

Université des Sciences et Technologies de Lille

Dossier de Candidature

Pascal TOUZET

en vue d'obtenir

L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Evolution des systèmes de reproduction et des génomes chez les angiospermes – le cas de la gynodiœcie. Exemples choisis chez la betterave, les silènes et la ravenelle

Soutenue le 10 novembre 2005 devant la commission d'examen :

Françoise Budar	Directeur de recherches, INRA Versailles	Rapporteur
Lynda Delph	Professeur, Université d'Indiana	Rapporteur
Jacqui Shykoff	Directeur de recherches, CNRS Orsay	Rapporteur
Xavier Vekemans	Professeur, Université de Lille 1	Examineur
Dominique de Vienne	Professeur, Université de Paris Sud	Examineur
Joël Cuguen	Professeur, Université de Lille 1	Examineur

Bersée, le 24 octobre 2005.

Merci.

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury pour sa participation. Chacun d'entre eux a joué un rôle important dans mon parcours, par ordre d'apparition:

Dominique de Vienne, mon directeur de thèse : je me rends compte maintenant de la difficile tâche d'encadrer un doctorant, et te suis reconnaissant pour ton encadrement confiant et enthousiaste.

Joël Cuguen, pour ce pas de foi lors de mon recrutement en tant qu'ATER puis en tant que MCF au sein de ton équipe. Merci de m'avoir rappelé la fameuse fable de *Perrette et le pot au lait*, même si dans le lot des plans sur la comète, quelques desserts lactés ont pu être consommés....

Françoise Budar, pour tes conseils sur la physiologie moléculaire de la SMC, pour cette collaboration qui commence à porter ses racines (de radis), ce qui augure (Ogura) un chouette futur...

Xavier Vekemans, pour tes avis éclairés sur mes différents projets et ta rigueur scientifique.

Jacqui Shykoff, pour ton parrainage à diverses reprises, lors des dossiers de délégation ou de Fulbright. What a privilege...

Lynda Delph, I am so honored to have been part of a research project with you. Thank you for your spontaneous welcome when I wrote to you for the first time about a Fulbright proposal. You are definitely the actor of one of my most exciting research adventures...I hope there will be more to come...

Merci aussi à tous les collègues du labo de supporter mes courses et trébuchement dans l'escalier, mon retard chronique, mon optimisme un peu imbécile, et en particulier à Pierre de faire tourner la boutique, Jeff pour les séquences de world music à fond dans le bureau et de te moquer de mes commentaires *tendance* (*trends* dans le texte), Mathilde, pour Fred Vargas et ses conseils statistiques, Jacqueline et Adeline, pour toutes les données de marquage et de séquence acquises avec tant de soin et de pugnacité, Cécile et Anne-Cath pour le service commun BM, Robert, Eric et Claire pour le service commun des serres (merci Robert pour tous ces semis de betterave), Sandrine, Michèle et Muriel pour les coups de mains administrativo-comptables, Jacky, pour l'aménagements des bureaux, à tous les étudiants qui ont pris le risque de travailler avec moi...

Enfin bulles de bonheur, papillons de plaisir à ma petite tribu. Je suis si fier de chacun de vous.

A toi Licia, mon ange gardien, mon Vis à Vis. Parfum de Vie. Parcelle d'éternité.

CURRICULUM VITAE

Pascal TOUZET

Génétique et Evolution des Populations

Végétales

UMR-CNRS 8016

Bât. SN2

Université de Lille I

49655 Villeneuve d'Ascq cedex

Tél : 03.20.33.63.97

Fax : 03.20.43.69.79

Email : Pascal.Touzet@univ-lille1.fr

Né le 31 mai 1967 à Maisons-Alfort (94)

Marié, 4 enfants

SITUATION ACTUELLE

Depuis septembre 1997 Maître de Conférences à l'Ecole Polytechnique de Lille (Polytech'Lille) (anciennement Institut Agroalimentaire de Lille) attaché au laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales (GEPV), UMR-CNRS 8016.

ITINERAIRE

02-07/2005 Professeur visiteur dans le laboratoire du Professeur **Lynda Delph**, Indiana University, Bloomington, Etats-Unis (**Bourse Fulbright/Région Nord-Pas de Calais**). *Systemes de reproduction et diversité nucléotidique mitochondriale dans le genre Silene.*

2003/2005 Délégation au CNRS au sein de l'UMR CNRS 8016

1996/1997 ATER à l'Institut Agroalimentaire de Lille, attaché au GEPV (192 heures equiv. TD)

1995/1996 Post-doctorat à la Station de Génétique Végétale, INRA-UPS-INAP-G, Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette (**Bourse de la Société de Secours des Amis des Sciences**). *Etude de l'effet du polymorphisme moléculaire de gènes impliqués dans le métabolisme carboné sur la variation quantitative du développement du grain et de la croissance au stade jeune chez le maïs.*

1991/1992 et 1994/1995 Thèse de doctorat de l'INAP-G, Station de Génétique Végétale (Gif-sur-Yvette). Mention très honorable. Titre : *Apport de l'électrophorèse bidimensionnelle de protéines dans l'analyse du génome de Zea mays*. Sous la direction de **Dominique de Vienne**.

1993/1994 Visitor scientist dans le laboratoire de **Tim Helentjaris**, University of Arizona, Tucson, Etats-Unis; dans le cadre du service national. *Caractérisation d'un gène responsable de la variation quantitative de la hauteur chez le maïs.*

1990 DEA d'Amélioration des Plantes, Création variétale et Ressources génétiques (INAP-G). Stage au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale de Rhône-Poulenc Agrochimie, Lyon. *Etude du transfert de gènes de plantes transformées à des bactéries du sol*. Responsable : **Michel Lebrun**.

1990 Diplôme d'Ingénieur Agronome de l'INAP-G.

6-8/1989 Stage de deuxième année de l'INAP-G au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale de Rhône-Poulenc Agrochimie, Lyon. *Suivi en champs de tabacs transgéniques*. Responsable : **Bernard Leroux**.

7/1988 Stage de première année de l'INAP-G au sein de l'IPV au centre CNRS de Gif-sur-Yvette. *Etude de la photosynthèse d'une plante de type CAM, Kalanchoe blossfeldania*. Responsables : **Jeanne Brulfert** et **Gabriel Cornic**.

1987 DEUG Sciences de la Nature et de la vie de l'Université de Paris-Sud, Orsay, Mention Bien.

ACTIVITES DE RECHERCHE

ENCADREMENT (taux d'encadrement en %)

Post-doctorats

2003/2004

Mathilde Dufaj. ATER. Etude théorique des paramètres de fitness affectant le maintien de la gynodioécie et de cytoplasmes non stérilisants chez une espèce auto-incompatible. (100%)

2002/2004

Gaëlle Guéritaine. ATER. Analyse du déterminisme génétique de l'auto-compatibilité dans la section *Beta*. (100%)

Thèses

En cours depuis le 1/10/2004

Sarah Villain. Histoire évolutive de la section *Beta*: Origine et maintien des différentes espèces de la section. (70% ; co-encadrement avec Joël Cuguen)

2000

Eric Ducos. Thèse de doctorat de l'université de Lille 1 soutenue le 24 octobre 2000. Caractérisation moléculaire du cytoplasme *G* induisant la stérilité mâle chez la betterave (*Beta vulgaris*). (80% ; co-encadrement avec Philippe Vernet)

Stages de longue durée (6 mois)

2005

Laetitia Buret. Stage de fin d'études de l'IUP « Génomique et Protéomique », Université de Lille 1. Analyse phylogéographique de la diversité nucléotidique de gènes nucléaires dans la section *Beta*. (50%) (co-encadrement avec Sarah Villain)

Sophie Chaillou. Master Professionnel Génétique et Gestion de la Biodiversité, Université de Paris VI. Analyse de l'histoire évolutive de la stérilité mâle cytoplasmique *Ogura* dans des populations sauvages de ravenelle (*Raphanus raphanistrum*) : chronique d'une mort annoncée ? (30%; co-encadrement avec Françoise Budar et Pierre Saumitou-Laprade)

2004

Sarah Villain. Stage du DEA BEFA, Université de Lille 1. Etude de la diversité nucléotidique cytoplasmique dans la section *Beta*. (70% ; co-encadrement avec Joël Cuguen)

2003

Virgil Fievet. Stage du DEA BEFA, Université de Lille 1. Diversité nucléaire et cytoplasmique, structure génétique des populations de betteraves maritimes de la Manche: effets des courants marins. (50% ; co-encadrement avec Jean-François Arnaud)

2001

Nathalie Hueber. Stage du DEA BEFA, Université de Lille 1. Recherche d'association entre des marqueurs génétiques liés à des locus de restauration de la fertilité mâle et le phénotype sexuel chez *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. (100%)

2000

Sophie Degouy. Stage de fin d'études de l'Institut des Sciences Agricoles de Lille, formation environnementaliste. Recherche de marqueurs moléculaires d'un gène d'auto-compatibilité chez la betterave. (100%)

Stages de courte durée

2004 (2)

Delavalle Pierre-Yves. Stage de 1^{ère} année de l'IUP « Génomique et Protéomique », Université de Lille 1. Mise au point d'un marqueur de locus de restauration Rfg1 chez *Beta vulgaris* ssp *maritima*. (100%)

Fatoumata Dao. Stage de maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes de l'université de Lille. (avril-juin). Recherche expérimentale chez *Beta vulgaris* ssp *maritima* d'un avantage femelle chez la CMS G.

2003 (3)

Emilie Lecomte. Stage de 1^{ère} année de Polytech'Lille (juin-juillet). Suivi en parcelle expérimentale de descendance maternelles pour les caractères de stérilité mâle chez *Beta vulgaris*.

Julien Barlet et Luc Moreau. Projet du DESS de Bioinformatique de Lille. Evolution et diversité du génome mitochondrial de la betterave.

Christophe Desprez. Stage de maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes de l'université de Lille. (avril-juin). Recherche expérimentale chez *Beta vulgaris* ssp *maritima* d'un avantage femelle chez la CMS G.

2002 (4)

Céline Bataillon. Stage de 1^{ère} année de Polytech'Lille (juin-juillet). Suivi en parcelle expérimentale de descendance maternelles pour les caractères de stérilité mâle et d'auto-compatibilité chez *Beta vulgaris*.

Maximilien Humez. Stage volontaire (juin-juillet). Suivi de plantes en ségrégation pour la stérilité mâle.

Maximilien Humez. Stage de maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes de l'université de Lille. (avril-juin). Avantage sélectif conféré par une mitochondrie stérilisante en cas de stress hydrique.

Sébastien Pélouard. Stage de 2^{ème} année de l'Institut AgroAlimentaire de Lille. (février-avril). Etude de la diversité mitochondriale des populations de betteraves maritimes des côtes de la Manche en relation avec la stérilité mâle.

2001 (1)

Anne Petit. Stage de maîtrise de Biologie des Populations et Ecosystèmes de l'université de Poitiers. (avril-juin). Recherche de marqueurs moléculaires d'un gène d'auto-compatibilité chez la betterave.

2000 (1)

Marianne De Paepe. Stage de 2^{ème} année de l'INAP-G. (mai-juillet). Etude génétique et cytologique de la stérilité mâle dans une descendance maternelle de betteraves sauvages (*Beta vulgaris* ssp *maritima*).

1999 (1)

Anne-Sophie Wepierre. Stage de 2^{ème} année de l'INAP-G. (mai-juillet). Quantification de la fertilité mâle dans une descendance maternelle de betterave sauvage (*Beta vulgaris* ssp *maritima*).

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles publiés dans des revues scientifiques à comité de lecture (Facteur d'impact 2004): **11**

Touzet P, Budar F (2004) Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in Cytoplasmic Male Sterility? *Trends in Plant Science* 9, 568-570 (**11,833**)

Touzet P, Hueber N, Burkholz A, Barnes S, Cuguen J (2004) Genetic analysis of male fertility restoration in wild cytoplasmic male sterility G of beet. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 240-247. (**2,981**)

Budar F, **Touzet P**, De Paepe R (2003) The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* 117, 3-16. (**2,085**)

Touzet P. (2002) *Is rf2 a restorer gene of CMS-T in maize?* *Trends in Plant Science* 7, 434. (**11,833**)

Ducos E, **Touzet P**, Boutry M (2001) The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *The Plant Journal*. 26, 171-180. (**6,367**)

Ducos E, **Touzet P**, Saumitou-Laprade P, Vernet P, Cuguen J (2001) Nuclear effect on mitochondrial protein expression of the CMS *Owen* cytoplasm in sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1299-1304. (**2,287**)

- Touzet P**, Riccardi F, Morin C, Damerval C, Huet J-C, Pernollet J-C, Zivy M, de Vienne D. (1996) The maize two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 997-1005. **(2,981)**
- Touzet P**, de Vienne D, Huet J-C, Ouali O, Bouet F, Zivy M (1996) Amino acid analysis of proteins separated by two-dimensional electrophoresis in maize : isoform detection and function identification. *Electrophoresis* 17, 1393-1401. **(3,743)**
- Touzet P**, Morin C, Damerval C, Le Guilloux M, Zivy M, de Vienne D (1995) Characterizing Allelic Proteins for Genome Mapping in Maize. *Electrophoresis* 16, 1289-1294. **(3,743)**
- Touzet P**, Winkler RG, Helentjaris T (1995) Combined Genetic and Physiological Analysis of a Locus Contributing to Quantitative Variation. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 200-205. **(2,981)**
- de Vienne D, Josse J-M, Maurice A, Causse M, Leonardi A, **Touzet P**, Krejci E, Gouesnard B, Sanou J, Panouille A, Boyat A, Dubreuil P, Dufour P, Gallais A, Lefort M, Charcosset A, Damerval C. (1994) Marquage et expression du génome chez le maïs. *Genetics, Selection and Evolution* 26, Suppl1, 21s-34s. Article original **(1.645)**

Articles soumis

- Fénart S, **Touzet P**, Arnaud J-F, Cuguen J. Emergence of gynodioecy in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* L.): a genealogical approach using chloroplastic nucleotide sequences. Soumis à *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*.
- Roux F, **Touzet P**, Cuguen J, Le Corre V. How to be early-flowering: An evolutionary perspective. Soumis à *Trends in Plant Science* pour la rubrique *Opinion* (résumé accepté).
- Fievet V, **Touzet P**, Arnaud J-F, Cuguen J. Hierarchical spatial analysis of cyto-nuclear polymorphism in the sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) within the Norman-Breton gulf: evidence for marine current influences. Soumis à *Molecular Ecology*.

Articles en preparation

- Delph L F, **Touzet P**, Bailey M. Mind the gap: connecting evolutionary theory and molecular mechanism for the cost of restoration in studies on gynodioecy. Pour *Trends in Ecology & Evolution*.
- Touzet P**, Delph, L F. Mitochondrial diversity and breeding systems in *Silene*.
- Touzet P**, Dufay M, Arnaud, J-F, Cuguen J. Gynodioecy in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* : 3 CMSs with different features. Pour *Journal of Evolutionary Biology*
- Touzet P**, Guéritaine G, Burkholz A, Barnes S, Cuguen J. Genetic mapping of a self-fertility locus in *Beta vulgaris*. Pour *Theoretical and Applied Genetics*.
- Villain S, **Touzet P**, Cuguen J. Chloroplastic Diversity of the Wild Beet (Section *Beta*): Is the Genetic Structure of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* the Consequence of Ice Age Refugia? Pour *Molecular Ecology*.

Chapitres de livre

- Budar F, **Touzet P**, Pelletier G. Cytoplasmic male sterility. In *Flowering and its manipulation*. Editeur C. Ainsworth. Sous-presse.

Brevets

- Réf : FR 63819 N (2001) (France) INRA, BIOGEMMA, CNRS, AVENTIS CROP SCIENCE S. A.
 Réf FR0202989 (2002) (Europe) GENOPLANTE-VALOR SAS.
 Utilisation d'associations entre au moins un polymorphisme de séquence nucléique du gène *Sh2* et entre au moins une caractéristique de qualité de la graine, dans les procédés de sélection de plantes.

Communications à des congrès depuis janvier 1997 : 20

- Villain S, **Touzet P**, Cuguen J (2005) Chloroplastic DNA phylogeography of the Beta section of wild beets, 10th Congress of the European Society for Evolutionary Biology, 15-20 août 2005, Kracovie, Pologne. (Poster)

- Dufay M, **Touzet P**, Fougnes L, Cuguen J (2005) Gynodioecy in wild beet: How to maintain non sterile cytotypes in populations? Evolution Conference 2005, 11-14 juin 2005, Fairbanks, E-U. (communication orale)
- Touzet P**, Fénart S, Fievet V, Cuguen J (2004) Gynodioecy in wild beet. Evolution Conference 2004, 26-30 juin 2004, Fort Collins, E-U. (communication orale)
- Touzet P**, Fénart S, Fievet V, Hueber N, Cuguen J (2004) A "state of the art" of gynodioecy in wild beet. Atelier thématique "Gender transitions from hermaphroditism to gonochorism and back". 21-25 avril 2004, Haus Humboldtstein, Allemagne. (communication orale)
- Dufay M, **Touzet P**, Maurice S, Cuguen J (2004) Can non sterile cytotypes be maintained in gynodioecious species? Atelier thématique "Gender transitions from hermaphroditism to gonochorism and back". 21-25 avril 2004, Haus Humboldtstein, Allemagne. (poster)
- Fievet V., **Touzet P**, Arnaud J-F, Cuguen J (2004) Les courants marins influencent-ils la structure génétique de la betterave maritime (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) ? *XXVI^{ème} Réunion du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.* (communication orale).
- Fievet V, **Touzet P**, Arnaud J.-F, Cuguen J (2004) Do marine currents shape the genetic structure in the wild sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*)? *The Evolution Conference 2004, 26-30 juin, Fort Collins, Colorado State University, Colorado (USA)* (communication affichée).
- Villain S., **Touzet P**, Cuguen J (2004) Phylogeography of the wild Beet (Section *Beta*) and potential ice age refugia. The Quaternary Legacy. Phylogeography and climatic changes in Southern Europe. 22-23 Octobre 2004, Lisbonne, Portugal. (poster)
- Fievet V, **Touzet P**, Arnaud J-F, Cuguen J. (2003) Polymorphisme sexuel et cytonucléaire de la betterave maritime (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) au sein du golfe anglo-normand. *XXV^{ème} Réunion du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, 27-29 août 2003, Toulouse.* (poster)
- Guéritaine G, **Touzet P** (2003) Genetic mapping of a *Self-fertility* gene in *Beta vulgaris*. 9th Congress of the European Society for Evolutionary Biology, 26-28 August 2003, Leeds, UK. (poster)
- Touzet P**, Hueber N, Burkholz A, Barnes S, Cuguen J. (2003) Genetic mapping of a male fertility restoration locus for a wild cytoplasmic male sterility in beet. *Plant and Animal Genome XI*, 11-15 janvier 2003, San Diego, Etats-Unis. (conférence invitée)
- Touzet P** (2002) Stérilités mâles nucléo-cytoplasmiques chez la betterave maritime (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*). Réunion du GDR 1928 CNRS "Génomique des populations" des 27 et 28 mai 2002, Paris. (communication orale sur invitation)
- Touzet P** (2002) Stérilités mâles nucléo-cytoplasmiques chez la betterave maritime (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*). Journée de rencontre en biologie des populations végétales du 25 avril 2002, Louvain-la-Neuve, Belgique. (communication orale sur invitation)
- Ducos E, Boutry M, **Touzet P** (2001) Male Sterile *G* Cytoplasm of Wild Beet Displays Modified Mitochondrial Respiratory Complexes. 8th Congress of the European Society for Evolutionary Biology, 20-25 August 2001, Aarhus, Danemark. (poster)
- Hueber N, **Touzet P**, Cuguen J (2001) Développement de marqueurs moléculaires de locus de restauration de la fertilité mâle chez *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *XXIII^{ème} Réunion du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, 27-29 août 2001, Orsay.* (poster)
- Touzet P**, Ducos E, Saumitou-Laprade P, Boutry M, Cuguen J (1998) Two-dimensional analysis of mitochondrial protein expression in sugar beet related to *Owen* cytoplasmic male sterility. In Moller IM, Gardeström P, Glimelius K, Glaser E (ed), *Plant mitochondria: from gene to function*, Backhuys Publishers, Leiden, pp. 99-103.
- Ducos E, **Touzet P**, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Boutry M (1998) Analysis of mitochondrial protein expression in wild beet in relation to cytoplasmic male sterility. In Moller IM, Gardeström P, Glimelius K, Glaser E (ed), *Plant mitochondria: from gene to function*, Backhuys Publishers, Leiden, pp. 73-77.
- Touzet P**, Causse M, Manicacci D, Saliba V, Séné M, Prioul J-L, de Vienne D (1997) Analyse du polymorphisme de gènes candidats QTL de caractères du grain chez le maïs. *Stratégies génomiques et amélioration des plantes, Groupe de travail INRA « Génomes végétaux »* avril 97, Mérébel. (communication orale)

De Vienne D, Damerval C, Dillmann C, Leonardi A, Burstin J. **Touzet P**, Zivy M (1997) Du génome au protéome : l'exemple du maïs. *Stratégies génomiques et amélioration des plantes, Groupe de travail INRA « Génomes végétaux »*, avril 97, Méribel. (communication orale)
Causse M, Santoni S, Damerval C, Deatrick J, Decoux G, Henry A-M, **Touzet P**, Charcosset A, Zivy M, de Vienne D (1997) INRA maize expressed genome mapping program: state of the art. *Plant Genome*, janvier 1997, San Diego, Etats-Unis. (poster)

BOURSES ET SUBVENTIONS

2005 Bourse Fulbright/région Nord-Pas de Calais. Soutien de **13050 €**(6 mois + frais de transport).
2003 PEDR obtenue auprès du Ministère de la recherche que j'ai dû refuser pour cause de délégation CNRS.
2004 Bonus Qualité Recherche de l'université de Lille 1. Participation aux frais de colloque Evolution 2004, Fort-Collins, Etats-Unis. **1000 €**(TTC)
2003 Bonus Qualité Recherche de l'université de Lille 1/Ministère des affaires étrangères. Participation aux frais de colloque Plant and Animal Genome, San Diego, Etats-Unis. **1800 €**(TTC)
2002 Bonus Qualité Recherche de l'université de Lille 1. Co-financement d'équipement du programme CPER. **6 800 €HT**
1995/1996 Bourse post-doctorale de secours des amis des sciences. 11 mois au sein de la Station de Génétique Végétale, INRA-UPS-INAP-G, Ferme du Moulon (Gif-sur-Yvette)
1991/1992 et 1994/1995 Bourse de thèse co-financée INRA/Rhône Poulenc Agrochimie. 3 ans.

CONTRATS

Coordinateur du Programme de Recherches Concertées "Stérilité Mâle Cytoplasmique" **CONTRAT DE PLAN ETAT-REGION 2000-2006.** Volet agroalimentaire. (Budget total du volet 2001-03 de 193 748 €HT ; dont **76 479 €HT** pour le volet betterave).

EXPERTISE

Evaluation de projets pour les appels d'offre du Bureau des Ressources Génétiques de 1999 et 2005, pour un projet de thèse au DGAP de l'INRA en 2003.
Evaluation d'articles scientifiques pour les revues *Theoretical and Applied Genetics* (1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2004) *Plant Breeding* (2003), *Molecular Ecology* (2003), *Heredity* (2003), *Sexual Plant Reproduction* (2004), *International of Plant Sciences* (2005) et *Molecular Genetics and Genomics* (2005).
Examineur des jurys de thèse d'Eric Ducos (Université Lille 1, oct. 2000) et Manuela López Villavicencio (université Paris Sud, déc. 2004)

SOCIETES SAVANTES ET GROUPEMENT DE RECHERCHE

Membre du GDR 1928 CNRS "Génomique des populations" depuis 2002
Membre de la Société Européenne de Biologie Evolutive (ESEB) depuis 2001
Membre de la Société pour l'Etude de l'Evolution (SSE) depuis 2002

COLLABORATIONS NATIONALES

Dr Françoise BUDAR, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA de Versailles.
Occurrence de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura dans les populations de ravenelles européennes.
Dr Rosine De PAEPE, Laboratoire de Biogenèse des Organites, Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Orsay. **Métabolisme mitochondrial et résistance aux stress biotiques et abiotiques chez la betterave.**
Dr Sandrine MAURICE, Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, UMR 5554, Université de Montpellier 2. **Dynamique et maintien de la gynodioecie. Approche théorique et modélisation.**

Dr Maude PUPIN, LIFL, équipe Bioinfo, Université de Lille 1. **Diversité et évolution du génome mitochondrial de la betterave.**

Dr Caroline RAMBAUD, Laboratoire de Physiologie de la Différenciation et Biotechnologies Végétales, Université de Lille 1. **CONTRAT DE PLAN ETAT-REGION 2000-2006. Volet agroalimentaire. Programme de Recherches Concertées "Stérilité Mâle Cytoplasmique".**

Dr Bernard SCHWEISGUTH, Laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, Dijon Epoisses. **Analyse génétique de l'auto-compatibilité chez la betterave.**

Dr Jacqui SHYKOFF, Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UPRESA 8079, Université Paris-Sud. **Dynamique et maintien de la gynodioecie. Approche expérimentale.**

COLLABORATIONS INTERNATIONALES

Prof Lynda DELPH. Université de Bloomington, Indiana, US. **Evolutionary dynamics of gynodioecy and mitochondrial nucleotide diversity in *Silene*** (Bourse Fulbright)

Dr Stephen BARNES, Advanta, SES Europe, Tienen, Belgique. **Cartographie génétique d'un locus de restauration de la fertilité mâle et d'un gène d'autocompatibilité chez la betterave**

Dr Stefaan HOREMANS, Advanta, SES Europe, Tienen, Belgique. **Evaluation de la source de stérilité G.**

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

J'enseigne au sein d'une école d'ingénieur de l'université de Lille 1, Ecole Polytechnique Universitaire de Lille (Polytech'Lille), et plus particulièrement dans le département Industries Agro-Alimentaires (autrefois IAAL). J'ai eu donc dès mon recrutement la charge et la liberté de mettre en place des cours magistraux en Agronomie, Agrophysiologie, Bioclimatologie, Amélioration des Plantes, Phytopathologie et de cours intégrés TD en Génétique des Populations. A côté de ces enseignements qui constituaient, et pour certains constituent encore, le cœur de mon service statutaire, j'ai aussi effectué des Travaux Pratiques de Physiologie Végétale devenus maintenant TP d'instrumentation, des TD et TP de statistiques. Enfin en 2001 j'ai mis en place une Unité de Valeur Transversale destinée à l'ensemble des étudiants des différents départements intitulée *Bio-Informatique*.

En parallèle de mon activité d'enseignement au sein de Polytech'Lille, j'ai eu l'opportunité de m'investir dans des cursus me permettant d'enseigner des disciplines plus proches de mes activités de recherche au sein d'Unités de Valeurs dont j'ai la responsabilité. Par ordre chronologique:

2000-2003 Co-responsable de l'Unité de valeur intitulée *Génétique des Pathologies Multifactorielles* (avec Thierry Brousseau, Institut Pasteur de Lille) du **DEA Sciences de la Vie et de la Santé** (Lille 2-Lille 1). Cours : *Application à l'analyse de l'architecture génétique de caractères complexes chez les organismes végétaux et animaux.*

Depuis 2000 Co-responsable puis responsable de l'UV de Biologie Evolutive Générale du **M2R Bio Pal Oc**, Université de Lille 1. Cours : *Introduction à la génétique des populations, Conflits génomiques et stérilité mâle nucléo-cytoplasmique, Bases moléculaires des caractères quantitatifs soumis à la sélection.* Je fais de plus **partie du jury final** du M2R.

Depuis 2001 Responsable de l'UV Mécanismes cellulaires du **M2Pro/R de Bioinformatique de Lille 1**. Cours sur la structure et l'expression des gènes, l'analyse des génomes. (Public non biologiste)

Depuis 2004 Responsable de l'UV *Evolution des génomes*, 3^{ème} année d'**IUP Génomique et Protéomique de l'université de Lille 1**. Cours : *Evolution des génomes, Evolution du génome mitochondrial.*

ACTIVITES D'ADMINISTRATION

Membre élu et 2^{ème} vice –président de la **commission de spécialiste 67-68** de l'Université de Lille 1 (depuis 2004)

Au sein de l'UMR-CNRS 8016

Responsable LABINTEL: coordination de l'acquisition des données (depuis 1998).

Co-responsable de l'organisation des séminaires de 2000 à 2003.

INTRODUCTION

La coexistence en populations naturelles de plantes mâle-stériles, incapables de produire du pollen viable, et de plantes hermaphrodites est un phénomène rencontré chez un grand nombre d'angiospermes (Richards 1997; Shykoff *et al.* 2003). Cette caractéristique du système de reproduction, appelée gynodiœcie, est généralement sous le contrôle génétique de deux compartiments qui interagissent dans l'expression du phénotype sexuel:

- le génome mitochondrial codant pour des facteurs qui bloquent la production de pollen viable, d'où le terme de stérilité male cytoplasmique (SMC) ;
- le génome nucléaire qui restaure spécifiquement la fonction mâle, en réprimant l'action de ces facteurs stérilisants par le biais d'allèles dits de restauration.

Ce polymorphisme sexuel peut être considéré comme le résultat d'un conflit génétique entre deux génomes n'ayant pas le même mode d'hérédité, chaque génome maximisant sa propre transmission au dépens de l'autre (Cosmides et Tooby 1981). En effet le génome mitochondrial est d'hérédité maternelle, tandis que le génome nucléaire est d'hérédité bi-parentale. Ainsi toute mutation mitochondriale qui, en bloquant la gamétogenèse mâle, favorise sa propre transmission par une plus grande production de graines, sera sélectionnée et envahira la population. L'augmentation en fréquence de cette stérilité mâle créera en retour une pression de sélection favorisant l'émergence de facteurs nucléaires restaurateurs de la fonction mâle. Cet avantage en fitness des femelles peut avoir plusieurs causes:

- un phénomène de compensation, c'est à dire une réallocation des ressources non utilisées dans la fonction mâle qui se traduit soit par un gain en fécondité femelle (plus de graines), ou une meilleure viabilité des individus mâle-stériles ;
- dans une espèce auto-compatible, les femelles qui ne peuvent pas s'autoféconder produiraient plus de graines viables en évitant la dépression de consanguinité (Thompson et Tarayre 2000).

Tableau 1 : Effet pléiotrope négatif de l'allèle de restauration Rf_1 en fonction du type de coût.

L'allèle Rf_1 restaure la fertilité d'un individu sur cytoplasme SMC_1 . Pour chaque type de coût, il est indiqué pour un génotype donné (génotype au locus de restauration/type de cytoplasme) s'il s'exprime (**X**) ou non.

Type de coût		Rf_1Rf_1/SMC_1	Rf_1rf_1/SMC_1	rf_1rf_1/SMC_1	Rf_1Rf_1/SMC_2	Rf_1rf_1/SMC_2	rf_1rf_1/SMC_2
Récessif	Silencieux				X		
	Exprimé	X					
	Constitutif	X			X		
Dominant	Silencieux				X	X	
	Exprimé	X	X				
	Constitutif	X	X		X	X	

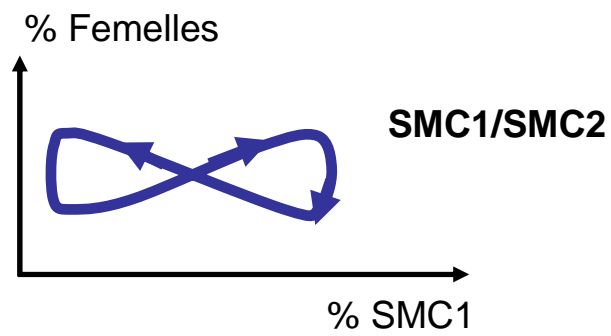
Pour ce dernier point le gain attendu est tout de même limité car la stérilité mâle réduit la taille efficace de la population (Laporte *et al.* 2000).

Des modèles théoriques ont été construits en vue de déterminer les conditions de maintien de la gynodioécie et expliquer les fréquences élevées de femelles observées dans les populations (Budar *et al.* 2003 ; Bailey *et al.* 2003). Dans le cas de modèles reposant sur une population panmictique de taille infinie, il est nécessaire d'introduire un deuxième paramètre qui est le coût associé aux allèles restaurateurs de la fertilité mâle. La notion de coût repose sur l'idée que les allèles de restauration ont un effet pléiotrope négatif. Différents types de coûts peuvent être envisagés (Bailey *et al.* 2003 ; Tableau 1) :

- **un coût dominant ou récessif** : le coût est dominant s'il s'exprime dès qu'une copie de l'allèle de restauration est présent, récessif s'il ne s'exprime que quand l'individu est homozygote pour l'allèle de restauration.
- **Un coût silencieux, exprimé ou constitutif** : le coût d'un allèle de restauration est dit silencieux quand il a un effet pléiotrope négatif en présence de la SMC qu'il ne restaure pas. C'est l'équivalent du coût d'une résistance en absence du pathogène (Gouyon *et al.* 1991). Un coût exprimé correspond à la situation inverse ; en d'autres termes, le coût est une conséquence ou un effet secondaire de l'action de l'allèle de restauration sur les facteurs de stérilité. Dans le cas d'un coût constitutif, l'effet pléiotrope négatif est indépendant du cytoplasme.
- **Un coût sur la fitness femelle** (production de graines), **la fitness mâle** (production de pollen) **ou les fitness mâle et femelle** (survie des descendants).

Il est possible de classer les différents modèles théoriques construits pour expliquer le maintien d'un polymorphisme nucléo-cytoplasmique par le type de dynamique qu'ils supposent. Les premiers modèles considèrent les apparitions de SMC comme des événements rares. Par conséquent, ils prédisent leur maintien dans un état polymorphe balancé.

Sélection balancée (Gouyon *et al.* 1991)



Un modèle épidémique (Frank 1989)

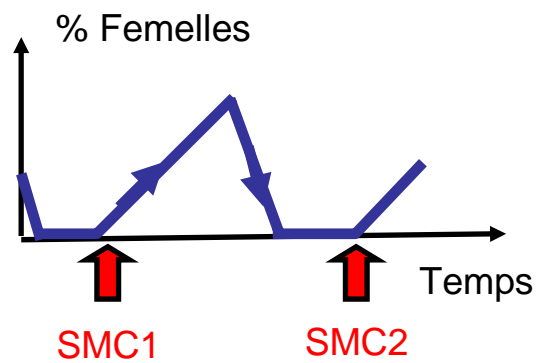


Figure 1: Représentation schématique des deux types de dynamiques, sélection balancée et dynamique épidémique.

Si le coût est dominant, il se produit une sélection fréquence-dépendante négative qui peut être schématisée de la façon suivante :

1. augmentation en fréquence du cytoplasme stérile dans une population du fait de l'avantage femelle,
2. ce qui à terme crée une sélection en faveur des allèles de restauration qui augmentent à leur tour en fréquence,
3. diminuant ainsi l'avantage du cytoplasme stérile lorsqu'il devient commun (en raison de l'augmentation du taux d'hermaphrodites restaurés sur ce cytoplasme, le cytoplasme n'est plus avantage dans sa transmission ; Charlesworth 1981; Gouyon *et al.* 1991). Selon certaines conditions d'avantage femelle et de coût, la fréquence de femelles varie dans le temps selon un cycle limite. Dans ce cas, la relation entre taux d'une SMC donnée et taux de femelle dans la population évolue dans le temps, générant une courbe en forme de papillon (d'où le terme de modèle « papillon ») (Figure 1).

Si le coût est récessif, la sélection balancée repose sur un phénomène de superdominance au locus de restauration, c'est à dire que les hermaphrodites restaurés hétérozygotes au locus de restauration ont une meilleure fitness que les hermaphrodites restaurés homozygotes pour l'allèle de restauration, et les femelles, homozygotes pour l'allèle de maintien. Ce phénomène peut se produire si l'allèle de restauration est une forme mutante d'un gène essentiel (Delph et Mutikainen 2003 ; Bailey *et al.* 2003).

D'autres modèles suggèrent des épidémies répétées de SMC, les populations étant envahies de façon récurrente par de nouvelles SMC qui se répandent et sont ensuite restaurées (Frank 1989) (Figure 1).

Ainsi, une question fondamentale pour comprendre la dynamique évolutive de la stérilité mâle est de savoir si un nombre limité de SMC est maintenu dans les populations sur de longues échelles de temps évolutives ou si, au sein de l'espèce, différentes SMC se sont substituées de façon continue.

Quel type de dynamique en populations ?

L'étude de la généalogie des gènes de régions génomiques co-transmises avec les facteurs stérilisants permet d'analyser le patron historique de la sélection sur la SMC. En effet, selon le mécanisme impliqué, la diversité génétique neutre attendue pour des locus maintenus en déséquilibre de liaison avec les locus stérilisants sera différente.

Les modèles invoquant un polymorphisme balancé prédisent une forte diversité génétique par rapport au cas neutre, les différentes lignées accumulant des mutations indépendamment, du fait de l'absence de recombinaison entre elles. *A contrario*, le rapide turnover des lignées par purge sélective ou « épidémies » récurrentes de SMC tend à réduire la variation génétique aux sites liés par rapport au modèle neutre (balayage sélectif). Il est à noter que ces deux phénomènes doivent être particulièrement prononcés dans des génomes qui ne subissent pas la recombinaison, tels que ceux du chloroplaste et de la mitochondrie (Charlesworth 2002).

Dans ce contexte, deux études récentes décrivent la généalogie de séquences nucléotidiques cytoplasmiques sur deux espèces gynodioïques de *Silene* et proposent des scénarios opposés (épidémique sur des données chloroplastiques - Ingvarsson et Taylor 2002 ; haplotypes anciens maintenus par sélection balancée sur des données mitochondriales - Städler et Delph 2002). De plus les résultats de Städler et Delph (2002) sur la diversité nucléotidique d'un gène mitochondrial suggéreraient qu'il existe des phénomènes de recombinaison entre types mitochondriaux.

La nature des gènes mitochondriaux de stérilité et des gènes nucléaires de restauration

Si la nature des facteurs mitochondriaux impliqués dans les SMC maintenues dans les populations naturelles est inconnue, elle a été déterminée dans un grand nombre de cas dans les espèces cultivées (Saumitou-Laprade *et al.* 1994 ; Schnable et Wise, 1998 ; Budar *et al.* 2003 ; Hanson et Bentolila 2004).

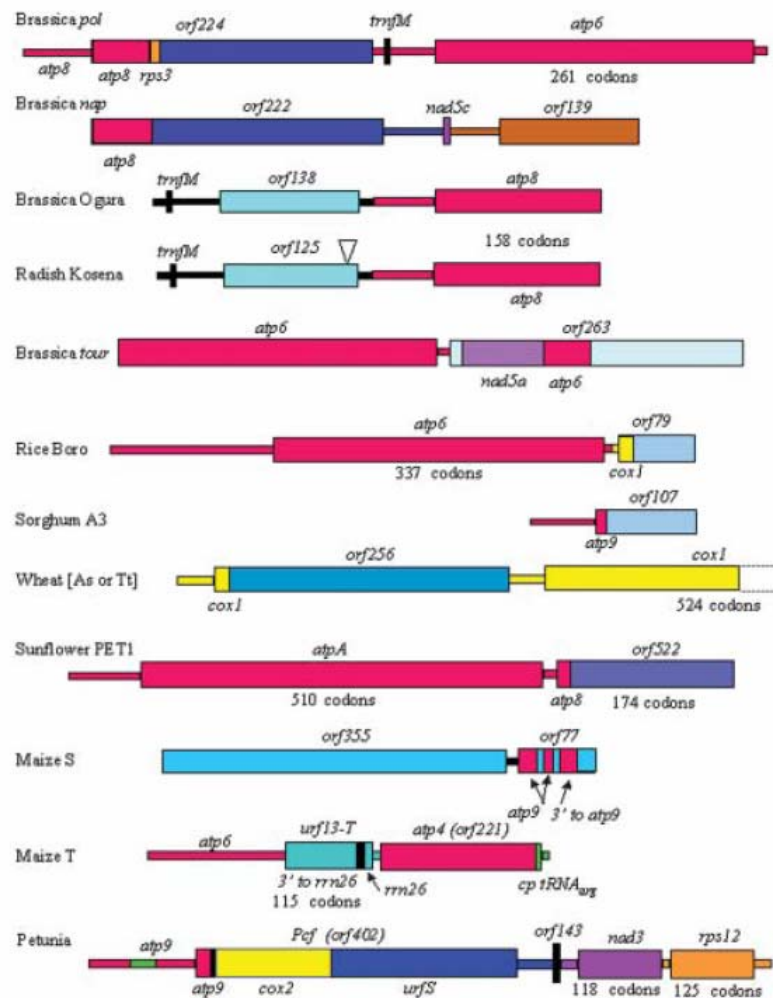


Figure 2 : Structure chimérique des gènes de stérilité de différentes SMC d'espèces cultivées (Hanson et Bentolila 2004).

En rouge, les sous-unités de l'ATP synthase ; en jaune, les sous-unités de la cytochrome c oxydase ; en orange, les gènes des protéines ribosomiques ; en vert, les séquences d'origine chloroplastique ; en bleu les *orf* d'origine inconnue des gènes de stérilité.

Quoique la comparaison entre gènes de stérilité ne révèle que peu de similarité de séquence, ces gènes partagent des propriétés communes.

Tout d'abord, ces gènes de stérilité sont généralement de nature chimérique, leur séquence mosaïque étant composée de fragments de gènes essentiels et de phases ouvertes de lecture d'origine inconnue (*orf*, *open reading frame*). Ils sont vraisemblablement le fruit de recombinaison intra-génomique (Figure 2).

Ensuite, ces gènes de stérilité sont généralement situés à proximité de gènes essentiels avec lesquels ils sont co-transcrits, assurant de manière « opportuniste » leur expression (Budar et Pelletier 2001 ; Hanson et Bentolila 2004).

Il est à noter que si la nature de ces gènes est connue, on ne sait toujours pas comment leur expression interfère spécifiquement avec la gamétogenèse mâle. Deux hypothèses sont généralement formulées : l'action du facteur stérilisant a pour conséquence un dysfonctionnement des mitochondries, ce qui rend limitant une production énergétique cruciale lors de la gamétogenèse mâle. On aurait en quelque sorte un effet seuil tissu-spécifique. La seconde hypothèse est l'interaction du facteur de stérilité avec un autre facteur exprimé spécifiquement dans les tissus de l'anthere (Budar *et al.* 2003).

Les allèles de restauration agissent généralement sur l'expression de ces gènes de stérilité, au niveau post-transcriptionnel. Une exception est le gène *Rf2*, l'un des locus de restauration de la SMC Texas du maïs, qui a été défini comme gène de restauration métabolique, car il n'affecte pas l'expression du gène de stérilité, mais jouerait un rôle de détoxificateur (Cui *et al.* 1996). Son statut de restaurateur est néanmoins discutable (Touzet 2002). En effet, l'allèle de restauration *Rf2* s'avère quasiment fixé dans les variétés de maïs et essentiel pour la production optimale de pollen en présence d'un cytoplasme non stérile (Liu *et al.* 2001). Il est donc peu probable que le cytoplasme Texas ait favorisé l'émergence de cet allèle.

Récemment, et ce chez trois espèces différentes, le pétunia (Bentolila *et al.* 2002), le radis (Brown *et al.* 2003 ; Desloire *et al.* 2003 ; Koizuka *et al.* 2003) et le riz (Kazama *et al.* 2003 ; Komori *et al.* 2004 ; Akagi *et al.* 2004), les gènes de restauration appartiennent à une même famille de gènes. Cette famille de gènes, très abondante chez les angiospermes, code pour des protéines dont la séquence est composée de motifs dégénérés de 35 acides aminés répétés en tandem, d'où leur nom de protéines à répétitions Pentatricopeptidique (PPR) (Figure 3, Small et Peteers, 2000). Ces gènes sont impliqués dans l'expression des gènes chloroplastiques et mitochondriaux, probablement en se liant à des transcrits spécifiques (Lurin *et al.* 2004). Dans un contexte de conflit génétique, cette famille de gènes semble être une réponse adaptée à un agresseur versatile (la mitochondrie). La structure complexe des locus de restauration chez les trois espèces témoigne de phénomènes de duplication de gènes puis d'évolution des paralogues, qui ressemblent au processus de « birth and death » décrit par Nei *et al.* (1997) aux locus d'histo-incompatibilité (Touzet et Budar 2004 ; Figure 4).

La connaissance de l'effet des allèles de restauration dans les SMC d'espèces cultivées permet de dresser un tableau des possibles pour les systèmes maintenus en populations naturelles, et en particulier sur les types de coûts associés aux allèles de restauration. Cette démarche est le sujet d'une revue en cours de rédaction avec Lynda Delph et Maia Bailey. J'illustrerai mes propos avec l'exemple de la restauration chez *Brassica napus*.

Effet des allèles de restauration et coût associé. Vers une synthèse.

On connaît chez cette espèce trois cytoplasmes, un cytoplasme fertile ancestral (*cam*) et deux stérilisants *nap* et *pol* (Brown 1999). Les gènes de stérilité correspondants partagent une forte similarité de séquence.

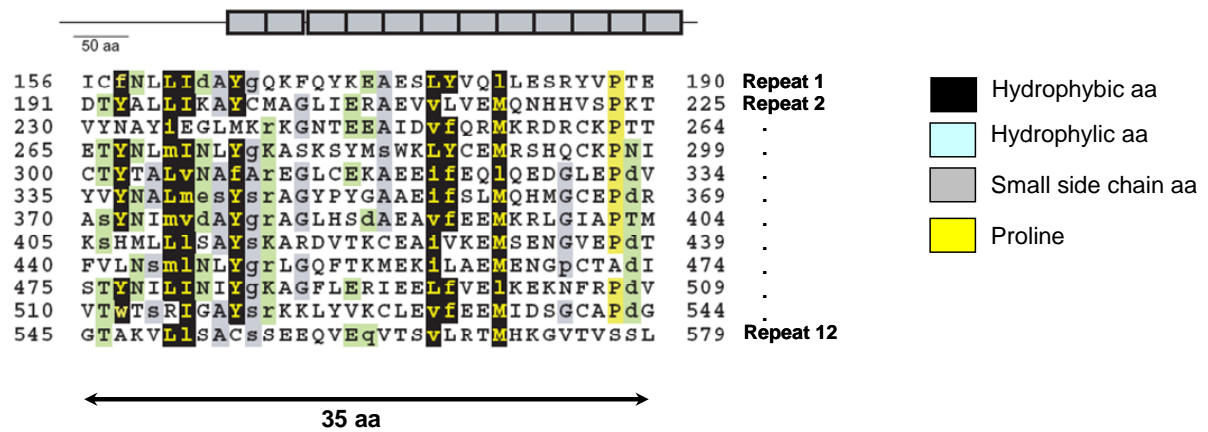


Figure 3 : Structure d'une protéine PPR

Représentation d'une protéine composée de 12 motifs de 35 acides aminés, dont 10 en tandem (Small et Peeters, 2000).

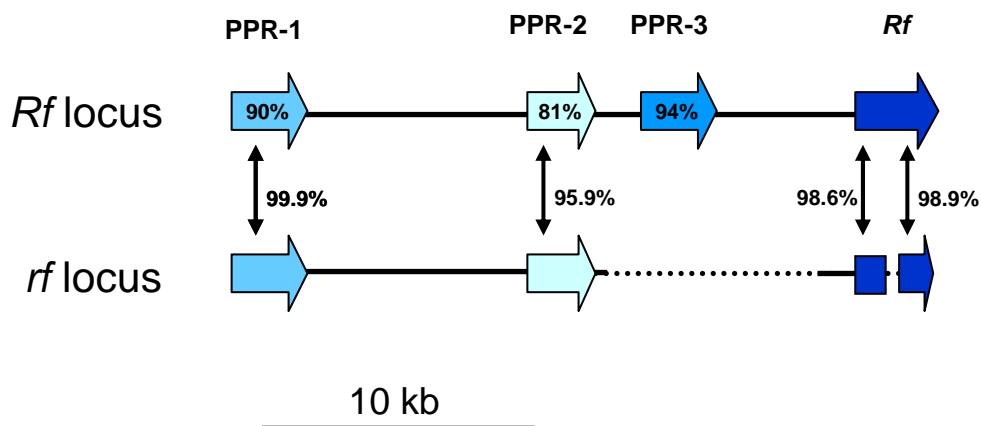


Figure 4 : Structure au locus de restauration de la SMC Bo du riz. Comparaison des allèles restaurateur (*Rf*) et mainteneur (*rf*) (Komori *et al.* 2004).

Les flèches correspondent aux homologues de gènes à PPR. Le pourcentage de similarité entre chaque paraglogue et le gène de restauration est indiqué. Le pourcentage de similarité entre allèles (même couleur) est indiqué à côté des flèches verticales. La ligne brisée indique une délétion au locus.

Il existe trois allèles à un locus de restauration, un allèle mainteneur récessif *rf* des stérilités *nap* et *pol*, et deux allèles restaurateurs dominants, *Rfp* pour la SMC *pol*, *Rfn* pour la SMC *nap* (Li *et al.* 1998). L'action de chaque allèle a pour effet le clivage des transcrits du gène de stérilité dans les anthères, empêchant ainsi sa traduction en protéines. Ainsi s'il y a coût, il devrait être dominant et affecter uniquement la fitness mâle. D'autre part l'effet pléiotrope des allèles *Rfp* et *Rfn* diffèrent. *Rfp* n'a aucun effet secondaire connu : il clive les transcrits produit par le cytoplasme *pol* (Geddy *et al.* 2005). On peut donc prédire que *Rfp* n'est coûteux qu'en présence des cytoplasmes *nap* et *cam* (coût silencieux), et que ce coût doit être limité (production d'une protéine restauratrice qui ne fait rien). Par contre *Rfn* a des effets pléiotropes supplémentaires. En effet, il clive non seulement les transcrits produits par *nap* mais aussi deux autres transcrits mitochondriaux : *nad4*, un gène essentiel et *ccll-1*, un gène qui serait impliqué dans la biogenèse du cytochrome c (Singh *et al.* 1996). Cet effet pléiotrope est observé aussi bien sur les cytoplasmes *nap* et *pol* (et potentiellement *cam*). Ainsi le coût associé à *Rfn* serait constitutif. Ce coût additionnel pourrait expliquer le fait que *Rfn* est plus rare que *Rfp* (Li *et al.* 1998). Il serait possible de tester notre hypothèse en mesurant la fitness mâle des différents génotypes sur un cytoplasme *cam*, la hiérarchie attendue étant la suivante : $rf/rf > Rfp/rf \geq Rfp/Rfp > Rfn/rf > Rfn/Rfn$ (Delph *et al.* en préparation).

C'est dans ce contexte général que s'intègrent les travaux de recherche que j'ai entrepris dès mon arrivée au laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales de Lille. Comme nous l'avons vu, l'évolution de caractères du système de reproduction tels que la gynodiœcie repose sur la variabilité des gènes et des génomes, dont les propriétés vont permettre l'émergence de traits dans l'espèce et au sein des populations. Ces caractéristiques génétiques auront en retour un rôle déterminant dans l'évolution de la diversité génétique et génomique de l'espèce en question. Je me suis donc intéressé dans un premier temps à comprendre la dynamique de la gynodiœcie dans l'espèce *Beta vulgaris* ssp *maritima*, espèce modèle du laboratoire, en y analysant à la fois les facteurs populationnels et génétiques de ce polymorphisme sexuel (Axe 1-1). Puis j'ai étendu l'étude de ce polymorphisme sexuel à d'autres espèces, pour dessiner une image plus large et plus générale de l'évolution de ce trait (Axes 1-2 et 1-3).

Par ailleurs, le polymorphisme auto/allogamie constitue une caractéristique de la section taxonomique à laquelle appartient *Beta vulgaris* ssp *maritima*. Cette dernière est auto-incompatible, alors que les deux autres espèces *Beta vulgaris* ssp *adanensis* et *Beta macrocarpa* sont auto-compatibles et autogames. J'ai ainsi commencé d'étudier l'architecture génétique de ce trait, par cartographie comparée de facteurs d'auto-compatibilité au sein du genre *Beta vulgaris* (Axe 2-1), ainsi que d'analyser l'impact du système de reproduction sur la diversité de séquences chloroplastiques et nucléaires (Axe 2-2). Cette dernière étude, reposant sur une approche phylogéographique et interspécifique de la diversité, a permis d'initier un projet de recherche (thèse en cours) ayant pour objectif de comprendre la genèse d'un taxon allo-tétraploïde (*maritima* x *macrocarpa*) présent dans l'archipel canarien.

AXE 1 DYNAMIQUE DE LA GYNODIOECIE – APPROCHE GENOMIQUE ET POPULATIONNELLE

1.1 GYNODIOECIE CHEZ *BETA VULGARIS SSP MARITIMA*

La betterave maritime, *Beta vulgaris ssp maritima*, est une espèce allogame, auto-incompatible et anémophile. La fréquence de plantes mâle-stériles au sein de 93 populations réparties le long des côtes françaises a révélé que 42% des populations étaient gynodioïques, avec une variation de la fréquence de femelles entre régions (Cuguen et al. 1994).

L'analyse de la diversité mitochondriale par une méthode de type Southern-RFLP (Saumitou-Laprade et al. 1993a) a permis de révéler une vingtaine de types mitochondriaux chez *Beta vulgaris ssp maritima* (Cuguen et al. 1994 ; Desplanque et al. 2000). Parmi ces haplotypes, 4 ont été décrits comme fortement corrélés à la stérilité mâle : par ordre décroissant de fréquence, les types *E*, *G*, *H* et *Sv*. Ce dernier correspond à la SMC dite *Owen*, du nom du chercheur qui l'a découverte et introduite dans les schémas de sélection de la betterave sucrière (Owen 1945). Du fait de sa spécificité et de sa rareté dans les populations sauvages, ce cytoplasme a été utilisé comme marqueur de flux du compartiment cultivé vers le compartiment sauvage (Boudry et al. 1993 ; Arnaud et al. 2003 ; Viard et al. 2004). L'étude de la gynodioecie dans des populations du Nord de la France a révélé une composante fortement cytoplasmique de la gynodioecie, en d'autres termes des niveaux de restauration assez bas (Laporte et al. 2001). La recherche d'un avantage femelle associé à SMC *E* n'a pas abouti, suggérant un avantage certainement assez faible pour ce cytoplasme (Boutin et al. 1988).

La restauration de la SMC *Sv/Owen* a longtemps été décrite comme étant sous le contrôle de deux locus *X* et *Z* (Owen 1945) localisés sur les chromosomes III et IV (Schondelmaier et Jung 1997, nomenclature de Butterfass 1964). Une étude récente suggère la présence de deux locus de restauration sur le chromosome IV, portant le nombre de locus à trois (Hjerdin-Panagopoulos et al. 2002). Quoiqu'il en soit, l'équipe de Mikami a récemment décrit le clonage positionnel du locus *X* (appelé *Rf1* par les auteurs) (Hagihara et al. 2005). De nombreuses études ont tenté de

déterminer sans succès la nature du facteur de stérilité de *Sv* (Halldén *et al.* 1992; Saumitou-Laprade *et al.* 1993b; Lorenz *et al.* 1997; Xue *et al.* 1994; Kubo *et al.* 1999 ; Ducos *et al.* 2001 (cf ci-dessous) ; Yui *et al.* 2003). Récemment, Yamamoto *et al.* (2005) ont mis en évidence un polypeptide de 35 kDa spécifique du type *Sv/Owen* correspondant à une séquence précurseur du gène *atp6*. Son rôle dans la SMC reste néanmoins à être confirmé, aucun effet de la restauration n'ayant été détecté sur son expression.

Pour les autres SMC, aucune étude fonctionnelle n'a été entreprise et l'architecture génétique de la restauration de la fertilité est inconnue, sauf pour la SMC *H* dont un locus de restauration a été cartographié sur le chromosome IV où se trouve aussi le locus de restauration *Z* (Laporte *et al.* 1998).

Pour aborder l'étude de ce système de reproduction complexe chez la betterave, nous avons utilisé différentes approches :

- de physiologie moléculaire, en cherchant à caractériser les facteurs de stérilité mitochondriaux;
- de cartographie génétique, pour déterminer l'architecture génétique de la restauration de la fertilité;
- de phylogénie, pour retracer l'histoire de l'émergence des différentes SMC ;
- de génétique des populations, à l'aide de marqueurs neutres et spécifiques des SMC, afin de comprendre la dynamique du trait dans les populations.

1.1.1 Recherche des facteurs mitochondriaux responsables de la stérilité mâle des betteraves sauvages

(Thèse d'Eric Ducos 2000 - Ducos *et al.* 2001a ; Ducos *et al.* 2001b)

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires de la stérilité mâle chez la betterave maritime, nous avons entrepris en collaboration avec le laboratoire du Professeur Marc Boutry (Université de Louvain la Neuve, Belgique) l'analyse de l'expression protéique mitochondriale des principaux cytoplasmes stérilisants (*Sv*, *E*, *G*) en vue d'identifier les facteurs stérilisants de ces différents systèmes.

Afin de ne révéler que les polypeptides codés par le génome mitochondrial (10% de l'ensemble des protéines que l'on trouve dans une mitochondrie), la synthèse *de novo* de polypeptides marqués dans des mitochondries isolées de feuilles (synthèse *in organello*) a été analysée par électrophorèse mono ou bi-dimensionnelle. L'utilisation de paires de lignées quasi-isogéniques, composées de lignées partageant un même fonds nucléaire mais différant pour leur cytoplasme (*Sv*, *E* ou *G* /type non stérilisant *Nv*), nous a permis de comparer l'expression mitochondriale des différents cytoplasmes tout en contrôlant l'effet du fonds nucléaire sur cette expression (obtenions de l'INRA de Dijon et de l'entreprise Florimond Desprez).

Les principaux résultats de ce travail peuvent être résumés de la manière suivante:

- *Sur le cytoplasme Sv*: mise en évidence d'interaction nucléocytoplasmique dans l'expression de polypeptides mitochondriaux du cytoplasme *Sv*. Ainsi, aucun polypeptide variant lié à ce cytoplasme sur l'ensemble des fonds nucléaires analysés n'a pu être révélé (Figure 5; Ducos et al. 2001a);

- *Sur le cytoplasme G* : caractérisation moléculaire et biochimique du cytoplasme *G* qui se distingue des autres cytoplasmes décrits chez la betterave, et en particulier *Sv* et *E*, par la présence de deux sous-unités variantes de complexes de la chaîne respiratoire, NAD9 (complexe I) et COX2 (complexe IV). Néanmoins, seule l'activité *in vitro* du complexe IV est affectée (Ducos et al. 2001b) (Figure 6).

A notre connaissance, ce cytoplasme est le premier mutant de la chaîne respiratoire maintenu en conditions naturelles jamais décrit dans la littérature. Si le lien causal entre ces variants mitochondriaux et la stérilité mâle n'est pas encore établi, ces résultats originaux ouvrent une voie pour la recherche d'un avantage sélectif conféré par un métabolisme mitochondrial modifié expliquant le maintien de ce variant respiratoire face à la sélection naturelle dans les populations.

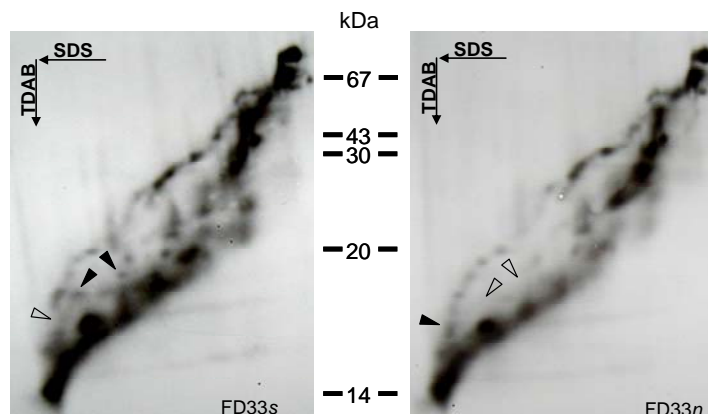


Figure 5: Gel d'électrophorèse bidimensionnel TDAB-SDS.

Les produits de la synthèse *in organello* d'une paire quasi-isogénique différant pour leur cytoplasme (s pour *Sv*, n pour type normal) sont comparés et les spots variables sont indiqués par des flèches (Ducos *et al.* 2001a).

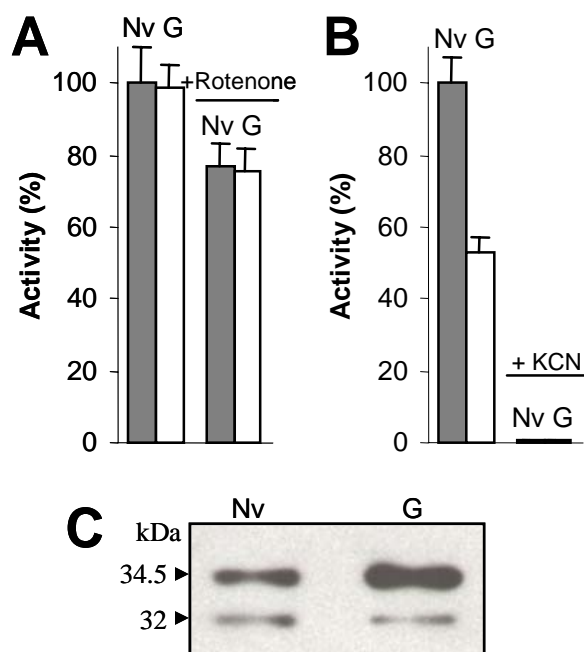


Figure 6: Analyse *in vitro* de l'activité des complexes I (A) et IV (B).

Seule l'activité du complexe IV est modifiée dans le cytoplasme G par rapport au type « normal » *Nv*. **C.** Corrélativement l'analyse par Western de la quantité d'Oxydase alterne semble plus importante dans le type G (sous-unité de 34.5 kDa)(Ducos *et al.* 2001b).

1.1.2 Restauration de la fertilité mâle de la SMC G

(DEA de Nathalie Hueber 2001 – Touzet *et al.* 2004)

Nous avons analysé un croisement ségrégeant pour la restauration de la fertilité mâle sur le cytoplasme G (179 individus) ayant pour origine une population gynodioïque située à Bages (Aude). La ségrégation observée suggère un contrôle génétique de la restauration par deux locus indépendants RfG_1 et RfG_2 avec une interaction épistatique. La présence de l'allèle de restauration RfG_1 contrôle le passage d'un phénotype stérile à un phénotype non stérile (intermédiaire et hermaphrodite), tandis qu'en présence de RfG_1 , l'allèle de restauration RfG_2 rend les plantes pleinement hermaphrodites. La descendance étudiée ayant 50% de plantes stériles et 50% de plantes non stériles (intermédiaires et hermaphrodites), il a ainsi été possible de rechercher des marqueurs AFLP et microsatellites (en collaboration avec S. Barnes, société SESVANDERHAVE) génétiquement liés à RfG_1 par la méthode de Bulk Segregant Analysis (BSA, Michelmore *et al.* 1991). Un groupe de liaison a été établi composé de 13 marqueurs dont un marqueur à 0 cM (0/111, intervalle de confiance à 95% [0 ; 2.66]) et deux marqueurs AFLP flanquant RfG_1 d'une fenêtre de 5 cM (Figure 7). Ce groupe de liaison a été identifié comme appartenant au chromosome VIII où se trouvent aucun des locus de restauration de la SMC Sv (Touzet *et al.* 2004). Ces résultats posent la question de la dynamique d'invasion d'allèles de restauration dans le cas d'un déterminisme génétique complexe, ce qui semble être la règle générale pour les espèces gynodioïques (Charlesworth et Laporte 1998).

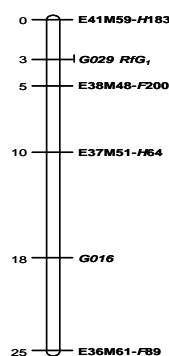


Figure 7: Cartographie génétique du locus RfG_1 (Touzet *et al.* 2004)

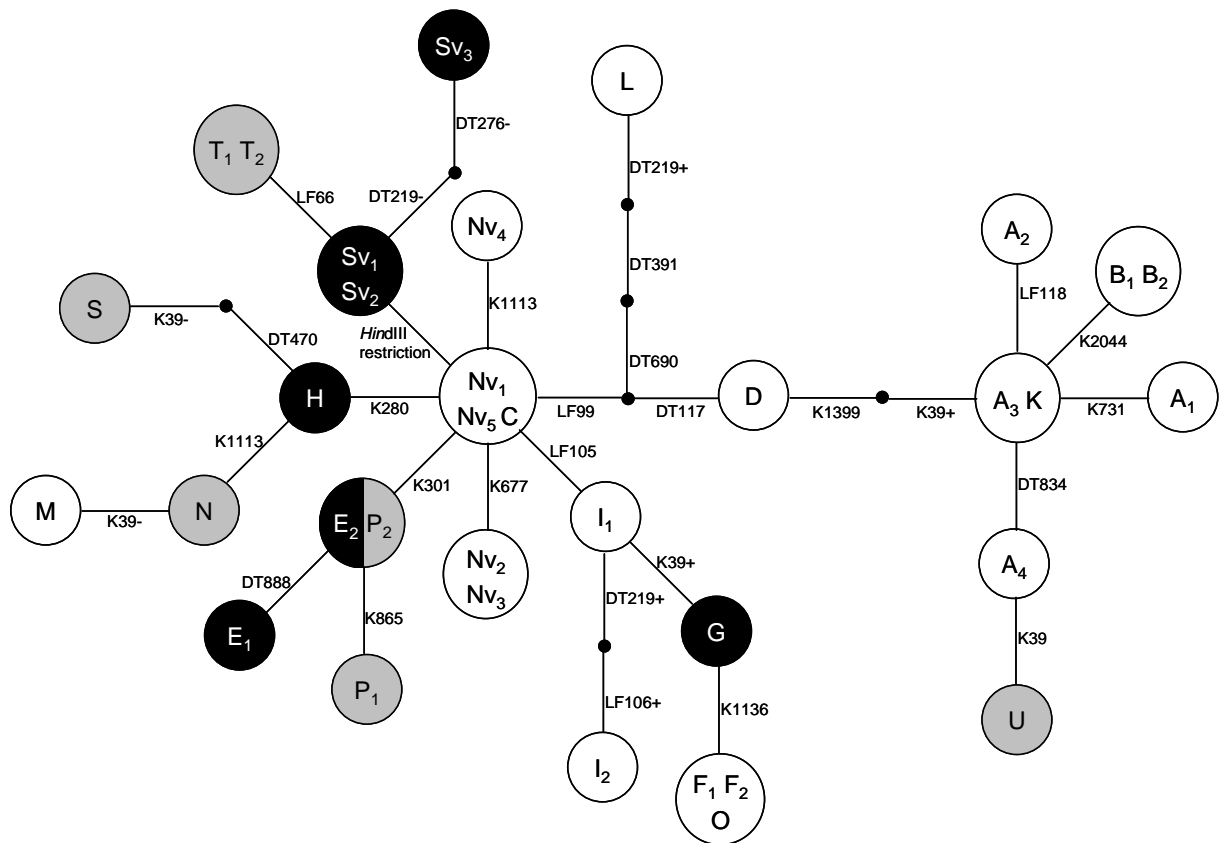


Figure 8: Réseau d'haplotypes chloroplastiques des différents types mitochondriaux de la betterave. Les cytoplasmes stérilisants sont en noir, les cytoplasmes non stérilisants en blanc, les cytoplasmes dont le phénotype associé n'est pas connu en gris (Fénart *et al.* soumis).

Le marqueur développé pour le locus *RfG₁* est en cours de mise au point afin de mesurer un coût éventuel de l'allèle *RfG₁* pour des plantes ayant un cytoplasme non stérile. Dans ce cadre, les descendances issues du croisement de plantes hermaphrodites sur *G* (donc restaurées) et de plantes hermaphrodites sur un cytoplasme non stérilisant ont été mesurées pour différents caractères de fitness mâle et femelle (projet collaboratif avec Mathilde Dufay).

1.1.3 Généalogie des cytoplasmes stérilisants

(Fénart *et al.* Soumis aux *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* – Annexe 1).

La méthode RFLP utilisée jusqu'alors a révélé une vingtaine de types mitochondriaux chez la betterave. L'étude conjointe de la diversité mitochondriale et chloroplastique avait mis en évidence un fort déséquilibre de liaison entre ces deux génomes, suggérant un rôle prédominant de la migration dans la diversité des types mitochondriaux (mitotypes) rencontrés dans les populations, en opposition à un phénomène de mutation récurrente suspectée du fait de la plasticité du génome mitochondrial (Desplanque *et al.* 2000). Sur la base de ce déséquilibre de liaison entre les génomes chloroplastique et mitochondrial, la généalogie des mitotypes connus a donc été construite sur la base d'une généalogie de régions chloroplastiques (intron de *trnK* (2500 bp), région intergénique *trnD-trnT* (1000 bp), et de *trnL-trnF* (400 bp)). Le réseau d'haplotypes obtenu par parcimonie statistique révèle que les différentes stérilités mâles identifiées chez *Beta vulgaris* ssp *maritima* sont apparues indépendamment à partir d'un cytoplasme n'exprimant pas la stérilité et ne correspondent donc pas à une seule lignée accumulant au cours du temps de nouvelles mutations stérilisantes (Figure 8).

1.1.4 Développement de marqueurs des principaux cytoplasmes stérilisants (Annexe 2)

Nous avons développé des marqueurs cytoplasmiques pour les trois principales SMC, *E*, *G* et *Sv*, en vue de déterminer leur fréquence en populations. Reposant sur l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN mitochondrial ou chloroplastique, suivie d'une restriction éventuelle, elles sont adaptées à l'analyse d'un grand nombre d'individus. Elles peuvent être résumées de la manière suivante:

- Marqueur de *Sv*: présence d'un site *TaqI* dans l'intron du gène mitochondrial *cox2*, absent chez les autres cytoplasmes ;
- Marqueur de *G*: repose sur l'existence d'une deuxième copie spécifique du gène *nad9* dans le génome mitochondrial de type *G*, révélé par un polymorphisme de taille après amplification du gène *nad9*.
- Marqueur de *E*: repose sur l'existence d'un site *AluI* dans la région chloroplastique *psba-trnK* spécifique de *E*.

1.1.5 Etude de la gynodioécie dans les populations de betteraves maritimes et de leur diversité génétique nucléo-cytoplasmique

1.1.5.1 Campagnes d'échantillonnage et caractérisation moléculaire de la diversité génétique

Les événements de fondation (structurant la diversité cytoplasmique) et de migration entre populations (pour la diffusion des allèles nucléaires de restauration) apparaissent comme des éléments majeurs de maintien du polymorphisme nucléo-cytoplasmique. Une prospection à l'échelle de la Manche a donc été menée afin d'estimer l'importance de ces facteurs. Un effort d'échantillonnage important a été entrepris de 1998 à 2004, que j'ai coordonné dès 2000 (soit 75% des populations échantillonnées), le long des côtes de la mer du Nord et de la Manche, avec un total de 85 populations récoltées sur 4 campagnes d'échantillonnage successives. Le phénotypage d'un total de 17 430 plantes (moyenne d'environ 200 plantes par population) a permis d'estimer la fréquence de plantes femelles dans chacune de ces populations.

Ces populations se répartissent sur les côtes continentales du Nord-Est au Sud-Ouest, de Burghsluis aux Pays-Bas jusqu'à l'île d'Ouessant en Bretagne, sur les îles anglo-normandes Jersey, Guernesey, Chausey et sur les côtes anglaises, du Nord-Est au Sud-Ouest, de Ramsgate à Land's End (pointe de Cornouaille) (Figure 9). Des échantillons de feuilles pour environ 50 plantes par population prospectée ont été prélevés pour l'extraction de l'ADN et la caractérisation moléculaire des individus, représentant un total de plus de 4000 betteraves maritimes destinées au génotypage pour divers locus mitochondriaux, chloroplastiques ou nucléaires.

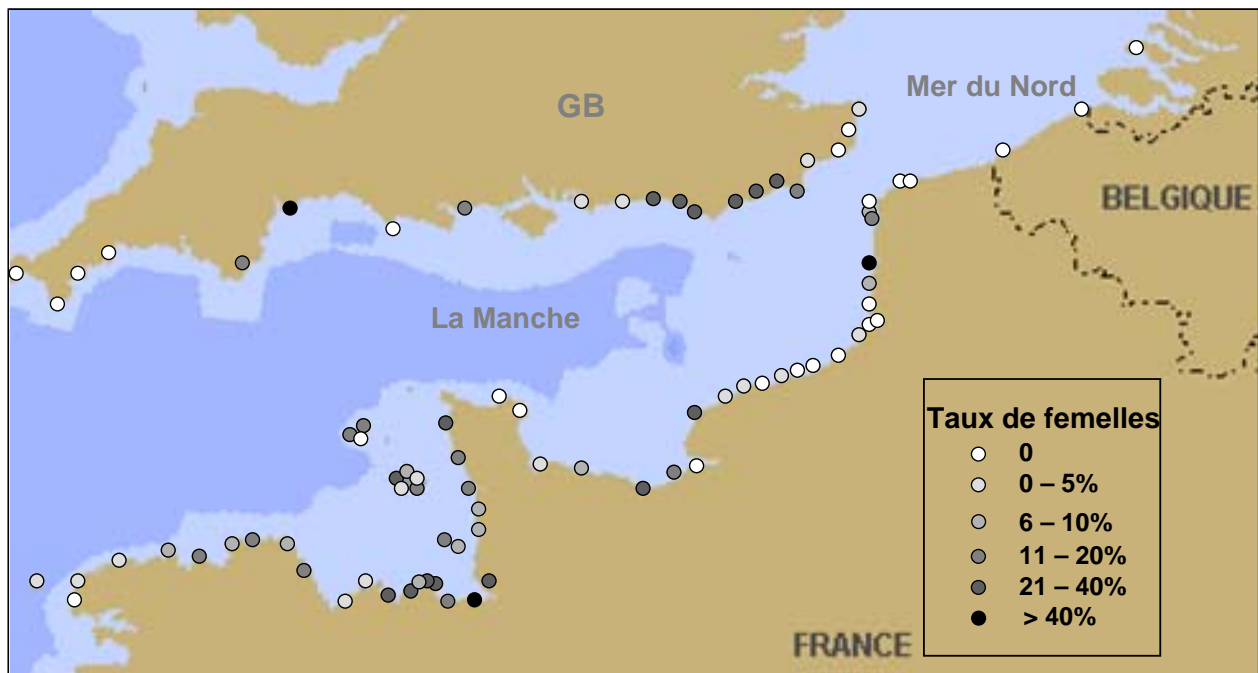


Figure 9: Répartition de la gynodiœcie dans 85 populations des côtes continentales et anglaises de la Manche et de la mer du Nord.

Je présenterai les résultats obtenus sur un sous-échantillon de 33 populations continentales et insulaires du golfe Anglo-Normand. Leur analyse en est à un stade encore très préliminaire.

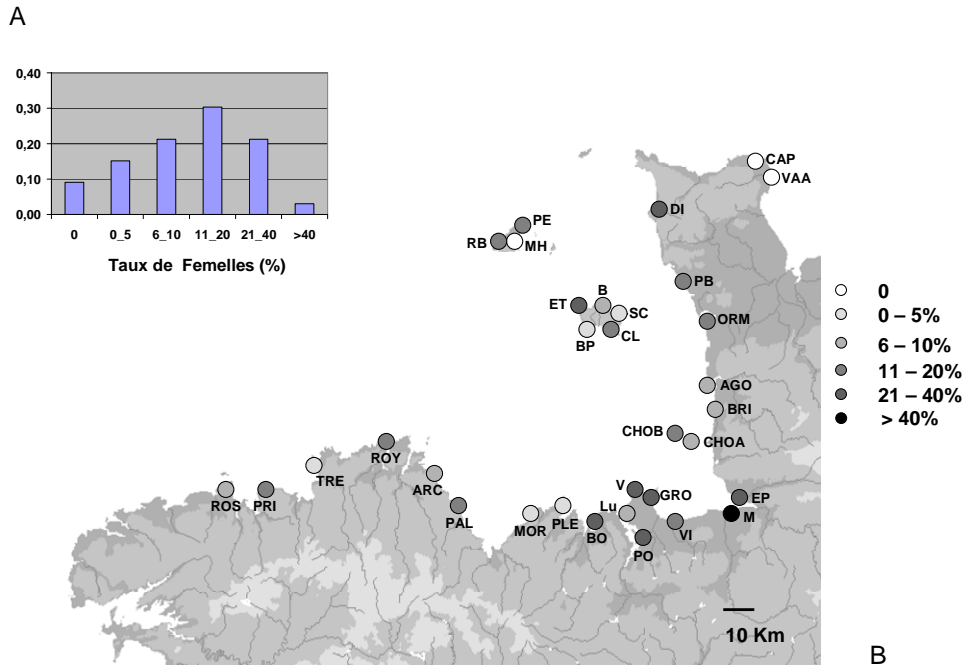


Figure 10: Distribution de la fréquence des femelles dans les populations du golfe anglo-normand.

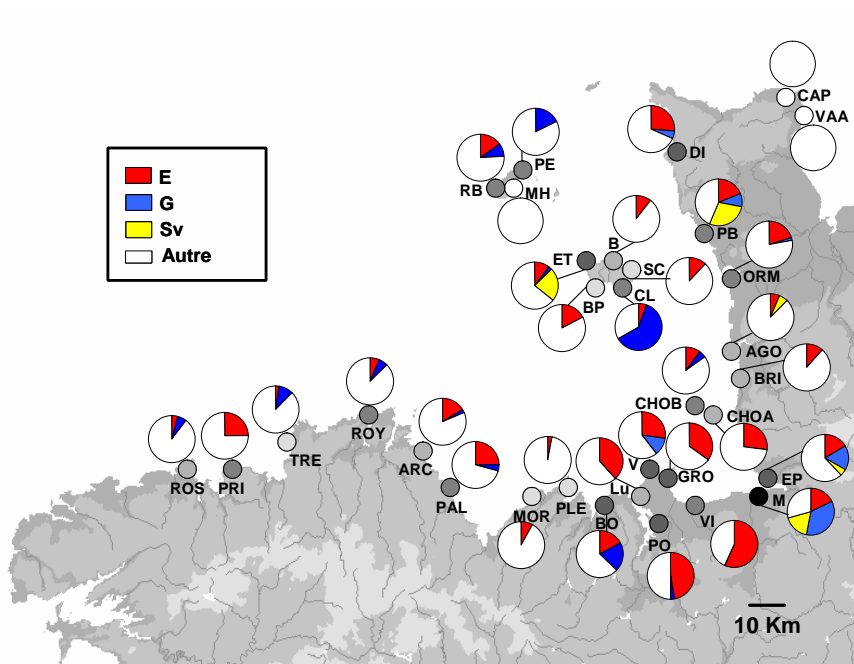


Figure 11: Distribution de la fréquence des SMC *E*, *G* et *Sv* dans les populations du golfe anglo-normand.

1.1.5.2 Dynamique de la gynodioécie dans les populations naturelles de betteraves maritimes - le cas du golfe anglo-normand

(Touzet *et al.* en préparation pour *Journal of Evolutionary Biology*)

Trente-trois populations du golfe anglo-normand dont 10 localisées sur trois îles (Jersey, Guernesey et Chausey) ont été échantillonnées afin d'estimer la fréquence de femelles. La gynodioécie y apparaît fréquente (30 populations gynodioïques, seulement 3 populations sans femelle) avec un taux global de 15% de femelles dans cette région (sur 6000 plantes phénotypées) (Figure 10). Pour les populations gynodioïques, le taux de femelle varie entre 0.02 et 0.42 (pour la population du Mont Saint Michel, M) la valeur médiane étant de 0.135.

Les marqueurs spécifiques des SMC *E*, *G* et *Sv* ont permis de déterminer leur fréquence ainsi que leur taux de restauration estimé dans les échantillons prélevés (environ 40 individus par population) (Figure 11).

Fréquence des différentes SMC dans les populations

Tout d'abord il apparaît que les populations non gynodioïques n'ont aucun des 3 cytoplasmes, en d'autres termes, il n'y a pas de populations fixées pour les allèles de restauration sur ces 3 SMC dans cette région. La SMC *E* apparaît comme étant la principale source de stérilité mâle et le cytoplasme stérile le plus fréquent (trouvé sur 29/30 populations, fréquence globale de 16%) dans les populations, *G* étant fréquent à 7% (18 populations) et *Sv* à 2% (5 populations). Au total, même si on ne considère que les populations gynodioïques, les trois cytoplasmes stérilisants ne représentent globalement que 27% des individus génotypés. La forte fréquence de cytoplasmes non stérilisants dans les populations gynodioïques pose la question de leur maintien en présence de SMC. Ce constat est à l'origine d'un travail théorique menée par Mathilde Dufaÿ à partir du modèle décrit par Gouyon et collaborateurs (1991) afin de déterminer l'espace de paramètres permettant le maintien d'un cytoplasme non stérile (neutre) en présence d'un cytoplasme stérilisant.

Taux de Femelles

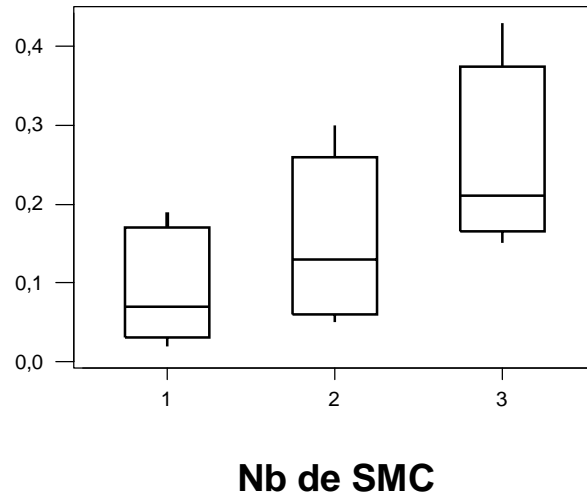


Figure 12: Relation entre nombre de SMC différents co-existant dans une population et taux de femelles.

Proportion d'individus restaurés/SMC

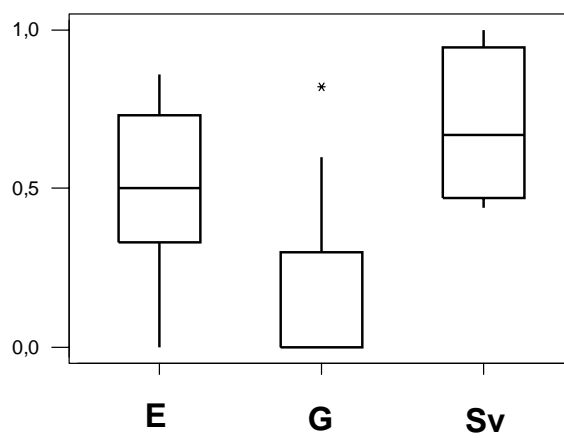


Figure 13: Proportion d'individus restaurés pour les SMC *E*, *G* et *Sv*.

Cette étude montre que dans des conditions d'avantage femelle et de coût de la restauration faibles (vraisemblablement le cas de la betterave maritime), le cytoplasme non stérile peut être maintenu, tout en permettant des cycles limites du taux de femelle au cours du temps, avec des maximums de l'ordre de grandeur de ce qui est trouvé dans les populations de betteraves maritimes (Dufaÿ *et al.* en préparation).

Nombre de SMC coexistant dans une population et relation avec le taux de femelles

Il est intéressant de noter que la plupart des populations gynodioïques ont plus d'un type stérilisant: 37% (11/30) ont une seule SMC, alors que les deux tiers restant en ont deux (50% 15/30) ou trois (13%, 4/30), et qu'il y a une corrélation entre le nombre de SMC différentes au sein d'une population gynodioïque (variant de 1 à 3) et sa fréquence en femelles (par régression logistique, 3 ddl, $\chi^2=250.39$, $p<.0001$) (Figure 12). Des analyses complémentaires sont en cours afin de déterminer si ce résultat est la conséquence d'une dynamique de type papillon. En effet l'augmentation du nombre de SMC co-existant dans une population favorise des pics de taux de femelles plus élevés (Manicacci 1993).

Quel est le niveau de restauration des différentes SMC ?

A partir des échantillons phénotypés et génotypés, il apparaît que les trois SMC diffèrent de manière significative pour leur niveau de restauration (proportion d'individus restaurés pour une SMC donnée ; test d'homogénéité sur la proportion globale ; 2 ddl, $\chi^2 = 17,5086181$, $p= 0,00016$): avec un taux de restauration moyen par population de 0.50 pour *E* (médiane de 0.50), 0.15 pour *G* (médiane de 0) et 0.66 pour *Sv* (médiane de 0.67) (Figure 13). Ces résultats reflètent des différences de fréquences d'allèles de restauration entre SMC dans les populations dont les causes peuvent être démographiques (dates de migration des SMC et des allèles de restauration correspondants) et sélectives (différence dans la « facilité » de recrutement des allèles de restauration (contrainte génomique) ou de leurs coûts associés).

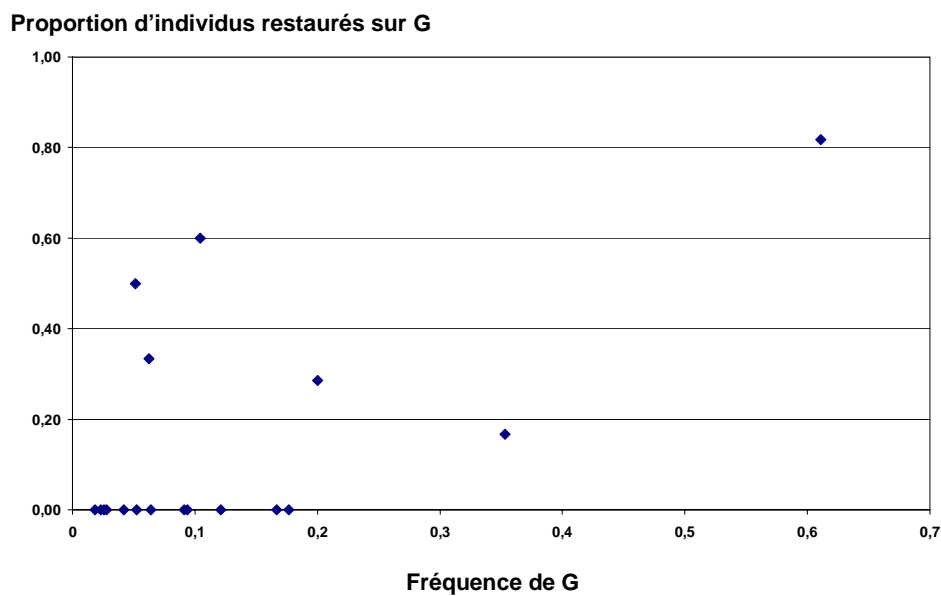
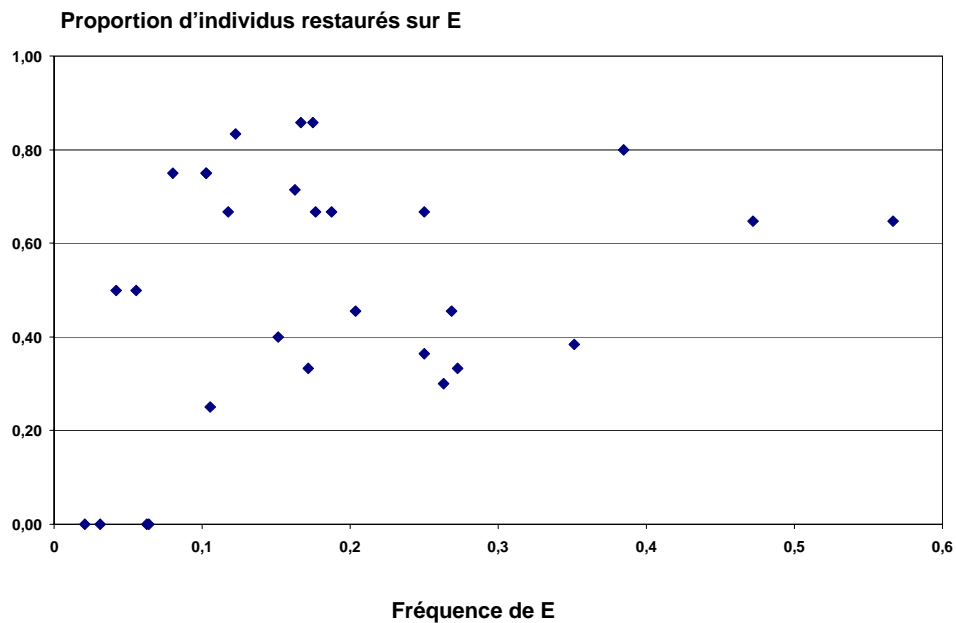


Figure 14: Relation entre la fréquence de la SMC *E* et la proportion d'individus restaurés sur *E*, la fréquence de la SMC *G* et la proportion d'individus restaurés sur *G* .

Y a-t-il corrélation entre le taux d'une SMC et son niveau de restauration dans les populations?

Alors qu'aucune corrélation n'est détectée entre la fréquence de *E* et la proportion d'individus restaurés sur *E* en population (régression logistique, 27 ddl, $\chi^2 = 37.26$, $p = 0.0904$), une corrélation positive est observée entre le taux de *G* et son niveau de restauration (régression logistique, 18 ddl, $\chi^2 = 64.46$, $p < 10^{-4}$) (Figure 14). Il est à noter que cette corrélation peut être expliquée par un grand nombre de points correspondant à de faibles fréquences de *G* et de faibles proportions d'individus restaurés, et un point à forte fréquence de *G* et d'individus restaurés.

Néanmoins, ces résultats peuvent se comprendre dans le cadre d'une dynamique de type papillon (Figure 15): l'évolution en cycle du taux d'une SMC donnée, suffisamment ancienne dans les populations, et de son niveau de restauration ne permet pas d'établir un lien direct entre taux d'une SMC et la fréquence des allèles de restauration correspondants. En effet, on peut rencontrer dans les populations des situations très contrastées au regard de ce cycle. Ceci serait le cas du cytoplasme *E*. Des simulations à partir du modèle dynamique développé par Mathilde Dufaÿ confirment cette absence de corrélation entre taux d'un cytoplasme stérilisant et fréquence des allèles de restauration. En revanche, sachant que *G* est globalement peu restauré, donc potentiellement d'immigration récente dans les populations, cette corrélation pourrait indiquer que la SMC *G* se trouve au commencement de la dynamique évolutive, lors de la phase de sélection des allèles de restauration quand la SMC augmente en fréquence.

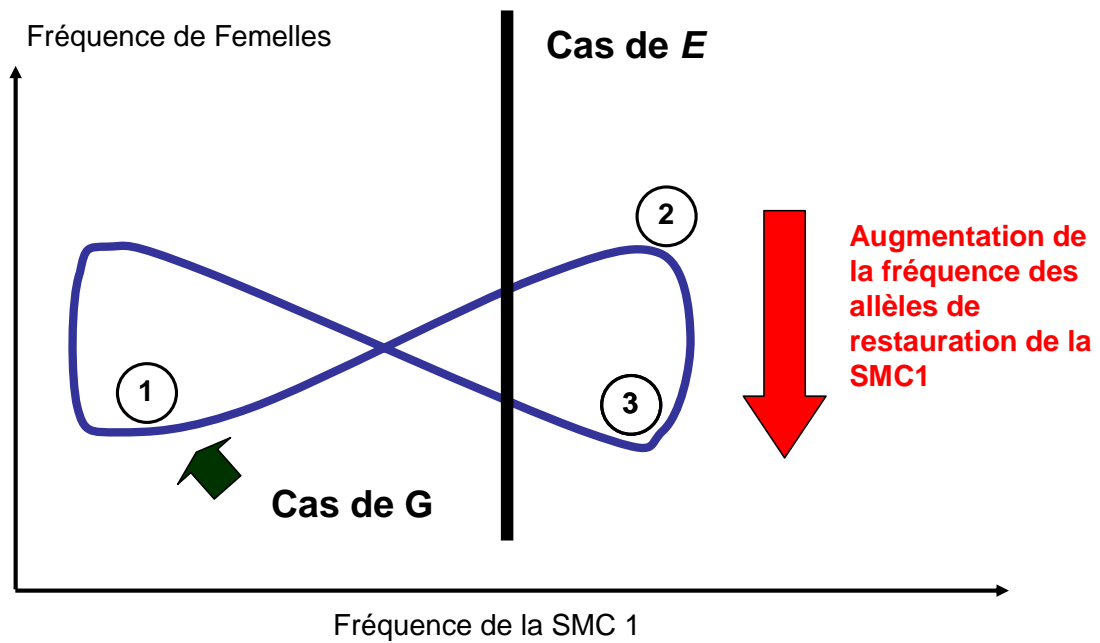


Figure 15 : Représentation schématique des dynamiques évolutives des SMC *E* et *G*.

1. Augmentation en fréquence de la SMC1 du fait de l'avantage femelle
2. Recrutement des allèles de restauration de la SMC1, la fréquence d'hermaphrodites sur SMC1 augmente, ce qui a pour conséquence la diminution de la fréquence de femelles en populations
3. Diminution de la fréquence des individus porteurs de la SMC1 au profit de la SMC2 qui augmente du fait de l'avantage femelle.

1.1.5.3 Structuration spatiale du polymorphisme cytonucléaire à l'intérieur du golfe Anglo-Normand

(DEA de Virgil Fievet 2003 - Fievet *et al.* soumis à *Molecular Ecology* – Annexe 3).

Le golfe Anglo-Normand constitue un site d'étude particulièrement intéressant pour retracer de manière indirecte l'influence potentielle des courants *via* l'utilisation de marqueurs génétiques. En effet, les modèles d'hydrodynamisme prédisent :

- un isolement important de ce golfe par rapport à la dynamique générale du système Manche ;
- des courants tourbillonnants sur les îles de Jersey, Guernesey et Chausey isolant apparemment chaque île du système.

L'influence potentielle des courants marins sur la structuration spatiale du polymorphisme nucléo-cytoplasmique a donc été étudiée à l'intérieur de ce golfe. 23 populations continentales (dont 4 situées *a priori* en dehors du système Anglo-Normand, d'après les tendances courantologiques) et 10 populations insulaires ont été échantillonnées. L'ensemble des individus a été génotypé pour 7 locus microsattellites nucléaires et 4 locus minisatellites mitochondriaux. Ces deux types de marqueurs ont été utilisés afin de mettre en évidence les flux de pollen/graines (marqueurs à hérédité biparentale) et les flux de graines (marqueurs à hérédité maternelle). Le lien entre la divergence génétique des populations, les courants marins et la topographie de la côte a été étudié au moyen d'analyses hiérarchiques de différenciation couplée avec les techniques d'autocorrélation spatiale sur différents regroupements de populations.

Les résultats montrent une plus forte différenciation entre populations au niveau cytoplasmique par rapport au niveau nucléaire, impliquant des flux de pollen deux fois plus élevés que les flux de graines (rapport de la quantité de migration pollinique sur la quantité de migration par les graines $r = 2.64$ (Ennos, 1994)). Un isolement par la distance est décelé au niveau des populations continentales.

Toutefois cette relation entre affinité génétique et éloignement géographique des populations disparaît lorsque les populations insulaires

sont incluses dans l'analyse. Ainsi, la position originale des populations collectées sur les îles de Jersey, Guernesey et Chausey semble être confirmée même si celles-ci ne semblent pas différer des populations continentales en terme de diversité génétique. En effet, l'assignation des individus à partir de leur génotype nucléaire multilocus suggère un comportement très différent des populations insulaires, certaines semblant fortement isolées génétiquement, d'autres au contraire reliées avec des populations continentales relativement éloignées. De manière générale, les grandes tendances courantologiques se reflètent dans l'identité génétique des populations, mais suggèrent aussi la nécessité d'une approche à une échelle plus locale pour certaines populations soumises à des régimes tourbillonnants, et la prise en compte d'autres forçages physiques tels que le vent affectant les mouvements de surface.

1.2 GYNODIOECIE ET DIVERSITE NUCLEOTIDIQUE CYTOPLASMIQUE DANS LE GENRE *SILENE*

Ce programme est le fruit de la collaboration avec le Professeur Lynda Delph (Indiana University, Bloomington, Etats-Unis), réalisé lors d'un séjour que j'ai effectué lors du premier semestre 2005 dans son laboratoire, avec le soutien d'une bourse Fulbright/Région Nord-Pas de Calais.

L'objectif général de ce projet reposait sur l'hypothèse suivante : si le maintien d'un polymorphisme nucléo-cytoplasmique est dû à une sélection de type balancée, alors on s'attend à trouver une diversité nucléotidique cytoplasmique plus élevée chez les espèces gynodioïques que chez les espèces non gynodioïques (Charlesworth 2002).

Cette hypothèse était suggérée par une première étude publiée en 2002 sur *Silene acaulis*, espèce gynodioïque, où il apparaissait chez cette espèce des haplotypes divergents et très anciens pour le gène mitochondrial *cob* (Städler et Delph 2002). Par ailleurs, une étude sur une autre espèce gynodioïque de Silène, *Silene vulgaris*, montrait que *Silene vulgaris* avait une diversité nucléotidique chloroplastique réduite, comparée à une espèce « témoin » non gynodioïque, *Silene latifolia* (Ingvarsson et Taylor 2002). Ceci suggérait une dynamique de type épidémique chez cette espèce, contrastant avec le modèle

acaulis.

Afin de tester la généralité du phénomène observé chez *Silene acaulis*, nous avons étudié la diversité de deux gènes mitochondriaux, *cob* et *cox1* sur un échantillon d'espèces de silènes différant pour leur système de reproduction (Figure 16 ; tableau 2), et en particulier étant caractérisées comme gynodioïques *versus* non gynodioïques. Encore une fois si la dynamique de la gynodioécie est caractérisée par une sélection de type balancée, on s'attend à observer une plus forte diversité mitochondriale (tant au niveau du nombre de sites ségrégeants, que du nombre d'haplotypes différents) chez les espèces gynodioïques comparée aux espèces non gynodioïques. De plus une diversité présente au niveau des populations sera aussi favorisée par une dynamique de ce type.

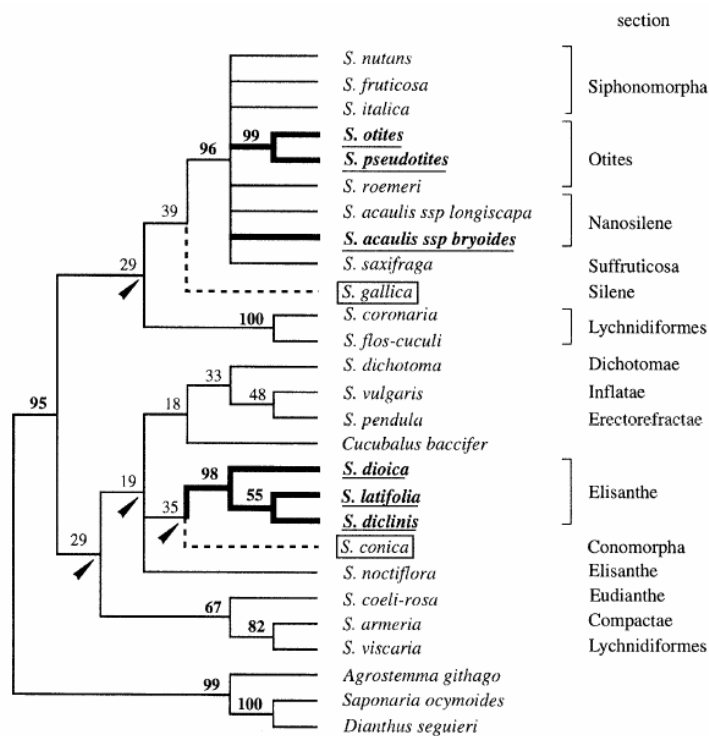


Figure 16: Phylogénie des silènes. Arbre consensus à partir de données ITS (Desfeux *et al.* 1996)

Les résultats sont résumés dans les tableaux 2A et 2B.

Tableau 2A: Bilan du polymorphisme de séquence du gène *cob* (1041 bp)

Sont indiqués pour chaque espèce de *Silene*, son système de reproduction (gynodioïque (**GD**), dioïque (**D**) ou hermaphrodite (**H**)), le nombre de populations analysées (**Nb pop**), le nombre d'individus séquencés (**N**), le nombre d'haplotypes (**Nb haplo**), le nombre de sites ségrégeants (**S**), la diversité nucléotidique ($\pi \pm$ écart-type), le nombre de substitutions synonymes par site synonyme (**Ks**), le nombre de substitutions non synonymes par site non synonyme (**Ka**), le rapport **Ks/Ka** ainsi que l'existence d'un polymorphisme intra-populationnel (**Intra**) (paramètres calculés par DnaSP 3.99).

Espèces	Système de reproduction	Nb pop	N	Nb haplot	S	$\pi \pm$ ET	Ks	Ka	Ks/Ka	Intra
<i>S. acaulis</i>	GD	4	19	13	21	0.00519 \pm 0.00052	0.01015	0.00369	2,75	oui
<i>S. vulgaris</i>	GD	10	46	4	4	0.00146 \pm 0.00009	0.00426	0.00061	6,98	oui
<i>S. nutans</i>	GD	5	23	12	15	0.00282 \pm 0.00054	0.00742	0.00141	5,26	oui
<i>S. latifolia</i>	D	7	59	1	0	0				non
<i>S. dioica</i>	D	3	5	1	0	0				non
<i>S. diclinis</i>	D	5	37	2	1	0.00036 \pm 0.00007	0	0.00048	0	oui
<i>S. virginica</i>	H	4	24	1	0	0				non
<i>S. douglasii</i>	H	4	5	1	0	0				non
<i>S. scouleri</i>	H	1	10	1	0	0				non

Tableau 2B: Bilan du polymorphisme de séquence du gène *cox1* (1037 bp)

Espèces	Système de reproduction	Nb pop	N	Nb haplot	S	$\pi \pm$ ET	Ks	Ka	Ks/Ka	Intra
<i>S. acaulis</i>	GD	4	16	6	8	0.00138 \pm 0.00035	0.00523	0.00016	32.69	oui
<i>S. vulgaris</i>	GD	8	16	2	1	0.00012 \pm 0.00010	0.00050	0		non
<i>S. nutans</i>	GD	5	21	10	14	0.00342 \pm 0.00031	0.01101	0.00101	10.90	oui
<i>S. latifolia</i>	D	8	20	3	2	0.0006 \pm 0.00009	0.00247	0		non
<i>S. dioica</i>	D	2	2	1	0	0				non
<i>S. diclinis</i>	D	2	3	1	0	0				non
<i>S. virginica</i>	H	4	4	1	0	0				non
<i>S. douglasii</i>	H	2	2	1	0	0				non
<i>S. scouleri</i>	H	1	2	1	0	0				non

Brièvement :

- on observe une plus forte diversité des gènes *cob* et *cox1* chez les espèces gynodioïques (nombre de sites ségrégeants et nombre d'haplotypes) que chez les espèces non gynodioïques, avec un résultat moins marqué chez *Silene vulgaris* ;
- une diversité qui est détectable au niveau populationnel ;
- des haplotypes stérilisants manifestant un polymorphisme trans-spécifique entre les deux espèces gynodioïques *Silene acaulis* et *Silene nutans* ;
- des signatures de recombinaison pour les deux gènes étudiés, vraisemblablement du fait d'épisode d'hétéroplasmie suite à des « fuites » paternelles (déjà décrite chez *Silene vulgaris*, McCauley *et al.* 2005).

Ces travaux suggèrent la généralité d'une dynamique reposant sur une sélection balancée pour le maintien de la gynodioécie chez les silènes. S'il apparaît clairement que ce système de reproduction permet de maintenir de la diversité cytoplasmique, demeure la question de l'origine de cette diversité. En d'autres termes, la diversité observée est-elle i) le résultat de l'accumulation de mutations sur une longue période de temps ? Städler et Delph 2002 avaient estimé l'âge approximatif de divergence des haplotypes de *cob* chez *Silene acaulis* de l'ordre de 15 millions d'années, en considérant un taux de substitution synonyme constant et très faible (Wolfe et al. 1987). Ou ii) sommes-nous témoins d'un taux de mutation mitochondrial exceptionnellement élevé dans certaines lignées de *Silene*, à l'image du genre *Plantago* (Cho et al. 2004), générant une forte diversité maintenue par le système de reproduction ? L'étude conjointe de la diversité chloroplastique chez ces différentes espèces permettra de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Noctiflora, l'Obscure

Au cours du séquençage des gènes *cob* et *cox1* chez différentes espèces de silènes, nous avons constaté que l'espèce *noctiflora*, une espèce non gynodioïque, bien que peu polymorphe manifestait une très forte divergence (tableau 3; Figure 17).

Tableau 3: Comparaison des séquences de *cob* (1041 bp) et *cox1* (1003 bp) de *S. noctiflora* et *S. latifolia*.

Sont indiqués, le nombre de sites ségrégeants (**S**), le nombre de substitutions synonymes (**SynDif**), le nombre de substitutions synonymes par site synonymes (**Ks**), le nombre de substitutions non synonymes (**NSynDif**), le nombre de substitutions non synonymes par site non synonyme (**Ka**) (paramètres calculés par DnaSP 3.99).

<i>cob</i>					<i>cox1</i>				
S	SynDif	Ks	NSynDif	Ka	S	SynDif	Ks	NSynDif	Ka
105	84	0.465	21	0.0269	93	78	0.4126	15	0.0205

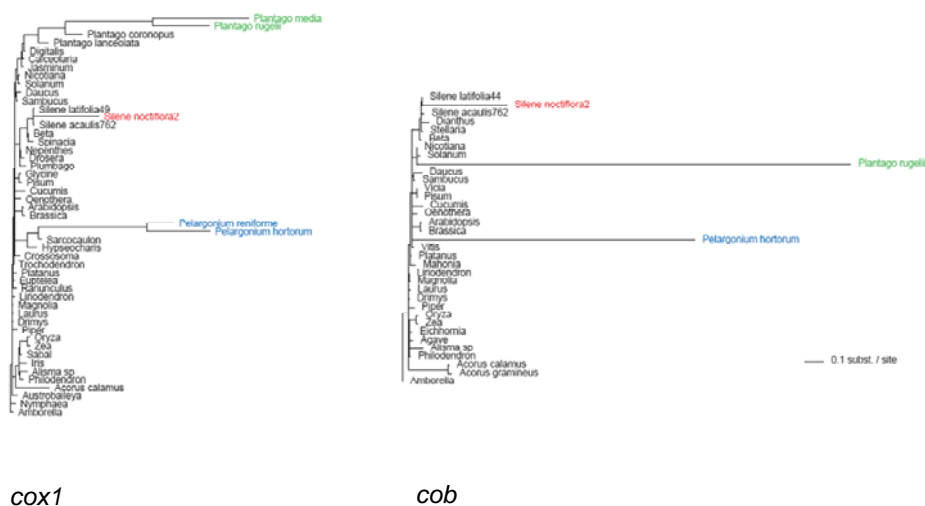


Figure 17 : Arbres phylogénétiques des gènes *cox1* et *cob*.

Arbres obtenus par maximum de vraisemblance sur la 3^{ème} position des codons (approximativement le taux de substitution synonyme), les topologies étant contraintes par les relations phylogénétiques connues des différentes espèces (Jeffrey Mower).

Le séquençage de deux fragments chloroplastiques chez plusieurs espèces de silènes montre que cette divergence est spécifique du génome mitochondrial, à l'image de ce que l'équipe du professeur Jeffrey Palmer (Bloomington, Indiana) a montré chez *Plantago* (Cho *et al.* 2004). Ces premiers résultats ont été l'amorce d'une collaboration active avec cette équipe afin de déterminer plus précisément l'extension et la chronologie de cette « explosion » du taux de mutation mitochondrial en séquençant d'autres gènes mitochondriaux chez *Silene noctiflora*, *Silene latifolia*, *Silene acaulis* et *Silene conica*, espèce phylogénétiquement proche de *Silene noctiflora*, et qui, si l'explosion du taux de mutation mitochondrial s'est produite antérieurement à la différenciation *conica*/*noctiflora*, devrait être aussi très divergente. Les résultats obtenus sur *noctiflora* ne concernant qu'une population située aux Etats-Unis, nous avons entrepris le séquençage des gènes *cob* et *cox1* sur une population européenne (Lund, Suède, récoltée par Honor Prentice). Nous nous attendons à trouver une faible différenciation entre les deux populations si la divergence est très ancienne et fixée, le système de reproduction non gynodioïque ne permettant pas *a priori* le maintien d'une forte diversité au sein de l'espèce.

1.3 ANALYSE DE L'HISTOIRE EVOLUTIVE DE LA STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE OGURA DANS DES POPULATIONS SAUVAGES DE RAVENELLE (*RAPHANUS RAPHANISTRUM*) : CHRONIQUE D'UNE MORT ANNONCEE ?

(Collaboration avec Françoise Budar, INRA de Versailles. Stage de M2Pro de Sophie Chaillou 2005).

La stérilité *Ogura* du radis, est causée par un gène mitochondrial, appelé *orf138* (Bonhomme *et al.* 1991, 1992; Grelon *et al.* 1994). Cette SMC est retrouvée dans des populations sauvages de radis, *Raphanus sativus*, d'Asie du Sud-Est où l'on trouve des plantes mâle-stériles (Yamagishi et Terachi 1996, 1997 ; Murayama *et al.* 2004). Récemment, les gènes portés par le locus *Rfo* restaurateur de fertilité de ce système ont aussi été identifiés (Desloire *et al.* 2003 ; Brown *et al.* 2003).

Ces différents éléments font de la SMC *Ogura* le seul système maintenu dans des populations sauvages pour lequel nous connaissons les déterminants génétiques de la stérilité et de la restauration.

Nous avons initié un programme de recherche étudiant la présence et le comportement du gène *orf138* dans des populations sauvages de ravenelle, *Raphanus raphanistrum*, de France, d'Angleterre et du Liban (proche de la zone de diversification). Un échantillonnage de 12 populations de ravenelles, 7 françaises, 3 anglo-normandes, et 1 anglaise semble suggérer que la situation est différente de celle décrite en Asie du Sud-Est puisque qu'aucune plante mâle-stérile n'a été détectée dans ces populations. La même situation est aussi rencontrée au Liban (4 populations). La fréquence de l'*orf138* a été estimée grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques sur l'ensemble de ces échantillons. Il apparaît que l'*orf138* n'est détectée que dans 4 populations avec une fréquence qui varie dans ces populations de 0.02 (1/57) à 0.15 (15/50). La séquence de cet *orf138* a révélé qu'il est de type B, la forme ancestrale la plus communément trouvée dans les populations asiatiques et non la forme introduite dans les variétés de colza (de type A) (Yamagishi et Terachi 2001). Le croisement d'individus avec des mainteneurs de la stérilité d'une part, et des plantes femelles testeurs d'autre part, montre que le cytoplasme n'est pas inducteur de stérilité (alors

que porteur d'une séquence codante fonctionnelle) et que les gènes de restauration sont en forte fréquence. Une étude fonctionnelle de ce cytoplasme particulier a révélé qu'il ne produit pas la protéine ORF138, le facteur stérilisant, et que ceci est probablement dû à une maturation du transcrit qui détruit la séquence codante de l'*orf138* (F. Budar, communication personnelle).

Il apparaît de cette étude que la situation de la stérilité mâle cytoplasmique dans les populations françaises et anglaise est très différente de celle rencontrée au Japon. Alors que les populations de radis sauvage japonais (*Raphanus sativus*) sont gynodioïques (avec des fréquences de femelles en population pouvant atteindre des valeurs de 0.21, du fait de la présence de l'*orf138* (Murayama *et al.* 2004), nous n'avons détecté aucune plante femelle dans les populations échantillonnées. S'il apparaît que l'*orf138* est rare en population, il s'avère que la fréquence des allèles de restauration y est élevée, et que l'*orf138*, quoiqu'ayant une séquence identique au type stérilisant le plus fréquent en Asie, a perdu son pouvoir stérilisant. Je propose le scénario suivant, telle la chronique d'une mort annoncée par les modèles théoriques de l'évolution de la gynodioécie. Nous avons vu que les modèles théoriques qu'ils soient épidémiques ou de type sélection balancée prédisent une phase d'augmentation de la fréquence des allèles de restauration favorisés lorsque le cytoplasme stérilisant correspondant est lui-même fréquent. Selon les paramètres de fitness associés au système de stérilité mâle, l'avantage femelle d'une part, le coût associé aux allèles de restauration d'autre part, les allèles de restauration peuvent à terme arriver à fixation, conduisant à la disparition du polymorphisme sexuel dans les populations. Le cytoplasme stérilisant devient alors neutre au regard des autres cytoplasmes co-existant dans la population. Dans ce contexte, toute mutation délétère affectant l'expression du facteur de stérilité sera neutre. C'est ainsi que le cytoplasme *Ogura* aurait perdu son pouvoir stérilisant dans un paysage de restauration fixée. Reste la question du maintien de ce système en Asie du Sud-Est. Il est à noter que si *Rfo* est vraisemblablement responsable de la restauration de la fertilité mâle en Asie, d'autres systèmes alternatifs de restauration semblent exister en

Europe, peut-être moins coûteux. Du reste, dans les populations asiatiques, il existe des populations non gynodioïques dans lesquelles le cytoplasme *Ogura* est présent, démontrant que la fixation de la restauration est possible même avec *Rfo*, et donc que notre hypothèse de fixation est probable.

Synthèse et perspectives: trois espèces gynodioïques pouvant représenter trois dynamiques ou états d'évolution différents de la gynodiœcie

La betterave maritime est une espèce dont le polymorphisme sexuel, quoique très courant, ne présente pas de caractéristiques très spectaculaires: avec une fréquence médiane des femelles de 0.13 dans les populations gynodioïques du golfe anglo-normand, un portion importante dans ces populations de cytoplasmes non stérilisants, un avantage femelle non détecté sur la SMC la plus fréquente, le type *E* (Boutin et al. 1988). Nous avons montré que les 4 seules SMC connues sont apparues indépendamment à partir d'un type ancestral non stérile. Le niveau de résolution actuel (peu de pas de mutations séparant les différents cytoplasmes) ne permet pas d'attribuer un âge même relatif à ces différentes SMC. Une faible divergence nucléotidique entre ces différents cytoplasmes (fruit probable d'un goulot d'étranglement récent antérieur à l'apparition de ces différents cytoplasmes), rend difficile la proposition d'une dynamique évolutive d'un système « timide », entre une dynamique épidémique relativement peu purgeante (faibles avantages femelles) et une sélection fréquence-dépendante permettant le maintien de cytoplasmes non stériles (faibles avantages femelles et faibles coûts associés aux allèles de restauration). Néanmoins, quelques propriétés ont pu être dégagées par l'étude des populations du golfe anglo-normand :

- i) Les 3 SMC *E*, *G* et *Sv*, ont des propriétés différentes en populations tant au niveau de leur fréquence que de leur niveau de restauration. Ces différences de restauration avaient été décrites sur quelques populations du Nord de la France lors de la thèse de Valérie Laporte (1998), avec en particulier une fréquence des allèles de restauration très élevée de la SMC

Sv, même en absence du cytoplasme, suggérant un coût associé assez faible. La faible fréquence des allèles de restauration de la SMC *G* pourrait s'expliquer par une migration un peu plus récente de ce cytoplasme (suggéré par la corrélation positive entre fréquence de ce cytoplasme et fréquence des individus restaurés sur ce cytoplasme) mais aussi par la nature même du facteur de stérilité. En effet si la variation au gène *cox2* est la cause de la stérilité mâle, on s'attend à ce que le recrutement des allèles de restauration se fasse parmi les gènes codant pour des protéines interagissant avec cette sous-unité du complexe IV, donc faisant potentiellement partie de ce complexe. Ceci impose donc une contrainte importante au recrutement, donc à sa probabilité d'apparition, ainsi qu'un coût probable constitutif, car reposant sur la modification d'un gène essentiel, moins efficace dans son interaction avec une sous-unité COX2 « normale » (superdominance attendue).

ii) Une dynamique de type sélection balancée en population suggérée par la non corrélation entre fréquence du cytoplasme *E* et son niveau de restauration.

Silene nutans, cette espèce gynodioïque, apparaît avec une diversité nucléotidique mitochondriale élevée à l'image de *Silene acaulis*. Les données acquises au cours de mon séjour à l'Université d'Indiana (Bloomington), suggère une sélection de type balancée permettant le maintien de la gynodioécie dans cette espèce. Une étude en populations est envisagée dans un avenir proche dans le cadre du projet post-doctoral de Fabienne Van Rossum. Au regard de la diversité nucléotidique obtenue, suggérant une dynamique marquée, on peut s'attendre à une forte variabilité de la fréquence d'individus femelles entre populations, des différences de fitness entre phénotypes importantes, détectables dans des conditions de culture contrôlées.

Raphanus raphanistrum* et le système *Ogura. Nous avons vu que si le système *Ogura* est responsable de la gynodioécie dans les populations de radis sauvage au Japon, nous n'avons détecté aucune plante mâle-stérile

dans les populations étudiées, avec un cytoplasme *Ogura* rare et ayant perdu son pouvoir stérilisant. Peut-on retracer les conditions démographiques et sélectives qui ont conduit aux deux situations contrastées en Europe et en Asie ? L'étude de la diversité chloroplastique par ecotilling (Henikoff et Comai 2003 ; Comai *et al.* 2004) a permis de révéler une diversité cytoplasmique non négligeable des populations européennes (avec une richesse allélique variant de 2 à 7) (Stage de M2Pro de Sophie Chaillou, 2005). Le séquençage des différents haplotypes obtenus permettra de jeter les premières bases d'une généalogie des différents cytoplasmes rencontrés. Il est clair que l'étude de la diversité cytoplasmique par cette méthode sur les populations gynodioïques asiatiques, et l'introduction d'accessions asiatiques dans l'établissement d'une généalogie, seront déterminantes pour comprendre l'histoire de cette « réversion cytoplasmique ».

Je souhaite à l'avenir continuer de mener l'étude comparée de ces trois systèmes gynodioïques contrastés, qui sera rendue possible par des collaborations solides dont certaines existent déjà et d'autres sont à construire. Ce programme de recherche peut-être décliné selon différents axes :

- Diversité nucléotidique et généalogie des génomes chloroplastique et mitochondrial des trois espèces

Il paraît clair que l'étude en parallèle de la diversité des génomes chloroplastique et mitochondrial d'une espèce ou d'un genre (comme dans le cas du programme *Silene*) permettra :

- de suivre l'évolution du déséquilibre de liaison de ces deux génomes co-transmis, et de détecter l'effet de la fuite paternelle sur ce déséquilibre ;
- de faire la part entre démographie dont l'effet est partagé par les deux génomes, et l'évolution propre de chacun de ces génomes, en particulier en ce qui concerne le taux de mutation mitochondrial attendu comme variable (entre gènes, entre lignées évolutives) contrairement au taux de mutation chloroplastique.

Il est à noter que si cette approche est en cours de développement au niveau inter-spécifique (équipe de Palmer par exemple, voir de plus l'exemple de *Silene noctiflora*), l'étude comparée de l'évolution et de la dynamique de ces deux génomes au niveau intraspécifique n'est quasiment pas abordée.

Pour ce qui concerne *Beta ssp vulgaris maritima*, cette étude permettra d'améliorer la résolution de la généalogie chloroplastique déjà établie, de donner un âge relatif à chaque SMC, de détecter une éventuelle diversité intra-SMC que l'on pourra comparer avec celle observée pour des cytoplasmes non stérilisants et de construire une « vraie » généalogie mitochondriale à partir des informations de diversité de l'ensemble des gènes mitochondriaux. Cette approche est rendue possible par la disponibilité de la séquence entière de deux génomes de betterave et la possibilité d'appliquer la technique d'ecotilling, développée avec succès par Pierre Saumitou-Laprade au laboratoire sur des fragments chloroplastiques, permettant de définir des classes d'haplotypes avant séquençage.

Pour le genre *Silene*, je souhaite continuer de travailler sur *Silene nutans*, espèce très variable. La construction d'une phylogénie chloroplastique chez *Silene nutans* sera l'objet du projet post-doctoral de Fabienne Van Rossum dont le dossier est en cours de constitution. L'analyse de la diversité chloroplastique et mitochondriale pourra faire partie d'un plus grand « ensemble » *Silene* constitué d'espèces représentant différents types de système de reproduction, déjà constitué et analysé pour la diversité aux gènes de *cob* et *cox1* (Collaboration avec Lynda Delph ; une demande de programme d'échange CNRS/Etats-Unis sera déposée en septembre 2006).

Pour *Raphanus raphanistrum*, le rapprochement avec l'équipe de T. Terachi, de l'université de Kyoto au Japon, permettra d'accéder à des accessions ou populations asiatiques, chaînons indispensables pour reconstruire l'histoire du système *Ogura* européen.

- **Patrons de diversité aux locus de restauration**

Jusqu'à présent nous avons abordé la question de la dynamique de la gynodioécie via l'analyse des patrons de diversité aux niveaux de gènes mitochondriaux. Or, pour *Beta vulgaris ssp maritima* et *Raphanus*

raphanistrum, il est maintenant possible de s'intéresser à la diversité aux locus de restauration de la fertilité, eux-mêmes soumis à la dynamique sélective.

Pour *Beta vulgaris*, le locus de restauration *X* de la SMC *Sv* est en cours de caractérisation et un contact a déjà été établi avec l'équipe du Professeur Mikami (université d'Hokkaido, Japon) pour étudier la diversité de ce locus dans les populations.

Pour *Raphanus raphanistrum*, nous envisageons, en collaboration avec Françoise Budar, d'étudier la diversité de séquence et de structure de *Rfo* (puisque c'est un locus complexe composé de plusieurs paralogues) dans les populations gynodioïques asiatiques et européennes. Au delà de l'analyse de patrons de diversité à un locus soumis à sélection, cette étude permettra de définir les parties du gène qui ont été cibles de la sélection et donc de mieux comprendre la fonction de ce gène et ce qui fait de lui un gène de restauration.

Enfin, il m'apparaît important de préciser que si ces approches de génomique évolutive constituent le cœur de ma future activité de recherche, elles ne donneront qu'une information partielle sur la dynamique d'un système si complexe. Je vois ainsi différents axes prometteurs qui nécessiteront développement ou consolidation au sein de l'équipe animée par Joël Cuguen :

- Mesure des paramètres de fitness mâles et femelles des différentes SMC chez la betterave, vraisemblablement différents au regard de leur situation en population ; le système *Silene nutans* est aussi certainement un bon candidat pour ce genre d'étude.
- Etude de l'impact de la gynodioécie sur la structure génétique des populations de betteraves maritimes à différentes échelles, au niveau d'une région (étude des 85 populations de la Manche en cours d'analyse avec Jean-François Arnaud) jusqu'au fonctionnement au niveau de la population (projet en cours de Jean-François Arnaud et Mathilde Dufaÿ). Cette relation serait aussi abordée dans le cadre du projet post-doctoral de Fabienne Van Rossum sur *Silene nutans*.

- Les approches empiriques tentant de relier diversité cytoplasmique et dynamique évolutive telles que nous les avons menées sur *Silene* bénéficieront certainement de développement théoriques permettant de prédire la forme d'arbres de coalescence en cas de sélection balancée ou d'épidémie.

AXE 2 EVOLUTION VERS L'AUTO-COMPATIBILITE, DIVERSITE NUCLEOTIDIQUE ET HISTOIRE DE LA SECTION *BETA*

Mon activité de recherche s'est essentiellement concentrée sur le déterminisme génétique de la gynodioécie et de sa dynamique en populations, néanmoins j'ai commencé de développer un axe de recherche complémentaire sur l'évolution et le déterminisme génétique d'un autre polymorphisme du système de reproduction, présent au sein de la section *Beta* : le fait d'être auto-compatible ou auto-incompatible.

2.1 ANALYSE DU DETERMINISME GENETIQUE DE L'AUTO-COMPATIBILITE CHEZ *BETA VULGARIS*

(Stage de Sophie Degouy 2000, Contrat d'ATER de Gaëlle Guéritaine 2002-2004 - Touzet *et al.* en préparation pour TAG)

La betterave maritime est une plante allogame et auto-incompatible, c'est à dire qu'elle ne peut produire des graines si elle est fécondée par son propre pollen. Cette caractéristique du système de reproduction de *Beta vulgaris* en fait une espèce à part dans la section *Beta*, *B. v. adanensis* et *Beta macrocarpa* étant décrits comme auto-compatibles, le statut de *patula* étant incertain (Bruun *et al.* 1995). Il est tout de même à noter qu'il existe une variabilité au sein de *maritima*, peut-être structurée géographiquement, pour ce caractère (Bruun *et al.* 1995). Le système d'auto-incompatibilité est de type gamétophytique, impliquant au moins deux locus indépendants (hypothèse à 2 locus comparable au système des graminés (Owen 1942 ; Maletsky et Weisman 1978; hypothèse à 4 locus (Larsen 1977)).

Néanmoins il existe chez la betterave cultivée un facteur monogénique appelé *Sf* (pour self fertility) qui la rend auto-compatible, supposé comme étant un allèle à un des locus d'auto-incompatibilité (Owen 1942). L'action de ce gène est décrite comme gamétophytique. Une plante hétérozygote au locus, sera auto-compatible, et le produit de son autofécondation donnera 100% de plantes auto-compatibles (50% de *Sfsf* et 50% de *SfSf*), puisque seuls les grains de pollen porteurs de l'allèle *Sf* participeront à la formation

de la génération suivante. Enfin, la présence de ce gène rend non seulement l'individu porteur auto-compatible, mais aussi autogame. Ce gène est utilisé fréquemment en création variétale car il facilite la production de lignées pures par autofécondation.

J'ai développé une descendance issue du croisement d'une plante hétérozygote au locus *Sf* (B. Schweisguth, INRA de Dijon) composée de 86 individus, ségrégeant pour la capacité à produire des graines par autofécondation. La ségrégation observée de type 1 :1 correspond à celle attendue si le caractère est monogénique. La recherche de marqueurs génétiquement liés à *Sf* a donc été conduite par la méthode de *Bulk Segregant Analysis* (BSA, Michelmore *et al.* 1991). A l'aide de marqueurs AFLP (61 combinaison d'amorces utilisées dans la première étape de la BSA), de marqueurs d'ancrage co-dominants (Schneider *et al.* 1999, 2002) et de marqueurs microsatellites développés par la société SESVANDERHAVE (S Barnes, Rae *et al.* 2000), nous avons pu construire un groupe de liaison autour du locus *Sf* composé de 16 marqueurs, les marqueurs les plus proches encadrant *Sf* d'une fenêtre de 8 cM (fonction de Kosambi, Lodscore de 3). Ce groupe de liaison correspond au chromosome V (classification de Butterfass 1964). Il est à noter que ce même chromosome avait été caractérisé dans la construction d'une carte génétique à partir d'une descendance de type F₂ (vraisemblablement faisant intervenir le gène *Sf* comme étant l'objet d'une forte distorsion de ségrégation, effet attendu de *Sf* lors d'une autofécondation, car seul les grains de pollen porteurs de l'allèle *Sf* sont compatibles (Pillen *et al.* 1992).

Nous avons entrepris la même démarche sur une descendance issue du croisement d'un individu *maritima* avec un hybride *maritima* x *adanensis* auto-compatible développé par Nina Hautekèete, dans le cadre de sa thèse sur l'étude du déterminisme génétique de la sémelparité (Hautekèete, 2001). La question posée était de savoir si l'évolution vers l'auto-compatibilité dans le taxon *adanensis* avait recruté un locus homologue à *Sf*. En appliquant la même méthodologie décrite précédemment, aucun marqueur AFLP n'a été trouvé pouvant caractériser les bulks phénotypiques : auto-compatibles *versus* auto-incompatibles. De plus, en utilisant des marqueurs appartenant

au chromosome V, aucun locus d'auto-compatibilité lié génétiquement à la zone homologue chez *adanensis* n'a été détecté. S'il n'est pas possible de rejeter totalement un problème lié au phénotypage dans ce croisement (de petit effectif, environ 60 individus), ces résultats suggèrent que l'auto-compatibilité chez *adanensis* n'est pas due à un locus homologue à *Sf*, et que son déterminisme repose sur plus d'un gène, ce qui expliquerait l'échec de la démarche BSA.

L'évolution vers l'auto-compatibilité dans le taxon *adanensis* pourrait donc être la conséquence de mutations directement aux 2 locus d'auto-incompatibilité. Si ce système à deux locus est attendu comme étant plus « robuste » qu'un système à un locus, il peut néanmoins « s'écrouler » dans le cas d'un goulot démographique important (Richards 1997), ce que suggèrent les données de diversité nucléo-cytoplasmique sur *adanensis* obtenues au laboratoire (Viard 2001 ; thèse de Sarah Villain).

Par contre *Sf* pourrait être un gène régulant en amont l'action des locus d'auto-incompatibilité (cf revue récente sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la rupture d'un système d'auto-incompatibilité par Stone 2002). Il est intéressant de noter que les modèles théoriques montrent que l'invasion d'un gène d'auto-compatibilité est plus facile si ce gène est un allèle au locus d'auto-compatibilité, que si c'est un gène indépendant (Charlesworth et Charlesworth 1979 ; Porcher et Lande 2005). Or, si l'invasion des allèles d'auto-compatibilité s'est réalisée chez *adanensis*, force est de constater que *Sf* peut être considéré comme rare au sein des populations de *maritima*. Il est possible de suivre l'évolution de sa fréquence dans un compartiment génétique particulier, le compartiment mauvaise-herbe. En effet, le gène *Sf*, étant utilisé dans la création variétale de la betterave cultivée, les mauvaises-herbes issues de l'hybridation d'un portegraine cultivé avec une betterave sauvage, peut avoir incorporé *Sf*. Ceci semble avéré quand on regarde le niveau d'autofécondation de betteraves mauvaises-herbes par génotypage de descendances maternelles avec des marqueurs microsatellites. On constate que les populations les plus jeunes ont un niveau d'autofécondation plus élevé que les populations plus anciennes.

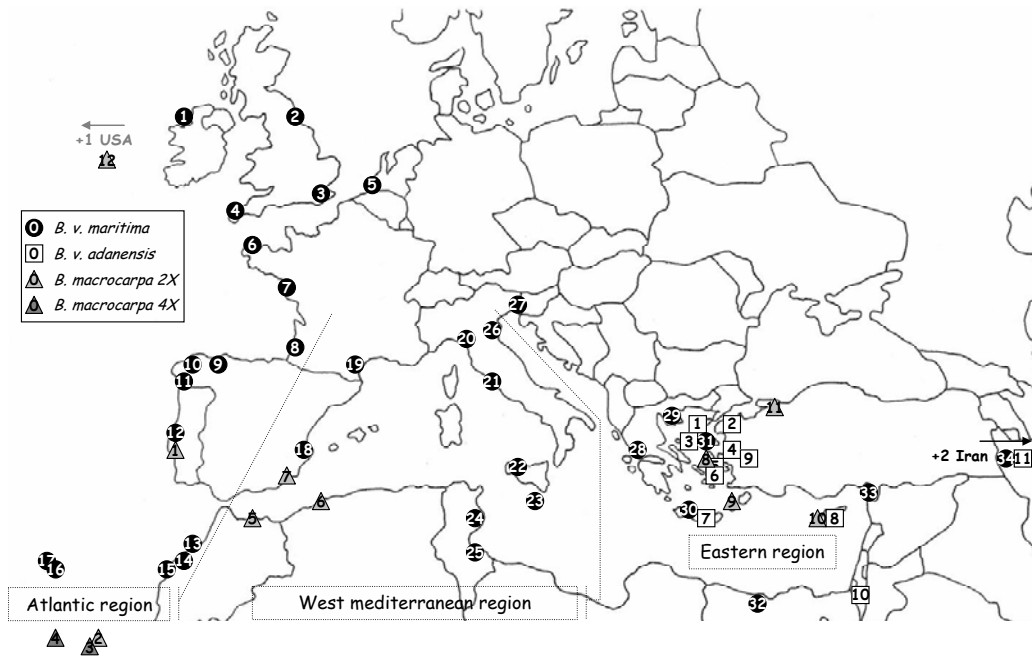


Figure 18: Carte des accessions des trois espèces de la section *Beta* choisies pour l'étude de la diversité chloroplastique et nucléaire (Sarah Villain).

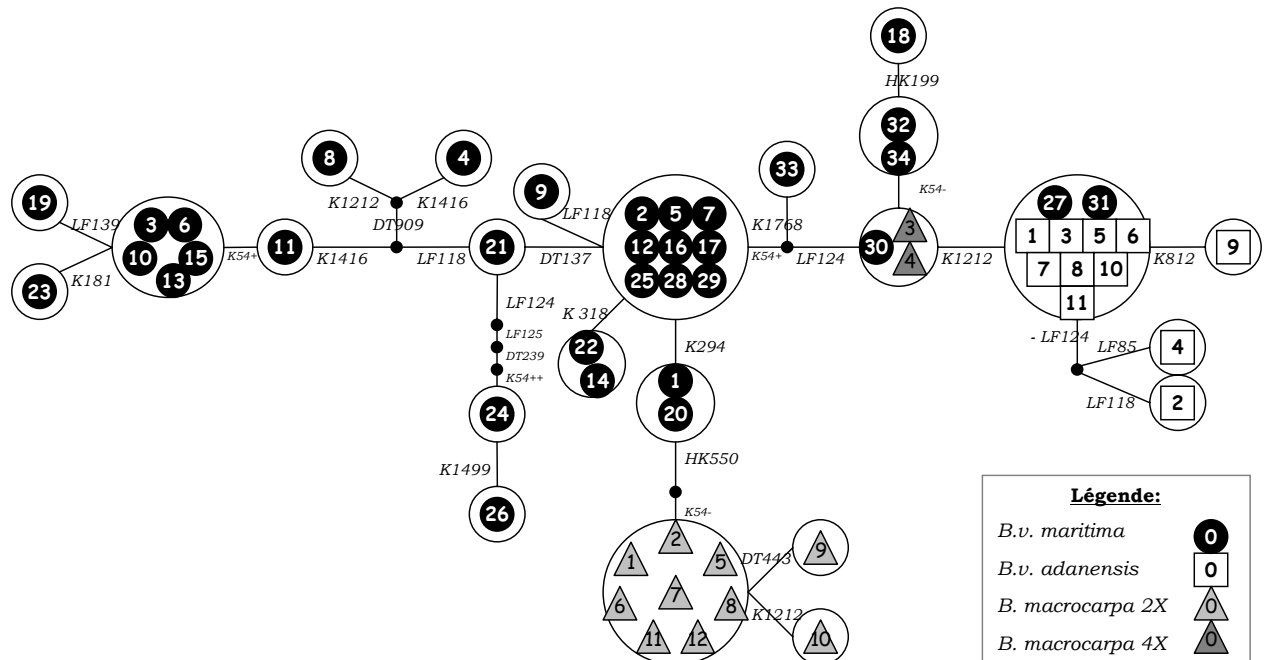


Figure 19: Réseau des haplotypes chloroplastiques des trois espèces de la section *Beta* (Sarah Villain).

Or l'implication du gène *Sf* peut être invoquée au regard des distorsions de ségrégation observées pour un locus microsatellite utilisé en routine au laboratoire, le locus CAA1 qui est génétiquement lié à *Sf*. Ainsi, si *Sf* permet d'expliquer le taux d'autofécondation des betteraves mauvaises herbes de premières générations, il apparaît que cet allèle est contre-sélectionné lors des générations successives (thèse de Stéphane Fénart).

2.2 DIVERSITE, PHYLOGEOGRAPHIE ET SPECIATION AU SEIN DE LA SECTION BETA

La construction de la généalogie des cytoplasmes reposait sur le choix d'haplotypes mitochondriaux RFLP représentant la diversité mitochondriale connue de *Beta vulgaris ssp maritima* (une vingtaine de mitotypes). Nous avons entrepris l'étude de la diversité cytoplasmique (via le séquençage de fragment chloroplastiques) et nucléaire (sur 3 gènes *adh*, *cab5* et ITS1-région 18S-5.8S-25S) sur l'ensemble de la section *Beta*, en effectuant un échantillonnage représentatif de la distribution géographique de chacune des espèces (Figure 18) ; l'objectif étant de déterminer les facteurs historiques et démographiques ayant modelé la diversité observée, et en particulier s'il était possible de détecter l'existence de zones refuges des dernières périodes glaciaires. Les résultats obtenus peuvent être résumés en deux points.

2.2.1 Phylogéographie de *Beta vulgaris ssp maritima* et *adanensis*

(DEA de Sarah Villain 2004 ; stage IUP-3 de Laetitia Buret - Villain *et al.* en préparation pour *Molecular Ecology*)

L'étude de l'organisation de la diversité entre ces deux taxons confirme la différenciation récente d'*adanensis* à partir de l'espèce *maritima* :

- au niveau cytoplasmique avec un haplotype porté par 8 sur 11 des individus *adanensis*, haplotype partagé par des individus *maritima* (Figure 19) ;
- au niveau nucléaire, généralement un cluster *adanensis* et un cluster d'allèles partagé aussi par des individus *maritima*, pouvant suggérer des hybridations encore en cours dans les zones de sympatrie.

L'organisation géographique de la diversité génétique au sein de *maritima* révèle l'existence probable de deux zones refuges pendant les dernières

périodes glaciaires, l'une se situant au Maroc, l'autre dans la partie orientale du bassin méditerranéen. De plus la diversité nucléotidique de cette espèce allogame apparaît assez faible, confirmant l'hypothèse de goulot d'étranglement émise lors de la construction de la généalogie des SMC.

2.2.2 Diversité et évolution de *Beta macrocarpa*. Histoire de la formation des allo-tétraploïdes *macrocarpa/maritima* de l'archipel canarien

(Thèse de Sarah Villain 2004-2007).

Les données chloroplastiques et nucléaires ont confirmé la différenciation ancienne de l'espèce *macrocarpa* quand on considère les individus diploïdes. De plus on observe une diversité génétique tant au niveau chloroplastique que nucléaire extrêmement réduite chez cette espèce dont la distribution géographique est pourtant assez étendue (ensemble du bassin méditerranéen). En effet, on observe au niveau chloroplastique, un haplotype majoritaire spécifique de *macrocarpa* et deux haplotypes dérivés ne concernant que deux individus (Figure 19), et au niveau nucléaire un seul allèle détecté pour chacun des 3 gènes nucléaires analysés.

Des formes tétraploïdes de type *macrocarpa* ont été décrites dans l'archipel canarien (Lange et de Bock 1989). Les premiers résultats confirment l'origine de ce taxon : les formes tétraploïdes résulteraient de l'hybridation entre des individus *maritima* et *macrocarpa*. Le sens de l'hybridation a pu être déterminé : les individus tétraploïdes ayant un type chloroplastique partagé par des individus *maritima*, les parents maternels sont donc *maritima* (Figure 19). On observe au niveau des gènes nucléaires deux allèles : un allèle de type *maritima* et un allèle de type *macrocarpa*, chacun d'entre eux étant à l'état homozygote du fait du régime autogame de la forme tétraploïde, acquis de *macrocarpa*.

Ces résultats ont été l'amorce du projet de thèse de Sarah Villain qui a pour objectif de retracer l'histoire de cette hybridation au sein de cet archipel.

REFERENCES

- Akagi, H., A. Nakamura, Y. Yokozeki-Misono, A. Inagaki, H. Takahashi, K. Mori, and T. Fujimura. 2004. Positional cloning of the rice Rf-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet* 108:1449-1457.
- Arnaud, J.-F., F. Viard, M. Delescluse, and J. Cuguen. 2003. Evidence for gene flow via seed dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. *Proc R Soc London B* 270:1565-1571.
- Bailey, M. F., L. F. Delph, and C. M. Lively. 2003. Modeling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism. *Am Nat* 161:762-776.
- Bentolila, S., A. A. Alfonso, and M. R. Hanson. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10887-10892.
- Bonhomme, S., F. Budar, M. Férault, and G. Pelletier. 1991. A 2.5 kb NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in Brassica cybrids. *Curr Genet* 19:121-127.
- Bonhomme, S., F. Budar, D. Lancelin, I. Small, D. MC, and G. Pelletier. 1992. Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male-sterility in Brassica cybrids. *Mol Gen Genet* 235:340-348.
- Boudry, P., M. Mörchen, P. Saumitou-Laprade, P. Vernet, and H. Van Dijk. 1993. The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theor Appl Genet* 87:471-478.
- Boutin, V., R. Jean, M. Valero, and P. Vernet. 1988. Gynodioecy in *Beta maritima*. *Oecologia Plantarum* 9:61-66.
- Brown, G. G. 1999. Unique aspects of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in *Brassica napus*. *J Heredity* 90:351-356.
- Brown, G. G., N. Formanova, H. Jin, R. Wargachuk, C. Dendy, P. Patil, M. Laforest, J. Zhang, W. Y. Cheung, and B. S. Landry. 2003. The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J* 35:262-272.
- Bruun, L., A. Haldrup, S. G. Petersen, L. Frese, T. S. M. d. Bock, and W. Lange. 1995. Self-incompatibility reactions in wild species of the genus *Beta* and their relation to taxonomical classification and geographical origin. *Genet Resour Crop Ev* 2:293-301.
- Budar, F., and G. Pelletier. 2001. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *C R Acad Sci III* 324:543-550.
- Budar, F., P. Touzet, and R. De Paepe. 2003. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica* 117:3-16.
- Butterfass. 1964. Die chloroplastenzahlen in verschiedenartigen zellen trisomer zuckerrübben

- (*Beta vulgaris* L.). *Z Bot* 52:46-77.
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1979. The evolution and breakdown of S-allele systems. *Heredity* 43:41-55.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46:27-39.
- Charlesworth, D., and V. Laporte. 1998. The male sterility polymorphism of *Silene vulgaris*. I. Analysis of genetic data from two populations, and comparison with *Thymus vulgaris*. *Genetics* 150:1267-1282.
- Charlesworth, D. 2002. What maintains male-sterility factors in plant populations. *Heredity* 89:408-409.
- Cho, Y., J. P. Mower, Y. L. Qiu, and J. D. Palmer. 2004. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17741-17746.
- Comai, L., K. Young, B. J. Till, S. H. Reynolds, E. A. Greene, C. A. Codomo, L. C. Enns, J. E. Johnson, C. Burtner, A. R. Odden, and S. Henikoff. 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* 37:778-86.
- Cosmides, L. M., and J. Tooby. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J Theor Biol* 89:83-129.
- Cuguen, J., R. Wattier, P. Saumitou-laprade, D. Forcioli, M. Mörchen, H. Van-Dijk, and P. Vernet. 1994. Gynodioecy and mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Genet Sel Evol* 26:87-101.
- Cui, X., R. P. Wise, and P. S. Schnable. 1996. The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272:1334-1336.
- Delph, L. F., and P. Mutikainen. 2003. Testing why the sex of the maternal parent affects seedling survival in a gynodioecious species. *Evolution* 57:231-239.
- Desfeux, C., S. Maurice, J.-P. Henry, B. Lejeune, and P.-H. Gouyon. 1996. Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proc. R. Soc. London B* 263:409-414.
- Desloire, S., H. Gherbi, W. Laloui, S. Marhadour, V. Clouet, L. Cattolico, C. Falentin, S. Giancola, M. Renard, F. Budar, I. Small, M. Caboche, R. Delourme, and A. Bendahmane. 2003. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep* 4:588-594.
- Desplanque, B., F. Viard, D. Forcioli, J. Bernard, J. Saumitou-Laprade, J. Cuguen, and H. Van Dijk. 2000. The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes in *Beta vulgaris* subsp *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Mol Ecol* 9:141-154.
- Ducos, E., P. Touzet, P. Saumitou-Laprade, P. Vernet, and J. Cuguen. 2001a. Nuclear effect on mitochondrial protein expression of the CMS Owen cytoplasm in sugar beet. *Theor Appl Genet* 102:1299-1304.
- Ducos, E., P. Touzet, and M. Boutry. 2001b. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J* 26:171-180.

- Ennos, R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72:250-259.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *Am Nat* 133:345-376.
- Geddy, R., L. Mahe, and G. G. Brown. 2005. Cell-specific regulation of a *Brassica napus* CMS-associated gene by a nuclear restorer with related effects on a floral homeotic gene promoter. *Plant J* 41:333-345.
- Gouyon, P. H., F. Vichot, and J. M. M. Van Damme. 1991. Nuclear-cytoplasmic male sterility: single point equilibria versus limit cycles. *Am Nat* 137:498-514.
- Grelon, M., F. Budar, S. Bonhomme, and G. Pelletier. 1994. Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile *Brassica* hybrids. *Mol Gen Genetics* 243:540-547.
- Hagihara, E., H. Matsuhira, M. Ueda, T. Mikami, and T. Kubo. 2005. Sugar beet BAC library construction and assembly of a contig spanning Rf1, a restorer-of-fertility gene for Owen cytoplasmic male sterility. *Mol Genet Genomics*.
- Halldén, C., C. Lind, and I. M. Moller. 1992. Variation in mitochondrial translation products in fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beets. *Theor Appl Genet* 85:139-145.
- Hancock, C. N., K. Kondo, B. Beecher, and B. McClure. 2003. The S-locus and unilateral incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London B* 358:1133-1140.
- Hanson, M. R., and S. Bentolila. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl 1:S154-S169.
- Henikoff, S., and L. Comai. 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu Rev Plant Biol* 54:375-401.
- Hjerdin-Panagopoulos, A., T. Kraft, I. Rading, S. Tuveesson, and N.-O. Nilsson. 2002. Three QTL regions for restoration of Owen CMS in sugar beet. *Crop Sci* 42:540-544.
- Ingvarsson, P. K., and D. R. Taylor. 2002. Genealogical evidence for epidemics of selfish genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11265-11269.
- Kazama, T., and K. Toriyama. 2003. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Letters* 2003:99-102.
- Koizuka, N., R. Imai, H. Fujimoto, T. Hayakawa, Y. Kimura, J. Kohno-Murase, T. Sakai, S. Kawasaki, and J. Imamura. 2003. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J* 34:407-415.
- Komori, T., S. Ohta, N. Murai, Y. Takakura, Y. Kuraya, S. Suzuki, Y. Hiei, H. Imaseki, and N. Nitta. 2004. Map-based cloning of a fertility restorer gene, Rf-1, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J* 37:315-325.
- Kubo, T., S. Nishizawa, and T. Mikami. 1999. Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol Gen Genet* 262:283-290.

- Lange, W., and T. S. M. de Bock. 1989. The diploidised meiosis of tetraploid *Beta macrocarpa* and its possible application in breeding sugar beet. *Plant Breeding* 103:196-206.
- Laporte, V. 1998. Structure spatiale du polymorphisme cytonucléaire et de la restauration de la fertilité mâle chez une espèce gynodioïque: études théoriques et expérimentales sur *Beta vulgaris* ssp *maritima*. Paris 6.
- Laporte, V., D. Merdinoglu, P. Saumitou-Laprade, G. Butterlin, P. Vernet, and J. Cuguen. 1998. Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Theor Appl Genet* 96:989-996.
- Laporte, V., J. Cuguen, and D. Couvet. 2000. Effective population sizes for cytoplasmic and nuclear genes in a gynodioecious species: The role of the sex determination system. *Genetics* 154:447-458.
- Laporte, V., F. Viard, G. Béna, M. Valero, and J. Cuguen. 2001. The spatial structure of sexual and cytonuclear polymorphism in the gynodioecious *Beta vulgaris* ssp *maritima*: I/ at a local scale. *Genetics* 157:1699-1710.
- Larsen, K. 1977. Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. I. Four gametophytic, complementary S-loci in sugar beet. *Hereditas* 85:227-248.
- Li, X.-Q., M. Jean, B. S. Landry, and G. G. Brown. 1998. Restorer genes for different forms of Brassica cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10032-10037.
- Liu, F., X. Cui, H. T. Horner, H. Weiner, and P. S. Schnable. 2001. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13:1063-1078.
- Lorenz, M., A. Weihe, and T. Börner. 1997. Cloning and sequencing of RAPD fragments amplified from mitochondrial DNA of male-sterile and male-fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris*L.). *Theor Appl Genet* 94:273-278.
- Lurin, C., C. Andrés, S. Aubourg, M. Bellaoui, F. Bitton, B. C, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, A. Lecharny, M. Le Ret, L. Martin-Magniette, H. Mireau, N. Peeters, J.-P. Renou, B. Szurek, L. Taconnat, and I. Small. 2004. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat (PPR) proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089-2103.
- Maletsky, S. I., and N. J. Weisman. 1978. A population genetics analysis of self- and cross-incompatibility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 52:21-28.
- Manicacci, D. 1993. Evolution et maintien de la gynodioecie: allocation sexuelle et structuration spatiale du polymorphisme nucléo-cytoplasmique. Université de Montpellier 2.
- McCauley, D. E., M. F. Bailey, N. A. Sherman, and M. Z. Darnell. 2005. Evidence for paternal transmission and heteroplasmy in the mitochondrial genome of *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Heredity* 95:50-58.
- Michelmore, R. W., I. Paran, and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*

88:9828-9832.

- Murayama, K., T. Yahara, and T. Terachi. 2004. Variation of female frequency and cytoplasmic male-sterility gene frequency among natural gynodioecious populations of wild radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol Ecol* 13:2459-2464.
- Nei, M., X. Gu, and T. Sitnikova. 1997. Evolution by the birth-and -death process in multigene families of the vertebrate immune systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7799-7806.
- Owen, F. V. 1942. inheritance of cross- and self-sterility and self-fertility in *Beta vulgaris*. *J Agric Res* 64:679-698.
- Owen, F. V. 1945. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beet. *J Agric Res* 71:421-440.
- Pillen, K., G. Steinrücken, G. Wricke, R. Hermann, and C. Jung. 1992. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet* 84:129-135.
- Porcher, E. 2005. Loss of gametophytic self-incompatibility with evolution of inbreeding depression. *Evolution* 59:46-60.
- Rae, S. J., C. Aldam, I. Dominguez, M. Hoebrechts, S. R. Barnes, and K. J. Edwards. 2000. Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp). *Theor Appl Genet* 100:1240-1248.
- Richards, A. 1997. *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, London.
- Saumitou-Laprade, P., G. J. A. Rouwendal, J. Cuguen, F. A. Krens, and G. Michaelis. 1993a. Different CMS sources found in *Beta vulgaris* ssp *maritima*: mitochondria variability in wild population revealed by a rapid screening procedure. *Theor Appl Genet* 85:529-535.
- Saumitou-Laprade, P., F. Maggouta, J. Cuguen, R. Wattier, H. Van Dijk, P. Vernet, and G. Michaelis. 1993b. Cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* and the nucleocytoplasmic conflict. Pp. 249-258 in A. Brennicke and U. Kück, eds. *Plant Mitochondria with Emphasis on RNA Editing and Cytoplasmic Male Sterility*. VCH, Weinheim.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cuguen, and P. Vernet. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trends Ecol Evol* 9:431-435.
- Schnable, P. S., and R. P. Wise. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* 3:175-180.
- Schneider, K., D. C. Borchardt, R. Schäfer-Pregl, N. Nagl, C. Glass, A. Jeppsson, C. Gebhardt, and F. Salamini. 1999. PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol Gen Genet* 262:515-524.
- Schneider, K., R. Schäfer-Pregl, D. C. Borchardt, and F. Salamini. 2002. Mapping QTLs for sucrose content, yield and quality in a sugar beet population fingerprinted by EST-related markers. *Theor Appl Genet* 104:1107-1113.
- Schondelmaier, J., and C. Jung. 1997. Chromosomal assignment of the nine linkage groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. *Theor Appl Genet* 95:590-596.
- Shykoff, J. A., S. O. Kolokotronis, C. L. Collin, and M. Lopez-Villavicencio. 2003. Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants: a meta-analysis. *Oecologia* 135:1-9.

- Singh, M., N. Hamel, R. Menassa, X. Q. Li, B. Young, M. Jean, B. S. Landry, and G. G. Brown. 1996. Nuclear genes associated with a single Brassica CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143:505-516.
- Small, I. D., and N. Peeters. 2000. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25:46-47.
- Städler, T., and L. F. Delph. 2002. Ancient mitochondrial haplotypes and evidence for intragenic recombination in a gynodioecious plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11730-11735.
- Stone, J. L. 2002. Molecular mechanisms underlying the breakdown of gametophytic self-incompatibility. *Q Rev Biol* 77:17-32.
- Thompson, J. D., and M. Tarayre. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution* 54:1510-1520.
- Touzet, P. 2002. Is rf2 a restorer gene of CMS-T in maize? *Trends Plant Sci* 7:434.
- Touzet, P., N. Hueber, A. Bürkholz, S. Barnes, and J. Cuguen. 2004. Genetic analysis of male fertility restoration in wild cytoplasmic male sterility G of beet. *Theor Appl Genet* 109:240-247.
- Touzet, P., and F. Budar. 2004. Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in Cytoplasmic Male Sterility? *Trends Plant Sci* 9:568-570.
- Viard, F. 2001. Structure génétique dans des réseaux de populations subdivisées – Influence de la migration et des systèmes de reproduction. Université des Sciences et Technologies de Lille 1, Lille.
- Viard, F., J.-F. Arnaud, M. Delescluse, and J. Cuguen. 2004. Tracing back seed and pollen flow within the crop-wild *Beta vulgaris* complex: genetic distinctiveness versus hot spots of hybridization over a regional scale. *Mol Ecol* 13:1357-1364.
- Wolfe, K. H., W. H. Li, and P. M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9054-9058.
- Xue, Y. B., S. Collin, D. R. Davies, and C. M. Thomas. 1994. Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpa* loci. *Plant Mol Biol* 25:91-103.
- Yamagishi, H., and T. Terachi. 1996. Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theor Appl Genet* 93:325-332.
- Yamagishi, H., and T. Terachi. 1997. Molecular and biological studies on male-sterility cytoplasm in the Cruciferae. IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant Breeding* 116:323-329.
- Yamagishi, H., and T. Terachi. 2001. Intra-and Inter-specific variations in the mitochondrial gene *orf138* of Ogura-type male sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theor Appl Genet* 103:725-732.
- Yamamoto, M. P., T. Kubo, and T. Mikami. 2005. The 5'-leader sequence of sugar beet

mitochondrial atp6 encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility. *Mol Genet Genomics* 273:342-349.

Yui, R., S. Iketani, T. Mikami, and T. Kubo. 2003. Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit in anther tapetum causes male sterility. *Plant J* 34:57-66.