytoplasmiques (mitochondriaux et chloroplastiques) sont transmis uniparentalement, le plus souvent maternellement.
- * Cette hérédité est assurée par des mécanismes très variés (destruction active par des enzymes, ségrégation des organites lors des divisions cellulaires, etc.), actifs de la gamétogénèse aux premières étapes du développement. Le déterminisme génétique en est mal connu.
- * L'hérédité uniparentale des génomes cytoplasmiques aurait été sélectionnée par le noyau pour empêcher l'invasion d'éléments mitochondriaux égoïstes.
- * Chez quelques espèces gynodioïques du genre *Silene*, en particulier *Silene vulgaris*, il a été montré que le génome mitochondrial était occasionnellement transmis par le pollen (=fuite paternelle), générant de l'hétéroplasmie, c'est-à-dire la coexistence de différents génomes cytoplasmiques au sein d'un même individu.
- * L'hétéroplasmie, phénomène rare, est encore mal connue. Chez les plantes, elle pourrait être transmise de la mère aux descendants, mais un maintien prolongé sur plusieurs générations semble peu probable.
- * Pour l'instant, les espèces chez lesquelles de la fuite paternelle et de l'hétéroplasmie ont été observées sont trop peu nombreuses pour statuer d'un lien entre le système de reproduction gynodioïque et la fuite paternelle. En revanche, théoriquement au moins, les évolutions de ces deux traits sont intimement liées puisque : (1) la stérilité mâle cytoplasmique constituerait un contexte favorable à l'évolution d'une hérédité partiellement biparentale des mitochondries ; (2) Cette dernière favoriserait le maintien du polymorphisme cytonucléaire chez les espèces gynodioïques.

Chapitre 5

Conclusion

Did you ever answer any really
interesting question ?

A student (pers.comm.)

Ce sont quelques grandes questions (et l'espoir d'y apporter des éléments de réponse) qui m'ont poussé à faire cette thèse : quel est l'impact du déterminisme du sexe sur les dynamiques d'évolution de la gynodioécie ? Quelle est la contribution des individus gynomonoïques dans l'évolution de la gynodioécie ? Y a-t-il un lien entre hétéroplasmie et gynomonoécie ? Est-ce que l'évolution de la fuite paternelle et celle de la gynodioécie sont liées ? etc. Trois ans après, je dois bien admettre que je n'ai pas de réponse claire à toutes ces questions, mais plutôt pleins de petites réponses à des questions souvent plus pointues, et parfois un peu déconnectées du questionnement initial. Cette conclusion sera donc l'occasion de faire le lien entre ces réponses partielles et les grandes questions qui ont motivé ma recherche. L'occasion aussi de rapprocher les différentes thématiques de cette thèse et d'évoquer quelques perspectives.

5.0.3 Hérité des mitochondries et gynodioécie

5.0.3.1 Évolution conjointe de la fuite paternelle et de la stérilité mâle cytoplasmique ?

Il a été démontré théoriquement qu'il existait un double lien entre l'évolution de la fuite paternelle et celle de la gynodioécie. En effet, on sait depuis peu que la fuite paternelle pourrait stabiliser le polymorphisme cytonucléaire sous-jacent à la gynodioécie (Wade and McCauley, 2005) et j'ai montré que la présence d'un gène de stérilité mâle cytoplasmique favorisait l'évolution de la fuite paternelle (ARTICLE 5). Mais quels sont les soutiens expérimentaux à ces deux prédictions théoriques ?

Concernant l'action stabilisatrice de la fuite paternelle, il semble qu'elle puisse jouer un rôle chez *Silene vulgaris*, puisque des taux de fuite paternelle de l'ordre de 5 à 10% produisent des effets significatifs dans le modèle et que les taux observés d'hérité non maternelle oscillent de 2,5 à 14% selon les études (Bentley et al., 2010; McCauley et al., 2005; Welch et al., 2006). En revanche, chez les autres espèces gynodioïques chez lesquelles on suspecte une fuite paternelle occasionnelle (e.g. *Silene acaulis*), on ne dispose que des signatures de recombinaison du génome mitochondrial qui peuvent être causées par un taux de fuite paternelle bien inférieur au taux nécessaire pour stabiliser la gynodioécie. Il est donc difficile de savoir si la fuite paternelle pourrait aider au maintien de la gynodioécie chez d'autres espèces. Chez *Silene nutans*, nous n'avons trouvé qu'un seul cas clair d'hérité paternelle (1/1113 individus) et un taux de cet ordre de grandeur est probablement insuffisant pour contribuer au maintien du polymorphisme de façon significative (Wade and McCauley, 2005).

D'autre part, comment examiner expérimentalement si la stérilité mâle cytoplasmique favorise l'évolution de la fuite paternelle ? Comment savoir si l'observation de fuite paternelle chez quelques espèces gynodioïques relève du hasard, d'un biais dans le choix des espèces étudiées, ou d'une généralité encore inconnue ? Tester cette hypothèse demanderait de quantifier précisément les taux de fuite paternelle chez des espèces gynodioïques et non-gynodioïques et de voir si système de reproduction et fuite paternelle sont ou non corrélés. Détecter des événements rares demandant des échantillons de grandes tailles, quantifier la fuite paternelle chez assez d'espèces pour établir une corrélation fiable représente un travail de très grande ampleur. De plus, cette approche nécessite de connaître l'histoire des systèmes de reproduction au sein des groupes étudiés. Par exemple chez le genre *Silene*, la gynodioécie est ancestrale et on pourrait trouver de la fuite paternelle chez toutes les espèces, y compris celles non-gynodioïques, sans que cela invalide l'hypothèse. De même, chez des espèces où la gynodioécie aurait évolué récemment, ne pas observer de fuite paternelle ne serait pas informatif. Enfin, cette approche présente l'inconvénient de toutes les approches corrélatives, à savoir l'impossibilité d'en déduire un lien causal. En particulier, s'il est théoriquement possible que la stérilité mâle cytoplasmique favorise l'évolution de la fuite paternelle, il est tout aussi possible que ce soit la fuite paternelle (ou plutôt l'hétéroplasmie et la recombinaison associées) qui ait favorisé l'émergence de CMS.

5.0.3.2 Fuite paternelle, gynodioécie et évolution du génome mitochondrial

Une conséquence importante de la fuite paternelle est qu'elle peut engendrer de l'hétéroplasmie et potentiellement de la recombinaison entre des génomes mitochondriaux différents. Cette recombinaison, dont les conséquences sont importantes pour l'évolution du génome mitochondrial en général, prend une dimension particulière chez les espèces gynodioïques (cf. chapitre 4). En effet, on sait que les gènes de CMS sont issus d'évènements de recombinaison au sein du génome mitochondrial. Leur apparition ne nécessite pas que la recombinaison ait lieu entre deux molécules différentes, cependant, une recombinaison entre génomes différents pourrait favoriser l'apparition de nouveaux variants et augmenter les possibilités d'apparition des CMS. D'autre part, des évènements de recombinaison ayant lieu entre des loci de CMS pourraient reconstituer des cytoplasmes mâle-fertiles ou, à l'inverse, générer de nouveaux complexes multilocus de stérilité mâle. De tels complexes pourraient expliquer les fréquentes relations d'épistasie entre les restaurateurs, dont l'évolution, non triviale, n'a jamais fait l'objet d'explications. En effet, la restauration d'un complexe de CMS nécessiterait la restauration conjointe des gènes de CMS le constituant, donnant l'illusion d'une relation d'épistasie entre les restaurateurs des différents gènes de CMS du complexe.

Contrairement à l'effet de la fuite paternelle sur le maintien de la gynodioécie, l'impact de la recombinaison sur l'évolution du génome mitochondrial peut donc être important même si les taux de fuite paternelle observés sont très faibles. Or on sait que des évènements de recombinaison intra- et inter-locus se produisent à l'échelle évolutive chez plusieurs espèces gynodioïques du genre *Silene* (cf. chapitre 4). Ainsi, même si le taux de recombinaison est insuffisant pour assurer un équilibre de liaison entre les loci mitochondriaux (McCauley and Ellis, 2008), il pourrait influencer sur l'évolution de la stérilité mâle cytoplasmique.

On peut s'étonner que, malgré les taux d'hétéroplasmie élevés observés chez *Silene vulgaris*, la recombinaison ne soit pas plus fréquente. Ce paradoxe s'explique par les nombreuses conditions nécessaires à la détection d'un recombinant. Il faut en effet que l'hétéroplasmie existe au sein des organites et pas seulement de l'individu (ce qui nécessite la fusion des organites paternels et maternels si l'hétéroplasmie résulte de la fuite paternelle) et que la recombinaison se produise entre deux molécules différentes au sein de l'organite – évènement de faible probabilité lorsque les stoechiométries des différents ADNmt sont déséquilibrées, ce qui pourrait souvent être le cas. S'ajoutent à cela les conditions nécessaires à la détection de la recombinaison, à savoir le génotypage de deux sites situés de part et d'autre du site où la recombinaison s'est produite. La mesure du taux de recombinaison sous-estime donc largement l'importance de la fuite paternelle et de l'hétéroplasmie.

Chez *Silene nutans*, nous avons détecté chez un individu gynomonoïque deux haplotypes non parentaux, qui pourraient résulter de la recombinaison entre l'ha-

plotype maternel AU (Auvergne) et l'haplotype Q1 (Queyras1), ce dernier n'étant a priori pas porté par les parents (ARTICLE 4). Cet événement de recombinaison a donc peu de chance de s'être produit chez le descendant, et il est plus vraisemblable que ces deux recombinants aient été déjà présents en faible stoechiométrie chez une mère hétéroplasmique cryptique. Selon cette hypothèse, la recombinaison entre l'haplotype Q1 et l'haplotype AU se serait donc produit dans la population Auvergnate, population d'origine de la mère. Malheureusement, la population Auvergnate semble être monomorphique (50 individus génotypés) et ces deux haplotypes ne coexistent que dans la population du Queyras. L'origine de ces deux recombinants reste donc mystérieuse pour l'instant.

5.0.3.3 Fuite paternelle et interprétation de croisements contrôlés

L'existence de la fuite paternelle pose également des problèmes plus pratiques liés à sa méconnaissance. L'hypothèse de l'hérédité maternelle du cytoplasme est sous-jacente à toutes les études expérimentales ayant pour sujet le déterminisme génétique de la gynodioécie. Pourtant, ne pas prendre en compte une transmission non maternelle du cytoplasme chez certains descendants peut amener à des conclusions fausses concernant le nombre de CMS et/ou le nombre de restaurateurs. Or les taux d'hérédité non maternelle observés chez *Silene vulgaris* sont assez importants, surtout lorsqu'on considère que le taux de fuite paternelle est très dépendant du croisement et que certains d'entre eux montrent près de 50% d'hérédité non maternelle (McCauley et al., 2005).

Notre étude du déterminisme génétique du sexe chez *Silene nutans* ne fait pas exception et suppose comme les autres une hérédité maternelle du cytoplasme pour l'interprétation des ségrégations de phénotypes sexuels dans les descendances de croisements contrôlés (cf. ARTICLE 1). Cependant, nous avons testé l'hérédité mitochondriale de tous les descendants et avons montré que le taux d'hérédité non maternelle était très faible (3/1113 individus, cf. ARTICLE 4). Les trois cas étant répartis dans trois croisements différents, leur éventuel impact sur le sex-ratio de la descendance est plus faible que celui lié au hasard de l'échantillonnage ($n=30$ par croisement). Il existe cependant deux cas particuliers pour lesquels des variations minimales de ségrégations sont susceptibles d'affecter les résultats : l'ajout d'un hermaphrodite dans une descendance purement femelle et l'ajout d'une femelle dans une descendance purement hermaphrodite. En effet, les sex-ratio 0:30 et 30:0 (femelle:hermaphrodite) s'expliquent avec très peu de restaurateurs tandis que les sex-ratio 29:1 et 1:29 demandent des modèles de restauration plus complexes (surtout pour 29:1). J'ai donc vérifié le génotype des individus de sexe très minoritaire au sein d'un croisement. Tous ont montré une hérédité des mitochondries normale à l'exception d'un individu avéré du croisement 27 (27#24, cf. ARTICLE 4) et deux cas suspects dans ce même croisement. En fonction des résultats de séquençage à venir, le nombre de restaurateurs associés à ce croisement pourrait être modifié mais le nombre de restaurateurs impliqués dans la restauration de l'haplotype AU

ne pourrait qu'être augmenté.

5.0.4 Les questions non résolues de la gynomonoécie

5.0.4.1 Déterminisme génétique de la gynomonoécie

Nos données démontrent que, chez les individus gynomonoïques, la proportion de fleurs pistillées et parfaites est au moins partiellement génétiquement déterminés (ARTICLE 2 et 3). Bien que nos données ne permettent pas de trancher entre les deux hypothèses de déterminisme génétique (l'hétéroplasmie et la restauration quantitative), nous discuterons ici la cohérence de certains de nos résultats avec les deux hypothèses.

Il a été suggéré que le phénotype gynomonoïque résulte de la ségrégation de cytoplasmes mâle-stériles et mâle-fertiles au sein des individus et les preuves récentes de fuite paternelle et d'hétéroplasmie chez *Silene vulgaris* apportent un soutien indirect à cette hypothèse. En effet, chez cette espèce, la proportion d'individus gynomonoïques est du même ordre de grandeur que celle d'individus hétéroplasmiques, même si aucun lien direct n'a été établi entre gynomonoécie et hétéroplasmie (Charlesworth and Laporte, 1998; Pearl et al., 2009; Welch et al., 2006). Chez *Silene nutans* cependant, le taux d'hérédité non-maternelle semble être très faible (0.3%) tandis que la proportion d'individus gynomonoïques atteint 30% lorsqu'un phénotype exhaustif est réalisé. Ainsi, même si les individus hétéroplasmiques portant un haplotype majoritaire d'origine maternelle n'ont pas pu être détecté par notre méthode de génotypage, l'hypothèse de l'hétéroplasmie est peu cohérente avec nos données. De plus, nous avons effectué chez 16 plantes gynomonoïques le génotypage de plusieurs hampes florales présentant parfois des variations dans la proportion de fleurs pistillées et nous n'avons détecté qu'un seul cas d'hétéroplasmie chez lequel aucune correspondance entre génotype et phénotype local n'a pu être établie. Bien que réalisée sur un petit échantillon, cette observation montre qu'il est peu probable que tous les individus gynomonoïques soient hétéroplasmiques.

Ainsi, nos données semblent difficiles à concilier avec l'hypothèse de l'hétéroplasmie, bien qu'aucune preuve ne puisse clairement la réfuter. Au contraire, nos données ne présentent pas d'incohérence avec l'hypothèse de restauration quantitative. Les nombreux gènes impliqués dans la restauration (ARTICLE 1) suggèrent une restauration complexe, peut-être quantitative, mais aucun lien avec la gynomonoécie n'a été montré. Tous ces arguments restent indirects. Les expériences en cours sur le déterminisme génétique des gynomonoïques devraient permettre d'obtenir des preuves directes en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses (les deux n'étant pas forcément exclusives).

5.0.4.2 La gynomonoécie est-elle une stratégie évolutive ?

Une des questions centrales de la gynomonoécie est de savoir si le fait de produire des fleurs pistillées et parfaites sur une même plante est une stratégie évolutive ou

découle de la détermination quantitative du sexe ou d'une mauvaise canalisation entraînant des erreurs développementales. Distinguer ces trois phénomènes n'est a priori pas évident mais la notion de stratégie évolutive implique un avantage sélectif tandis que les deux autres phénomènes peuvent mener à des phénotypes de faibles valeurs adaptatives.

Deux types d'avantage évolutif des gynomonoïques sont généralement évoqués dans la littérature. Le premier est lié à l'avantage adaptatif que peut procurer la plasticité phénotypique. En effet, les individus gynomonoïques semblent être caractérisés par une plasticité phénotypique importante qui pourrait être adaptative pour plusieurs raisons ¹ :

- La plasticité pourrait permettre aux gynomonoïques de produire plus de fleurs parfaites quand la production de pollen à l'échelle de la population est faible afin d'assurer la fécondation de leurs ovules, et au contraire produire plus de fleurs pistillées lorsque l'apport de pollen est suffisant, afin de profiter des avantages de l'allopécondation.
- Elle pourrait favoriser la production des fleurs ou des gamètes les moins coûteux(es) en ressources quand les conditions environnementales sont défavorables (voir la discussion de l'ARTICLE 3).

Chez les espèces gynodioïques comprenant des individus gynomonoïques, peu d'études se sont penchées sur le sujet et il n'existe pour l'instant pas de preuve que la plasticité phénotypique puisse apporter un quelconque avantage adaptatif. En outre, la plasticité du phénotype gynomonoïque a rarement été quantifiée et les deux études (dont la notre) l'ayant fait montrent que la variation intra-individuelle dans l'expression du phénotype sexuel serait plus réduite que celle entre individus (Widén and Widén, 1999, ARTICLE 3). La plasticité du phénotype gynomonoïque pourrait donc avoir été surestimée, peut-être à cause des nombreux phénotypes réalisés à partir d'un échantillon des fleurs de l'individu (qui ajoutent à la variation réelle une variation due à l'erreur de mesure). La quantification de la plasticité phénotypique chez d'autres espèces gynodioïques est donc nécessaire avant de s'intéresser à son éventuelle valeur adaptative.

En revanche, quelques résultats intéressants ont été obtenus chez des espèces gynomonoïques pures et motivent l'investigation chez les espèces gynodioïques. Par exemple, chez la gynomonoïque *Silene noctiflora*, Folke and Delph (1997) ont montré que la proportion de fleurs pistillées augmentait avec la température. Les auteurs suggèrent que cette plasticité pourrait être adaptative, l'activité des pollinisateurs augmentant avec la température et permettant d'assurer l'allopécondation des fleurs pistillées. Cependant, le caractère adaptatif de la plasticité du phénotype gynomonoïque n'a, à ma connaissance, été démontré que chez la gynomonoïque *Solidago altissima*. Chez cette espèce, une faible disponibilité en nutriments dans le sol favorise la production de fleurs pistillée, et les individus les plus mâles sont les plus fit

1. Cependant, la plasticité du phénotype gynomonoïque pourrait simplement résulter du fait qu'il est plus difficile de canaliser un phénotype hétérogène qu'un phénotype uniforme.

en milieu riche tandis que les individus les plus femelles sont les plus fit en milieu pauvre (Wise et al., 2008). Pourtant, les auteurs estiment que l'impact évolutif serait minime, l'amplitude de la plasticité étant réduite.

La gynomonoécie pourrait également présenter un avantage évolutif en soi, indépendant de la plasticité. Cet avantage correspond à la stratégie usuellement appelée *bet-hedging*. Cette stratégie tire son avantage de la diminution de la variance autour de la fitness moyenne. Les gynomonoïques pourraient bénéficier d'une stratégie *bet-hedging* grâce au compromis entre dépression de consanguinité et limitation par le pollen qu'offre la production de fleurs pistillées et parfaites. L'espèce gynomonoïque *Silene noctiflora* pourrait répondre à cette stratégie (Davis and Delph, 2005). Au contraire, Collin and Shykoff (2003) ont montré chez *Dianthus sylvestris* que les fleurs pistillées des gynomonoïques ne bénéficiaient pas d'un meilleur taux d'allofécondation que les fleurs parfaites. De plus, la limitation par le pollen serait assez réduite chez les espèces gynodioïques (cf. chapitre 3).

En l'absence de tout avantage adaptatif, on peut également imaginer que le phénotype gynomonoïque soit du à des erreurs développementales. L'erreur développementale étant par définition exceptionnelle (sinon, on parlera plutôt de polymorphisme), cette hypothèse explique mal les gynomonoïques portant des fleurs parfaites et pistillées en proportions équilibrées. Elle est, en revanche, invoquée pour expliquer les individus gynomonoïques produisant seulement quelques fleurs pistillées, et en particulier lorsque celles-ci sont produites en début de floraison. La mise en route de la physiologie de la floraison (hormones, etc.) pourrait en être la cause. D'autre part, on s'attend à ce que des conditions stressantes favorisent l'apparition d'erreurs de développement et donc augmente la proportion de gynomonoïques. Aucune de nos données ne suggère que le phénotype gynomonoïque soit le résultat d'un stress biotique ou abiotique (voir la fin de la discussion de l'ARTICLE 2) mais cette hypothèse nécessite d'être testée.

5.0.4.3 Impact de la gynomonoécie sur l'évolution de la gynodioécie

Chez *Silene nutans*, comme chez la majorité des espèces chez lesquelles le phénotype gynomonoïque a été étudié avec attention, les individus gynomonoïques représentent une part importante des individus et sont donc susceptibles de jouer un rôle dans les dynamiques d'évolution de la gynodioécie. Pourtant, il n'existe aucune étude théorique ayant pris en compte l'existence de ces individus. Les raisons de ce manque sont simples :

- Premièrement, les traits reproducteurs des gynomonoïques sont mal connus (Chapitre 2) et de ce point de vue, notre étude chez *Silene nutans* contribue à enrichir notre compréhension du phénotype gynomonoïque (ARTICLE 2). D'un autre côté, elle tend aussi à la complexifier puisque nous avons montré que les individus gynomonoïques étaient répartis en deux classes aux caractéristiques reproductrices différentes. Cette distinction, bien que souvent mentionnée, n'a

jamais été prise en compte dans l'analyse des traits floraux et reproducteurs dans les autres études, et la généralisation de ces deux catégories à la gynomonoécie dans son ensemble reste donc à démontrer.

- La deuxième raison, la plus limitante, est la méconnaissance du système de contrôle, génétique et/ou environnemental, du phénotype gynomonoïque. Nous avons démontré que le sex-ratio des gynomonoïques était au moins en partie génétiquement déterminé chez *Silene nutans* (ARTICLE 3). Cependant, ni les données disponibles dans la bibliographie ni nos données ne permettent d'éliminer clairement l'une des deux hypothèses de déterminisme génétique.

Pour étudier l'impact des gynomonoïques sur l'évolution de la gynodioécie, il est donc nécessaire de choisir l'un des deux déterminismes et de paramétrer les fitness mâles et femelles en fonction des données disponibles.

Supposons d'abord un déterminisme de type restauration quantitative. Même si l'impact du phénotype gynomonoïque n'a jamais été modélisé, il existe un modèle d'évolution de la gynodioécie supposant que la restauration est quantitative (Bailey and Delph, 2007b). Dans ce modèle, le niveau de restauration est une variable quantitative pouvant prendre 6 valeurs (0 à 5). Au-dessus d'un certain seuil de restauration (fixée à 3 dans le modèle), l'individu est hermaphrodite, en dessous, il est femelle. Deux CMS, chacune restaurée indépendamment et selon ce principe, sont modélisées et différents types de coûts de restauration sont testés. Bailey and Delph (2007b) montrent que les résultats varient assez peu par rapport à des modèles similaires dans lesquels la restauration est contrôlée par un seul locus (Bailey et al., 2003; Gouyon et al., 1991). Que changerait la présence d'individus gynomonoïques dans le modèle ?

Supposons que le phénotype n'est plus déterminé par un seuil, mais par deux, partageant femelles, gynomonoïques et hermaphrodites (cf FIGURE 5.1A). L'impact des gynomonoïques dépendra de leurs fitness mâle et femelle à l'échelle individuelle (les caractéristiques des fleurs parfaites et pistillées n'ont pas d'importance puisque toutes transmettent la même information génétique). Si les fitness mâle et femelle des gynomonoïques sont comprises entre celles des femelles et des hermaphrodites, ce qui est plausible (cf chapitre 3 et ARTICLE 2), l'ajout des gynomonoïques dans le modèle devrait avoir un effet sur l'évolution des CMS et des restaurateurs similaire à celui généré par un déplacement du seuil de restauration T dans un modèle sans gynomonoïques (cf FIGURE 5.1A). Ce paramètre n'a malheureusement pas été testé dans le modèle de Bailey and Delph (2007b) et prédire son effet n'est pas trivial. En effet, un déplacement du seuil vers la droite produit immédiatement plus de femelles mais devrait également modifier la sélection sur les restaurateurs et pourrait déplacer la courbe vers la droite. D'autre part, la différence $T_1 - T_2$ devrait également influencer la proportion de gynomonoïques.

Spéculer sous l'hypothèse de l'hétéroplasmie est plus délicat car aucun modèle n'a jamais considéré que l'action stérilisante des cytoplasmes puisse être quantitative. De plus, cela demande de connaître les caractéristiques reproductrices des fleurs

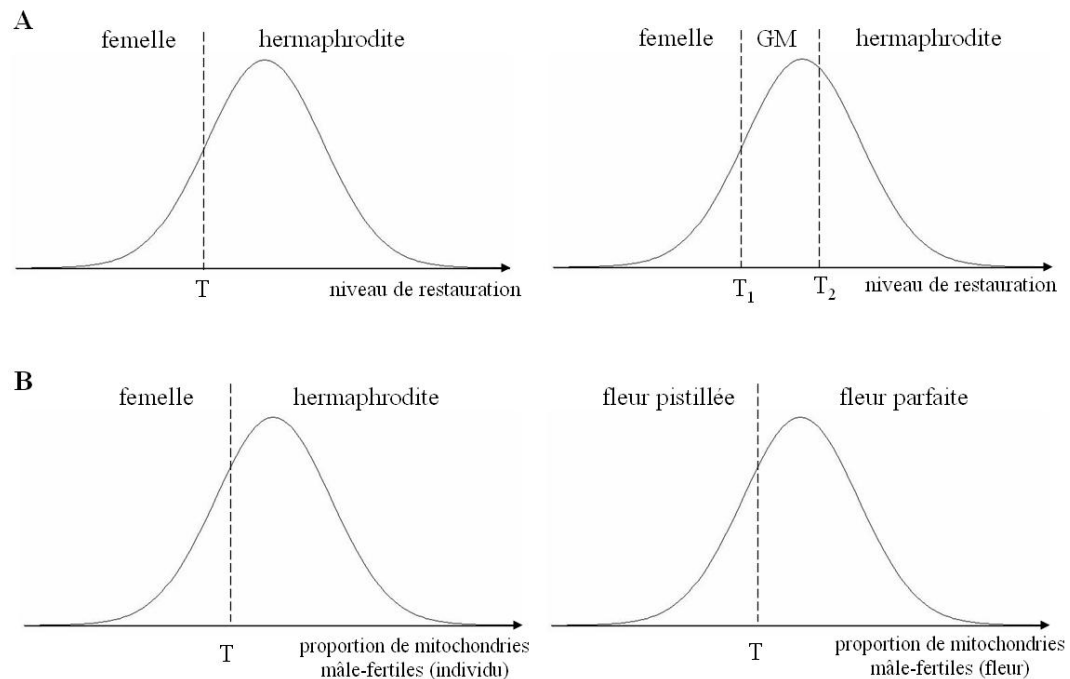


FIGURE 5.1 – Détermination du sexe sous l’hypothèse d’une restauration quantitative (A) ou de l’hétéroplasmie (B). **(A)** La restauration est une variable quantitative, ici illustrée dans un cas continu. A gauche, les individus gynomonoïques ne sont pas considérés. En dessous d’un certain seuil du niveau de restauration, appelé T , l’individu est femelle, au-dessus, il est hermaphrodite. A droite, on introduit les individus gynomonoïques grâce à deux seuils qui définissent les trois phénotypes sexuels. Si les gynomonoïques possèdent des caractéristiques reproductrices très proches de celles de femelles (resp. des hermaphrodites), on en revient au cas précédent avec $T \approx T_2$ (resp. $T \approx T_1$). Si les gynomonoïques ont des caractéristiques intermédiaires entre celles des femelles et celles des hermaphrodites, on attend des effets intermédiaires entre ces deux extrêmes ($T = T_1$ et $T = T_2$). **(B)** Sous l’hypothèse de l’hétéroplasmie, le sexe est aussi une variable quantitative mais est déterminé par la proportion de mitochondries mâle-stériles et mâle-fertiles. A gauche, les individus gynomonoïques ne sont pas considérés et c’est la proportion de mitochondries mâle-fertiles dans l’individu qui détermine si l’individu est femelle ou hermaphrodite. A droite, cette détermination s’effectue au niveau de la fleur et non plus de l’individu, ce qui permet d’inclure les gynomonoïques dans le modèle. GM : gynomonoïques. Les distributions ont été supposées normales à des fins d’illustration.

parfaites et pistillées des gynomonoïques et plus seulement les fitness au niveau individuel. Négligeons dans un premier temps les gynomonoïques et imaginons un déterminisme du sexe tel que la proportion de mitochondries mâle-fertiles et mâle-stériles² au sein d'un individu détermine si celui-ci est femelle ou hermaphrodite (cf FIGURE 5.1B). Si l'hétéroplasmie est rare, la proportion de mitochondries mâle-fertiles d'un individu est presque toujours égale à 0 ou 1 et le modèle s'approche par les modèles classiques de gynodioécie. Si l'hétéroplasmie n'est pas négligeable, les femelles peuvent porter une part de mitochondries mâle-fertiles et les hermaphrodites une part de mitochondries mâle-stériles, ce qui pourrait avoir plusieurs effets :

- Les mitochondries mâle-fertiles portées par des femelles bénéficient de l'avantage dans la production de graines de celles-ci, avec pour conséquence la diminution de l'avantage relatif des mitochondries mâle-stériles par rapport aux mâle-fertiles.
- A l'inverse, des mitochondries mâle-stériles sont portées par des hermaphrodites, qui produisent moins de graines que les femelles, ce qui renforce l'effet mentionné ci-dessus.
- En supposant que l'hétéroplasmie est générée par fuite paternelle, les hermaphrodites transmettent essentiellement des mitochondries mâle-fertiles via le pollen, ce qui augmente encore leur avantage par rapport aux mitochondries mâle-stériles (cf. effet de la fuite paternelle sur le maintien de la CMS, décrit par Wade and McCauley, 2005).

On s'attend donc à ce que considérer la CMS comme une variable quantitative diminue l'avantage du cytoplasme mâle-stérile (avantage lié à l'avantage femelle s).

Inclure les gynomonoïques dans un tel modèle ne change pas fondamentalement son principe mais requiert une détermination du sexe au niveau de la fleur et plus au niveau de l'individu (cf FIGURE 5.1B). Cependant, le niveau auquel s'exerce la détermination (fleur ou individu) n'a pas d'influence si les fleurs pistillées des gynomonoïques et des femelles (resp. les fleurs parfaites des gynomonoïques et des hermaphrodites) ont les mêmes caractéristiques reproductrices. Dans le cas contraire, les individus gynomonoïques doivent être modélisés en tant que tels et une meilleure connaissance de leur origine (maintien de l'hétéroplasmie d'une génération à l'autre, fuite paternelle) est indispensable pour construire le modèle.

5.0.5 Conclusion & Perspectives

Deux des études entreprises pendant cette thèse étant encore en cours, les perspectives pour un avenir proche ont déjà été évoquées dans les discussions des ARTICLES 3 et 4, et les données attendues sur le déterminisme génétique de la gynodioécie (ARTICLE 3) devraient constituer un bon point de départ pour la construction de modèles de gynodioécie incluant des individus gynomonoïques.

2. L'appellation mâle-stérile/mâle-fertile n'est pas absolue mais plutôt relative aux restaurateurs portés par l'individu.

Concernant des perspectives moins immédiates, j'ai déjà largement évoqué dans cette conclusion les perspectives liées à l'étude de la gynomonoécie, de la fuite paternelle et de l'hétéroplasmie. Les autres perspectives, peut-être plus classiques mais non moins importantes, sont liées aux aspects que j'ai laissés de côté pendant ma thèse, comme l'impact de la limitation par le pollen, du régime de reproduction, et de tous les autres effets spatiaux. En effet, la totalité des travaux expérimentaux de ma thèse a été réalisée dans des populations artificielles créées à partir des descendants de croisements contrôlés. Si cette approche a l'avantage de prendre en compte les effets de famille et de mieux contrôler les conditions environnementales, elle ne reproduit pas l'hétérogénéité spatiale existant dans les populations. En particulier, l'estimation des fitness (ARTICLE 2) pourrait être sensiblement différente dans les populations naturelles, par exemple en cas de limitation par le pollen et/ou de dépression de consanguinité. De même l'estimation du taux d'hérédité non maternelle a été faite sur des croisements conçus pour maximiser la probabilité de détection de fuite paternelle et ce taux pourrait être bien plus faible dans des populations naturelles structurées.

Enfin, l'identification de gènes de CMS différents et des restaurateurs associés (ARTICLE 1) constitue une base intéressante pour l'étude de la dynamique de la gynodioécie à plus large échelle spatiale. Une étude est en cours sur la répartition des haplotypes mitochondriaux en Europe, incluant les haplotypes étudiés dans cette thèse. Couplée à l'estimation des taux de femelles et du lien entre phénotype et haplotype mitochondrial dans les populations, ces travaux pourraient permettre une meilleure compréhension des dynamiques des CMS et des restaurateurs à large échelle.

Bibliographie

- Aanen, D. K., Kuyper, T. W., Debets, A. J. M., and Hoekstra, R. F.** 2004. The evolution of non-reciprocal nuclear exchange in mushrooms as a consequence of genomic conflict. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271 :1235–1241. → p. 19, 20
- Adams, C. R., Stamer, K. A., Miller, J. K., McNally, J. G., Kirk, M. M., and Kirk, D. L.** 1990. Patterns of organellar and nuclear inheritance among progeny of two geographically isolated strains of *Volvox Carteri*. *Current Genetics* 18 :141–153. → p. 151
- Agren, J. and Willson, M. F.** 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in gynodioecious *Geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78 :470–480. → p. 39, 70, 73, 75, 81, 82, 92, 93, 94, 95, 99, 158
- Albert, B., Lelandais, C., Pla, M., Leuret, C., Vitart, E., Mathieu, C., Si-hachakr, D., Godelle, B., and De Paepe, R.** 2003. Amplification of *Nicotiana sylvestris* mitochondrial subgenomes is under nuclear control and is associated with phenotypic changes. *Genetica* 117 :17–25. → p. 128
- Alonso, C.** 2005. Pollination success across an elevation and sex ratio gradient in gynodioecious *Daphne laureola*. *American Journal of Botany* 92 :1264–1269. → p. 95
- Alonso, C. and Herrera, C. M.** 2001. Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in southern spanish gynodioecious *Daphne laureola* (thymelaeaceae). *American Journal of Botany* 88 :1016–1024. → p. 39
- Andersson, H.** 1999. Female and hermaphrodite flowers on a chimeric gynodioecious *Silene vulgaris* plant produce offspring with different genders : A case of heteroplasmic sex determination? *Journal of Heredity* 90 :563–565. → p. 62, 82, 99, 101, 108, 130, 131, 137, 138, 152
- Arimura, S., Yamamoto, J., Aida, G. P., Nakazono, M., and Tsutsumi, N.** 2004. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid

- distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 :7805–7808. → p. 127, 167
- Ashman, T. L.** 1999. Determinants of sex allocation in a gynodioecious wild strawberry : implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology* 12 :648–661. → p. 21, 53
- Asikainen, E. and Mutikainen, P.** 2003. Female frequency and relative fitness of females and hermaphrodites in gynodioecious *Geranium sylvaticum* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* 90 :226–234. → p. 39, 158
- Atlan, A.** 1991. Sexe et hérédité maternelle : évolution de la stérilité mâle chez *Thymus vulgaris*. PhD thesis, Université Montpellier II, Montpellier, France. → p. 99
- Backert, S., Nielsen, B. L., and Borner, T.** 1997. The mystery of the rings : structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science* 2 :477–483. → p. 126
- Bailey, M. F.** 2002. A cost of restoration of male fertility in a gynodioecious species, *Lobelia siphilitica*. *Evolution* 56 :2178–2186. → p. 38, 63
- Bailey, M. F. and Delph, L. F.** 2007a. A field guide to models of sex-ratio evolution in gynodioecious species. *Oikos* 116 :1609–1617. → p. 39
- Bailey, M. F. and Delph, L. F.** 2007b. Sex-ratio evolution in nuclear-cytoplasmic gynodioecy when restoration is a threshold trait. *Genetics* 176 :2465–2476. → p. 47, 53, 94, 178
- Bailey, M. F., Delph, L. F., and Lively, C. A.** 2003. Modeling gynodioecy : Novel scenarios for maintaining polymorphism. *American Naturalist* 161 :762–776. → p. 33, 35, 39, 53, 94, 165, 178
- Bailey, M. F. and McCauley, D. E.** 2005. Offspring sex ratio under inbreeding and outbreeding in a gynodioecious plant. *Evolution* 59 :287–295. → p. 63, 103
- Barr, C. M.** 2004. Soil moisture and sex ratio in a plant with nuclear-cytoplasmic sex inheritance. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-biological Sciences* 271 :1935–1939. → p. 39
- Barr, C. M., Keller, S. R., Ingvarsson, P. K., Sloan, D. B., and Taylor, D. R.** 2007. Variation in mutation rate and polymorphism among mitochondrial genes of *Silene vulgaris*. *Molecular Biology and Evolution* 24 :1783–1791. → p. 42
- Barr, C. M., Neiman, M., and Taylor, D. R.** 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist* 168 :39–50. → p. 120, 126, 127, 137, 151
- Barrett, S. C. H.** 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3 :274–284. → p. 11, 14

- Barroso, G. and Labarere, J.** 1995. Molecular organization and heredity of the mitochondrial genome in Basidiomycetes. *Mycoscience* 36 :135–142. → p. 151
- Battersby, B. J., Loredó-Osti, J. C., and Shoubridge, E. A.** 2003. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nature Genetics* 33 :183–186. → p. 128, 154
- Baur, E.** 1909. Das Wesen und die Erblchkeitsverhältnisse der "Varietates albo-marginatae hort" von *Pelargonium zonale*. *Z. Vererbungsl* 1 :330–351. → p. 154
- Belhassen, E., Atlan, A., Couvet, D., Gouyon, P. H., and Quetier, F.** 1993. Mitochondrial genome of *Thymus vulgaris* L. (Labiata) is highly polymorphic between and among natural populations. *Heredity* 71 :462–472. → p. 81
- Belhassen, E., Dommée, B., Atlan, A., Gouyon, P. H., Pomete, D., Assouad, M. W., and Couvet, D.** 1991. Complex determination of male-sterility in *Thymus vulgaris* L - Genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 82 :137–143. → p. 46, 60, 63, 102
- Bell, G.** 1978. The evolution of anisogamy. *Journal of Theoretical Biology* 73 :247–270. → p. 6
- Bellaoui, M., Martin-Canadell, A., Pelletier, G., and Budar, F.** 1998. Low-copy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae : relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Molecular and General Genetics* 257 :177–185. → p. 30, 130
- Belliard, G., Vedel, F., and Pelletier, G.** 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281 :401–403. → p. 157, 167
- Bentley, K. E., Mandel, J. R., and McCauley, D. E.** 2010. Paternal leakage and heteroplasmy of mitochondrial genomes in *Silene vulgaris* : Evidence from experimental crosses. *Genetics* 185 :961–968. → p. 123, 132, 133, 137, 138, 153, 154, 165, 172
- Bertin, R. I. and Kerwin, M. A.** 1998. Floral sex ratios and gynomonoeacy in Aster (Asteraceae). *American Journal of Botany* 85 :235–244. → p. 69
- Billiard, S., Lopez-Villavicencio, M., Devier, B., Hood, M., Fairhead, C., and Giraud, T.** 2010. Having sex, yes, but with whom ? inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biological Reviews* in press. → p. 3, 9
- Birky, C. W.** 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes - Mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 :11331–11338. → p. 119, 156

- Birky, C. W.** 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts : Laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* 35 :125–148. → p. 7, 120
- Boutin, V., Jean, R., Valéro, M., and Vernet, P.** 1988. Gynodioecy in *Beta maritima*. *Acta Oecologica-oecologia Plantarum* 9 :61–66. → p. 39
- Budar, F., Touzet, P., and De Paepe, R.** 2003. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* 117 :3–16. → p. 27, 29, 30, 31
- Burt, A. and Trivers, R.** 2006. Genes in conflict. Harvard University Press. → p. 17, 25, 26, 124, 145, 153
- Cao, L. Q., Kenchington, E., and Zouros, E.** 2004. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166 :883–894. → p. 124
- Cao, L. Q., Shitara, H., Horii, T., Nagao, Y., Imai, H., Abe, K., Hara, T., Hayashi, J. I., and Yonekawa, H.** 2007. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nature Genetics* 39 :386–390. → p. 129
- Charlesworth, D.** 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88 :94–101. → p. 12
- Charlesworth, D.** 2010. Don't forget the ancestral polymorphisms. *Heredity* 105 :509–510. → p. 42
- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. A. A.** 1979. The evolution and breakdown of s-allele systems. *Heredity* 43 :41–55. → p. 9
- Charlesworth, D. and Laporte, V.** 1998. The male-sterility polymorphism of *Silene vulgaris* : Analysis of genetic data from two populations and comparison with *Thymus vulgaris*. *Genetics* 150 :1267–1282. → p. 42, 46, 53, 60, 62, 63, 70, 81, 102, 175
- Charnov, E.** 1982. The theory of sex allocation. Princeton University Press, Princeton. → p. 82, 112
- Chase, C. D.** 2007. Cytoplasmic male sterility : a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics* 23 :81–90. → p. 29, 30, 31, 53, 62
- Chat, J., Decroocq, S., Decroocq, V., and Petit, R. J.** 2002. A case of chloroplast heteroplasmy in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) that is not transmitted during sexual reproduction. *Journal of Heredity* 93 :293–300. → p. 129

- Chinnery, P. F., Thorburn, D. R., Samuels, D. C., White, S. L., Dahl, H. H. M., Turnbull, D. M., Lightowlers, R. N., and Howell, N. 2000. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy : random drift, selection or both? *Trends in Genetics* 16 :500–505. → p. 17, 128, 129
- Chiu, W. L. and Sears, B. B. 1993. Plastome-genome interactions affect plastid transmission in *Oenothera*. *Genetics* 133 :989–997. → p. 123, 154
- Cogswell, A. T., Kenchington, E. L. R., and Zouros, E. 2006. Segregation of sperm mitochondria in two- and four-cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis* : implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 49 :799–807. → p. 124
- Collin, C. L., Pennings, P. S., Rueffler, C., Widmer, A., and Shykoff, J. A. 2002. Natural enemies and sex : how seed predators and pathogens contribute to sex-differential reproductive success in a gynodioecious plant. *Oecologia* 131 :94–102. → p. 75, 81, 92
- Collin, C. L. and Shykoff, J. A. 2003. Outcrossing rates in the gynomonoeious-gynodioecious species *Dianthus sylvestris* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 90 :579–585. → p. 70, 75, 81, 93, 94, 177
- Corriveau, J. L. and Coleman, A. W. 1991. Monitoring by epifluorescence microscopy of organelle DNA fate during pollen development in 5 angiosperm species. *Developmental Biology* 147 :271–280. → p. 121
- Cosmides, L. and Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of theoretical biology* 89 :83–129. → p. 152
- Couvet, D., Ronce, O., and Gliddon, C. 1998. The maintenance of nucleocytoplasmic polymorphism in a metapopulation : The case of gynodioecy. *American Naturalist* 152 :59–70. → p. 53
- Cree, L. M., Samuels, D. C., Lopes, S., Rajasimha, H. K., Wonnapijit, P., Mann, J. R., Dahl, H. H. M., and Chinnery, P. F. 2008. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature Genetics* 40 :249–254. → p. 129
- Cuguen, J., Wattier, R., Saumitoullaprade, P., Forcioli, D., Morchen, M., Vandijk, H., and Vernet, P. 1994. Gynodioecy and mitochondrial-DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* sp *maritima*. *Genetics Selection Evolution* 26 :S87–S101. → p. 46, 60, 81
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species . John Murray, London. → p. 81

- Davis, A. F. and Clayton, D. A.** 1996. In situ localization of mitochondrial dna replication in intact mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 135 :883–893. → p. 129
- Davis, S. L. and Delph, L. F.** 2005. Prior selfing and gynodioecy in *Silene noctiflora* L. (Caryophyllaceae) : Opportunities for enhanced outcrossing and reproductive assurance. *International Journal of Plant Sciences* 166 :475–480. → p. 69, 177
- De Cauwer, I., Arnaud, J. F., Schmitt, E., and Dufay, M.** 2010. Pollen limitation of female reproductive success at fine spatial scale in a gynodioecious and wind-pollinated species, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Journal of Evolutionary Biology* 23 :2636–2647. → p. 41
- de Haan, A. A.** 1996. The maintenance of male sterility in *Plantago lanceolata* L. PhD thesis, Netherland institute of Ecology, Heteren, Netherlands. → p. 99, 100, 107, 113
- de Haan, A. A., Hundscheid, M. P. J., and vanHinsberg, A.** 1997a. Effects of CMS types and restorer alleles on plant performance in *Plantago lanceolata* L. : an indication for cost of restoration. *Journal of Evolutionary Biology* 10 :803–820. → p. 38
- de Haan, A. A., Koelewijn, H. P., Hundscheid, M. P. J., and van Damme, J. M. M.** 1997b. The dynamics of gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. 2. Mode of action and frequencies of restorer alleles. *Genetics* 147 :1317–1328. → p. 46, 62
- de Haan, A. A., Mateman, A. C., van Dijk, P. K., and van Damme, J. M. M.** 1997c. New CMS types in *Plantago lanceolata* and their relatedness. *Theoretical and Applied Genetics* 94 :539–548. → p. 42, 46, 60
- Del Castillo, R. F. and Trujillo, S.** 2009. Evidence of restoration cost in the annual gynodioecious *Phacelia dubia*. *Journal of Evolutionary Biology* 22 :306–313. → p. 38, 63
- Delph, L. F.** 1996. Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers, pp. 217–237. In D. Lloyd and S. Barret (eds.), *Floral biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman and Hall, New York. → p. 92
- Delph, L. F. and Mutikainen, P.** 2003. Testing why the sex of the maternal parent affects seedling survival in a gynodioecious species. *Evolution* 57 :231–239. → p. 70, 75, 81
- Delph, L. F., Touzet, P., and Bailey, M. F.** 2007. Merging theory and mechanism in studies of gynodioecy. *Trends in Ecology & Evolution* 22 :17–24. → p. 29, 35, 36, 37, 53, 60, 62, 166, 167

- Derepas, A. and Dulieu, H.** 1992. Inheritance of the capacity to transfer plastids by the pollen parent in *Petunia hybrida* hort. *Journal of Heredity* 83 :6–10. → p. 123, 154
- Desfeux, C.** 1996. L'évolution des systèmes de reproduction chez les plantes à fleurs : modélisation et approches expérimentales sur des espèces du genre *Silene*. PhD thesis, Institut National Agronomique, Paris-Grignon, France. → p. 70, 75, 82, 93, 95, 99, 155
- Desfeux, C., Maurice, S., Henry, J. P., Lejeune, B., and Gouyon, P. H.** 1996. Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263 :409–414. → p. 13
- Dudle, D. A., Mutikainen, P., and Delph, L. F.** 2001. Genetics of sex determination in the gynodioecious species *Lobelia siphilitica* : evidence from two populations. *Heredity* 86 :265–276. → p. 46
- Dufay, M., Cuguen, J., Arnaud, J. F., and Touzet, P.** 2009. Sex ratio variation among gynodioecious populations of sea beet : can it be explained by negative frequency-dependent selection ? *Evolution* 63 :1483–1497. → p. 40, 60, 64
- Dufay, M., Lahiani, E., and Brachi, B.** 2010. Gender variation and inbreeding depression in gynodioecious-gynomonoecious *Silene nutans* (Caryophyllaceae). *International journal of plant sciences* 171 :53–62. → p. 54, 70, 75, 81, 82, 84, 85, 92, 93, 94
- Dufay, M., Touzet, P., Maurice, S., and Cuguen, J.** 2007. Modelling the maintenance of male-fertile cytoplasm in a gynodioecious population. *Heredity* 99 :349–356. → p. 33, 34, 38, 40, 53, 94, 165
- Dufay, M., Vaudey, V., De Cauwer, I., Touzet, P., Cuguen, J., and Arnaud, J. F.** 2008. Variation in pollen production and pollen viability in natural populations of gynodioecious *Beta vulgaris* ssp *maritima* : evidence for a cost of restoration of male function ? *Journal of Evolutionary Biology* 21 :202–212. → p. 38, 63
- Dulieu, H., Derepas, A., and Cornu, A.** 1990. The role of pollen in the transmission of chloroplasts and mitochondria - Examination of a special case in *Petunia*. *Bulletin de la Societe Botanique de France-Actualites botaniques* 137 :49–56. → p. 123, 154
- Ehlers, B. K., Maurice, S., and Bataillon, T.** 2005. Sex inheritance in gynodioecious species : a polygenic view. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272 :1795–1802. → p. 46, 47, 62, 81, 95, 102, 165
- Emery, S. N. and McCauley, D. E.** 2002. Consequences of inbreeding for offspring fitness and gender in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Journal of Evolutionary Biology* 15 :1057–1066. → p. 63, 103

- Erickson, L. and Kemble, R.** 1993. The effect of genotype on pollen transmission of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*). *Sexual Plant Reproduction* 6 :33–39. → p. 62, 82, 101, 123, 130, 152, 154
- Ferris, P. J. and Goodenough, U. W.** 1997. Mating type in *Chlamydomonas* is specified by mid, the minus-dominance gene. *Genetics* 146 :859–869. → p. 7
- Folke, S. H. and Delph, L. F.** 1997. Environmental and physiological effects on pistillate flower production in *Silene noctiflora* L. (Caryophyllaceae). *International Journal of Plant Sciences* 158 :501–509. → p. 100, 176
- Frank, S. A.** 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male-sterility. *American Naturalist* 133 :345–376. → p. 53
- Frank, S. A.** 1996. Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263 :339–344. → p. 8
- Frederick, R. L., Okamoto, K., and Shaw, J. M.** 2008. Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast. *Genetics* 178 :825–837. → p. 122
- Frey, J. E.** 1999. Genetic flexibility of plant chloroplasts. *Nature* 398 :115–116. → p. 129
- Frey, J. E., Frey, B., and Forcioli, D.** 2005. Quantitative assessment of heteroplasmy levels in *Senecio vulgaris* chloroplast DNA. *Genetica* 123 :255–261. → p. 128
- Fujii, S. and Toriyama, K.** 2008. Genome barriers between nuclei and mitochondria exemplified by cytoplasmic male sterility. *Plant and Cell Physiology* 49 :1484–1494. → p. 29, 32
- Garcia-Diaz, A., Oya, R., Sanchez, A., and Luque, F.** 2003. Effect of prolonged vegetative reproduction of olive tree cultivars (*Olea europaea* L.) in mitochondrial homoplasmy and heteroplasmy. *Genome* 46 :377–381. → p. 125, 129
- Garraud, C., Brachi, B., Dufay, M., Touzet, P., and Shykoff, J. A.** 2011. Genetic determination of male sterility in gynodioecious *Silene nutans*. *Heredity* 106 :757–764. → p. 81, 142
- Gigord, L., Lavigne, C., Shykoff, J. A., and Atlan, A.** 1998. No evidence for local adaptation between cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. *Heredity* 81 :156–163. → p. 63
- Gigord, L., Lavigne, C., Shykoff, J. A., and Atlan, A.** 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology* 12 :596–604. → p. 82, 104

- Glaettli, M. and Goudet, J.** 2006. Inbreeding effects on progeny sex ratio and gender variation in the gynodioecious *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *New Phytologist* 172 :763–773. → p. 62, 82, 94, 95, 103, 104
- Godelle, B. and Reboud, X.** 1995. Why are organelles uniparentally inherited. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 259 :27–33. → p. 118, 152
- Gouyon, P.-H.** 2009. Aux origines de la sexualité. Fayard. → p. 2
- Gouyon, P. H., Vichot, F., and van Damme, J. M. M.** 1991. Nuclear-cytoplasmic male-sterility - Single-point equilibria versus limit-cycles. *American Naturalist* 137 :498–514. → p. 33, 35, 39, 40, 53, 178
- Graff, A.** 1999. Population sex structure and reproductive fitness in gynodioecious *Sidalcea malviflora malviflora* (Malvaceae). *Evolution* 53 :1714–1722. → p. 41
- Guitian, P. and Medrano, M.** 2000. Sex expression and fruit set in *Silene litorea* (Caryophyllaceae) : variation among populations. *Nordic Journal of Botany* 20 :467–473. → p. 62, 70, 75, 81, 82, 93
- Hamaji, T., Ferris, P. J., Coleman, A. W., Waffenschmidt, S., Takahashi, F., Nishii, I., and Nozaki, H.** 2008. Identification of the minus-fomiance gene ortholog in the mating-type locus of *Gonium pectorale*. 178 :283–294. → p. 151
- Hanson, M. R. and Bentolila, S.** 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16 :S154–S169. → p. 29
- Hastings, I. M.** 1992. Population genetic aspects of deleterious cytoplasmic genomes and their effect on the evolution of sexual reproduction. *Genetical Research* 59 :215–225. → p. 8, 151, 164
- Hauser, T. P. and Siegismund, H. R.** 2000. Inbreeding and outbreeding effects on pollen fitness and zygote survival in *Silene nutans* (Caryophyllaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 13 :446–454. → p. 94
- Hintz, W. E. A., Anderson, J. B., and Horgen, P. A.** 1988. Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. *Genetics* 119 :35–41. → p. 18
- Hoekstra, R. F.** 1982. On the asymmetry of sex : evolution of mating types in nisogamous populations. *Journal of Theoretical Biology* 98 :427–451. → p. 9
- Hoekstra, R. F.** 1990. The evolution of male-female dimorphism - Older than sex. *Journal of Genetics* 69 :11–15. → p. 8
- Houliston, G. J. and Olson, M. S.** 2006. Non-neutral evolution of organelle genes in *Silene vulgaris*. *Genetics* 174 :1983–1994. → p. 41, 42, 53, 63, 131, 152, 167

- Hurst, G. D. D. and Werren, J. H. 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 2 :597–606. → p. 16, 151
- Hurst, L. D. 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 248 :135–140. → p. 151
- Hurst, L. D. 1994. Cytoplasmic genetics under inbreeding and outbreeding. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 258 :287–298. → p. 8
- Hurst, L. D., Atlan, A., and Bengtsson, B. O. 1996. Genetic conflicts. *Quarterly Review of Biology* 71 :317–364. → p. 8, 16, 151, 165
- Hurst, L. D. and Hamilton, W. D. 1992. Cytoplasmic fusion and the nature of sexes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 247 :189–194. → p. 2, 3, 8, 151, 164
- Ingvarsson, P. K. and Taylor, D. R. 2002. Genealogical evidence for epidemics of selfish genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 :11265–11269. → p. 42
- Jacobs, M. S. and Wade, M. J. 2003. A synthetic review of the theory of gynodioecy. *American Naturalist* 161 :837–851. → p. 22, 33, 38, 53, 62, 152
- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M., and Mackenzie, S. A. 1998. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10 :1163–1180. → p. 130
- Jenuth, J. P., Peterson, A. C., Fu, K., and Shoubridge, E. A. 1996. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 14 :146–151. → p. 18, 129
- Jurgens, A., Witt, T., and Gottsberger, G. 1996. Reproduction and pollination in central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta* 109 :316–324. → p. 82
- Kheyr-Pour, A. 1981. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare* L. 72 :45–51. → p. 46
- Kikuzawa, K. 1989. Floral biology and evolution of gynodioecism in *Daphne kamtchatica* var *jezoensis*. *Oikos* 56 :196–202. → p. 82
- Kimura, M., Seiwa, K., Suyama, Y., and Ueno, N. 2003. Flowering system of heterodichogamous *Juglans ailantifolia*. *Plant Species Biology* 18 :75–84. → p. 11
- Klaas, A. L. and Olson, M. S. 2006. Spatial distributions of cytoplasmic types and sex expression in Alaskan populations of *Silene acaulis*. *International Journal of Plant Sciences* 167 :179–189. → p. 41, 54, 62, 81, 99

- Kmiec, B., Woloszynska, M., and Janska, H.** 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics* 50 :149–159. → p. 126, 128, 130, 137, 154
- Koelewijn, H. P.** 2003. Variation in restorer genes and primary sexual investment in gynodioecious *Plantago coronopus* : the trade-off between male and female function. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270 :1939–1945. → p. 82, 94, 104
- Koelewijn, H. P. and van Damme, J. M. M.** 1995a. Genetics of male-sterility in gynodioecious *Plantago coronopus*. 1 Cytoplasmic variation. *Genetics* 139 :1749–1758. → p. 44, 46, 63, 72
- Koelewijn, H. P. and van Damme, J. M. M.** 1995b. Genetics of male-sterility in gynodioecious *Plantago coronopus*. 2 Nuclear genetic variation. *Genetics* 139 :1759–1775. → p. 46, 62, 63, 70, 82, 94, 95, 102, 103
- Koelewijn, H. P. and van Damme, J. M. M.** 1996. Gender variation, partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132 :67–76. → p. 62, 69, 70, 81, 82, 93, 99, 100
- Korpelainen, H.** 2004. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften* 91 :505–518. → p. 120, 124, 126, 128, 137, 151
- Kuroiwa, T., Enomoto, S., and Shihiraishikawa, I.** 1985. Preferential destruction of chloroplast nucleoids in zygotes in green-algae *Dictyosphaeria cavernosa* and *Acetabularia calyculus*. *Experientia* 41 :1178–1179. → p. 151
- Kuroiwa, T. and Hori, T.** 1986. Preferential digestion of male chloroplast nuclei and mitochondrial nuclei during gametogenesis of *Bryopsis maxima* okamura. *Protoplasma* 133 :85–87. → p. 122
- Kuroiwa, T., Kawano, S., Watanabe, M., and Hori, T.** 1991. Preferential digestion of chloroplast DNA in male gametangia during the late stage of gametogenesis in the anisogamous alga *Bryopsis maxima*. *Protoplasma* 163 :102–113. → p. 151
- Lafuma, L. and Maurice, S.** 2006. Reproductive characters in a gynodioecious species, *Silene italica* (Caryophyllaceae), with attention to the gynomonoeious phenotype. *Biological Journal of the Linnean Society* 87 :583–591. → p. 39, 75, 81, 82, 92, 93, 95, 155, 158
- Lax, A. R., Vaughn, K. C., Duke, S. O., and Endrizzi, J. E.** 1987. Structural and physiological studies of a plastome cotton mutant with slow sorting out. *Journal of Heredity* 78 :147–152. → p. 127, 129

- Levitan, D.** 2000. Optimal egg size in marine invertebrates : Theory and phylogenetic analysis of the critical relationship between egg size and development time in echinoids. *The American Naturalist* 156 :175–192. → p. 6
- Lewis, D.** 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants : the equilibrium between females and hermaphrodites to be expected with different types of inheritance. *New phytologist* 40 :50–63. → p. 22, 53, 81, 152
- Lopez-Villavicencio, M., Collin, C. L., and Shykoff, J. A.** 2003. No evidence of sex-differential pollen limitation at the flower level in the gynodioecious *Gypsophila repens* infected by *Microbotryum violaceum*. *International Journal of Plant Sciences* 164 :899–905. → p. 95
- Lynch, M. and Blanchard, J. L.** 1998. Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. *Genetica* 102-3 :29–39. → p. 120
- MacAlpine, D. M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R. A., and Perlman, P. S.** 2001. Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *Embo Journal* 20 :1807–1817. → p. 17, 151
- Mackenzie, S. and McIntosh, L.** 1999. Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11 :571–585. → p. 154, 157
- Manicacci, D., Couvet, D., Belhassen, E., Gouyon, P. H., and Atlan, A.** 1996. Founder effects and sex ratio in the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Molecular Ecology* 5 :63–72. → p. 40
- Matsushima, R., Hu, Y., Toyoda, K., Sodmergen, and Sakamoto, W.** 2008. The model plant *Medicago truncatula* exhibits biparental plastid inheritance. *Plant and Cell Physiology* 49 :81–91. → p. 129
- Maurice, S. Charlesworth, D. D. C. C. D. G. P.-H.** 1993. The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecious populations with nucleo-cytoplasmic male-sterility. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 251 :253–261. → p. 14
- Maurice, S.** 1999. Gynomonoecy in *Silene italica* (Caryophyllaceae) : Sexual phenotypes in natural populations. *Plant Biology* 1 :346–350. → p. 62, 70, 72, 75, 81, 92, 93, 94, 99, 103
- McCauley, D. E. and Bailey, M. F.** 2009. Recent advances in the study of gynodioecy : the interface of theory and empiricism. *Annals of Botany* 104 :611–620. → p. 40, 153
- McCauley, D. E., Bailey, M. F., Sherman, N. A., and Darnell, M. Z.** 2005. Evidence for paternal transmission and heteroplasmy in the mitochondrial genome of *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Heredity* 95 :50–58. → p. 62, 123, 131, 132, 137, 138, 152, 153, 154, 165, 172, 174

- McCauley, D. E. and Brock, M. T.** 1998. Frequency-dependent fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Evolution* 52 :30–36. → p. 95
- McCauley, D. E. and Ellis, J. R.** 2008. Recombination and linkage disequilibrium among mitochondrial genes in structured populations of the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Evolution* 62 :823–832. → p. 131, 152, 167, 173
- McCauley, D. E. and Olson, M. S.** 2003. Associations among cytoplasmic molecular markers, gender, and components of fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Molecular Ecology* 12 :777–787. → p. 38
- McCauley, D. E. and Olson, M. S.** 2008. Do recent findings in plant mitochondrial molecular and population genetics have implications for the study of gynodioecy and cytonuclear conflict? *Evolution* 62 :1013–1025. → p. 130, 137, 153
- McCauley, D. E., Olson, M. S., Emery, S. N., and Taylor, D. R.** 2000. Population structure influences sex ratio evolution in a gynodioecious plant. *American Naturalist* 155 :814–819. → p. 40
- McCauley, D. E., Sundby, A. K., Bailey, M. F., and Welch, M. E.** 2007. Inheritance of chloroplast DNA is not strictly maternal in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) : Evidence from experimental crosses and natural populations. *American Journal of Botany* 94 :1333–1337. → p. 133
- McCauley, D. E. and Taylor, D. R.** 1997. Local population structure and sex ratio : Evolution in gynodioecious plants. *American Naturalist* 150 :406–419. → p. 40
- Milligan, B. G.** 1992. Is organelle DNA strictly maternally inherited - Power analysis of a binomial distribution. *American Journal of Botany* 79 :1325–1328. → p. 138
- Miyake, K., Miyake, T., Terachi, T., and Yahara, T.** 2009. Relative fitness of females and hermaphrodites in a natural gynodioecious population of wild radish, *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae) : comparison based on molecular genotyping. *Journal of Evolutionary Biology* 22 :2012–2019. → p. 60
- Miyamura, S. and Nagumo, T.** 2007. Inheritance pattern of chloroplast DNA is correlated with gamete types based on sex-specific arrangement of the cell fusion site in *Caulerpa* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Phycological Research* 55 :47–57. → p. 151
- Mogensen, H. L.** 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83 :383–404. → p. 121, 122
- Morand-Prieur, M. E., Raquin, C., Shykoff, J. A., and Frascaria-Lacoste, N.** 2003. Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled

- crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany* 90 :949–953. → p. 94
- Moriyama, Y. and Kawano, S.** 2003. Rapid, selective digestion of mitochondrial DNA in accordance with the matA hierarchy of multiallelic mating types in the mitochondrial inheritance of *Physarum polycephalum*. *Genetics* 164 :963–975. → p. 122, 151, 154
- Moriyama, Y., Yamazaki, T., Nomura, H., Sasaki, N., and Kawano, S.** 2005. Early zygote-specific nuclease in mitochondria of the true slime mold *Physarum polycephalum*. *Current Genetics* 48 :334–343. → p. 122
- Morris, W. F. and Doak, D. F.** 1998. Life history of the long-lived gynodioecious cushion plant *Silene acaulis* (Caryophyllaceae), inferred from size-based population projection matrices. *American Journal of Botany* 85 :784–793. → p. 39, 92
- Mower, J. P., Touzet, P., Gummow, J. S., Delph, L. F., and Palmer, J. D.** 2007. Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *Bmc Evolutionary Biology* 7. → p. 42
- Nagata, N., Saito, C., Sakai, A., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T.** 1999. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. *Planta* 209 :53–65. → p. 121
- Neiman, M. and Taylor, D. R.** 2009. The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences* 276 :1201–1209. → p. 119, 120
- Nilsson, E. and Agren, J.** 2006. Population size, female fecundity, and sex ratio variation in gynodioecious *Plantago maritima*. *Journal of Evolutionary Biology* 19 :825–833. → p. 40
- Nishimura, Y., Misumi, O., Kato, K., Inada, N., Higashiyama, T., Momoyama, Y., and Kuroiwa, T.** 2002. An mt+ gamete-specific nuclease that targets mt- chloroplasts during sexual reproduction in *C. reinhardtii*. *Genes and Development* 16 :1116–1128. → p. 7, 122, 151, 154
- Olesen, J. M., Forfang, A. S., and Baez, M.** 1998. Stress-induced male sterility and mixed mating in the island plant *Cedronella canariensis* (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 212 :159–176. → p. 100, 113
- Olson, M. S., Graf, A. V., and Niles, K. R.** 2006. Fine scale spatial structuring of sex and mitochondria in *Silene vulgaris*. *Journal of Evolutionary Biology* 19 :1190–1201. → p. 39, 41, 53, 81, 94, 158, 166
- Olson, M. S. and McCauley, D. E.** 2000. Linkage disequilibrium and phylogenetic congruence between chloroplast and mitochondrial haplotypes in *Silene*

- vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267 :1801–1808. → p. 131
- Olson, M. S. and McCauley, D. E.** 2002. Mitochondrial DNA diversity, population structure, and gender association in the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Evolution* 56 :253–262. → p. 41, 54, 166
- Pannell, J.** 2002. The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual Review of Ecological Systems* 33 :397–425. → p. 15
- Parker, G. A., Baker, R. R., and Smith, V. G. F.** 1972. The origin and evolution of gamete dimorphism and the male-female phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 36 :181–198. → p. 3, 5, 6
- Pearl, S. A., Welch, M. E., and McCauley, D. E.** 2009. Mitochondrial heteroplasmy and paternal leakage in natural populations of *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Molecular Biology and Evolution* 26 :537–545. → p. 62, 132, 133, 137, 138, 153, 165, 175
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., and Vendramin, G. G.** 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14 :689–701. → p. 40
- Philipp, M.** 1980. Reproductive biology of *Stellaria longipes* goldie as revealed by a cultivation experiment. *New Phytologist* 85 :557–569. → p. 92, 93, 94, 103
- Philipp, M., Jakobsen, R. B., and Nachman, G.** 2009. A comparison of pollen-siring ability and life history between males and hermaphrodites of subdioecious *Silene acaulis*. *Evolutionary Ecology Research* 11 :787–801. → p. 94
- Poot, P.** 1997. Reproductive allocation and resource compensation in male-sterile and hermaphroditic plants of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *American Journal of Botany* 84 :1256–1265. → p. 39, 53, 70, 73, 75, 82, 92, 93, 95, 158
- Raineri, D., Jordan, P., and Kumar, A.** 1992. Restoration of fertility in cytoplasmic male-sterile *Nicotiana tabacum* (Cytoplasm N-Bigelowii) by protoplast fusion with X-Irradiated protoplasts of *Nicotiana tabacum*, Sr-1. *Journal of Experimental Botany* 43 :195–203. → p. 157, 167
- Ramsey, M., Vaughton, G., and Peakall, R.** 2006. Does inbreeding avoidance maintain gender dimorphism in *Wurmbea dioica* (Colchicaceae)? *Journal of Evolutionary Biology* 19 :1497–1506. → p. 39
- Randerson, J. P. and Hurst, L. D.** 1999. Small sperm, uniparental inheritance and selfish cytoplasmic elements : a comparison of two models. *Journal of Evolutionary Biology* 12 :1110–1124. → p. 8, 151, 164

- Randerson, J. P. and Hurst, L. D.** 2001. The uncertain evolution of the sexes. *Trends in Ecology & Evolution* 16 :571–579. → p. 6, 8
- Reboud, X. and Zeyl, C.** 1994. Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72 :132–140. → p. 151
- Richards, A.** 1997. Plant breeding systems. Chapman and Hall, London. → p. 53
- Rigaud, T. and Juchault, P.** 1992. Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* 68 :47–52. → p. 166
- Ross, M. D. and Gregorius, H. R.** 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. 2. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109 :427–439. → p. 33
- Roze, D., Rousset, F., and Michalakis, Y.** 2005. Germline bottlenecks, biparental inheritance and selection on mitochondrial variants : A two-level selection model. *Genetics* 170 :1385–1399. → p. 18, 120
- Sakurai, R., Nomura, H., Moriyam, Y., and Kawano, S.** 2004. The mitochondrial plasmid of the true slime mold *Physarum polycephalum* bypasses uniparental inheritance by promoting mitochondrial fusion. *Current Genetics* 46 :103–114. → p. 8
- Sato, A., Nakada, K., Shitara, H., Kasahara, A., Yonekawa, H., and Hayaishi, J.-I.** 2007. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Genetics* 177 :2031–2037. → p. 17, 18, 128
- Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., and Vernet, P.** 1994. Cytoplasmic male-sterility in plants - Molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trends in Ecology & Evolution* 9 :431–435. → p. 21, 29
- Schnable, P. S. and Wise, R. P.** 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science* 3 :175–180. → p. 29
- Schwartz, M. and Vissing, J.** 2002. Paternal inheritance of mtDNA in a patient with mitochondrial myopathy. *European Journal of Human Genetics* 10 :239–239. → p. 127
- Sears, B. B. and VanWinkle-Swift, K.** 1994. The salvage turnover repair (STOR) model for uniparental inheritance in *Chlamydomonas* - DNA as a source of sustenance. *Journal of Heredity* 85 :366–376. → p. 119, 152
- Sheahan, M. B., McCurdy, D. W., and Rose, R. J.** 2005. Mitochondria as a connected population : ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant Journal* 44 :744–755. → p. 127, 167

- Shedge, V., Arrieta-Montiel, M., Christensen, A. C., and Mackenzie, S. A.** 2007. Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual recA and mutS homologs. *Plant Cell* 19 :1251–1264. → p. 130
- Shykoff, J. A.** 1988. Maintenance of gynodioecy in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) - Stage-specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany* 75 :844–850. → p. 81, 92
- Shykoff, J. A.** 1992. Sex polymorphism in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) and the possible role of sexual selection in maintaining females. *American Journal of Botany* 79 :138–143. → p. 70, 81
- Shykoff, J. A., Kolokotronis, S. O., Collin, C. L., and Lopez-Villavicencio, M.** 2003. Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants : a meta-analysis. *Oecologia* 135 :1–9. → p. 22, 39, 53, 81, 95
- Sloan, D. B., Barr, C. M., Olson, M. S., Keller, S. R., and Taylor, D. R.** 2008. Evolutionary rate variation at multiple levels of biological organization in plant mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 25 :243–246. → p. 42
- Sokal, R. and Rohlf, F.** 1995. Biometry. 3rd edition. Freeman and Co., New York. → p. 57
- Städler, T. and Delph, L. F.** 2002. Ancient mitochondrial haplotypes and evidence for intragenic recombination in a gynodioecious plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 :11730–11735. → p. 41, 53, 63, 131, 137, 152, 167
- Stewart, A. D., Logsdon, J. M., and Kelley, S. E.** 2005. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution* 59 :730–739. → p. 166
- Storchova, H. and Olson, M. S.** 2004. Comparison between mitochondrial and chloroplast DNA variation in the native range of *Silene vulgaris*. *Molecular Ecology* 13 :2909–2919. → p. 41, 54, 166
- Tada, Y.** 2007. Effects of rf-1, rf-3 and rf-6(t) genes on fertility restoration in rice (*Oryza sativa* L.) with wa- and bt-type cytoplasmic male sterility. *Breeding Science* 57 :223–229. → p. 104
- Talavera, S., Arista, M., and Salgueiro, F. J.** 1996. Population size, pollination and breeding system of *Silene stockenii* Chater (Caryophyllaceae), an annual gynodioecious species of southern Spain. *Botanica Acta* 109 :333–339. → p. 62, 70, 81
- Taylor, D. R.** 1994. The genetic basis of sex ratio in *Silene alba* (= *S. latifolia*). *Genetics* 136 :641–651. → p. 25

- Taylor, D. R., Olson, M. S., and McCauley, D. E.** 2001. A quantitative genetic analysis of nuclear-cytoplasmic male sterility in structured populations of *Silene vulgaris*. *Genetics* 158 :833–841. → p. 53, 81
- Taylor, D. R., Zeyl, C., and Cooke, E.** 2002. Conflicting levels of selection in the accumulation of mitochondrial defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 :3690–3694. → p. 16
- Thiele, J., Hansen, T., Siegmund, H. R., and Hauser, T. P.** 2010. Genetic variation of inbreeding depression among floral and fitness traits in *Silene nutans*. *Heredity* 104 :52–60. → p. 94
- Thompson, J. and Tarayre, M.** 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution* 54 :1510–1520. → p. 39, 158
- Tilney-Bassett, R. and Birky** 1981. The mechanism of the mixed inheritance of chloroplast genes in *Pelargonium*. *Theo* 60 :43–53. → p. 123, 129, 154
- Touzet, P. and Budar, F.** 2004. Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in cytoplasmic male sterility? *Trends in Plant Science* 9 :568–570. → p. 29, 31, 32
- Touzet, P. and Delph, L. F.** 2009. The effect of breeding system on polymorphism in mitochondrial genes of *Silene*. *Genetics* 181 :631–644. → p. 29, 42, 53, 54, 63, 130, 131, 137, 140, 152, 167
- Touzet, P., Hueber, N., Burkholz, A., Barnes, S., and Cuguen, J.** 2004. Genetic analysis of male fertility restoration in wild cytoplasmic male sterility G of beet. *Theoretical and Applied Genetics* 109 :240–247. → p. 46
- van Damme, J.** 1984. Gynodioecy in *Plantago-lanceolata* L. 3. sexual reproduction and the maintenance of male steriles. *Heredity* 52 :77–93. → p. 38
- van Damme, J. M. M., Hundscheid, M. P. J., Ivanovic, S., and Koelewijn, H. P.** 2004. Multiple CMS - restorer gene polymorphism in gynodioecious *Plantago coronopus*. *Heredity* 93 :175–181. → p. 43, 46, 53, 55, 60, 62, 64, 81
- van Damme, J. M. M. and van Delden, W.** 1982. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. 1. Polymorphism for plasmon type. *Heredity* 49 :303–318. → p. 70, 72, 75
- van Damme, J. M. M. and van Delden, W.** 1984. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. 4. Fitness components of sex types in different life-cycle stages. *Evolution* 38 :1326–1336. → p. 92

- Van Leeuwen, T., Vanholme, B., Van Pottelberge, S., Van Nieuwenhuyse, P., Nauen, R., Tirry, L., and Denholm, I.** 2008. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance : Non-mendelian inheritance in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 :5980–5985. → p. 128, 129
- Wade, M. J. and McCauley, D. E.** 2005. Paternal leakage sustains the cytoplasmic polymorphism underlying gynodioecy but remains invisable by nuclear restorers. *American Naturalist* 166 :592–602. → p. 137, 146, 153, 155, 156, 160, 166, 172, 180
- Welch, M. E., Darnell, M. Z., and McCauley, D. E.** 2006. Variable populations within variable populations : Quantifying mitochondrial heteroplasmy in natural populations of the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Genetics* 174 :829–837. → p. 62, 123, 132, 137, 138, 153, 154, 165, 172, 175
- Werren, J. H., Baldo, L., and Clark, M. E.** 2008. *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6 :741–751. → p. 26, 166
- White, D. J., Wolff, J. N., Pierson, M., and Gemmell, N. J.** 2008. Revealing the hidden complexities of mtdna inheritance. *Molecular Ecology* 17 :4925–4942. → p. 126, 128, 137
- Whittle, C. A. and Johnston, M. O.** 2002. Male-driven evolution of mitochondrial and chloroplastidial DNA sequences in plants. *Molecular Biology and Evolution* 19 :938–949. → p. 124
- Widén, B. and Widén, M.** 1990. Pollen limitation and distance-dependent fecundity in females of the clonal gynodioecious herb *Glechoma hederacea* (Lamiaceae). *Oecologia* 83 :191–196. → p. 95
- Widén, M. and Widén, B.** 1999. Sex expression in the clonal gynodioecious herb *Glechoma hederacea* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 77 :1689–1698. → p. 70, 75, 81, 82, 93, 94, 99, 100, 112, 176
- Wise, M. J., Coffey, L. E., and Abrahamson, W. G.** 2008. Nutrient stress and gall flies interact to affect floral-sex ratio in gynomonoeious *Solidago altissima* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 95 :1233–1239. → p. 100, 112, 113, 177
- Woodson, J. D. and Chory, J.** 2008. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9 :383–395. → p. 126, 154
- Xu, J. P.** 2005. The inheritance of organelle genes and genomes : patterns and mechanisms. *Genome* 48 :951–958. → p. 120, 124, 126, 137, 151

- Yamauchi, A.** 2003. Factors affecting binary sex evolution with respect to avoidance of vertical transmission of deleterious intracellular parasites. *Journal of Theoretical Biology* 222 :505 – 515. → p. 8
- Yan, Z., Hull, C. M., Sun, S., Heitman, J., and Xu, J. P.** 2007. The mating type-specific homeodomain genes *SXI1* alpha and *SXI2a* coordinately control uniparental mitochondrial inheritance in *Cryptococcus neoformans*. *Current Genetics* 51 :187–195. → p. 122
- Yan, Z. and Xu, J. P.** 2003. Mitochondria are inherited from the MATa parent in crosses of the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 163 :1315–1325. → p. 151
- Zaegel, V., Guermann, B., Le Ret, M., Andres, C., Meyer, D., Erhardt, M., Canaday, J., Gualberto, J. M., and Imbault, P.** 2006. The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 18 :3548–3563. → p. 130, 154
- Zar, J.** 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 2nd edition edition. → p. 86
- Zhang, Q., Liu, Y., and Sodmergen** 2003. Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant and Cell Physiology* 44 :941–951. → p. 122
- Ziegler, M. and Davidson, R.** 1981. Elimination of mitochondrial elements and improved viability in hybrid cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 7 :73–88. → p. 8, 155

Glossaire

Dans ce glossaire figurent aussi bien des termes de biologie générale que des termes très spécifiques à ma thèse. Pour ces derniers, des explications complètes sont proposées au cours des différents chapitres et ce glossaire n'en reprend que l'essentiel dans le but de permettre une lecture du manuscrit « à la demande ». Ce glossaire a plutôt pour cible les non-spécialistes ; que les experts, donc, ne s'offensent pas de trouver quelques explications caricaturales et que les profanes me pardonnent les oublis. Les termes apparaissant en italique dans les définitions sont eux-même définis dans ce glossaire.

ADN Acide désoxyribonucléique – molécule composée d'un enchaînement d'unités élémentaires, les nucléotides, dont la séquence code l'information génétique. Dans les cellules *eucaryotes*, la majeure partie l'ADN est contenue dans le *noyau* et une petite partie dans les *mitochondries* ainsi que dans les *chloroplastes*.

Allèle Les allèles sont les différentes versions d'un même gène et diffèrent par leur séquence de nucléotides. Tous les allèles d'un gène occupent le même *locus*.

Angiospermes Unité taxonomique comprenant environ 300 000 espèces de plantes et caractérisée par des organes reproducteurs condensés en une fleur et des graines enfermées dans un fruit, à la différence des *gymnospermes* dont la graine est à nu.

Anisogamie Mode de fécondation dans lequel les *gamètes* sont de tailles différentes. Le gamète femelle est par définition le plus gros des deux types de gamètes. S'oppose à *isogamie*.

Avantage femelle Chez les espèces *gynodioïques*, avantage des individus femelles dans la production de graines par rapport aux *hermaphrodites*.

Chloroplaste *Organite* présent dans le *cytoplasme* des cellules *eucaryotes* photosynthétiques (plantes, algues). Il est le siège de la photosynthèse et contient de la chlorophylle, qui lui donne sa couleur verte. De par son origine endosymbiotique, il contient comme les mitochondries son propre *ADN*.

CMS *Cytoplasmic male sterility* ou stérilité mâle cytoplasmique. Désigne des éléments cytoplasmiques capables d'inactiver la fonction mâle d'un organisme. L'exemple

le plus connu est celui de la stérilité mâle cytoplasmique chez certaines *Angiospermes*, où des gènes mitochondriaux sont capables de transformer un individu normalement hermaphrodite en un individu *mâle-stérile*, c'est-à-dire femelle.

Conflit génomique Interêt divergent entre deux gènes ou groupes de gènes vis à vis de leur transmission. Situation dans laquelle « la propagation d'un gène crée un contexte favorable à la propagation d'un autre gène, exprimé au sein du même individu, mais ayant un effet opposé » (Hurst et al., 1996). Voir aussi *élément égoïste*.

Cytoplasme Totalité du contenu cellulaire, à l'exception du *noyau*. Le cytoplasme comprend plusieurs *organites*, dont les *mitochondries* et les *chloroplastes*.

Dérive génétique Processus par lequel les fréquences alléliques fluctuent aléatoirement au cours du temps. La dérive est importante dans les populations de faible effectif, et à pour origine le hasard de l'échantillonnage au moment de la transmission des *allèles* d'une génération à l'autre.

Déterminisme génétique Ensemble des gènes impliqués dans l'expression d'un trait biologique (caractère morphologique, etc.).

Diploïde Une cellule biologique est diploïde lorsque qu'elle contient deux copies (*allèles*) identiques ou différentes de chaque gène, c'est-à-dire lorsqu'elle possède deux jeux de chromosomes (2n chromosomes). Cette définition ne concerne que les organismes *eucaryotes*.

Élément égoïste Gène, ou plus généralement portion de génome, augmentant sa transmission au détriment d'autres gènes (non liés) et/ou de l'organisme dans son ensemble. Voir aussi *conflit génomique*.

Eucaryote Du grec, signifiant « vrai noyau ». Organisme vivant caractérisé par le fait que la majorité du matériel génétique cellulaire est contenu dans un *noyau* délimité par une membrane nucléaire, par opposition aux procaryotes. Ce groupe taxonomique comprend entre autres, les animaux, les végétaux et les champignons.

Fuite paternelle (*paternal leakage*) Transmission occasionnelle du *génome* mitochondrial ou chloroplastique par le *gamète* mâle résultant en une hérédité paternelle ou biparentale de ce génome.

Gamètes Cellule reproductrice *haploïde* destinée à fusionner avec un autre gamète pour donner un nouvel individu *diploïde*. Les spermatozoïdes et les *ovules* sont les gamètes mâles et femelles des animaux.

Gène Unité d'information génétique ayant pour support l'ADN et pouvant spécifier la synthèse d'une chaîne de polypeptides (p.ex. une protéine).

Génome Ensemble du matériel génétique d'un individu, codé par l'ADN. Chez les *Eucaryotes*, on peut distinguer le génome nucléaire, le génome mitochondrial et le génome chloroplastique.

Génotype Composition allélique pour tout ou partie des gènes d'un individu. Chez un individu *diploïde*, le génotype à un *locus* est défini par les deux *allèles* portés par l'individu.

Gymnospermes Unité taxonomique comprenant environ 1000 espèces caractérisées par des organes reproducteurs condensés en une fleur et des *ovules* nus (pas de fruit).

Gynodioïque Se dit d'une espèce ou d'une population composée d'individus femelles (*mâle-stériles*) et d'individus *hermaphrodites*.

Gynomonoïque Se dit d'une espèce ou d'une plante où deux types de fleurs, des fleurs *parfaites* et des fleurs *pistillées*, sont présentes sur le même individu.

Haploïde Une cellule biologique est haploïde lorsque qu'elle ne contient qu'une seule copie (*allèle*) de chaque gène, c'est-à-dire lorsqu'elle ne possède qu'un seul jeu de chromosomes (n chromosomes). Cette définition ne concerne que les organismes *eucaryotes*.

Hermaphrodite Individu produisant à la fois des *gamètes* mâles et des gamètes femelles. Chez les plantes, chaque fleur d'un individu hermaphrodite produit des gamètes mâles et des gamètes femelles et est dite *parfaite*.

Hermaphroditisme Système de reproduction dans lequel tous les individus sont *hermaphrodites*.

Hétéroplasmie Coexistence de différents *génomes* mitochondriaux et/ou chloroplastiques au sein d'un individu. S'oppose à *homoplasmie*.

Homoplasmie Présence d'un unique *génome* mitochondrial et d'un unique génome chloroplastique au sein d'un individu. S'oppose à *hétéroplasmie*.

Isogamie Mode de fécondation dans lequel tous les *gamètes* sont identiques morphologiquement. S'oppose à *anisogamie*.

Locus/loci Désigne un emplacement physique précis sur la molécule d'*ADN*. Il peut représenter un gène, une portion de gène ou un groupement de gènes.

Mâle-stérile Se dit d'un individu dont la fonction mâle est inactivée. Dans le cas de plantes *hermaphrodites*, les mâle-stériles sont donc femelles. Se dit également du *cytoplasme* de ces individus, lorsque la stérilité mâle est codée par des gènes cytoplasmiques. Voir *CMS*.

Méiose Processus impliquant des divisions cellulaires et aboutissant à la production de cellules *haploïdes* à partir de cellules *diploïdes*. Les cellules *haploïdes* engendrées peuvent être des *gamètes* ou être à l'origine d'un individu haploïde qui générera des gamètes ultérieurement.

Mitochondrie *Organite* de la cellule *eucaryote* impliquée dans la respiration cellulaire. Son rôle physiologique est primordial, car elle permet de récupérer l'énergie fournie par les molécules organiques sous forme d'ATP (molécule de stockage de l'énergie) et constitue ainsi la source principale d'énergie. La mitochondrie contient, comme le *chloroplaste*, son propre *ADN*.

Mitose Division cellulaire menant à la répartition équitable du matériel génétique dans les deux cellules filles. La mitose précédée de la réplication de l'*ADN*

permet de produire deux cellules filles génétiquement identiques entre elles et à la cellule mère.

Mutation Modification dans la séquence d'*ADN* pouvant résulter dans la modification de certains caractères *phénotypiques*.

Noyau *Organite* contenant la plupart du matériel génétique chez les *Eucaryotes*.

Organite Compartiment cellulaire spécialisé et délimité du reste de la cellule par une membrane lipidique. Il en existe de nombreux types, dont le *noyau*, les *mitochondries* et les *chloroplastes*.

Ovule *Gamète* femelle ou chez les *Angiospermes*, structure portant le gamète femelle.

Parfaite Se dit d'une fleur capable de produire des *gamètes* mâles et des gamètes femelles, c'est-à-dire portant des étamines et un pistil.

Phénotype Totalité des traits observables caractérisant un être vivant. Il est l'expression du *génotype* mais peut être influencé par les conditions environnementales (voir *plasticité phénotypique*).

Pistillée Se dit d'une fleur produisant uniquement des *gamètes* femelles, c'est-à-dire portant un pistil mais pas d'étamines.

Plasticité phénotypique Capacité d'un organisme à exprimer différents *phénotypes* dans différentes conditions environnementales à partir d'un *génotype* donné.

Pollen Minuscules grains de quelques dizaines de micromètres de diamètre produits par les étamines et contenant le gamète mâle.

Polymorphisme génétique Coexistence de plusieurs *allèles* pour un *locus* donné dans une population.

Recombinaison Phénomène conduisant à l'apparition chez le descendant de combinaisons d'allèles inédites au sein des chromosomes par rapport à celles observées chez les individus parentaux.

Ségrégation des organites Processus par lequel les lignées cellulaires issues de cellules *hétéroplasmiques* deviennent progressivement *homoplasmiques*. La ségrégation des *organites* résulte de la répartition aléatoire des organites dans les deux cellules filles lors de la *mitose*. Elle conduit à une répartition hétérogène des différents *génomomes* cytoplasmiques dans l'organisme si celui-ci est pluricellulaire.

Sex-ratio Proportions relatives des individus des différents sexes dans une population. Dans le cas des espèces *gynodioïques*, il s'agit de la proportion relative de femelles et d'hermaphrodites. Dans cette thèse, j'ai également utilisé ce terme pour désigner la proportion de fleurs *pistillées* des plantes *gynomonoïques* (traduit par *femaleness* dans les passages en anglais).

S voir *avantage femelle*

Silene Genre de plantes herbacées annuelles ou vivaces, appartenant à la famille des Caryophyllacées. Très étudié en Écologie et en Évolution, il présente une grande diversité de systèmes de reproduction. Par exemple, *Silene nutans*, *Silene vulgaris*

et *Silene acaulis* sont des espèces gynodioïques, et *Silene latifolia* et *Silene dioica* des espèces dioïques.



Silene vulgaris



Silene acaulis



Silene latifolia

Sélection Désigne le fait que les gènes les mieux transmis, par exemple ceux codant pour des traits qui favorisent la survie et la reproduction, voient leurs fréquences s'accroître d'une génération à l'autre.

Stérilité mâle cytoplasmique voir *CMS*

Restaurateur Chez les espèces *gynodioïques*, gène nucléaire capable de contrer l'action d'un gène de *stérilité mâle cytoplasmique* et de restaurer la fertilité mâle.

Résumé

Chez les plantes à fleurs, la gynodioécie – système dans lequel coexistent des individus femelles et des individus hermaphrodites – est le système de reproduction le plus commun après l’hermaphroditisme. La question de l’évolution et surtout du maintien de la gynodioécie et du polymorphisme génétique sous-jacent a intrigué les chercheurs depuis le XIX^e siècle. Aujourd’hui, les grands principes de son évolution sont posés mais beaucoup de zones d’ombres persistent. Durant ma thèse, j’ai exploré trois aspects de la gynodioécie en utilisant une approche expérimentale chez l’espèce *Silene nutans* et une approche théorique. Je me suis en premier lieu intéressée au déterminisme génétique de la gynodioécie grâce à la réalisation de croisements contrôlés qui m’ont permis de montrer que le déterminisme génétique du sexe était cytonucléaire, c’est à dire contrôlé par plusieurs gènes de stérilité mâle cytoplasmique (CMS) et plusieurs restaurateurs nucléaires de fertilité. En parallèle, j’ai porté une attention particulière aux plantes gynomonoïques – celles où coexistent sur le même pied des fleurs pistillées (femelles) et des fleurs parfaites (hermaphrodites) – fréquentes chez *Silene nutans* comme chez d’autres espèces gynodioïques. J’ai montré que les caractéristiques reproductrices et florales de ce troisième phénotype sexuel étaient souvent intermédiaires entre celles des femelles et des hermaphrodites mais pouvaient dépendre de la proportion de fleurs pistillées sur la plante. Par ailleurs et contrairement à ce qui avait été suggéré, la plasticité du phénotype gynomonoïque s’est révélée être relativement réduite, suggérant un déterminisme génétique dont la caractérisation est encore en cours. La troisième partie de ma thèse a été motivée par les preuves récentes d’hétéroplasmie – coexistence de différents génomes mitochondriaux au sein d’un individu – et de la transmission occasionnelle du génome mitochondrial par le pollen chez *Silene vulgaris*. J’ai montré théoriquement que la présence d’un gène de stérilité mâle cytoplasmique favorisait l’évolution de la fuite paternelle de mitochondries. J’ai également vérifié expérimentalement l’hérédité mitochondriale chez *Silene nutans* par le génotypage des descendance de croisements contrôlés.

Mots clés : gynodioécie | gynomonoécie | *Silene nutans* | hérédité mitochondriale | stérilité mâle cytoplasmique | restaurateurs nucléaires | plasticité phénotypique | déterminisme génétique du sexe.

Abstract

In flowering plants, gynodioecy – a system in which females and hermaphrodites coexist within populations – is the most common sexual system after hermaphroditism. The evolution and maintenance of gynodioecy and its underlying polymorphism have puzzled evolutionary biologists since the 19th century. The main principles of its evolution are well known but some points remain vague. During my PhD, I explored three aspects of gynodioecy using an experimental approach in the species *Silene nutans* and a theoretical approach. First, I studied the genetic determination of gynodioecy using controlled crosses that showed that the genetic determination of sex was cytonuclear, i.e. controlled by several cytoplasmic male sterility (CMS) genes and several nuclear restorers of fertility. Second, I focused on gynomonoecious plants – those that carry both pistillate (female) flowers and perfect (hermaphrodite) flowers – that are frequently found in *Silene nutans* as in other gynodioecious species. I showed that the floral and reproductive traits of this third sex phenotype were often intermediate between those of females and hermaphrodites but varied with varying proportions of pistillate flowers on the plant. Contrary to what was previously thought, the plasticity of the gynomonoecious phenotype was found to be limited, suggesting a genetic determination whose characterization is still in progress. The third part of my PhD was motivated by recent evidences of heteroplasmy – the coexistence of different mitochondrial genomes within an individual – and occasional transmission of the mitochondrial genome through pollen in *Silene vulgaris*. I showed theoretically that the occurrence of a cytoplasmic male sterility gene can favor the evolution of paternal leakage of mitochondria. I also investigated mitochondrial inheritance in *Silene nutans* by genotyping progenies from controlled crosses.

Keywords : gynodioecy | gynomonoecy | *Silene nutans* | mitochondrial inheritance | cytoplasmic male sterility | nuclear restorer | phenotypic plasticity | genetic determination of sex.