



**HAL**  
open science

# Analyse et caractérisation du rôle des protéines SPO11-2 du blé tendre impliquées dans l'initiation de la recombinaison méiotique

Fatiha Benyahya

► **To cite this version:**

Fatiha Benyahya. Analyse et caractérisation du rôle des protéines SPO11-2 du blé tendre impliquées dans l'initiation de la recombinaison méiotique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Clermont Auvergne (UCA), Clermont-Ferrand, FRA., 2021. Français. NNT: . tel-04595773

**HAL Id: tel-04595773**

**<https://hal.science/tel-04595773>**

Submitted on 6 Jun 2024

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

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

Public Domain



**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE  
LA VIE ET DE LA SANTE – AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT**

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

**Spécialités :**

*Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation*

Soutenue publiquement le **1<sup>er</sup> Octobre 2021**  
devant la commission d'examen par :

**Fatiha BENYAHYA**

## **Analyse et caractérisation du rôle des protéines SPO11-2 du blé tendre impliquées dans l'initiation de la recombinaison méiotique**

**Membres du Jury :**

<b>Dr Anne-Marie CHEVRE</b>	Directrice de Recherche, INRAE – Rennes	Examinatrice
<b>Dr Bernard DE MASSY</b>	Directeur de Recherche, CNRS – Montpellier	Rapporteur
<b>Dr Arnaud DE MUYT</b>	Chargé de Recherche – Institut Curie – Paris	Examinateur
<b>Pr Maria Eugenia GALLEGRO</b>	Professeur, GRéD – Clermont-Ferrand	Examinatrice
<b>Dr Mathilde GRELON</b>	Directrice de Recherche, INRAE – Versailles	Rapporteuse
<b>Dr Pierre SOURDILLE</b>	Directeur de Recherche, INRAE – Clermont-Ferrand	Directeur de Thèse

**Préparée dans l'Unité Mixte de Recherche INRAE/UCA GDEC à CLERMONT-FERRAND dans  
l'équipe Génétique et Recombinaison**

# Remerciements

Ce travail de thèse restera une des meilleures expériences professionnelles que j'ai pu pratiquées. En effet, j'ai eu la chance de voyager à travers des disciplines diverses, de travailler avec des matières et outils riches aussi bien très « high tech » que dérisoires « systèmes D ». J'ai eu une très grande liberté dans la manière de mener et appliquer les expérimentations. J'ai également eu la chance de voyager hors du laboratoire et de voir et discuter « science » avec les plus grands de mon domaine. J'ai été, par ailleurs, très honorée d'avoir pu travailler avec une équipe très compétente, déterminée à réussir coûte que coûte, pluridisciplinaire, perfectionniste et très polyvalente (Bouzid Charef, Benoit Darrier, Marie-Claire Debote, Ludovic Georges, Isabelle Lhommet, Alain Loussert, Robin Michard, Isabelle Nadaud). Chacun des membres a su mettre sa petite graine dans ce projet et a participé à sa maturation et à sa floraison. J'ai, en outre, eu des discussions scientifiques riches et profondes avec les autres membres de mon laboratoire qui ont conduit à des collaborations (Jérôme Salse (Données RNAseq) Jonathan Kitt (Travail de développement d'une méthode pour caractériser les délétions des mutants Renan à partir de la puce 35K), Romain De oliveira (pour son travail sur les sondes FISH à partir des ISBP Insertion-sitebased polymorphism junctions), Hélène Rimbert (pour son implication dans l'article de thèse et pour son aide sur linux au départ), Emmanuelle Bancel et Marielle Merlino (biochimie et idées très fructueuses), Pierre Barret, Philippe Leroy, Caroline Juery, Francis Fabre (analyse protéomique), Séverine Rougeol (en qPCR), Mireille Dardevet (conseils en PCR longs fragments), Cécile Huneau et Margaux Olivier (aide sur R), Mélissa Battache (Réalisation d'icographies sur inkscape), Julie Laugerotte, Jeanne Bazile, Medhi Boulnemour et Kissi N'gou (Script Python). Je tiens également à remercier les personnes des plateformes et extérieurs à l'INRAE pour les supports techniques : Equipe CPCC, la plateforme de génotypage Gentyane et la plateforme de microscopie confocale CLIC (Caroline Vachias et Sophie Dessel).

Je tiens à remercier Olivier Da Inès pour ses conseils et son aide précieuse pour mener à bien ce travail de thèse et pour ses travaux de complémentations hétérologues chez Arabidopsis.

Je remercie les membres de mon comité de thèse qui m'ont prodigué des conseils très pertinents. En particulier Raphaël Mercier pour ses suggestions essentielles sur les mutants.

Je voudrais également remercier Thierry Langin, le directeur du GDEC qui m'a permis de venir travailler à l'INRAE

Je tiens à remercier chaleureusement mon mentor, mon guide et directeur de thèse que je n'ai pas épargné surtout ces derniers temps. Je le remercie tout d'abord de m'avoir accordé sa confiance, d'avoir cru en moi et en mes facultés à relever ce défi. Je le remercie de m'avoir laissé cette grande liberté d'action qui a permis toutes ces avancées. Je le remercie de m'avoir laissé participer à énormément de congrès et conférences qui m'ont ouvert l'esprit sur ce sujet de thèse.

Enfin je vous remercie, vous membres du jury qui allez prendre de votre temps précieux pour avoir un regard de spécialiste critique sur ces études que nous avons conduites sur le blé tendre.



## Résumé

La recombinaison méiotique ou crossing-over (CO) est initiée par des cassures double-brin (CDB) catalysées par le complexe de protéines SPO11. Chez les plantes, il existe deux protéines, SPO11-1 et SPO11-2, fonctionnant sous forme d'un complexe hétérodimérique. Bien que les mécanismes moléculaires des CDB soient de mieux en mieux caractérisés chez les espèces diploïdes, ils restent encore très peu documentés pour les espèces polyploïdes telles que le blé tendre (*Triticum aestivum*). L'objectif de ce travail consistait à étudier la protéine SPO11-2 en observant l'impact de sa mutation sur le comportement méiotique chez le blé. La première étape de ce projet a consisté à développer une méthodologie expérimentale s'appuyant sur le criblage d'une population de mutants d'irradiation et sur le développement des outils (anticorps ZYP1, ASY1, DMC1) permettant de caractériser l'effet de ces mutations à l'échelle génétique, cytologique et de la plante entière. Une collection de mutants pour l'une des trois copies homéologues (AA, BB ou DD), pour deux copies et pour les trois copies a été produite à partir d'une descendance frères/sœurs issue de plantes hétérozygotes pour les trois copies. Les mutants nuls où les trois homéologues du gène *Spo11-2* avaient été mutés, se sont avérés stériles et incapables de former des foyers de recombinaison DMC1. La copie A de *Spo11-2* est naturellement mutée chez le blé tendre et les plantes doublement mutées pour les copies B et D mais sauvages pour la copie A sont stériles. Cependant, elles possèdent encore une activité résiduelle et sont capables de faire quelques chiasmas et quelques foyers DMC1. Néanmoins, cette activité ne suffit pas à rétablir l'activité de la protéine en complémentation hétérologue chez *Arabidopsis*. Enfin, une analyse visant à comprendre le processus évolutif du complexe SPO11 chez le blé a été réalisée en focalisant notre approche sur les blés progéniteurs. L'utilisation combinée d'espèces diploïdes, tétraploïdes ainsi que différents cultivars hexaploïdes a permis une approche descriptive *in silico* et *in vivo* de ces gènes démontrant que la mutation de l'homéologue A du gène *Spo11-2* était déjà présente chez le progéniteur tétraploïde et que les blés suivaient la même dynamique de division méiotique quel que soit leur degré de ploïdie.

Mots clés : recombinaison ; méiose ; *Triticum aestivum* ; chiasma ; SPO11-2 ; cytogénétique.

## Abstract

Meiotic recombination or crossing-over (CO) is initiated by double strand breaks (DSBs) catalysed by the SPO11 complex. This complex includes two different proteins in plants, SPO11-1 and SPO11-2, forming a heterodimeric complex. Molecular mechanisms of DSB formation are well described in diploid species, but these mechanisms remain poorly documented in polyploid species such as bread wheat (*Triticum aestivum*). Here, we evaluated SPO11-2 protein of bread wheat and we studied how its mutation affects meiotic behaviour, using a set of antibodies (ZYP1, ASY1, DMC1). In a first step, we developed a collection of single, double and triple sister-mutants for each homoeologous copy of Spo11-2, derived from heterozygous irradiated-mutant plants. The triple mutant where the three homoeologous A, B and D copies were knocked-out, were shown to be fully sterile and unable to form DMC1 foci. The A-copy is mutated in bread wheat and double-mutants where the B and D copies are extinct are also sterile. However, cytogenetic analyses of these mutants showed that a few chiasmata can form as well as a few DMC1 foci suggesting a residual activity of the A-copy, albeit not sufficient to restore fertility. Moreover, a complementation assay conducted in *Arabidopsis* using the wild-type A-copy did not succeed in restoring *Atspo11-2* fertility confirming that this copy is not functional. Finally, we performed a cytogenetic analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat-relatives to evaluate the evolution of Spo11-2 among the Triticeae. Detailed *in silico* and *in vivo* study of Spo11-2 revealed that the mutation of the homoeologous A-copy was already present in tetraploid species suggesting that mutation occurred after the first polyploidy event. Moreover, we evaluated the number of DMC1 foci in diploid, tetraploid and hexaploid species and we showed that this number followed a linear number according the ploidy level of the species. We also observed that the dynamic of the meiotic division was similar whatever the ploidy level is, as well.

**Keywords:** recombination; meiosis; *Triticum aestivum*; chiasma; SPO11-2; cytogenetics.

# Table des matières

<b>1 Introduction générale</b>	<b>12</b>
<b>2 Synthèse bibliographique</b>	<b>14</b>
2.1 Méiose	14
2.1.1 Historique	14
2.1.2 Processus de la méiose en cytologie	15
2.1.3 Dynamique de la méiose	27
2.2 Recombinaison méiotique	30
2.2.1 Définition	30
2.2.2 Aspects moléculaires de la recombinaison	30
2.2.3 Fréquence et distribution des CO	42
2.3 Cassure double brin	46
2.3.1 Historique	46
2.3.2 Le complexe SPO11	46
2.3.3 Autres protéines impliquées dans les CDB	51
2.3.4 Fréquence et distribution des CDB	52
2.4 Objectifs de la thèse	53
2.4.1 Rappel du contexte	53
2.4.2 Etude de la recombinaison chez le blé	56
2.4.3 Questions scientifiques	59
<b>3 Matériels et Méthodes</b>	<b>60</b>
3.1 Matériel végétal	60
3.1.1 Population de mutants	60
3.1.2 Progéniteurs du blé	61
3.2 Bioanalyse des données	61
3.2.1 Caractérisation des séquences du complexe SPO11	61
3.2.2 Etude des gènes méiotiques chez les <i>Triticeae</i>	63
3.2.3 Analyse des mutants d'irradiation	64
3.3 Analyses cytogénétiques	67
3.3.1 Repérage des stades méiotiques et traitement des anthères	67
3.3.2 Immuno-marquage et exploitation des lames	69
3.4 Analyses moléculaires	71
3.4.1 Extraction d'ADN	71
3.4.2 Dessin des amorces spécifiques	71
3.4.3 Puce FLUIDIGM	73
3.4.4 Complémentation hétérologue du gene Ta-spo112-7A-CS	74

<b>4 Résultats .....</b>	<b>75</b>
4.1 Développements technologiques.....	75
4.1.1 Production du matériel végétal .....	75
4.1.2 Développement des immunomarquages.....	91
4.2 Analyse du comportement méiotique de mutants <i>spo11-2</i> .....	95
4.2.1 Analyse cytogénétiques .....	95
4.2.2 Analyse d'expression des gènes méiotiques .....	112
4.3 Comportement méiotique d'espèces apparentées .....	140
4.3.1 Analyse évolutive de trois protéines du complexe de CDB .....	140
4.3.2 Analyse d'expression des trois protéines du complexe .....	151
4.3.3 Etablissement d'un atlas méiotique .....	155
4.3.4 Observation des foyers DMC1 .....	158
<b>5 Discussion et perspectives .....</b>	<b>161</b>
5.1 Partie 1 : Comment étudier la méiose chez une espèce hexaploïde ?.....	161
5.1.1 La génétique directe <i>versus</i> la génétique inverse.....	161
5.1.2 La mutagenèse aléatoire <i>versus</i> la mutagenèse dirigée .....	163
5.2 Partie 2 : Quel est le rôle des protéines <i>Spo11-2</i> chez le blé cv Renan ? .....	164
5.2.1 Inconvénients de la population EMS .....	165
5.2.2 Réflexions au sujet des résultats obtenus sur les mutants <i>spo11-2</i> .....	169
5.3 Partie 3 : Comment les gènes du complexe <i>Spo11</i> ont évolués chez le blé ? .....	182
5.3.1 Bioanalyse du complexe <i>SPO11</i> .....	183
5.3.2 Description de la méiose chez les progéniteurs du blé tendre.....	184
<b>6 Conclusions.....</b>	<b>186</b>
<b>7 Références bibliographiques.....</b>	<b>188</b>
<b>8 Annexes .....</b>	<b>214</b>
8.1 Résultats complémentaires .....	214
8.1.1 BLASTP des gènes méiotiques .....	214
8.1.2 Comparaisons des séquences du complexe <i>SPO11</i> chez les poacées .....	242
8.1.3 Modes opératoires développés en thèse.....	251

## FIGURES

Figure 1 Une population et des besoins qui augmentent. ....	11
Figure 2 Evolution des espèces Triticeae à partir des ancêtres communs.....	13
Figure 3 La reproduction sexuée des plantes à fleurs. ....	14
Figure 4 Etapes de la méiose.....	15
Figure 5 Etapes de la prophase I .....	16
Figure 6 Structure et organisation des chromosomes méiotiques en leptotène .....	17
Figure 7 Immunomarquage ASY1 d'un noyau d'At .....	18
Figure 8 Structure de la chromatine et des nucléosomes.....	18
Figure 9 Immunomarquage $\gamma$ H2AX de noyaux d'At au zygotène et pachytène.....	19
Figure 10 Immunomarquage RAD51 et DMC1 de noyaux d'At au milieu du leptotène. ....	19
Figure 11 Organisation du CS sur des chromosomes homologues .....	20
Figure 12 Co-immunomarquage de ASY1 et ZYP1 dans des noyaux en zygotène d'At .....	21
Figure 13 Immunomarquage et dynamique spatiale du CS chez At .....	22
Figure 14 Immunomarquage de HEI10 sur des noyaux d'At aux stades zygotène à diplotène .....	23
Figure 15 Immunomarquage des marqueurs des CO : MLH1 et HEI10 sur des noyaux d'At en diplotène .....	24
Figure 16 Immunomarquage de la protéine MLH1 dans des noyaux d'AT au stade diacinèse.....	24
Figure 17 Schéma de deux chromosomes homologues en metaphase I reliés par les cohésines .....	25
Figure 18 Métaphase I de noyau de méiocyte d'At .....	26
Figure 19 Anaphase I de noyau de méiocyte d'At .....	26
Figure 20 Méioses II de noyaux d'At marqués au DAPI.....	27
Figure 21 Configurations des chromosomes en méiose .....	28
Figure 22 Modèles historiques d'Initiation de la recombinaison homologue.....	31
Figure 23 Les principales voies de réparation des CDB .....	32
Figure 24 Régulation et mode d'invasion des recombinases .....	34
Figure 25 Limitation de la longueur du nucléofilament DMC1 .....	35
Figure 26 L'endonucléase Yen1 de secours finement régulée en méiose .....	38
Figure 27 Différents rôles de Top3 Rmi1 dans la redirection vers les NCO.....	39
Figure 28 Voies des protéines anti CO et les co-facteurs associés.....	41
Figure 29 Fréquence de recombinaison du chromosome 3B de blé tendre .....	44
Figure 30 Rôle des TOPI au niveau de l'ADN .....	47
Figure 31 Structure 3D de la topoisomérase AtMTPVIB.....	49
Figure 32 Géographie du Croissant fertile .....	53
Figure 33 Histoire évolutive simplifiée du blé tendre .....	54
Figure 34 Caryotype du blé tendre (source ) .....	56
Figure 35 Photo de la puce Axiom™ BreedWheat 35K .....	64
Figure 36 Sorties de puce Axiom .....	65
Figure 37 Pipeline et fichiers Axiom .....	65
Figure 38 Calcul du log de r .....	66
Figure 39 Package de segmentation .....	66
Figure 40 Photo d'un épi immature de blé tendre Renan.....	67
Figure 41 Schématisation d'un épi de blé .....	67
Figure 42 Anthères synchrones chez le blé tendre .....	67
Figure 43 Méthodologie pour dessiner les amorces .....	71
Figure 44 Schématisation de la puce Fluidigm .....	73
Figure 45 Programme PCR de la puce Fluidigm .....	74
Figure 46 Schéma des caryotypes des lignées nulli tétra .....	78
Figure 47 Vérification de l'absence du gène spo11-2 .....	79
Figure 48 Schéma de la méthode d'obtention des mutants .....	79
Figure 49 Efficacité d'amplification des amorces de qPCR .....	81
Figure 50 Schéma de la valeur du ct seuil .....	81
Figure 51 Positions des amorces spo11-2 utilisées .....	82
Figure 52 Génotypage des mutants spo11-2 .....	83

Figure 53 Variations structurales sur le Chr7A .....	85
Figure 54 Variations structurales sur le Chr7B .....	86
Figure 55 Variations structurales sur le Chr7D .....	86
Figure 56 Absence de larges variations structurales .....	88
Figure 57 Position des délétions sur le chromosome 7 au locus <i>spo11-2</i> .....	90
Figure 58 Alignement des séquences DMC1 et RAD51 .....	93
Figure 59 Peptide DMC1 utilisé en compétition et immunomarquage DMC1 .....	94
Figure 60 Nombres de graines chez les plantes At complémentées.....	112
Figure 61 Synténie et gènes d'initiation.....	120
Figure 62 Synténie et gènes de maturation .....	121
Figure 63 Synténie et gènes de résolution .....	122
Figure 64 Synténie et gènes de résolution suite .....	123
Figure 65 Phylogénie des copies TaSMUS81 .....	126
Figure 66 Isoformes TaMUS81 exprimées .....	127
Figure 67 Heatmap Puce Fluidigm 1 .....	134
Figure 68 Heatmap Puce Fluidigm 2 .....	135
Figure 69 Heatmap-synthétique-initiation .....	136
Figure 70 Heatmap-synthétique-maturation .....	137
Figure 71 Heatmap-synthétique-résolution .....	139
Figure 72 Niveaux de % d'identité pour MTOPVIB selon le génome considéré.....	146
Figure 73 Domaines conservés de la MTOPVIB entre At et le blé tendre .....	147
Figure 74 Phylogénie de la protéine MTOPVIB chez les blés .....	147
Figure 75 Niveaux de % d'identité pour SPO11-1 .....	148
Figure 76 Phylogénie de la protéine SPO11-1 chez les blés .....	149
Figure 77 Niveaux de % d'identité pour SPO11-2 .....	150
Figure 78 Phylogénie de la protéine SPO11-2 chez les blés .....	150
Figure 79 Expression des cDNA MTOPVIB d'anthères .....	151
Figure 80 Expression des cDNA SPO11-2 d'anthères .....	151
Figure 81 Expression des cDNA SPO11-1 d'anthères .....	152
Figure 82 Heatmap Expression Complexe SPO11 .....	153
Figure 83 Expression cDNA du complexe SPO11. Etude des synthétiques. ....	154
Figure 84 Photos d'épis des progéniteurs et leurs graines .....	156
Figure 85 Atlas méiotique des progéniteurs .....	157
Figure 86 Nombre de bivalents chez les progéniteurs .....	158
Figure 87 Marquage des protéines ASY1, ZYP1 et DMC1 chez les progéniteurs .....	159
Figure 88 Résumé schématique des des principaux résultats de l'axe 1 .....	161
Figure 89 Résumé schématique des principaux résultats de l'axe 2.....	164
Figure 90 Position du gène <i>Spo11-1</i> .....	165
Figure 91 Les mutants agronomiques de <i>fancM</i> .....	167
Figure 92 La difficulté d'établir le seuil des foyers en microscopie .....	171
Figure 93 Des foyers MTOPVIB présents chez <i>Atspo11-2/-</i> .....	171
Figure 94 foyers DMC1 détectés chez le lys .....	172
Figure 95 Des foyers difficiles à distinguer même en super-résolution .....	172
Figure 96 Immunomarquage $\gamma$ H2AX sur méiocytes de blé .....	173
Figure 97 Principe du Tunnel assay .....	173
Figure 98 Principe de la voie du Non-mediated-decay .....	174
Figure 99 Diversité d'épissage des gènes <i>Spo11</i> chez différentes espèces. ....	175
Figure 100 Mécanisme d'épissage alternatif du gène <i>spo11</i> murin .....	176
Figure 101 Test du double-hybride de levure Y2H sur le complexe SPO11 .....	177
Figure 102 Test du BiFC sur le complexe SPO11 .....	178
Figure 103 La délétion due au saut d'exon prédit.....	179
Figure 104 Motifs conservés SPO11-1 .....	180
Figure 105 Résumé schématique des principaux résultats de l'axe 3.....	183
Figure 106 Mécanisme du Stop codon readthrough.....	185

# TABLEAUX

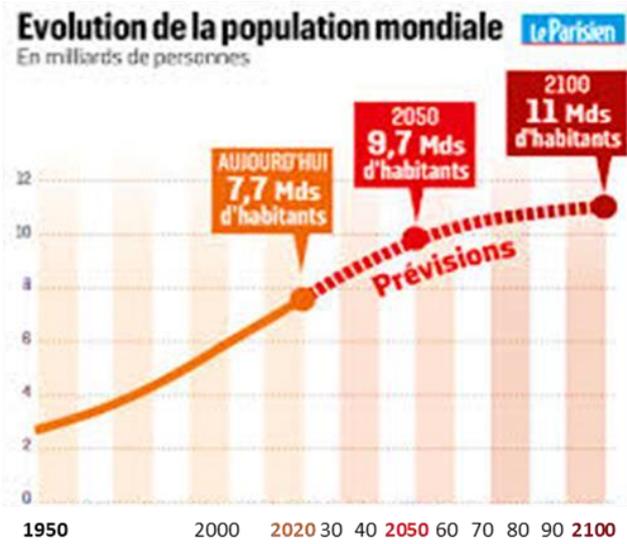
<b>Tableau 1:</b> Liste des études sur les gènes de la méiose disponibles au début du projet.....	58
<b>Tableau 2:</b> Mutants Renan irradiés .....	60
<b>Tableau 3:</b> Liste et génotypes des plantes fournies par le CRB .....	61
<b>Tableau 4:</b> Bases de données utilisées .....	62
<b>Tableau 5:</b> Gènes représentatifs du paysage méiotique .....	63
<b>Tableau 6:</b> Espèces apparentées au blé tendre .....	64
<b>Tableau 7:</b> Amorces compatibles avec la chimie Fluidigm .....	72
<b>Tableau 8:</b> Amorces pour tester l'absence des exons .....	76
<b>Tableau 9:</b> Mutants <i>Spo11-2</i> sélectionnés .....	80
<b>Tableau 10:</b> Amorces qPCR <i>spo11-2</i> .....	80
<b>Tableau 11:</b> Calcul de la VQ à partir des ct et génotypage des individus .....	82
<b>Tableau 12:</b> schématisation des génotypes obtenus en qPCR .....	82
<b>Tableau 13:</b> Tableau de gamètes pour une plante hétérozygote .....	83
<b>Tableau 14:</b> Orthologues blé DMC1 .....	91
<b>Tableau 15:</b> Comparaison DMC1 RAD51 .....	91
<b>Tableau 16:</b> Graines et complémentation hétérologues .....	113
<b>Tableau 17:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID initiation .....	114
<b>Tableau 18:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID : maturation .....	115
<b>Tableau 19:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID résolution .....	115
<b>Tableau 20:</b> Non dupliqués chez le blé tendre .....	116
<b>Tableau 21:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes initiation .....	117
<b>Tableau 22:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes maturation .....	118
<b>Tableau 23:</b> Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes résolution .....	118
<b>Tableau 24:</b> Répartition sur les chromosomes du blé des isoformes de MUS81 .....	124
<b>Tableau 25:</b> Taille des gènes, CDS et protéines des copies de Ta-MUS81 .....	125
<b>Tableau 26:</b> ID des copies les plus proches de la protéine MUS81 d'Arabidopsis .....	125
<b>Tableau 27:</b> Correspondance des noms MUS81 utilisés .....	126
<b>Tableau 28:</b> Séquences Mus81 chez les poacées.....	128
<b>Tableau 29:</b> Nombre moyen d'exons pour les gènes d'initiation .....	131
<b>Tableau 30:</b> Nombre moyen d'exons pour les gènes de maturation.....	131
<b>Tableau 31:</b> Nombre moyen d'exons pour les gènes de résolution .....	132
<b>Tableau 32:</b> Résultats de BLASTP du COMPLEXE SPO11 Poacées.....	141
<b>Tableau 33:</b> Résultats de BLASTP de la protéine MTOPVIB des progéniteurs .....	146
<b>Tableau 34:</b> Résultats de BLASTP de SPO11-1 des progéniteurs .....	148
<b>Tableau 35 :</b> Résultats de BLASTP de SPO11-2 des progéniteurs .....	149
<b>Tableau 36:</b> Liste des mutants EMS <i>spo11-1</i> et <i>spo11-2</i> ciblés sur le site du JIC .....	166
<b>Tableau 37:</b> Liste des mutants EMS <i>fancM</i> commandés sur le site du JIC.....	166
<b>Tableau 38:</b> Domaines de la protéine TaFancM .....	169
<b>Tableau 39:</b> Résumé des interactions du complexe SPO11 d'Arabidopsis .....	179
<b>Tableau 40:</b> Taille des protéines de l'initiation de la méiose des triticées .....	215
<b>Tableau 41:</b> Taille des protéines de la maturation de la méiose des triticées .....	215
<b>Tableau 42:</b> Taille des protéines de la résolution de la méiose des triticées .....	216
<b>Tableau 43:</b> Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans l'initiation de la recombinaison méiotique sur le blé .....	217
<b>Tableau 44:</b> Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans la maturation de la recombinaison méiotique sur le blé .....	224
<b>Tableau 45:</b> Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans la résolution de la recombinaison meiotique sur le blé .....	229
<b>Tableau 46:</b> Comparaison 2 à 2 des séquences <i>spo11-1</i> entre les 13 espèces de poacées.....	237
<b>Tableau 47:</b> Comparaison des séquences MTOPVIB entre les 13 espèces de poacées .....	239
<b>Tableau 48:</b> Comparaison des séquences <i>spo11-2</i> entre les 13 espèces de poacées .....	241

## ABREVIATIONS

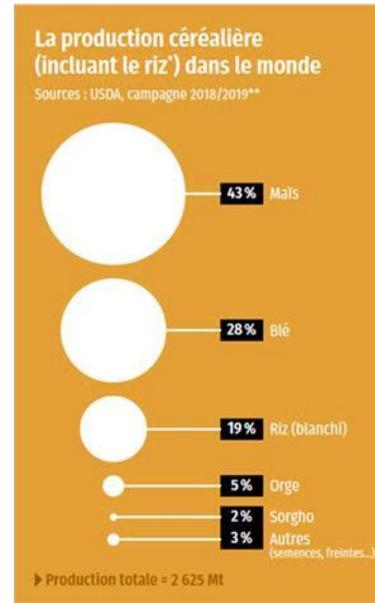
APC/C	Anaphase promoting complex / cyclosome
ARNm	ARN messenger
ASY1	Protein asynaptic
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BLAST	Basic local alignment search tools
Bp	Base Pair
BS	Bloom syndrome
CAP	Catabolite activation protein
CDB	Cassure double-brin
CENH3	Centromeric histone 3
Chr	Chromosome
CO	Crossing-over
CS	Complexe synaptonémal
dJH	Double jonction de Holliday
D-loop	Displacement loop
DMC1	Disrupted Meiotic cDNA 1 protein
DSBR	Double strand break repair
EA	Elément axial
EJC	Exon Junction Complex
EM	Electronic microscopy
EME1	Essential Meiotic structure-specific Endonuclease 1
FanCM	Fanconi anemia group M protein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
IR	Intermédiaire de recombinaison
JH	Jonction de Holliday
KO	Knock-out
MAFFT7	Multiple alignment using fast Fourier transformation
MLH	MutL protein homolog
MSH	MutS protein homolog
MUS81	Crossing-over junction endonuclease
NAS	Non sens associated altered splicing
NCO	Non-crossing-over
NE	Nuclear envelop
NHEJ	Non-homologous end joining
NMD	Non mediated decay
NT	Nullisomiques-tétrasoniques
Os	<i>Oryza sativa</i>
PC	Pairing center
<i>Ph1</i>	Pairing homoeologous 1
PP2A	Phosphatase 2A
PRDM9	PR domain zinc finger protein 9
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RAD51	Radiation sensitive 51
REC8	Meiotic recombination protein 8

RecQ4	ATP-dependent DNA helicase Q4
RMI	RecQ4 mediated instability
RPA	Replication protein A
SCE	Sisters chromatide exchange
SDSA	Synthesis-dependant strand annealing
SEC	Second end capture
SEI	Single end invasion
SGO	Protéine de la famille Shugoshin
SIC	Synapsis initiation complex
SMC	Structural maintenance of chromosome
STR	Complex SGS1-Top3-RMI1
TIR	Terminal inverted repeat
TopoVI	Topoisomerase VI
VQ	Valeur quantitative
WT	Wild type
ZIP1	Zipper protein 1
ZMM	Groupe de protéines Zip/Mer/Msh

1A



1B



1C

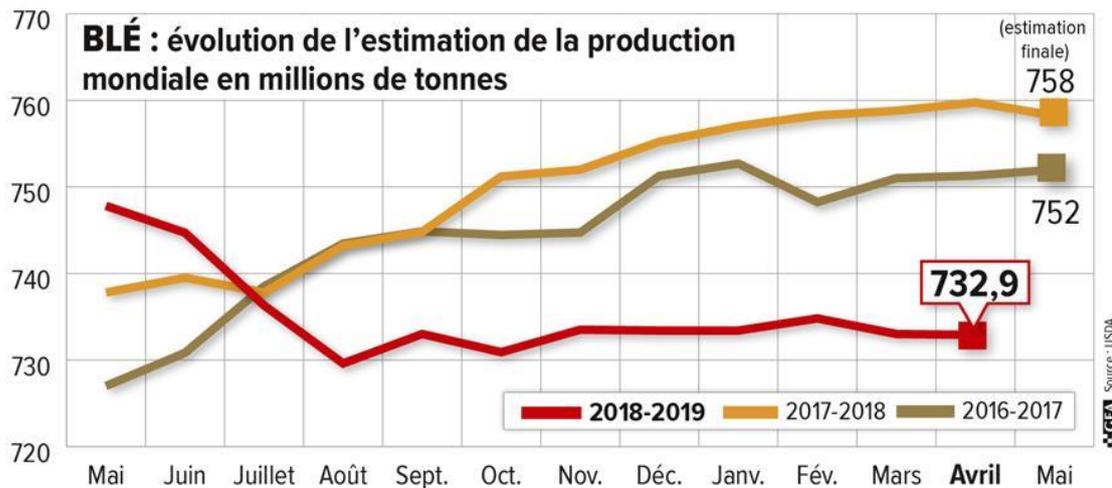


Figure 1 Une population et des besoins qui augmentent.

1A. Evolution de la population mondiale d'ici à 2100 (Le Parisien). 1B. Production céréalière dans le monde (2018-2019). 1C. Evolution et estimation de la production de blé entre 2016 et 2019 (en millions de tonnes) (La France agricole, 2019).

# 1 Introduction générale

Il y a urgence à augmenter et améliorer la production des espèces agronomiques d'intérêt pour faire face au défi de la sécurité alimentaire et la crainte apportée par les changements climatiques et la croissance de la population mondiale qui est supposée atteindre les neuf milliards de personnes d'ici 2050 (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture ; FAO. Figure 1). Il est donc nécessaire d'accélérer le développement de nouveaux idéotypes qui doivent supporter une hausse du rendement, mieux répondre aux stress biotiques et abiotiques (résistances aux maladies, sécheresse, stress salin...), avoir une meilleure qualité nutritionnelle de même qu'une plus grande flexibilité dans la variété de leurs utilisations, en particulier industrielles pour répondre aux besoins croissants en termes de plastiques biodégradables, de bio-fuel, etc... Dans le même temps, il va falloir réduire l'empreinte environnementale de la production des cultures, c'est-à-dire utiliser moins d'eau, moins d'énergie fossile, moins d'engrais, moins de fongicides, de pesticides... ce qui est également crucial dans la mesure où les ressources sont limitées. D'autre part, la sélection de variétés modernes a conduit à un déclin progressif de la diversité génétique (Gur and Zamir, 2004) qu'il convient de réenrichir pour créer de nouvelles variétés innovantes et performantes dans des conditions d'agriculture durable.

Cette observation est particulièrement vraie chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), qui est la 2<sup>ème</sup> espèce la plus cultivée au monde et qui apporte à elle-seule 20% des calories consommées par l'être Humain selon l'Organisation des Nations unies (ONU). Les rendements stagnent depuis plus de 20 ans (Figure 1) alors qu'il faudrait une hausse annuelle de 2% jusqu'en 2050 pour répondre à la demande mondiale. Une façon de parvenir à revitaliser la diversité génétique consiste à aller puiser dans le vaste réservoir des allèles originaux et performants qui existent chez les variétés exotiques ou ancestrales (populations de pays appelées aussi « landraces ») et chez les espèces cultivées voire sauvages apparentées. Il est reconnu depuis longtemps que ces ressources représentent une riche source de diversité pour améliorer différents caractères tels que les résistances aux maladies, la tolérance aux stress abiotiques, voire le rendement ou le contenu en protéines (Feuillet et al., 2008; Mondal et al., 2016; Wulff and Moscou, 2014).

Les espèces apparentées au blé sont composées d'espèces cultivées (orge, seigle, avoine... Figure 2) et sauvages et elles peuvent être divisées en trois groupes principaux (Feuillet et al., 2008; Qi et al., 2007) :

- Le pool primaire est composé de populations de pays ancestrales, des espèces domestiquées et des espèces sauvages qui se croisent aisément avec le blé tendre. Cela comprend des espèces polyploïdes (par exemple tétraploïdes comme le blé dur *T. turgidum ssp durum* (AABB) ou des espèces apparentées *T. dicoccum*, *T. dicoccoides* ; des espèces hexaploïdes AABBDD *T. aestivum ssp spelta*, *T. aestivum ssp compactum*, *T. aestivum ssp sphaerococcum*) et les espèces diploïdes donneuses des génomes A et D (*T. monococcum ssp urartu*, *ssp monococcum*, *ssp boeoticum* AA ; *Ae. tauschii*, DD).
- Le pool secondaire est composé d'espèces polyploïdes qui partagent au moins un génome homologue avec les types cultivés (par exemple *T. timopheevii*, AAGG ; *Ae. ventricosa*, DDMM), mais aussi les espèces diploïdes de la section *Sitopsis* porteuses du génome S apparenté au génome B du blé (par exemple *Ae. speltoides*, SS).
- Les autres espèces de Triticées qui contiennent des génomes autres que A, B ou D constituent le pool tertiaire (par exemple les genres *Secale* (seigle), RR ; *Hordeum* (orge), HH ; *Agropyron*, PP ; *Thinopyrum*, EE).

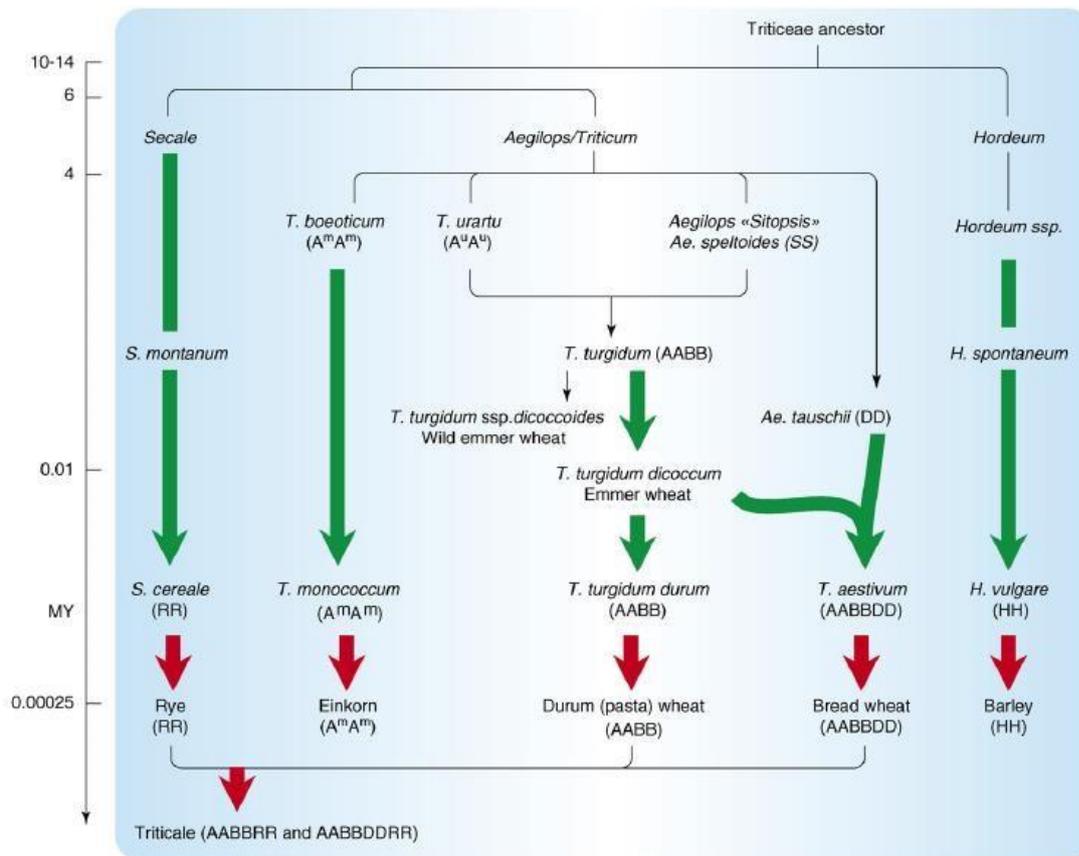


Figure 2 Evolution des espèces Triticeae à partir des ancêtres communs

Une fois que les croisements entre les variétés élites et ces différentes espèces ont été réalisés, l'introgession de nouveaux gènes et/ou le brassage des allèles repose sur la recombinaison méiotique ou « crossing-over », c'est-à-dire un échange réciproque de larges fragments de chromosomes qui se produit durant la gamétogénèse chez les organismes à reproduction sexuée (Osman et al., 2011). L'efficacité de la recombinaison est un déterminant clé qui impacte le nombre de générations et/ou la taille des populations nécessaires pour un brassage optimal. Elle réduit également le phénomène « d'auto-stop » (ou encore « linkage drag », perte de performance due à des gènes délétères introduits en même temps que ceux ayant un effet bénéfique) ce qui est vital pour la diversification des ressources de sélection (appelé « germplasm ») tout en maintenant des caractères sélectionnés pendant des années, voire des siècles, et d'intérêt agronomique (Gur and Zamir, 2004) . La production de nouvelles variétés améliorées repose donc largement sur notre capacité à découvrir et comprendre comment manipuler efficacement la recombinaison méiotique entre chromosomes homologues (voire entre homéologues pour les cas extrêmes) issus de ces espèces plus ou moins éloignées du blé. Or, si les mécanismes qui contrôlent la formation des crossing-over sont relativement bien compris et étudiés chez les espèces modèles telles que la levure ou *Arabidopsis thaliana* (At) pour les plantes, il reste encore beaucoup à découvrir chez le blé, en particulier au regard de son statut polyploïde.

La recombinaison méiotique est initiée par un processus de cassure double brin qui sera ensuite réparée par un échange entre les deux chromosomes homologues conduisant ainsi au phénomène de crossing-over dans certains cas. Nous avons donc choisi de focaliser nos analyses sur une des protéines impliquées dans cette cassure, la protéine SPO11-2. Les objectifs de cette thèse étaient donc d'identifier chez le blé les différentes copies homéologues du gène *Spo11-2*, d'analyser leur fonctionnalité et l'impact de leur mutation sur le déroulement de la méiose et de comprendre comment ce gène a évolué au sein des différents progéniteurs du blé tendre.

## 2 Synthèse bibliographique

### 2.1 Méiose

#### 2.1.1 Historique

La reproduction sexuée des êtres vivants serait apparue il y a environ 1.5 milliards d'années concomitamment avec la mise en place du noyau chez les eucaryotes. C'est l'un des fondements de l'évolution dans la mesure où elle contribue à la fois au brassage de l'information génétique et à l'occurrence de nouvelles combinaisons, voire de nouveaux allèles. Chaque descendant d'un croisement donné est ainsi unique, ce qui multiplie les potentialités d'adaptation aux différents environnements et aux variations des conditions climatiques.

La reproduction sexuée est caractérisée par l'alternance de deux phases, l'une diploïde où chaque cellule possède deux exemplaires homologues de chaque chromosome, l'autre haploïde, le gamète, où un seul stock de chromosomes est présent (Figure 3). Le passage du stade haploïde au stade diploïde se fait par la fécondation, fusion de deux cellules haploïdes. Les cellules diploïdes ainsi reformées peuvent se diviser par le biais de la mitose et donner deux cellules « filles » diploïdes identiques, qui pourront elles aussi se diviser, résultant ainsi en un organisme pluricellulaire dont toutes les composantes ont la même origine et le même patrimoine génétique.

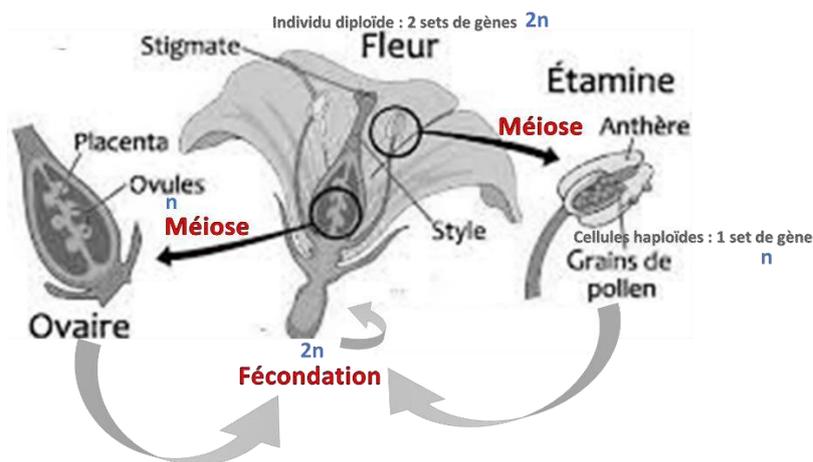


Figure 3 La reproduction sexuée des plantes à fleurs.

Ce mode de division est essentiel pour la reproduction sexuée car elle réduit de moitié le nombre de chromosomes des cellules sexuelles, ce qui permet de conserver le nombre de chromosomes de l'espèce après la fécondation.

En revanche, le passage du stade diploïde au stade haploïde impose la séparation des deux chromosomes homologues de façon équilibrée de manière à ce qu'un seul exemplaire de chaque paire soit maintenu dans chaque cellule fille. Ce processus de division très conservé chez tous les eucaryotes est appelé « méiose » (du grec μείωσις, *meiosis*, qui signifie « réduire ») et ne se produit que dans les cellules germinales. Il est obligatoire pour maintenir la ploïdie des descendants qui sinon, doublerait à chaque génération.

La méiose a été mise en évidence dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Édouard Van Beneden (1846-1910) en travaillant sur la gamétogenèse et l'embryogenèse chez un parasite de l'intestin de Cheval (*Parascaris equorum*). Il découvre les deux phases de la méiose et met en évidence la réduction du nombre de chromosomes lors de la formation des gamètes, puis le rétablissement de la diploïdie au moment de la fécondation. Ce processus permet donc de passer d'une cellule diploïde (2N-2C, 2N représentant le nombre de chromosomes et 2C la quantité d'ADN) avec deux jeux de chromosomes homologues, l'un provenant du père et l'autre de la mère, à une cellule haploïde avec un seul jeu complet de

chromosomes homologues (1N-1C). Par le simple biais du mélange des chromosomes paternels et maternels, le nombre de combinaisons croît rapidement. Ainsi un organisme à deux paires de chromosomes homologues pourra donner quatre combinaisons différentes ( $2^2$ ) pour chacun des deux gamètes mâle et femelle soit  $2^4$  possibilités de descendants lorsque le mâle est différent de la femelle. Chez l'Homme qui possède 23 paires de chromosomes, il y a donc  $2^{23} \times 2^{23}$  soit plus de 70 000 milliards de possibilités pour un seul couple. Chaque individu issu d'un croisement donné est donc unique.

## 2.1.2 Processus de la méiose en cytologie

Dans le but de réduire de moitié le nombre de jeux de chromosome, la méiose est toujours précédée d'une phase de réplication de l'ADN appelée phase pré-méiotique de réplication, ou phase de synthèse (phase S) ou interphase. Les jeux de chromosomes homologues sont alors composés de deux chromatides sœurs identiques ( $2N-4C$ ) reliés par des protéines spécifiques, les cohésines REC8 ; ((Bhatt et al., 1999; Chelysheva et al., 2005; Shao et al., 2011). La méiose est composée de deux grandes divisions (Figure 4).

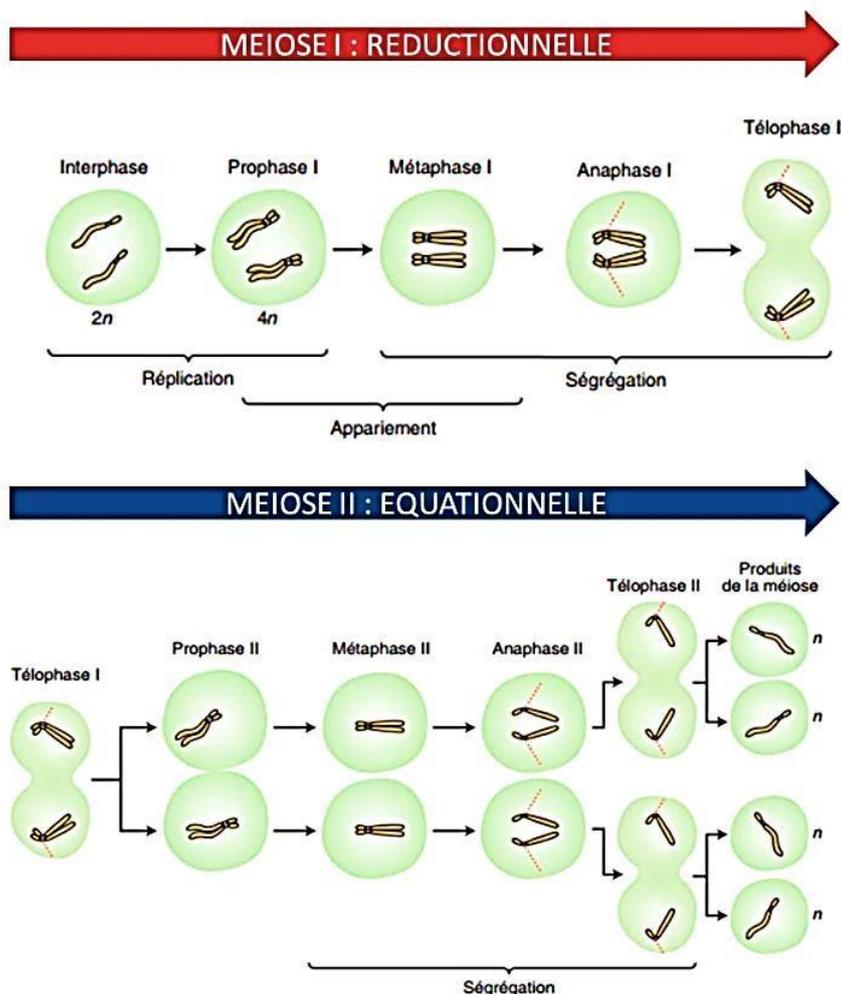


Figure 4 Etapes de la méiose

La première division est précédée d'une phase de doublement des chromosomes ( $4N$ ) que l'on appelle l'interphase. En prophase I les chromosomes homologues vont s'apparier et en métaphase I il vont s'aligner ensemble sur la plaque métaphasique. En anaphase I, ils vont ségréger chacun de part et d'autre de la cellule. La télophase I signe la fin de la division réductionnelle. La méiose équationnelle se comporte comme une mitose classique permettant la production de 4 cellules ( $n$ ) (Thèse de Mouka, 2017).

La première division, ou méiose I, est dite réductionnelle car elle permet de séparer aléatoirement les chromosomes homologues mâles et femelles en deux lots équilibrés, réduisant d'un facteur deux leur nombre au sein de chaque cellule fille. La deuxième division, ou méiose II, est dite équationnelle, car elle résulte de la séparation des deux chromatides sœurs mais donne deux cellules filles avec un nombre équivalent de chromosomes homologues. Le processus permet donc de passer successivement d'une cellule 2N-2C à une cellule 2N-4C, puis deux cellules 1N-2C et finalement quatre cellules 1N-1C haploïdes qui vont se différencier en gamètes.

Chacune des deux étapes (méiose I et méiose II) est elle-même composée de quatre étapes clés : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Grelon, 2016).

## 2.1.2.1 Prophase I

### 2.1.2.1.1 Déroulement général

Durant la prophase I, les chromatides homologues s'apparient parfaitement sur toute leur longueur tout en se condensant. De plus, au niveau de la dynamique du noyau, le nucléole qui est un compartiment non délimité composé de protéines et d'ARN (surtout ribosomiques) et d'ADN hétérochromatique s'efface progressivement tout comme la membrane nucléaire. Le centrosome qui a été dupliqué en phase S est alors composé de quatre centrioles qui vont à nouveau donner deux centrosomes à deux centrioles. Chacun des deux centrosomes migre en direction des pôles opposés de l'autre. C'est à partir de ces structures que vont émaner les microtubules et les protéines motrices (kinésines, dynéines, les polymérases) impliquées dans la formation du fuseau méiotique. Les chromosomes homologues vont se lier physiquement grâce à l'établissement de chiasmats (zone de chevauchement de 2 chromatides d'un chromosome, observable au microscope optique) qui seront résolus en au moins un crossing-over (CO) par paire de chromosomes homologues après la métaphase I (Grelon, 2016). Ces liens sont essentiels car ils permettent la ségrégation équilibrée des chromosomes homologues en anaphase I qui se répartiront de part et d'autre de la cellule. La prophase I est elle-même divisée en cinq étapes au cours desquelles les CO ont lieu : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diakinèse (Figure 5).

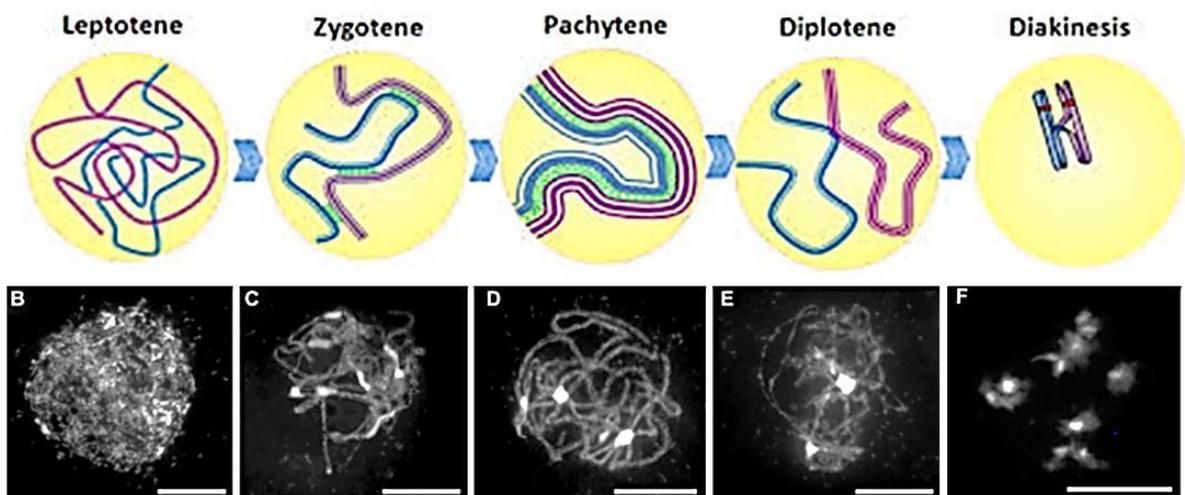


Figure 5 Etapes de la prophase I

Les schémas représentent le déroulé de la prophase I et les différents états de condensation de deux molécules d'ADN parentales en rouge et en bleu avec le stade correspondant au dessus et en dessous, les mêmes étapes mais sur des étalements de noyaux d'Arabidopsis colorés au DAPI. Extrait de Tagliaro-Jahns, 2014 pour les schémas et (Higgins et al., 2014) pour les images de cytologie.

### 2.1.2.1.1.1 Première étape : Le leptotène

Après la réplication, les chromosomes maternels et paternels (homologues), qui comprennent maintenant chacun une paire de chromatides sœurs, se condensent en structures visibles à un stade appelé « leptotène » (fils fins). Les deux chromatides sœurs s'organisent alors en boucles régulières autour d'une structure protéique, l'élément axial (EA) (Figure 6A). Des études par hybridation *in situ* fluorescente (FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization) ou par microscopie haute résolution, montrent que les deux chromosomes homologues commencent à s'aligner (alignement présynaptique c'est-à-dire avant la formation du complexe synaptonémal (CS) voir § 2.1.2.1.1.2) tout en restant relativement éloignés (~300 nm). Les télomères ont également tendance à se fixer à la membrane nucléaire pour ensuite glisser et se regrouper pour former un bouquet télomérique (Figure 6B).

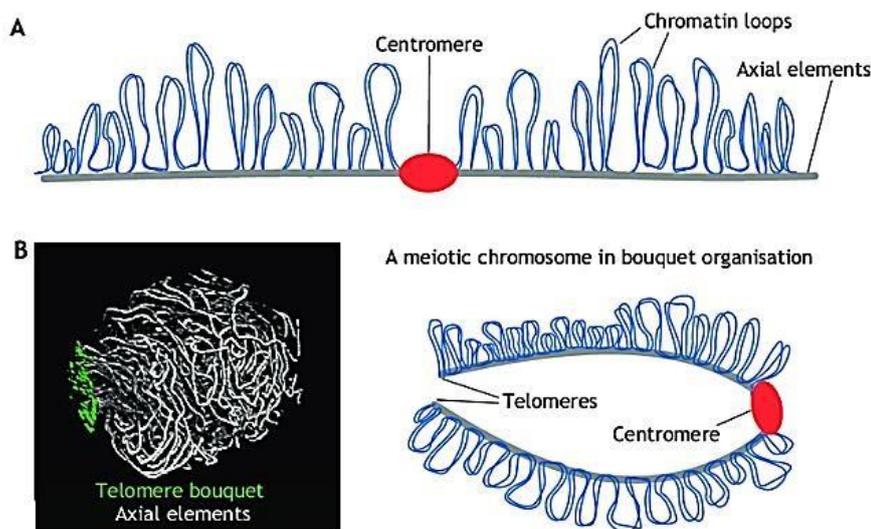


Figure 6 Structure et organisation des chromosomes méiotiques en leptotène

(A) Représentation schématique d'un chromosome méiotique avec la chromatine organisée comme un réseau de boucles (bleu) le long d'un axe protéique (éléments axiaux, gris). Le centromère est représenté en rouge. (B) Disposition des chromosomes à l'intérieur du noyau pendant la méiose précoce (leptotène). A gauche : Image microscopique montrant un noyau leptotène d'orge tétraploïde en 3D, avec des éléments axiaux complètement allongés (gris) et des télomères attachés à une zone restreinte (le bouquet télomérique (vert)) à la périphérie nucléaire (Sepsi and Schwarzacher, 2020).

Cet EA est composé des protéines que l'on retrouve en mitose à savoir des cohésines, condensines et la topoisomérase II qui sont fixés aux chromosomes ainsi que des protéines de remodelage de l'ADN (SWI/SNF (SWitch/Sucrose Non-Fermentable)). Chez *At*, l'élément axial est représenté entre autres par la protéine (Asynaptic 1) ASY1, homologue de la protéine HOP1 de *S. cerevisiae* (Caryl et al., 2000; Schwacha and Kleckner, 1997). Cette protéine est extrêmement conservée chez les eucaryotes pluricellulaires (HIM-3 chez *C. elegans*, PAIR2 chez le riz, HORMAD1 et HORMAD2 chez les mammifères) (Fukuda et al., 2010; Nonomura et al., 2004; Wojtasz et al., 2009; Zetka, 2009; Zetka et al., 1999). D'un point de vue cytogénétique en immunomarquage, le marqueur ASY1 est utilisé pour apprécier la dynamique de la mise en place du CS. Au stade leptotène, cette protéine forme des filaments qui suivent l'ADN et fait partie de l'EA (Figure 7).

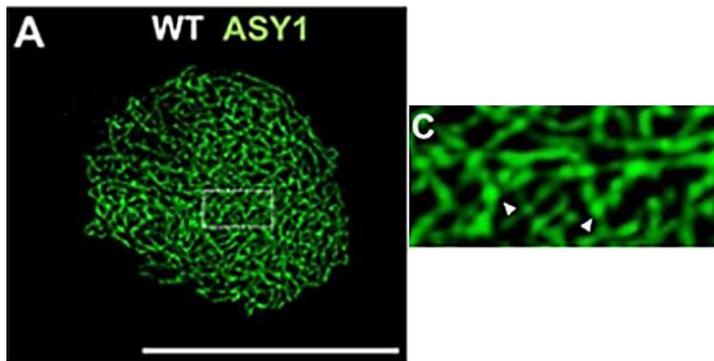


Figure 7 Immunomarkage ASY1 d'un noyau d'At

L'agrandissement permet d'apprécier les zones d'entrecroisement des filaments d'ASY1 (Lambing et al., 2015).

ASY1 possède un domaine HORMAD qui joue un rôle clé dans les interactions protéinesprotéines et que l'on retrouve régulièrement dans les protéines qui fonctionnent par polymérisation et qui sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans le contrôle de certaines étapes de la division cellulaire. Au début de la prophase méiotique, les HORMAD méiotiques se localisent sur toute la longueur des chromosomes *via* un mécanisme de « ceinture de sécurité » et favorisent la formation de cassures de l'ADN par l'endonucléase Spo11 (Rosenberg and Corbett, 2015).

Ces cassures vont être à l'origine de l'initiation de la recombinaison et peuvent être aussi caractérisées par différents marqueurs cytologiques. Un des marqueurs utilisé communément est un anticorps dirigé contre la protéine H2AX phosphorylée ( $\gamma$ H2AX). En effet cette protéine est un variant de l'histone H2A. Les histones sont des protéines qui sont impliquées dans la compaction de l'ADN, ces deux éléments constituent la chromatine. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histone ((H2A, H2B, H3 et H4) X2) et d'ADN. L'histone H1 ou linker permet d'augmenter le degré de compaction de l'ADN. H2AX qui peut représenter jusqu'à 25% des histones H2A au sein d'une cellule (Rogakou et al., 1998), se trouve parsemée au sein de l'ADN. Lors de cassures induites ou subites, la protéine ATM va la phosphoryler sur une sérine en position 139. C'est cette modification post-traductionnelle qui va permettre la signalisation de la cassure aux mécanismes de réparation de la cellule (DDR DNA damage response).

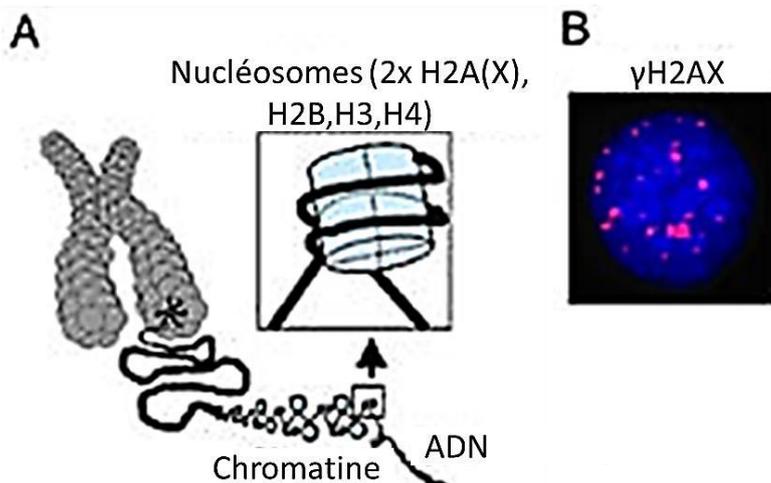


Figure 8 Structure de la chromatine et des nucléosomes

En A, on retrouve un chromosome qui est condensé grâce à ses histones qui sont composées d'un octamère avec H2A, H2B, H3 et H4. En B on retrouve un noyau d'At marqué au DAPI en bleu et immunomarké contre le variant d'histone  $\gamma$ H2AX. D'après (Dickey et al., 2009).

En méiose, au stade leptotène, les signaux  $\gamma$ H2AX apparaissent sous forme de points (foyers) mais sont spécifiquement dénombrés aux stades zygotène et pachytène (Figure 9). Chaque espèce possède un nombre spécifique de ces foyers  $\gamma$ H2AX qui correspondent aux nombres de cassures double-brin (CDB) induites par SPO11. Par exemple dans cet article de Yao et collaborateurs (Yao et al., 2020), traitant des mutants *atm* chez *At*, ils dénombrent chez le témoin 204,07 ( $\pm 10,64$ ) foyers en zygotène et 80,20 ( $\pm 10,31$ ) au stade pachytène. Cette diminution suggère que les CDB sont rapidement prises en charge par les mécanismes de réparation. On retrouve des chiffres semblables dans d'autres études sur *At* (Sanchez-Moran et al., 2007; Su et al., 2017).

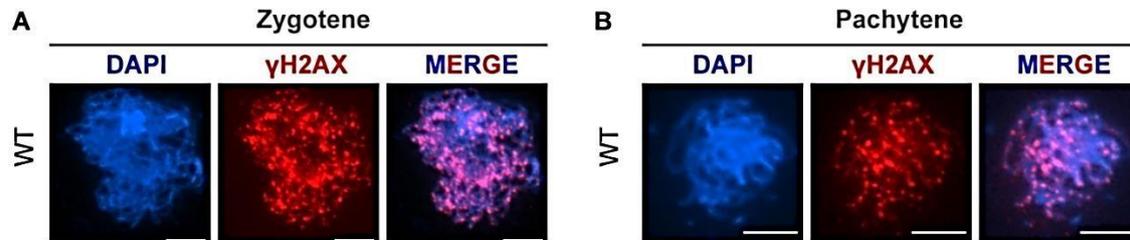


Figure 9 Immunomarquage  $\gamma$ H2AX de noyaux d'*At* au zygotène et pachytène.

(Yao et al., 2020)

D'autres protéines, les recombineses DMC1 (Disrupted meiotic cDNA 1 protein) et RAD51 (Radiation sensitive 51), reflètent le nombre de CDB en méiose. Ces foyers sont plus spécifiques de la recombinaison méiotique contrairement aux  $\gamma$ H2AX qui correspondent aussi bien aux CDB ectopiques dus à des erreurs qu'aux CDB induites par SPO11. En effet dans l'étude de Sanchez-Moran et ses collaborateurs (Sanchez-Moran et al., 2007), ils ont artificiellement induit des CDB en utilisant un agent génotoxique la cisplatine qui bloque les fourches de replication et induit la formation de ces CDB chez les mutants *atspo11-1-3*. Ce mutant n'a plus de marquage  $\gamma$ H2AX et ne fait presque pas de chiasmas. L'ajout de cisplatine (agent simulant les CDB) rétablit partiellement de façon dose dépendante le marquage  $\gamma$ H2AX et un nombre réduit de chiasmas (2,5 chiasmas contre 5).

Les marqueurs utilisant les recombineses sont dénombrés aux stades fin leptotène, début zygotène et sont spécifiques de l'espèce étudiée. La Figure 10 représente le double immunomarquage des protéines ASY1 et RAD51 ou DMC1 (Lambing et al., 2015). On peut voir que le marquage est punctiforme et se localise à proximité de l'axe axial. Cette étude a permis de dénombrer 146 foyers ( $n = 12$ ;  $P = 0.37$ ) pour RAD51 et 173 foyers pour DMC1 ( $n = 12$ ;  $P = 0.56$ ).

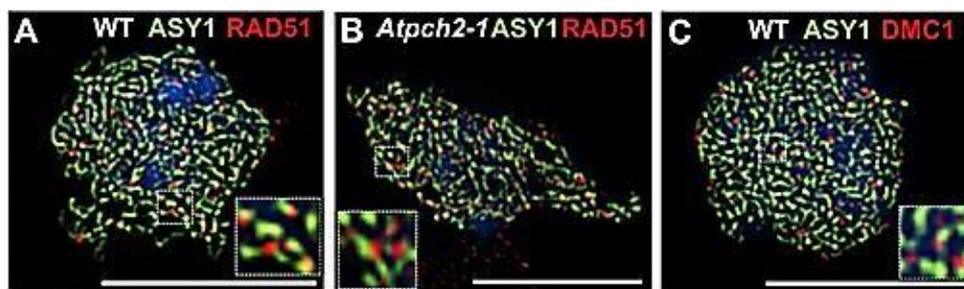


Figure 10 Immunomarquage RAD51 et DMC1 de noyaux d'*At* au milieu du leptotène.

Double localisation d'ASY1 (vert) et de RAD51 (rouge) sur des cellules méiotiques de type sauvage en (A) et *Atpch2-1* en (B) au milieu du leptotène ; ASY1 (vert) et DMC1 (rouge) sur le type sauvage en (C). (Lambing et al., 2015).

D'autres études, pour DMC1, donnent 204 $\pm$ 6 foyers (Duroc et al., 2014) ; 235  $\pm$  84 ( $n = 43$ ) foyers (Chelysheva et al., 2007) ; 176.3  $\pm$  36.1 (Hurel et al., 2018). Pour RAD51, d'autres études obtiennent 187 $\pm$ 24,5 foyers (Su et al., 2017) et une moyenne de 168 foyers (SD = 21.09,  $n = 27$ ) (Yao et al., 2020).

### 2.1.2.1.1.2 Deuxième étape : Le zygotène

Au stade « zygotène » (fils appariés), les chromosomes commencent à s'apparier (juxtaposition physique de segments de chromosomes homologues), initiant la synapse par la mise en place d'une structure protéique (appelée pour cela région centrale du complexe synaptonémal) reliant les éléments axiaux de chaque homologue qui deviennent alors les éléments latéraux de cette nouvelle structure. Malgré des décennies de recherche, la manière dont les chromosomes homologues se retrouvent dans le noyau afin d'initier l'appariement est encore une énigme. Dans la plupart des organismes, la réparation des cassures double-brin (CDB ; (Neale and Keeney, 2006); (San Filippo et al., 2008) introduites au leptotène par le complexe SPO11 (Keeney, 2001a), semble initier l'action de protéines impliquées dans la recherche d'homologie. Ceci est confirmé par des observations au microscope électronique, où les homologues apparaissent ainsi reliés en plusieurs points par la région centrale du CS (Figure 11).

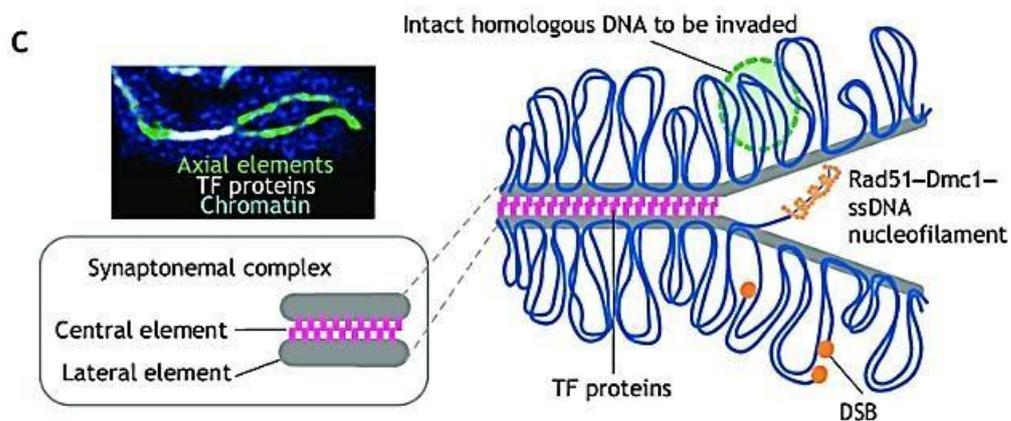


Figure 11 Organisation du CS sur des chromosomes homologues

A gauche : Image microscopique, montrant deux éléments axiaux parallèles (vert) avec de la chromatine non synapsée (bleu) les entourant. Les éléments axiaux sont partiellement connectés par les protéines des filaments transversaux (TF) du complexe synaptonémal (blanc). A droite : Schéma, montrant un réseau de boucles de chromatine (bleu) le long des éléments axiaux (gris) du complexe synaptonémal qui est progressivement connecté par les protéines TF (violet) qui forment l'élément central du complexe synaptonémal (Sepsi and Schwarzacher, 2020).

L'élément principal constituant la région centrale du CS chez les végétaux est la protéine ZYP1 (Osman et al., 2006).

Il en existe deux copies (ZYP1a et ZYP1b) chez *Arabidopsis* mais les deux gènes ont une fonction redondante (Osman et al., 2006). Cette protéine est orthologue aux protéines SYCP1/SCP1/SYN1 des mammifères (Dobson et al., 1994; Heyting et al., 1989; Meuwissen et al., 1992), ZIP1 de la levure (Tung and Roeder, 1998), SYP1 de *C. elegans* (MacQueen et al., 2002; Schild-Prüfert et al., 2011) ou encore c(3)G de la drosophile (Page and Hawley, 2001). Si leur séquence nucléique et protéique est peu conservée (20% d'homologie), toutes ces protéines partagent la même structure en hélice-hélice (coiled-coil) qui sépare les deux extrémités globulaires de la protéine (Higgins et al., 2005; Page and Hawley, 2001; Smolikov et al., 2009; Sym et al., 1993; Zetka et al., 1999). Cette protéine est particulièrement utilisée pour suivre la mise en place du CS chez les mutants de tous les gènes méiotiques (Phillips et al., 2012).

Comme on peut le voir sur le schéma (Figure 11 à droite), le CS est une structure tripartite composé des éléments centraux (Filaments transverse TF) et des éléments latéraux nommés axiaux en leptotène. Les boucles d'ADN des deux chromosomes homologues vont ainsi être reliés *via* le CS à la manière d'une fermeture éclair. Cette structure va servir de plate-forme protéique qui va accueillir les protéines impliquées dans la prise en charge des CDB (RAD51, DMC1...).

Au stade zygotène, le signal de la protéine ZYP1 apparaît à différents endroits sur la chromatine sous forme de petits fils à partir de centres d'initiation. C'est à partir de ces des sites d'initiation, le CS commence à s'étendre le long des chromosomes pour progresser et former la synapse (Figure 12).

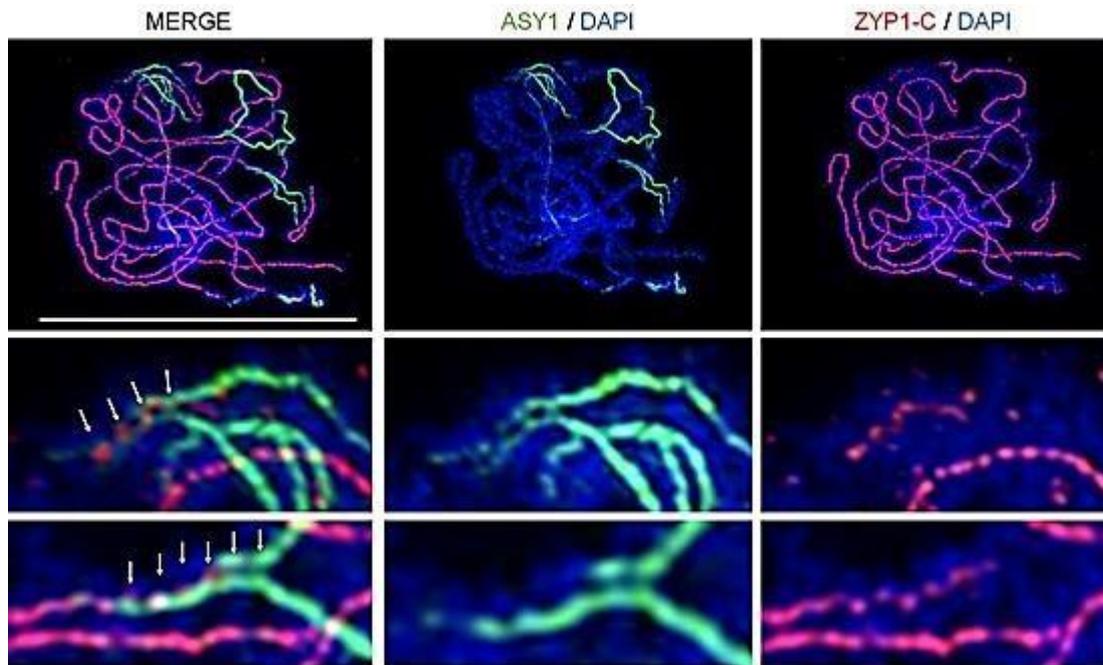


Figure 12 Co-immunomarquage de ASY1 et ZYP1 dans des noyaux en zygotène d'At

Coimmunofluorescence de ASY1 et de l'extrémité C de ZYP1 sur un noyau de zygotène tardif de type sauvage d'At par microscopie à illumination structurée. Les images montrent la dynamique du déchargement de la protéine axiale ASY1 et du chargement de la protéine ZYP1 au niveau des synapses. Les encarts et les flèches blanches mettent en évidence la localisation au niveau des ponts axiaux. (Barre d'échelle, 10  $\mu$ m.) (France et al., 2021).

L'agrandissement nous permet de voir comment la protéine ZYP1 joue le rôle de structure en échelle en reliant la protéine ASY1 de l'élément latéral. Compte-tenu des observations sur les interactions de ZYP1 avec l'élément latéral et son implication dans la formation de l'élément central, il semble que ZYP1 aurait la capacité de former un homo-dimère via une interaction entre les parties N-ter et la zone hélice-hélice des deux entités, les parties C-ter restant attachées aux éléments latéraux de chacun des deux chromosomes homologues (Sym et al., 1993; Tung and Roeder, 1998).

### 2.1.2.1.1.3 Troisième étape : Le pachytène

Au stade « pachytène » (fils épais), le complexe synaptonémal termine sa polymérisation complète. Chaque paire d'homologues est alors séparée par une distance inférieure à 200 nm et est sous forme de bivalents (Higgins et al., 2005). Le complexe synaptonémal apparaît ainsi comme la structure caractéristique du pachytène. Sur ces images en Figure 13, les auteurs ont utilisé la microscopie à déplétion par émission stimulée (STED) et des anticorps dirigés contre la cohésine REC8, qui est un composant de l'élément latéral, et deux anticorps dirigés contre deux parties différentes de ZYP1A/B pour analyser la disposition du CS chez At.

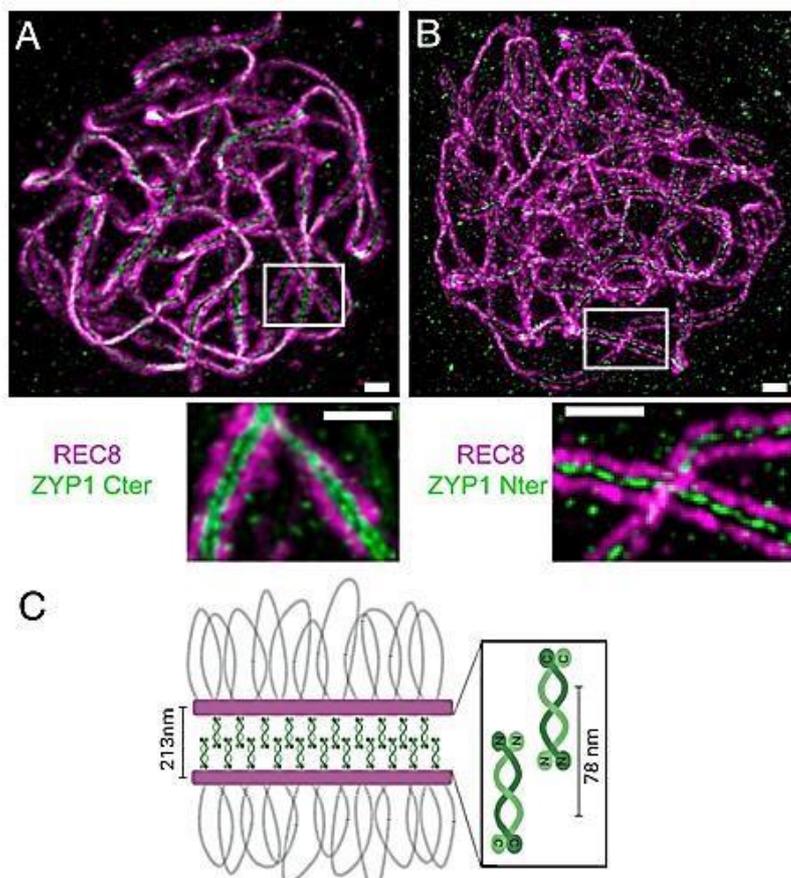


Figure 13 Immunomarquage et dynamique spatiale du CS chez At

Immunolocalisation des terminaisons C et N de ZYP1 sur les méiocytes mâles d'At. Un double immunomarquage a été réalisé contre REC8 (Axe latéral ; violet) et ZYP1 (vert). L'anticorps ZYP1 a été dirigé contre l'extrémité carboxyle en (A) ou l'extrémité N en (B) de la protéine. Les images ont été acquises par microscopie STED. La projection d'intensité maximale est montrée. (Barre d'échelle, 0,5  $\mu$ m.) en (C) Représentation schématique de l'organisation du SC (Capilla-Pérez et al., 2021).

Au stade pachytène, REC8 forme deux lignes parallèles séparées par une distance de  $213 \pm 17$  nm (moyenne  $\pm$  SD, mesurée entre les pics de signal, Figure 13). L'immunomarquage avec un anticorps dirigé contre les acides aminés 422 à 845 en C-terminal (longueur totale = 871 aa) de ZYP1A et qui reconnaît à la fois ZYP1A et ZYP1B a révélé deux lignes parallèles séparées par une distance de  $78 \pm 8$  nm entre les lignes REC8 (Figure 13A). En revanche, la localisation de ZYP1 avec un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale (acides aminés 34 à 45) de ZYP1A/B a révélé une seule ligne au milieu des deux signaux REC8 (Figure 13B). Cela montre que l'organisation générale du filament transverse est conservée chez les plantes, avec l'extrémité C-terminale orientée vers les éléments latéraux et l'extrémité N-terminale située dans la région centrale (Figure 13C). Bien que cette étude ne permette pas de savoir si la dimerisation des parties N-terminale implique une homo ou une hétérodimerisation des protéines ZYP1A et ZYP1B, elle a permis d'apprécier l'ultrastructure précise en fermeture éclair du CS. Lorsque l'appariement est totalement terminé, les chromosomes se condensent encore plus. Le stade pachytène se finit lorsque les chromosomes homologues commencent à se séparer.

#### 2.1.2.1.1.4 Quatrième étape : Le diplotène

La séparation partielle des deux chromosomes homologues initie le stade « diplotène » (deux fils). Le CS se dépolymérise et les chromosomes semblent être partiellement décompactés. Ce stade est parfois appelé « stade diffus » en référence à l'aspect moins dense des chromosomes par rapport

aux stades pachytène et diacinèse. Les chromosomes homologues restent toutefois associés par des connexions locales discrètes entre les homologues appelés chiasmas ou nodules tardifs qui ne deviennent visibles que plus tard, en particulier au milieu du diplotène. Les nodules précoces eux sont désignés dès le leptotène et peuvent être ciblés par les protéines ZMM (Zip1-4/Mer3/Msh4-5), en particulier HEI10 (Enhancer of cell invasion 10) qui est l'orthologue de Zip3 (Zipper3). Dans l'étude de Lambing et collaborateurs (Lambing et al., 2015), il est reporté 166 foyers HEI10 ( $n = 10$ ;  $P = 0.81$ ). L'étude ci-dessous, en Figure 14, évoque une centaine de foyers aux stades précoces en leptotène. Comme on peut le voir dans la figure ci-dessous aux stades précoces (zygotène, pachytène), on dénombre une moyenne de 45 foyers et aux stades tardifs (pachytène tardif ou diplotène), une dizaine de foyers.

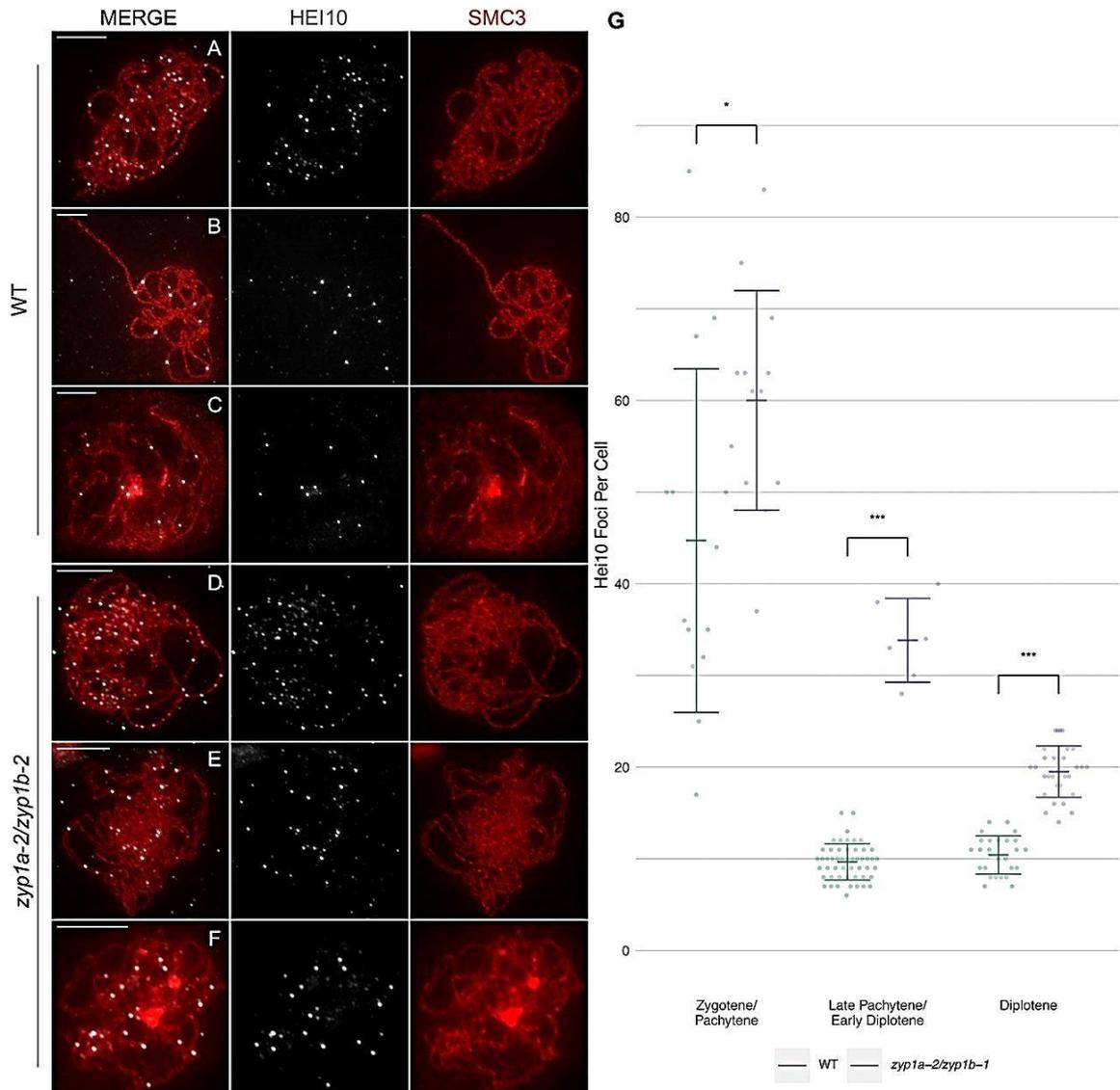


Figure 14 Immunomarquage de HEI10 sur des noyaux d'At aux stades zygotène à diplotène

Un nombre plus élevé de foyers HEI10 persiste en l'absence de ZYP1. Coimmunofluorescence de HEI10 et SMC3 sur les étalements chromosomiques de la prophase I méiotique. (A et D) Zygotène/ pachytène précoce (et analogue). (B et E) Pachytène tardif et transition "pachytène"/diplotène. (C et F) Diplotène. (Barres d'échelle, 10 μm.) (G) Nombre de foyers HEI10 par cellule pour le type sauvage et *zyp1a-2/zyp1b-1*. \*P < 0,05 et \*\*\*P < 0,001 pour un test de somme rangée de Wilcoxon à deux échantillons. (France et al., 2021)

On retrouve cette valeur usuelle de 10 pour les marqueurs de type MLH1 aussi au stade diplotène dans la Figure 15 ci-dessous ; 10.14 foyers  $\pm$  1.87,  $n = 7$  et pour HEI10 9.9 foyers  $\pm$  0.64,  $n = 7$  (Duroc et al., 2014) ; (Capilla-Pérez et al., 2021; Yao et al., 2020).

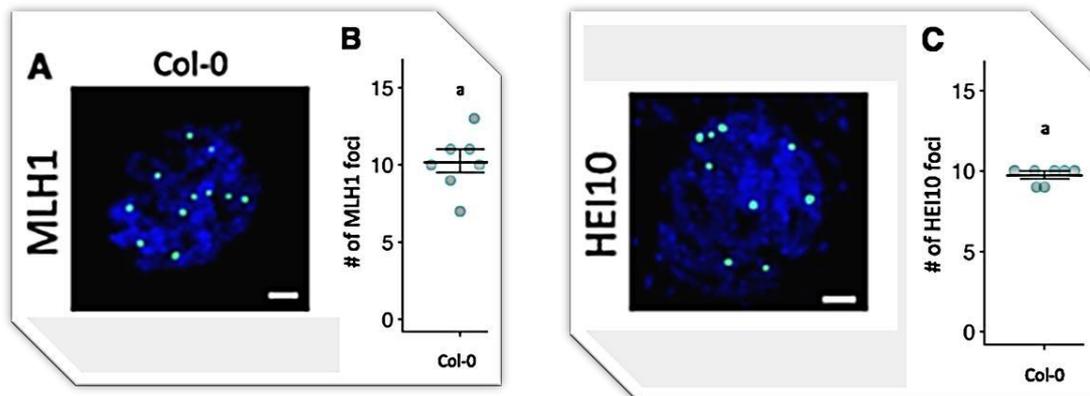


Figure 15 Immunomarkage des marqueurs des CO : MLH1 et HEI10 sur des noyaux d'At en diplotène

En (A) Immunomarkage des protéines marqueurs de CO de classe I (vert) MLH1 (à gauche) et HEI10 (à droite) dans les noyaux en diplotène des plantes sauvages Col-0. L'ADN est coloré avec du DAPI (bleu). Les images représentent des projections maximales d'intensités en Z. Barre = 2  $\mu$ m.(Nibau et al., 2020).

Ces marqueurs et ces valeurs correspondent aux nodules finaux de recombinaisons qui vont aboutir aux CO obligatoires indispensables pour la bonne ségrégation des chromosomes homologues en anaphase I.

### 2.1.2.1.1.5 Cinquième étape : La diacinèse

En diacinèse (« mouvement de distinction » d'après la racine grecque, caractérisant le fait que les régions centromériques des chromosomes homologues se distinguent l'une de l'autre), le CS est totalement dépolymérisé, il n'y a plus de synapse, et les chiasmats sont clairement visibles entre chaque paire d'homologues qui composent ce que l'on appelle alors les bivalents. Les chromosomes continuent de se condenser. La diacinèse est un stade intermédiaire entre la prophase I et la métaphase I, transition définie par la dislocation de l'enveloppe nucléaire. On note le même nombre de foyers HEI10 ou MLH1 qu'en diplotène, c'est-à-dire 10 pour At. On retrouve ce marquage exactement au niveau des zones des chiasmats.

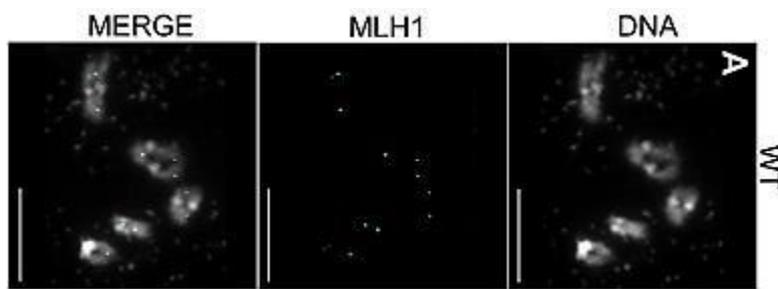


Figure 16 Immunomarkage de la protéine MLH1 dans des noyaux d'AT au stade diacinèse

On retrouve les chromosomes colorés au DAPI à droite et les foyers MLH1 en vert au centre (Duroc et al., 2014).

### 2.1.2.1.1.6 Durée de la prophase I

C'est durant la prophase I que naissent les liaisons entre les chromosomes homologues. En effet il faut du temps pour créer du lien et c'est pourquoi elle est la phase la plus complexe et la plus longue. Chez le blé *Triticum aestivum*, une étude récente montre que la méiose dure 43 heures et la prophase I dure à elle seule 36 h soit plus de 80% du temps (Osman et al., 2021). C'est le leptotène qui dure le plus longtemps durant la méiose (14 h environ). En revanche, chez la souris et chez *Arabidopsis*, le pachytène représente, en temps, la plus longue part de la prophase I (5 à 7 heures chez la souris, et une quinzaine d'heures chez *Arabidopsis* (Armstrong and Jones, 2003; Cohen et al., 2006).

### 2.1.2.1.2 Métaphase I

A ce stade, les chromosomes homologues, reliés par les chiasmata, ont terminé leur condensation. Les chromatides des chromosomes homologues sont aussi attachés grâce à des cohésines spécifiques à la méiose I, les protéines REC8 pour éviter leur dissociation précoce (Figure 17). REC8 est retirée des bras des chromosomes lors de la première division, séparant ainsi les chromosomes homologues les uns des autres. Toutefois, REC8 est maintenue au niveau des centromères, de sorte que les chromatides sœurs restent unies jusqu'à l'anaphase de la méiose II, moment auquel l'élimination de la cohésine restante entraîne la séparation des chromatides sœurs.

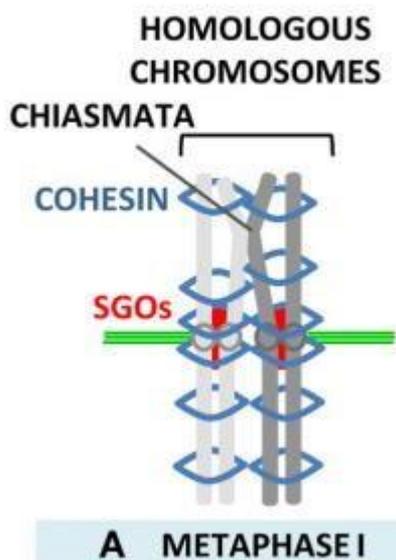


Figure 17 Schéma de deux chromosomes homologues en métaphase I reliés par les cohésines (Zamariola et al., 2014)

Le fuseau de microtubules s'étend à partir des pôles cellulaires et se fixe aux kinétochores, une structure protéique localisée au niveau des centromères, de chacune des chromatides. Chacun des chromosomes constituant le bivalent est relié au pôle opposé à son homologue grâce à la coorientation des kinétochores des chromatides sœurs. En effet, en méiose I, les deux kinétochores fixés sur une paire de chromatides sœurs sont orientés vers le même pôle cellulaire grâce aux cohésines, Shugosin (SGOs). On parle alors de kinétochores monopolaires ou mono-orientés. Les bivalents sont soumis à une tension équivalente sous l'action des microtubules qui les attirent ainsi vers des pôles cellulaires opposés.

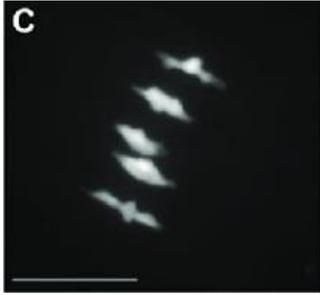


Figure 18 Métaphase I de noyau de méiocyte d'At

(Lambing and Heckmann, 2018)

En résulte un alignement des bivalents au niveau de la plaque équatoriale de la cellule, aussi appelée plaque métaphasique (Figure 18). Le nombre de bivalents, nous permet de comptabiliser le nombre de chiasmas et de contrôler que la prophase I s'est bien déroulée.

### 2.1.2.1.3 Anaphase I

Après la métaphase I, les chromosomes paternels et maternels homologues se déplacent vers des pôles opposés (anaphase I), complétant ainsi la première division.

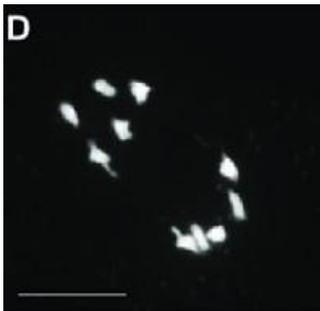


Figure 19 Anaphase I de noyau de méiocyte d'At

(Lambing and Heckmann, 2018)

En anaphase I (Figure 19), les chromosomes homologues se séparent et les chromatides sœurs sont liées par des cohésines spéciales (REC8) au niveau des centromères. A la fin de la méiose I la réduction due à la répartition équilibrée des chromosomes parentaux a permis l'émergence de brassages intra et inter-chromosomiques. Sous l'effet tracteur du fuseau et grâce au relâchement de la cohésion au niveau des bras chromosomiques, les chromosomes homologues sont séparés et migrent vers des pôles opposés de la cellule.

### 2.1.2.1.4 Télaphase I

Les chromosomes constitués de deux chromatides forment deux groupes équilibrés autour desquels apparaît une nouvelle membrane nucléaire. Chez certaines espèces, les mammifères en particulier, il y a cytotélerèse, c'est-à-dire la mise en place d'une nouvelle paroi cellulaire pour donner deux cellules filles 1N,2C. Chez Arabidopsis il n'y a pas cytotélerèse, mais il y a formation de deux noyaux 1N,2C distincts.

### 2.1.2.2 La Méiose II, deuxième division équationnelle

C'est au cours de cette division que les chromatides sœurs se divisent et que la protéine REC8 est phosphorylée afin d'être dégradée. Elle est composée des mêmes phases que la première division de méiose à savoir la prophase II, la métaphase II, l'anaphase II et la télophase II (Figure 20).

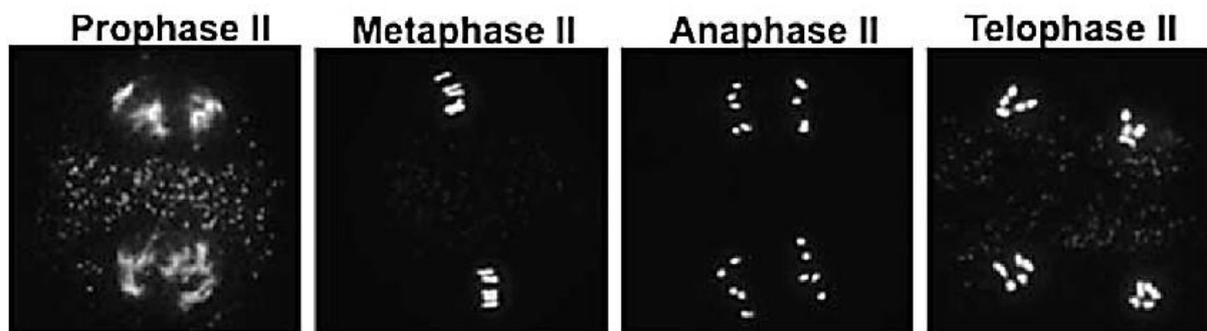


Figure 20 Méioses II de noyaux d'At marqués au DAPI

Les noyaux de méiocytes d'At sont étalés et marqués au DAPI (Wang et al., 2014)

Chez certaines espèces, il est possible d'observer une décondensation partielle (interphase II) puis une re-condensation des chromosomes de chaque noyau (prophase II). Les kinétochores se lient de part et d'autre du centromère aux deux chromatides sœurs (un par chromatide) qui sont en train de se condenser. Puis les chromosomes constitués de deux chromatides sont alignés sur la plaque métaphasique, les centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule et se fixent aux kinétochores qui sont alors qualifiés de bipolaires ou bi-orientés. Grâce au relâchement de la cohésion au niveau des centromères, les chromatides sœurs se séparent après la rupture de leur centromère et migrent vers les pôles opposés de la cellule, tirées par les protéines motrices des microtubules. Les chromatides sœurs sont séparées en anaphase II pour former deux lots équilibrés. Chacun des deux noyaux 1N,2C issus de la méiose I donnera ainsi deux noyaux 1N,1C en télophase II. A l'issue de la division équationnelle, les noyaux des quatre cellules sexuelles sont haploïdes et possèdent une chromatide de chaque chromosome. La deuxième division de méiose s'apparente à une division mitotique puisque ce sont les chromatides sœurs qui sont séparées. À la suite de la gamétogénèse, les produits de méiose vont se spécialiser pour devenir des cellules compétentes qui vont féconder l'ovule au cours de la spermiogénèse pour les animaux et lors de la micro-gamétogénèse chez les angiospermes. En cytologie, il est possible de travailler sur les produits de méiose ; soit les tétrades où l'on peut analyser la recombinaison grâce à l'utilisation de fluorochromes fixés sur des intervalles définis et qui donnent des combinaisons de couleurs selon les recombinaisons obtenues. On peut aussi travailler sur le pollen et vérifier qu'il est bien vivant avec des marqueurs spécifiques.

### 2.1.3 Dynamique de la méiose

#### 2.1.3.1 Formation du bouquet

Avant que les chromosomes homologues ne se recombinent et ne forment des bivalents, ils doivent se retrouver dans le noyau de la cellule. Dans la plupart des organismes, l'initiation de l'appariement homologue se produit à de nombreux endroits le long des chromosomes par un mécanisme qui reste encore flou. Ces premières interactions ne sont ensuite stabilisées que sur les

sites où il y a une homologie suffisante entre les chromosomes. Il a été reconnu qu'en interphase, les chromosomes occupent des territoires non aléatoires (Avivi and Feldman, 1980; Bolzer et al., 2005; Schubert and Shaw, 2011). En effet la cellule est hautement compartimentée avec une organisation spécifique de la chromatine. En effet l'hétérochromatine se trouve en périphérie, de même que les séquences denses en gènes se retrouvent au centre ainsi que les petits chromosomes. Cette organisation a un rôle structural dans la protection de l'ADN et un rôle fonctionnel puisque cette chromatine est organisée en domaines ou clusters actifs de gènes co-exprimés, co-régulés.

Dans de nombreux cas ce processus de tri et de stabilisation semble être favorisé par une organisation des chromosomes spécifique à la méiose appelée « configuration du bouquet », qui est initiée par un regroupement de télomères sur l'enveloppe nucléaire interne au stade leptotène, juste avant la synapse (Zickler and Kleckner, 1999) (Figure 6B). Le bouquet semble faciliter la reconnaissance et l'alignement homologue en concentrant les chromosomes dans une région limitée du volume nucléaire, ce qui va permettre des mouvements de chromosomes qui favorisent l'identification des homologues, pour la réparation homologue des CDB (Harper et al., 2004; Hiraoka, 1998; Scherthan, 2001). Il a été montré *in vivo* chez la levure, que les mouvements oscillatoires des chromosomes favorisent l'alignement des homologues dans la prophase méiotique précoce (Ding et al., 2004; TrellesSticken et al., 2005a).

### 2.1.3.2 Configuration Rabl chez les céréales

Chez les eucaryotes, les télomères et les centromères peuvent se regrouper aux pôles opposés du noyau (Cowan et al., 2001; RABL, 1885). Cette configuration dite « Rabl » (Figure 21) se trouve chez le blé, le seigle, l'avoine et l'orge, mais pas chez le maïs ni chez Arabidopsis (Schubert and Shaw, 2011). On suppose qu'elle est liée à la grande taille de leur génome et/ou la longueur des chromosomes (Dong and Jiang, 1998). Lors du zygotène, le bouquet de télomères est formé et les extrémités des chromosomes s'attachent à l'enveloppe nucléaire interne. La reconnaissance entre les chromosomes homologues semble se produire entre les régions subtélomériques (Corredor et al., 2007).

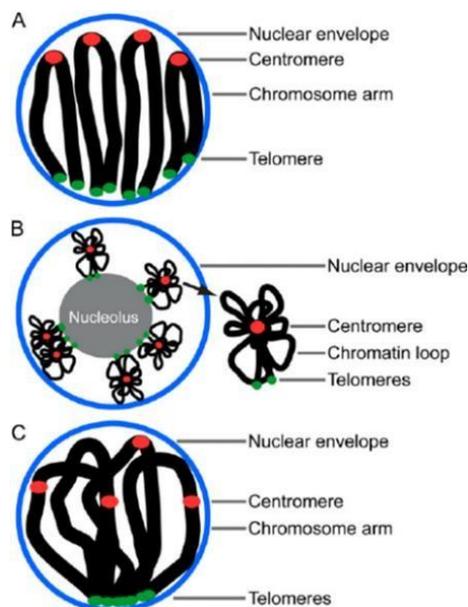


Figure 21 Configurations des chromosomes en méiose

En A la conformation Rabl. En B les conformations « rosettes » retrouvées chez Arabidopsis. En C le bouquet télomérique. (Tiang et al., 2011).

La configuration de Rabl et le bouquet de télomères regroupent les chromosomes et contribuent ainsi à réduire la distance spatiale entre eux ce qui faciliterait leur appariement.

### 2.1.3.3 Configurations chez les polyploïdes

La reconnaissance et l'appariement peuvent être plus complexes chez les polyploïdes. En effet, la méiose est retardée par rapport à leur homologue diploïde chez les autotétraploïdes des souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Trelles-Sticken et al., 2005b). De façon similaire, des espèces de plantes avec un contenu d'ADN génomique (C) élevé ont également une durée de la méiose supérieure par rapport au même niveau de ploïdie. Cependant, la comparaison de plantes ayant une ploïdie différente au sein d'une même espèce a révélé une corrélation négative surprenante : une polyplôïdie plus élevée semble réduire le temps nécessaire pour achever la méiose (Bennett, 1977). Ces différences peuvent être créées en définissant la durée uniquement par des événements visibles en cytologie. Une analyse avec des techniques à plus haute résolution et au niveau moléculaire (Carlton et al., 2006) au début de la méiose pourrait fournir des informations plus précises sur la cinétique de la méiose chez les polyploïdes. En dépit des différences individuelles, il est remarquable qu'un large éventail de variations de la taille des génomes et des noyaux ne modifie pas la durée du processus de reconnaissance des chromosomes (Moore and Shaw, 2009). Il semble que la reconnaissance de l'homologie n'est pas l'étape limitante, grâce à des éléments de soutien tels que la configuration de Rabl et le bouquet de télomères. Dans le cas du blé tendre qui est composé de trois génomes très similaires en séquence, la reconnaissance de l'homologie doit se faire avec une grande précision.

Sepsi et collaborateurs (Sepsi and Schwarzacher, 2020) ont donné quelques pistes qui permettent de mieux comprendre la dynamique d'association des chromosomes en méiose chez l'orge et le blé. En effet ils proposent un modèle en analysant la localisation des centromères et du CS au cours de la prophase. À la suite de la conformation Rabl, à l'entrée en leptotène précoce, les centromères forment un cluster au niveau du pôle nucléaire en même temps que le CS s'initie à partir des régions subtélomériques. Cette étape coïncide avec la mise en place des CDB et réduit la motilité de la chromatine à grande échelle et favorise les interactions chromosomes-chromosomes. S'ensuit une dissociation du cluster des centromères et les arrangements présynaptiques commencent. La libération des centromères induit une augmentation de la motilité, ce qui permettrait de défaire les interactions ectopiques non homologues qui sont moins robustes. Ils proposent ainsi que cette danse initiée par les mouvements transmis du cytosquelette aux télomères et rythmée par les centromères permet de favoriser les interactions légitimes tout en supprimant les contacts illicites pour la bonne conduction de la recombinaison homologue.

La poursuite du développement d'outils d'imagerie en direct devrait permettre de réaliser des progrès substantiels dans ce domaine, notamment pour comprendre les implications de la motilité des chromosomes interphasiques pour l'activité des gènes ainsi que pour les processus d'entretien du génome comme la réplication ou la réparation de l'ADN. Afin d'aller plus loin et de comprendre l'organisation 3D du noyau en début de méiose il serait intéressant d'utiliser les anciennes techniques de multiFISH et les nouvelles techniques développées depuis ces dernières années couplées au séquençage liées à la capture de la conformation des chromosomes (HiC, 5C) (Umlauf, 2015).

## 2.2 Recombinaison méiotique

### 2.2.1 Définition

Ce mécanisme au sens large revêt plusieurs définitions selon l'échelle à laquelle on s'intéresse. En effet à l'échelle du chromosome dans les cellules sexuelles, c'est le résultat du brassage que l'on appelle interchromosomique, c'est-à-dire la répartition au hasard des chromosomes parentaux au sein de la nouvelle cellule fille. Ce sont les brassages que Grégor Mendel avait mis en évidence lors de ses travaux sur la ségrégation des « caractères » sur le pois, sans connaître l'existence des chromosomes. Ces brassages d'ailleurs obéissent strictement à une des lois de Mendel qui stipule que les caractères sont indépendants. Cette loi a été revue à la suite des travaux de Thomas Hunt Morgan sur la drosophile. Ces travaux nous permettent d'appréhender la seconde facette de la définition de la recombinaison. A l'échelle moléculaire, ce mécanisme met en jeu les échanges qui se produisent au sein d'un même chromosome entre deux molécules d'ADN, ce sont les brassages intrachromosomiques. Ceci a pu être mis en évidence grâce à l'émergence des théories chromosomiques de l'hérédité qui ont démontré que le support de l'information génétique est l'ADN et de la théorie de la chiasmotypie (page 42 ; §2.2.3.1) qui a permis d'observer les chiasmas des chromosomes en métaphase I (Hunter, 2015).

Comme nous avons pu le voir précédemment à travers des aspects cytologiques au cours de la prophase I méiotique, les chromosomes homologues qui ont subi des CDB vont se rapprocher (une centaine de nm de distance), ce qui va favoriser lors de la réparation, les échanges de matériel génétique, les remaniements, en somme la recombinaison. La recombinaison génétique est donc le résultat de la réparation de l'ADN à la suite d'un dommage subit ou induit. Cette réparation n'est pas toujours à l'origine de la mise en place de nouvelles combinaisons de molécule d'ADN. En effet, en mitose par exemple après la réplication, la réparation et donc la recombinaison se fera avec la chromatide sœur qui est à sa proximité et non avec le chromosome homologue. De ce fait la réparation sera fidèle et identique et ne sera pas à l'origine de diversité. En méiose on retrouve aussi ce mode de réparation avec la sœur mais il existe un biais en faveur de la réparation avec le chromosome homologue. L'issue de la réparation avec l'homologue fournit plusieurs résultats. Ces éléments de recombinaison correspondent aux conversions génétiques ou NCO (Non-CO) qui impliquent un échange non réciproque de séquence d'ADN. On retrouve aussi le CO qui correspond à l'échange réciproque de brin d'ADN. C'est l'enjeu majeur de la recombinaison en méiose car il a un rôle à la fois mécanique et structurel. Ces deux résultats sont à l'origine aussi de la diversité génétique qui permet aux cellules, aux organismes de s'adapter et d'être un des moteurs de l'évolution des espèces. La recombinaison illégitime quant à elle est le résultat de la réparation avec un fragment d'ADN présentant peu ou pas d'homologie avec le fragment lésé. Les conséquences conduisent à diverses mutations structurelles de type, délétions, insertion, translocation qui peuvent être à l'origine de maladies génétiques et de dysfonctionnements cellulaires.

### 2.2.2 Aspects moléculaires de la recombinaison

#### 2.2.2.1 Historique

La caractérisation du phénotype *Rec<sup>-</sup>* chez la levure a permis de mettre en évidence que la production de gamètes haploïdes viables reposait sur la recombinaison méiotique dans la mesure où, lorsque celle-ci est absente ou fortement réduite (>1%), les chromosomes ségrègent aléatoirement, formant des gamètes aneuploïdes (Klapholz et al., 1985). Cette étude a permis l'analyse de mutants *spo11-1* et grâce à l'usage de marqueurs intra-génétiques ils ont pu déterminer l'absence de

recombinaison chez ceux-ci. Néanmoins le contexte dans lequel l'article a été publié n'a pas montré de lien entre l'initiation de la recombinaison et SPO11. Cette initiation reposait bien sur la présence d'une cassure d'ADN, et ceci des années avant que les CDB ne soient généralement acceptées comme initiateurs de la recombinaison méiotique (Sun et al., 1989).

Pendant longtemps, deux hypothèses ont été évoquées pour aboutir à la jonction de Holliday qui est un des intermédiaires qui conduit à la recombinaison méiotique (Figure 22 d). La première reposait sur un modèle où la recombinaison est initiée par une cassure simple-brin asymétrique qui évoluerait ensuite en échange double-brin symétrique (Meselson and Radding, 1975; Radding, 1982) (Nickinitiated models sur la Figure 22). Si ce modèle a longtemps permis d'expliquer les différents cas de figure rencontrés, il est apparu certaines limites au fur et à mesure des découvertes et il imposait certaines contraintes au regard par exemple des migrations de branches ou de correction des erreurs (Stahl, 1979).

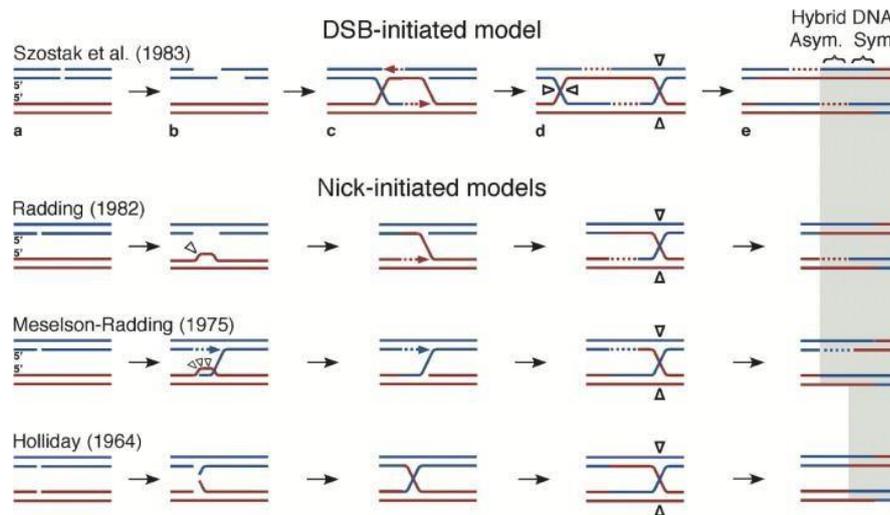


Figure 22 Modèles historiques d'Initiation de la recombinaison homologue

Chaque ligne représente un brin d'ADN, le bleu provenant d'un duplex parental et le rouge de l'autre. Dans le modèle de (Szostak et al., 1983) en haut), une fois qu'une CDB est formée (a), les extrémités 5' sont érodées (b), et une extrémité 3' s'envahit l'homologue non coupé pour générer une boucle de déplacement ; l'autre extrémité 3' s'apparie avec la boucle D, et les deux extrémités 3' amorcent la synthèse d'ADN (lignes pointillées) ; c). Les ligations rejoignent les extrémités de l'ADN pour former deux jonctions de Holliday croisées, qui migrent pour former un ADN hybride symétrique (c'est-à-dire sur les deux duplex) ; d). La résolution des jonctions de Holliday (triangles ouverts) peut donner un ADN recombinant pour les marqueurs flanquant la région d'échange de brins (e). La résolution des jonctions de Holliday est similaire dans tous les modèles présentés ici. Dans le modèle de Holliday (Holliday, 1964) (en bas), des entailles sont faites à des points identiques sur les duplex parentaux, et les brins sont échangés pour donner une jonction de Holliday, qui migre et est résolue comme ci-dessus. Meselson et Radding (Meselson and Radding, 1975) ont proposé qu'une entaille sur un brin parent amorce la synthèse de l'ADN de déplacement pour former une queue invasive ; une boucle D est formée et dégradée (triangles ouverts), conduisant à la formation, la migration et la résolution d'une jonction de Holliday. Dans le modèle de Radding (Radding, 1982), la coupure initiale est élargie en un espace simple brin ; un brin de l'autre parent remplit l'espace. Une coupure sur ce brin (triangle ouvert) permet la synthèse d'ADN de déplacement et la formation d'une jonction de Holliday, comme ci-dessus. La boîte verte à droite indique les structures recombinantes similaires dans les modèles (Smith, 2004).

Un deuxième modèle a alors été proposé par Szostak et ses collaborateurs (Szostak et al., 1983). Celui-ci repose sur une initiation de la recombinaison par des CDB dont les deux extrémités sont maturées en ADN simple-brin (Nicolas et al., 1989; Sun et al., 1989, 1991). Une des deux extrémités simple-brin va alors envahir l'une des deux chromatides du chromosome homologue. Cela conduit à la formation d'une structure appelée « D-loop » (Displacement loop : D-loop(s)) qui est stabilisée par la synthèse du brin complémentaire jusqu'à parvenir à capturer la seconde extrémité maturée. Cela aboutit à la formation de la double jonction de Holliday (dJH). Ce modèle et les différents intermédiaires de recombinaison (IR) prédits a été validé depuis chez la levure (Bzymek et al., 2010) et il est reconnu comme un modèle universel chez les eucaryotes.

## 2.2.2.2 Initiation de la recombinaison méiotique

Les CDB de l'ADN se produisent accidentellement lors de l'exposition de l'ADN à des radiations, des produits chimiques ou résultent de processus métaboliques défectueux de l'ADN. Elles peuvent également être introduites de manière programmée, par exemple au cours de la maturation du système immunitaire, de la méiose ou de la chimio ou radiothérapie du cancer. La cellule possède des systèmes de réparation lui permettant de faire face à ces stress génotoxiques. En particulier la voie de réparation des CDB ou DSBR. Il existe au sein de cette voie plusieurs modes de réparation selon le contexte et les protéines présentes au site de cassure. Dans les cellules somatiques, deux mécanismes principaux ont été identifiés, la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologe (RH) (Figure 23) (Vítor et al., 2020). Le NHEJ est le mécanisme le plus courant, il fonctionne dans toutes les phases du cycle cellulaire et son action repose sur une non-resection via le recrutement du complexe Ku70/80 et d'autres facteurs de régulation, tels que la protéine 53BP1 (p53-binding protein 1). Bien que les voies NHEJ soient très efficaces, elles sont également sujettes à des erreurs puisque cette réparation consiste en la religation des extrémités cassées. En revanche, la RH utilise une molécule d'ADN intacte comme modèle pour la réparation, ce qui garantit la haute fidélité de la réparation. Cependant, ce mécanisme n'agit que lorsqu'une copie d'ADN,

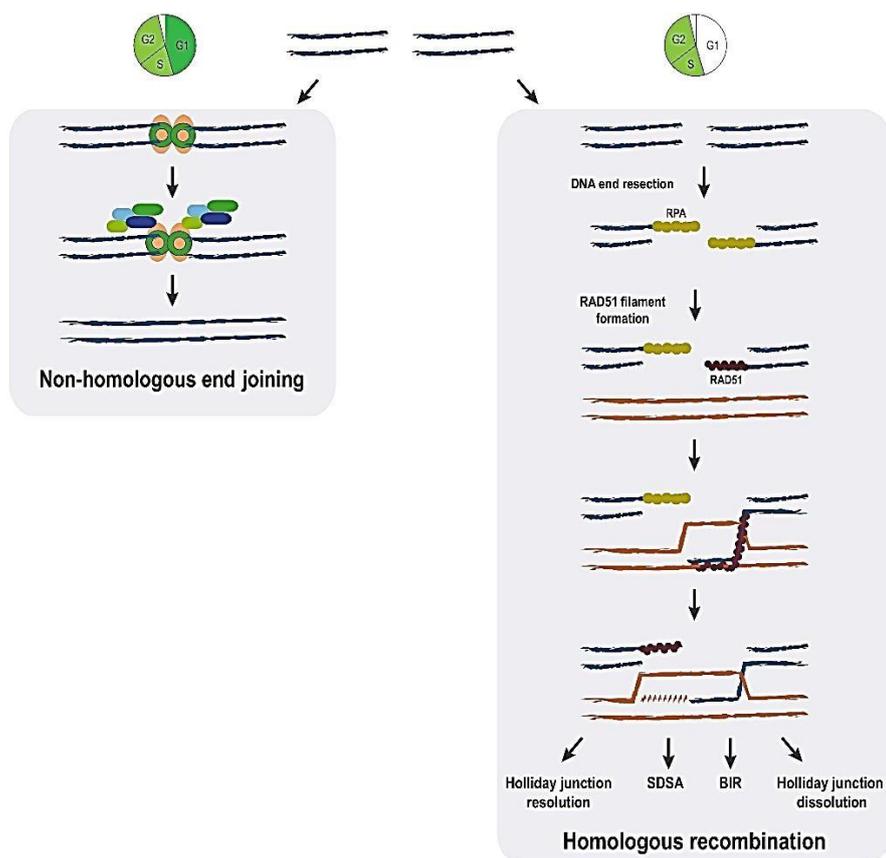


Figure 23 Les principales voies de réparation des CDB

Les principales étapes des mécanismes de réparation par jonction des extrémités non homologues et par recombinaison homologue sont représentées. La recombinaison homologue peut se résoudre par des voies distinctes (synthesis dependent strand annealing (SDSA), répllication induite par rupture (BIR) et dissolution de la jonction de Holliday) qui partagent toutes des étapes initiales identiques. Le cycle cellulaire est un déterminant majeur du choix entre les mécanismes de réparation des DSB. Alors que le NHEJ est disponible tout au long de l'interphase, les voies de recombinaison homologue sont limitées aux phases S/G2 du cycle cellulaire (Vítor et al., 2020).

généralement la chromatide sœur, est disponible, ce qui ne se produit que pendant les phases S/G2 du cycle cellulaire. La différence essentielle entre la réparation par RH et la réparation par NHEJ est que l'ADN est réséqué autour du point de rupture, ce qui génère des fragments d'ADN simple brin (ADNs) qui sont utilisés pour rechercher la chromatide sœur ou le chromosome homologue en RH.

En méiose, la voie de réparation qui est prédominante est la RH avec la recombinase DMC1, le NHEJ n'intervient qu'en secours et en fin de méiose (Enguita-Marruedo et al., 2019). Les CDB sont induites par le complexe protéique SPO11 (décrit en détail dans le § 2.3.2 page 46) et la réparation va se faire par RH (Macaisne et al., 2018). Ce complexe reste attaché de manière covalente à l'extrémité 5' des brins d'ADN générés. Leur libération est le premier stade de maturation des CDB et nécessite une activité d'endonucléase qui permettra de cliver l'ADN en 3' du site de fixation du complexe SPO11. Cette activité, portée conjointement par le complexe protéique MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) chez *S. cerevisiae* (ou MRN (Mre11-Rad50- Nbs1) chez d'autres espèces), ainsi que par la protéine SAE2 (également appelée CtIP chez les mammifères ou COM1 chez les plantes), est nécessaire à la progression de la recombinaison méiotique mais aussi pour la méiose (Lengsfeld et al., 2007; Neale et al., 2005; Osman et al., 2011; Rothenberg et al., 2009). Chez les mutants *Mre11*, *Rad50* ou *Sae2/Com1*, la synapse est incapable de se former entre les chromosomes homologues, qui à leur tour présentent un niveau élevé de fragmentation en raison de l'incapacité à réparer les CDB (Bleuyard et al., 2004; Ji et al., 2013; Lamarche et al., 2010; Lengsfeld et al., 2007; Puizina et al., 2004; Uanschou et al., 2007).

Dans une deuxième étape, les extrémités 5' de l'ADN seront dégradées, ce qui permettra d'allonger les extrémités 3' sous forme d'un simple brin. Ce phénomène, également connu sous le nom de résection, nécessite une activité exonucléase 5'-3', absente du complexe MRX/MRN qui serait notamment induite par la protéine EXO1 (Hodgson et al., 2011). Ensuite les extrémités 3' simple-brin vont être prises en charge par les protéines RPA (Replication Protein A) qui vont jouer le rôle de protection grâce à leur encombrement stérique (Ribeiro et al., 2016). Il existe de nombreuses formes de ces protéines RPA et parmi elles, les protéines MEIOB qui sont méiose-spécifiques mais dont le rôle autre que structural reste inconnu. Il a été démontré que ces protéines sont phosphorylées par ATR (ataxia-telangiectasia-like and Rad3 homolog) et seraient impliquées dans la régulation des crossingover (Bartrand et al., 2006).

### 2.2.2.3 Invasion simple-brin

L'extrémité 3' simple brin va ensuite être colonisée par les histones H2AX phosphorylées sur la sérine 139 par ATM (ataxia-telangiectasia mutated) (TEL1 chez la levure). Les protéines ATR (MEC1 chez la levure) vont charger le nucléofilament RAD51/DMC1 au niveau des CDB. Les recombinases DMC1 et RAD51 agissent de concert et en méiose c'est la protéine DMC1 qui va coloniser le brin d'ADN homologue plutôt que la chromatide sœur. Ainsi la protéine RAD51 joue un rôle de soutien et permet la régulation de la recombinaison (Da Ines et al., 2013). Kurzbauer et ses collaborateurs (Kurzbauer et al., 2012) ont montré que ces deux recombinases se fixaient de part et d'autre de la CDB et agissaient de manière séparée dans la mise en place des IR. Chaque recombinase prend donc en charge un nucléofilament et les deux sont spatialement et fonctionnellement séparés (Kurzbauer et al., 2012). De plus, en l'absence de RAD51, il n'y a pas de réparation possible. Cependant en l'absence de DMC1 la réparation se fait mais il y a une diminution du nombre de CO (Howard-Till et al., 2011). Seul DMC1 forme des CO dépendants des CDB sur la chromatine méiotique, alors que la distribution de RAD51 reste diffuse à l'intérieur des noyaux. Cela suggère que les filaments nucléoprotéiques méiotiques sont principalement constitués de DMC1. De plus, un test d'interaction a confirmé que peu ou pas de protéine RAD51 forme des filaments mixtes avec DMC1. Les auteurs de ces études supposent que des filaments nucléoprotéiques RAD51 relativement courts et/ou transitoires sont suffisants pour la RH avec la chromatide sœur, alors que des filaments nucléoprotéiques longs constitués principalement

de DMC1 sont nécessaires pour la RH inter-homologue. Crickard et collaborateurs, (Crickard and Greene, 2018), ont démontré aussi ce rôle important de DMC1 qui serait capable de communiquer avec les filaments de RAD51 dans l'optique de désigner les futurs CO. Ils insistent aussi sur ce rôle de soutien de RAD51. La Figure 24, ci-dessous représente les différents événements à la suite de la CDB et à la resection. Ici ils mettent en avant que la protéine ATR/ATRIP empêche DMC1 de se fixer au départ. Une fois que RAD51 est présent sur un des fragments, DMC1 est recruté.

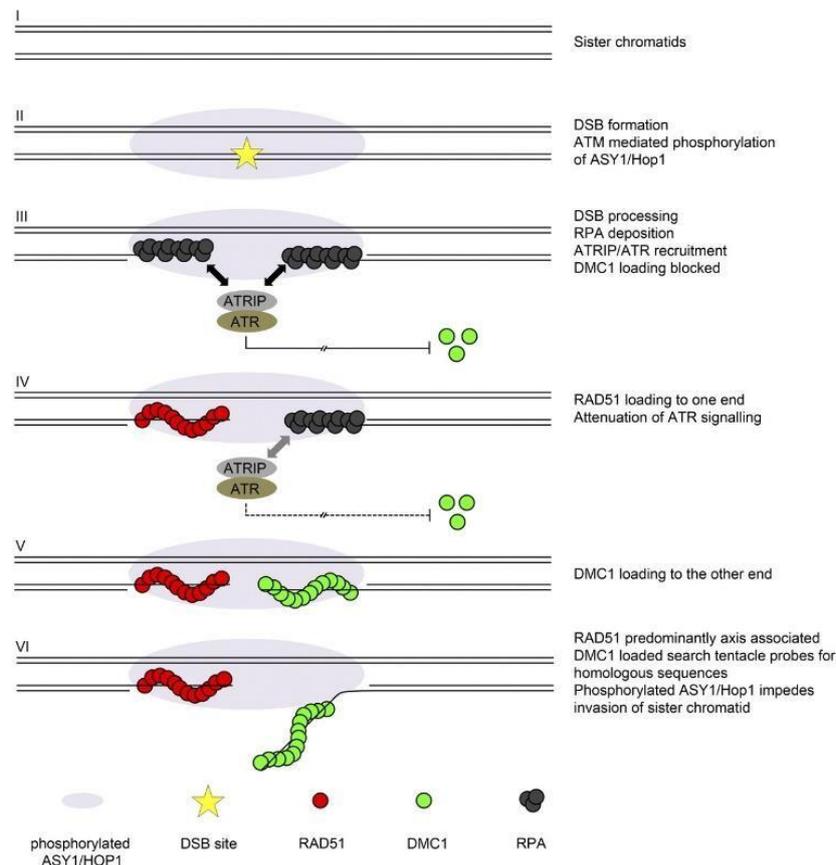


Figure 24 Régulation et mode d'invasion des recombineses

Les dommages causés à l'ADN (CDB) entraînent l'activation de la kinase ATM qui phosphoryle la protéine de l'élément axial ASY1 (Hop1), générant ainsi un signal localement limité à proximité du site de la CDB de l'ADN. La résection des CDB génère des ADN simple-brin qui sont rapidement protégés par les RPA. Le dépôt de RPA entraîne le recrutement et l'activation de ATR via son partenaire d'interaction ATRIP. La signalisation ATR bloque le chargement de la recombinaise DMC1 mais pas celui de RAD51 qui remplace alors RPA à une extrémité de la CDB. La signalisation ATR est alors atténuée ce qui permet le chargement de DMC1 à l'autre extrémité du DSB. L'extrémité recouverte par RAD51 est conservée, et le filament nucléoprotéique DMC1 est libéré pour rechercher des séquences homologues. L'activation locale d'ASY1 empêche l'accès à la chromatide sœur, favorisant ainsi la réparation et la recombinaison inter-homologue de l'ADN (Kurzbaueer et al., 2012).

Les recombineses RAD51 (exprimées de manière constitutive) et DMC1 (spécifiques de la méiose) favorisent donc la formation de produits d'invasion de brins, les D-loops, entre molécules homologues. Les produits d'invasion des brins peuvent continuer à être pris en charge par la voie de la réparation des CDB (DSBR), soit peuvent rejoindre une voie annexe de réparation du SDSA (Synthesis-dependent strand annealing Figure 23). Les D-Loops destinées à être traitées par le SDSA doivent se dissocier et produisent des NCO et celles destinées au DSBR doivent résister à la dissociation pour générer des CO (Bugreev et al., 2011). Le mécanisme qui canalise les IR dans différentes voies de recombinaison homologue est inconnu. Les auteurs démontrent que les D-loops, dans une réaction pilotée par DMC1, sont sensiblement plus résistantes à la dissociation par des protéines de migration de branche telles que RAD54, que celles formées par RAD51. Ils proposent que la résistance intrinsèque à la dissociation

des intermédiaires d'invasion du brin DMC1 pourrait expliquer pourquoi DMC1 est essentielle pour assurer la bonne ségrégation des chromosomes dans la méiose.

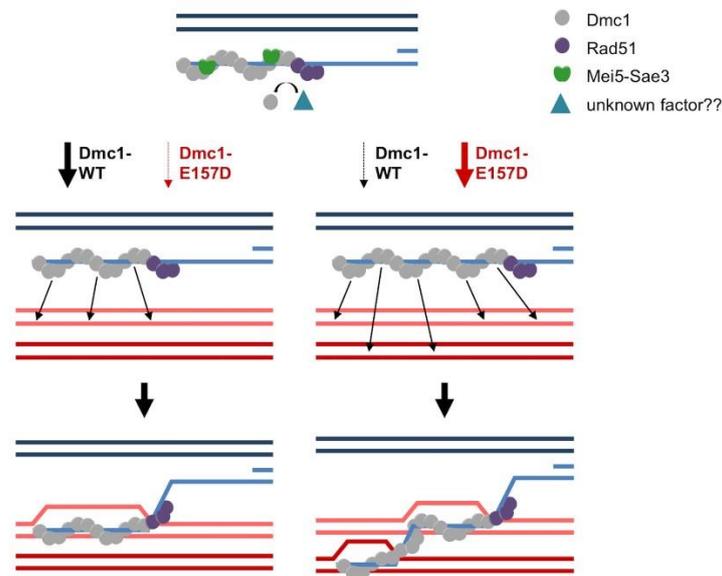


Figure 25 Limitation de la longueur du nucléofilament DMC1

Mei5-Sae3 et Rad51 favorisent la formation et la stabilité des filaments de Dmc1 *in vivo*. Le nucléofilament composé de DMC1, RAD51, Mei5-Sae3 va à gauche (DMC1-WT) envahir de façon limitée la chromatide homologue. Cependant à droite lorsque l'on perd l'interaction à Mei5-Sae3 (*DMC1-E157D*), le filament est très long et est enclin à envahir les deux chromatides du chromosome homologue (Reitz et al., 2019).

L'activité de DMC1 est régulée par des facteurs accessoires, notamment la protéine hétérodimérique MEI5-SAE3 et RAD51 (Reitz et al., 2019 ; Figure 25). En effet, en présence de ses co-facteurs le nucléofilament est plus court (~100 nt) forme une invasion unique. Cependant, lorsque l'interaction avec MEI5-SAE3 (*dmc1-E157D*) est abolie, le filament n'est plus limité en longueur. Il est capable d'envahir plusieurs chromatides et de former même en absence de CDB des événements de recombinaison aberrants. La régulation fine de l'invasion est essentielle pour empêcher les réarrangements incorrects du génome. La D-loop est la conséquence de l'invasion du nucléofilament DMC1-RAD51 et va être maturée en jonction de Holliday dans le cadre du DSB.

#### 2.2.2.4 Jonction de Holliday

Une jonction de Holliday est une structure d'acide nucléique ramifiée formée de quatre bras double-brin reliés entre eux. La structure est nommée d'après Robin Holliday, le biologiste moléculaire qui a proposé son existence en 1964 (Holliday, 1964) (Figure 22). Les jonctions de Holliday sont des IR clés dans de nombreux types de recombinaison génétique, ainsi que dans la réparation des CDB. Ces jonctions ont généralement une séquence symétrique et sont donc mobiles, ce qui signifie que les quatre bras individuels peuvent glisser à travers la jonction selon un schéma spécifique qui préserve largement l'appariement des bases. On retrouve aussi des jonctions à quatre bras similaires aux jonctions de Holliday qui apparaissent dans certaines molécules d'ARN fonctionnelles (Burke-Agüero and Hearst, 1990).

La jonction de Holliday peut ensuite être maturée en double jonction de Holliday (djH) par la capture de la deuxième extrémité d'ADN (Second end invasion SEI et Second end capture SEC) (Sobhy et al., 2019).

Les facteurs qui contrôlent le destin d'une D-loop pour donner un NCO ou un CO ont été bien décrits et résultent pour la plupart de deux activités opposées qui sont bien conservées au cours de l'évolution : 1) le démantèlement de l'IR par des hélicases (le complexe Sgs1-Top3-Rmi1 (STR) chez *S. cerevisiae*) ou 2) la stabilisation par un groupe de protéines appelé « ZMM » (ZIP1-4, MSH4-5, MER3, SPO16) (Pyatnitskaya et al., 2019). Chez la levure, la plupart des D-loops stabilisées par les ZMM sont traitées comme des CO. Cependant, les foyers ZMM sont plus nombreux que les CO dans plusieurs autres espèces, suggérant que les D-loops liées par les protéines ZMM ne sont pas exclusivement traitées comme des CO et peuvent toujours former des NCO (De Muyt et al., 2014; Edelman et al., 1999; Higgins et al., 2008). Les IR, SEI et djH sont des carrefours qui sont à la base de la résolution de la recombinaison. En effet selon les acteurs mobilisés au niveau des IR, l'issue peut donner lieu à des CO ou des NCO.

## **2.2.2.5 Voies de formation des CO et NCO**

### **2.2.2.5.1 Interférence**

L'une des caractéristiques intéressantes de la recombinaison méiotique est le fait que les CO ont une forte tendance à être espacés régulièrement sur les chromosomes (Zickler and Kleckner, 2015). Ils apparaissent de façon stochastique, à différents endroits selon les noyaux observés. Ce phénomène a d'abord été observé chez la Drosophile et baptisé « interférence des CO » (Berchowitz and Copenhaver, 2010). Celle-ci se définit comme l'impossibilité pour un crossing-over de type I (§2.2.2.5.2 page 37) de se produire au voisinage d'un autre crossing-over de même type. Cela se traduit donc par une distribution non-aléatoire des CO I. L'interférence varie avec la distance entre deux CO I et elle se pose donc comme un moyen de contrôle majeur de leur distribution. La fonction biologique de l'interférence reste largement inconnue mais elle pourrait conférer un avantage sélectif grâce à la co-ségrégation de gènes liés (Sun et al., 2017; Wang et al., 2015).

L'interférence ne semble pas être induite dès l'apparition des cassures (Baudat and Nicolas, 1997; Gerton et al., 2000; Mézard et al., 2007). Une modélisation mathématique montre que la mise en route du processus pour une réalisation de CO à un site précurseur donné, déclencherait un signal de polymérisation qui serait ensuite propagé vers l'extérieur jusqu'à ce qu'il rencontre un autre signal de polymérisation provoqué par une désignation de CO se produisant ailleurs (King and Mortimer, 1990). Il semble clair que la continuité d'un chromosome est requise pour transmettre l'interférence (Hillers and Villeneuve, 2003), de même que la distance physique (en  $\mu\text{m}$ ). Il est aussi évident que les éléments axiaux des chromosomes sont essentiels dans la mesure où tous les autres aspects de la recombinaison en dépendent (Zickler and Kleckner, 2015). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que l'interférence dépendait de l'activité catalytique de la Topoisomérase II (Zhang et al., 2014) et que cette protéine jouait un rôle à la fois dans l'interférence et dans l'homéostasie des CO ce qui suggère un processus sous-jacent commun, supportant la relation directe entre les phénomènes qui était initialement proposée. Une autre protéine ASY1, qui se fixe sur tout l'axe chromosomique supprime l'interférence lorsqu'elle est mutée complètement (Lambing et al., 2020). De plus l'étude des plantes hétérozygotes *Asy1<sup>+/−</sup>* montre une relocalisation de la recombinaison vers les régions subtélomériques plutôt que son expansion dans les régions péricentromériques. Les protéines axiales du CS sont aussi impliquées dans la régulation de l'interférence (Capilla-Pérez et al., 2021). La mutation des protéines Zyp1 chez *At* abolie totalement l'interférence et de manière surprenante le nombre de CO augmente avec l'observation fréquente de CO proches. Le CS jouerait donc un rôle primordial dans l'interférence, probablement par le biais de la propagation de son signal et par sa dynamique de « turn-over » protéique.

### 2.2.2.5.2 La voie de formation des CO de type I

Les CO dépendants des ZMM se forment rarement à proximité les uns des autres et sont plus uniformément espacés par rapport à ceux obtenus lors d'une distribution aléatoire (Berchowitz and Copenhaver, 2010). Ces CO sont appelés « interférents » ou « CO de type I ». Ils représentent la fraction majeure, allant de 75 à 100 % de la totalité des CO. En l'absence des protéines ZMM chez la levure, une diminution des SEI (single-end invasion) et des dJH est observée, simultanément à la diminution des CO sauf aux points chauds (Pyatnitskaya et al., 2019). Les auteurs de cet article proposent que les ZMM stabiliseraient les D-loops pour les convertir en un IR plus stable, le SEI, qui peut être détecté sur des gels bidimensionnels (Hunter and Kleckner, 2001). Cet IR est le précurseur des CO. Il est stabilisé puis résolu en tant que CO par l'activité d'endonucléase du complexe MutLy (Mlh1-Mlh3) (Nishant et al., 2008; Zakharyevich et al., 2012). Il est difficile d'estimer génétiquement avec précision les fréquences de CO chez les mutants *zmm*, car la viabilité de leurs spores est réduite. En utilisant les hybrides de levure, plusieurs études ont montré une réduction allant de 34 à 60 % et confirmé que les CO n'interfèrent plus (Chen et al., 2008; Mancera et al., 2008; Marsolier-Kergoat et al., 2018; Oke et al., 2014; Sym and Roeder, 1994). Toutefois, la réduction du nombre de CO n'est pas égale sur tous les chromosomes et varie en fonction de leur taille. En conséquence, le nombre de CO est plus réduit sur les petits chromosomes (comme le chromosome III) que sur les grands chromosomes (comme le chromosome VIII). Les mutants *zmm* peuvent avoir plus de CO que dans le type sauvage (Capilla-Pérez et al., 2021; Chen et al., 2015; Serrentino and Borde, 2012). Une hypothèse est que l'absence de synapse entraîne une activité continue de la protéine SPO11 en augmentant de manière disproportionnée les CDB le long des chromosomes les plus grands (Keeney et al., 2014; Subramanian et al., 2019; Thacker et al., 2014). Les ZMM, stabilisent les IR et notamment le SEI. Le SEI qui est le précurseur des CO, est fixé par le complexe MutSy (MSH4-MSH5) qui empêche les hélicases de le dissoudre et de l'orienter vers la conversion génique (Jessop et al., 2006; Oh et al., 2007). Cet IR stabilisé, est ensuite transformé en un dHJ protégée qui sera exclusivement résolu comme un CO par l'activité endonucléasique du complexe MutLy (Mlh1-Mlh3) (Zakharyevich et al., 2012). Les protéines des complexes MutSy et MutLy appartiennent à la famille des protéines de la réparation des mésappariements, néanmoins les protéines MutSy n'ont plus le domaine I leur permettant la recherche de l'homologie sur l'ADN et jouent un rôle stabilisateur des IR (Manhart et Alani 2016). D'autres protéines de cette famille comme MSH2, agissent dans la recherche de l'homologue qui lui ressemble mais de manière relative avec un certain dosage de polymorphisme (Blackwell et al., 2020). En cas d'insuffisance en CO, la cellule met en œuvre d'autres voies lui permettant à tout prix de rétablir cette homéostasie car le CO est critique pour la bonne segregation des chromosomes.

### 2.2.2.5.3 Les voies de secours de la résolution de la recombinaison

La voie de formation des CO de type II (non-interférents) implique la protéine MUS81 (Methyl metanosulfate (MMS) UV Sensitive 81) qui a d'abord été décrite pour son rôle dans la réparation de l'ADN soumis au MMS. Le MMS est un agent alkylant (Interthal and Heyer, 2000), qui induit des liaisons croisées (cross-links) au niveau des guanines ce qui fige la structure de l'ADN et bloque les machineries de transcription et réplication. Les UV induisent la création de dimères de thymine et pyrimidine ainsi que des bases déformées. Ces bases ont la même conséquence que le MMS et donnent lieu à des fourches de réplication arrêtées. La protéine MUS81 agit sous forme d'hétéro-dimère avec la protéine EME1 et cible les substrats *in vitro* qui miment les fourches de réplication arrêtées et les jonctions de Holliday coupées (Ciccio et al., 2008; Ehmsen and Heyer, 2008; Fricke et al., 2005; Interthal and Heyer, 2000). Elle les convertit en CDB (Regairaz et al., 2011), qui sont prises en charge par les mécanismes de réparation qui vont induire une résection et *in fine* rétablir la fourche de réplication qui pourra à nouveau démarrer. L'implication de la protéine au niveau de la méiose est drastiquement différente

selon les eucaryotes concernés. En effet chez *S. pombe* la mutation de *mus81* conduit à une stérilité complète (Boddy et al., 2001). Ainsi tous les CO chez cette espèce sont insensibles à l'interférence et utilisent la voie II des CO. *A contrario*, chez *C. elegans* et chez la drosophile, la mutation de *mus81* n'a pas d'effet sur la fertilité (Hillers and Villeneuve, 2003; Meneely et al., 2002; Zhao et al., 1995) ce qui suggère que ces deux espèces ne sont soumises qu'à des CO interférents. Chez *A. thaliana*, les mutations de *msh4*, *msh5* ou *mer3*, réduisent de 85% le nombre de CO, ce qui suggère que les 15% restants sont pris en charge par la voie des CO de type II. Chez un mutant *mus81*, la viabilité du pollen est significativement affectée ce qui confirme le rôle méiotique de la protéine MUS81 (Berchowitz et al., 2007). De plus ils mettent en évidence une diminution de la recombinaison méiotique et des CO non interférents chez ce même mutant. Le substrat utilisé chez *S. pombe* pour réaliser des CO est la jonction de Holliday simple (sjH) alors que chez *S. cerevisiae*, le substrat de prédilection est la djH. Comme *S. pombe* n'utilise que la voie II des CO, une des hypothèses serait que le substrat préférentiel du complexe MUS81 serait la sjH. Une autre hypothèse serait que chez les espèces qui utilisent les deux voies de CO, la voie II serait une voie de secours permettant d'avoir suffisamment de CO à l'arrivée et de bien réparer tous les IR. Les doubles mutants de levure *zmm* et *mus81* possèdent encore des CO résiduels.

La résolution des IR contenant des jonctions de Holliday (HJ) est essentielle pour la maintenance du génome et la ségrégation correcte des chromosomes. De ce fait d'autres protéines de type resolvases sont impliquées dans la résolution des IR (Sarbjana et al., 2014). On les appelle Endonucléases à structure spécifique. Parmi elles la resolvase Yen1(GEN1) est strictement activée au début de l'anaphase II (Arter et al., 2018)Figure 26).

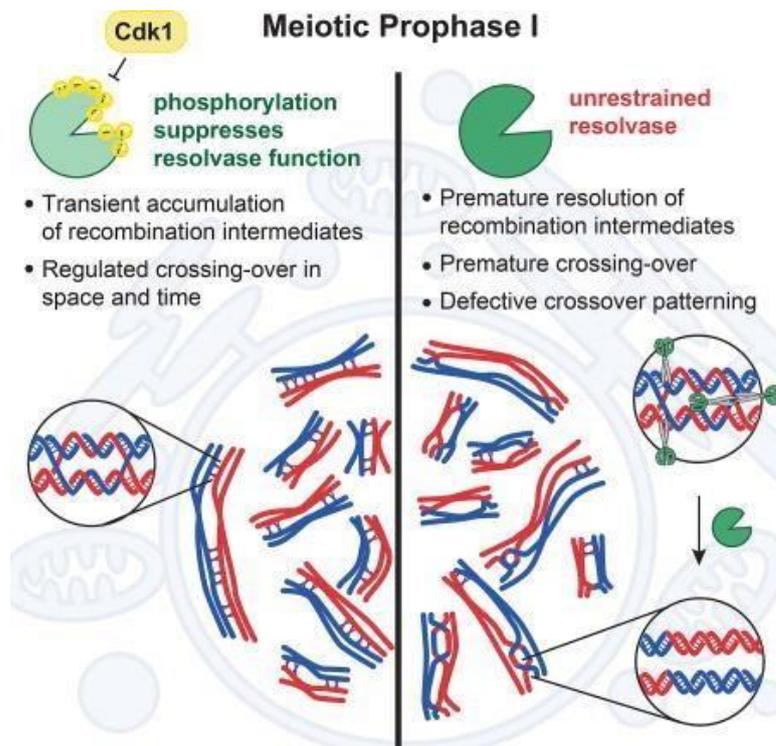


Figure 26 L'endonucléase Yen1 de secours finement régulée en méiose

A gauche, l'inactivation par phosphorylation de la resolvase Yen1 par CDK1, pendant la prophase I, évite la résolution précoce des IR pour permettre la formation contrôlée de CO dans tout le génome. Cependant en cas de levée d'inhibition de l'activité de Yen1, on retrouve une résolution prématurée des IR, des profils de CO modifiés. (Arter et al., 2018).

On ignore si l'activation contrôlée de Yen1 est importante pour l'homéostasie des CO méiotiques, mais la phosphorylation de Yen1 médiée par la CDK empêche son recrutement généralisé aux IR pendant la prophase I. Les mutants de Yen1 qui sont réfractaires à la phosphorylation résolvent prématurément les molécules de jonction de l'ADN et forment des CO indépendamment de MutL $\gamma$ , la résolvasse centrale des CO pendant la méiose. La suractivation de Yen1 altère la distribution spatiale des événements de CO, à l'échelle du génome. Ainsi, la suppression active de la fonction de Yen1, et par inférence également des résolvases Mus81-Mms4(EME1) et Slx1-Slx4(BTBD12), évite la résolution précoce des IR et une invasion de CO non interférents. Dans la grande majorité des cas, la résolution des IR aboutit à la formation de NCO. En effet bien que le CO soit essentiel, il doit rester un événement rare et très contrôlé car il est dangereux pour l'intégrité cellulaire.

#### 2.2.2.5.4 Formation des NCO conversion de gène

Un NCO est un produit issu de la recombinaison qui consiste en un échange de quelques centaines de paires de bases entre deux chromatides. Il ne concerne qu'une seule chromatide alors qu'un CO va impliquer la modification de deux chromatides. Si la voie des CO est fréquente lors de la méiose, un nombre variable de CDB est résolu en NCO. Bien que les NCO, n'impliquent que de courtes séquences d'ADN (jusqu'à 1kb chez les mammifères ; (Chen et al., 2007)) et que leur effet soit ponctuel, leur fréquence plus élevée se traduit par une contribution environ deux fois plus importante que celle des CO au brassage des allèles et à la distorsion de transmission basés sur la conversion génique (Cole et al., 2012). Chez la souris, ils retrouvent dans cette étude près de 90 % des événements de recombinaison qui correspondent à des NCO. Différentes voies sont adoptées pour la réparation des CDB en NCO. En effet, les acteurs moléculaires peuvent agir à différentes échelles de la cinétique de la recombinaison : avant l'invasion du nucléofilament DMC1/RAD51, à la suite de la formation du SEI, à la suite du SEC et la formation de la djH. Sur le schéma ci-dessous, on peut voir la redondance d'action de différentes protéines. Le complexe TR (Top3 Topoisomérase III /Rmi1 RecQ4-Mediated Instability 1) qui conduit à la voie SDSA va aussi agir en aval de la djH (Kaur et al., 2015).

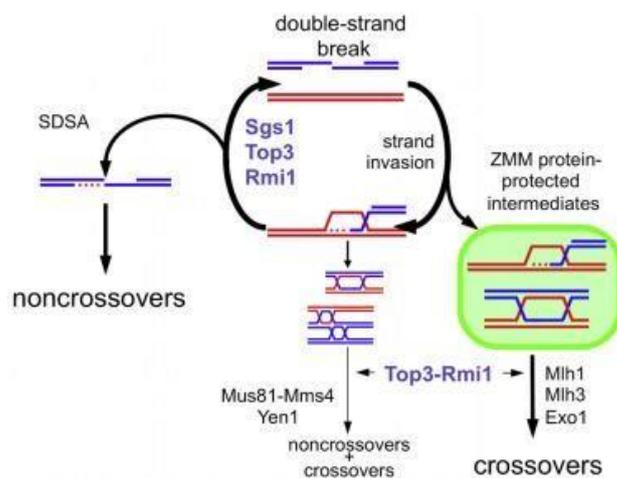


Figure 27 Différents rôles de Top3 Rmi1 dans la redirection vers les NCO

(A) Modèle de chaperon IR pour l'activité de Sgs1-Top3-Rmi1 pendant la méiose. L'activité combinée de Sgs1 et Top3-Rmi1 désassemble les IR ramifiés. Le désassemblage des IR à brin précoce facilite la formation de NCO par SDSA ou le retour des événements à l'état initial de la DSB, facilitant la capture et la stabilisation par les protéines ZMM et la formation de djH par capture de la seconde extrémité.(Kaur et al., 2015).

L'objectif est bien de prendre en charge les IR car ils sont dangereux pour la cellule s'ils ne sont pas résolus.

#### 2.2.2.5.4.1 Dissolution de la D-loop : orientation vers le SDSA

Des études conduites chez *S. cerevisiae* suggèrent que les NCO apparaîtraient plus tôt que la formation des doubles jonctions de Holliday (dJH) et donc avant les CO (Allers and Lichten, 2001). Les deux voies sont identiques jusqu'à la formation de la D-loop (McMahill et al., 2007) mais l'hélicase SRS2 empêche la formation des dJH ce qui permet à la voie SDSA d'agir (Miura et al., 2012). Le bras invasif 3' est rallongé ce qui déplace la D-loop jusqu'à induire le décrochement du brin néo-synthétisé qui peut revenir s'apparier sur la molécule originale. La synthèse des brins complémentaires peut alors reprendre dans les deux sens pour combler les espaces et produire un évènement de NCO.

La voie de formation des NCO par SDSA reste très mal connue, la protéine RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1) a été identifiée comme favorisant la formation par ce biais de NCO chez *C. elegans* (Uringa et al., 2011). Alors que chez cette espèce, il n'y a qu'un seul CO par paire d'homologues chez des individus sauvages, les mutants *rte1* ont des taux de doubles et triples CO qui atteignent respectivement 14% et 2% ce qui confirme que l'interférence est complètement abolie dans ces cas et qui suggère que toutes les CDB deviennent des CO (Youds et al., 2010). Les analyses d'activité de RTEL1 *in vitro* en présence de RAD51 et RPA, confirment son rôle dans le déplacement de l'invasion transitoire du brin lors de la formation de la D-loop. RTEL1 régulerait donc ainsi la recombinaison méiotique et l'homéostasie des CO chez *C. elegans* en favorisant la réparation des cassures sous forme de NCO par la voie SDSA.

D'autres protéines ont été montrées comme impactant favorablement la formation des NCO au détriment des CO. Par exemple, la protéine SGS1 (slow growth suppressor 1) de levure est une hélicase apparentée à la protéine BLM humaine impliquée dans le syndrome de Bloom (De Muyt et al., 2012). SGS1 est l'un des principaux régulateurs des évènements de recombinaison chez la levure (Ira et al., 2003). SGS1 forme un complexe (appelé STR par analogie avec les initiales des trois protéines qui le compose) avec le dimère qui catalyse le passage de l'ADN simple-brin formé de la (Top3) et de RMI1 vu précédemment. Ce complexe favorise la formation précoce de NCO par SDSA lors de la méiose (Kaur et al., 2015).

Le complexe STR est aussi appelé BTR ou RTR lorsque respectivement les hélicases, BLM ou RECQ4 remplacent SGS1, ou RTB/BTB lorsque la protéine BLAP75 orthologue de RMI1 est présente. Chez *At*, l'orthologue de SGS1 est RECQ4 (Hartung and Puchta, 2006). Les protéines RECQ sont des hélicases ATP- et ADN-dépendantes qui séparent les ADN double brin dans le sens 3'-5' (Kaiser et al., 2017). Elles modifient la conformation de l'ADN en bloquant le filament présynaptique dépendant de RAD51 et en perturbant la formation des D-loops ce qui entraîne la dissolution des dJH. Des hémi-caténares seraient formés et serviraient de substrat à TOPOIII. Il y a deux copies fonctionnelles de RECQ4 chez *Arabidopsis*, RECQ4A et RECQ4B (Hartung and Puchta, 2006), mais seule la copie A complémente le mutant *sgs1* de levure ce qui suggère que les deux copies ont une divergence fonctionnelle (BagheriehNajjar et al., 2005). Chez *At*, la mutation des deux copies A et B de RecQ4 induit une hausse d'un facteur 6 des taux de recombinaison (Séguéla-Arnaud et al., 2015a). Cette effet « anti-crossing-over » de la protéine fonctionnelle RECQ4 est également observé chez la tomate, le pois et le riz (Mieulet et al., 2018 ; de Maagd et al., 2020) (décrit au § ci dessous).

### 2.2.2.5.4.2 Les protéines anti-CO

Il a récemment été montré que des mécanismes actifs limitent la formation des CO de type II chez *Arabidopsis* (Crismani et al., 2012a; Fernandes et al., 2018; Girard et al., 2014a, 2015a; SéguélaArnaud et al., 2015a, 2017; Ziolkowski et al., 2017). Des cribles génétiques basés sur la restauration de la fertilité de mutants de la voie des ZMM (*zip4*, (Crismani et al., 2012a)), ont permis d'identifier différentes protéines ayant des activités anti-CO (Figure 28).

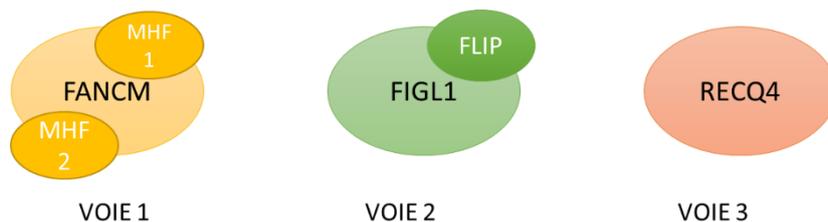


Figure 28 Voies des protéines anti CO et les co-facteurs associés

Par exemple, le gène *Fancm* code pour une hélicase à ADN (Crismani et al., 2012a). La mutation de ce gène induit une hausse de la recombinaison d'un facteur trois mais seulement chez des lignées pures d'*Arabidopsis* et avec un effet très limité chez des hybrides issus de deux écotypes différents (Crismani et al., 2012a, 2012a; Fernandes et al., 2018; Ziolkowski et al., 2017). Cet effet est également observé chez des lignées pures d'une espèce apparentée, *Brassica rapa* (Blary et al., 2018a).

Une autre voie dépend du complexe AAA-ATPase FIDGETIN-Like 1 (FIGL1) qui est une protéine qui est impliquée dans le remodelage, le dépliage, et le désassemblage des protéines (Kumar et al 2019) et de son co-facteur FIDGETIN-LIKE-1 INTERACTING PROTEIN (FLIP). Il agit de manière antagoniste à BRCA2 qui permet le recrutement du nucléofilament RAD51/DMC1 L'effet de la mutation de ce seul gène reste modeste (environ 25% chez des hybrides d'*Arabidopsis*) mais il devient massif lorsqu'il est couplé avec la mutation de RECQ4 en produisant une hausse d'un facteur 7,8 dans la fréquence des CO (Fernandes et al., 2018).

La dernière voie, redirige vers le SDSA mais a aussi un rôle prépondérant dans la modification du nombre de CO. RECQ4, homologue de la protéine humaine BLM et de celle de levure SGS1 (Hartung and Puchta, 2006), produit un effet encore plus important avec une augmentation d'environ quatre fois des taux de recombinaison dans un contexte hybride chez *Arabidopsis* (Fernandes et al., 2018; Serra et al., 2018).

De la même manière, il a été montré que l'augmentation du nombre de copies du gène *Hei10* chez *Arabidopsis* induisait une hausse du nombre de crossing-overs (Serra et al., 2018). La protéine HEI10 est une E3-ligase et les résultats suggèrent qu'elle aurait un effet sur l'interférence. La combinaison des mutations *recq4A*, *recq4B* et *hei10* conduit à une augmentation substantielle du taux de recombinaison. Toutefois, l'augmentation reste cantonnée aux régions sub-téломériques alors que les centromères sont toujours dépourvus de CO.

Ces résultats sont prometteurs pour améliorer les taux de recombinaison chez les espèces de grande culture. Toutefois, des résultats mitigés ont été observés. Par exemple, la mutation de FIGL1 induit une stérilité complète chez le riz (Zhang et al., 2017). Ceci a été vérifié dans une autre étude chez le pois et la tomate ce qui fait naître des doutes sur l'intérêt de manipuler cette protéine chez les espèces d'intérêt (de Maagd et al., 2020; Mieulet et al., 2018a). De façon plus prometteuse, la mutation de la protéine RECQ4 provoque une hausse de la recombinaison chez le riz, le pois et la tomate ce qui fait d'elle un candidat plus pertinent à travailler pour améliorer la recombinaison chez des espèces agronomiques.

### 2.2.2.5.4.3 Qu'est-ce qui guide le choix entre CO ou NCO ?

Chez la levure, la mutation du gène méiose-spécifique NDT80 arrête la méiose au stade pachytène avec les deux homologues connectés par un complexe synaptonémal complet et avec des pôles du fuseau dupliqués mais qui sont restés associés (Xu et al., 1995). La recombinaison méiotique est quasiment normale chez le mutant délété pour *ndt80* même si l'échange hétéro-allélique est multiplié par deux ou trois alors que les CO sont réduits d'un facteur deux par rapport à ceux du type sauvage. Dans le même temps, la mutation *ndt80* provoque une accumulation des molécules de types SEI et djH (Allers and Lichten, 2001). Ceci suggère que la majorité de ces molécules doit évoluer en CO et que la décision de réparer les cassures en CO ou en NCO est prise précocement, avant même l'apparition des premières molécules SEI (Allers and Lichten, 2001; Hunter and Kleckner, 2001).

Les processus de réparation de l'ADN sont coordonnés par plusieurs modifications posttraductionnelles, dont la SUMOylation et l'ubiquitinylation (Hunter, 2015; Pyatnitskaya et al., 2019). Des orthologues de Zip3 ont été découverts dans d'autres organismes, et il apparaît que deux sousgroupes existent au sein de la famille Zip3 : le groupe Zip3/RNF212 et le groupe HEI10. Les plantes, les champignons, *C. elegans* et la drosophile possèdent un seul orthologue de RNF212 ou HEI10 alors que les vertébrés codent pour des espèces distinctes de RNF212 et HEI10. RNF212 est une sumo E3 ligase et HEI10 une ubiquitine E3 ligase qui fonctionnent comme des protéines antagonistes. Ces protéines vont permettre la fixation de ces étiquettes qui vont être reconnues par la cellule et qui vont impliquer soit une orientation vers la dégradation (proteasome 26S ; (Ahuja et al., 2017)) ou bien vont avoir une demi-vie prolongée. Un mécanisme évoqué dans la revue serait que le peptide sumo agirait comme une colle pour consolider les interactions multiples entre les partenaires et promouvoir les CO sur les IR (SEI, SEC, djH...) (Rao et al., 2017). En effet un tel rôle de designation des CO est compatible avec l'observation des nodules de recombinaison visibles en microscopie électronique. Une forte aggrégation de ces protéines serait en faveur du recrutement et de la stabilisation de protéines de type MutSy et MutLy. Chez la souris, les sites marqués par MutSy colocalisent avec les protéines RNF212. L'absence de RNF212 rend instables des facteurs tels que MutSy conduisant à leur dissociation ou à leur dégradation. De même, HEI10 du riz peut interagir avec MSH5, suggérant qu'un mécanisme similaire se produit chez les plantes.

Ainsi, la différenciation des voies de CO et NCO observée au niveau de l'ADN est soutenue par une stabilisation différentielle des facteurs de recombinaison au niveau des protéines. Le CS est une plateforme très dynamique où les protéines sont délocalisées ou stabilisées par les processus de protéolyse via l'ubiquitinylation et de stabilisation via la sumoylation. L'analyse des nodules précoces et tardifs de recombinaison montre que les marqueurs des sites d'initiation des CO apparaissent dès le stade zygotène (Hunter and Kleckner, 2001; Zickler, 1977). Il existe une corrélation entre ces sites et le démarrage de la synapse. Tous ces éléments vont donc en faveur d'une hypothèse de choix précoce (probablement juste avant ou au plus tard lors de l'invasion simple-brin) entre la décision de former un CO ou un NCO même si les mécanismes qui guident ce choix restent obscures.

## 2.2.3 Fréquence et distribution des CO

### 2.2.3.1 Généralités

En génétique, « La théorie de la Chiasmotypie » a été identifiée pour la première fois en 1909 par le professeur Frans Alfons Janssens, cytologiste belge (Kozsul et al., 2012). Ses travaux contiennent la première description de la structure du chiasma. Il observe dans des cellules d'insecte des sites de connexion sur les quatre chromatides au diplotène ou à l'anaphase de la première division méiotique,

deux se croisent et deux ne se croisent pas. Il a donc postulé que les chromatides maternelles et paternelles qui se sont croisées ont pénétré l'une dans l'autre jusqu'à ce qu'elles se brisent et se rejoignent dans les segments maternels et paternels de façon nouvelle ; les deux autres chromatides sont restées libres et donc intactes. Cela lui a permis de proposer également que les chromatides distribués dans les quatre noyaux issus de la deuxième division méiotique avaient diverses combinaisons de segments maternels et paternels de chaque chromosome. Et inversement, cela a permis d'apprécier que les lois de la ségrégation mendélienne exigeaient la rupture et la jonction (le croisement) entre chromatides homologues non sœurs.

De façon intéressante, chez quasiment toutes les espèces, la distribution des événements de recombinaison n'est pas homogène le long des chromosomes, quelle que soit l'échelle.

### 2.2.3.2 A l'échelle du génome

Lors de la méiose, la présence d'au moins un CO par paire de chromosomes homologues est obligatoire pour obtenir leur bonne ségrégation et éviter la formation de gamètes non-équilibrés aneuploïdes à cause de la présence d'univalents (Templado et al., 2013). Au cours de la première division méiotique, la connexion des chromosomes homologues est assurée en particulier par les chiasmata. Si l'un des chiasmata est défectueux, les chromosomes homologues se séparent de manière aléatoire aux pôles, ce qui donne lieu à une aneuploïdie et à des gamètes stériles (IWGSC et al., 2018a) (Kleckner et al., 2012). Ainsi, dans la plupart des organismes, en plus de favoriser la diversité génétique, le chiasma joue un rôle mécanique direct essentiel pour assurer une ségrégation chromosomique méiotique équilibrée et donc la fertilité de l'espèce.

Chez les végétaux, les observations tendent à suggérer qu'il y aurait une sorte de sélection à la fois positive et négative sur le taux de CO (Ritz et al., 2017). Comme mentionné précédemment, il y a une sélection vers un taux minimal dans la mesure où l'absence de CO induit une stérilité due à l'apparition d'aneuploïdes. En revanche, la sélection contre un taux trop élevé paraît moins évidente. La seule hypothèse serait que des taux trop élevés de CO pourraient amener à casser des associations bénéfiques sur un même haplotype (Otto, 2009; Otto and Lenormand, 2002).

Chez l'Homme, il semble y avoir un chiasma par bras chromosomique, et chez les mammifères, le nombre de bras chromosomiques est un bon indicateur du nombre de chiasmata. Le nombre de CO au niveau du génome peut être augmenté artificiellement. Ainsi, l'irradiation aux rayons X pendant les stades leptotène-zygotène chez la sauterelle, augmente la fréquence des chiasmata (Church and Wimber, 1969; Westerman, 1971).

D'une manière universelle, la recombinaison est supprimée au niveau des centromères. Il semble en effet que l'apparition de CO dans ces régions induirait des erreurs de ségrégation et une aneuploïdie accrue engendrant une perte de fertilité (Rockmill et al., 2006; Stewart and Dawson, 2008). *A contrario*, la densité de CO est beaucoup plus forte dans les régions euchromatiques plus denses en séquences codantes (Dluzewska et al., 2018). Ceci pourrait être dû à un état chromatinién favorable facilitant l'accès à l'ADN, particulièrement au moment de la méiose alors que la chromatine est fortement condensée.

### 2.2.3.3 A l'échelle des chromosomes

Plus de 80% des chromosomes montrent moins de trois CO par bivalent, quelle que soit la taille physique du chromosome (Fernandes et al., 2018), y-compris les chromosomes de blé qui font

pratiquement 1 Gb de longueur (IWGSC 2018). Ce taux est comparable au chromosome le plus long d'*Arabidopsis* (31 Mb) et même au plus petit de la levure (0.3 Mb).

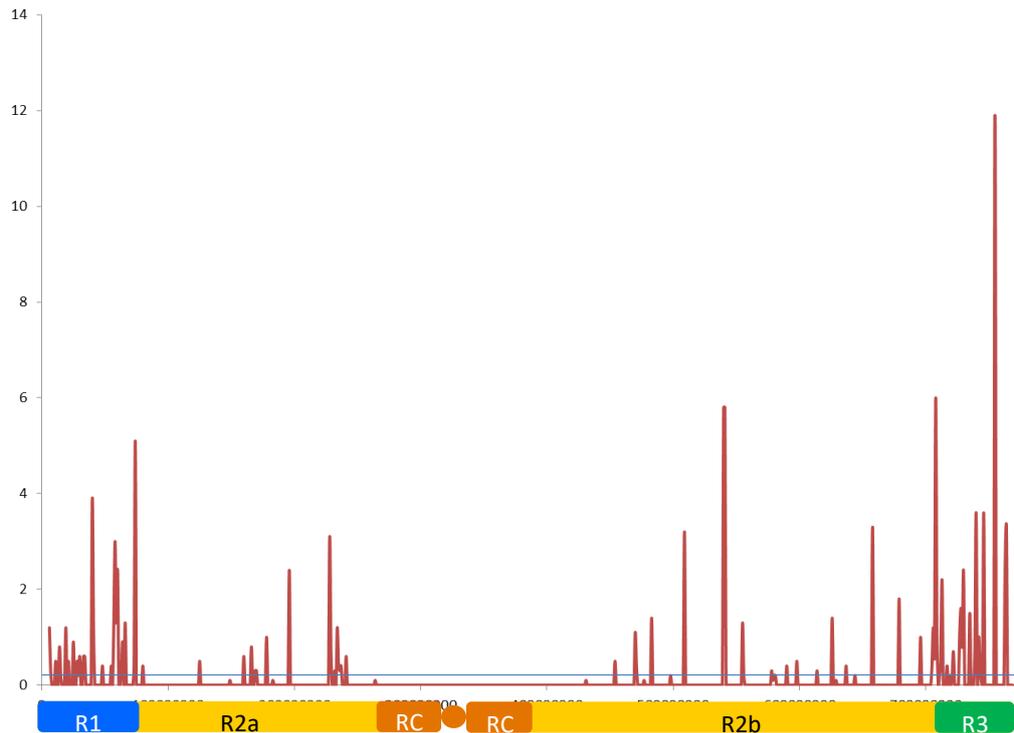


Figure 29 Fréquence de recombinaison du chromosome 3B de blé tendre

Fréquence de recombinaison chez le blé en fenêtre glissante de 10Mb le long du chromosome 3B de blé. Les régions R1 et R3 sont les zones hautement recombinogènes sub-télomériques, les régions R2a et R2b, les régions péri-centromériques faiblement recombinogènes et RC représente la région centromérique d'où la recombinaison est absente.

Chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) comme chez beaucoup d'espèces de Triticées à gros chromosomes, la recombinaison est biaisée et apparaît préférentiellement dans les régions distales alors que les régions péri-centromériques sont quasiment dépourvues de CO (Choulet et al., 2014; Darrier et al., 2017; Saintenac et al., 2009) ; IWGSC 2018 ; Figure 29). Une hypothèse avancée serait que l'initiation de la recombinaison se ferait dans les régions sub-télomériques, en particulier sous l'influence de la création de la structure du bouquet. Ceci est également le cas chez l'orge (Higgins et al., 2012). Cependant, l'utilisation de lignées transloquées de blé chez lesquelles des bras de chromosomes sont inversés (centromère en position télomérique et vice versa) montre que les chiasmata continuent d'apparaître à proximité des télomères indépendamment de leur position ce qui suggérerait plutôt que les fréquences de recombinaison sont prédéterminées le long des chromosomes (Lukaszewski et al., 2012).

De façon surprenante, il a été montré que cette règle de distribution biaisé vers les télomères pouvait être transgressée chez le colza en utilisant des hybrides allo-triploïdes (AAC,  $2n = 3x = 29$ ), issus du croisement entre un allo-tétraploïde (*B. napus*, AAC,  $2n = 4x = 38$ ) et l'un de ses progéniteurs diploïde (*B. rapa*, AA,  $2n = 2x = 20$ ) (Pelé et al., 2017). Des populations de cartographie (AA x AAC avec AA utilisée soit comme mâle, soit comme femelle) ont été produites et près de 3000 CO ont été analysés. Comparativement aux populations diploïdes, les populations allo-triploïdes avec les chromosomes C surnuméraires montrent entre 1.7 et 3.4 fois plus de CO que les populations diploïdes avec seulement les chromosomes du génome A, en fonction du sexe et du fond génétique. De façon intéressante, le profil de recombinaison est également modifié avec des taux de recombinaison élevés dans les régions péri-centromériques qui habituellement, sont peu recombinogènes. De la même façon, l'interférence semble également abolie. Chez les hybrides allo-triploïdes mâles, il paraît probable que ces

changements seraient préférentiellement dus aux CO de classe I. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour l'amélioration de l'espèce et la limitation des phénomènes de « linkage drag » dans les régions autour des centromères.

Ce petit nombre de CO par chromosome n'est pas dû à une réduction du nombre de CDB dans la mesure où celui-ci dépasse de 10 à 50 fois celui de CO (Muyt et al., 2009) mais certains mécanismes empêchent les CDB de devenir des CO. Cette faible variation de fréquence de CO pose la question des forces évolutives qui régulent ce nombre. Une hypothèse est qu'un nombre trop important de CO créerait des contraintes physiques qui nuiraient à la ségrégation optimale des chromosomes (Louis and Borts, 2003). Cependant, cette hypothèse est contredite par des données observées chez *S. pombe*, l'abeille et certains mutants d'*Arabidopsis* qui montrent des nombres de CO par chromosome extrêmement élevés sans défaut méiotique (Mercier et al., 2015). Il semble donc qu'il y ait plutôt un niveau moyen autour d'un CO par chromosome qui soit dicté par des facteurs d'adaptation.

#### **2.2.3.4 Points chauds de recombinaison**

Chez la levure, *Arabidopsis*, le blé et l'Humain, 80% des CO apparaissent dans moins de 25% du génome (Choi et al., 2013, 2013; Mancera et al., 2008; Myers et al., 2006). Les CO sont donc regroupés dans de petites régions de quelques kilobases appelées « points chauds ». Les CDB étant à l'initiation des CO, il apparaîtrait logique d'observer une corrélation positive entre le taux de CDB et le taux de CO. Pourtant, les données sont assez contradictoires. Ainsi, chez le maïs, le nombre de CDB dans les régions hétérochromatiques faiblement recombinogènes est particulièrement élevé (He et al., 2017). De la même façon, chez *At*, la distribution des CDB est bien plus régulière que celle des CO (Choi et al., 2018a; Underwood et al., 2018). Il semble donc que d'autres facteurs gouvernent l'apparition des CO dans certaines régions du génome pour les transformer en points chauds.

Les marques épigénétiques semblent être des acteurs prépondérants pour réparer les CDB en CO, en particulier la méthylation des cytosines et des histones. Ainsi, chez *Arabidopsis* et le maïs, les points chauds de CO montrent un faible taux de méthylation de l'ADN (Choi et al., 2018b; Kianian et al., 2018; Rodgers-Melnick et al., 2015; Underwood et al., 2018). Paradoxalement, l'analyse de la distribution des CO chez des mutants *met1* et *ddm1* d'*Arabidopsis*, deux gènes impliqués dans le maintien des méthylations des cytosines en contexte CG, ne montre pas une augmentation drastique des taux de CO dans les régions péri-centromériques normalement hyperméthylées mais plutôt une redistribution des CO le long des chromosomes ce qui suggérerait un effet sur l'interférence (Melamed-Bessudo and Levy, 2012; Mirouze et al., 2012; Yelina et al., 2012, 2015).

De la même façon, des marques d'histones comme les variants H2A.Z ou l'histone H3 triméthylée sur la lysine 4 (H3K4<sup>me3</sup>) sont des marques associées à des taux de CO élevés chez les eucaryotes (Lawrence et al., 2017). Chez certains mammifères, la marque H3K4<sup>me3</sup> peut être déposée par PRDM9, une protéine à domaine SET avec des doigts de zinc qui reconnaît une séquence spécifique de l'ADN enrichie en motif CTT/CNN avec une périodicité de 3 bases pour la cytosine. PRDM9 va ensuite recruter la machinerie des CDB et orienter la réparation vers des CO (Paigen and Petkov, 2018). De façon intéressante, les points chauds de CO chez les plantes sont également enrichis en motifs CTT/CNN alors même que PRDM9 n'est pas retrouvée (Choi et al., 2013; Darrier et al., 2017; Shilo et al., 2015; Wijnker et al., 2013) et les animaux ayant perdu naturellement ou par mutation PRDM9 voient les CO dirigés vers les régions promotrices également enrichies pour ces motifs (Auton et al., 2013; Brick et al., 2012; Petes, 2001). Cela suggère que ces séquences promotrices enrichies en CTT/CNN sont peut-être les sites ancestraux de points chauds des eucaryotes (Darrier et al., 2017; Lawrence et al., 2017).

## **2.3 Cassure double brin**

### **2.3.1 Historique**

Le modèle de recombinaison méiotique élaboré par Szostak et ses collaborateurs (Szostak et al., 1983) repose sur une initiation du processus par des CDB. Dès la parution du modèle, des études ont rapidement été entreprises afin de résoudre la question des protéines impliquées dans ce mécanisme. Elles ont d'abord été conduites chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) chez qui il est facile de suivre les différents produits issus de la méiose, et pour laquelle une collection de mutants destinée à identifier des gènes impliqués dans la méiose et la formation des spores a été développée et exploitée dès le début des années 1970 (Esposito and Esposito, 1974). L'un des mutants nommé « *spo11-1* » montre un faible niveau de sporulation et ne produit que des asques anormaux ce qui entraîne une viabilité réduite (Esposito and Esposito, 1978). Par ailleurs, les quelques rares produits de méiose observés ne présentent aucun événement de recombinaison ce qui laissait penser que le gène muté était impliqué dans les échanges entre chromosomes homologues. Cette hypothèse a été confirmée par une analyse détaillée de ce mutant qui montre que la recombinaison est réduite d'un facteur 100 chez celui-ci (Klapholz et al., 1985).

Sur la base de ces analyses, un clonage du gène a été effectué et validé par complémentation du mutant (Atcheson et al., 1987). Les analyses montrent que ce gène n'intervient pas en mitose mais exclusivement en méiose et à un stade précoce. Cependant, les faibles quantités d'information dans les bases de données à l'époque n'ont pas permis ni de relier sa séquence à celles d'autres protéines connues comme impliquées dans la recombinaison ou la réparation des cassures, ni d'identifier une fonction quelconque. Il faudra attendre une dizaine d'années supplémentaires pour montrer que cette protéine est associée aux CDB et constitue la sous-unité catalytique de la nucléase qui initie la recombinaison méiotique qui coupe l'ADN en formant un intermédiaire ADN/protéine (Keeney and Kleckner, 1995) et qu'il s'agit d'une sous-unité d'une nouvelle famille de topoisomérases de type II (Bergerat et al., 1997). À la suite de ces travaux, des orthologues de *Spo11* ont été identifiés chez la drosophile, la souris, Arabidopsis, l'Homme (Grelon et al., 2001; McKim and Hayashi-Hagihara, 1998; Romanienko and Camerini-Otero, 2000).

### **2.3.2 Le complexe SPO11**

#### **2.3.2.1 Structure et fonctionnement de la protéine SPO11**

##### **2.3.2.1.1 Structure**

Le clonage et l'analyse détaillée de la structure de la protéine SPO11 indique qu'il s'agit d'une topoisomérase (Bergerat et al., 1997). Les topoisomérases ont pour rôle de modifier la topologie de l'ADN et de défaire des super-enroulements positifs ou négatifs, des compactations ou des noeuds qui engendrent des torsions excessives de l'ADN, en induisant des cassures et des re-ligations, afin de faciliter les mécanismes de la réplication, de la transcription, et la recombinaison de l'ADN (Figure 30).

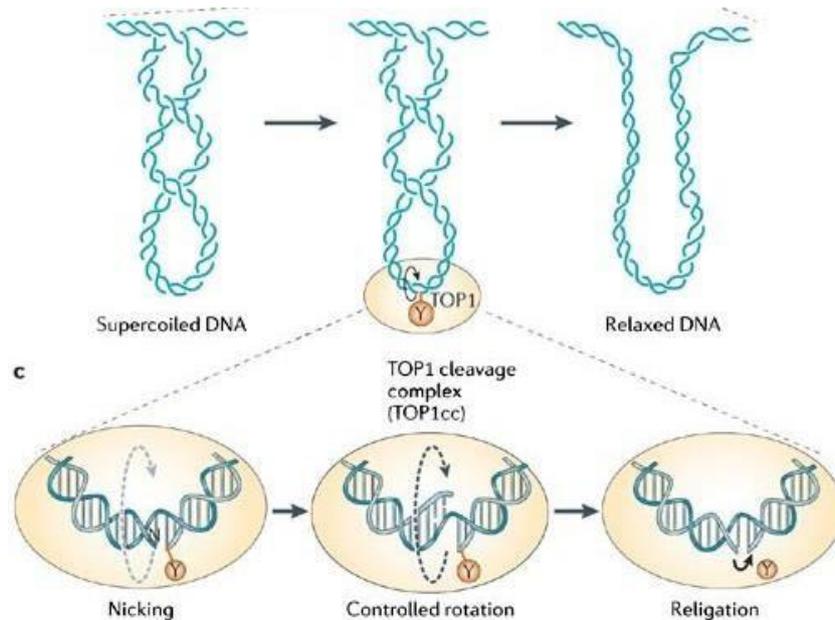


Figure 30 Rôle des TOPI au niveau de l'ADN

Exemple d'effet des topoisomérases de type I sur les modifications de la topologie de l'ADN. Les enzymes topoisomérases 1 (TOP1) sont essentielles chez les eucaryotes supérieurs, car elles sont nécessaires pour détendre le super-enroulement de l'ADN généré par la transcription, la réplication et le remodelage de la chromatine. (Pommier, 2006)

Elle possède les caractéristiques d'une topoisomérase de type II (Bergerat et al., 1997) et en tant que telle, elle génère donc des cassures double-brin (Wang 1996). Elle possède deux domaines protéiques principaux : (1) un domaine de type feuillet hélice  $\square$  qui porte l'activité catalytique via un résidu tyrosine (Tyr-135 chez la levure ; (Bergerat et al., 1997)) et nommé 5Y-CAP ; (2) un domaine constitué de quatre feuillets  $\square$  parallèles encadrés de deux paires d'hélices  $\square$  ayant une vague ressemblance avec une primase d'*E. coli* et appelé Toprim (Aravind et al., 1998).

Une analyse détaillée des résidus aminés essentiels au fonctionnement de cette protéine a été menée chez la levure (Diaz et al., 2002). Outre le résidu Tyr-135, 12 résidus dans trois motifs ont une importance majeure dans l'activité de SPO11. La mutation des résidus Glu-233 ou Asp-288 (respectivement E202 et D225 chez *C. elegans* (Yeh et al., 2017)) du domaine Toprim induit un blocage de la recombinaison. Ces résidus sont impliqués dans la fixation de l'ion  $Mg^{2+}$  ce qui confirme que les coupures SPO11 dépendent de cet ion. De la même façon, le remplacement de l'arginine 131 par une alanine (R131A) entraîne une chute drastique de la recombinaison et réduit à 0,11% le nombre de CDB par rapport au sauvage. Trois autres changements de résidus (E235A, F260R, et D290A) induisent des modifications dans le profil des CDB à un point chaud de recombinaison ce qui suggère que la protéine SPO11 contribue directement au choix des sites de clivage. Au niveau du motif de fixation à l'ADN ils ont aussi identifié la tyrosine 292 qui serait aussi impliquée dans la poche à  $Mg^{2+}$  et qui donne le même phénotype à savoir une absence de CDB et un nombre réduit de spores.

Chez *At*, le mutant *spo11-1* est stérile avec peu de bivalents et une absence de synapse aussi bien chez le mâle que chez la femelle (Grelon et al., 2001). La caractérisation de résidus critiques a aussi été faite chez cette espèce et des acides aminés de la protéine SPO11 impliqués dans la fixation de l'ADN ont été identifiés grâce à l'élaboration d'une protéine recombinante rendu soluble grâce à l'ajout d'un « trigger factor » (Shingu et al., 2010). Les chercheurs ont muté au sein de leur protéine recombinantes SPO11-1 des résidus conservés avec la protéine TopVIA de l'archée-bactérie *Methanococcus jannaschii*. Ils ont démontré à l'aide de la technique du gel retard (EMSA), que les résidus G215, R222, R226 sont essentiels à la fixation de la protéine à l'ADN et à l'activité de la protéine car les plantes contenant ces mutations dirigées sont stériles. L'acide aminé G215 dont l'équivalent est le G290 chez *C. elegans* est impliqué dans la régulation de la conformation de la protéine (Yeh et al., 2017). Le résidu

R130 est aussi critique pour l'activité de la protéine mais pas pour la fixation à l'ADN (Shingu et al., 2010).

Chez le blé tendre, il existe trois copies homéologues (*TaSpo11-1-5A*, *TaSpo11-1-5B*, *TaSpo11-1-5D*) du fait de l'hexaploïdie (Da Ines et al., 2020a). Ces trois copies sont très similaires (93-95% d'identité) et les copies des génomes A et D sont identiques à celles des progéniteurs ancestraux *T. monococcum ssp urartu* (AA) et *Ae. tauschii* (DD) ce qui suggère que les trois copies sont fonctionnelles et redondantes. Une analyse phylogénétique de 105 espèces végétales montre un partitionnement évident entre monocotylédones et dicotylédones mais les sept motifs principaux restent parfaitement conservés entre les deux genres. De ce fait, bien que la copie *TaSpo11-1-5D* n'ait que 55% d'identité avec celle d'*Arabidopsis* (At), l'ADNc de blé parvient à restaurer significativement la fertilité du mutant *Atspo11-1* ce qui indique une conservation de la fonction et une capacité à reformer le complexe même chez une espèce distante.

### 2.3.2.1.2 Fonctionnement

Une caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe SPO11 a récemment été menée chez la levure (Claeys Bouuaert et al., 2021a, 2021b). SPO11 a été purifiée avec trois autres protéines du complexe, REC102, REC104 et SKI8 ce qui a permis de caractériser la stoechiométrie du complexe *in vitro* et d'évaluer l'effet de différentes mutations sur l'activité catalytique et la modification du profil de cassure *in vivo*. Ces quatre protéines constituent le core-complexe SPO11 et sont absolument nécessaires pour assurer une bonne solubilité de SPO11. De façon surprenante, une stoechiométrie 1:1:1:1 de ces quatre protéines est observée alors que deux sous-unités SPO11 sont nécessaires pour réaliser les cassures et jusqu'à présent, les données suggéraient un fonctionnement des complexes TOPOVI en dimères ( $A_2B_2$  et donc attendu 2:2:2:2 ; (Corbett et al., 2007; Forterre et al., 2007; Graille et al., 2008)). L'analyse des domaines suggère que l'association de REC102 (domaine « transducer ») et REC104 (domaine « GHKL ») pourrait correspondre à la protéine TOPOVIB de souris ou MTOPVIB de plantes qui possèdent les deux domaines simultanément (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016).

Chez la souris et *Arabidopsis*, le modèle de complexe sous forme d'un hétéro-tétramère avec deux sous-unités A et deux sous-unités B reste probable (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016). Chez la levure, la forme active de SPO11 en dimère *in vivo* pourrait n'apparaître qu'au moment où REC114 recrute le complexe sur l'axe des chromosomes. Les protéines REC114, MEI4 et MER2 forment un complexe (RMM) qui se fixerait à l'ADN et attirerait ultérieurement le complexe SPO11 (Claeys Bouuaert et al., 2021a). Cela confirmerait que la coupure double-brin se fait par l'intermédiaire d'une structure ADN-protéine fixée de façon stable (Keeney and Kleckner, 1995; Liu et al., 1995). La coupure génère alors une extrémité 5' avec deux nucléotides simple-brin (Buhler et al., 2001, 2007; Liu et al., 1995) qui peut être ensuite maturée en ADN simple-brin pour aller envahir une chromatide homologue. Chez *Arabidopsis*, les orthogues de REC114, MEI4 et MER2 sont respectivement PHS1, PRD2 et PRD3 et leur mutation affecte également la formation des CDB (pour revue, voir Kim et Choi 2019). Cependant, la protéine PRD1 (orthologue de MEI1 de levure) jouerait un rôle de plateforme entre les complexes SPO11 et RMM (De Muyt et al., 2007; Kim and Choi, 2019; Tang et al., 2017).

### 2.3.2.2 La protéine MTOPVIB

Jusqu'à récemment, aucune sous-unité B (Topo-VIB) n'avait été identifiée chez des eucaryotes. Cette sous-unité contient un domaine de liaison à l'ATP (domaine de Bergerat) caractéristique de la famille des GHKL (Gyrase, HSP90, Histidine Kinase, MutL ;(Bergerat et al., 1997; Dutta and Inouye,

2000)), et un domaine transducteur en position C-Ter qui transfère les changements de conformation induits par la liaison à l'ATP et l'hydrolyse du domaine GHKL, aux sous-unités A (Bates et al., 2011).

Cette sous-unité a été isolée simultanément chez *Arabidopsis* (MTOPIVIB ; (Vrielynck et al., 2016)) et la souris (TOPOVIB-L ; (Robert et al., 2016) ; Figure 31).

La protéine est caractérisée par quatre motifs très conservés (b1 à b4) et elle montre une bonne conservation structurale avec les protéines TOPOVIB d'*archae*. Une analyse des interactions entre les protéines MTOPIVIB, SPO11-1 et SPO11-2 chez *At* montre la liaison entre les 149 derniers aa de MTOPIVIB et les régions N-Ter de SPO11-1 (54 aa) et de SPO11-2 (22 aa). La présence de MTOPIVIB est indispensable pour que SPO11-1 et SPO11-2 puissent former un hétérodimère. Chez *At*, la mutation du gène *MTOPIVIB* induit une stérilité quasi complète avec des défauts de développement des gamètes (Vrielynck et al., 2016).

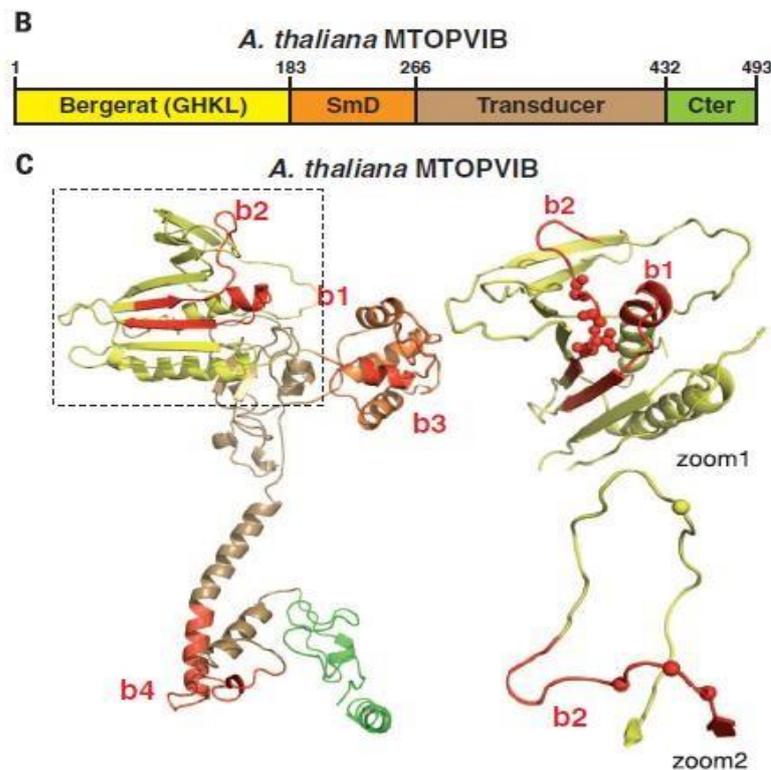


Figure 31 Structure 3D de la topoisomérase AtMTOPIVIB

(Vrielynck et al., 2016)

### 2.3.2.3 SPO11-2, une protéine du complexe spécifique des végétaux

En 2000, deux protéines SPO11 ont été identifiées chez *A. thaliana* : SPO11-1 et SPO11-2 (Hartung and Puchta, 2001). D'un point de vue évolutif, les deux gènes sont relativement différents (28% d'identité) ce qui suggère qu'ils ne dérivent pas d'une duplication récente chez les plantes supérieures. Cependant, les deux protéines possèdent les cinq motifs essentiels (Bergerat et al., 1997) avec 26-41% d'identité dans les motifs ce qui confirme leur homologie avec la famille *Spo11*. *AtSPO11* possède 12 exons et 11 introns pour une séquence codante de 1152 pb soit 383 acides aminés avec 21-29% d'identité avec différentes séquences de *Spo11* (Hartung and Puchta, 2001).

Stacey et collaborateurs (Stacey et al., 2006), se sont focalisés sur les mutants *spo11-2* et le double mutant *spo11-1* et *spo11-2*. Ils concluent que la protéine SPO11-2 est nécessaire tout comme son paralogue SPO11-1 à l'initiation de la méiose. De plus, leur double mutant hétérozygote est aussi stérile. Ils expliquent cette observation par le phénomène de non-complémentation non-allélique, phénomène qui traduit l'interaction physique entre les protéines des gènes mutés ce qui leur permet de conclure que ces protéines travaillent au sein d'un même complexe et s'hétéro-dimérisent (Stacey et al., 2006).

Une analyse complémentaire confirme que *AtSpo11-2* est nécessaire pour assurer la fertilité des plantes et sa mutation induit la formation régulière de gamètes aneuploïdes (Hartung et al., 2007). L'étude de doubles mutants *Atspo11-1/Atspo11-2* confirme également que ces deux gènes interviennent dans la même étape précoce de la méiose et dans les CDB. Contrairement à l'analyse précédente (Stacey et al., 2006), ils démontrent que leur double mutant hétérozygote est bien fertile et que la descendance hétérozygote de celui-ci donne systématiquement des plantes fertiles au moins sur trois générations. Ils mettent en avant que les deux locus sont épistatiques et que par conséquent, ils interagissent au niveau génétique. De plus ils utilisent aussi de la mutagenèse dirigée en direction de la tyrosine conservée chez *Spo11-1* (Y103) et *Spo11-2* (Y124) et démontrent que ces résidus sont requis pour l'induction des CDB. Les deux protéines SPO11 d'*Arabidopsis* sont donc non redondantes et toutes les deux nécessaires à l'initiation de la méiose.

L'analyse de doubles hybrides de levure montre que les protéines SPO11-1 et SPO11-2 interagissent pour former un hétérodimère mais uniquement en présence de la protéine MTOPVIB (Vrielinck et al., 2016).

Une étude similaire a été menée chez le riz (Fayos et al., 2020) pour montrer que la protéine OsSPO112 joue bien le même rôle chez le riz que chez les autres espèces.

### **2.3.2.4 Les autres protéines SPO11 chez les végétaux**

#### **2.3.2.4.1 SPO11-3**

Les plantes possèdent un troisième homologue de *Spo11* en plus de *Spo11-1* et *Spo11-2*, appelé *Spo11-3* (Hartung and Puchta, 2001). Cette universalité confirme que les différentes copies de *Spo11* ne dérivent pas de duplications récentes mais plutôt d'événements plus anciens. Chez *Arabidopsis*, sa structure est relativement simple avec seulement un intron au lieu de 15 et 11 respectivement pour *Spo11-1* et *Spo11-2*. Comme *Spo11-1* et *Spo11-2*, *Spo11-3* possède les cinq motifs conservés des topoisomérases (Bergerat et al., 1997). Ce gène est exprimé relativement fortement dans la plupart des tissus analysés contraire aux deux homologues qui restent spécifiques des organes floraux et avec des taux d'expression assez bas. La protéine SPO11-3 interagit significativement avec la topoisomérase 6 (*AtTop6B*). Ces deux protéines pourraient donc être des partenaires *in planta* où elles pourraient assurer une fonction topoisomérase mais plutôt dans des cellules somatiques (Hartung and Puchta, 2006).

De façon à confirmer et préciser son action, une étude plus détaillée sur des mutants de *Atspo11-3* et *Attop6B* a été menée (Hartung et al., 2002). Les mutants montrent un retard important lors de la croissance avec des cotylédons de petite taille et jamais plus de deux petites paires de feuilles par rosette. Rapidement, les plantes jaunissent et meurent en général au bout de quatre ou cinq semaines. La réalisation d'une protéine de fusion avec la GSP montre que la protéine AtSPO11-3 est adressée vers le noyau. Une analyse en microscopie électronique des mutants entre sept et 14 jours après germination montre la présence de gros agglomérats de corps protéiques. Chez les mutants âgés de deux semaines, il y a dégradation des chloroplastes et des autres organelles. L'endoréduplication est stoppée au stade 8C et s'accompagne d'une réduction de la quantité d'ADN ce qui suggère que ce processus n'est pas complètement réalisé. La réalisation du double mutant *Atspo11-3* et *Attop6B*

montre qu'il présente le même phénotype que les deux mutants individuels de qui indique que ces deux gènes sont impliqués dans le même processus induisant une réduction drastique de la prolifération cellulaire (Hartung et al., 2002).

### 2.3.2.4.2 SPO11-4 et SPO11-5

Chez le riz, deux autres copies homologues de *Spo11* ont été identifiées : *OsSpo11-4* et *OsSpo115* (An et al., 2011). Pour l'instant, elles restent spécifiques de cette espèce. Une approche doublehybride de levure révèle que la protéine OsSPO11-4 est capable d'interagir *in vitro* avec OsTOPVIB ce qui n'est pas le cas pour OsSPO11-5. *OsSpo11-5* n'est donc probablement pas impliqué dans la méiose. Toujours *in vitro*, OsSPO11-4 semble avoir une activité catalytique sur de l'ADN double-brin induisant une coupure de la molécule. Cette cassure dépend de la concentration en ions  $Mg^{2+}$  mais est indépendante de OsTOPVIB malgré leur interaction. Une réduction d'activité de OsSPO11-4 entraîne des défauts dans la méiose mâle ce qui suggère son implication dans ce processus (An et al., 2011). Cette activité dans la réalisation des CDB a été retrouvée en exploitant un système hétérologue chez la drosophile (Shingu et al., 2012).

Cependant, deux autres études portant sur l'analyse de la sous-unité OsMTOPVIB chez le riz observent des résultats contradictoires quant à l'interaction entre cette protéine et OsSPO11-4 (Fu et al., 2016; Xue et al., 2016). Une analyse récente utilisant une approche d'extinction de fonction via un système CRISPR/Cas9 a permis d'élucider définitivement la question (Fayos et al., 2020). Chez des mutants *Osspo11-4* homozygotes, une progression de la méiose équivalente à celle d'un individu sauvage est observée. Il n'y a aucun défaut dans la formation des tétrades et seulement une perte légère de fertilité (12%). Le nombre de foyers DMC1 reste inchangé (~100/méiocyte) ce qui indique clairement que *OsSpo11-4* n'est pas impliqué dans la formation des cassures et plus généralement dans la méiose chez le riz.

## 2.3.3 Autres protéines impliquées dans les CDB

Chez la levure, le fonctionnement correct du complexe SPO11 nécessite neuf autres protéines : RAD50, MRE11, XRS2, REC102, REC104, REC114, SKI8, MER2, MEI4 (Keeney et al., 2007 ; pour revue voir (de Massy, 2013)). Nous avons vu précédemment (§2.3.2.1.2 page 48) que SPO11, REC102, REC104 et SKI8 forment le core-complexe SPO11 (Claeys Bouuaert et al., 2021a, 2021b), REC102/REC104 correspondant probablement à la sous-unité B (MTOPVIB de plante, MTOPOVIB-L de souris) et SPO11/SKI8 à la sous-unité A (SPO11-1/SPO11-2 de plante, dimère SPO11 d'animaux ; (Vrielynck et al., 2016)). Les protéines REC114, MEI4 et MER2 (complexe RMM, respectivement PHS1, PRD2 et PRD3 d'*Arabidopsis*) servent de plateforme pour le complexe SPO11 chez la levure (Claeys Bouuaert et al., 2021a) alors que la protéine PRD1 (orthologue de MEI1 de levure) d'*Arabidopsis* sert d'intermédiaire entre les deux complexes chez les plantes (Kim and Choi, 2019). Cependant, ces protéines sont parfois mal conservées en termes de séquences entre les espèces et des divergences de fonctions sont également notées. Par exemple, l'orthologue de *Ski8* n'est pas requis pour la recombinaison méiotique chez *Arabidopsis* (Jolivet et al., 2006).

Les protéines MRE11, RAD50, XRS2 forment le complexe MRX (ou MRN chez l'Humain, XRS2 étant remplacé par NBS1 ; (Connelly and Leach, 2002)). Ce complexe est bien conservé chez les eucaryotes et il a la capacité de se fixer aux extrémités libres des molécules d'ADN pour y réaliser certaines modifications. Chez la levure, la mutation de l'une de ces trois protéines induit une déficience de la recombinaison, un mauvais assemblage du complexe synaptonémal et donc une perte de viabilité des spores. Il en a été déduit qu'elles interviennent dans la formation des CDB (revue dans (Keeney, 2001b)). La mutation de *AtRad50* chez *Arabidopsis* induit une fragmentation des chromosomes qui se

traduit finalement par la production de polyades avec des contenus en ADN variables et une stérilité mâle et femelle massive (Bleuyard et al., 2004). Pourtant, *AtRad50* n'est pas nécessaire à la réalisation des CDB chez cette espèce (Mercier et al., 2015). L'implication du complexe MRX dans les CDB chez la levure est encore débattue, une hypothèse étant que sa présence faciliterait la coordination entre coupure et résection pour une réparation efficace des CDB (Borde et al., 2004).

Chez la souris, il a été montré que la mutation du gène *Mei1* induit le même phénotype que la mutation de *Spo11* ce qui suggère son implication dans la formation des CDB (Reinholdt and Schimenti, 2005). La mutation de cette protéine chez l'Humain conduit à de l'azoospermie (Sato et al., 2006). L'orthologue de *Mei1* chez *Arabidopsis* est *Prd1* dont la mutation produit systématiquement des univalents (Grelon et al., 2003). *Mei1/Prd1* serait donc impliqué dans la formation des CDB chez ces deux espèces. De façon similaire, *Crc1* joue un rôle dans les CDB chez le riz par le biais d'une interaction avec *Pair1* (*Prd3* chez *Arabidopsis* ; (Miao et al., 2013)). Pourtant, *Pch2*, l'orthologue de *Crc1* chez la levure, n'est pas impliqué dans les CDB chez cette espèce (Börner et al., 2008). Il reste donc encore beaucoup à faire pour complètement élucider le processus qui gouverne la réalisation et la régulation des CDB chez toutes les espèces, qu'elles soient modèles ou d'intérêt.

### **2.3.4 Fréquence et distribution des CDB**

La fréquence des CDB varie largement le long des chromosomes des eucaryotes avec des points chauds contrôlés par des caractéristiques des séquences d'ADN. Chez la levure, aucune séquence consensus n'a été trouvée aux sites préférentiels de coupure ce qui suggère que cette activité de coupure n'a pas réellement de spécificité de séquence (de Massy et al., 1995). Des approches de purification et de séquençage des oligonucléotides liés à SPO11 (soit environ 20-40 nucléotides) ont contribué à fournir des profils de CDB chez les levures et la souris (Fowler et al., 2014; Lange et al., 2016; Pan et al., 2011). Les CDB et les CO qui en découlent sont souvent concentrés dans des petites régions de 1 à 2 kb dont la composition nucléotidique et la structure en termes de marques épigénétiques peuvent varier (Baudat et al., 2013; Choi and Henderson, 2015; Kauppi et al., 2004). Par exemple, chez *S. cerevisiae*, les points chauds de CDB apparaissent préférentiellement dans des régions sans chromatosomes, plutôt dans des promoteurs mais rarement dans des exons ou des terminateurs de gènes (Fan and Petes, 1996; Pan et al., 2011; Wu and Lichten, 1995). Chez cette même espèce, la composition en bases, la structure des chromosomes, la fixation des facteurs de transcription et la phosphorylation ATM/ATR-dépendante modifient la fréquence des CDB (pour revue, (Cooper et al., 2016; Lam and Keeney, 2015; de Massy, 2013; Székölgyi et al., 2015).

*A contrario*, chez la souris, un motif particulier est retrouvé. Ce motif attire la protéine PRDM9 qui, à l'aide de son domaine SET, catalyse la triméthylation des lysines 4 et 36 des histones H3 (H3K4 et H3K36 ; (Baudat et al., 2010; Brick et al., 2012; Grey et al., 2011, 2018; Lange et al., 2016; Mihola et al., 2009; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010; Powers et al., 2016). En conséquence, les CDB SPO11-dépendantes chez la souris apparaissent uniquement dans les régions qui ont acquis H3K4me3 et H3K36me3 au cours de la méiose.

Chez *At*, une approche similaire de capture et de séquençage des oligonucléotides fixés à la protéine SPO11-1 a été menée (Choi et al., 2018b). La fréquence des oligonucléotides est plus élevée dans les promoteurs, les terminateurs et les introns des gènes. Ces séquences sont enrichies en A/T ce qui exclu les chromatosomes et facilite l'accès de SPO11-1. Paradoxalement, une faible corrélation entre les CDB et les CO est observée à l'échelle locale, même si la corrélation est positive à l'échelle du génome entier. Ceci pourrait refléter l'influence du polymorphisme entre chromosomes homologues sur la formation des CO, en aval de la formation des CDB. Bien que la marque H3K4me3 soit plus fréquente à proximité des oligonucléotides SPO11-1 à l'extrémité 5' des gènes, le niveau de cette marque n'est pas corrélé avec les CDB.

De façon surprenante, le taux d'oligonucléotides à proximité des transposons à ADN de type Hélitron/Pogo/Tc1/Mariner est élevé alors que les rétro-transposons sont des points froids de CDB (Choi et al., 2018b). Cet étude révèle que tous les types de transposons ne se valent pas et en fonction de leur localisation et de leur taille ils sont plus ou moins enrichis en oligonucléotides SPO11. Ce résultat est à rapprocher des observations faites chez le blé où un motif de type TIR-Mariner est retrouvé plus fréquemment dans des zones riches en CO (DARRIER et al., 2017). De la même façon, chez le riz (Marand et al., 2019), les points chauds de recombinaison sont enrichis en éléments Stowaway et P-instability factor (PIF)/Harbinger. La diversité nucléotidique et les signatures de différenciation entre populations d'*Oryza sativa ssp indica* et *ssp japonica* sont prévalentes au niveau des points chauds spécifiques des sous-espèces. Les transposons Stowaway et PIF/Harbinger sont de surcroît associés au biais de G/C au niveau des points chauds actifs, ce qui suggère que cette activité pourrait être alimentée par des variations *de novo*.

## 2.4 Objectifs de la thèse

### 2.4.1 Rappel du contexte

#### 2.4.1.1 Un peu d'histoire du blé tendre

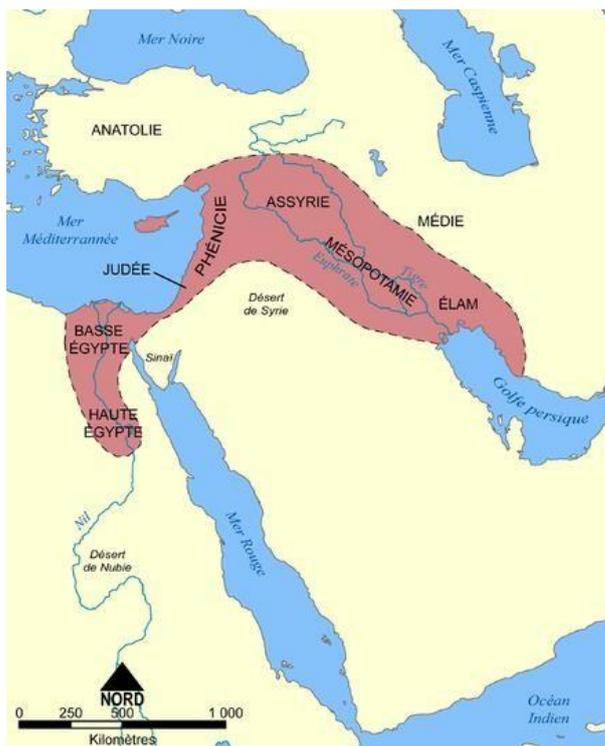


Figure 32 Géographie du Croissant fertile

Le Croissant fertile est une expression désignant une région (non officielle) biogéographique du Proche-Orient formant une bande de terres cultivables grâce à un climat suffisamment pluvieux, délimitée au sud par le désert de Syrie (la partie nord du désert d'Arabie), à l'ouest par la mer Méditerranée, et par les montagnes du Taurus et du Zagros au nord et à l'est. Il traverse les États actuels d'Israël, la Palestine, la Jordanie, la Syrie, le Liban, le sud-est de la Turquie, le nord et l'est de l'Irak, et le bord ouest de l'Iran. Le terme fut introduit en 1916 par l'archéologue James Henry Breasted car l'arc formé ressemble à un croissant. La définition actuelle inclue l'Égypte. Wikipedia

Le blé tendre (*Triticum aestivum*) est avec le riz et le maïs, la céréale la plus cultivée au monde (environ 220 Mha) avec une production de près de 800 Mt/an et elle contribue à apporter 20% des calories consommées par l'humanité (<http://faostat.fao.org/>). Le terme « blé » est un terme générique utilisé pour décrire différentes espèces. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre et le blé dur (*T. turgidum*). Une troisième espèce, l'engrain ou petit épeautre (*T. monococcum*) est une espèce historique mais uniquement cultivée de façon marginale. Pourtant, l'engrain est probablement la première espèce de céréales à avoir été cultivée il y a de ça environ 10 000 ans dans le croissant fertile, au sud de la Turquie (Marcussen et al., 2014 ; Figure 32).

L'engrain reste d'ailleurs cultivé, essentiellement pour servir d'aliment au bétail. Au-delà de l'engrain, d'autres espèces apparentées sont retrouvées dans cette région du Moyen Orient. Elles partagent toutes le même nombre de bases de chromosomes (7) et sont majoritairement des espèces diploïdes (pour revue, voir (Feuillet et al., 2008). Elles sont classées sur la base de caractéristiques méiotiques, et en particulier sur les appariements entre chromosomes chez les hybrides dérivés de croisements entre diploïdes.

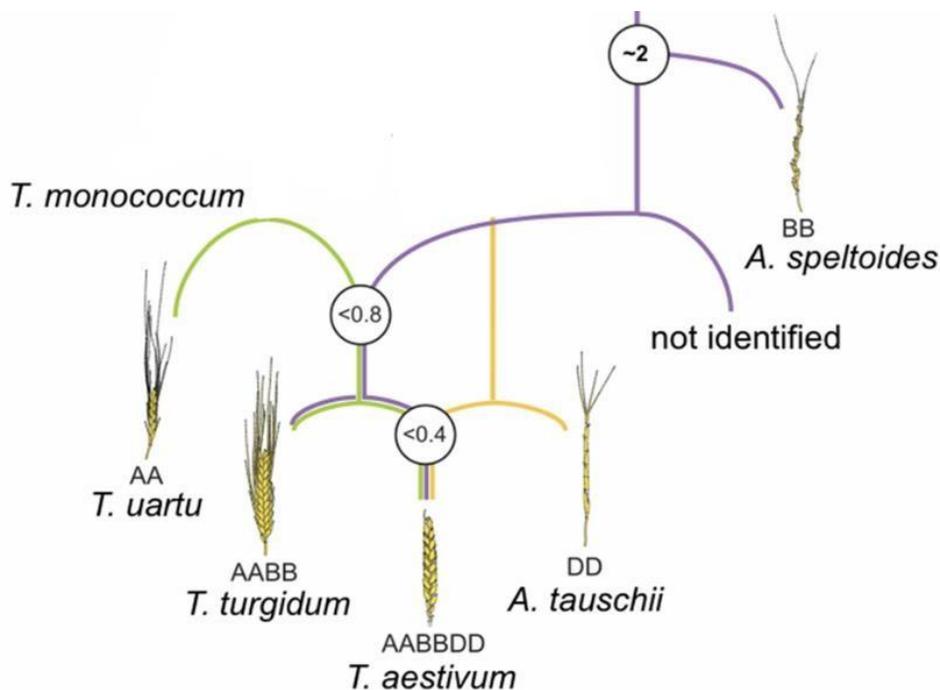


Figure 33 Histoire évolutive simplifiée du blé tendre

(Marcussen et al., 2014)

Le deuxième événement de polyploïdisation est apparu à l'époque où la diffusion du blé commençait avec les migrations des premiers agriculteurs, au moment où ils ont atteint le sud de la mer Caspienne. Cette zone est riche d'une autre espèce diploïde, *Ae. tauschii*, qui s'est hybridée avec cette espèce tétraploïde pour donner naissance au blé tendre hexaploïde actuel en apportant le génome D, *T. aestivum ssp aestivum* (AABBDD). Cette espèce a ensuite commencé à être cultivée il y a environ 7 000 ans (Zohary et al., 2000). Ce génome D a apporté à la fois la rusticité pour résister aux climats plus continentaux et des protéines qui confèrent la friabilité de l'albumen et une meilleure panification (Chantret et al., 2005).

Dès 1924, Kihara a déterminé la nature allo-polyploïde des blés dur et tendre, à partir de l'observation des méioses d'hybrides entre espèces diploïdes et tétraploïdes d'une part, et entre espèces tétraploïdes et hexaploïdes d'autre part. Il dénombre ainsi sept bivalents et sept univalents chez les hybrides triploïdes dérivés du croisement entre *T. turgidum* et *T. monococcum* alors que les cellules pentaploïdes d'hybrides issus du croisement entre *T. turgidum* et *T. aestivum* révèlent 14 bivalents et sept univalents. Il en déduit qu'un des génomes des blés polyploïdes est commun avec *T. monococcum*

(génomme qu'il appellera AA) et qu'un autre génome (qu'il appellera BB) est commun aux deux espèces polyploïdes. Pour ce qui concerne le dernier génome, McFadden et Sears (McFADDEN and Sears, 1946) l'ont identifié à partir de blés allo-hexaploïdes synthétiques issus du croisement entre *T. turgidum* et *Ae. tauschii* (aussi appelé *Ae. squarrosa*). Ils ont montré que des hybrides produits entre ces blés synthétiques et des blé hexaploïdes sont fertiles et forment 21 bivalents à la méiose. Ils en déduisent donc qu'*Ae. tauschii* est le donneur du génome D. La question du génome B reste en suspens. Des approches morphologiques, méiotiques, moléculaires, cytoplasmiques ont toutes abouti à des résultats contradictoires. Cependant, toutes s'accordent à dire que l'espèce donneuse provient de la section *Sitopsis* et qu'il s'agit plus probablement de l'espèce *Ae. speltoïdes* ou peut-être *Ae. longissima*. Une origine polyphylétique n'est pas à exclure non plus (Kerby and Kuspira, 1987). Le blé tendre est donc issu de deux évènements d'hybridation entre espèces différentes (Figure 33). Le premier évènement ayant amené la polyploïdie chez les blés durs et tendres a été l'hybridation d'une sousespèce d'engrain, *T. monococcum ssp urartu* de constitution génomique AA avec une espèce de la section *Sitopsis* qui a apporté le génome B et est probablement fortement apparentée à *Aegilops speltoïdes* (SS). Cette nouvelle espèce tétraploïde (AABB) a également été domestiquée il y a environ 10 000 ans et a évolué pour donner le blé dur (*T. turgidum ssp durum*). Différentes espèces tétraploïdes restent encore cultivées ou à l'état sauvage telles que *T. dicoccoides* ou *T. dicoccum*.

### 2.4.1.2 Amélioration de l'espèce

L'évènement clé de la domestication du blé est l'apparition naturelle de mutants qui ont des caractéristiques avantageuses par rapport aux espèces sauvages, en particulier en ce qui concerne le grain et l'épi. Trois locus sont essentiels pour cela : le locus du rachis cassant (*Brittle rachis : Br*) et deux locus concernant les grains vêtus (*Tenacious glumes, Tg* et *Q* ; (Faris et al., 2003; Jantaturiyarat et al., 2004; Nalam et al., 2006)). Le gène *Q* contrôle également la forme de l'épi (« spelt/squarehead » ; (Faris et al., 2003)). Ces mutants étaient probablement plus attractifs pour les agriculteurs car ils produisent des épis qui ne s'égrènent pas et leurs grains sont nus ce qui les rend plus facile à broyer.

La domestication, la culture et maintenant la sélection ont résulté dans les variétés élites actuelles qui ne possèdent qu'une fraction de la diversité naturelle. Par exemple, au début du 20<sup>ème</sup> siècle aux Etats Unis, seules cinq variétés étaient cultivées et une seule (Turkey) représentait la quasi-totalité des surfaces (Cox et al., 1986). Même si des efforts ont été faits pour améliorer la diversité, celle-ci reste relativement étroite. Pourtant, la diversité naturelle des populations de pays (« landraces ») ou des espèces apparentées constitue un fabuleux réservoir d'allèles originaux pour améliorer le blé tout en instaurant une agriculture durable moins gourmande en intrants, respectueuse de l'environnement et prenant en compte les changements climatiques (sécheresse, température) inévitables.

Depuis le début des années 70, des succès significatifs ont été obtenus comme l'introduction des gènes de nanisme (*Rht-B1* et *Rht-D1*) issus de variétés japonaises, ou des résistances aux maladies et aux insectes provenant du seigle ou du chiendent. L'introduction (ou l'introgession lorsque les portions de génomes proviennent d'espèces apparentées) de ces locus plus performants repose sur un processus clé du développement : la recombinaison méiotique pour éliminer et/ou remplacer les allèles délétères aux gènes d'intérêt. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la suppression des gènes avec un effet négatif qui sont situés dans le voisinage des gènes d'intérêt et qui sont introduits simultanément, un phénomène appelé « autostop » ou « linkage drag ».

La recombinaison entre les chromosomes apparentés issus d'espèces différentes est en général complètement bloquée ou *a minima*, très fortement réduite. Ce défi pour franchir cette barrière a favorisé l'émergence des technologies d'ingénierie des chromosomes et en particulier, a largement contribué au développement des projets de recherche centrés autour des connaissances concernant la recombinaison chez cette espèce.

## 2.4.2 Etude de la recombinaison chez le blé

Comme nous venons de le voir, le blé est une espèce allo-hexaploïde. Son génome est composé de trois jeux de 7 paires de chromosomes, numérotés de 1 à 7 (Figure 34).

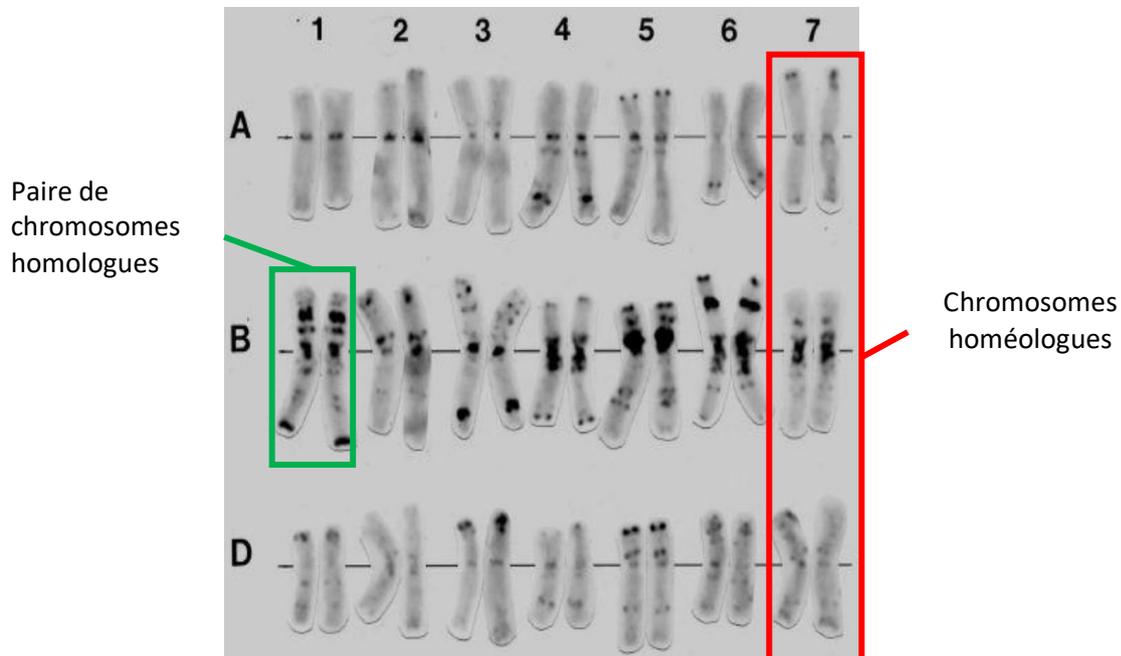


Figure 34 Caryotype du blé tendre (Badaeva E., communication personnelle)

Les trois jeux sont issus de trois espèces diploïdes dont seulement deux sont connues formellement : *T. urartu* pour le génome A et *Ae. tauschii* pour le génome D. Le progéniteur du génome B reste un sujet de controverse mais il est apparenté à la section *Sitopsis* avec un génome S. Les trois génomes sont très proches en termes de séquences et d'ordre des gènes et sont dits pour cela « homéologues » en opposition aux chromosomes « homologues » issus des deux parents et qui sont identiques chez les variétés en général homozygotes.

Le génome est donc composé de 42 chromosomes au total ( $2n = 6X = 42$  ; AABBDD). Ces chromosomes sont de grande taille, relativement homogène mais ils peuvent être facilement identifiés par des techniques cytogénétiques (C-banding par exemple). La polyploïdie et la grande taille du génome a longtemps retardé son séquençage. Cependant, la polyploïdie a aussi permis de développer des stocks génétiques essentiels. En effet, du fait de la duplication des génomes, le blé supporte assez facilement l'aneuploïdie et il est possible de supprimer un chromosome, un bras de chromosome ou un fragment de chromosome sans que cela n'affecte le développement et la fertilité de la plante à de rares exceptions près (Endo and Gill, 1996; Sears, 1954a). Ce matériel original a permis de mettre en place une approche de séquençage basée sur le tri des chromosomes et le séquençage de chacun individuellement (Choulet et al., 2014; Marcussen et al., 2014; Paux et al., 2008; Safár et al., 2004).

Le développement récent de processus d'assemblage sophistiqués, basés sur des lectures courtes de nouvelle génération a permis finalement d'aboutir au séquençage complet du génome et à son annotation (Borrill et al., 2016; IWGSC et al., 2018b). Des études menées sur la base de ces informations ont permis de montrer que le génome possède environ 108 000 gènes, la moitié d'entre eux (55 000) représentant les trois copies homéologues soit ~18 600 triplicats. Environ 12 000 gènes supplémentaires ne sont présents qu'en deux copies (soit ~25 000 gènes ; AB, AD ou BD), sans qu'aucune dominance d'un génome particulier par rapport aux deux autres ne puisse être observée.

De la même façon, les trois copies sont en général exprimées, sans aucune dominance (Borrill et al., 2016).

Bien que son génome soit polyploïde, le blé tendre se comporte comme une espèce diploïde et dans des conditions normales, seuls les chromosomes homologues s'apparient et recombinent lors de la méiose. Cet état de fait est connu de longue date et il a été montré que la recombinaison est contrôlée à deux niveaux : un premier niveau pour prévenir la recombinaison entre homéologues et un deuxième niveau pour favoriser la recombinaison entre homologues.

### 2.4.2.1 Recombinaison homéologue

Dès les années 30, Sears (Sears, 1939), a montré que la suppression de certains chromosomes (lignées nullisomiques) induisait une perturbation de la méiose. Ainsi, la délétion du chromosome 3B entraîne une production accrue d'univalents et c'est à partir de cette lignée que Sears et ses collaborateurs ont développé la totalité des stocks aneuploïdes (Kimber and Sears, 1980; Sears, 1944).

Le comportement diploïde du blé tendre est sous le contrôle d'un gène majeur dominant, *Ph1*, localisé sur le bras long du chromosome 5B grâce à l'étude de métaphases de lignées nullisomiques pour ce chromosome (Okamoto and Sears, 2011; Riley and Chapman, 1958). Il est fort probable que ce gène soit apparu après la polyploïdisation plutôt qu'il ait été présent dans l'un ou l'autre des ancêtres diploïdes avant (Chapman and Riley, 1970). Le clonage récent du locus complet (Griffiths et al., 2006) a permis de mieux comprendre son mode de fonctionnement même s'il reste des zones d'ombre. Le locus est constitué d'un complexe de cyclines (*CDK2-Like*) dont le plus proche homologue chez *Arabidopsis* régule aussi l'appariement et la recombinaison (Zheng et al., 2014). Le locus contient également un bloc d'hétérochromatine dupliqué provenant d'un chromosome du groupe 3. De façon intéressante, ce bloc contient une copie dupliquée du gène *TaZip4*, *TaZip4-B2* (Rey et al., 2017a). Chez le riz et *Arabidopsis*, la mutation de *Zip4* a un effet majeur sur les CO homologues mais pas sur la synapse (Chelysheva et al., 2007; Shen et al., 2012). La mutation de *TaZip4-B2* induit une hausse de la recombinaison homéologue chez les hybrides haploïdes issus du croisement entre un blé *ph1* et *Ae. variabilis* confirmant ainsi l'implication de ce gène dans le phénotype (Rey et al., 2017a).

D'un point de vue fonctionnement, *Ph1* aurait un double effet pendant la méiose (Martín et al., 2014a). Premièrement, il n'empêcherait pas la synapse entre chromosomes homéologues mais il favoriserait la synapse entre homologues en la priorisant. La synapse homéologue n'apparaît pas dans la phase précoce du bouquet en présence ou en absence de *Ph1* et seule la synapse homologue se fait (Martín et al., 2017). Chez les mutants, la synapse homologue est retardée après le stade bouquet ce qui permettrait à la synapse homéologue de mieux se réaliser et de parvenir de temps en temps à faire des CO entre homéologues. Deuxièmement, *Ph1* jouerait ultérieurement un rôle dans la résolution d'un tiers des sites MLH1 homéologues en CO (Martín et al., 2014a).

Un deuxième gène, *Ph2*, joue également un rôle dans l'appariement entre chromosomes homéologues. Le gène *Ph2* est localisé sur le bras court du chromosome 3D (Mello-Sampayo, 1971; Mello-Sampayo and Lorente, 1968)). Il vient d'être cloné dans l'équipe d'accueil de la thèse (Serra et al., 2021). Il s'agit d'une protéine, MSH7, intervenant dans la réparation des mésappariements qui agit sous forme d'un dimère hétérologue avec une autre protéine du même système, MSH2. Cependant, le mode d'action de *Ph2* demeure inconnu de même que les interactions avec son partenaire et la dynamique avec l'autre locus majeur *Ph1*.

## 2.4.2.2 Recombinaison homologue

Chez le blé tendre, la distribution de la recombinaison le long des chromosomes est particulière. Werner et ses collaborateurs (Werner et al., 1992), ont utilisé des lignées de délétion couplées avec une carte génétique d'une dizaine de marqueurs localisés sur les chromosomes du groupe 7 pour montrer que la recombinaison est faible dans les régions proches des centromères et plus élevée dans les zones distales. Cette distribution biaisée a été confirmée ultérieurement par d'autres analyses (pour revue, (Saintenac et al., 2009)).

Ces dernières années, la possibilité d'accéder à des cartes physiques et plus récemment, à une séquence complète, annotée et ancrée sur des cartes génétiques très haute densité, a permis d'améliorer les connaissances sur la distribution de la recombinaison et sur son impact sur le partitionnement des chromosomes (Choulet et al., 2014; Darrier et al., 2017; IWGSC et al., 2018b; Saintenac et al., 2009). En particulier, il a été montré que plus de 80% des CO apparaissent dans moins de 20% de la taille totale du génome, et essentiellement dans les parties distales (Darrier et al., 2017; Saintenac et al., 2009). Une analyse par coalescence (prédiction de la recombinaison en utilisant le déséquilibre de liaison) a permis de corréliser la présence de CO avec des séquences géniques (Darrier et al., 2017), en particulier lorsqu'elles sont exprimées en méiose. Les zones non-recombinogènes sont enrichies en rétrotransposons alors qu'un motif apparenté à un TIR (Terminal Inverted Repeat) de transposon à ADN (*Mariner*) est retrouvé fréquemment dans les régions riches en CO.

En revanche, si la mécanistique de la recombinaison homologue est bien étudiée chez les espèces modèles (At chez les plantes ; pour revue, (Mercier et al., 2015; Pyatnitskaya et al., 2019)), elle restait en 2017 beaucoup plus superficielle chez le blé tendre. Seuls quelques gènes ont été observés et les études restent en général cantonnées à l'analyse comparative des séquences homéologues, à la localisation sur le génome et aux études d'expression des trois copies (**Tableau 1**).

**Tableau 1:** Liste des études sur les gènes de la méiose disponibles au début du projet

(Martín et al., 2014b)	Licensing <b>MLH1</b> sites for crossover during meiosis
(Khoo et al., 2012a)	The isolation and characterisation of the wheat molecular ZIPper I homologue, <b>TaZYP1</b>
(Khoo et al., 2012b)	<b>PHS1</b> Poor Homologous Synapsis 1 Interacts with Chromatin but Does Not Colocalise with ASynapsis 1 during Early Meiosis in Bread Wheat
(Pérez et al., 2011)	The <b>Rad50</b> genes of diploid and polyploid wheat species. Analysis of homologue and homoeologue expression and interactions with Mre11
(Devisetty et al., 2010)	The <b>RAD51</b> and <b>DMC1</b> homoeologous genes of bread wheat: cloning, molecular characterization and expression analysis
(Khoo et al., 2008)	The <b>RAD51</b> gene family in bread wheat is highly conserved across eukaryotes, with RAD51A upregulated during early meiosis
(Boden et al., 2009)	<b>TaASY1</b> promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of Ph1
(Boden et al., 2007)	Expression and functional analysis of <b>TaASY1</b> during meiosis of bread wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )
(Li et al., 2006)	Cloning and expression analysis of TSK1, a wheat <b>SKP1</b> homologue, and functional comparison with Arabidopsis ASK1 in male meiosis and auxin signalling

Aucune étude concernant l'impact sur le comportement méiotique des mutations de ces gènes n'a été faite. Cela est essentiellement dû à la difficulté à isoler des mutants et surtout à la lourdeur, à la fois en temps et en énergie, à générer des doubles et des triples mutants pour chaque gène.

### **2.4.3 Questions scientifiques**

L'objectif de cette thèse était donc d'étudier l'impact de la mutation d'un gène impliqué dans la méiose sur le comportement méiotique des différents types de mutants, simples (aaBBDD, AAbbDD, AABBdd), doubles (aabbDD, aaBBdd, AAbbdd) et triples (aabbdd) par rapport à un individu sauvage (AABBDD) ou hétérozygote (AaBbDd) et d'étudier les variations d'expression dans ces différents contextes ainsi que l'évolution du comportement de ce gène chez les ancêtres diploïdes et tétraploïdes en réalisant un atlas méiotique chez tous ces individus. Nous avons focalisé notre analyse sur le gène *Spo11-2*. Notre choix est justifié par le fait que ce gène est spécifique des plantes et que nous avons toutes les raisons de penser qu'il était également présent chez le blé tendre. Par ailleurs, le phénotype mutant est aisément observable dans les méiocytes mâles en développement et il se traduit par une absence d'appariement en métaphase I et à la production d'univalents (Hartung and Puchta, 2000). Enfin, c'est un gène qui gouverne une étape clé de la méiose, la réalisation des CDB et qu'une meilleure connaissance de ce gène permettrait d'envisager de manipuler la recombinaison chez cette espèce d'intérêt.

La thèse était donc divisée en trois parties qui serviront de base à la rédaction du manuscrit. La première a été consacrée au développement du matériel végétal et à la mise en place des protocoles d'immuno-fluorescence permettant de suivre le déroulement de la méiose. A mon arrivée, le laboratoire de cytogénétique était encore en cours de développement et tous les anticorps n'étaient pas disponibles ou mis au point. De même, seuls les simples mutants étaient isolés et il a fallu définir le plan de croisement pour développer les mutants dans un laps de temps réduit.

La deuxième partie de la thèse a constitué le gros de la production de résultats. Elle est étayée par un article publié dans *The Plant Journal* (Benyahya et al., 2020); doi 10.1111/tpj.14903). Cet article résume l'évolution des trois copies homéologues du gène *Spo11-2*, leur variabilité, leur fonctionnalité et l'impact des différentes mutations sur le comportement méiotique. Pour la première fois également, le nombre de foyers DMC1 a été dénombré chez le blé tendre. Il a été complété par l'analyse de l'expression de la cascade des gènes méiotique chez les différents mutants.

La dernière partie a consisté en l'analyse des différences de méiose entre plusieurs progéniteurs diploïdes ou tétraploïdes comparées avec les observations faites chez l'hexaploïde. Compte tenu du temps imparti et des difficultés rencontrées liées aux mesures sanitaires en fin de thèse, nous nous sommes restreints à l'élaboration des différents atlas et à l'analyse comparative visuelle des données cytogénétiques.

## 3 Matériels et Méthodes

### 3.1 Matériel végétal

#### 3.1.1 Population de mutants

Une population de 4400 mutants d'irradiation a été dérivée, à partir du cultivar Renan. Les graines ont été irradiées à 150 Gray (Gy) en 2012, puis semées en plein champ en conditions de culture standards. Les individus fertiles ont été autofécondés par pose de sacs sur les épis maîtres, et, conduits de cette façon jusqu'en génération F6 sans appliquer de crible de sélection autre que la fertilité. Parmi cette population, des mutants des gènes *Spo11-2* sont recherchés (**Tableau 2**) selon deux approches : la PCR classique et l'utilisation de puces Fluidigm 192-24. Des amorces génome-spécifique ont été dessinées à partir de séquences génomiques des gènes identifiés chez CS à la main pour chaque protéine et spécifique du génome A, B ou D en utilisant le logiciel d'alignement Ugene (<http://ugene.net/download.html>).

**Tableau 2:** Mutants Renan irradiés

Liste des mutants d'irradiation identifiés pour le gène *Spo11-2* chez le blé tendre (Renan).

NOM	N° mutant Re
Ta-Spo11.2-C2-7AL-RE	3321/1
Ta-Spo11.2-C2-7AL-RE	3371/1
Ta-Spo11.2-C2-7BL-RE	1169/1
Ta-Spo11.2-C2-7BL-RE	3280/1
Ta-Spo11.2-C2-7BL-RE	3942/1
Ta-Spo11.2-C2-7BL-RE	4226/1
Ta-Spo11.2-C2-7DL-RE	3414/1
Ta-Spo11.2-C2-7DL-RE	4084/1

Après une identification et une validation, les plantes mutantes ont été semées en pot individuel. Au bout d'une semaine de pousse, les feuilles ont été prélevées pour les génotypages. Les individus sont ensuite mis en vernalisation pendant 6 semaines (8°C, 8h jour/16h nuit) au stade trois feuilles. Elles sont ensuite repiquées en pot de 4L en terreau additionné d'engrais (Nutricote) et mises à croître en serre avec une alternance de température de 18°C/22°C et une photopériode de 8h nuit/16h jour.

Deux mutants, pour chacune des copies homéologues de *Spo11-2*, ont été sélectionnés :

- Génome A : 3321 et 3371
- Génome B : 1169 et 3942 • Génome D : 3414 et 4084.

Les simples mutants ont été croisés entre eux, afin de donner des plantes hétérozygotes sur deux génomes. Puis ces plantes hétérozygotes ont été croisées entre-elles.

Dans le cas des mutants *spo11-2*, l'équipe s'est aléatoirement focalisée sur le croisement entre les hybrides AD<sup>+/-</sup> (4084x3321/2) et AB<sup>+/-</sup> (3371x1169/2), ce qui a donné des descendants chez lesquels des plantes hétérozygotes sur les trois génomes ont pu être triées.

### 3.1.2 Progéniteurs du blé

Pour les analyses évolutives du gène *Spo11-2* chez les céréales apparentées au blé tendre, quatre espèces diploïdes (*T. monococcum ssp urartu* (B0K33869 ; AA), *T. monococcum ssp monococcum* (AA), *Ae. speltoides* (SS apparenté au génome BB) et *Ae. tauschii* (DD)), trois espèces tétraploïdes (AABB : *T. diccoides*, *T. dicoccum* et *T. turgidum* cv. Maimara) et une accession hexaploïde (AABBDD ; Saissette de Maninet) ont été étudiées. Les graines ont été fournies par le Centre de ressource biologique de l'INRA (CRB) (**Tableau 3**)

**Tableau 3:** Liste et génotypes des plantes fournies par le CRB

ERGE	Genotype	Nom de la variété
6421	AABBDD	SAISSETTE DE MANINET
26665	AABB	DC.Rufo inflatum 118v (T. Dicoccum)
6807	AABB	T. DICOCCOIDES SPONTANEONIGRUM
8260	AABB	MAIMARA
23732	DD	Aegilops tauschii d'Arménie
25984	BB	Speltoides - 1
27017	AA	BO.K33869
27299	AA	MONOCOCCUM

Les graines ont été semées en boîte de Pétri puis transférées en godet et en pot. Elles sont ensuite soumises aux mêmes conditions que les plantes de la population irradiée Renan.

D'autres cultivars de blés hexaploïdes, comme Chinese Spring qui est le blé de référence en génomique, et Cadenza qui est un blé utilisé pour une population de mutants EMS (John Innes Centre : JIC), ont été utilisés en contrôles. Ces plantes ont été analysées d'un point de vue méiotique, et des prélèvements de feuilles et extractions d'ADN ont également été faits, dans l'optique d'analyser moléculairement le gène *Spo11-2*.

## 3.2 Bioanalyse des données

### 3.2.1 Caractérisation des séquences du complexe SPO11

Dans le but de rechercher des mutants de méiose, un travail de bioanalyse a dû être effectué sur la séquence de référence du blé tendre (cultivar Chinese Spring ; CS ; (IWGSC et al., 2018b)), afin d'identifier les différentes copies présentes au sein du génome. Des analyses de similarité, à partir des séquences protéiques de gènes méiotiques d'At, ont permis d'identifier les orthologues de ces gènes. (BLAST ; Basic Local Alignment Search Tool ; (Altschul et al., 1997). Les séquences ont été récupérées, à partir des données publiées et disponibles dans des bases publiques pour le blé tendre (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Data>), pour le blé tétraploïde *T. durum* ((Avni et al., 2017) <https://wewseq.wixsite.com/consortium>), et pour les blés apparentés diploïdes *T. monococcum ssp urartu* ((Ling et al., 2018) <http://www.mbkbase.org/Tu/>) et *Aegilops tauschii* (Luo et al., 2017) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/341983>). Les paramètres standards de l'outil BLAST ont été utilisés pour la tolérance des mésappariements et la couverture. Chaque copie de chaque gène a été

ré-annotée proprement à l'aide de TriAnnot (Leroy et al., 2012) en utilisant la séquence codante (CDS) d'*Arabidopsis* comme référence.

Pour ce qui est des séquences des variétés Renan, Apache, Arche et W7984 (blé synthétique reconstruit à partir du croisement entre un blé dur (AABB ; variété Altar) et *Ae. tauschii* (DD ; accession 78) ; (Nelson et al., 1995), les séquences ont été récupérées à partir de données de capture d'exome chez 43 variétés (Rimbert et al., 2018). L'analyse comparative des séquences des différentes copies et des différentes espèces (**Tableau 4**) a été conduite en alignant les séquences à l'aide de MAFFT7 (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>;(Kato et al., 2002)). La comparaison des séquences deux à deux a été réalisée à l'aide du logiciel ACT (Artemis Comparison Tool; (Carver et al., 2005).

**Tableau 4:** Bases de données utilisées

Liste des espèces et bases de données utilisées pour les bioanalyse du complexe Spo11-2

Espèce	Base de données / Assemblage	Sous espèce	Groupe	Taille du génome (Mb)	Comparaison de la taille du génome avec ble tendre
<i>Triticum dicoccoides</i>	WEWSeq_v.1.0	<i>Triticum dicoccoides</i> (wild emmer wheat) Ecotype: Zavitan	MONOCOT	10000	1.7
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum_bicolor_NCBIv3	<i>Sorghum bicolor subsp. Bicolor</i>	MONOCOT	730	23.3
<i>Zea mays</i>	B73_RefGen_v4	<i>Zea mays</i> var. japonica	MONOCOT	2400	7.1
<i>Hordeum vulgare</i>	IBSC_v2	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i> barley cultivar Morex v1.0	MONOCOT	5300	3.2
<i>Triticum urartu</i>	ASM34745v1	Cultivar: G1812	MONOCOT	3920	4.3
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	IRGSP-1.0	<i>Oryza sativa Japonica Group</i> (Japanese rice) Cultivar: Nipponbare	MONOCOT	370	45.9
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TAIR10	At(thale cress) Ecotype: Columbia	DICOT	120	141.7
<i>Triticum turgidum</i>	Svevo.v1	<i>Triticum turgidum subsp. durum</i>	MONOCOT	12000	1.4
<i>Oryza nivara</i>	Oryza_nivara_v1.0	<i>Oryza sativa f. spontanea</i> (rice)	MONOCOT	448	37.9
<i>Oryza sativa Indica Group</i>	ASM465v1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> (long-grained rice) Cultivar: 93-11	MONOCOT	466	36.5
<i>Aegilops tauschii</i>	Aet_v4.0	<i>Aegilops tauschii subsp. strangulata</i> (monocots) Cultivar: AL8/78	MONOCOT	4200	4
<i>Brachypodium distachyon</i>	Brachypodium_distachyon_v3.0	<i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 strain)	MONOCOT	355	47.9
<i>Triticum aestivum</i>	IWGSC	CS	MONOCOT	17000	1

### 3.2.2 Etude des gènes méiotiques chez les *Triticeae*

Cette étude s'est focalisée sur 46 gènes identifiés ayant un rôle en méiose chez *At*. Ces gènes ont été classés en trois catégories en fonction de leur implication soit dans l'initiation, soit dans la maturation ou soit dans la résolution de la recombinaison (**Tableau 5**).

Nous avons sélectionné 15 gènes en initiation de la recombinaison avec des gènes impliqués dans la structure de la chromatine méiotique (DYAD-SWI, SMC3, SYN4-REC8), les topoisomérases 6A et 6B, les quatre protéines ASY du complexe synaptonémal et les protéines impliquées dans la CDB (complexe SPO11, PRD1, VIP3-SKI8-REC14) et la régulation via les protéines SDS. Pour la maturation de la recombinaison, 11 gènes ont été évalués : ceux impliqués dans la signalisation de la CDB (ATM, ATR), le complexe MRN et l'exonucléase COM1 et les recombinases DMC1 et RAD51 ainsi que le gène BRCA2 qui permet leur recrutement. Pour la résolution de la recombinaison, nous avons sélectionné 20 gènes impliqués dans la résolution en NCO (hélicases et co-facteurs SGS1-RECQ4A, FANCM et ses co-facteurs (FANCD2, FAN1, MHF1 et MHF2), pour la résolution en CO, les protéines ZMM pour les CO de classe 1

**Tableau 5:** Gènes représentatifs du paysage méiotique

INITIATION DE LA RECOMBINAISON	MATURATION DE LA RECOMBINAISON	RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON
ASY1-AT1G67370.1	ATM-AT3G48190.1	EME1A-AT2G21800.2
ASY2-AT4G32200.2	ATR-AT5G40820.1	EME1B-AT2G22140.1
ASY3-AT2G46980.2	BRCA2-AT5G01630.1	FAN1-AT1G48360.2
ASY4-AT2G33793.1	COM1-AT3G52115.1	FANCD2-AT4G14970.1
DYAD-SWI-AT5G51330.1	DMC1-AT3G22880.1	FANCM-AT1G35530.2
MTOPVIB-AT1G60460.1	G-H2AX-AT1G08880.1	HEI10-AT1G53490.1
PRD1-AT4G14180.1	H2AXB-AT1G54690.1	MER3-AT3G27730.1
SDS-AT1G14750.1	MRE11-AT5G54260.1	MHF1-AT5G50930.1
SMC3-AT2G27170.1	NBS1-AT3G02680.1	MHF2-AT1G78790.1
SPO11-1-AT3G13170.1	RAD50-AT2G31970.1	MLH1-AT4G09140.1
SPO11-2-AT1G63990.1	RAD51-AT5G20850.1	MLH3-AT4G35520.1
SYN4-REC8-AT5G16270.1		MSH4-AT4G17380.1
TOP6A-AT5G02820.1		MSH5-AT3G20475.1
TOP6B-AT3G20780.1		MUS81-AT4G30870.1
VIP3-SKI8-REC14-AT4G29830.1		RECQ4A-AT1G10930.1
		RECQ4B-AT1G60930.1
		SHOC1-AT5G52290.1
		ZYP1A-AT1G22260.1
		ZYP1B-AT1G22275.1
		ZYP4-AT5G48390.1

(ZYP1, SHOC1, HEI10, ZYP4, MER3, MSH4, MSH5, MLH1 et MLH3), pour la voie de secours des CO, MUS81 et ses co-facteurs (EME1A et EME1B).

Un BLASTP, à partir de ces 46 protéines, a été fait sur les espèces apparentées au blé tendre (**Tableau 6**).

**Tableau 6:** Espèces apparentées au blé tendre

Liste des espèces apparentées au blé tendre sur lesquelles l'étude des gènes de la méiose a été menée

Espèce	Base de données / Assemblage	Sous espèce
<i>Triticum dicoccoides</i>	WEWSeq_v.1.0	<i>Triticum dicoccoides</i> (wild emmer wheat) Ecotype: Zavitan
<i>Triticum urartu</i>	ASM34745v1	Cultivar: G1812
<i>Triticum turgidum</i>	Svevo.v1	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>
<i>Aegilops tauschii</i>	Aet_v4.0	<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> (monocots) Cultivar: AL8/78
<i>Triticum aestivum</i>	IWGSC	CS

Les résultats bruts sont disponibles au niveau des annexes (Tableau 43, Tableau 44 et Tableau 45). Ces résultats ont été analysés avec EXCEL en utilisant les tableaux croisés dynamiques, afin d'afficher les informations principales émanant de ces gros jeux de données.

### 3.2.3 Analyse des mutants d'irradiation

Afin de caractériser plus précisément les mutations identifiées dans le Tableau 2, il a été mené une analyse des délétions grâce à la puce 35K de génotypage BreedWheat Affymetrix Axiom (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/550868#/550868>; AxiomTaBW35K ; Figure 35) contenant 34,746 marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism)(Rimbert et al., 2018).



Figure 35 Photo de la puce Axiom™ BreedWheat 35K

("Genotyping Array (384HT format)")

Les mutants ont été semés selon les mêmes conditions que précédemment et les ADN extraits, dosés et ajustés à 10 ng/μL selon le protocole décrit précédemment. Les mutations ont été vérifiées par PCR classique avec les amorces spécifiques de la qPCR. Pour les plantes qui se sont révélées hétérozygotes, nous avons prélevé les ADN de cribles précédents (Tableau 2) sur différentes plaques conservées à -20°C qui avaient été validés par qPCR. La plate-forme Gentyane de séquençage de Clermont-Ferrand a réalisé les expérimentations liées à la puce Axiom 35k à partir des plaques d'ADN que nous avons produites.

A partir des intensités de fluorescences produites et relevées à la suite de l'hybridation avec les marqueurs, un « pipeline » utilisant R a été mis au point (J. Kitt, E. Paux ; données non-publiées ; communication personnelle) pour caractériser et représenter les variations structurales des génomes

des mutants irradiés. Dans notre cas, nous nous sommes focalisés sur les valeurs AB et « NoCall » du fichier de sortie d'analyse de la puce Axiom 35k représentés sur la Figure 36. En effet, ces valeurs peuvent être soit associées à des individus hétérozygotes pour le marqueur, soit au fait qu'il n'y a pas eu d'hybridation et potentiellement à des variations structurales de type délétions.

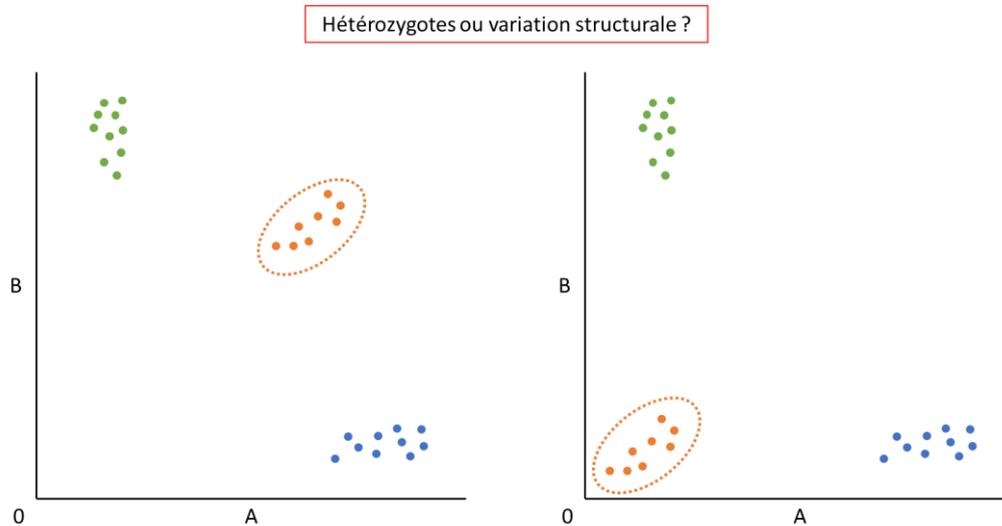


Figure 36 Sorties de puce Axiom

Résultats de sortie des puces Axiom 35k des génotypes soit homozygotes (AA ou BB) soit des hétérozygotes (AB) soit des OTV (" off-target variant » ou "No call").

- Pour faire tourner cet outil nous avons utilisé les fichiers de sortie de la puce Axiom 35k :
- AxiomGT1.calls.final.txt (0 = AA 1 = AB 2 = BB et -1= NA)
  - AxiomGT1.confidences.txt (Score compris entre 0 (fiable) et 1 (non fiable) Si score > seuil (0,15) : call = -1)
  - AxiomGT1.summary.txt

Nous avons aussi utilisé un fichier contenant la liste des échantillons SPO11-2 et la liste des marqueurs SNP avec leur positions (Figure 37).

Méthode
Visualisation graphique
Larges variations
Délétions

**Fichiers en entrée**

- 1) Fichiers Axiom
- 2) Liste d'échantillons

array_name	file_name	well	unique_id	sample_name	analysis_group	definition
axiom35k_fb_02	Renan.CEL	A6	axiom35k_04_A6	Re_wt_02	renan_fb	reference
axiom35k_fb_02	1169.CEL	F3	axiom35k_03_F3	Re_mut_hmz_b_spo11-2_7BL_01	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	3321.CEL	E9	axiom35k_03_E9	Re_mut_hmz_a_spo11-2_7AL_01	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	3371.CEL	H9	axiom35k_03_H9	Re_mut_hmz_a_spo11-2_7AL_02	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	3414.CEL	D10	axiom35k_03_D10	Re_mut_hmz_d_spo11-2_7DL_02	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	3942.CEL	F1	axiom35k_04_F1	Re_mut_hmz_b_spo11-2_7BL_02	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	4084.CEL	G2	axiom35k_04_G2	Re_mut_hmz_d_spo11-2_7DL_01	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	Spo11-2 '+'.CEL	B6	axiom35k_04_B6	plante_soeur_non_mutee_spo11	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	Spo11-2 '-'.CEL	C6	axiom35k_04_C6	plante_soeur_mutee_spo11_ko	renan_fb	sample
axiom35k_fb_02	T47.CEL	D7	axiom35k_04_D7	temoin_non_irradie	renan_fb	sample

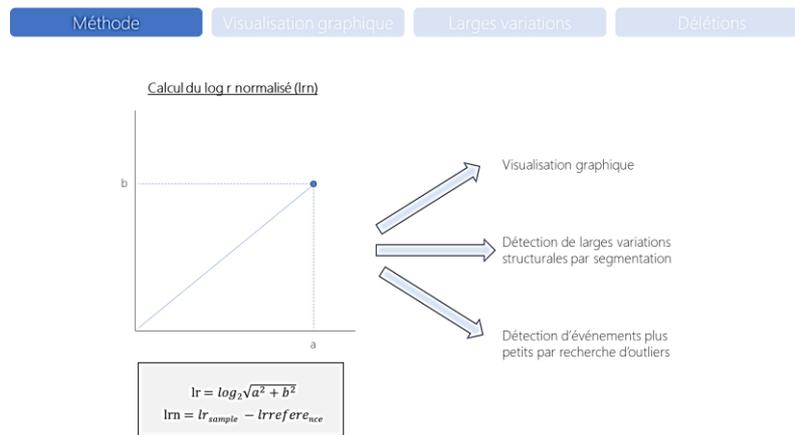
- 3) Liste des SNPs avec positions (34583)

Figure 37 Pipeline et fichiers Axiom

Fichiers types pour l'utilisation du pipeline chez les mutants spo11-2

Les intensités de fluorescence représentées dans la Figure 38, à partir des valeurs a et b sont utilisées, afin de calculer un logarithme ( $\log r$ ) résultant de ces deux coordonnées. Ce log de r obtenu pour les échantillons tests est normalisé en soustrayant le log de r de la référence RENAN WT. A partir de ce résultat, le pipeline R permet de représenter les données obtenues à travers trois prismes :

- 1- une visualisation graphique des données logarithmiques
- 2- une détection des larges variations structurales par segmentation (Figure 39)
- 3- une détection de très petites variations structurales en analysant les points de rupture par rapport à la référence en utilisant la régression linéaire et un test de Bonferroni avec un filtre SNP génotypé -1 (No Call) ou -2 (OTV) +  $\text{lrn} \leq -2$  (signal 4x plus faible que la référence).



Calcul du log de r normalisé à partir de l'intensité de fluorescence a et b par rapport au RENAN WT (Jonathan Kitt, communication personnelle).



Segmentation : BinSeg – MBIC – max 5 points de rupture

Filtre : au moins un segment avec une moyenne de  $\text{lrn} > 0,25$  ou  $\leq -0,25$

chromosome	unique_id	sample_name
chr1D	axiom35k_03_E9	Re_mut_hmz_a_spo11-2_7AL_01
chr3A	axiom35k_03_D10	Re_mut_hmz_d_spo11-2_7DL_02
chr4D	axiom35k_04_B6	plante_soeur_non_mutee_spo11
chr6B	axiom35k_03_D10	Re_mut_hmz_d_spo11-2_7DL_02
chr7A	axiom35k_04_F1	Re_mut_hmz_b_spo11-2_7BL_02
chr7B	axiom35k_04_F1	Re_mut_hmz_b_spo11-2_7BL_02
chr7D	axiom35k_03_D10	Re_mut_hmz_d_spo11-2_7DL_02

Figure 39 Package de segmentation

Package de segmentation, inspiré de Killick et Eckley (2014) adapté aux larges délétions.

### 3.3 Analyses cytogénétiques

#### 3.3.1 Repérage des stades méiotiques et traitement des anthères

L'étude de la méiose se fait principalement au niveau des méiocytes mâles qui sont protégés dans les anthères. Elles doivent être triées selon le stade de la division. Des épis immatures, en début de méiose, sont prélevés (Figure 40), puis placés dans la glace pour arrêter la méiose.



Figure 40 Photo d'un épi immature de blé tendre Renan

Le blé tendre a la particularité d'avoir une organisation spatiale en fonction de la maturité des méiocytes. En effet, les stades les plus avancés se retrouvent au milieu de l'épi et les moins avancés aux deux extrémités (Figure 41).

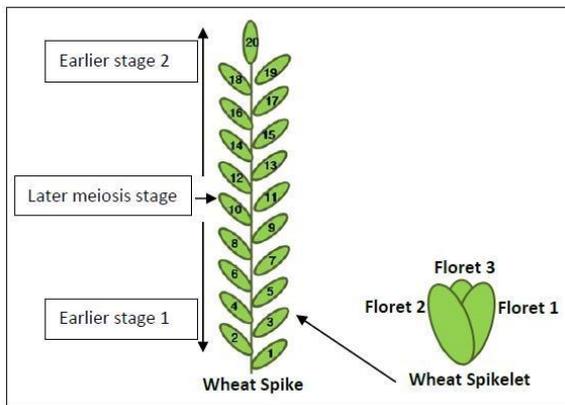


Figure 41 Schématisation d'un épi de blé

Organisation spatiale en fonction de la maturité des meiocytes chez le blé

Les trois anthères étant synchrones (Figure 42), une des anthères est sacrifiée pour la reconnaissance du stade méiotique.

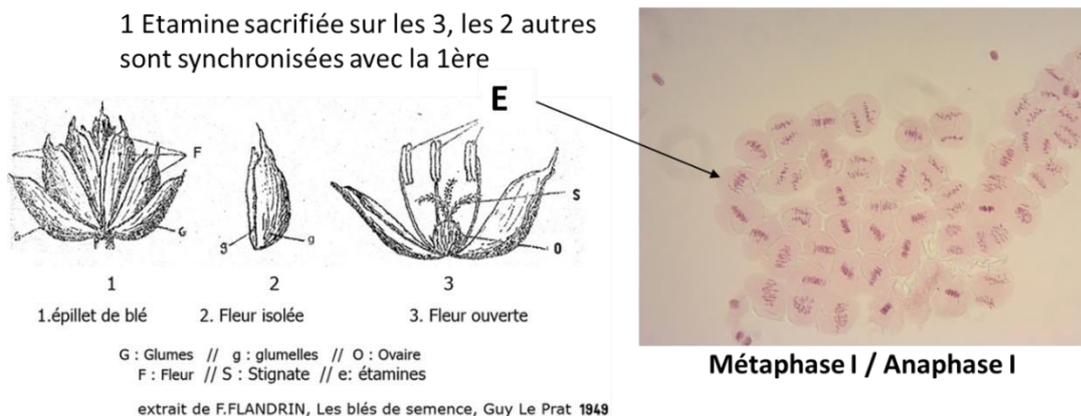


Figure 42 Anthères synchrones chez le blé tendre

Anatomie d'une fleur de blé tendre et synchronicité des trois anthères

Elle est placée sur une lame contenant une goutte de carmin acétique, et, elle est observée sous microscope optique classique. Une fois le stade vérifié, les deux autres anthères sont placées dans le Carnoy (3 :1 EtOH : Acide acétique), pour la constitution des atlas de méiose et l'étude du comportement méiotique au stade métaphase I.

Entre quatre et six anthères issues d'épis fraîchement prélevés sont placées à 4°C dans un verre de montre contenant 1mL de PBS 1X avec 1µL d'inhibiteur de protéases (Protease inhibitor cocktail Sigma, ref P8340).

### **3.3.1.1 Atlas et comportement méiotique**

La construction de l'atlas méiotique se fait grâce à la collecte des anthères dans le Carnoy aux différents stades de la méiose. Les anthères conservées au froid (4°C ou -20°C) dans ce liquide sont exploitables jusqu'à plus deux ans après la collecte. Les stades les plus importants pour la constitution de l'atlas sont : la métaphase I, l'anaphase I, la métaphase II, l'Anaphase II et le stade tétrades (voir Annexes MO-01, MO-02, MO-03).

Les anthères sont disséquées dans une goutte d'acide acétique à 45%, afin de n'avoir que les méiocytes en suspension. Une lamelle est déposée délicatement sur le liquide, et, à l'aide d'un papier Whatman, une pression au doigt est appliquée sur la préparation. La lame est plongée dans l'azote liquide, puis à l'aide d'un crayon diamant, les contours de la lamelle sont délimités. La lamelle est ôtée rapidement, grâce à l'utilisation d'une lame de rasoir. La lame est séchée quelques secondes à l'air libre, puis une goutte de Vectashield avec DAPI (Eurobio Ingen, ref H-1200) est déposée sur la préparation. Une lamelle est placée au-dessus de la lame et du vernis est appliqué sur les contours, les lames sont conservées à 4°C ou à -20°C.

Concernant le comportement méiotique, seule la métaphase I est exploitée. En effet, c'est à ce moment que les chromosomes sont visibles, et particulièrement les liens ou chiasma qui témoignent de la recombinaison entre les chromosomes homologues. Une anthère au stade métaphase I, fixée au Carnoy et conservée dans de l'éthanol à 70%, est disséquée sur une lame dans une goutte de carmin acétique, afin de libérer les méiocytes, et une lamelle déposée sur la préparation. Une régression du carmin par de l'acide acétique 45% est pratiquée à l'aide d'un papier Whatman, ainsi qu'un chauffage de la lame à 90°C quelques secondes qui permet de bien séparer les chromosomes les uns des autres. Une légère pression est appliquée sur la préparation et la lame est analysée tout de suite après à l'aide d'un microscope optique en lumière blanche et en contraste de phase. Environ 50 photos sont prises au grossissement X40, afin de moyenniser le nombre de chiasmas observés par cellule.

### **3.3.1.2 Pour les immunomarquages des protéines du CS et des recombinaisons**

La préparation des lames pour les immunomarquages est faite à partir de cinq anthères collectées dans le PBS 1X au stade de la prophase I. L'analyse du complexe synaptonémal (CS) se fait sur des cellules qui sont aux stades leptotène, zygotène, pachytène et diplotène, afin de suivre la mise en place de celui-ci, puis sa dissolution. Les anthères sont d'abord fixées au paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 1X à température ambiante pendant 15 minutes, puis elles sont rincées deux fois au PBS 1X pendant 5 minutes à 4°C. Les anthères sont ensuite perméabilisées avec une solution contenant du PBS 1X avec Triton 0.05%, 1 mM EDTA pendant 15 min sur la glace. Les anthères subissent un traitement de saturation (3% BSA, 0,1% Tween-20, 1mM EDTA dans du PBS 1X) de 15 min afin de limiter le marquage aspécifique sur la glace. Un cercle est gravé grâce au stylo diamant sur une lame SuperFrost-Plus afin de délimiter à l'œil nu la zone de dissection d'étalement des méiocytes. Après cette étape, cinq anthères sont collectées et disséquées dans une goutte de PBS 1X, 0.05% Tween20 dans le cercle de la lame. Une fois toutes les anthères vidées, les cellules méiotiques sont étalées

uniformément dans le cercle. La lame est légèrement « séchée » ; il doit rester une pellicule de liquide afin d'avoir des protéines intactes. Pour la suite du protocole se référer à la section : 3.3.2 Page 69.

### **3.3.1.3 Pour l'expression des gènes de la méiose**

Les anthères sont disséquées et maintenues dans la glace, sur une coupelle à 4°C et avec des outils nettoyés au préalable. Pour cette analyse, les épis ciblés sont jeunes. Au milieu de l'épi, le stade désiré est un mélange de la division II de la méiose (Métaphase II, anaphase II et tétrades). Si le stade central est bon, les anthères de tous les épillets sont récoltées, afin de cerner la méiose dans toutes ses étapes. Une fois les 50 anthères réunies, elles sont transférées directement dans un tube RNase free préalablement refroidi et conservées à -80°C. Elles sont ensuite broyées au mortier avec de l'azote liquide et les ARN sont extraits à l'aide du kit : Macherey-Nagel (NucleoSpin RNA plant 50 preps N°740979.50). L'extrait d'ARN est soit conservé à -80°C ou est transcrit en ADNc. Toutes les étapes suivantes sont réalisées dans la glace : environ 1 µg d'ARN est prélevé, et, inclus dans la réaction de réverse transcriptase composée d'oligo-dT (Sigma Aldrich Référence O4387-.1ML) à 500 µg/mL, de dNTP Mix (10 mM chacun) et d'eau stérile qsp 12 µL. Le mélange est dénaturé à 65°C pendant 5 min dans un thermocycleur puis est immédiatement transféré dans la glace. La première solution composée de Tampon 5X first stand buffer ; 0.1 M DTT ; RNase OUT (Cat. No. 10777-019 ; 40 U/µL) est ajoutée au mélange dénaturé et est incubée 2 min à 42°C. La SuperScript™ II RT (Transcriptase reverse ; 200 unités) est ensuite ajoutée au mélange et incubée pendant 50 min à 42°C. La réaction est stoppée par une incubation du mélange à 70°C, pendant 15 min. Entre 12 et 30 µg d'ADN sont obtenus. Les ADNc obtenus seront utilisés dans les puces 192/24 (Chapitre 3.4.3 Page73).

### **3.3.1.4 Comportement méiotique**

#### **3.3.1.4.1 Atlas des méiocytes**

Les lames des méiocytes aux stades d'intérêt sont colorées au DAPI et scellées au vernis. Elles sont observées et les images sont acquises à partir du logiciel Zeiss avec l'échelle, au plus fort grossissement afin de bien apprécier le stade métaphase I, anaphase I et métaphase II et tétrades. L'atlas est construit à partir de quelques images qui sont représentatives des événements majoritaires de la méiose des plantes contrôles et des mutants. Cette analyse est strictement descriptive, et, l'objectif est de vérifier le bon déroulé de la méiose, à travers ces étapes, qui sont les plus simples à appréhender.

#### **3.3.1.4.2 Criblage des chiasmas**

Pour le comportement méiotique, les lames marquées au carmin acétique sont exploitées dans l'heure suivant le montage, car le liquide s'évapore et les chromosomes sèchent. Les images sont acquises avec un microscope optique en lumière blanche et contraste de phase au grossissement X40. Le blé tendre forme deux types d'appariements courants : les bivalents anneaux et les bivalents droits. Les premiers résultent de la formation de deux chiasmas et les seconds d'un seul. Le comptage du nombre de chiasmas est réalisé sur 50 cellules par génotype et la moyenne calculée pour chaque forme d'appariement. .

## **3.3.2 Immuno-marquage et exploitation des lames**

### **3.3.2.1.1 γH2AX**

Les lames contenant la fine pellicule de liquide ne doivent pas sécher. Les lames sont incubées une nuit avec une solution d'anticorps γH2AX anti-plante faite chez le lapin (dilution 1/600 ; fournit par le GRd (Charles White)) dans la solution de saturation (3% BSA, 0.05% Tween-20 dans du PBS1X). 100

$\mu\text{L}$  d'anticorps/lame sont déposés et les lames sont recouvertes avec du parafilm et mises en chambre climatique à 4°C pour une nuit. Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X. Elles sont incubées à température ambiante avec l'anticorps secondaire (100  $\mu\text{L}$  d'anticorps/lame) antilapin fait chez la chèvre alexa 488 (1/1000 dans la solution de saturation) dans une chambre humide à l'obscurité. Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X. Le vectashield contenant le DAPI est ajouté à la lame une fois drainée et une lamelle est apposée pour finaliser le montage. Les images sont acquises au microscope Axio Observer Zeiss.

Cet anticorps n'a pas été utilisé dans l'article, car il persiste des foci chez le mutant *spo11-2*. Pour les analyses de complexe synaptonémal et marqueur de la recombinaison, le triple marquage suivant a été optimisé.

### 3.3.2.1.2 ASY1, ZYP1 et DMC1

Les lames contenant la fine pellicule de liquide ne doivent pas sécher. 50  $\mu\text{L}$  de la solution contenant l'anticorps primaire (CS et recombinaison : *T. aestivum* ASY1 (rabbit ; Agrisera, réf AS08323) : stockage -20°C, à utiliser au 1/200<sup>ème</sup> ; *T. aestivum* ZYP1 (guinea pig ; Azahara C. Martin, John Innes Centre) : 1/300<sup>ème</sup> ; *T. aestivum* DMC1 (hens ; F. Benyahya, INRAE GDEC de Clermont-Ferrand laboratoire Génétique et Recombinaison) 1/20<sup>ème</sup>) sont appliqués sur la préparation. La lame est recouverte par un morceau de parafilm et mise à incuber pendant 48 heures à 4°C dans une chambre humide bien fermée (Voir MO-04). Les lames sont lavées au PBS 1X, trois fois pendant 5 minutes. Elles sont drainées légèrement, sans les sécher totalement puis 50  $\mu\text{L}$  de la solution d'anticorps secondaire (ASY1 : anti-rabbit AF 568 (rouge) Fischer Scientific A11036 : 1/400<sup>ème</sup> ; ZYP1 : anti-guinea pig A647, Fisher scientific ref A21450 : 1/300<sup>ème</sup> ; DMC1 : anti-chicken AF 488 ; A11039 : 1/300<sup>ème</sup>) sont déposés sur les méiocytes.

Un carré de parafilm est disposé sur la préparation et les lames sont incubées dans la chambre humide 1h à température ambiante. Les lames sont, ensuite, lavées trois fois 5 minutes au PBS1X. Elles sont ensuite drainées et montées entre lame et lamelle dans du Vectashield avec DAPI. Les lames sont observées au microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 800 avec le module Airyscan. Les lames subissent deux lectures : la première permet l'analyse du complexe synaptonémal à savoir sa mise en place en leptotène et zygotène, son déploiement le long des chromosomes homologues en pachytène et sa dissolution en diplotène. Pour ce faire l'acquisition des images se fait avec deux canaux spécifiques aux anticorps couplés aux fluorochromes des protéines du CS et l'analyse des volumes des protéines se fait avec le logiciel Imaris Imaris 9.2 (<https://imaris.oxinst.com/versions/9-2>) avec l'option créer une surface et il est possible d'apprécier la colocalisation en pachytène des protéines ASY1 et ZYP1 avec le module colocalisation (MO-06).

Les mêmes lames utilisées pour l'analyse du CS sont à nouveau acquises cette fois en ajoutant le canal d'émission des anticorps fluorescents couplés aux protéines DMC1. L'analyse de la cinétique de cette protéine nous a permis de conclure que l'étude doit se faire en zygotène car c'est à ce moment-là que l'on peut compter des foci. En effet, en leptotène, la protéine colore le noyau de manière uniforme, même s'il y a accumulation de DMC1 dans le nucléole, alors que des foyers de protéines DMC1 ponctiformes et comptables apparaissent en zygotène. Les photos des lames obtenues sont ensuite acquises au microscope confocal LSM800 en utilisant le module Airyscan (MO-05). Une fois les acquisitions faites, les photos sont analysées à l'aide du logiciel Imaris 9.2 et les foci sont automatiquement comptés à l'aide de l'option « Spots ».

## 3.4 Analyses moléculaires

### 3.4.1 Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN de feuilles ont été faites à l'aide d'un kit (sbeadex® tissue kit ; 960 tests) utilisant des billes magnétiques chargées positivement et fixant l'ADN qui est chargé négativement. Les ADN sont dosés au Tecan Infinite M200, avec l'utilisation du Hoechst qui est un agent intercalant de l'ADN qui émet de la fluorescence à la longueur d'onde de 461 nm. La quantité d'ADN des échantillons a été mesurée et oscille autour de 50 ng/μL par puits. Les concentrations des ADN sont ensuite ajustées à 10 ng/μL pour les analyses des génotypes par PCR classique ou Puce Fluidigm ou qPCR.

Ces deux méthodes ont eu pour objectif de caractériser l'absence de la séquence génomique en utilisant des amorces spécifiques des gènes de la méiose et spécifique des génomes A, B ou D. Au départ du projet la PCR classique a été utilisée avec l'utilisation d'amorces génome-spécifique, puis avec l'émergence de la technologie Fluidigm qui est moins gourmande en ADN (3 μL pour 24 réactions au lieu d'une), l'équipe s'est tournée vers cette méthodologie (Annexe : MO-09 ; MO-010).

### 3.4.2 Dessin des amorces spécifiques

Cette analyse a pour but d'appréhender et de dessiner le paysage transcriptomique des protéines de la méiose aux différentes étapes moléculaires de la recombinaison. Différentes protéines (21) ont été ciblées, depuis l'initiation du processus jusqu'à la résolution des cassures en NCO ou CO de type I ou II :

- Initiation de la recombinaison : SPO11-1, SPO11-2, TOP6B
- Stabilisation et signal de la cassure :  $\gamma$ H2AX, MER3, RAD50, NBS1
- Réparation et résolution en jonction de Holliday : DMC1, RAD51
- Voie des NCO : FANCM, FAN1
- CO interférents: ZYP1, SHOC1, HEI10, ZYP4, MSH4, MSH5, MLH1, MLH3
- CO non-interférents : MUS81, EME1A.

Méthodologie du dessin des amorces ARN

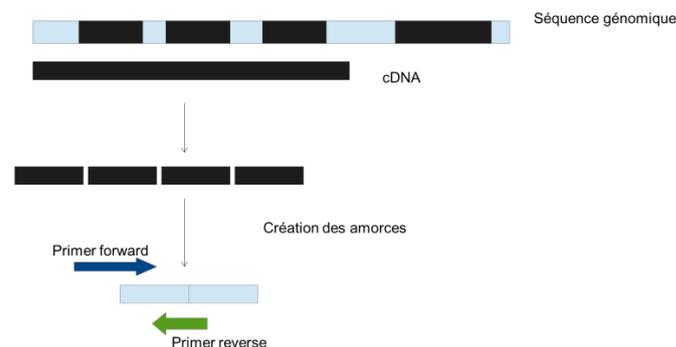


Figure 43 Méthodologie pour dessiner les amorces

Méthodologie de développement informatisé des amorces pour la qPCR des gènes méiotiques : Alignement des séquences génomiques (en noir les exons et en bleu les introns) avec les séquences codantes. Détermination des régions exons-exons. Le pipeline génère des amorces spécifiques des régions codantes.

**Tableau 7:** Amorces compatibles avec la chimie Fluidigm. Caractéristiques et liste des amorces retenues pour la puce 192/24

PUCE1				PUCE2			
GENE	Nom	Efficacité	Efficacité en %	GENE	Nom	Efficacité	Efficacité en %
Ta-ASY1-1	QRT-PCR-ASY1-FD1	2,16	116,40	Ta-ASY1-2	QRT-PCR-ASY1-FD2	1,88	88,40
Ta-DMC1-1	QRT-PCR-DMC1-FD2	1,85	85,30	Ta-DMC1-2	QRT-PCR-DMC1-FD3	2,05	104,50
Ta-EME1-1	QRT-PCR-EME1A-FD1	2,00	99,50	Ta-EME1-2	QRT-PCR-EME1A-FD2	1,91	90,70
Ta-FAN1	QRT-PCR-FAN1-FD2	1,99	99,00	Ta-H2AXB	QRT-PCR-H2AXB-FD1	1,77	76,60
Ta-FANCM-1	QRT-PCR-FANCM-FD1	1,94	94,30	Ta-FANCM-2	QRT-PCR-FANCM-FD2	1,95	94,90
Ta-GH2AX-1	QRT-PCR-GH2AX-FD1	2,00	99,70	Ta-GH2AX-2	QRT-PCR-GH2AX-FD2	1,82	82,10
Ta-HEI10-1	QRT-PCR-HEI10-FD3	2,06	105,70	Ta-HEI10-2	QRT-PCR-HEI10-FD4	2,04	103,70
Ta-MER3	QRT-PCR-MER3-FD3	2,19	118,80	Ta-MLH1-1	QRT-PCR-MLH1-FD2	1,74	73,80
Ta-MLH1-1	QRT-PCR-MLH1-FD1	1,86	86,00	Ta-MLH3	QRT-PCR-MLH3-FD1	1,88	88,30
Ta-MSH4	QRT-PCR-MSH4-FD4	2,50	149,90	Ta-MSH5-2	QRT-PCR-MSH5-FD2	2,17	117,30
Ta-MSH5-1	QRT-PCR-MSH5-FD1	1,71	71,40	Ta-TOPVIB-3	QRT-PCR-Mtop6b-FD2	2,09	108,70
Ta-TOPVIB-1	QRT-PCR-Mtop6b-FD1	2,06	105,50	Ta-TOPVIB-4	QRT-PCR-Mtop6b-FD4	1,98	97,90
Ta-TOPVIB-2	QRT-PCR-Mtop6b-FD3	2,03	103,40	Ta-MUS81-2	QRT-PCR-MUS81-FD3	1,92	92,10
Ta-MUS81-1	QRT-PCR-MUS81-FD1	2,17	117,20	Ta-NBS1	QRT-PCR-NBS1-FD3	1,94	94,40
Ta-NBS1	QRT-PCR-NBS1-FD2	2,19	119,10	Ta-RAD51	QRT-PCR-RAD51-FD1	2,14	113,70
Ta-SHOC1	QRT-PCR-SHOC1-FD1	2,26	125,70	Ta-SHOC1	QRT-PCR-SHOC1-FD2	2,04	104,30
Ta-SPO11-1	QRT-PCR-SPO11-1-FD1	2,03	102,70	Ta-ZYP1	QRT-PCR-ZYP1-FD1	2,03	102,50
Ta-ZYP4	QRT-PCR-ZYP4-FD1	1,99	98,50	Ta-ZYP4	QRT-PCR-ZYP4-FD2	2,01	101,30
Ta-ZYP4-5BL	QRT-ZYP4-5BL	2,13	112,60	Ta-ZYP4-5BL	QRT-ZYP4-5BL	2,13	112,60
Ta-SPO11-11-2-7A	Spo11.2A= 11A	2,00	100,00	Ta-SPO11-11-2-7A	Spo11.2A= 11A	2,00	100,00
Ta-SPO11-11-2-7B	Spo11.2B= 8B	2,00	100,00	Ta-SPO11-11-2-7B	Spo11.2B= 8B	2,00	100,00
Ta-SPO11-11-2-7D	Spo11.2D= 4D	2,00	100,00	Ta-SPO11-11-2-7D	Spo11.2D= 4D	2,00	100,00
Ta-Ta 54238	Gene de ménage	2,00	100,00	Ta-Ta 54238	Gene de ménage	2,00	100,00
Ta-Ta54227	Gene de ménage	2,00	100,00	Ta-Ta54227	Gene de ménage	2,00	100,00

Les séquences protéiques de blé ont été récupérées conformément au processus décrit dans le paragraphe 3.2.2 Page 63. Pour dessiner les amorces spécifiques pour la qPCR, le logiciel *ugene* a été à nouveau utilisé. Un alignement des séquences génomiques sur les séquences des CDS a permis de délimiter les exons (Figure 43). Les amorces ont été dessinées dans les régions exoniques, afin de ne cibler que les transcrits. Afin d'automatiser, les recherches sur les 21 gènes cités au-dessus, un script python a été rédigé en donnant comme sortie les amorces exoniques du gène spécifique au génome A, B et D. Les amorces dessinées ont été testées, pour savoir si elles étaient compatibles avec la qPCR : sur les 80 dessinées, 36 ont été retenues (Tableau 7).

### 3.4.3 Puce FLUIDIGM

Les puces Fluidigm sont utilisées pour deux objectifs :

- Criblage des mutants dans la population irradiée (Tableau 2)
- Analyse du paysage transcriptomique des gènes de la cascade méiotique

L'utilisation des puces Fluidigm pour la PCR quantitative nécessite une pré-amplification. Les amorces des 24 marqueurs sont mélangées en quantité équimolaire (0.2  $\mu$ M) dans du TE 1X. Le mélange (1  $\mu$ L) est distribué dans une plaque 96 (MicroAmp Fast à 0.1 mL), complété d'un volume équivalent de « Préamp Master Mix Fluidigm » et ajusté à 3.7  $\mu$ L par puits à l'aide de TE 1X. Les ADNc (1.3  $\mu$ L ajustés à 60 ng/ $\mu$ L) sont alors ajoutés et l'amplification est réalisée dans un thermocycleur Verity avec une dénaturation initiale de 10 min à 95°C suivie de 14 cycles de 15 sec à 95°C et 4 min à 60°C.

Les oligonucléotides en excès sont éliminés par un traitement de 30 min à 37°C à l'exonucléase I à 4U/ $\mu$ L (2  $\mu$ L/puits) suivi d'une étape d'inactivation de 15 min à 80°C. Puis, 18  $\mu$ L de TE 1X sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques peuvent alors être stockées en chambre froide (4°C) ou au congélateur (-20°C).

L'analyse d'expression est réalisée à l'aide de puces BioMark Fluidigm 192:24 permettant d'analyser 192 échantillons avec 24 marqueurs simultanément. Ces puces sont préalablement préparées par injection d'un fluide spécial (« control line fluid ») dans l'accumulateur 2 (Figure 44) à l'aide d'une seringue.

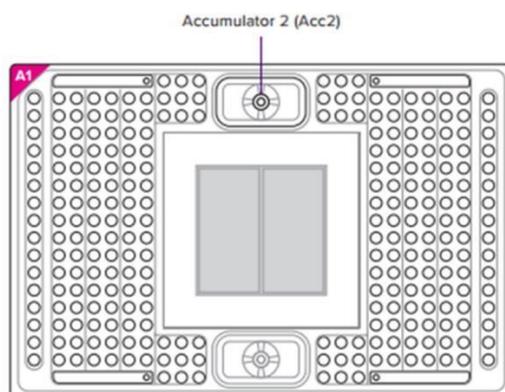


Figure 44 Schématisation de la puce Fluidigm

Dans chacun des 192 puits, 1.8 µL de produit de pré-amplification sont additionnés de 2.5 µL d'un mélange des éléments fourni dans le kit spécifique (annexe MO-09) auquel sont ajoutés 0.17 µL d'EvaGreen 20 X par puits qui sert à la mesure de la variation de quantité d'ADN amplifié pour chaque échantillon. Chaque marqueur est constitué d'un mélange des amorces (5 µM chaque) et de 1X « Assay Loading reagent » dilués en TE 1X. La plaque est finalement chargée selon le protocole défini en MO10.

L'amplification PCR se fait selon le programme GE 192\*24 Standard v1 (Figure 45) :

1. 2 minutes à 50°C
2. 10 minutes à 95°C
3. Puis 40 fois : 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C.

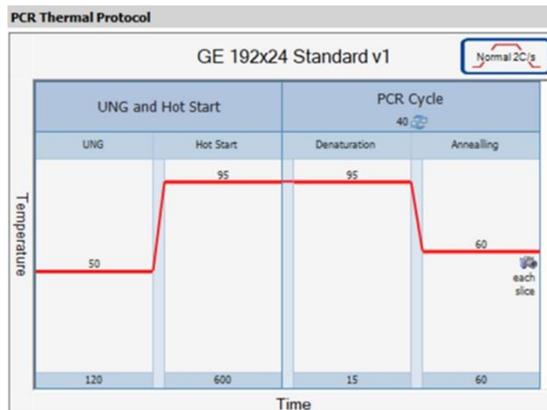


Figure 45 Programme PCR de la puce Fluidigm

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel « Fluidigm Real-Time PCR Analysis ». Afin de mener à bien cette analyse, les échantillons sont téléchargés dans « Sample Setup » en précisant quels sont les ADN de référence et quels sont les témoins H<sub>2</sub>O « BLANK » (voir les détails en annexe MO-10).

### 3.4.4 Complémentation hétérologue du gene Ta-spo112-7A-CS

Pour l'expression de TaSPO11-2 dans Arabidopsis, les séquences codantes TaSPO11-2-7A ont été synthétisées et clonées dans un vecteur de destination GATEWAY pMDC32 dans lequel le promoteur 35S a été remplacé par le promoteur Arabidopsis RAD51 (séquences jointes en annexe page XX).

Ce plasmide a ensuite été inséré dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1, qui a ensuite été utilisée pour transformer des plantes hétérozygotes d'Arabidopsis SPO11-2-3 / Spo11-2-3 (Vrielynck et al., 2016) par la méthode du trempage floral (Clough and Bent, 1998). Les graines des plantes traitées par *Agrobacterium* ont été semées sur le sol et les transformants ont été sélectionnés pour leur résistance à l'hygromycine.

## 4 Résultats

### 4.1 Développements technologiques

Au début de cette thèse, seuls les simples mutants homozygotes *Spo11-2* pour les trois copies homéologues et les hybrides dérivés de leurs croisements avaient été produits. Il était donc nécessaire de poursuivre le schéma de génération des doubles et triples mutants et de développer une stratégie de criblage des descendants.

Par ailleurs, le laboratoire de cytogénétique était également en cours de développement et il était nécessaire d'internaliser les procédés l'immunomarquage essentiels à l'observation des comportements méiotiques des mutants et des contrôles sauvages. En particulier, tous les anticorps couramment utilisés pour suivre le déroulement de la méiose (*ASY1*, *ZYP1*, *DMC1*) n'étaient pas disponibles ou mis au point.

Ce premier chapitre est donc consacré aux développements de matériel végétal et de technologies qui ont constitués une part importante du travail au début du stage doctoral.

#### 4.1.1 Production du matériel végétal

##### 4.1.1.1 Caractérisation moléculaire des mutants

Les mutants utilisés pour cette étude sont issus d'une population d'irradiation de plus de 4000 individus réalisés à partir du cultivar Renan. Ils sont isolés par suite d'un crible PCR à l'aide d'amorces spécifiques de chaque copie. Afin de caractériser les mutations, j'ai développé au laboratoire toute une série d'amorces permettant de démontrer l'absence de la séquence génomique du gène *Spo11-2* dans sa totalité et pour les trois copies. Les amorces entourent les huit premiers exons car les autres ne sont pas génome spécifiques (**Tableau 8**).

**Tableau 8:** Amorces pour tester l'absence des exons Analyse de l'absence des exons du gène *Spo11-2* chez les mutants Renan irradiés

NOM	Target genome	SEQUENCE 1	SEQUENCE 2	CONDITIONS			
		AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Taille de l'amplicon	Amorces génomespécifique: <i>in silico</i>	Amorces génome spécifique: PCR
EXON1	A	ATGGCGGAGGCGGA	CGGCGAGAGCATGT	46.7	90	OK	NO
	B	GTGCGGATGGCGCA	GCAGACCTCGGGC	46	102	OK	OK
	D	GTGCGGATGGCGCA	ACAGACCTCGAGGG	46.7	102	OK	OK
EXON2	A	GCTTCTCTCCATAGGTTCC	CAGGGGGAGGACAGA	51.6	99	OK	OK
	B	GCTTCTCTCGATAGGTTCCG	CAGGGGGAGGACAGA	51.6	101	OK	NO
	D	GCTTCTCTCGATAGGTTCCG	CAGGGGGAGGACAGG	54.3	101	OK	OK
EXON3	A	GGCACAACAGATTTCC	CCTCTGACGAATGCC	48.8	141	OK	OK
	B	GGCACCACAGATCTCA	CACCTCTGACGAATGC	50.7	143	OK	OK
	D	GGCACAACAGATCTCA	CCTCTGACGAATGCC	48.8	141	OK	OK
EXON4	A	GTATGGAAGTCATGGAG	GATTTTGAAGACCTTGGATA	52.3	151	OK	OK
	B	CTACAAGATCTTGGGAGAC	GTGTTTGGATTTTGAAGACC	54.3	135	OK	OK
	D	GTATGGAAGTCATGGAG	GCCTTTGGATTTTGAAGAC	53	158	OK	OK
EXON5	A	CTCAGATTTTGCACTTTGG	CAAGTCGTCCAATCAGAGC	57.3	110	OK	NO
	B	CTCAGATTTTGCACTTTGG	CAATCAGAGCCCCTCTAC	56.1	101	OK	NO
	D	CTGCACTTTGGTCTTGTGT	CAAGTCGTCCAATCAGAGC	57.3	102	OK	NO
EXON6	A	CTCAACCTTGTCTTCGTC	CAGTACCTTCTCCACTAC	53.8	157	OK	OK
	B	GCCTCAACCTTGTCTTCA	ACCTTCTCCACTAGAAATG	51.6	155	OK	NO
	D	CCCTCAACCTTGTCTTCAT	ACCTTCTCCACTAGAAATG	51.6	155	OK	NO

EXON7	Target genome	AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Amplicon size bp	Probes genome specific: serial cloner	Probes genome specific: PCR
	A		GACCGCTTATATAATCAGA	AGAGGTACAGAACCTTG	50	81	OK
B		GACCGCTTATATAACCAGC	GGAGGTACAGAACCTTGT	53.8	81	OK	OK
D		CTATTTGAACAAAGGATGCC	GGAGGTACAGAACCTCGT	56.1	122	OK	OK
EXON8	Target genome	AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Amplicon size bp	Probes genome specific: serial cloner	Probes genome specific: PCR
	A		CGTACTGATCCAACCTTATCTTTA	GTCCACTAATGCAAATATTGGC	58.4	99	OK
B		CGTACTGATCCAACCTTATCTTTT	GTCCACTAATGCAAATATTGGC	58.4	99	OK	NO
D		TGTAAGTATCCAACCTTATC	CACTAATGCAAATATTGGC	50.9	96	OK	NO
EXON9	Target genome	AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Amplicon size bp	Probes genome specific: serial cloner	Probes genome specific: PCR
	A		TCTCAATTCAGGAACCCTG	ATCCAAAGGAATACCGTATC	54.3	102	OK
B		CTTCAATTCAGGAACCCTG	ATCCAAAGGAATACCGTATC	54.3	102	OK	NO
D		TCAAAATTCAGGAACCCTGC	ATCCAAAGGAATACCGTATC	54.3	102	OK	NO
EXON10	Target genome	AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Amplicon size bp	Probes genome specific: serial cloner	Probes genome specific: PCR
	A		CAACATTAATGATATTCTTC	CAAAATAGCAGACACACC	50	170	OK
B		GACACTAATGATATTCTTC	GAAATAGCAGACACACC	50	171	OK	NO
D		GGCATTAAATGAAATTCTTC	GAAATAGCAGACACACC	52.4	171	OK	NO
EXON11	Target genome	AMORCES FD	AMORCES RV	TM °C	Amplicon size bp	Probes genome specific: serial cloner	Probes genome specific: PCR
	A		CAATACCGGGAAGTTATAAGC	GCAACGCTGCACTCTGTC	58.4	189	OK
B		GATACCGGCAAGTTATAAGC	ACAACGCTGCACTCTGTC	56.1	188	OK	NO
D		CGATACCGGCAAGTTATAAG	GTAACGCTGCACTCTGTC	56.1	189	OK	NO

La spécificité des amorces à chaque génome est validée sur les témoins aneuploïdes, les lignées nullisomiques-tétrasoniques (NT) du groupe 7 produites par (Sears, 1954b) : N7AT7B (lignée nullisomique pour le chromosome 7A et tétrasomique pour le chromosome 7B), N7AT7D, N7BT7A, N7BT7D, N7DT7A, N7DT7B (Figure 46).

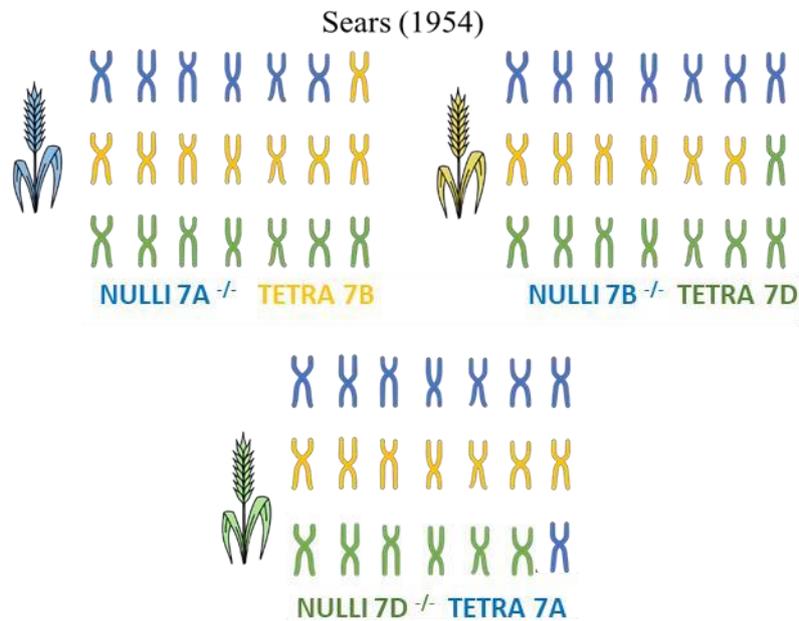


Figure 46 Schéma des caryotypes des lignées nulli tétra

Schématisation des caryotypes des témoins aneuploïdes, les lignées nullisomiques-tétrasoniques (NT) du groupe 7 produites par Sears (Sears, 1954b).

La Figure 46, illustre l'amplification des couples d'amorces des exons 2, 3, 4, 6 et 8 spécifiques de la copie A sur la série de lignées aneuploïdes. Il y a absence d'amplification chez les lignées N7AT7B et N7AT7D chez qui le chromosome 7A est absent alors que l'amplification est nette chez les lignées ne possédant pas soit le chromosome 7B soit le chromosome 7D mais ayant en revanche deux ou quatre copies du chromosome 7A. Ce profil typique traduit la spécificité de ce couple d'amorces. Sur les 33 couples d'amorces dessinés (11 pour chacun des génomes A, B et D), 14 ont montré une bonne spécificité pour les différentes copies.

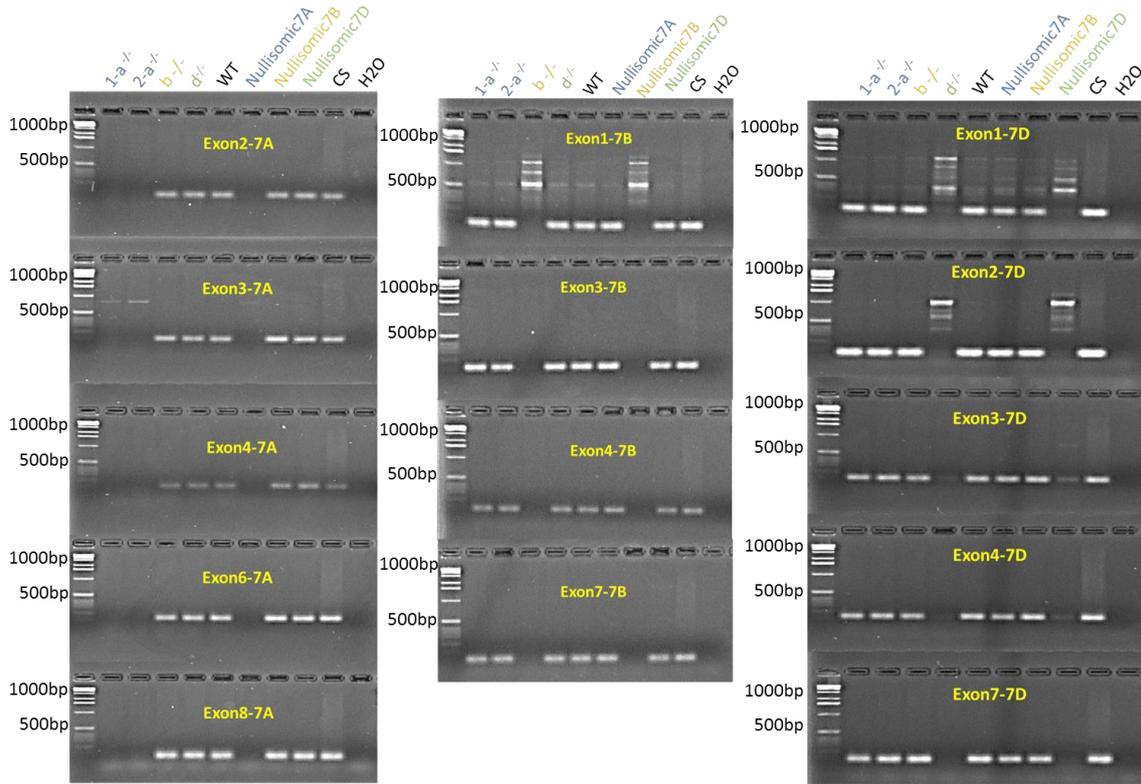


Figure 47 Vérification de l'absence du gène spo11-2

Parmi les différents mutants de chaque copie, deux (3321 et 3371) ont ainsi confirmé que le gène TaSpo11-2-7A est bien délété, deux (1169 et 3942) pour le gène TaSpo11-2-7B et deux (3414 et 4084) pour le gène TaSpo11-2-7D. Les sept premiers exons sont absents des mutants simples  $a^{-/-}$ ,  $b^{-/-}$  et  $d^{-/-}$ .

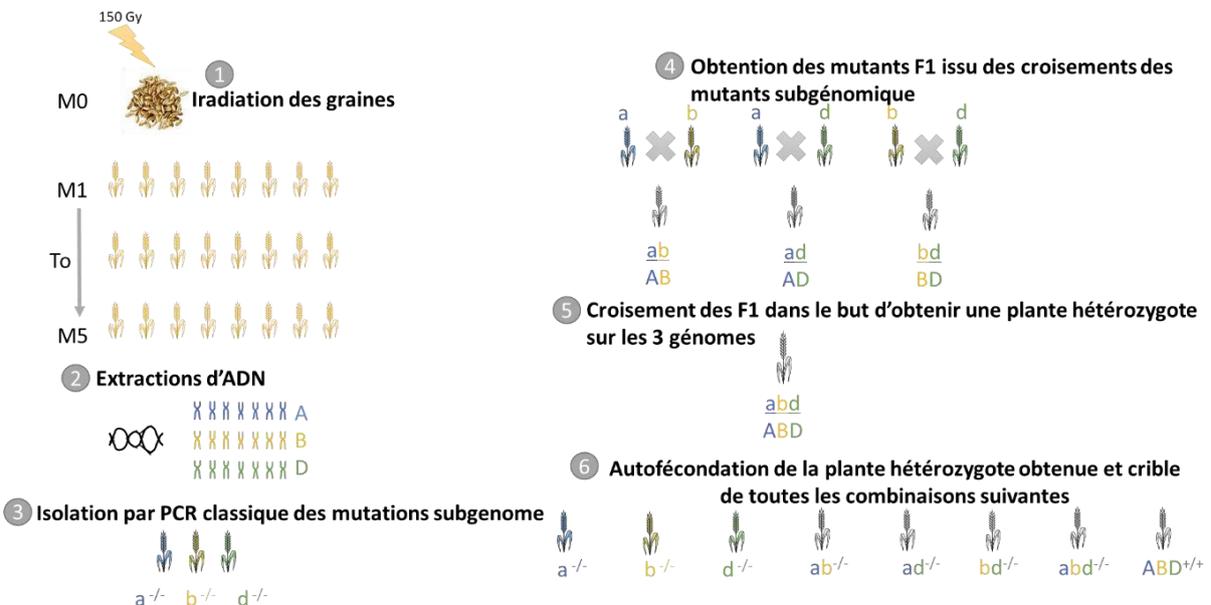


Figure 48 Schéma de la méthode d'obtention des mutants

Plan d'obtention des mutants simples ou multiples sur les trois génomes du blé tendre

**Tableau 9:** Mutants *Spo11-2* sélectionnés

Mutants (surlignés en jaune) et les couples d'amorces qui ont servi à les cribler dans la population Renan irradiée

NOM	N°dans la population	Amorces séquence	Amplicon	Condition PCR
Ta-Spo11.2-C2-7AL-RE	3321/1	GGCTTGGAAATCATACAGATAC	928	56°C
	3371/1	ACAACACCAGCTTATAACTTC		
Ta-Spo11.2-C2-7BL-RE	1169/1		103	56°C
	3280/1	GCTACAAGATCTTGGGAGAC		
	3942/1	TTGACATGGCGCTGACAGC		
	4226/1			
Ta-Spo11.2-C2-7DL-RE	3414/1	GATGGTGGAGACAGGCACT	97	56°C
	4084/1	ACCCTGCACAATCTTCTGGCG		

À la suite de l'identification et la caractérisation des simples mutants, ceux-ci ont été croisés entre eux afin de donner des plantes hétérozygotes sur deux génomes selon le plan en Figure 48. Puis ces plantes hétérozygotes ont été croisées entre elles. Dans le cas des mutants *spo11-2*, l'équipe s'est aléatoirement focalisée sur le croisement entre les hybrides AD<sup>+/-</sup>(4084x3321/2) et AB<sup>+/-</sup>(3371x1169/2) qui a donné des descendants chez lesquels des plantes hétérozygotes sur les trois génomes ont pu être triées.

Le crible des plantes hétérozygotes sur les trois génomes nous a demandé de développer une technique d'analyse basée sur la PCR quantitative (qPCR). Des amorces compatibles avec cette approche ont été dessinées (Tableau 10 et Figure 49). Les conditions pour des amorces qPCR sont un TM à 60°C et des amplicons de 70 à 200 paires de bases et une efficacité comprise entre 1.7 et 2.3. Les amorces ont été testées sur les témoins aneuploïdes, les lignées nullisomiques-tétrasoniques (NT) du groupe 7 produites par (Sears, 1954b)

**Tableau 10:** Amorces qPCR *Spo11-2*

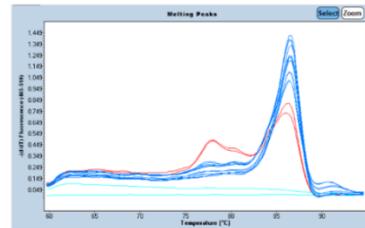
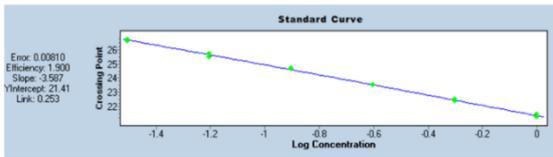
Amorces spécifiques des différentes copies homéologues du gène *Spo11.2* validées pour le test des hétérozygotes en qPCR.

Spo11.2-C2-F3	TGTACTAAACCAGGGTCAATTAA	134	60°C
Spo11.2-C2-7AL-R4	CACAACACCAGCTTATAACTTC		

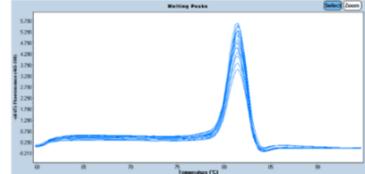
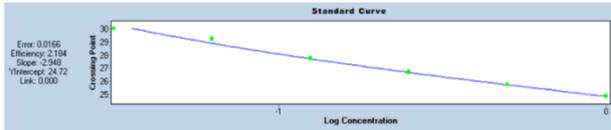
Spo11.2-C2-7BL-F2	TGCTACAAGATCTTGGGAGAC	104	60°C
Spo11.2-C2-R7	ATTGACATGGCGCTGACAGCT		

Spo11.2-C2-7DL-F4	GGATGGTGGAGACAGGCACT	134	60°C
Spo11.2-C2-R6	GACAAGCAAGTAACGCTGCAC		

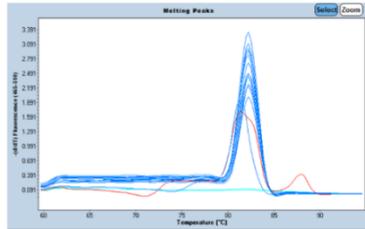
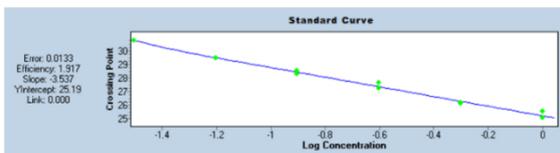
Ta-54227



Ta-Spo11-2-7AL



Ta-Spo11-2-7BL



Ta-Spo11-2-7DL

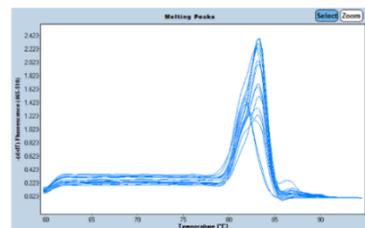
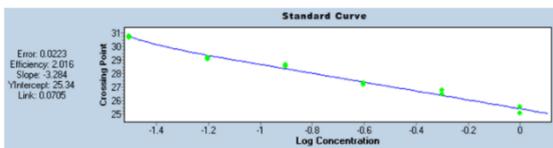


Figure 49 Efficacité d'amplification des amorces de qPCR

Vérification de l'efficacité des amorces génomes-spécifiques entre 1.7 et 2.3 et de la présence d'un seul pic d'amplification

### Q-PCR

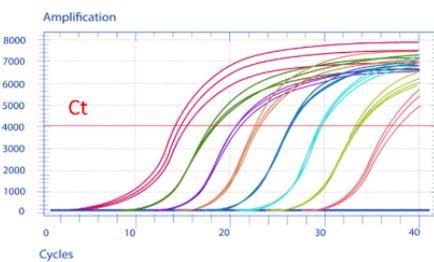


Figure 50 Schéma de la valeur du ct seuil

La valeur du cycle de seuil ( $C_t$ ) (Figure 50) a été convertie en quantité de copies de gènes.

Un calcul de la valeur quantitative (VQ) a été mis en place :

- $\Delta ct = ct \text{ gène de ménage} - ct \text{ du gène d'intérêt}$
- $\Delta\Delta ct = 2^{\Delta ct}$  (Attention l'efficacité doit être autour de 2 (1,75-2,25))
- $VQ = \Delta\Delta ct \text{ de la plante d'intérêt} / \Delta\Delta ct \text{ de la plante contrôle}$

C'est la valeur quantitative de VQ qui va nous permettre de caractériser le génotype de nos mutants (**Tableau 11**).

**Tableau 11:** Calcul de la VQ à partir des ct et génotypage des individus

INDIVIDU	Ct MENAGE	Ct SPO11-2A	Ct SPO11-2B	Ct SPO11-2D	Delta ct A	Delta delta ct A	VQ A	Delta ct B	Delta delta ct B	VQ B	Delta ct D	Delta delta ct D	VQ D
Re	24,73	26,99	26,8	26,47	-2,26	0,20877198	1,1138732	-2,07	0,2381595	1,0933027	-1,74	0,299369676	1,0933027
Re	24,46	27,05	26,8	26,47	-2,59	0,166085727	0,8861268	-2,34	0,197510328	0,9066973	-2,01	0,248273124	0,9066973
3321	24,75	40	27,16	26,24	-15,25	2,57E-05	0,0001369	-2,41	0,188155843	0,8637543	-1,49	0,356012549	1,3001634
3371	24,59	40	26,99	26,11	-15,41	2,30E-05	0,0001225	-2,4	0,189464571	0,8697622	-1,52	0,348685917	1,2734064
1169	25,04	27,27	33,92	26,57	-2,23	0,213158723	1,1372781	-8,88	0,002122529	0,0097438	-1,53	0,346277367	1,2646103
4084	24,69	26,93	27,06	29,47	-2,24	0,211686328	1,1294223	-2,37	0,193445624	0,8880377	-4,78	0,036397925	0,1329258
?	24,69	28,1	28,16	27,34	-3,41	0,094077922	0,5019394	-3,47	0,090245575	0,4142843	-2,65	0,159320078	0,5818394

Une valeur de VQ comprise entre 0 et 0,2 ( $0 < VQ < 0,2$ ) est indicative d'une absence de détection du gène en question et donc qu'il est à l'état homozygote mutant (hmz mutant en jaune). Si VQ est compris entre 0,4 et 0,65, alors la plante est considérée comme hétérozygote (htz en vert) et si la valeur est supérieure à 0,8 les individus sont classés comme homozygotes sauvages (hmz sauvage en rouge). Le **Tableau 12** correspond à une autre manière visuelle de représenter les résultats afin de voir rapidement les génotypes.

**Tableau 12:** schématisation des génotypes obtenus en qPCR

TEST: Quantité relative des copies du gene spo11-2			
Génotype	A	B	D
d <sup>-/-</sup>	0,88	1,33	0,02
-/-			
d	0,83	0,98	0,02
b <sup>-/-</sup>	1,10	0,00	0,84
b <sup>-/-</sup>	0,88	0,00	1,01
a <sup>-/-</sup>	0,00	1,21	0,93
a <sup>-/-</sup>	0,00	1,27	0,94
abd <sup>-/-</sup>	0,00	0,00	0,09
ABD <sup>-/-</sup>	0,43	0,64	0,60
ABD <sup>+/+</sup>	0,96	0,97	0,97
ABD <sup>+/+</sup>	1,04	1,03	1,03
H2O	2916,45	11,79	315,17

Sur 80 individus issus du croisement entre AD<sup>+/-</sup>(4084x3321/2) et AB<sup>+/-</sup>(3371x1169/2), six plantes hétérozygotes pour les trois copies ont été isolées et multipliées pour produire une descendance suffisante pour la suite du projet. Parmi celle-ci, 351 plantes ont été analysées par la qPCR et 74 plantes ont été conservées pour l'étude des mutants Ta-*spo11-2-7-Re*. Les plantes sœurs mutantes pour le gène Spo11-2 caractérisées en qPCR ont été vérifiées en PCR classique avec les mêmes amorces.



Figure 51 Positions des amorces spo11-2 utilisées

Schéma des positions des amorces utilisées spécifiques de chaque génome et exons (qPCR et PCR classique de vérification)

A l'aide des couples d'amorces « Amorces A », « Amorces B », « Amorces D », nous avons confirmé en Figure 51 que les mutants isolés par qPCR ont bien les génotypes annoncés via cette méthodologie. En effet les plantes témoins ABD<sup>+/+</sup> ont bien une amplification présente pour les génomes A, B et D. A *contrario* les triples mutants abd<sup>-/-</sup> n'ont aucun fragment d'amplification avec les amorces A, B et D. Les autres combinaisons des plantes sœurs ont bien aussi le génotype annoncé en qPCR. De plus les

spécificités des amorces sont aussi présentées dans la migration de produits de PCR classique à l'aide des lignées aneuploïdes. Le témoin positif Renan a aussi un fragment amplifié pour les trois amorces.

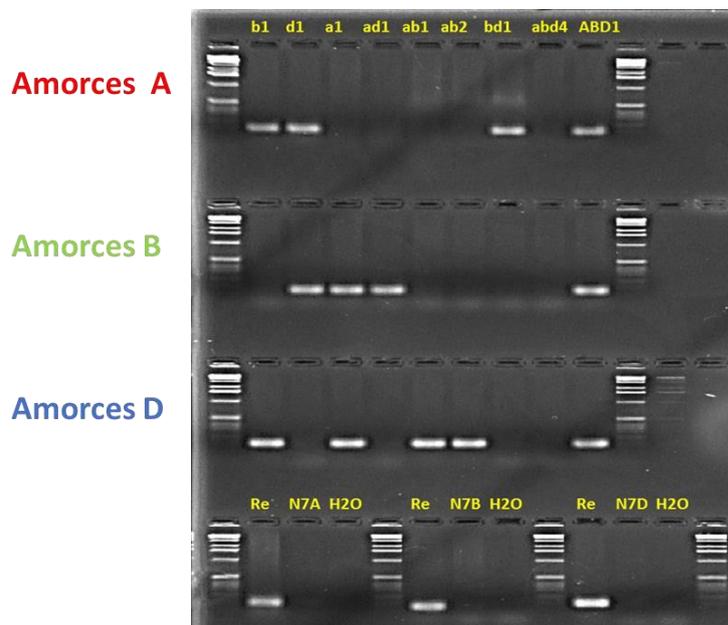


Figure 52 Génotypage des mutants *spo11-2*

Résultats des PCR des vérifications des mutants plantes sœurs isolées en qPCR

Ces mutants ont été caractérisés à travers des aspects morphologiques, moléculaires, cytologiques et cytogénétiques (Benyahya et al., 2020). Il est à noter qu'à partir de l'autofécondation de la plante hétérozygote à l'origine de la population de plantes sœurs *Spo11-2*, nous nous attendions à obtenir les proportions mendéliennes suivantes (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Tableau de gamètes pour une plante hétérozygote

Echiquier de croisement issu de l'aufécondation d'une plante hétérozygote sur les trois génomes pour le gène *Spo11-2*



|     | abd        |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| abd | abd<br>abd |
| ABD | abd<br>ABD |
| aBD | abd<br>aBD |
| Abd | abd<br>Abd |
| abD | abd<br>abD |
| ABd | abd<br>ABd |
| aBd | abd<br>aBd |
| AbD | abd<br>AbD |

Nous avons comparé les effectifs attendus en regard des effectifs réels :

	<u>abd</u>											
	abd											
		abd										
Proportions attendues	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,14
Proportions observées	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06	0,03	0,06	0,12	0,04
<b>Pour 351 attendues</b>	5,48	10,97	10,97	10,97	5,48	5,48	5,48	5,48	5,48	5,48	5,48	49,14
<b>Pour 351 observées</b>	3,00	7,00	6,00	6,00	8,00	8,00	3,00	20,00	11,00	20,00	42,00	15,00

Un test du khi2 nous a permis de conclure que nous avons une distorsion de ségrégation en faveur des mutants les moins impactés (mutés sur une seule copie) et presque 8 fois plus de plantes ABD<sup>+/+</sup> qu'attendu. En revanche, il y a un déficit d'un facteur 3 du nombre de plantes hétérozygotes. A ce jour nous n'avons pas d'explication précise de ces distorsions mais il est sûr qu'elles ne sont pas dues à une cause gamétique mais plutôt zygotique car le pollen des plantes hétérozygotes est semblable au témoin ABD<sup>+/+</sup>.

#### 4.1.1.2 Caractérisation moléculaire précise des délétions

Une analyse plus détaillée de chaque mutant confirmé a été conduite à l'aide d'une puce hautedensité de SNP (35K-BW ; nos résultats non publiés) dérivée de la puce publique 280K-BW (Rimbert et al., 2018). La méthodologie d'analyse est expliquée dans la section 3.2.3 Page 64. Ces analyses ont été conduites sur les simples mutants (2 mutants par génome), sur la plante KO spo11-2 sur les 3 génomes et sa plante sœur WT et le témoin Renan non irradié soit 9 individus au total. Ces données ont permis de révéler des variations structurales de petite ou grande intensité, sur les chromosomes. Tout d'abord pour l'analyse des variations structurales, des graphiques permettent de constater que les chromosomes du groupe 7 sont très affectés par les délétions dues aux irradiations (Figure 53, Figure 54 et Figure 55)

chr7A

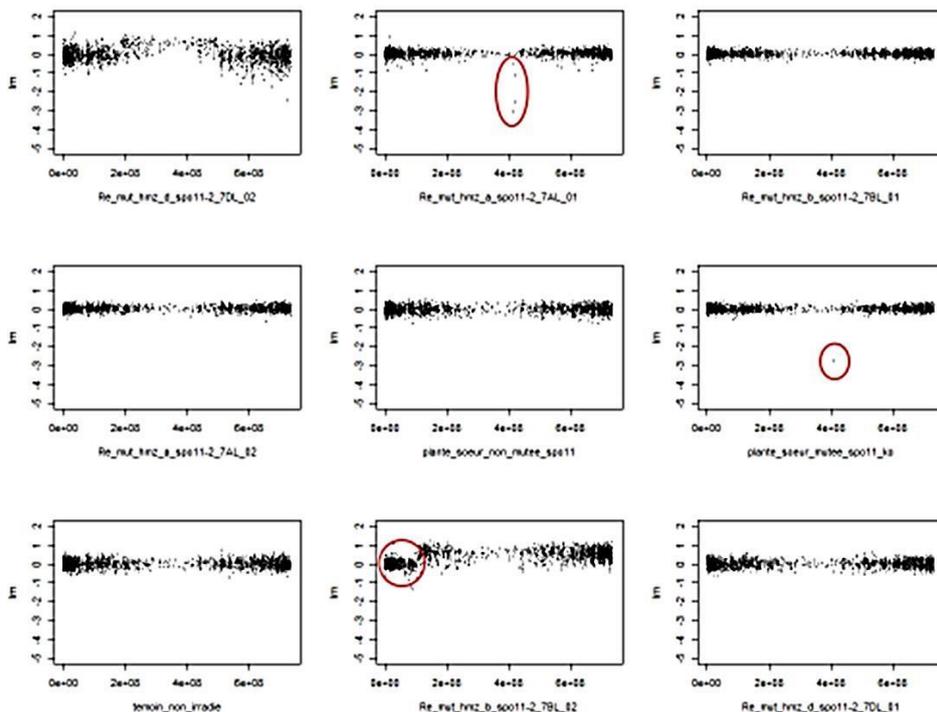


Figure 53 Variations structurales sur le Chr7A

Visualisation graphique des variations structurales des mutants spo11-2 sur le chr7A

chr7B

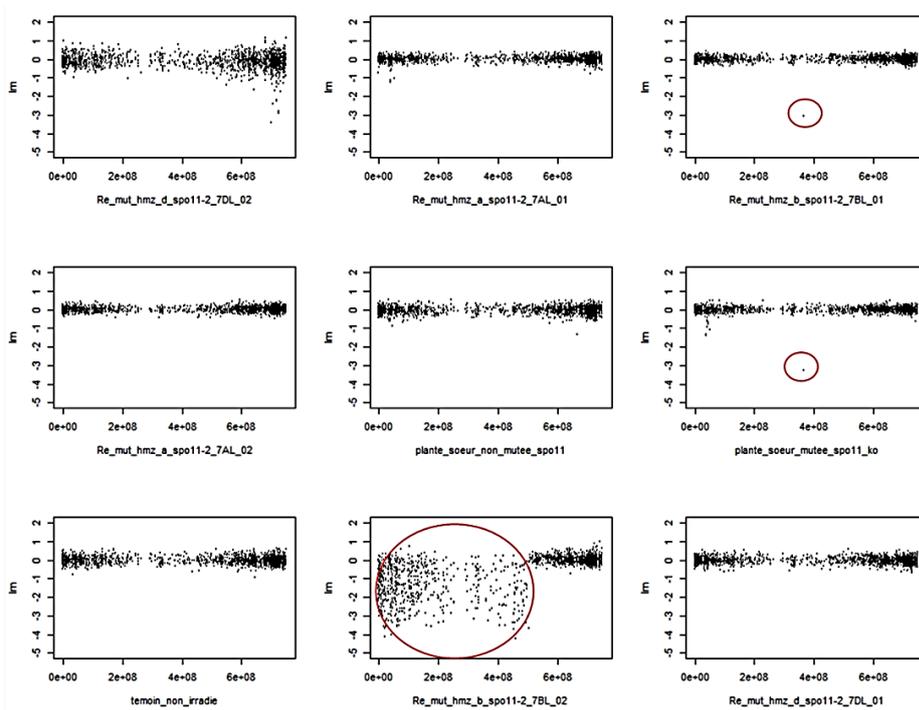


Figure 54 Variations structurales sur le Chr7B

Visualisation graphique des variations structurales des mutants spo11-2 sur le chr7B

chr7D

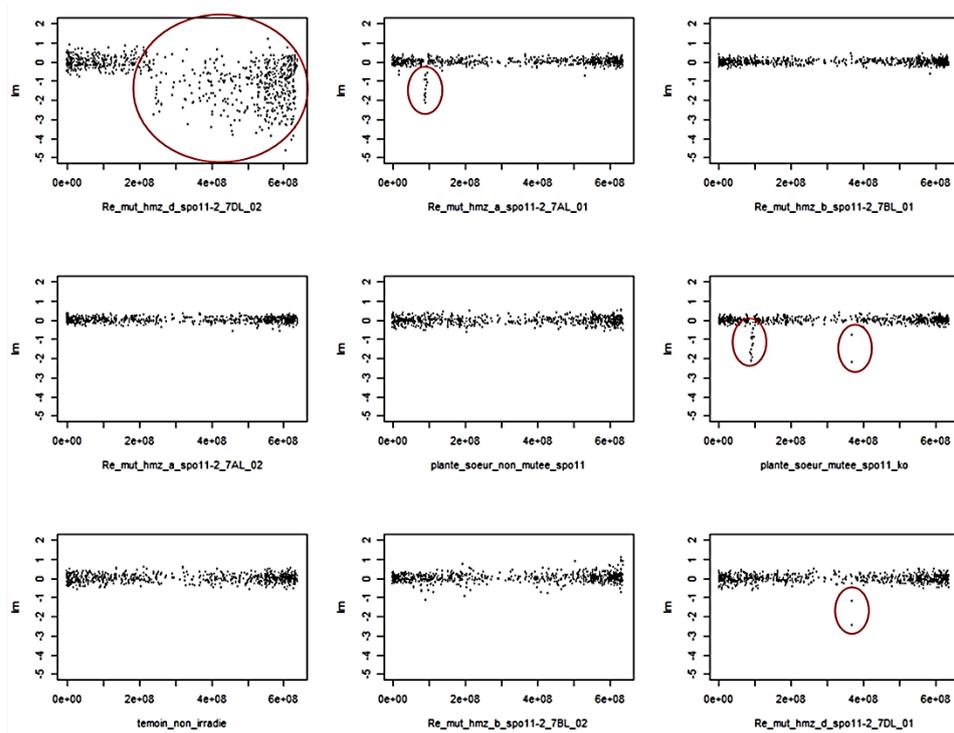


Figure 55 Variations structurales sur le Chr7D

Visualisation graphique des variations structurales des mutants *spo11-2* sur le chr7D

La structure chromosomique de certains mutants est fortement perturbée avec des délétions couvrant parfois des bras presque entiers de chromosomes. C'est le cas pour deux mutants simple génome *spo11-2* (copie B : 3942 et copie D : 3414 Figure 54 et Figure 55). Par chance les croisements que nous avons choisis pour générer les plantes hétérozygotes *Taspo11-2<sup>+/−</sup>* sur les 3 génomes A, B et D n'ont pas impliqué pas ces mutants.

La deuxième analyse met en exergue les larges variations structurales, c'est-à-dire les événements de très grande ampleur et visibles (Figure 56). Ceci se traduit graphiquement par un décalage dans l'ordonnement du chromosome, une rupture nette visible par la discontinuité du trait représentant la structure du chromosome. Ce n'est pas le cas pour les mutants nuls *spo11-2<sup>−/−</sup>* pour les trois chromosomes homéologues du groupe 7. Les mutations observées ne sont que des outliers, c'est-à-dire des tous petits points qui s'écartent nettement de l'organisation horizontale du chromosome et qui sont représentés en rouge. Dans les analyses classiques d'études de larges variations, ils ne sont même pas pris en compte. Nous les avons analysés de plus près et ce sont eux qui correspondent aux délétions que l'on va pouvoir caractériser au niveau du génome des mutants.

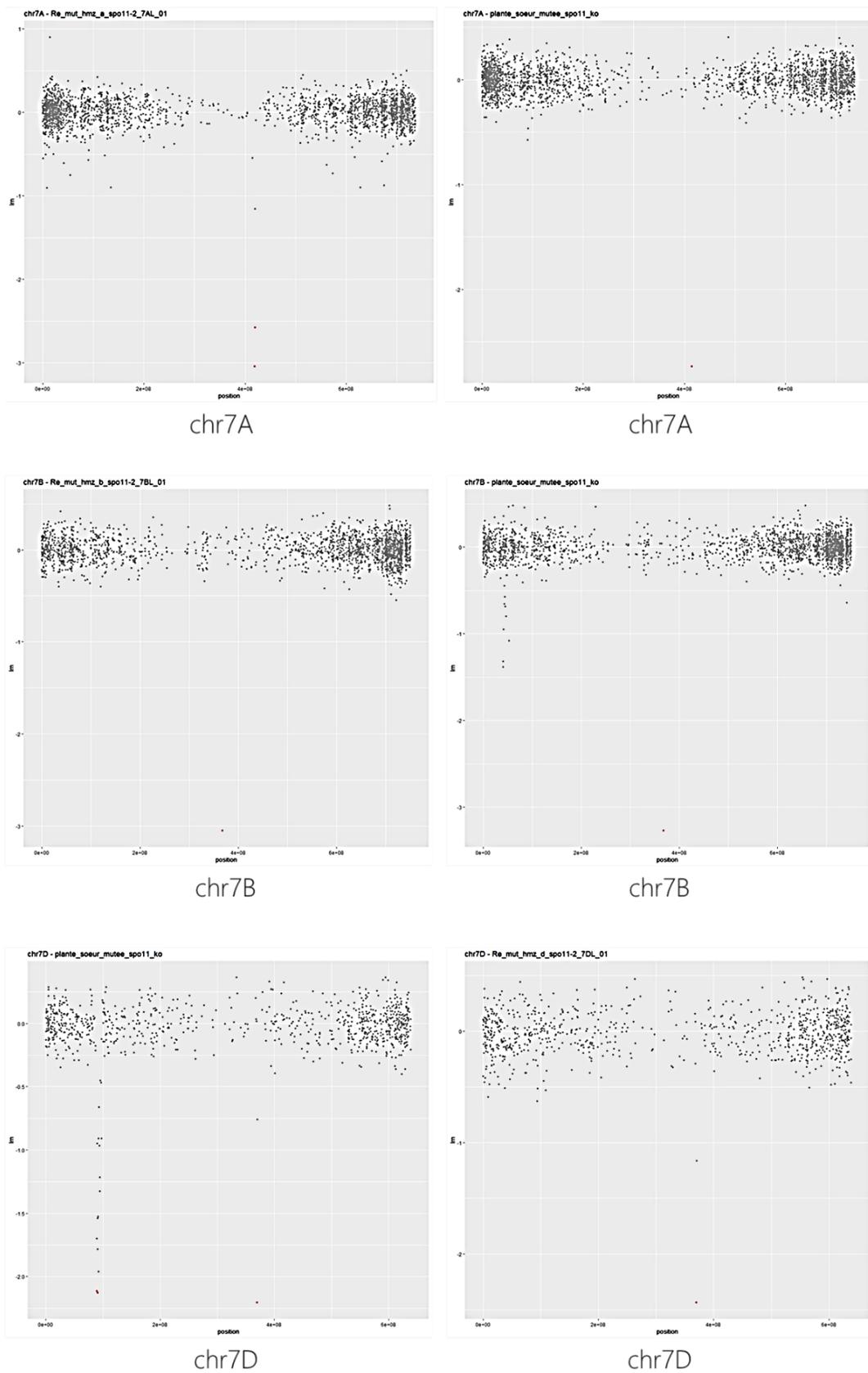


Figure 56 Absence de larges variations structurales

Larges variations structurales identifiées chez les mutants sur un génome en regard du mutant *spo11-2<sup>-/-</sup>*

Cette technique nous a permis de caractériser avec précision les tailles exactes des délétions présentes chez les mutants *spo11-2* et chez le triple KO.

Les délétions accumulées chez le mutant *spo11-2<sup>-/-</sup>* correspondent à une taille de 14 Mb pour le Chr 7A, 12Mb pour le Chr 7B et 2 Mb pour le Chr 7D :

chromosome	SNP précédent	SNP outlier	SNP suivant	Taille
chr7A	405058496	415173844	419272437	14Mb
chr7B	364047271	367988207	375651320	12Mb
chr7D	368828667	370128441	370726892	2Mb

Les tailles sont du même ordre de grandeur pour la mutation A et B et 3 fois plus petite pour le génome D. La Figure 57 synthétise les positions et correspondent bien à la position du gène *Spo11-2*.

Spo11-2 -/-  
Plante mutée Spo11 KO

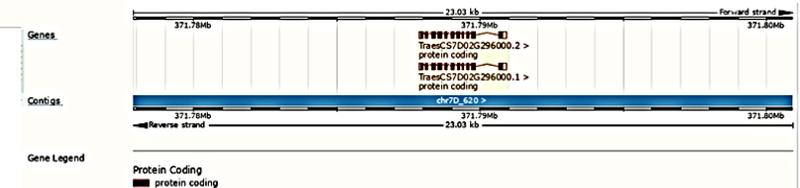
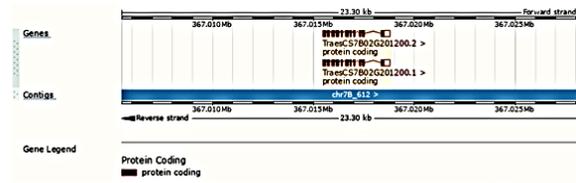
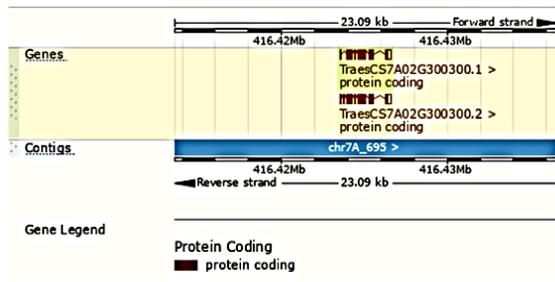
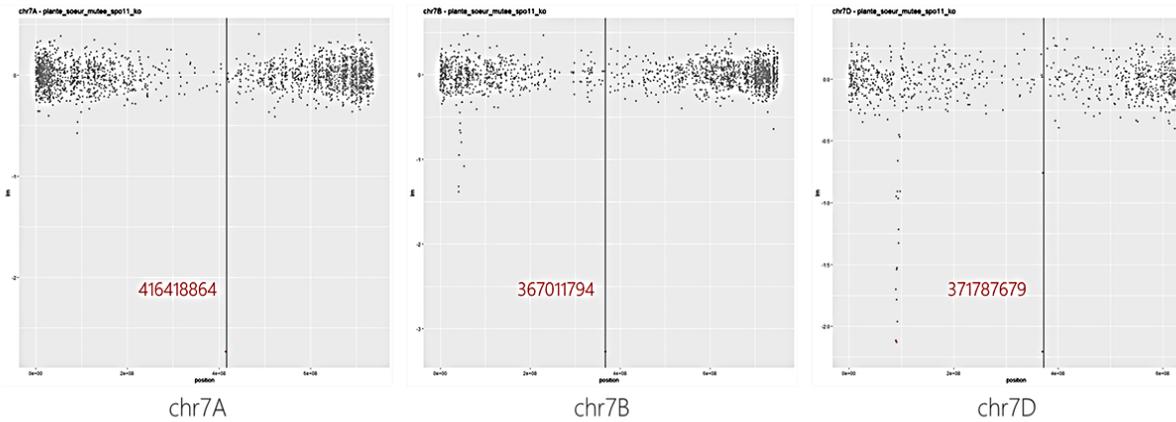


Figure 57 Position des délétions sur le chromosome 7 au locus spo11-2

Position exacte du gène *Spo11-2* qui est bien situé dans les 3 délétions décrites.

En conclusion, nous avons donc confirmé deux mutants pour chacune des copies A, B et D. Pour la copie A, un mutant possède une délétion de petite taille (503 kb à la position 419-420 Mb et une délétion de 14Mb) qui est intéressante pour la suite du projet de même que pour la copie B (un seul SNP délété, délétion maximale de 12 Mb en position 364-375 Mb) et pour la copie D (2 Mb en position 369-371 Mb). Ces analyses se révèlent très utiles quant à la gestion de la population de mutants et aux futurs croisements à prévoir afin d'obtenir des mutants nuls pour les trois génomes de locus considérés.

## 4.1.2 Développement des immunomarquages

L'étude du comportement méiotique des mutants de gènes impliqués dans ce processus est une des caractéristiques de l'impact de la mutation sur le déroulement de la méiose. Pour ce faire, différentes protéines sont utilisées pour développer des anticorps, en particulier ASY1 qui intervient dans la mise en place de l'élément axial des homologues et donc de façon précoce, ZYP1 qui intervient dans la mise en place de l'élément central du complexe synaptonémal,  $\gamma$ H2AX et DMC1 qui matérialisent les cassures double-brin, MLH1 et HEI10 qui servent au dénombrement des CO de type I.

Lors du début de ma thèse, ces différents anticorps n'avaient pas été travaillés au laboratoire. Une partie de mon temps a donc été consacrée au développement des techniques d'immunomarquage, parallèlement à la production des mutants.

Afin de mener à bien ces analyses d'immunomarquages sur noyau de blé, il nous a fallu développer un anticorps dirigé contre la protéine Ta-DMC1. Pour ce faire, les séquences du blé pour les gènes DMC1 et RAD51 ont été récupérées (**Tableau 14**) car ces deux protéines sont très proches en séquences (50% d'identité **Tableau 15**).

**Tableau 14:** Orthologues blé DMC1

Recherche des orthologues TaDMC1 et TaRAD51 à partir des séquences d'At

Code	Cible
TaDMC1-5A-CS	TraesCS5A02G133000.1
TaDMC1-5B-CS	TraesCS5B02G131900.1
TaDMC1-5D-CS	TraesCS5D02G141200.1
TaRAD51-7A-CS	TraesCS7A02G384800.1
TaRAD51-7B-CS	TraesCS7B02G287700.1
TaRAD51-7D-CS	TraesCS7D02G381300.1

**Tableau 15:** Comparaison DMC1 RAD51

Comparaison des copies TaDMC1 et TaRAD51 du cultivar Chinese spring

QUERY ID	TARGET ID	% IDENTITY	% SIMILARITY
TaDMC1-5A	TaDMC1-5D	99,1	99,4
TaDMC1-5A	TaDMC1-5B	98,5	99,1
TaDMC1-5A	TaDMC1-5A	100,0	100,0
TaDMC1-5A	ATDMC1-AT3G22880.1	82,1	92,1

TaDMC1-5A	ATRAD51-AT5G20850.1	55,2	71,4
TaDMC1-5A	TaRAD51-7D	53,8	71,1
TaDMC1-5A	TaRAD51-7A	53,8	70,8
TaDMC1-5A	TaRAD51-7B	53,8	70,4
TaDMC1-5B	TaDMC1-5D	98,8	99,1
TaDMC1-5B	TaDMC1-5B	100,0	100,0
TaDMC1-5B	TaDMC1-5A	98,5	99,1
TaDMC1-5B	ATDMC1-AT3G22880.1	80,8	91,0
TaDMC1-5B	ATRAD51-AT5G20850.1	55,2	71,1
TaDMC1-5B	TaRAD51-7D	54,1	70,9
TaDMC1-5B	TaRAD51-7A	54,1	70,6
TaDMC1-5B	TaRAD51-7B	54,1	70,3
TaDMC1-5D	TaDMC1-5D	100,0	100,0
TaDMC1-5D	TaDMC1-5B	98,8	99,1
TaDMC1-5D	TaDMC1-5A	99,1	99,4
TaDMC1-5D	ATDMC1-AT3G22880.1	81,4	91,3
TaDMC1-5D	ATRAD51-AT5G20850.1	55,6	71,8
TaDMC1-5D	TaRAD51-7D	54,4	71,5
TaDMC1-5D	TaRAD51-7A	54,4	71,2
TaDMC1-5D	TaRAD51-7B	54,4	70,9
TaRAD51-7A	TaDMC1-5D	54,4	71,2
TaRAD51-7A	TaDMC1-5B	54,1	70,6
TaRAD51-7A	TaDMC1-5A	53,8	70,8
TaRAD51-7A	ATDMC1-AT3G22880.1	52,7	70,5
TaRAD51-7A	ATRAD51-AT5G20850.1	89,0	96,6
TaRAD51-7A	TaRAD51-7D	99,1	99,4
TaRAD51-7A	TaRAD51-7A	100,0	100,0
TaRAD51-7A	TaRAD51-7B	99,4	100,0
TaRAD51-7B	TaDMC1-5D	54,4	70,9
TaRAD51-7B	TaDMC1-5B	54,1	70,3
TaRAD51-7B	TaDMC1-5A	53,8	70,4
TaRAD51-7B	ATDMC1-AT3G22880.1	52,7	70,5
TaRAD51-7B	ATRAD51-AT5G20850.1	88,7	96,6
TaRAD51-7B	TaRAD51-7D	99,1	99,4
TaRAD51-7B	TaRAD51-7A	99,4	100,0
TaRAD51-7B	TaRAD51-7B	100,0	100,0
TaRAD51-7D	TaDMC1-5D	54,4	71,5

TaRAD51-7D	TaDMC1-5B	54,1	70,9
TaRAD51-7D	TaDMC1-5A	53,8	71,1
TaRAD51-7D	ATDMC1	52,7	70,8
TaRAD51-7D	ATRAD51-AT5G20850.1	86,0	93,9
TaRAD51-7D	TaRAD51-7D	100,0	100,0
TaRAD51-7D	TaRAD51-7A	99,1	99,4
TaRAD51-7D	TaRAD51-7B	99,1	99,4

Un alignement de ces séquences a été produit afin de cibler des peptides signant l'identité de la protéine DMC1 (Figure 58).

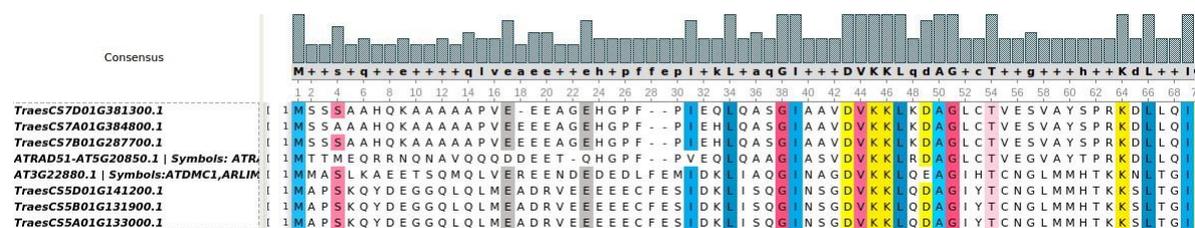


Figure 58 Alignement des séquences DMC1 et RAD51

Alignement des séquences protéiques de TaDMC1 et TaRAD51 au niveau de la séquence peptidique ciblée pour le dessin de l'anticorps.

Deux peptides ont été sélectionnés pour la synthèse :

**Peptide 1 DMC1-5L : nh<sub>2</sub>- MAPSKQYDEGGQLQL+C -conh<sub>2</sub> Référence : 1811071 (15AA + C) Peptide 2 DMC1-5L : nh<sub>2</sub>- CFESIDKLISQGINSG –conh<sub>2</sub> Référence : 1811072 (16AA)**

Leur unicité a été testée en utilisant un BLASTP avec l'option « short » car les séquences ne font que 16 aa.

Les peptides correspondent bien seulement à la protéine TaDMC1 et non à TaRAD51 ou autres protéines.

Les anticorps développés chez la poule ont été utilisés en immunomarquage en compétition avec les peptides utilisés pour le dessin afin de tester la spécificité de réaction (Figure 59). L'immunomarquage nous confirme la spécificité des anticorps car le signal s'affaiblit en présence du peptide.

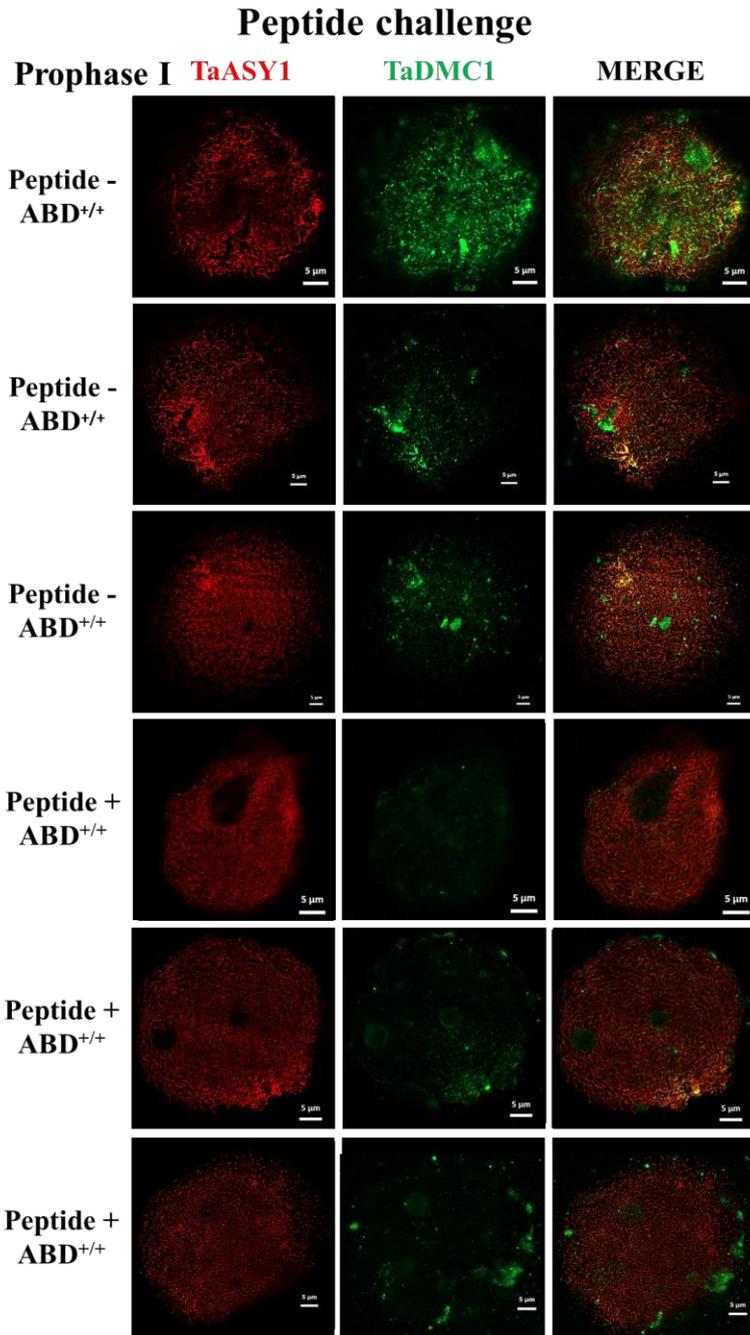
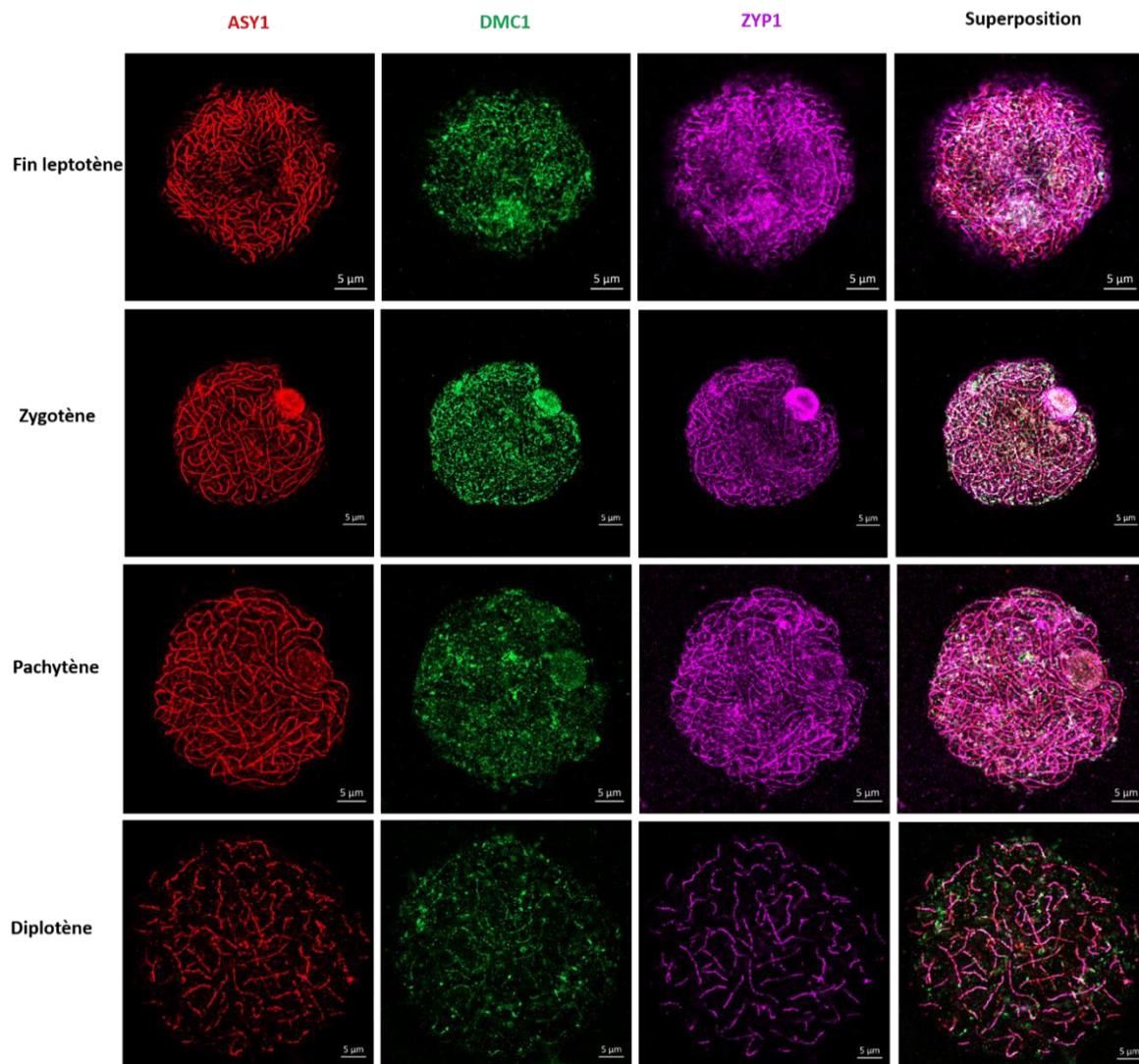


Figure 59 Peptide DMC1 utilisé en compétition et immunomarquage DMC1

Test en compétition de la spécificité des anticorps envers le peptide et la protéine TaDMC1

La protéine ASY1 est la première présente dans la totalité du noyau des cellules en leptotène et forme des filaments le long des chromosomes, en zygotène la protéine ZYP1 colonise le nucléole et s'étend sous forme de faisceaux en direction des chromosomes. La forme de fermeture éclair fermée est visible en zygotène tardif et pachytène précoce. Les protéines ASY1 entourent de part et d'autre les protéines ZYP1 puis en diplotène, c'est d'abord la protéine ASY1 qui s'efface partiellement car elle est majoritaire. Puis les protéines ZYP1 à leur tour s'étiolent et laissent place à des microfilaments qui seront les futurs chiasmata en métaphase I. Ensuite, les protéines DMC1 suivent parfaitement la dynamique spatiale de ZYP1 et co-localisent aux prémices des chiasmata en fin de prophase I.



Au regard de ces données et des outils développés, nous sommes maintenant en mesure d'analyser l'impact de la mutation de *Spo11-2* sur le comportement méiotique et de suivre le déroulé de la méiose chez les différents mutants.

## [4.2 Analyse du comportement méiotique de mutants \*spo11-2\*](#)

### [4.2.1 Analyse cytogénétiques](#)

#### [4.2.1.1 Article Benyahya et al., The Plant Journal 2020](#)

La deuxième partie de la thèse a constitué en la production d'une grosse partie résultats. Elle est étayée par un article publié dans The Plant Journal (Benyahya et al., 2020); doi 10.1111/tpj.14903). Cet article résume l'évolution des trois copies homéologues du gène *Spo11-2*, leur variabilité, leur fonctionnalité et l'impact des différentes mutations sur le comportement méiotique. Pour la première fois également, le nombre de foyers DMC1 a été dénombré chez le blé tendre.

## SPO11.2 is essential for programmed double-strand break formation during meiosis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)

Benyahya Fatiha<sup>1</sup>, Nadaud Isabelle<sup>1</sup>, Da Ines Olivier<sup>2</sup> , Rimbart Hélène<sup>1</sup>, White Charles<sup>2</sup> and Sourdille Pierre<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Genetics, Diversity & Ecophysiology of Cereals, INRAE, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand 63000, France, and

<sup>2</sup>Génétique, Reproduction et Développement, UMR CNRS 6293 - Université Clermont Auvergne - INSERM U1103, Clermont-Ferrand 63001, France

Received 12 February 2020; revised 10 June 2020; accepted 12 June 2020.

\*For correspondence (e-mail pierre.sourdille@inrae.fr).

### SUMMARY

Meiotic recombination is initiated by formation of DNA double-strand breaks (DSBs). This involves a protein complex that includes in plants the two similar proteins, SPO11-1 and SPO11-2. We analysed the sequences of SPO11-2 in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*), as well as in its diploid and tetraploid progenitors. We investigated its role during meiosis using single, double and triple mutants. The three homoeologous SPO11-2 copies of hexaploid wheat exhibit high nucleotide and amino acid similarities with those of the diploids, tetraploids and Arabidopsis. Interestingly, however, two nucleotides deleted in exon-2 of the A copy lead to a premature stop codon and suggest that it encodes a non-functional protein. Remarkably, the mutation was absent from the diploid A-relative *Triticum urartu*, but present in the tetraploid *Triticum dicoccoides* and in different wheat cultivars indicating that the mutation occurred after the first polyploidy event and has since been conserved. We further show that triple mutants with all three copies (A, B, D) inactivated are sterile. Cytological analyses of these mutants show synapsis defects, accompanied by severe reductions in bivalent formation and numbers of DMC1 foci, thus confirming the essential role of *TaSPO11-2* in meiotic recombination in wheat. In accordance with its 2-nucleotide deletion in exon-2, double mutants for which only the A copy remained are also sterile. Notwithstanding, some DMC1 foci remain visible in this mutant, suggesting a residual activity of the A copy, albeit not sufficient to restore fertility.

**Keywords:** alternative splicing, crossover, DMC1 foci, double-strand break formation, meiotic recombination.

### INTRODUCTION

Most eukaryote species multiply through sexual reproduction. This involves the fusion of specialized haploid cells, the gametes, leading to restoration of the initial ploidy level of the parents. These haploid cells are produced through meiosis, a cell-cycle process that consists of two successive cell divisions following one round of DNA replication (Mercier *et al.*, 2015). The first division separates the pairs of homologous chromosomes coming from both parents, and the second separates sister chromatids, leading to four balanced haploid cells carrying one set of chromosomes. An accurate and balanced segregation of the homologous chromosomes during the first meiotic division relies on appropriate pairing of chromosomes that form specific assemblies called bivalents (Hunter, 2015; Mercier *et al.*, 2015; Zickler and Kleckner, 2015). Each

chromosome is physically linked to its homologue through one or several chiasmata, which are the visible cytological manifestation of a reciprocal exchange between two homologous chromatids (also called crossover, CO; Grelon, 2016). At least one CO per bivalent is required to ensure faithful segregation of homologues and to produce viable gametes (Zamarolia *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2015). COs occur during the early step of meiosis (prophase I). They are initiated by DNA double-strand breaks (DSBs) catalysed by a complex of several proteins (De Massy, 2013; Lam and Keeney, 2015). Over the last 20 years, genetic approaches on different model species have identified about 20 essential proteins involved in meiotic DSB production (Cole *et al.*, 2010; Lam and Keeney, 2015; Jing *et al.*, 2019). In budding yeast, the complex is composed of 10 proteins (Lam and Keeney, 2015), among

which SPO11 acts via a topoisomerase-like reaction (De Massy *et al.*, 1995; Keeney and Kleckner, 1995; Liu *et al.*, 1995; Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997; Keeney, 2008). SPO11 is a conserved protein, homologous to the A-subunit of topoisomerase VI (TOPOVIA) from the Archae, *Sulfolobus shibatae* (Bergerat *et al.*, 1994, 1997; Nichols *et al.*, 1999). Despite the key importance of the activity of SPO11, its action mechanism remains largely unknown. TOPOVI proteins operate through the assembly of two subunits, A and B, and the question of the existence of a B subunit in eukaryotes, necessary for the SPO11 activity, has only been resolved by the recent identification of the B subunit (TOPOVIB) in vertebrates (Robert *et al.*, 2016a) and plants (Vrielynck *et al.*, 2016; for review, see Robert *et al.*, 2016b).

Homologues of the SPO11 protein have been identified in many species. Their analysis reveals strong evolutionary conservation with archaeal proteins (Malik *et al.*, 2007), especially in the DNA binding and the divalent-cation interaction domains [respectively, 5Y-CAP (catabolite gene activator protein) and TOPRIM (topoisomerase-primase), common to topoisomerases and primases], the two main domains of the TOPOVIA protein (De Massy *et al.*, 1995; Keeney and Kleckner, 1995; Liu *et al.*, 1995; Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2002; Schoeffler and Berger, 2005). The absence of SPO11 protein results in a lack of meiotic DSBs and thus defective CO formation (Klapholz *et al.*, 1985; Baudat and De Massy, 2004). This leads to chromosome segregation errors in meiosis I and eventually to sterility (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997; Dernburg *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2000; Hartung *et al.*, 2007).

While a single gene encodes *SPO11* in most organisms, plants have several *SPO11* genes. Three copies were isolated in *Arabidopsis* (*SPO11-1*, -2, -3), but only *SPO11-1* and *SPO11-2* are required for accurate meiosis, *SPO11-3* apparently only being involved in somatic endo-reduplication (Hartung and Puchta, 2000, 2001; Grelon *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2002, 2007; Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Stacey *et al.*, 2006; Sprink and Hartung, 2014). Five *SPO11* orthologues have been identified in rice (*OsSPO11-1*, -2, -3, -4, -5; An *et al.*, 2011). Mutation of *OsSPO11-1* and *OsSPO11-2* affects meiotic progression and results in sterility, confirming crucial roles in meiosis (Yu *et al.*, 2010; Fayos *et al.*, 2020). The *OsSPO11-4* protein was initially described as having DNA-cleavage activity (An *et al.*, 2011; Shingu *et al.*, 2012), with RNAi experiments showing aberrant meiosis and reduced fertility, suggesting an important role in meiosis (An *et al.*, 2011). However, contrasting results were observed regarding the interaction between *OsSPO11-4* and *OsMTOPIVIB* proteins (Fu *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016), and recent data suggest that the additional *OsSPO11-4* gene plays no major role in rice meiosis (Fayos *et al.*, 2020).

Polyploidy adds another layer of intricacy in this already complex process. All angiosperm species have undergone at least one round of whole genome duplication during their evolution (Soltis and Soltis, 2009; Van de Peer *et al.*, 2009; Peer *et al.*, 2009) and about 30% of them are current polyploids (Wood *et al.*, 2009). Among these, bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is an allo-hexaploid species (AABBDD;  $2n = 6x = 42$ ) derived from two successive interspecific hybridizations involving three related diploid species (for details, see International Wheat Genome Sequence Consortium, IWGSC 2014; 2018). The first occurred about 0.8 million years ago (MYA) and took place between *Triticum urartu* (AA genome) and a yet-unknown species related to the *Sitopsis* section (SS genome related to wheat BB genome). This natural cross gave rise to tetraploid species (*Triticum dicoccoides*), which further evolved to give *Triticum turgidum*, the ancestor of current durum wheat. The second cross arose ~0.4 MYA, and involved this newly created tetraploid species and *Aegilops tauschii* (DD genome) leading to hexaploid bread wheat. Thus, in bread wheat, 85.6% of the genes are present in two or three homoeologous copies and 6% have more than three copies (IWGSC 2018; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2018). Moreover, 70% of the genes that exhibit three homoeologous copies are expressed in a balanced manner between the three copies (IWGSC, 2018; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2018). For the remaining 30%, one or two copies are more expressed but without detectable differences between the homoeologous genomes, suggesting the absence of any sub-genome dominance (Alabdullah *et al.*, 2019). Similar results were also observed for wheat meiosis-specific genes (Lloyd *et al.*, 2014).

Until now, only a few meiotic genes have been deeply studied in wheat, and data are often limited to a description of the differences between homoeologous copies and expression analyses (Boden *et al.*, 2007; Devisetty *et al.*, 2010; Khoo *et al.*, 2012). In-depth functional analyses are mainly restricted to *Ph1* (Pairing homoeologous locus 1), a gene involved in homoeologous recombination (Griffith *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2017; Rey *et al.*, 2017).

Here, we present a thorough analysis of *TaSPO11-2* and its role in bread wheat meiosis. We first identified and characterized the sequences of the three homoeologous copies of this gene. The A copy has a two-nucleotide deletion in exon-2 leading to a premature stop codon and presumably to a non-functional protein. This mutation was conserved in the wheat tetraploid ancestor but not in the diploid species, indicating that mutation occurred after the first polyploidy event of wheat. We then isolated single mutants for each copy, and developed a full set of single, double and triple mutant lines derived from heterozygous hybrids. Analysis of meiosis in these mutants confirmed that only the B and D homoeologous copies are functional. In particular, *TaSpo11-2* triple mutants showed

significantly reduced numbers of DSBs, impaired synapsis and defective CO formation. Our data thus demonstrate the essential role of *TaSPO11-2* in meiotic recombination initiation in bread wheat. Finally, we show that expression of the *TaSPO11-2-7D* copy restores fertility of Arabidopsis *spo11-2* mutant demonstrating the strong functional conservation of the plant *SPO11-2* gene.

## RESULTS

### Three homoeologous copies of SPO11-2 are present in the wheat genome, but slightly differ between each other

We used Arabidopsis SPO11-2 protein sequence (AT1G63990.1) as a query to perform a BLAST-P analysis (Altschul *et al.*, 1997) against the IWGSC database (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Data>). Considering the hexaploid status of bread wheat, we identified three high-confidence proteins located on the homoeologous group 7 chromosomes, and annotated as *TraesCS7A02G300300.1*, *TraesCS7B02G201200.1* and *TraesCS7D02G296000.2*. For convenience, they will further be named as *TaSPO11-2-7A*, *TaSPO11-2-7B* and *TaSPO11-2-7D*, respectively. The amino acid (aa) identity percentages shared with Arabidopsis protein ranged from 64.9 to 66.7% (Table 1), suggesting a strong conservation of SPO11-2 protein between these two species. The genomic wheat-gene lengths were 3085 bp, 3299 bp and 3026 bp for the A, B and D copies, respectively. This was 50% more than the gene from Arabidopsis (2063 bp), confirming longer introns in wheat as described earlier (IWGSC, 2014, 2018). Differences in size between the copies were mainly due to small insertions/deletions (indels) in introns 8 and 10 (Figure S1).

We made *ab initio* annotations of the three homoeologous copies and compared them with the annotation from Arabidopsis to study their structure thanks to TAIR prediction for exon positions and putative motifs for the Arabidopsis protein structure (Figure 1a). The coding sequence (CDS) from Arabidopsis covers 1152 bp corresponding to 383 aa and consists of 10 introns and 11 exons. *Ab initio* annotation of wheat *SPO11-2* genes predicted 10 exons for *TaSPO11-2-7A* and 11 exons for the other two B and D copies. This corresponds to 359, 386 and 386 aa for the A, B and D copies, respectively. The seven motifs (Bergerat *et al.*, 1997; Malik *et al.*, 2007) known for this gene and the essential motifs for the catalytic activity (Y124; Hartung *et al.*, 2007) and DNA binding capacity (G215, R222, R226; Shingu *et al.*, 2012) are conserved in all copies (Figure 1a; Table S1). The B and D proteins are identical in size (386 aa, Figure 1b) and almost identical (97.7% identity).

The *TaSPO11-2-7A* genomic sequence is highly similar to the B and D homoeologous copies (95.3% and 96% identity, respectively; Figure 1b). Two amino acids are inserted just after the predicted translation starting site (ATG; Figure 1c). In addition, this copy exhibits a deletion of two nucleotides (CC) in exon-2 (Figure 1c). This deletion results in a frameshift inducing a premature stop codon (PSC) at the end of exon-3 suggesting that the A copy is not functional. *Ab initio* annotation proposed an alternative model where exon-2 is skipped leading to a shorter protein (359 aa; Figure 1a), albeit more similar to the Arabidopsis protein (66.7% identity). These results prompted us to investigate whether the mutation on the A copy is also present in the diploid and tetraploid ancestors of wheat and in other varieties.

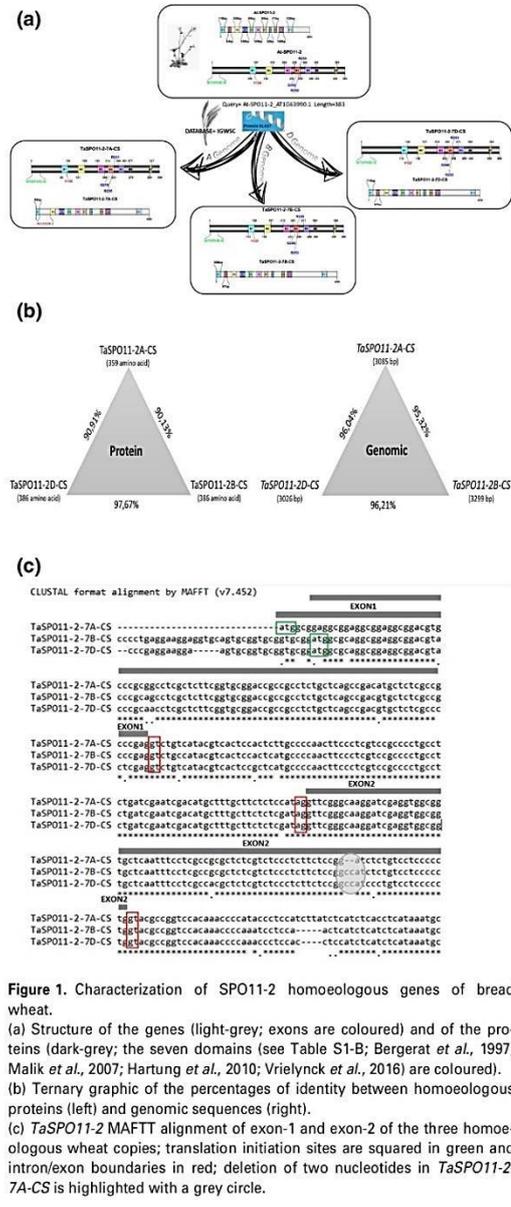
**Table 1** Results of BLAST-P analysis using AtSPO11-2 protein as query. Arabidopsis protein was BLASTed against corresponding wheat databases: IWGSC = *T. aestivum* cv. Chinese Spring (hexaploid AABBDD); WheatTu = *T. monococcum ssp urartu* (diploid AA); AET = *Ae. tauschii* (diploid DD); TRIDC = *T. diccoides* cv. Zavitan (tetraploid AABB). Sequences producing significant alignments were sorted out using parseblast.pl (Choulet *et al.*, 2014) with default parameters; %Id: percentage of identity with Arabidopsis protein; Prot.: length of the proteins (aa); Gene: length of the genomic sequences (exons + introns in bp); CDS: length of the coding sequences (bp).

Databases	Sequences producing significant alignments	Protein	% Id	Prot. (aa)	Gene (bp)	CDS (bp)
IWGSC_v1.1_HC_20170706_pep.fasta	<i>TraesCS7A02G300300.1*</i>	TaSPO11-2-7A-CS	66.7	359	3085	1080
	<i>TraesCS7A02G300300.2**</i>	TaSPO11-2-7A-CS-ISO2	69	290	3085	873
	<i>TraesCS7D02G296000.2</i>	TaSPO11-2-7D-CS	65.1	386	3026	1161
WheatTu.pros	<i>TraesCS7B02G201200.1</i>	TaSPO11-2-7B-CS	64.9	386	3299	1161
	<i>TuG1812G070003251.01</i>	TuSPO11-2	65.7	386	3151	1161
AET_HighLow_confidence_gene_protein	<i>AET7Gv20751300.7</i>	AetSPO11-2	65.1	393	2979	1182
TRIDC_WEWseq_PG5B_20160501_Proteins	<i>TRIDC7AG041910.1</i>	TtSPO11-2-7A-Za	66.7	384	2976	1155
	<i>TRIDC7BG033100.4</i>	TtSPO11-2-7B-Za	65.7	385	3293	1158
Arabidopsis_thaliana.TAIR10.pep	<i>AT1G63990.1</i>	AtSPO11-2	100	383	2544	1152

\*Isoform with exon-2 skipping.

\*\*Isoform with alternative starting site.

4 Benyahya Fatiha et al.



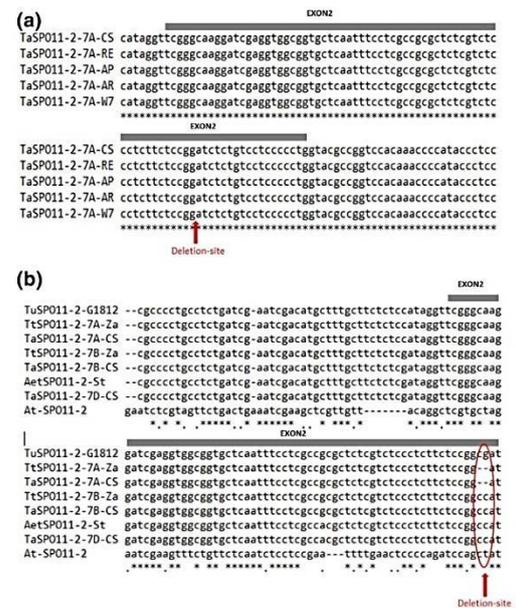
**Figure 1.** Characterization of *SPO11-2* homoeologous genes of bread wheat. (a) Structure of the genes (light-grey; exons are coloured) and of the proteins (dark-grey); the seven domains (see Table S1-B; Bergerat *et al.*, 1997; Malik *et al.*, 2007; Hartung *et al.*, 2010; Vrielynck *et al.*, 2016) are coloured). (b) Ternary graphic of the percentages of identity between homoeologous proteins (left) and genomic sequences (right). (c) *TaSPO11-2* MAFFT alignment of exon-1 and exon-2 of the three homoeologous wheat copies; translation initiation sites are squared in green and intron/exon boundaries in red; deletion of two nucleotides in *TaSPO11-2-7A-CS* is highlighted with a grey circle.

**The mutation of the A copy is conserved between cultivars and with tetraploid species, but is absent from the diploid ancestors**

We aligned sequences of *TaSPO11-2-7A* exon-2 from cultivars Arche (AR), Apache (AP), Renan (RE) and W7984 (W7);

synthetic wheat; Nelson *et al.*, 1995) with the *TaSPO11-2-7A-CS* reference sequence from Chinese Spring (CS; Figure 2a). The five sequences were identical, showing that the two nucleotides are also deleted in these cultivars. In addition, we isolated the homoeologous copies from the two diploid ancestors *T. urartu* (AA genome) and *Ae. tauschii* (DD genome), and from a tetraploid wild accession from *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (AABB, cv. Zavitan). As expected, we found only one copy of *SPO11-2* in the diploid species and two copies in the tetraploid. Genomic sequences ranged from 2976 to 3293 bp (Table 1), which was similar to what was observed for Chinese Spring.

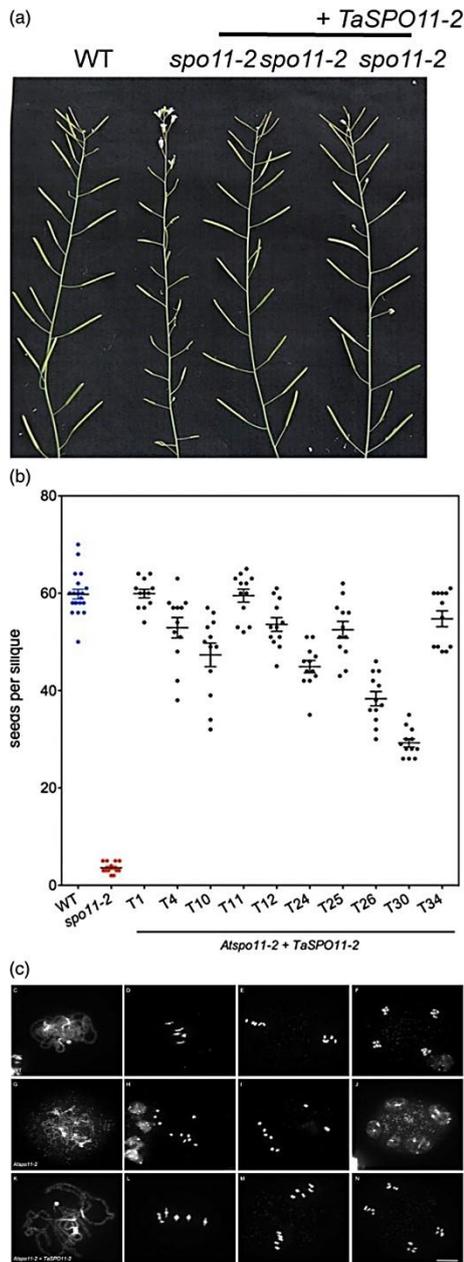
We then aligned all these CDS sequences (Figure 2b). Interestingly, the deletion of two nucleotides in the second exon was also present in *TtSPO11-2-7A-Za* but absent in *T. urartu* (Figure 2b). With these two nucleotides, the copy from *T. urartu* is thus almost identical to the B and D copies (95.9% and 94.3% identity, respectively) and should correspond to the functional copy. This suggests that the deletion occurred after the first polyploidization event



**Figure 2.** Comparative analysis of exon-2 from A copy of different varieties and species.

(a) Alignment of *TaSPO11-2* exon-2 from cultivars Chinese Spring (CS), Renan (RE), Apache (AP), Arche (AR) and W7984 (W7), synthetic wheat; Nelson *et al.*, 1995).

(b) Alignment of *TaSPO11-2* exon-2 from *Triticum monococcum* ssp. *urartu* (TuSPO11-2-G1812; diploid AA), *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (TtSPO11-2-7A-Za; Tetraploid AABB), *Aegilops tauschii* (AetSPO11-2-St; diploid DD) and *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring (TaSPO11-2-7-CS; hexaploid AABBDD).



**Figure 3.** Wheat *TaSPO11-2-7D* complements fertility of the Arabidopsis *spo11-2* mutant.

(a) Photography of siliques in wild-type, *Atspo11-2* mutants and *Atspo11-2 TaSPO11-2* complemented plants. Both wild-type and *Atspo11-2 TaSPO11-2* plants have long siliques full of seeds, while *Atspo11-2* mutants are sterile and exhibit short siliques.

(b) Number of seeds per silique in wild-type, *Atspo11-2* and 10 *Atspo11-2 TaSPO11-2* independent primary transformants. Each dot represents the number of seeds in one silique.

(c–n) Meiotic progression in wild-type (c–f), *Atspo11-2* (g–j) and *Atspo11-2 TaSPO11-2*-complemented plants (k–n). Scale bar: 10  $\mu$ m.

and *Ae. tauschii*, and beyond during tetraploid and hexaploid wheat evolution and domestication.

#### Wheat *TaSPO11-2-7D* can complement Arabidopsis *Atspo11-2* mutant

Because the *SPO11-2* sequence is extremely well conserved between wheat and Arabidopsis, we tested whether the function of *SPO11-2* is also conserved during evolution. We expressed the *TaSPO11-2-7D* cDNA in the Arabidopsis *spo11-2* mutant and evaluated its ability to restore fertility. Strikingly, all 10 *spo11-2* homozygous mutant plants expressing the *TaSPO11-2-7D* transgene that we obtained exhibited a significant increase in fertility compared with *Atspo11-2* mutant (Figure 3; Table S2). The residual fertility in the different transformants ranged from 50% to 100% of that of the wild-type, with most lines exhibiting fertility at about 80–90%. This is in strong contrast with the 5% residual fertility of the *Atspo11-2* mutants (Hartung *et al.*, 2007). Cytogenetic analysis of meiotic progression in pollen mother cells of *Atspo11-2* transformants expressing the *TaSPO11-2-7D* transgene revealed normal meiotic stages (Figure 3c). In particular, Metaphase I with five bivalents could be observed in *Atspo11-2/TaSPO11-2-7D* transgenic plants (mean of 4.4 bivalent/cell,  $n = 35$ ) contrasting with the presence of univalents in *Atspo11-2* (Hartung *et al.*, 2007). These results demonstrate that wheat *TaSPO11-2-7D* gene can substitute for Arabidopsis *SPO11-2* and thus exhibits evolutionary conserved function in meiosis.

#### Only the B and D copies of *TaSPO11.2*, but not the A copy, ensure wheat fertility

*TaSPO11-2* is essential for meiosis, but the question of the functionality of the three wheat homoeologous copies remains to be ascertained. We isolated a mutant plant heterozygous for the three homoeologous copies of *TaSPO11-2-7-RE* gene (*ABD<sup>1/1</sup>*) in our irradiated population derived from Renan (Figure S2). We analysed a series of 73 sister plants for all combinations of single and multiple *Taspo11-2* mutants. All mutants show normal vegetative development. The spikes are physiologically normal (Figure 4a), and all lines exhibit a non-significant decrease in

between *T. urartu* and the donor of the B genome. This mutation has been maintained until the second polyploidization event between *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*

seed numbers compared with the control, except the triple mutant ( $abd^{-/-}$ ) and the double  $bd^{-/-}A^{+/+}$  or  $bd^{-/-}A^{+/-}$  mutants, for which no grains were obtained (Figure 4b). Interestingly, the double  $ab^{-/-}D^{+/+}$  and  $ad^{-/-}B^{+/+}$  mutants that remained heterozygous for the D or B copies, respectively, showed normal fertility, indicating that only one functional copy of *TaSPO11-2* is sufficient to ensure a fully fertile plant. This suggests that there is no dosage effect for *SPO11-2*.

We next investigated pollen viability in the mutants using Alexander staining according to Jahier (1992; Figure S3a). In control plants, pollen remained intact. Similarly, the three single and double  $ab^{-/-}$  and  $ad^{-/-}$  mutants exhibited between 90.5% and 96% of unaltered pollen. On the contrary, only 12% and 30% of the pollen grains were viable in the triple  $abd^{-/-}$  and the double  $bd^{-/-}$  mutants, respectively (Figure S3b). Total RNAs of cvs Renan and CS anthers were collected at the leptotene stage, and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) performed to analyse expression of the different *TaSPO11-2* copies. All three copies were expressed

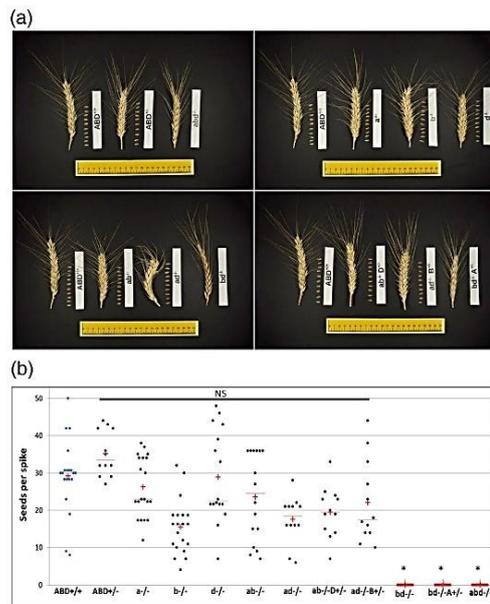
(Figure S4a), and they were more highly expressed in Renan compared with Chinese Spring. In both varieties, the D copy was more expressed than the B-copy, which was more expressed than the A copy (Figure S4b). For the A copy, using available RNA-Seq data (Lloyd *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2018; Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2018), we showed that both isoforms (with alternative ATG or with exon-2 skipping) were expressed (Figure S4c), and that the main expressed form was the one with exon-2 skipping. All together, these results showed that both B and D copies of the *SPO11-2* gene are functional, while the A copy is altered and no longer plays its full role. Despite its alteration, the A copy remains expressed, but significantly less so than the other two copies. A single functional copy of either the B or D genome is sufficient to ensure normal fertility.

#### ***TaSPO11-2* is necessary for normal meiotic progression in bread wheat**

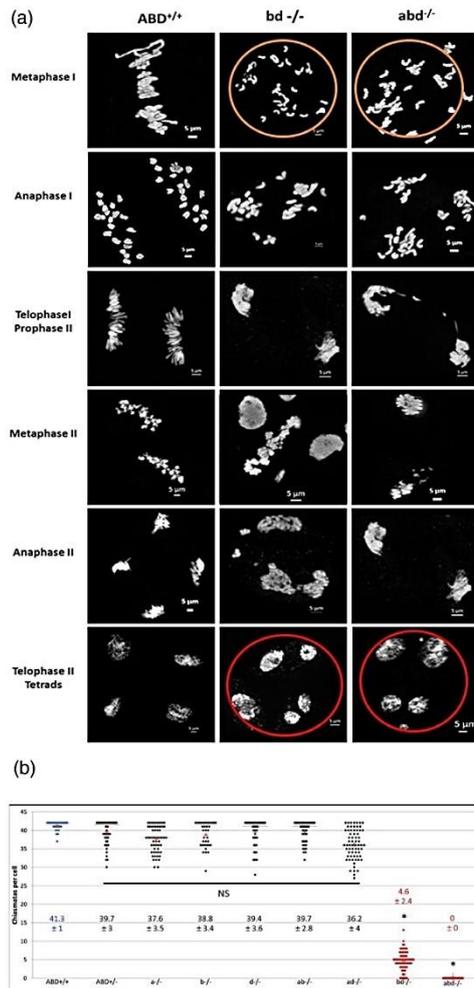
Mutation of *SPO11-2* affects meiosis in Arabidopsis (Hartung and Puchta, 2000, 2001). We thus established an atlas of meiotic stages for the wheat mutants. In control plants ( $ABD^{+/+}$ ) meiosis is normal, with 21 bivalents at Metaphase I, well-balanced anaphases and final meiotic products composed of four balanced nuclei (tetrads; Figure 5a). Normal meiotic stages were also observed for all single sub-genome mutants ( $a^{-/-}$ ,  $b^{-/-}$ ,  $d^{-/-}$ ), and for the  $ab^{-/-}$  and  $ad^{-/-}$  double mutants (Figure S5). In contrast, extensive meiotic defects were observed in the  $abd^{-/-}$  triple mutant, with only univalents observed at Metaphase I and random segregation of these at Anaphase I. This leads to unbalanced polyads at the end of Meiosis II in these plants (Figures 5a and S6). The  $bd^{-/-}$  double mutant showed the same phenotypes as  $abd^{-/-}$  triple mutant, confirming that the A copy is non-functional. Quantification of numbers of chiasmata per cell in control plants ( $ABD^{+/+}$ ,  $ABD^{+/-}$ ), the single ( $a^{-/-}$ ,  $b^{-/-}$ ,  $d^{-/-}$ ), the double ( $ab^{-/-}$ ,  $ad^{-/-}$ ) mutants, showed 21 bivalents and a mean of  $40.4 \pm 2.0$ ,  $38.7 \pm 3.5$  and  $38.1 \pm 3.4$  chiasmata per cell, respectively (Figure 5b). In sharp contrast, the  $bd^{-/-}$  double mutant exhibited  $4.6 \pm 2.4$  chiasmata per cell, and no chiasmata were observed in the  $abd^{-/-}$  triple mutant. Thus, as in Arabidopsis, *TaSPO11-2* is required for CO formation in wheat. However, only the B and D copies are functional, and the mutation of the A copy strongly affects (although not completely) its activity.

#### ***TaSPO11.2* is necessary for chromosome synapsis and meiotic DSB formation in hexaploid wheat**

We established the kinetics of the synaptonemal complex in our control (Figure S7). At the beginning of meiotic prophase, ASY1 (Asynaptic 1) associates with chromosome axes, forming visible filaments. At the leptotene stage, the ZYP1 (Zipper 1) protein is present on chromosome axes as



**Figure 4.** Wheat mutant fertility analysis. (a) Photography of spikes and 10 seeds (when produced) for all genotypes used in this study. (b) Number of seeds per genotype and spike (three plants minimum per genotype and four spikes per plants). Because values do not follow normality law, the Kruskal–Wallis test was applied with  $\alpha = 0.01$  and Monte-Carlo methods with 10 000 simulations. Values were significantly different for the double ( $bd^{-/-}A^{+/+}$  or  $bd^{-/-}$ ) and triple ( $abd^{-/-}$ ) mutants (red) only (\**P*-value < 0.0001; NS: not significant).



**Figure 5.** Progression of meiosis from metaphase I to telophase II (tetrads) in wild-type (WT) and mutants.

(a) Mutants *bd*<sup>-/-</sup> and *abd*<sup>-/-</sup> show abnormalities during meiosis, such as presence of univalents in metaphase I (orange circle) and polyad formation at anaphase II (red circle). Scale bar: 5 μm.

(b) Chiasma number per cell. Because values do not follow normality law, the Kruskal–Wallis test was applied with alpha = 0.01 and Monte-Carlo methods with 10 000 simulations. Values were significantly different for the double (*bd*<sup>-/-</sup>) and triple (*abd*<sup>-/-</sup>) mutants (red) only (\**P*-value < 0.0001; NS: not significant).

foci, and these extend as synaptonemal complex (SC) formation proceeds through zygotene and pachytene stages. These filaments disassemble at the diplotene stage to fix only the chiasmata. In wheat, the SC is thus set up in the

same way as in other species (Colas *et al.*, 2017). We focussed on the pachytene stage to see if synapsis was affected by the mutation of SPO11-2 protein in wheat. In the *abd* mutant, ASY1 is normally loaded onto the chromosomes, forming long filaments along chromosome axes and eventually starts disassembling at pachytene. In contrast, ZYP1 signal appears mostly in dots and does not form long filaments typical of synapsis, although a few partial stretches could be observed (Figure 6a). Normal pachytene stages were not observed. As expected, sub-genome single mutants showed normal synapsis while triple mutant was unable to form SC. Similar defects were observed for the *bd*<sup>-/-</sup> double mutant, confirming the inactivity of A copy (Figure 6a). The other double mutants (*ab*<sup>-/-</sup>, *ad*<sup>-/-</sup>) had normal complete synapsis. Meiotic progression is thus dramatically affected in the absence of *TaSPO11-2*, and the SPO11-2 protein is necessary for the establishment of the SC in bread wheat.

Meiosis is initiated by the formation of DSBs by the SPO11 complex, and SPO11-2 is an essential member of this complex in Arabidopsis (Hartung and Puchta, 2000). We analysed the formation of DSBs in a control and in *Taspo11-2* mutants by performing immuno-localization of the DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA 1) recombinase protein as a marker of DSBs. At leptotene, TaDMC1 protein is essentially located in the nucleolus and starts to spread to the rest of the nucleus (Figure S8). DMC1 foci peak at zygotene and the signal decreases at pachytene (Figure 6b). In control plants (ABD<sup>+/+</sup>), a mean of 727 foci (± 193) were counted at zygotene; this number is ~20% lower compared with Renan or Chinese Spring (Figure 6c), probably because this plant also derives from irradiated mutants. We found a drastic 10-fold decrease in the mean number of DMC1 foci 71 ± 29 at zygotene in the triple mutant. Interestingly, we also found a strong, but lower reduction (fourfold reduction, with 174 ± 53 DMC1 foci) in the *bd*<sup>-/-</sup> double mutant (*P*-value < 0.0001; Figure 6b,c; Table S3). Thus, DMC1 loading is dramatically affected in both mutants. Yet, there are significantly more DMC1 foci in the *bd*<sup>-/-</sup> double mutant than in the triple mutant, and this concords with chiasma number and pollen viability (see above) and confirms the residual activity of the A copy of *TaSPO11-2*. Eventually, DMC1 foci were still present at zygotene in other mutants (Figure 6b).

Overall, these data demonstrate that *TaSPO11-2* is necessary for DSB formation and initiation of meiosis in bread wheat.

## DISCUSSION

### The A copy of SPO11-2 is following a pseudogenization process

Using SPO11-2 Arabidopsis protein as query, we found three copies of the orthologous gene in the wheat genome,

interaction with MTOPVIB. Alternative splicing is observed for *SPO11* in mammals (Romanienko and Camerini-Otero, 1999) and for *SPO11-1* in Arabidopsis (Hartung and Puchta, 2000; Reddy *et al.*, 2013), with up to seven isoforms observed for *SPO11-2* in Arabidopsis because of either intron retention or exon skipping (Sprink and Hartung, 2014). Several isoforms have also been observed in *Brassica rapa* (6 isoforms), *Carica papaya* (6), *Oryza sativa* (2) and *Physcomitrella patens* (2). Isoform  $\beta^*$  from *P. patens* corresponds to the skipping of exon-2 as we suggest for the A copy of wheat, and this form was found in generative tissues only (Sprink and Hartung, 2014).

The very low level of pollen viability we observed suggests either of the two forms (or even the two) remains partly active. However, because the form with exon-2 skipping is normally expressed (Figure S4c), we thus favour the hypothesis that skipping of exon-2 produces a less-efficient TaSPO11-2-7A protein. This would explain the presence of a few bivalents and some viable pollen grains in the *bd<sup>-/-</sup>* double mutants, even if this is not sufficient to fully restore fertility.

All these results suggest that the A copy from SPO11-2 of bread wheat is losing its functionality and is on the way of pseudogenization.

#### TaSPO11-2 is necessary for meiotic double-strand break formation

Plants missing *SPO11-2* (*bd<sup>-/-</sup>* or *abd<sup>-/-</sup>* mutants) are sterile, as this is the case for Arabidopsis *spo11-2* mutants (Hartung and Puchta, 2000).

We developed specific wheat antibodies to describe for the first time the progression of wheat prophase I in both wild-type and *spo11-2* mutant backgrounds. In wheat, the SC is set up in the same way as in most species (Boden *et al.*, 2007; Khoo *et al.*, 2012; Barakate *et al.*, 2014). The SPO11-2 protein is necessary for the establishment of the SC, as mutants are unable to synapse and to reach the pachytene stage, leaving cells blocked at a zygotene-like stage. *SPO11-2* is involved in the formation of bivalents, with the triple mutants giving only univalents, while the double *bd<sup>-/-</sup>* mutant gave 4.8 ring bivalents instead of the 21 seen in the wild-type or in other single (*a<sup>-/-</sup>*, *b<sup>-/-</sup>*, *d<sup>-/-</sup>*) or double (*ab<sup>-/-</sup>*, *ad<sup>-/-</sup>*) mutants.

Although *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* SC is established independently of recombination (Dernburg *et al.*, 1998; McKim *et al.*, 1998), in general recombination is required for meiotic chromosomal synapsis [e.g. yeast (Alani *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1992), mouse (Yoshida *et al.*, 1998; Romanienko *et al.*, 2000), Arabidopsis (Grelon *et al.*, 2001; Stacey *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2018)].

In Arabidopsis, ~150–250 DSBs are observed at Lep-totene (Vignard *et al.*, 2007; Serrentino and Borde, 2012), while in maize twofold more (~500) DSBs are observed (Anderson *et al.*, 2003; Pawlowski *et al.*, 2003) for a

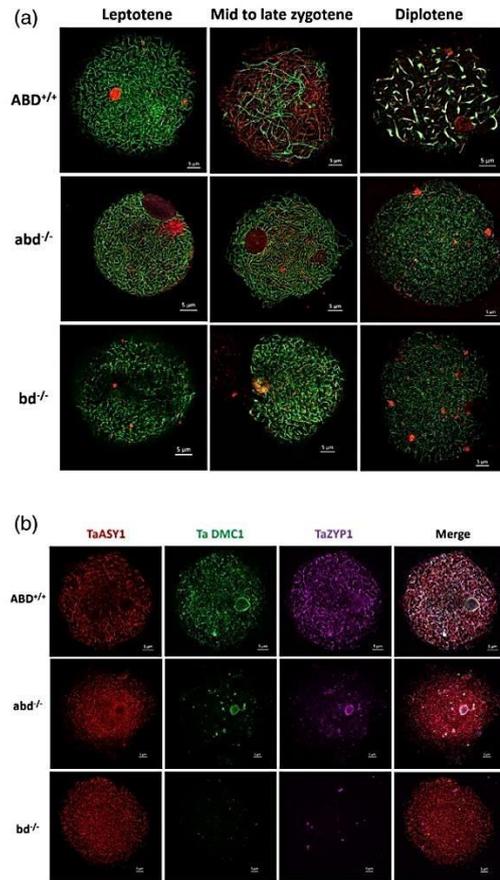
genome that is ~20 times larger. The wheat genome is more than 130 times larger than that of Arabidopsis and ~six times larger than the maize genome (~14.5 Gb; IWGSC, 2018). According to this non-linear relationship between genome-size and number of DSBs, we expected ~800–3200 DSBs in wheat. Using  $\gamma$ -H2AX staining, Gardiner *et al.* estimated the number of DSBs to be more than 2100 (Gardiner *et al.*, 2019). Using DMC1 antibody, we estimated for the first time in wheat the number of DMC1 foci as being between 365 and 1563 (mean 833), which corresponds to the lower boundary of our estimates. The slight discrepancy between  $\gamma$ -H2AX and DMC1 counts may be explained by several parameters, such as lab growing conditions, cell staging and/or choice of antibody. DMC1 marks active DSB sites engaged in homologous recombination and thus, although very close to reality, DMC1 foci may slightly underestimate the real number of initial DSBs. On the contrary,  $\gamma$ -H2AX may not always indicate the presence of DSBs (de Feraudy *et al.*, 2010; Cleaver *et al.*, 2011; Revet *et al.*, 2011), and thus use of  $\gamma$ -H2AX could slightly overestimate DSBs. Nevertheless, both approaches gave a similar order of magnitude and the number of DSBs obtained is in the range of what was expected. Thus, compared with Arabidopsis, the bread wheat genome exhibited about 10 times more DSBs while its genome was 130 times larger. This means that the DSB density is much lower in the bread wheat genome. Interestingly, recombination mainly occurs in the distal regions of the chromosomes in wheat, while pericentromeric regions are almost devoid of COs (Saintenac *et al.*, 2009; Choulet *et al.*, 2014). It is tempting to speculate that this CO distribution is explained (at least partly) by a low amount of DSBs compared with the size of the genome, and by a preferential location of these DSBs in the telomeric regions to the expense of pericentromeric regions. However, this remains to be demonstrated.

In this study, we have identified and characterized *SPO11-2*, a gene involved in the formation of DSBs at the onset of meiosis. Its functionality during the formation of the synaptonemal complex is described for the first time in wheat. We show that only two of the three homoeologous copies present in the wheat genome are functional. This is an important step in precisely deciphering the way recombination can be improved in a polyploid species such as bread wheat.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plant material and growth conditions

To study the impact of the mutation of *SPO11-2*, we used the reference line Chinese Spring as a control. The variety Renan was used to develop the set of 4500 irradiation lines (gamma rays, 150 Gy) from which the various *Spo11-2* mutants were derived. Single-copy mutants were identified and crossed manually between each other to generate a heterozygous line for the three



**Figure 6.** Synaptonemal complex (SC) and DMC1-foci analyses of the mutants during prophase I.

(a) Immunolocalization of synaptonemal proteins ASY1 (green) and ZYP1 (red). Control  $ABD^{+/+}$ : the synapse is set up correctly until complete co-localization of the two proteins at pachytene.  $abd^{-/-}$  and  $bd^{-/-}$  mutants: alteration of the SC with ZYP1 protein aggregates leading to synapse failure. Scale bar: 5  $\mu$ m.

(b) Triple immunolocalization of ASY1 (red), ZYP1 (magenta) and DMC1 (green) meiotic proteins at leptotene stage. Scale bar: 5  $\mu$ m.

(c) Number of DMC1 foci per cell at mid-zygotene for the genotypes Renan (RE), Chinese Spring (CS), control  $ABD^{+/+}$ , and mutants  $bd^{-/-}$  and  $abd^{-/-}$ . Because values follow normality law, a *t*-test was applied between the control ( $ABD^{+/+}$ ; blue) and the mutants (red). \**P*-value < 0.0001; NS: not significant.

mapping on each of the three homoeologous genomes. This was not unexpected as 47% of the wheat genes are present in triads with a single gene copy per sub-genome (an A:B:D configuration of 1:1:1; IWGSC 2018). The three copies of hexaploid wheat and those from diploid (*T. urartu* and *Ae. tauschii*) and tetraploid (*T. diccoides*) wheat ancestors are highly conserved. The D copy was the

best conserved between wheat and *Ae. tauschii*, which is consistent with its more recent hybridization with the AABB tetraploid genome progenitor and with a limited number of D-genome progenitors (Giles and Brown, 2006; Marcussen *et al.*, 2014). This high level of similarity was also observed between wheat D copy and Arabidopsis *SPO11-2* gene, confirmed by the successful complementation of Arabidopsis *spo11-2* mutant with the wheat *SPO11-2-D* protein. This latter result is reminiscent of the data obtained with *TaSPO11-1* (Da Ines *et al.*, 2020), and demonstrate that both *TaSPO11-1* and *TaSPO11-2* can functionally replace Arabidopsis *AtSPO11-1* and *AtSPO11-2*. Collectively, our data reveal important functional conservation of the *SPO11* complex features.

On the contrary, the A copy diverged slightly from that of the other homoeologous genomes, with a deletion of two nucleotides in the second exon. This deletion leads to a frameshift and to the occurrence of a premature stop codon giving a truncated non-functional protein. This mutation was present in the tetraploid species but absent from the diploid progenitor. This suggests that mutation occurred after the first polyploidization event (~0.8 MYA), in the tetraploid ancestor that further hybridized with *Ae. tauschii* to give current bread wheat, as the same mutation is conserved in different hexaploid varieties as well as in tetraploid species.

Non-functionality of the A copy was confirmed in the  $bd^{-/-}$  double mutants, which were sterile. However, we observed a few viable pollen grains as well as a few DMC1 foci in these mutants, suggesting some residual activity of the *SPO11* complex. The A copy is expressed, albeit significantly less than the other two copies. These results were in accordance with RNA-Seq data in the literature derived from Chinese Spring developing anthers (Lloyd *et al.*, 2014) or from *ph1* mutants (Martin *et al.*, 2018). Thus, the A copy is normally transcribed and translated, but deletion of two nucleotides (CG in *T. urartu* A progenitor or CC in B and D genomes; Figure 2b) in *SPO11-2* exon-2 sequence creates a premature stop codon. Interestingly, *ab initio* prediction gave us two possibilities for the expression of the A copy: an alternative translation starting site on exon-3 or alternative splicing with exon-2 skipping. The first hypothesis gives a protein of 290 aa missing the first 96 aa, but keeping the essential motifs for the catalytic activity Y124 (Hartung *et al.*, 2007) and DNA binding capacity G215, R222, R226 (Shingu *et al.*, 2012). However, given that the N-terminal part of *SPO11-2* protein is involved in the interaction with MTOPVIB in Arabidopsis (Vrielynck *et al.*, 2016), if a complex is present, it would only be partially active. Proteomic analyses will be needed to evaluate this hypothesis.

Alternatively, exon skipping (or alternative splicing) removing exon-2 gives a protein of 359 aa, with all catalytic sites and with the first amino acids involved in the

copies of *SPO11-2* (Figure S2). This line was self-pollinated and the progeny was screened by Q-PCR to isolate 73 plants with zero, one, two or three mutated copies. Two different individuals (replicates) per combination were randomly selected for further analyses. Because *SPO11-2* is located on homoeologous group 7, we used the nulli-tetrasomic (NT) stock of group 7 chromosomes (lines missing one pair of homologous chromosomes that is replaced by a pair of homoeologous chromosomes: N7AT7B, N7AT7D, N7BT7A, N7BT7D, N7DT7A, N7DT7B; Sears, 1954, 1966; Sears and Sears, 1978) for expression analysis of the copies of *SPO11-2*.

Seeds were germinated in a growth chamber at  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cold treatment ( $8^\circ\text{C}$ ) was applied at the three-leaf stage for 2 months with an 8-h light photoperiod. Plantlets were potted (4 L) in the greenhouse at  $23^\circ\text{C}$  day and  $18^\circ\text{C}$  night with a 16-h day photoperiod. Commercial progressive release fertilizer Nutricote (Fertil) was used to fertilize the plants during watering.

#### Identification of wheat *SPO11-2* copies

DNA sequences of *SPO11-2* were identified in the hexaploid wheat (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Data/>), tetraploid wheat *T. durum* (Avni *et al.*, 2017; <https://wewseq.wixsite.com/consortium>), and diploid wheat-relatives *T. urartu* (Ling *et al.*, 2018 <http://www.mbkbase.org/Tu/>) and *Ae. tauschii* (Luo *et al.*, 2017; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?term=PRJNA341983&cmd=DetailsSearch>) genome through a BLAST-P research using the Arabidopsis *SPO11-2* protein sequence (AT1G63990.1) as query. The three copies of wheat *SPO11-2* (TraesCS7A02G300300.1, TraesCS7B02G201200.1, TraesCS7D02G296000.2, further named TaSPO11-2-7A, TaSPO11-2-7B, TaSPO11-2-7D, respectively), as well as *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (TRIDC7AG041910.1 and TRIDC7BG033100.4), *T. urartu* (TuG1812G0700003251.01) and *Ae. tauschii* (AET7Gv20751300.7) copies were then aligned with MAFFT7 (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Kato *et al.*, 2002).

We used ACT (Artemis Comparison Tool; Carver *et al.*, 2005) to display pairwise comparisons between the three homoeologous sequences.

Intron/exon boundaries were identified using the genomic and CDS sequences from Arabidopsis as model. We aligned *SPO11-2* genomic and CDS sequences exon-2 with MAFFT7. A deletion of two nucleotides (CC) was found in the A copy.

To isolate *SPO11-2* sequences in cultivars Renan, Apache, Arche and W7984 (synthetic wheat; Nelson *et al.*, 1995), we exploited the SNP BreedWheat TaBW280K array (Rimbert *et al.*, 2018), which used an exome capture to target approximately 57 MB of coding sequences in 43 bread wheat accessions. We aligned all reads matching with *SPO11-2* genomic sequence on the corresponding reference Chinese Spring sequences, and we visualized the correspondences with IGV software (Genomic Visualisation and Interpretation).

#### Gene expression

To study the gene expression, we extracted mRNAs in pre-meiotic and leptotene anthers of plant controls (three biological replicates) using Renan (Re), Chinese Spring (CS) and CS Nulli-tetrasomic lines. We then generated genome-specific primers for *SPO11-2* in the CDS sequence. We quantified the signal intensity of each *SPO11-2* cDNA and normalized it against housekeeping gene (Ta54227: ATPase Paolacci *et al.*, 2009) using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). RNA-Seq data were those

described in Lloyd *et al.*, (2014), Martin *et al.*, (2018) and Ramirez-Gonzalez *et al.*, (2018).

#### Complementation in Arabidopsis

For expression of *TaSPO11-2* in Arabidopsis, the *TaSPO11-2-7D* coding sequence was synthesized and cloned into a GATEWAY destination vector pMDC32 in which the 35S promoter was replaced by the Arabidopsis *RAD51* promoter. This plasmid was then inserted in an *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain, which was subsequently used to transform Arabidopsis *SPO11-2-3/spo11-2-3* (Vrielynck *et al.*, 2016) heterozygous plants by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Seeds from the *Agrobacterium*-treated plants were sown on soil, and transformants were selected for Hygromycin resistance. Cytological analysis of meiotic progression in pollen mother cells was performed as previously described (Ross and Murphy, 1996).

#### Meiocyte isolation

Immature wheat inflorescences were harvested and placed in ice. Anthers were extracted using two roll pins. The identification of the stage was determined from one of the three anthers of the same spikelet after Acetocarmine (Carmin  $10 \text{ g L}^{-1}$  with acetic acid 45%) staining under light microscope. For meiotic atlas, two synchronized anthers were fixed in Carnoy solution (EtOH 100-acetic acid v/v: 3:1) during 48 h, then placed in EtOH 70% and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Anthers were placed on poly-L-lysine-coated slides in  $15 \mu\text{L}$  of fresh 45% acetic acid and then opened under binocular with two roll pins to liberate meiocytes. The slides were frozen in liquid nitrogen. The slides were mounted with Vectashield-DAPI (Eurobio Ingen) and observed on ZEISS Axio Observer Z1 microscope (Carl ZEISS Microscopy). For meiotic behaviour studies, fixed chromosomes of anthers at metaphase I stage were spread according to Jahier (1992). The slides were photographed under brightfield light on ZEISS Axio Observer Z1 microscope. The number of chiasmata and pairing types were counted on at least 50 cells per genotype to calculate the means.

#### Design of DMC1 antibody

The DMC1 protein shares very strong homology with the RAD51 protein (50% of amino acid positions), and to avoid cross-reactivity we aligned TaRAD51 and TaDMC1 proteins and those of *Arabidopsis thaliana* (AT5G20850.1 and AT3G22880.1). We selected sequences used by Sanchez-Moran *et al.* (2007) considered as the most immunogenic in our case (amino acids 27–42). We validated the uniqueness of this sequence *in silico* by doing a BLAST-P against the IGWSC database using the short function for the small sequences. BLAST-analysis results confirmed the presence of hits exclusively in TaDMC1-5-CS. Two peptides for TaDMC1-5-CS were designed after the bioanalysis. We used competition with the two peptides synthesized for the immunization of two chickens by Eurogentec to validate experimentally the specificity of the TaDMC1-5-CS antibody. Antibody is available on request.

#### Immunostaining

Samples were prepared according to Colas *et al.* (2016, 2017), and performed with slight modifications for wheat mutants. Anthers at prophase I stage were collected on ice in a watch glass containing 1 mL phosphate buffer (PBS)  $1 \times$  with  $1 \mu\text{L}$  of protease inhibitor cocktail (Sigma), then fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Anthers were washed twice with 1 mL PBS  $1 \times$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ , transferred at room temperature in

1 mL permeabilization solution (PBS 1 × with 0.05% Triton X100, 1 mM EDTA) for 15 min, then in 1 mL blocking solution consisting in 3% bovine serum albumin in PBS 1 ×, 0.1% Tween-20, 1 mM EDTA for 15 min. Meiocytes of three anthers per slide were isolated manually under binocular in 20 µL of PBS 1 × on poly-L-lysine-coated slide. The meiocyte suspension was left at room temperature to dry slightly. Fifty microlitres per slide of primary antibody solutions [dilutions 1:400 anti-TaASY1 (rabbit; Agrisera), Boden *et al.*, 2007, 2009, 1:200 anti-TaZYP1 (guinea pig) supplied by A.C. Martin, John Innes Centre, UK, and a mixture of two peptides by 1:20 anti-TaDMC1 (chicken; Eurogentec)] were deposited on the slide and then covered with a piece of parafilm. The slides were placed in a humid chamber at 4°C for 36–48 h. Slides were washed three times for 5 min with PBS 1 ×. Fifty microlitres of secondary antibody solutions (dilution in blocking solution 1:400 anti-rabbit Alexa Fluor 568, 1:300 anti-guinea pig Alexa Fluor 647, 1:300 anti-chicken Alexa Fluor 488; Fisher Scientific) were deposited on each slide, covered with parafilm and incubated in a humid chamber at room temperature for 1 h. Slides were washed three times with PBS 1 × and mounted with Vectashield-DAPI.

#### Confocal microscopy and image analysis

The fluorescence optical images of meiocytes were obtained with confocal LSM 800 microscope (Carl ZEISS) for three channels (488, 568, 647 nm) and Zeiss ZEN2 image analysis software. Image acquisition was made with high-resolution AIRYSCAN module. Detection parameters were 850 V for power laser and an intensity adjustment for each channel. 3D confocal stack images were acquired and deconvoluted with ZEN2 software image analysis (Carl ZEISS). Image analysis was made with Imaris software 7.6 (<https://imaris.oxinst.com/>) with Spot detection method (defaults parameters) for counting DMC1 foci.

#### Viability of pollen and fertility

Pollen of one anther was deposited on a slide and stained with Alexander reagent according to Jahier (1992) for 3 min. Two repetitions were done by genotype. Slides were observed in brightfield on Axio Observer Z1 (Carl ZEISS) microscope. Images full field were acquired with tiles module of ZEN2 image analysis software. About 1500 pollen grains per repetition were counted with Image J software. We conducted a fertility study by working on three–five plants per genotype, and we isolated four master spikes per plant and counted the number of grains produced by self-pollination.

#### Statistics

Statistical inference tests were done with the XLSTAT software (<https://www.xlstat.com/fr/>). Normality of values was verified with the normality test module including Shapiro and Wilk testing with default values (and other tests: from Anderson and Darling, from Lillifors and the Jarque Bera test). If the values follow a normal distribution, a student test was applied with the two-test and test module, keeping the defaults (alpha = 0.05). If the values do not follow a normal distribution, we applied a non-parametric Kruskal–Wallis test with an alpha error to 0.01.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank M.C. Debote and V. Lesage for providing seeds and DNA from irradiated population Renan; L. Georges and A. Loussert for screening the irradiated population; C. Vachias for help to acquire confocal images; R. Michard

(MIOGENIX) for developing *TaSPO11-2-7D* constructions for Arabidopsis complementation; I. Colas (JHI, Dundee, UK) and A.C. Martin (JIC, Norwich, UK) for providing antibodies; and colleagues from GENTYANE and CPCC platforms for genotyping and plant culture, respectively. The research received funding from French ANR Project CROC (CE19 2014). This work was supported by CNRS, INRA, INSERM, Université Clermont Auvergne, and the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP20-25). F.B. acknowledges support from Auvergne-Rhône-Alpes Region and FEDER (Fonds Européens de Développement Régional, AV0013222; SRESRI 2015).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

PS, ODI and CW conceived experiments and supervised the study. FB, IN and ODI participated in designing, and conducted all experiments and analysed the data. HR made all bioinformatics. FB, IN, ODI and PS wrote the manuscript core, and prepared figures and complementary figures. CW made a critical revision of the content of the manuscript. All authors contributed to the final reading and approved the submitted version.

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

All relevant data can be found within the manuscript and its supporting materials.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1.** Synteny analysis between the three homoeologous copies of *TaSPO11-2-CS*.

**Figure S2.** Experimental plan of the production of mutants. Nomenclature of mutants.

**Figure S3.** Analysis of pollen viability of mutants using Alexander-dye staining.

**Figure S4.** Expression analysis of homoeologous copies of *TaSPO11-2*.

**Figure S5.** Meiotic behaviour of *TaSPO11-2* mutants.

**Figure S6.** Analysis of terminal meiotic products in WT and mutants using acetocarmine staining.

**Figure S7.** ASY1, ZYP1, meiotic protein kinetic in the wild-type (*ABD<sup>+/+</sup>*).

**Figure S8.** DMC1 kinetic during prophase of the wild-type (*ABD<sup>+/+</sup>*).

**Table S1.** Complete annotation of *TaSPO11-2-CS* homoeologous copies.

**Table S2.** Seed number per silique in *AtSpo11-2* primary transformants after complementation with *TaSPO11-2-7D-CS*.

**Table S3.** Descriptive and inference statistics (Quantitative data) of DMC1 foci per cell.

#### REFERENCES

Alabdullah, A.K., Borrill, P., Martin, A.C., Ramirez-Gonzalez, R.H., Hassani-Pak, K., Uauy, C., Shaw, P. and Moore, G. (2019) A co-expression network in hexaploid wheat reveals mostly balanced expression and lack of

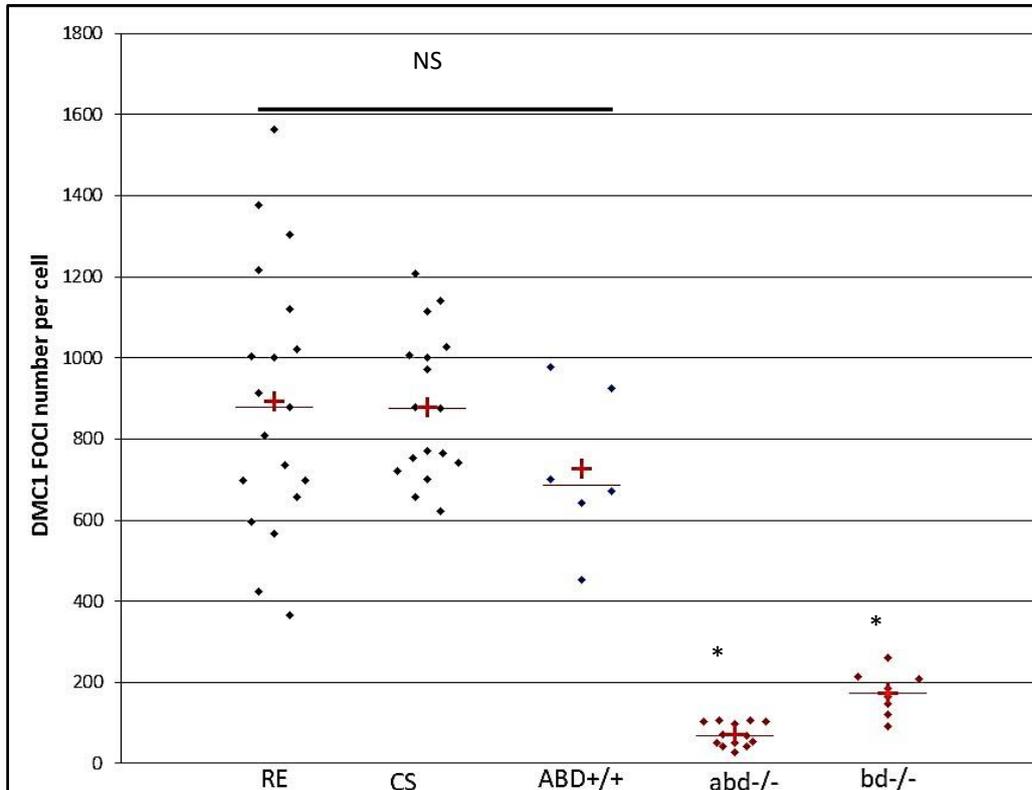
- significant gene loss of homeologous meiotic genes upon polyploidization. *Front Plant Sci.* 10, 1325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01325>
- Alani, E., Padmore, R. and Kleckner, N. (1990) Analysis of wild-type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell*, 61, 419–436.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- An, X.J., Deng, Z.Y. and Wang, T. (2011) *OsSpo11-4*, a rice homologue of the Archaeal *TopVIA* protein, mediates double-strand DNA cleavage and interacts with *OsTopVIB*. *PLoS One*, 6(5), 1–14.
- Anderson, L.K., Doyle, G.G., Brigham, B., Carter, J., Hooker, K.D., Lai, A., Rice, M. and Stack, S.M. (2003) High-resolution crossover maps for each bivalent of *Zea mays* using recombination nodules. *Genetics*, 165, 849–865.
- Avni, R., Nave, M., Barad, O. et al. (2017) Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, 357, 93–97.
- Barakate, A., Higgins, J.D., Vivera, S. et al. (2014) The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley. *Plant Cell*, 26(2), 729–740.
- Baudat, F. and De Massy, B. (2004) *SPO11*: an activity that promotes DNA breaks required for meiosis. *Med. Sci. (Paris)*, 20(2), 213–218.
- Bergerat, A., Gabelle, D. and Forterre, P. (1994) Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*: a thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *J. Biol. Chem.* 269, 27663–27669.
- Bergerat, A., De Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A. and Forterre, P. (1997) An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 386, 414–417.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N. (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homologue of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell*, 69, 439–456.
- Boden, S.A., Shadiac, N., Tucker, E.J., Langridge, P. and Able, J.A. (2007) Expression and functional analysis of *TaASY1* during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*). *BMC Mol. Biol.* 8(65), 1–14.
- Boden, S.A., Langridge, P., Spangenberg, G. and Able, J.A. (2009) *TaASY1* promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of *Ph1*. *Plant J.* 57, 487–497.
- Carver, T.J., Rutherford, K.-M., Berriman, M., Rajandream, M.A., Barrell, B.G. and Parkhill, J. (2005) ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*, 21, 3422–3423.
- Cervantes, M.D., Farah, J.A. and Smith, G.R. (2000) Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Molecular Cell*, 5(5), 883–888.
- Choulet, F., Alberti, A., Theil, S. et al. (2014) Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, 345(6194), 1–7.
- Cleaver, J.E., Feeney, L. and Revet, I. (2011) Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 10(19), 3223–3224.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- Colas, I., Maccaluy, M., Higgins, J.D. et al. (2016) A spontaneous mutation in *MutL*-Homolog 3 (*HvMLH3*) affects synapsis and crossover resolution in the barley desynaptic mutant *des10*. *New Phytol.* 212, 693–707.
- Colas, I., Darrier, B., Arrieta, M., Mittmann, S.U., Ramsay, L., Sourdille, P. and Waugh, R. (2017) Observation of extensive chromosome axis remodeling during the “diffuse-phase” of meiosis in large genome cereals. *Front. Plant Sci.* 8, 1235.
- Cole, F., Keeney, S. and Jasin, M. (2010) Comprehensive, fine-scale dissection of homologous recombination outcomes at a hot spot in mouse meiosis. *Mol. Cell*, 39(5), 700–710.
- Da Ines, O., Michard, R., Fayos, I., Bastianelli, G., Nicolas, A., Guiderdoni, E., White, C. and Sourdille, P. (2020) Bread Wheat *TaSPO11-1* exhibits evolutionary conserved function in meiotic recombination across distant plant species. *Plant J.* 1–17. <https://doi.org/10.1111/tj.14882>
- De Feraudy, S., Revet, I., Bezroukove, V., Feeney, L. and Cleaver, J.E. (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(15), 6870–6875.
- De Massy, B., Rocco, V. and Nicolas, A. (1995) The nucleotide mapping of DNA double-strand breaks at the *CYS3* initiation site of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 14, 4589–4598.
- De Massy, B. (2013) Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 47, 563–599.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M. and Villeneuve, A.M. (1998) Meiotic Recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis. *Cell*, 94, 387–398.
- Devisetty, U.K., Mayes, K. and Mayes, S. (2010) The *RAD51* and *DMC1* homoeologous genes of bread wheat: cloning, molecular characterization and expression analysis. *BMC Res. Notes*, 3, 245. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-245>.
- Diaz, R.L., Alcidi, A.D., Berger, J.M. and Keeney, S. (2002) Identification of residues in Yeast *Spo11p* critical for meiotic DNA double-strand break formation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1106–1115.
- Fayos, I., Meunier, A.C., Vernet, A., Navarro-Sanz, S., Portefaix, M., Bastianelli, G., Perin, C., Nicolas, A. and Guiderdoni, E. (2020) Assessment of the roles of *OsSPO11-2* and *OsSPO11-4* in rice meiosis using CRISPR/CAS9 mutagenesis. *J. Exp. Bot (accepted)*.
- Fu, M., Wang, C., Xue, F., Higgins, J., Chen, M., Zhang, D. and Liang, W. (2016) The DNA topoisomerase VI-B subunit *OsMTOPVIB* is essential for meiotic recombination initiation in rice. *Mol. Plant*, 9, 1539–1541.
- Giles, R.J. and Brown, T.-A. (2006) *GluDy* allele variations in *Aegilops tauschii* and *Triticum aestivum*: implications for the origins of hexaploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1563–1572.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. and Pelletier, G. (2001) *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* 20, 589–600.
- Grelon, M. (2016) Meiotic recombination mechanisms. *C R Biol.* 339(7–8), 247–251.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I. and Moore, G. (2006) Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 439, 749–752.
- Hartung, F. and Puchta, H. (2000) Molecular characterisation of two paralogous *SPO11* homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 28, 1548–1554.
- Hartung, F. and Puchta, H. (2001) Molecular characterization of homologues of both subunits A (*SPO11*) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene*, 271, 21–26.
- Hartung, F., Angelis, K.J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M. and Puchta, H. (2002) An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr. Biol.* 12, 1787–1791.
- Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S. and Puchta, H. (2007) The catalytically active tyrosine residues of both *SPO11-1* and *SPO11-2* are required for meiotic double-strand break induction in arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 3090–3099.
- Hunter, N. (2015) Meiotic recombination: the essence of heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(12), a016618.
- Jahier, J. (1992) Techniques de cytogénétique végétale. Eds INRA.
- IWGSC (The International Wheat Genome Sequencing Consortium) (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345 (6194). <https://doi.org/10.1126/science.1251788>.
- IWGSC (The International Wheat Genome Sequencing Consortium) (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, Issue 6403, eaar7191.
- Jing, J., Zhang, T., Wang, Y., Cui, Z. and He, Y. (2019) *ZmRAD51C* is essential for double-strand break repair and homologous recombination in maize meiosis. *Int J Mol Sci.* 20(21), 5513.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I. and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Keeney, S. (2008) *Spo11* and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Recombination and Meiosis: Crossing-Over and Disjunction. Book Series: Genome Dynamics and Stability*, 2, 81–123.

- Keeney, S., Giroux, C.N. and Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, **88**, 375–384.
- Keeney, S. and Kleckner, N. (1995) Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11274–11278.
- Kho, K.H.P., Able, A.J. and Able, J.A. (2012) The isolation and characterisation of the wheat molecular ZIPper 1 homologue, TaZYP1. *BMC Res. Notes*, **5**(106), 1–13.
- Klapholz, S., Waddell, C.S. and Easton-Esposito, R. (1985) The role of the SPO11 gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics*, **110**, 187–216.
- Lam, I. and Keeney, S. (2015) Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**(1), a016634.
- Ling, H.Q., Ma, B., Shi, X. *et al.* (2018) Genome sequence of the progenitor of wheat A subgenome *Triticum urartu*. *Nature*, **557**, 424–428.
- Liu, J., Wu, T.C. and Lichten, M. (1995) The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. *Embo J.* **14**, 4599–4608.
- Lloyd, A.H., Ranoux, M., Vautrin, S. *et al.* (2014) Meiotic gene evolution: can you teach a new dog new tricks? *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1724–1727.
- Luo, M., Gu, Y., Puiu, D. *et al.* (2017) Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature*, **551**, 498–502.
- Malik, S.-B., Ramesh, M.A., Hulstrand, A.M. and Logsdon, J.M. (2007) Pro-tist homologs of the meiotic Spo11 gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineage-specific loss. *Mol. Biol. Evol.* **24**(12), 2827–2841.
- Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L. *et al.* (2014) Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, **345**, 1–4.
- Martin, A.C., Borrill, P., Higgins, J., Alabdullah, A., Ramirez-González, R.H., Swarbreck, D., Uauy, C., Shaw, P. and Moore, G. (2018) Genome-wide transcription during early wheat meiosis is independent of synapsis, ploidy level, and the Ph1 locus. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–19.
- Martin, A.C., Rey, M.D., Peter Shaw, P. and Moore, G. (2017) Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma*, **126**, 669–680.
- McKim, K.S., Green-Marroquin, B.L., Sekelsky, J.J., Chin, G., Steinberg, C., Khodosh, R. and Hawley, R.S. (1998) Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science*, **279**, 876–878.
- Mercier, R., Mezard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N. and Grelon, M. (2015) The molecular biology of meiosis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 297–327.
- Nelson, J.C., Sorrells, M.E., Van Deynze, A.E., Lu, Y.H., Atkinson, M., Bernard, M., Leroy, P., Farris, J.D. and Anderson, J.A. (1995) Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5 and 7. *Genetics*, **141**, 721–731.
- Nichols, M.D., De Angelis, K., Keck, J.L. and Berger, J.M. (1999) Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO J.* **18**, 6177–6188.
- Paolacci, A.R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E. and Ciaffi, M. (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biol.* **10**, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>.
- Pawłowski, W.P., Golubovskaya, I.N. and Cande, W.Z. (2003) Altered nuclear distribution of recombination protein RAD51 in maize mutants suggests the involvement of RAD51 in meiotic homology recognition. *Plant Cell*, **15**, 1807–1816.
- Ramirez-González, R.H., Borrill, P., Lang, D. *et al.* (2018) The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science*, **361**, 1–12.
- Reddy, A.S.N., Marquez, Y., Kalyna, M. and Bartab, A. (2013) Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell*, **25**, 3657–3683.
- Revet, I., Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T.K., Oh, D.H., Dankort, D. and Cleaver, J.E. (2011) Functional relevance of the histone gamma-H2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(21), 8663–8667.
- Rey, M.-D., Martín, A. C., Higgins, J., Swarbreck, D., Uauy, C., Shaw, P. and Moore, G. (2017) Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol. Breeding*, **37**, 95.
- Rimbert, H., Darrier, B., Navarro, J. (2018) High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS One*, **13**(1), 1–19.
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., Bourbon, H.M. and De Massy, B. (2016a) The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science*, **351**, 943–949.
- Robert, T., Vrielynck, N., Mezard, C., De Massy, B. and Grelon, M. (2016b) A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* **54**, 165–176.
- Romanienko, P.J. and Camerini-Otero, R.D. (1999) Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics*, **61**, 156–169.
- Romanienko, P.J. and Camerini-Otero, R.D. (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell*, **6**, 975–987.
- Ross, J.H.E. and Murphy, D.J. (1996) Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. *Plant J.* **9**, 625–637.
- Saintenac, C., Falque, M., Martin, O.C., Paux, E., Feuillet, C. and Sourdille, P. (2009) Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, **181**, 393–403.
- Sanchez-Moran, E., Santos, J.L., Jones, G.H. and Franklin, F.C.H. (2007) ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev.* **21**, 2220–2233.
- Schoeffler, A.J. and Berger, J.M. (2005) Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans.* **33**, 1465–1470.
- Sears, E.R. (1954) The aneuploids of common wheat. *Mo. Agric. Exp. Sta. Res. Bull.* **572**, 1–58.
- Sears, E.R. (1966) Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In *Chromosome Manipulations and Plant Genetics*. (Riley, R. and Lewis, K.R., eds). Oliver and Boyd: London, pp. 29–45.
- Sears, E.R. and Sears, L.M.S. (1978) The telocentric chromosomes of common wheat. In *Wheat Genetics Symp*(Ramanujam, I.S. ed. Proc. 5th Int). New Delhi, Indian: Agricultural Research Institute, pp. 389–407.
- Serrentino, M.E. and Borde, V. (2012) The spatial regulation of meiotic recombination hotspots: Are all DSB hotspots crossover hotspots? *Exp. Cell Res.* **318**, 1347–1352.
- Shingu, Y., Tokai, T., Agawa, Y. *et al.* (2012) The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a Drosophila bioassay. *BMC Mol. Biol.* **13**, 1–16.
- Soltis, P.S. and Soltis, D.E. (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 561–588.
- Sprink, T. and Hartung, F. (2014) The splicing fate of plant SPO11 genes. *Front. Plant Sci.* **5**(214), 1–9.
- Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**, 206–216.
- Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N.J., Corsar, J., Roberts, K. and McCann, M.C. (2002) DNA Topoisomerase VI is essential for endoreduplication in arabidopsis. *Curr. Biol.* **12**, 1782–1786.
- Van de Peer, Y., Maere, S. and Meyer, A. (2009) The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 725–732.
- Vignard, J., Siwiec, T., Chelysheva, L., Vrielynck, N., Gonord, F., Armstrong, S.J., Schlögelhofer, P. and Mercier, R. (2007) The Interplay of RecA-related Proteins and the MND1-HOP2 Complex during Meiosis in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **3**, 1894–1906.
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., Mezard, C., Mayer, C. and Grelon, M. (2016) A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science*, **351**, 939–943.
- Wood, T.E., Takebayashi, N., Barker, M.S., Mayrose, I., Greenspoon, F.B. and Rieseberg, L.H. (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *PNAS*, **106**, 13875–13879.
- Xue, Z., Li, Y., Zhang, L. *et al.* (2016) OsMTOPIV promotes meiotic DNA double-strand break formation in rice. *Molecular Plant*, **9**, 1535–1538.
- Xue, M., Wang, J., Jiang, L., Wang, M., Wolfe, S., Pawłowski, W.P., Wang, Y. and He, Y. (2018) The number of meiotic double-strand breaks influences crossover distribution in Arabidopsis. *Plant Cell*, **30**, 2628–2638.
- Yin, Y., Cheong, H., Friedrichsen, D., Yunde Zhao, Y., Jianping, H.u., Mora-García, S., Chory, J. (2002) A crucial role for the putative Arabidopsis topoisomerase VI in plant growth and development. *PNAS*, **99**, 10191–10196.

- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y. and Morita, T.** (1998) The mouse RecA-like gene *Dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell*, **1**, 707–718.
- Yu, H., Wang, M., Tang, D., Wang, K., Chen, F., Gong, Z., Gu, M. and Cheng, Z.** (2010) OsSPO11-1 is essential for both homologous chromosome pairing and crossover formation in rice. *Chromosoma*, **119**, 625–636.
- Zamariola, L., Tiang, C.L., DeStorne, N., Pawlowski, W. and Geelen, D.** (2014) Chromosome segregation in plant meiosis. *Front. Plant Sci.* **5**, 1–19.
- Zickler, D. and Kleckner, N.** (2015) Recombination, pairing, and synapsis of homologs during Meiosis *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016626.

**Erratum 1:** dans la publication, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas la **figure 6C** (seulement la légende). La figure 6C présentée ci-dessous représente le nombre moyen de foyers DMC1 pour les témoins et les génotypes mutés (T-Test).

**C**



**Figure 6C de l'article.** Number of DMC1 foyers per cell at mid-zygotene for the genotypes Renan (RE), Chinese spring (CS), control ABD<sup>+/+</sup>, and mutants *bd*<sup>-/-</sup> and *abd*<sup>-/-</sup>. Since values follow normality law, a T-Test was applied between the control (ABD<sup>+/+</sup>; blue) and the mutants (red). \*: p-value <0.0001; NS: not significant.

**Erratum 2:**

Paragraphe « TaSPO11-2 is necessary for meiotic double-strand break » de l'article:

Formation SPO11.2 is involved in the formation of bivalent, with the triple mutant giving only univalents, while the double *bd*<sup>-/-</sup> mutant gave 4,6 ring bivalents (instead of 4,8 ring bivalents)

**4.2.1.2 Quelques éléments de discussion supplémentaires**

Comme nous l'avons démontré dans l'article, le gène *Spo11-2* est très conservé et complémente les mutants *Atspo11-2*. Cette complémentation hétérologue ouvre le champ à des analyses fonctionnelles des séquences de blé dans un système simplifié qui nous permettra de mieux comprendre le rôle des gènes méiotiques du blé hexaploïde. Nous avons pu voir dans l'article que la copie *TaSpo11-2-7A* est mutée et qu'elle est bien exprimée. La question qui restait en suspens dans l'article était de savoir si cette copie qui possédant une activité résiduelle est issue d'un exon skipping permettant d'éviter le codon stop ou bien d'un site de traduction alternatif qui aussi éviterait le codon

stop ou la présence d'une protéine tronquée ne possédant que les deux premiers exons. Afin de tenter de répondre à ces interrogations, nous avons produit les CDS suivant (voir annexes pour les séquences)) suivants :

- TASpo11-2A-IWGSC-Exon-skipping-TraesCS7A01G300300.1 pour laquelle l'exon 2 dans lequel les deux nucléotides sont manquants, n'est pas traduit ;
- TASpo11-2A-Frameshift correspondant à la copie mutée ;
- TASpo11-2A-NoFrameshift correspondant à la copie intègre avec les deux nucléotides manquants rajoutés ;
- TASpo11-2A-IWGSC-Alternative-splicing-5-Prime-Modif-TraesCS7A01G300300.2 correspondant à la copie avec l'ATG alternatif.

Des mutants hétérozygotes *Atspo11-2<sup>+/-</sup>* ont été transformés par trempage floral d'*Agrobacterium tumefaciens* portant les plasmides d'expression contenant les séquences ci-dessus. Les graines ont été analysées et semées et la fertilité des descendants a pu être estimée (Figure 60).

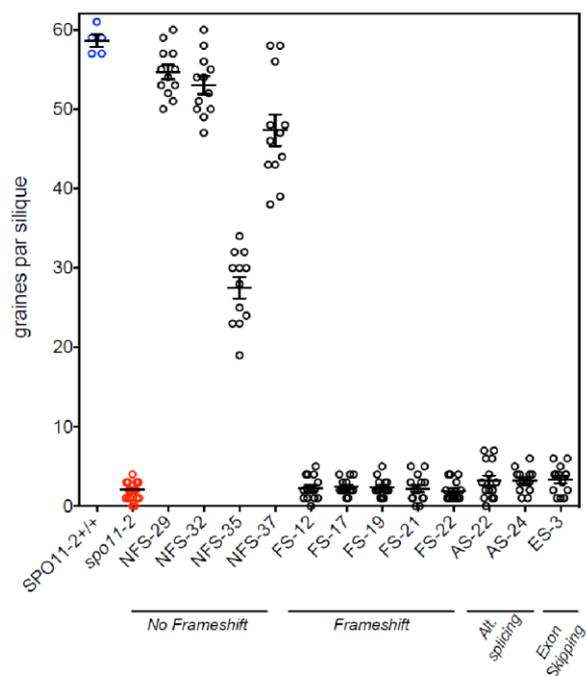


Figure 60 Nombres de graines chez les plantes At complémentées

Résultats de la complémentation des mutants *Atspo11-2* d'*Arabidopsis* avec les différentes versions de CDS pour Ta-SPO11-2A générés par Olivier Da Ines GREC.

Les plantes contenant la version sans décalage de cadre de lecture (No Frameshift) complètent les mutants *Atspo11-2<sup>-/-</sup>* (54,7+/- 3,1 ; 53 +/- 3,9 ; 27,5+/-4,6 ; 47,3 +/- 4,6) de manière non significativement différente des plantes sauvages *AtSPO11-2<sup>+/+</sup>* (58,6 +/- 1,7). Ce résultat nous confirme bien que la mutation causale identifiée dans l'article est bien due à la suppression des deux nucléotides. Nous constatons aussi que la mutation avec la délétion des deux nucléotides donne significativement le même nombre de graines que chez le mutant *Atspo11-2<sup>-/-</sup>* (autour de 2 graines). Les deux autres constructions donnent un peu plus de graines que le KO, mais ces données tournent autour de la valeur seuil de 0,01. Ces résultats ne sont pas interprétables en l'état car ces constructions n'ont donné lieu qu'à un ou deux évènements. Afin d'augmenter la robustesse des statistiques il faudrait réitérer la transformation pour générer un nombre plus grand de complémentations. Nous n'attendons pas forcément une complémentation pour les deux formes ES ou AS car chez le blé tendre, seule persiste une activité résiduelle au niveau de l'analyse du comportement méiotique. Il

nous faudrait approfondir les analyses de ces transformants complémentés au niveau cytologique afin de voir si une activité résiduelle est conservée chez les mutants *Atspo11-2* transformés.

**Tableau 16:** Graines et complémentation hétérologues

Nombre de graines obtenues en fonction de la construction du gène TaSpo11-2 intégrée chez les mutants AtSpo11-2 par rapport à la plante soeur WT.

GENOTYPE	Construct Spo11-2	SEEDS NUMBER	VAR	STUDENT VS +/+	STUDENT VS -/-
SPO11-2+/+	Mock	58.6	1.7		5.55659E-08
spo11-2	Mock	2.1	1.2	5.55659E-08	
NFS-29	No Frameshift-1	54.7	3.1	0.004819494	8.72889E-16
NFS-32	No Frameshift-2	53.0	3.9	0.000835625	2.62137E-14
NFS-35	No Frameshift-3	27.5	4.6	2.52875E-12	5.88229E-10
NFS-37	No Frameshift-4	47.3	4.6	0.000111534	9.67211E-11
FS-12	Frameshift-1	2.3	4.7	2.30731E-10	0.614713185
FS-17	Frameshift-2	2.4	5.0	8.0847E-09	0.265039369
FS-19	Frameshift-3	2.4	5.3	3.32525E-09	0.412347746
FS-21	Frameshift-4	2.2	5.3	4.37873E-11	0.757442924
FS-22	Frameshift-5	1.9	5.8	1.34918E-09	0.722901316
AS-22	AlternativeSplicing-1	3.2	3.8	3.84743E-14	0.102507853
AS-24	AlternativeSplicing-2	3.2	1.6	3.84743E-14	0.012614349
ES-3	ExonSkipping	3.4	1.2	2.75322E-11	0.01823837

## 4.2.2 Analyse d'expression des gènes méiotiques

Afin de voir si la mutation de *Spo11-2* pouvait affecter l'expression des autres gènes de la méiose, nous avons complété notre étude par l'analyse de l'expression de la cascade des gènes méiotiques chez les différents mutants.

### 4.2.2.1 Choix des acteurs principaux de la cascade méiotique

Dans le but d'analyser l'impact de la mutation de *Spo11-2* sur les processus de la méiose, nous avons scindé les protéines selon leur rôle dans l'initiation, maturation et résolution de la recombinaison (3.2.2 Page 63). Concernant l'initiation de la recombinaison nous avons focalisé notre étude sur les protéines faisant partie de la structure chromatinienne à savoir les cohésines et condensines ainsi que des protéines du remodelage de la chromatine et des topoisomères. Nous avons aussi intégré à ce groupe les protéines de l'élément axial du CS et les protéines du complexe SPO11 et les familles associées ainsi que le régulateur direct du complexe SPO11, les protéines SDS.

Pour la maturation de la recombinaison nous avons choisi les kinases ATM et ATR qui sont les senseurs des CDB, les histones H2AX puis les protéines MRN qui sont impliquées dans la coupure du complexe SPO11 fixé de manière covalente à l'ADN. Nous avons aussi intégré l'exonucléase SAE2/COM1 et les recombinases RAD51 DMC1 ainsi que BRCA2 qui sert de plateforme de recrutement des recombinases.

Pour la résolution de la recombinaison nous avons classé les protéines ZMM impliquées dans la résolution des CO de classe I puis les hélicases qui orientent la réparation vers le SDSA dont la famille FancM et les protéines MUS81 impliquées dans la résolution des CO de classe II.

Nous avons d'abord voulu savoir comment ces gènes se présentent chez le blé tendre et les espèces apparentées et pour cela nous avons fait des alignements multiples des protéines à partir des séquences d'*At* afin d'isoler les homéologues et paralogues présents.

### 4.2.2.2 Bioanalyse des gènes de la cascade

Nous avons identifié les différentes copies orthologues de ces 46 gènes en utilisant la protéine d'At comme référence. Les données complètes de présence chez le blé, de localisation, de taille des ADN génomiques et CDS, du nombre d'introns/exons, de taille des protéines sont fournies dans les annexes des Tableau 43, Tableau 44 et Tableau 45. Nous avons d'abord voulu analyser le degré de conservation à savoir le pourcentage d'identité partagé entre les espèces du blé et la plante modèle At (**Tableau 17**). De manière générale le niveau de conservation des gènes méiotiques est très élevé (en moyenne plus de 65% d'identité), en particulier les histones et les protéines REC8-SYN4 qui atteignent plus de 90% d'identité.

**Tableau 17:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID initiation

Pourcentage d'identité moyen en fonction du gène par rapport aux protéines orthologues d'Arabidopsis pour les gènes de l'initiation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABB), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

POURCENTAGE D'IDENTITE-MOYEN-VS-ARABIDO							
INITIATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ASY1	79,9	100,0	69,3	62,1	71,1	65,9	73,1
ASY2	63,6	100,0	61,6	63,5	63,3	62,4	66,2
ASY3	39,7	100,0	40,0	40,1	40,1	39,7	46,0
ASY4	50,0	100,0	50,7	51,1	51,1	51,6	55,8
DYAD	54,7	100,0	55,5	55,9	55,9	56,8	60,2
MTOPVIB	45,5	100,0	45,5	45,5	45,5	50,7	52,1
PRD1	36,4	100,0	36,3	36,2	36,2	36,4	42,7
SDS	57,9	100,0	57,9	57,9	57,9	57,4	62,1
SMC3	57,5	100,0	57,6	57,7	57,7	84,6	64,6
SPO11-1	65,2	100,0	65,3	63,2	65,4	42,7	66,1
SPO11-2	64,8	100,0	65,3	65,6	68,5	54,9	68,4
SYN4	92,0	100,0	92,0	92,0	92,0	81,9	91,8

<b>TOP6A</b>	76,6	100,0	76,5	76,5	76,5	76,3	<b>78,8</b>
<b>TOP6B</b>	78,0	100,0	77,9	77,7	77,8		<b>80,3</b>
<b>VIP3</b>	75,1	100,0	75,0	74,9	74,9	68,7	<b>76,8</b>
<b>Total général</b>	<b>62,5</b>	<b>100,0</b>	<b>61,8</b>	<b>61,8</b>	<b>62,2</b>	<b>59,3</b>	<b>65,6</b>

**Tableau 18:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID : maturation

Pourcentage d'identité moyen en fonction du gène par rapport aux protéines orthologues d'Arabidopsis pour les gènes de la maturation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

POURCENTAGE D'IDENTITE-MOYEN-VS-ARABIDC							
MATURATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
<b>ATM</b>	70,4	100,0	70,4	70,4	70,4	44,8	<b>70,8</b>
<b>ATR</b>	60,4	100,0	60,4	63,2	60,4	60,6	<b>64,8</b>
<b>BRCA2</b>	52,5	100,0	52,0	51,8	51,8	52,0	<b>56,8</b>
<b>COM1</b>	85,0	100,0	85,0	85,0	85,0	85,0	<b>86,5</b>
<b>DMC1</b>	81,4	100,0	81,4	81,3	80,8	87,3	<b>84,0</b>
<b>G-H2AX</b>	89,7	100,0	90,0	90,1	90,5	87,3	<b>90,3</b>
<b>H2AXB</b>	89,7	100,0	91,2	91,2	90,5	83,3	<b>90,9</b>
<b>MRE11</b>	86,0	100,0	86,2	86,3	86,0	69,5	<b>85,8</b>
<b>NBS1</b>	34,8	100,0	34,6	34,5	34,5	33,7	<b>41,0</b>
<b>RAD50</b>	69,4	100,0	69,4	69,4	69,4	64,1	<b>72,2</b>
<b>RAD51</b>	86,0	100,0	87,4	88,1	88,1	53,8	<b>85,4</b>
<b>Total général</b>	<b>75,7</b>	<b>100,0</b>	<b>74,7</b>	<b>74,1</b>	<b>73,0</b>	<b>67,4</b>	<b>76,0</b>

**Tableau 19:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis % d'ID résolution

Pourcentage d'identité moyen en fonction du gène par rapport aux protéines orthologues d'Arabidopsis pour les gènes de la résolution de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

POURCENTAGE IDENTITE-MOYEN-VS-ARABIDO							
RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
EME1A	51,5	100,0	51,3	51,3	48,2	57,0	56,1
EME1B	66,9	100,0	66,4	66,2	67,0	67,7	70,0
FAN1	60,5	100,0	60,6	61,1	61,0	60,8	64,7
FANCD2	52,0	100,0	51,8	51,9	51,8		57,2
FANCM	57,5	100,0	57,5	58,0	57,6	81,1	64,2
HEI10	79,9	100,0	80,6	81,2	81,0	45,9	79,2
MER3	71,5	100,0	71,6	71,8	71,4	40,4	71,3
MHF1	67,8	100,0	60,1	60,7	57,0	59,8	64,6
MHF2	72,5	100,0	76,7	76,7	76,7	76,7	78,8
MLH1	72,5	100,0	72,4	72,1	72,3	69,0	74,2
MLH3	61,2	100,0	60,9	59,6	61,1	52,4	63,4
MSH4	75,0	100,0	67,0	51,9	75,1	52,3	68,2
MSH5	76,8	100,0	76,3	75,7	76,0	76,1	78,5
MUS81	63,9	100,0	62,9	64,3	62,6	62,4	64,7
RECQ4A	82,9	100,0	83,2	83,1	83,3	60,7	82,6
RECQ4B	82,4		82,7	82,7	82,9	83,5	82,8
SHOC1	54,7	100,0	54,4	54,2	54,2	54,6	56,9
ZYP1A	51,3	100,0	51,8	50,9	51,9	48,8	56,1
ZYP1B	51,3	100,0	52,9	49,6	53,0	50,0	56,5
ZYP4	47,8	100,0	47,5	47,3	47,4	43,7	51,2
Total général	64,9	100,0	63,8	62,9	63,5	60,3	66,3

Les résultats présentés dans cette section vont permettre de mieux appréhender le paysage des protéines méiotiques chez les différentes espèces de blés. Il nous faut d'abord mettre en avant le fait que certaines protéines ne sont pas dupliquées chez le blé tendre (**Tableau 20**) et n'existent qu'au travers des trois copies homéologues.

**Tableau 20:** Non dupliqués chez le blé tendre

Gènes qui ne sont pas dupliqués chez le blé tendre et ne sont présents qu'en trois copies homéologues A, B, D.

Nombre	Requête	Cible	HIT	% ID
1	At- EME1A_AT2G21800.2	TraesCS2A01G514800.1	1	48.6
1	At- EME1A_AT2G21800.2	TraesCS2B01G543100.1	1	47.8
1	At- EME1A_AT2G21800.2	TraesCS2D01G516300.1	1	47.8
2	At-EME1B_AT2G22140.1	TraesCS2A01G514800.1	1	57.3
2	At-EME1B_AT2G22140.1	TraesCS2B01G543100.1	1	56.4
2	At-EME1B_AT2G22140.1	TraesCS2D01G516300.1	1	56.8
3	At-H2AXB_AT1G54690.1	TraesCS5A02G098300.1	1	91,2
3	At-H2AXB_AT1G54690.1	TraesCS5B02G103600.1	1	91,2
3	At-H2AXB_AT1G54690.1	TraesCS5D02G110600.1	1	91,2
4	GAMMA- H2AX_AT1G08880.1	TraesCS5A02G098300.1	1	91,2
4	GAMMA- H2AX_AT1G08880.1	TraesCS5B02G103600.1	1	91,2
4	GAMMA- H2AX_AT1G08880.1	TraesCS5D02G110600.1	1	91,2
5	AtZYP1A_AT1G22260.1	TraesCS2A01G340400.2	1	39.1
5	AtZYP1A_AT1G22260.1	TraesCS2B01G338300.3	1	38.7
5	AtZYP1A_AT1G22260.1	TraesCS2D01G318100.4	1	38.9
6	AtZYP1B_AT1G22275.1	TraesCS2A01G340400.2	1	39.8
6	AtZYP1B_AT1G22275.1	TraesCS2B01G338300.3	1	39.5
6	AtZYP1B_AT1G22275.1	TraesCS2D01G318100.4	1	39.7

Ce qu'il faut mettre aussi en avant est le fait que la protéine At-RECQ4B n'existe pas chez les blés (Tableau 21). Concernant les nombres de copies de gènes impliqués dans l'initiation de la recombinaison, nous ne retrouvons pas de gène surnuméraire hormis pour la protéine Ta-ASY2-5A-CS présente en deux exemplaires sur le chromosome 5A.

**Tableau 21:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes initiation

Nombre de copies par gène impliqué dans l'initiation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE DE COPIES DE GENES EN MOYENNE							
INITIATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ASY1	1	1	3	2	2	1	10
ASY2	1	1	4	2	2	1	11
ASY3	1	1	3	2	2	1	10
ASY4	1	1	3	2	2	1	10
DYAD	1	1	3	2	2	1	10
MTOPVIB	1	1	3	2	2	1	10
PRD1	1	1	3	2	2	1	10
SDS	1	1	3	2	2	1	10
SMC3	1	1	3	2	2	1	10
SPO11-1	1	1	3	2	2	1	10
SPO11-2	1	1	3	2	2	1	10
SYN4	1	1	3	2	2	1	10
TOP6A	1	1	3	2	2	1	10
TOP6B	1	1	3	2	2	1	10
VIP3	1	1	3	2	2	1	10
<b>Total général</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>46</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>151</b>

**Tableau 22:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes maturation

Nombre de copie par gènes impliqués dans la maturation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE DE COPIES DE GENES EN MOYENNE							
MATURATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ATM	1	1	3	2	2	1	10
ATR	1	1	3	3	2	1	11
BRCA2	1	1	3	2	2	1	10
COM1	1	1	3	2	2	1	10
DMC1	1	1	3	2	2	1	10
G-H2AX	2	1	6	4	2	2	17
H2AXB	2	1	3	2	2	2	12
MRE11	1	1	3	2	2	1	10
NBS1	1	1	3	2	2	1	10
RAD50	1	1	3	2	2	1	10
RAD51	1	1	3	2	2	1	10
<b>Total général</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>36</b>	<b>25</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>120</b>

Concernant les gènes impliqués dans la maturation de la recombinaison (Tableau 22), le blé dur (Td) possède une copie surnuméraire du gène ATR sur le Chr 1B alors que les autres copies sont toutes sur le groupe d'homéologie 7. Cette copie et celle provenant du chromosome 7B ont des scores de BLASTP (versus At) faibles (609 et 543) par rapport aux autres copies (en moyenne 1715,38 ±5,42). La taille des autres protéines tourne autour de 2537 aa (± 261 aa) alors que celles des chromosomes 1B et 7B font respectivement 464 et 295 aa. La protéine γH2AX est dupliquée sur les chromosomes des groupes 5 et 7 pour tous les blés avec des tailles similaires (142 aa ± 20 aa). Chez le blé dur (Td) il n'y a que deux copies l'une sur le chromosome 5A et l'autre sur le chromosome 7B.

Les gènes de la résolution de la recombinaison (Tableau 23) sont aussi dupliqués pour SHOC1 sur les chromosomes des groupes 4 et 6 sauf chez *Aegilops tauschii* (AET) où seule la copie sur le chromosome 6D est trouvée. La taille des protéines est très conservée (1636 aa +/-220 aa). Nous verrons plus tard dans l'analyse le cas de MUS81 chez le blé (4.2.2.2.1.3 Page 124). Pour MLH1 qui est normalement sur le groupe d'homéologie 3, une copie située sur le chromosome 7A apparaît chez le tétraploïde (Td et Tt) puis est conservée chez le blé tendre (Ta). Cette copie possède les mêmes caractéristiques que la copie initiale du chromosome 3 avec une taille génomique de CDS et de protéine oscillant autour de 700 aa et un score très élevé vis à vis de la protéine d'At. La protéine MLH3 qui est canoniquement située sur le groupe d'homéologie 5 est dupliquée chez le blé dur (Td) sur le chromosome 3B, avec un score de BLASTP (versus *Arabidopsis thaliana*) plus faible (2,9E-55 VS XE-90/-92) et une taille de 574 aa contre de 894 aa pour la copie 5A et 1021 pour la copie 5B. Le gène ZYP4-5B qui est impliqué dans la recombinaison entre homéologues (Martín et al., 2017) était déjà présent chez les tétraploïdes (Td et Tt Tableau 23).

**Tableau 23:** Sorties de BLASTP du blé versus Arabidopsis Nombre de gènes résolution

Nombre de copies par gène impliqué dans la résolution de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE DE COPIES DE GENES EN MOYENNE							
RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
EME1A	1	1	3	2	2	1	10
EME1B	1	1	3	2	2	1	10
FAN1	1	1	3	2	2	1	10
FANCD2	1	1	3	2	2	1	10
FANCM	1	1	3	2	2	1	10
HEI10	1	1	3	2	2	1	10
MER3	1	1	3	2	2	1	10
MHF1	2	1	3	2	2	1	11
MHF2	1	1	3	2	2	1	10
MLH1	1	1	4	3	3	1	13
MLH3	1	1	3	3	2	1	11
MSH4	1	1	3	2	2	1	10
MSH5	1	1	3	2	2	1	10
MUS81	5	1	4	4	5	5	24
RECQ4A	1	1	3	2	2	1	10
RECQ4B	1	1	3	2	2	1	10
SHOC1	1	1	6	4	4	2	18
ZYP1A	1	1	3	2	2	1	10
ZYP1B	1	1	3	2	2	1	10
ZYP4	1	1	4	3	3	1	13
<b>Total général</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>66</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>25</b>	<b>230</b>

#### 4.2.2.2.1 Analyse de synténie du blé tendre

Tous les gènes de la cascade sont retrouvés en au moins deux copies homéologues. Le cofacteur de MUS81, EME1 n'est présent qu'en un seul exemplaire chez le blé alors que chez *At*, il existe les formes EME1A et EME1B qui ne fixent pas tout à fait les mêmes substrats (Geuting et al., 2009). Afin d'affiner notre analyse nous avons voulu savoir si les gènes ont conservé leur homéologie sur les trois génomes. Pour ce faire nous avons utilisé le fichier GFF des positions de nos gènes de la cascade méiotique puis nous avons utilisé un pipeline R nous permettant de relocaliser ces gènes sur un schéma conservant les tailles des 21 chromosomes (Figure 61, Figure 62, Figure 63 et Figure 64). L'homéologie est bien respectée pour 80% des gènes. Comme nous avons pu le constater, cinq gènes (ZIP4, MUS81, MLH1, MRE11) ont des paralogues qui se sont dupliqués soit sur le même chromosome soit sur un autre.

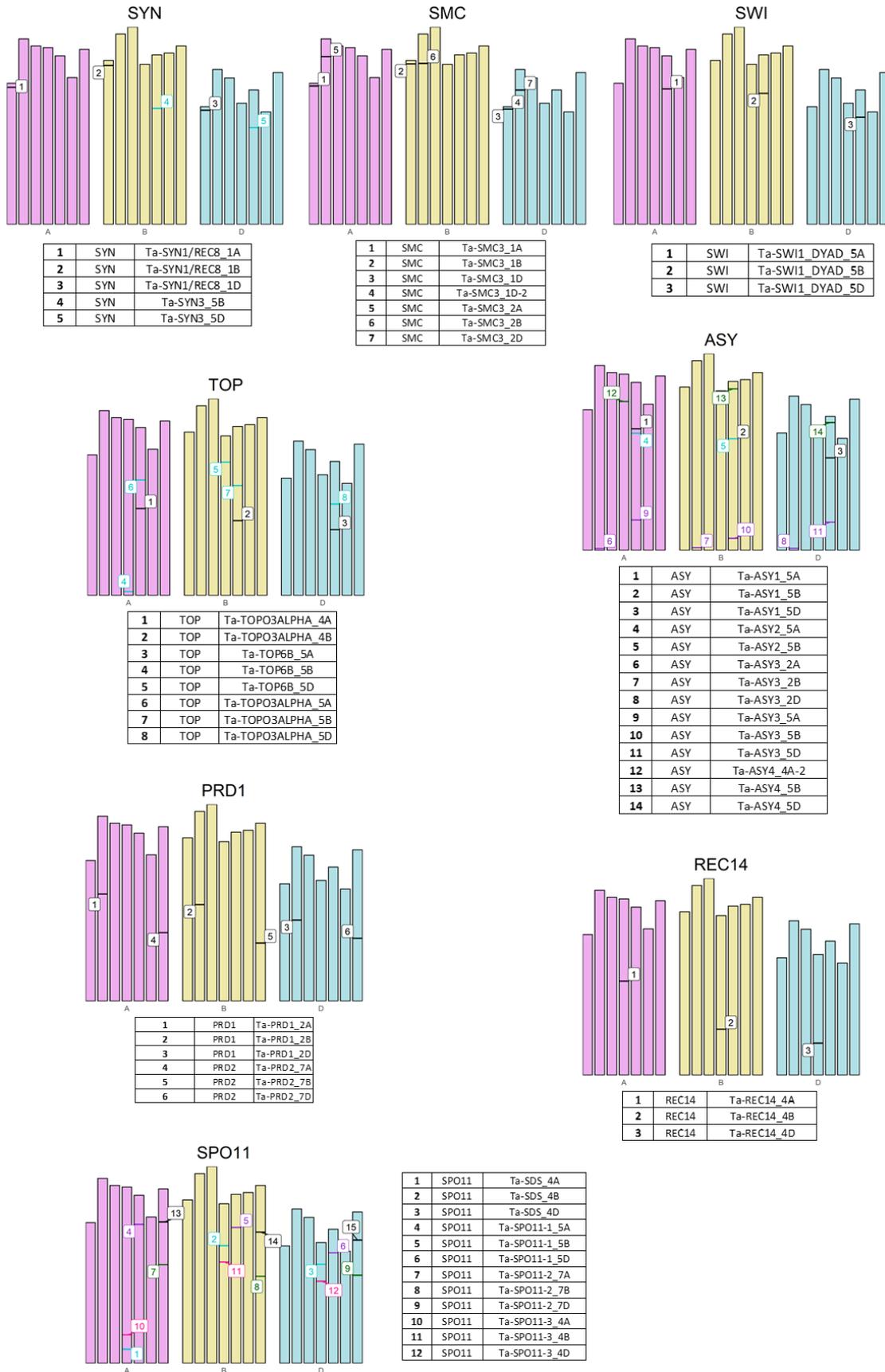


Figure 61 Synténie et gènes d'initiation

Analyse de synténie des gènes impliqués dans l'initiation de la recombinaison

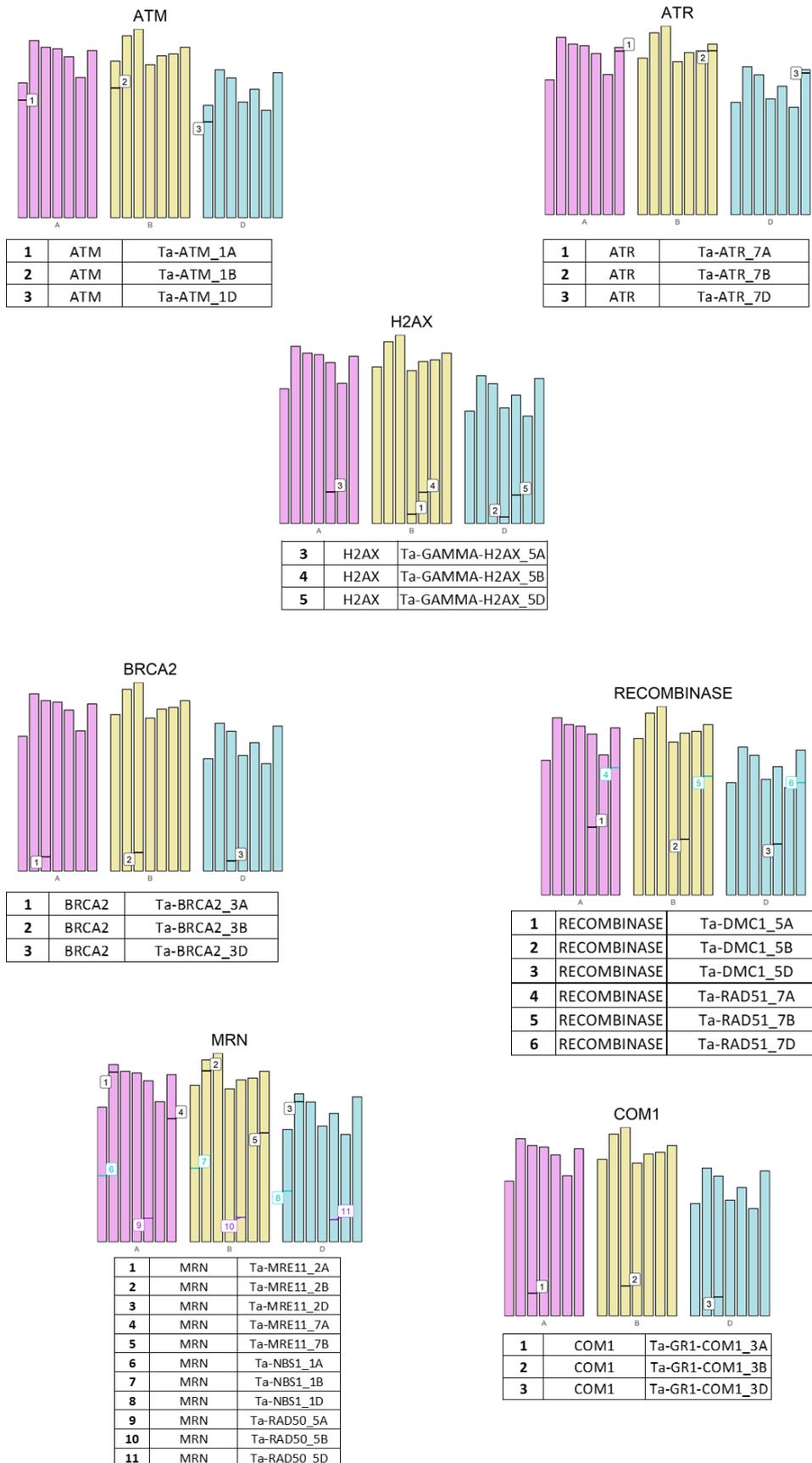


Figure 62 Synténie et gènes de maturation

Analyse de synténie des gènes impliqués dans la maturation de la recombinaison

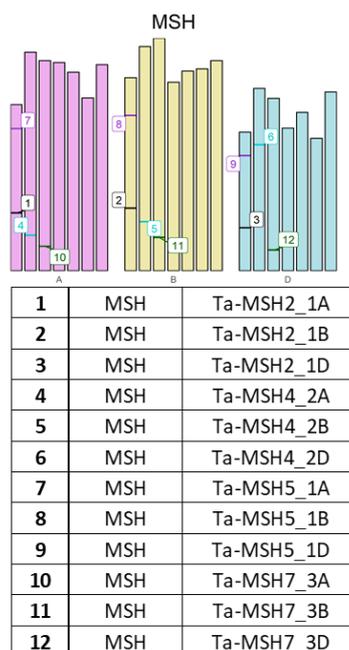
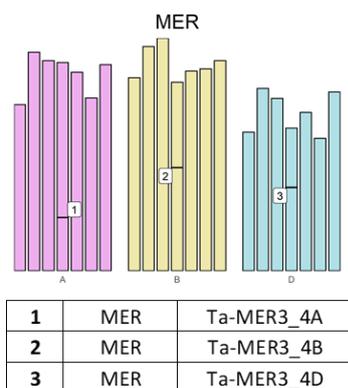
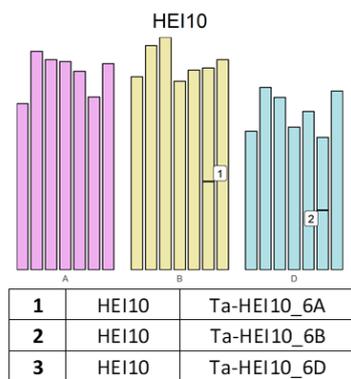
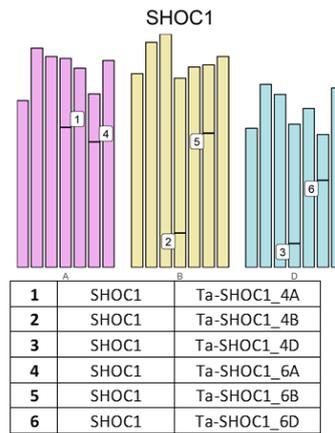
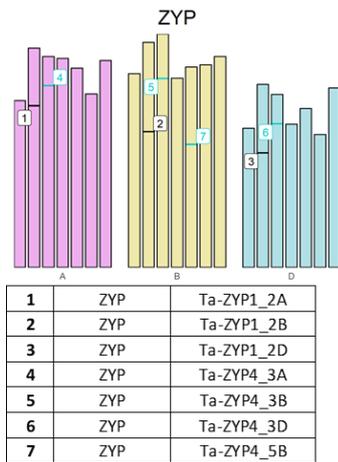
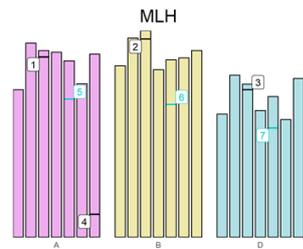
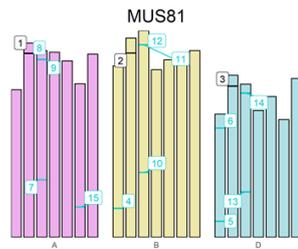


Figure 63 Synténie et gènes de résolution

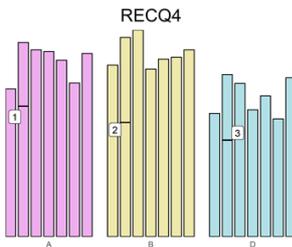
Analyse de synténie des gènes impliqués dans la résolution de la recombinaison



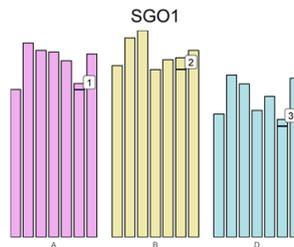
1	MLH	Ta-MLH1_3A
2	MLH	Ta-MLH1_3B
3	MLH	Ta-MLH1_3D
4	MLH	Ta-MLH1_7A
5	MLH	Ta-MLH3_5A
6	MLH	Ta-MLH3_5B
7	MLH	Ta-MLH3_5D



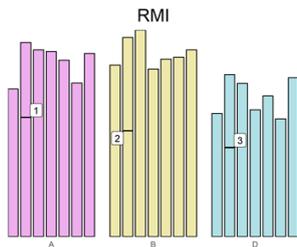
1	MUS81	Ta-EME1A_2A
2	MUS81	Ta-EME1A_2B
3	MUS81	Ta-EME1A_2D
4	MUS81	Ta-MUS81_1B
5	MUS81	Ta-MUS81_1D
6	MUS81	Ta-MUS81_1D-2
7	MUS81	Ta-MUS81_3A
8	MUS81	Ta-MUS81_3A-2
9	MUS81	Ta-MUS81_3A-3
10	MUS81	Ta-MUS81_3B
11	MUS81	Ta-MUS81_3B-2
12	MUS81	Ta-MUS81_3B-3
13	MUS81	Ta-MUS81_3D
14	MUS81	Ta-MUS81_3D-2
15	MUS81	Ta-MUS81_6A



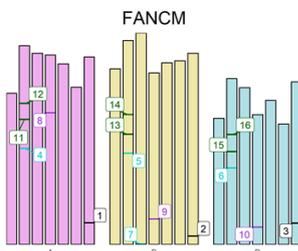
1	RECQ4	Ta-RECQ4/SGS1_2A
2	RECQ4	Ta-RECQ4/SGS1_2B
3	RECQ4	Ta-RECQ4/SGS1_2D



1	SGO1	Ta-SGO1_6A
2	SGO1	Ta-SGO1_6B
3	SGO1	Ta-SGO1_6D



1	RMI	Ta-BLAP75/RMI1_2A	RMI
2	RMI	Ta-BLAP75/RMI1_2B	RMI
3	RMI	Ta-BLAP75/RMI1_2D	RMI



1	FANCM	Ta-FAN1_7A
2	FANCM	Ta-FAN1_7B
3	FANCM	Ta-FAN1_7D
4	FANCM	Ta-FANCD2_2A
5	FANCM	Ta-FANCD2_2B
6	FANCM	Ta-FANCD2_2D
7	FANCM	Ta-FANCD2_3B
8	FANCM	Ta-FANCM_4A
9	FANCM	Ta-FANCM_4B
10	FANCM	Ta-FANCM_4D
11	FANCM	Ta-MHF1_2A
12	FANCM	Ta-MHF1_2A-2
13	FANCM	Ta-MHF1_2B
14	FANCM	Ta-MHF1_2B-2
15	FANCM	Ta-MHF1_2D
16	FANCM	Ta-MHF1_2D-2

Figure 64 Synténie et gènes de résolution suite

Analyse de synténie des gènes impliqués dans la résolution de la recombinaison (suite)

De manière générale, les gènes situés sur le chromosome 4A perdent leur synténie par rapport aux deux autres homéologues (4AL vs. 4BS 4DS). La copie 4A est située sur le bras long pour les gènes impliqués dans l'initiation de la CDB SDS, TOP6B, pour les gènes impliqués dans la résolution des CO interférents SHOC1 et MER3, et pour un gène de la résolution des NCO, FANCM. Cette inversion ancestrale est connue chez le blé tendre (Miftahudin et al., 2004). De façon inattendue, il y a aussi une inversion de la synténie pour la copie D du gène MSH4 qui se retrouve sur le bras court du chromosome 2 alors que les autres homéologues sont sur le bras long. Cette inversion atypique pourrait être à l'origine du fait que cette copie soit en cours de pseudogénéisation (voir § 4.2.2.2.3 Page 130) car l'environnement chromatinien n'est pas le même.

#### 4.2.2.2.1.1 Perte d'une copie

Pour certains gènes, une des copies n'a pas été retrouvée. Par exemple, la protéine PRD1 démontrée comme étant impliquée dans l'initiation des CDB est présente sur les chromosomes des groupes d'homéologie 2 et 7 mais la copie 7D n'a pas été retrouvée. De la même façon, il manque la copie 4D du gène TOP6, et la copie 4A du gène H2AX. De façon intéressante, les copies A du gène HEI10 qui devrait être sur le chromosome 6A et du gène SYN3 qui devrait être sur le chromosome 5A, ne sont pas sur les deux pseudo molécules attendues. En revanche, elles se retrouvent dans des contigs nonassignés à un chromosome particulier (appelés « unknown »).

Il est donc possible que lorsque des copies sont absentes, cela est dû à un mauvais assemblage des séquences et l'absence devra être validée expérimentalement.

#### 4.2.2.2.1.2 Gain d'une copie

Cette étude nous a également permis de mettre en avant l'apparition de paralogues dupliqués soit de manière CIS (sur un même chromosome) soit de manière TRANS (sur un autre chromosome) mais pas forcément en triplicat.

Une copie du gène ZYP4 est retrouvée sur le chromosome 5B alors que les autres paralogues sont sur le groupe d'homéologie 3. Cette copie fait partie intégrante d'un bloc provenant du chromosome 3B et la copie surnuméraire TaZIP4-B2 est responsable du contrôle de la recombinaison homéologue chez le blé (Martín et al., 2017; Rey et al., 2017b). De même, cette configuration est retrouvée pour le gène MLH1 qui possède une copie additionnelle sur le chromosome 7A alors que ses paralogues se situent sur le groupe d'homéologie 3. De même pour le gène MRE11, les copies canoniques sont situées sur le groupe d'homéologie 2 alors que des copies additionnelles sont retrouvées sur les chromosomes 7A et 7B mais pas sur chromosome 7D.

#### 4.2.2.2.1.3 Cas particulier de TaMus81

MUS81 est une endonucléase qui intervient dans la voie des CO non-interférents. Il n'existe qu'une copie chez la plupart des espèces. Cette protéine est présente en un seul exemplaire fonctionnel chez Arabidopsis (AT4G30870.1) avec une taille de 659 aa. Cependant, il existe également

**Tableau 24:** Répartition sur les chromosomes du blé des isoformes de MUS81

Distribution des différentes copies du gène MUS81 sur les différents chromosomes du blé tendre.

	Génome A	Génome B	Génome D
Chromosome 1	-	2	2
Chromosome 3	3	4	2
Chromosome 6	1	-	-
Chromosome 7	-	1	1

un autre exemplaire d'une taille de 1272 aa mais il s'agirait d'un pseudogène (AT5G39770.1). Chez le blé tendre, nous avons identifié 16 exemplaires répartis sur quatre groupes d'homéologie (**Tableau 24**).

Ces paralogues sont surtout présents sur le groupe d'homéologie 3 où ils existent en trois exemplaires. De façon intéressante, une copie est manquante sur le chromosome 3D alors qu'il y a une copie supplémentaire sur le chromosome 3B. Cela suggère que la copie 3D aurait pu être coupée et collée sur le chromosome 3B. Chez le colza, des échanges entre chromosomes homéologues ont été mentionnés (Higgins et al., 2018). De même, une seule copie est retrouvée sur le chromosome 6A alors que la copie du chromosome 7A est manquante. Il pourrait donc s'agir d'une translocation entre ces deux chromosomes. La taille moyenne des séquences génomiques se situe autour 7000 pb, mais les copies 1B et 6A ont des tailles avoisinant les 16000 paires de base ce qui suggère des insertions d'éléments transposables dans les introns (Tableau 25). Ces paralogues ont des tailles de protéines variant de 644 aa à 87 aa.

**Tableau 25:** Taille des gènes, CDS et protéines des copies de Ta-MUS81

CODE	NAME	Taille gène (pb)	Taille CDS (pb)	Taille protéine (aa)
Ta-MUS81-3A-CS-1	TraesCS3A02G487200.1	6924	1728	495
Ta-MUS81-3D-CS-1	TraesCS3D02G482500.2	7227	1731	496
Ta-MUS81-7D-CS	TraesCS7D02G490700.1	6276	1608	455
Ta-MUS81-3B-CS-1	TraesCS3B02G535000.2	6610	1641	466
Ta-MUS81-1D-CS-1	TraesCS1D02G082300.1	6714	1515	424
Ta-MUS81-3A-CS-2	TraesCS3A02G188900.1	7350	1296	351
Ta-MUS81-3D-CS-2	TraesCS3D02G192600.1	7901	1296	351
Ta-MUS81-3B-CS-2	TraesCS3B02G218300.2	7533	1311	356
Ta-MUS81-1B-CS-1	TraesCS1B02G122400.1	13417	1671	476
Ta-MUS81-3B-CS-3	TraesCS3B02G489200.1	25102	1536	431
Ta-MUS81-3A-CS-3	TraesCS3A02G486900.1	6381	1488	415
Ta-MUS81-1B-CS-2	TraesCS1B02G105000.1	15377	1812	556
Ta-MUS81-6A-CS	TraesCS6A02G144500.1	14036	1479	412
Ta-MUS81-7B-CS	TraesCS7B02G011000.1	25797	1476	411
Ta-MUS81-3B-CS-3	TraesCS3B02G534900.1	5911	2175	644
Ta-MUS81-1D-CS-2	TraesCS1D02G354000.1	1247	504	87

Nous avons aligné ces 16 copies avec celle d'Arabidopsis et un seul résidu est très conservé. Il correspond au domaine PTHR13451 (CLASS II CROSSOVER JUNCTION ENDONUCLEASE MUS81 PANTHER entry) qui est bien présent au niveau de la structure protéique de MUS81. Les copies les plus proches de celle d'Arabidopsis sont répertoriées dans le Tableau 26.

**Tableau 26:** ID des copies les plus proches de la protéine MUS81 d'Arabidopsis

Code	Protéine	Score	E-value	%Id
Ta-MUS81-3A-CS-1	TraesCS3A02G487200.1	481	4E-57	63,2
Ta-MUS81-3D-CS-1	TraesCS3D02G482500.2	473	5E-56	62,4
Ta-MUS81-7D-CS	TraesCS7D02G490700.1	470	1,3E-55	64,4
Ta-MUS81-3B-CS-1	TraesCS3B02G535000.1	469	1,8E-55	61,7

Cela suggère que seules les protéines du groupe d'homéologie 3 localisées sur le bras long sont fonctionnelles mais que la copie du chromosome 7D aurait été dupliquée et pourrait avoir gardé un rôle actif.

Nous avons ensuite comparé ces isoformes en faisant un arbre phylogénétique incluant la protéine d'Arabidopsis à partir du résidu conservé.

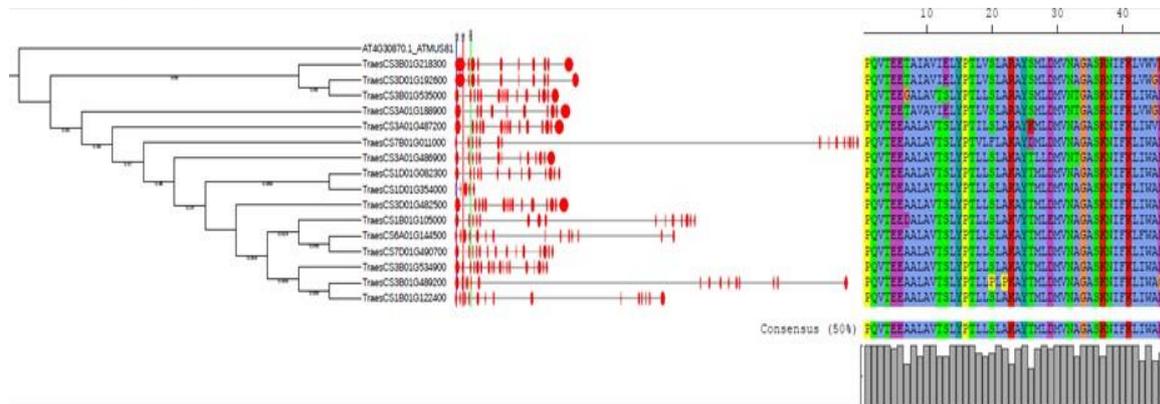


Figure 65 Phylogénie des copies TaSMUS81

Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences des résidus conservés de la protéine MUS81

Nous avons aussi représenté en rouge la structure génomique de ces protéines (Figure 65). L'analyse de l'arbre, confirme que les quatre copies du Tableau 27 sont bien les plus proches de celle d'At. Les protéines conservent la même structure et donc probablement leur fonctionnalité. Nous avons utilisé les données d'annotation de ces gènes pour identifier les différentes isoformes éventuelles. Elles sont répertoriées dans le Tableau 27 .

**Tableau 27:** Correspondance des noms MUS81 utilisés

Tableau de correspondance des isoformes des protéines Ta-MUS81 du groupe d'homéologie 3 et du chromosome 7D.

TraesCS3A01G487200,1	Ta-MUS81-3A-CS-1-1
TraesCS3A01G487200,2	Ta-MUS81-3A-CS-1-2
TraesCS3A01G487200,3	Ta-MUS81-3A-CS-1-3
TraesCS3B01G535000,1	Ta-MUS81-3B-CS-1-1
TraesCS3B01G535000,2	Ta-MUS81-3B-CS-1-2
TraesCS3D01G482500,1	Ta-MUS81-3D-CS-1-1
TraesCS3D01G482500,2	Ta-MUS81-3D-CS-1-2
TraesCS3D01G482500,3	Ta-MUS81-3D-CS-1-3
TraesCS7D01G490700,1	Ta-MUS81-7D-CS

Il existe trois isoformes pour les copies 3A et 3D, deux pour la copie 3B et seulement une pour la copie 7D. Pour affiner notre analyse de ces protéines, nous sommes allés voir leur niveau d'expression en utilisant des données de RNASeq disponibles au laboratoire (Lloyd et al., 2014). Seulement six sont exprimés de manière tissu-spécifique, à des taux très faibles et en majorité en méiocytes (Figure 66). Aucune expression n'est détectée dans les feuilles pour ces isoformes.

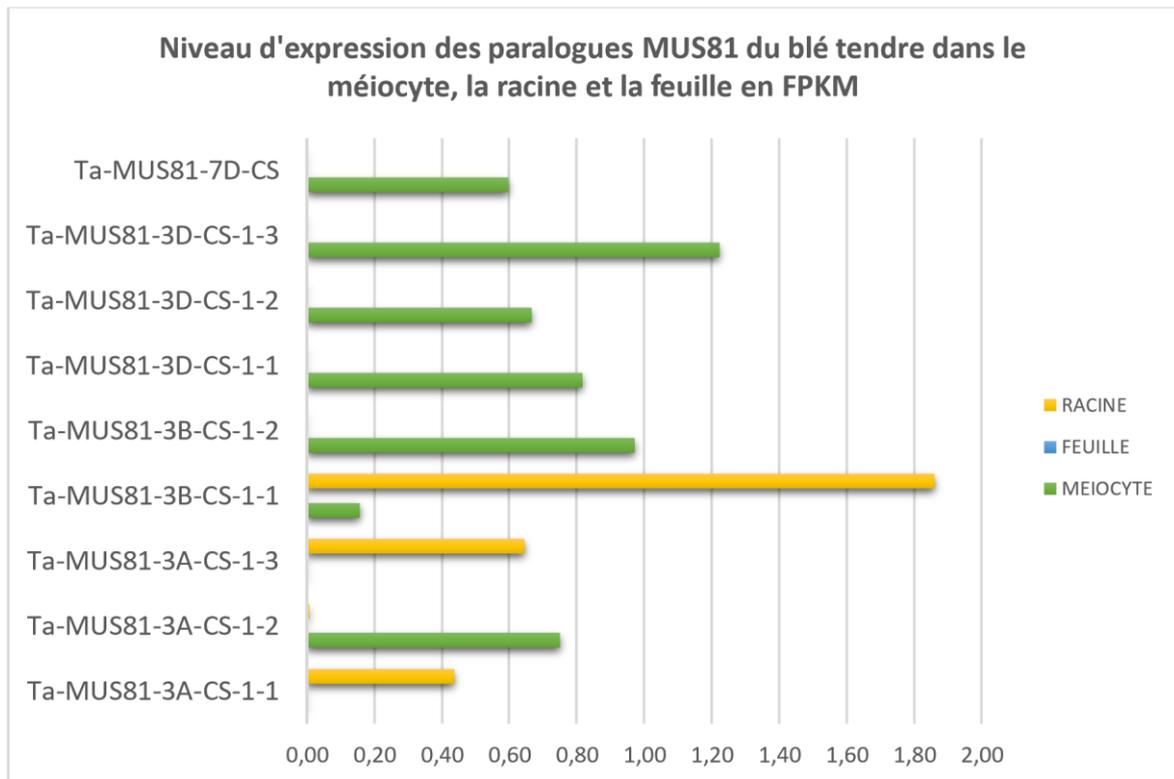


Figure 66 Isoformes TaMUS81 exprimées

Graphique représentant les isoformes principales exprimées chez le blé tendre

Les isoformes Ta-MUS81-3A-CS-1-1, Ta-MUS81-3A-CS-1-3 et Ta-MUS81-3B-CS-1-1 sont exprimées dans les racines. Les six autres copies et isoformes de Ta-MUS81 sont exprimées dans les méiocytes.

Nous avons ensuite voulu savoir si ces variants protéiques existaient avant la polyploïdisation et si de nombreux paralogues étaient retrouvés chez les autres espèces de Poacées.

**Tableau 28:** Séquences Mus81 chez les poacées

Différentes copies du gène MUS81 retrouvées chez des espèces de Poacées (Orge, *Brachypodium*, sorgho, riz, blé dur (*T. turgidum* et *T. dicoccoides*), blé tendre, *T. monococcum*, maïs et *Ae. tauschii*). At est pris comme séquence de référence.

Nombre de paralogues	Espèce	CODE	Protéine cible	HIT gène	Score	E-Value	%ID
2	<b>Hordeum vulgare</b>	HV-MUS81-Morex-1	HORVU3Hr1G039160.27	HORVU3Hr1G039160	485	1,60E-57	64,7
	<b>Hordeum vulgare</b>	HV-MUS81-Morex-2	HORVU3Hr1G106210.22	HORVU3Hr1G106210	465	8,70E-55	62,9
3	<b>Brachypodium distachyon</b>	Bd-MUS81-Bd21 strain-1	KQK11524	BRADI_2g60640v3	480	2,10E-57	66,7
	<b>Brachypodium distachyon</b>	Bd-MUS81-Bd21 strain-2	KQK03894	BRADI_2g10500v3	435	3,10E-51	64,3
	<b>Brachypodium distachyon</b>	Bd-MUS81-Bd21 strain-3	KQK11542	BRADI_2g60755v3	170	7,30E-15	49,3
2	<b>Sorghum bicolor</b>	Sb-MUS81-3H-Bicolor-1	KXG34104	SORBI_3003G423700	323	6,30E-36	63,2
	<b>Sorghum bicolor</b>	Sb-MUS81-3H-Bicolor-2	KXG34105	SORBI_3003G423800	299	1,20E-32	61,5
1	<b>Oryza sativa Japonica Group</b>	Os-MUS81-Nipponbare	Os01t0948100-01	OsMUS81	469	4,10E-56	66,2
2	<b>Arabidopsis thaliana</b>	At-MUS81-Columbia-1	AT4G30870.1	MUS81	3434	0	100
	<b>Arabidopsis thaliana</b>	At-MUS81-Columbia-2	AT5G39770.1	AT5G39770	667	4,20E-83	71,6
5	<b>Triticum turgidum</b>	Tt-MUS81-3A-Durum-1	TRITD3Av1G266320.5	TRITD3Av1G266320	482	4,40E-57	59
	<b>Triticum turgidum</b>	Tt-MUS81-3B-Durum-1	TRITD3Bv1G260800.2	TRITD3Bv1G260800	468	3,70E-55	61,7
	<b>Triticum turgidum</b>	Tt-MUS81-3A-Durum-2	TRITD3Av1G248110.2	TRITD3Av1G248110	468	3,70E-55	63,6
	<b>Triticum turgidum</b>	Tt-MUS81-3A-Durum-3	TRITD3Av1G094460.1	TRITD3Av1G094460	463	1,80E-54	64,7
	<b>Triticum turgidum</b>	Tt-MUS81-3B-Durum-2	TRITD3Bv1G094600.4	TRITD3Bv1G094600	461	3,40E-54	64
16	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3A-CS-1	TraesCS3A02G487200.1	TraesCS3A02G487200	481	4,00E-57	63,2
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3D-CS-1	TraesCS3D02G482500.2	TraesCS3D02G482500	473	5,00E-56	62,4
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-7D-CS	TraesCS7D02G490700.1	TraesCS7D02G490700	470	1,30E-55	64,4
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3B-CS-1	TraesCS3B02G535000.1	TraesCS3B02G535000	469	1,80E-55	61,7
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-1D-CS-1	TraesCS1D02G082300.1	TraesCS1D02G082300	465	6,20E-55	64,4
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3A-CS-2	TraesCS3A02G188900.2	TraesCS3A02G188900	463	1,20E-54	64,7
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3D-CS-2	TraesCS3D02G192600.1	TraesCS3D02G192600	462	1,60E-54	64,7
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3B-CS-2	TraesCS3B02G218300.2	TraesCS3B02G218300	461	2,20E-54	64

	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-1B-CS-1	TraesCS1B02G122400.1	TraesCS1B02G122400	457	7,80E-54	63,6
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3B-CS-3	TraesCS3B02G489200.1	TraesCS3B02G489200	440	1,70E-51	64,1
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3A-CS-3	TraesCS3A02G486900.1	TraesCS3A02G486900	419	1,30E-48	64,4
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-1B-CS-2	TraesCS1B02G105000.1	TraesCS1B02G105000	343	3,50E-38	64,6
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-6A-CS	TraesCS6A02G144500.1	TraesCS6A02G144500	340	9,00E-38	63,5
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-7B-CS	TraesCS7B02G011000.1	TraesCS7B02G011000	332	1,10E-36	67,8
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-3B-CS-3	TraesCS3B02G534900.1	TraesCS3B02G534900	264	2,40E-27	65,8
	<b>Triticum aestivum</b>	Ta-MUS81-1D-CS-2	TraesCS1D02G354000.1	TraesCS1D02G354000	253	7,90E-26	63,2
7	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-3A-ZAVITAN-1	TRIDC3AG068580.7	TRIDC3AG068580	481	6,50E-57	63,2
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-1B-ZAVITAN	TRIDC1BG017830.1	TRIDC1BG017830	473	8,10E-56	65,2
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-3B-ZAVITAN-1	TRIDC3BG077580.16	TRIDC3BG077580	469	2,90E-55	61,7
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-3A-ZAVITAN-2	TRIDC3AG026250.11	TRIDC3AG026250	463	1,90E-54	64,7
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-3B-ZAVITAN-2	TRIDC3BG030000.1	TRIDC3BG030000	461	3,60E-54	64,0
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-6A-ZAVITAN	TRIDC6AG019810.1	TRIDC6AG019810	388	3,80E-44	65,7
	<b>Triticum dicoccoides</b>	Td-MUS81-7B-ZAVITAN	TRIDC7BG001440.1	TRIDC7BG001440	374	3,20E-42	63,2
5	<b>Triticum urartu</b>	Tu-MUS81-G1812-1	TRIUR3_27577-P1	TRIUR3_27577	482	5,90E-58	59,0
	<b>Triticum urartu</b>	Tu-MUS81-G1812-2	TRIUR3_30004-P1	TRIUR3_30004	477	2,90E-57	64,4
	<b>Triticum urartu</b>	Tu-MUS81-G1812-3	TRIUR3_18043-P1	TRIUR3_18043	475	5,40E-57	65,9
	<b>Triticum urartu</b>	Tu-MUS81-G1812-4	TRIUR3_28752-P1	TRIUR3_28752	351	5,60E-40	65,6
	<b>Triticum urartu</b>	Tu-MUS81-G1812-5	TRIUR3_15115-P1	TRIUR3_15115	251	3,00E-26	57,1
3	<b>Zea mays</b>	Zm-MUS81-Japonica-1	Zm00001d042130_P002	Zm00001d042130	321	3,90E-35	63,2
	<b>Zea mays</b>	Zm-MUS81-Japonica-2	Zm00001d042130_P001	Zm00001d042130	321	3,90E-35	63,2
	<b>Zea mays</b>	Zm-MUS81-Japonica-3	Zm00001d042128_P002	Zm00001d042128	302	1,60E-32	62,6
5	<b>Aegilops tauschii</b>	AET-MUS81-3D-AL8/78-1	AET3Gv21109600.18	AET3Gv21109600	473	7,10E-56	62,4
	<b>Aegilops tauschii</b>	AET-MUS81-7D-AL8/78	AET7Gv21232700.10	AET7Gv21232700	470	1,80E-55	64,4
	<b>Aegilops tauschii</b>	AET-MUS81-1D-AL8/78-1	AET1Gv20251000.1	AET1Gv20251000	469	2,50E-55	63,6
	<b>Aegilops tauschii</b>	AET-MUS81-1D-AL8/78-2	AET1Gv20199400.22	AET1Gv20199400	467	4,70E-55	64,4
	<b>Aegilops tauschii</b>	AET-MUS81-3D-AL8/78-2	AET3Gv20427000.6	AET3Gv20427000	462	2,30E-54	64,7

Trois de ces duplications sont présentes chez les progéniteurs diploïdes du blé tendre. Par exemple, cinq copies sont présentes chez les espèces *Ae. tauschii* (DD) et *T. monococcum ssp. urartu* (AA). De façon intéressante, cinq copies sont également retrouvées chez l'espèce tétraploïde *T. turgidum* mais trois copies sont sur les chromosomes du génome A et deux sur ceux du génome B. De façon similaire, chez l'espèce tétraploïde *T. dicoccoides* (cv. Zavitan), sept copies sont présentes, trois localisées sur le génome A et quatre sur le génome B. Il est donc très probable que certaines de ces duplications soient apparues avec la récente duplication chez *Ae. tauschii*. Cependant, elles semblent évoluer différemment selon les espèces avec des pertes (copie 6A chez *T. turgidum*) ou des duplications locales (3A-4869 et 3A-4872 chez *T. aestivum*). En revanche, les cinq copies présentes chez *Ae. tauschii* sont retrouvées chez *T. aestivum* ce qui confirme l'évènement de polyploïdisation récent avec cette espèce.

Concernant l'orge et le sorgho, nous avons deux copies mais pour ces deux espèces, l'une des deux est annotée comme étant un pseudogène dans les bases de données. Le maïs et *Brachypodium distachyon* qui est l'organisme modèle en génomique des graminées ont quant à eux trois copies de MUS81 alors que le riz n'en possède qu'une. MUS81 est une protéine essentielle en mitose et en méiose, ce qui justifie peut-être le fait qu'elle ait subi une forte pression de sélection allant jusqu'à conserver des paralogues fonctionnels.

#### 4.2.2.2.2 Distribution sur le génome des gènes méiotiques

Les gènes de la cascade méiotique sont distribués sur quasiment tous les groupes d'homéologie. Ils ne sont pas non plus regroupés en clusters fonctionnels sur un même chromosome. Ils semblent donc agir indépendamment les uns des autres bien qu'ils soient tous impliqués dans un même processus qui ne dure qu'un court laps de temps. Ces gènes sont peut-être regroupés dans le noyau en domaines fonctionnels.

#### 4.2.2.2.3 Variations de taille des gènes méiotiques

La taille des ADN génomiques varie de 26611 pb pour le gène Ta-ATM (+/-2219 pb) à 1442 pb pour le gène Ta-GH2AX (+/-1657 pb) soit une différence de 18X entre le plus grand et le plus petit gène. La protéine Ta-GH2AX est plus stable avec une taille moyenne de 143 aa (+/- 12 aa). La variation de taille génomique de Ta-GH2AX est dû au fait que la protéine Ta-GH2AX-5A est 6 fois plus grande que les autres. Il y a en général peu de variabilité pour les différentes copies homéologues d'un même gène. Les différences sont souvent localisées dans les introns au sein desquels il peut y avoir des insertions d'éléments transposables. En revanche, les CDS conservent une taille en générale constante entre les trois copies. Une différence importante a été notée pour la copie D du gène MSH4 qui est bien plus petite que les copies A et B (respectivement ~7000 contre ~12000 ; Eric Jenczewski, communication personnelle ; (Gonzalo et al., 2019)). Une analyse plus détaillée de cette copie a permis de constater qu'elle était devenue un pseudogène car il lui manque les domaines essentiels à sa fonction.

Il n'y a pas de différence notable pour les gènes de chacune des différentes étapes de la méiose et de la recombinaison. Au niveau des protéines impliquées dans l'initiation, on note que la copie 5B de la protéine SPO11-1 est plus grande que les copies A et D, probablement à cause d'indels au niveau des introns (Da Ines et al., 2020b). La protéine PRD1 présente elle aussi du polymorphisme au niveau de sa taille notamment sur le chromosome 2B.

Au niveau de la maturation des CDB, il y a une très grande variation de taille entre les différents gènes. Ainsi, les gènes RAD50 et ATM sont très grands. Ils ont une taille supérieure à 20000 paires de base. A côté de cela le gène ATR et le variant d'histone H2AX ont une taille de l'ordre de 12000 paires de bases pour le premier et 800 pour le second.

Concernant les hélicases, seul le groupe d'homéologues BLAP75/RMI1 a des tailles variables allant de 17000 pb en passant par 10000 pb et 5000 pb. Les protéines agissant dans la voie de FANCM ont des tailles qui sont plutôt bien homogènes entre les homéologues, seule la protéine FANCD2 qui est dupliquée sur les chromosomes 2 et 3 pour la copie B a des tailles allant de 1000 à 15000 pb. Les autres paralogues ont des tailles avoisinant les 7000 pb.

En conclusion, nous pouvons dire que les analyses de taille des gènes de la cascade méiotique ne sont pas un facteur nous permettant de statuer quant au devenir de ces protéines et sur leur fonctionnalité. Elles peuvent nous aiguiller sur des différences flagrantes entre homéologues comme pour MSH4. Nous avons d'ailleurs fourni les séquences de blé pour les travaux de Gonzalo et al., 2019 pour la phylogénie de MSH4. Concernant les gènes qui sont très grands, cela est souvent dû à des insertions d'éléments transposables qui sont très nombreux chez le blé tendre puisqu'ils représentent plus de 85% de la séquence génomique (IWGSC et al., 2018b).

#### 4.2.2.2.4 Conservation de la structure

Aucune différence notable n'a été constatée concernant des variations de la structure en introns et exons. Les nombres d'exons restent stables par rapport à At, les différences pouvant parfois être dues à des problèmes d'annotation qui restent à parfaire dans certains cas (**Tableau 29, Tableau 30, Tableau 31, Tableau 32**).

**Tableau 29:** Nombre moyen d'exons pour les gènes d'initiation

Nombre moyen d'exons par gène de l'initiation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : *Arabidopsis*, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE D'EXONS MOYEN							
INITIATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ASY1	21,0	22,0	20,7	15,0	21,0	19,0	20,1
ASY2	10,0	15,0	19,3	20,0	18,0	5,0	16,3
ASY3	11,0	10,0	10,3	10,0	10,0	9,0	10,1
ASY4	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	7,0	7,9
DYAD	10,0	8,0	11,0	8,0	10,0	12,0	9,9
MTOPIVIB	11,0	12,0	12,0	4,0	12,0	11,0	10,9
PRD1	9,0	9,0	9,7	10,0	9,0	16,0	10,1
SDS	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
SMC3	15,0	28,0	30,0	29,0	27,0	27,0	27,2
SPO11-1	13,0	15,0	15,0	12,0	15,0	1,0	12,8
SPO11-2	11,0	11,0	10,7	11,0	10,0	1,0	9,7
SYN4	12,0	16,0	16,0	17,5	15,5	16,0	15,8
TOP6A	1,0	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,6
TOP6B	18,0	19,0	19,0	18,5	17,5		18,4
VIP3	2,0	2,0	2,3	2,0	3,0	2,0	2,3
<b>Total général</b>	<b>10,6</b>	<b>12,3</b>	<b>13,0</b>	<b>11,4</b>	<b>12,3</b>	<b>9,6</b>	<b>11,9</b>

**Tableau 30:** Nombre moyen d'exons pour les gènes de maturation

Nombre moyen d'exons par gène de la maturation de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE D'EXONS MOYEN							
MATURATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ATM	76,0	77,0	74,0	50,0	72,0	73,0	69,2
ATR	11,0	16,0	15,0	7,7	14,0	6,0	11,7
BRCA2	19,0	20,0	33,3	22,5	33,5	32,0	28,3
COM1	3,0	2,0	2,3	2,0	2,5	2,0	2,3
DMC1	15,0	15,0	14,7	15,0	14,0	13,0	14,5
G-H2AX	2,0	2,0	1,8	2,0	2,5	2,5	2,1
H2AXB	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,5	2,2
MRE11	18,0	23,0	21,3	21,5	22,0	17,0	20,9
NBS1	10,0	14,0	13,0	12,5	11,5	13,0	12,4
RAD50	17,0	27,0	27,0	26,5	18,5	26,0	24,1
RAD51	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	13,0	9,4
<b>Total général</b>	14,3	18,8	17,9	14,1	18,4	15,8	16,7

**Tableau 31:** Nombre moyen d'exons pour les gènes de résolution

Nombre moyen d'exons par gène de la résolution de la recombinaison. AET : *Ae. tauschii* (DD), At : Arabidopsis, Ta : *T. aestivum* (AABBDD), Td : *T. durum* (AABB), Tt : *T. turgidum* (AABB), Tu : *T. urartu* (AA).

NOMBRE D'EXONS MOYEN PAR GENE							
GENES : RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
EME1A	10,0	12,0	11,0	10,5	11,0	12,0	11,0
EME1B	9,0	12,0	11,0	11,5	11,0	12,0	11,1
FAN1	7,0	15,0	15,0	13,5	13,0	14,0	13,4
FANCD2	29,0	30,0	25,7	29,0	20,5		26,1
FANCM	21,0	23,0	21,3	10,0	20,5	18,0	18,7
HEI10	7,0	10,0	8,7	7,5	7,0	13,0	8,5
MER3	26,0	27,0	26,7	25,5	26,0	6,0	24,2
MHF1	3,5	6,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,1
MHF2	16,0	8,0	5,0	4,0	5,0	5,0	6,3
MLH1	16,0	16,0	15,3	15,3	13,7	14,0	14,9
MLH3	23,0	23,0	23,7	18,0	21,0	3,0	19,6
MSH4	24,0	24,0	20,0	29,0	24,0	12,0	22,6
MSH5	32,0	34,0	34,0	27,0	27,0	33,0	30,9
MUS81	11,2	15,0	14,5	12,8	12,8	12,8	12,8

RECQ4A	24,0	26,0	25,0	25,0	21,0	24,0	<b>24,1</b>
RECQ4B	24,0	26,0	25,0	25,0	17,5	24,0	<b>23,4</b>
SHOC1	9,0	8,0	10,0	8,3	9,8	11,0	<b>9,5</b>
ZYP1A	17,0	19,0	19,7	14,5	15,5	20,0	<b>17,5</b>
ZYP1B	17,0	19,0	18,0	17,5	16,0	20,0	<b>17,7</b>
ZYP4	6,0	5,0	5,3	5,3	5,3	5,0	<b>5,3</b>
Total général	<b>15,2</b>	<b>17,9</b>	<b>16,4</b>	<b>15,0</b>	<b>14,7</b>	<b>13,5</b>	<b>15,5</b>

### 4.2.2.3 Analyse d'expression des gènes de la cascade

Nous avons cherché à analyser les différences d'expression de nos 26 gènes en fonction des tissus, dans les anthères, chez le mutant *spo11-2*, chez un hybride et en cours de polyploïdisation :

- Des données sur cDNA d'anthères stades méiose issus de la population de mutants *spo11-2* à savoir les plantes sœurs issues de deux réplicats biologiques et de quatre réplicats techniques des témoins, les simples mutants ( $a^{-/-}$ ,  $b^{-/-}$  et  $d^{-/-}$ ), les doubles mutants ( $ab^{-/-}$ ,  $ad^{-/-}$  et  $bd^{-/-}$ ), les doubles mutants homozygotes mais hétérozygotes sur la troisième copie ( $ab^{-/-}D^{+/+}$  noté abD,  $ad^{-/-}B^{+/+}$  noté adB et  $bd^{-/-}A^{+/+}$  noté bdA), les triples mutants ( $abd^{-/-}$ ), des cultivars sauvages Chinese Spring et Renan ainsi que l'hybride (duplicats biologiques moyennés) ;
- Des données de grains (moyenne des 100, 250 et 500 degrés jours) pour le diploïde *Ae. tauschii* (DD), le tétraploïde Langdon (AABB) et pour le blé hexaploïde synthétique issu du croisement des deux précédents à la génération 0 (C0 ; AABBDD) et suite à la seconde autofécondation (C2).

#### 4.2.2.3.1 Analyse chez les mutants *spo11-2*

La deuxième étude est axée sur les anthères des mutants de la protéine SPO11-2. Les ADNc ont été dosés et une analyse des fragments a été effectuée. Les RQN (RNA quality number) étaient entre 7 et 10, ce qui nous conforte sur leur bonne qualité. Les ARN ont été analysés avec deux puces FLUIDIGM contenant chacune 24 marqueurs et en quatre réplicats techniques. Les heatmaps ont été construites avec R et la moyenne des deux heatmaps a été obtenue grâce au logiciel <http://www.heatmapper.ca/expression/>.

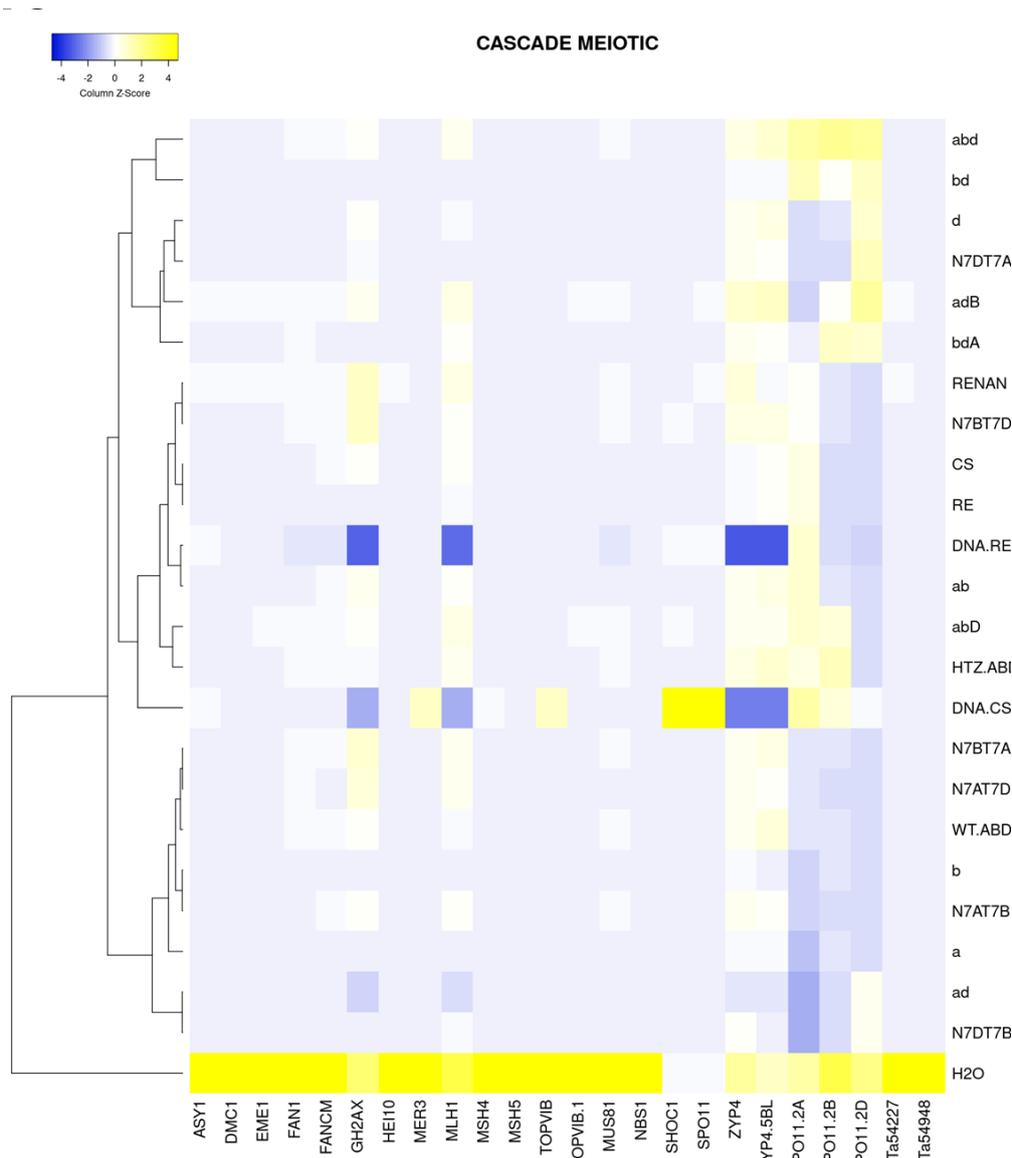


Figure 67 Heatmap Puce Fluidigm 1

Résultats de l'expression des gènes de la cascade de la puce 1 chez les mutants *Ta-spo11-2-Re*

Il n'y a pas de différence d'expression entre les mutants pour les 24 marqueurs de la cascade. On peut juste mettre en exergue une « clusterisation » de l'expression entre les génotypes ne contenant plus la copie D de *Spo11-2*. Les amorces génomes-spécifiques pour chaque copie homéologue *Spo11-2* ne permettent pas de discriminer suffisamment les mutants de chaque copie. Pour résumer, il n'y a pas de régulation ou de correction d'expression sur l'accumulation des transcrits *Spo11-2* chez les mutants (Figure 67 et Figure 68). Une étude est parue dans le journal Nature scientific report (Garrido et al., 2020) sur le choix de gènes de ménage pertinents pour des études de qPCR. Il faudrait les essayer car ceux que nous avons utilisés ne sont peut-être pas assez discriminants en méiose.

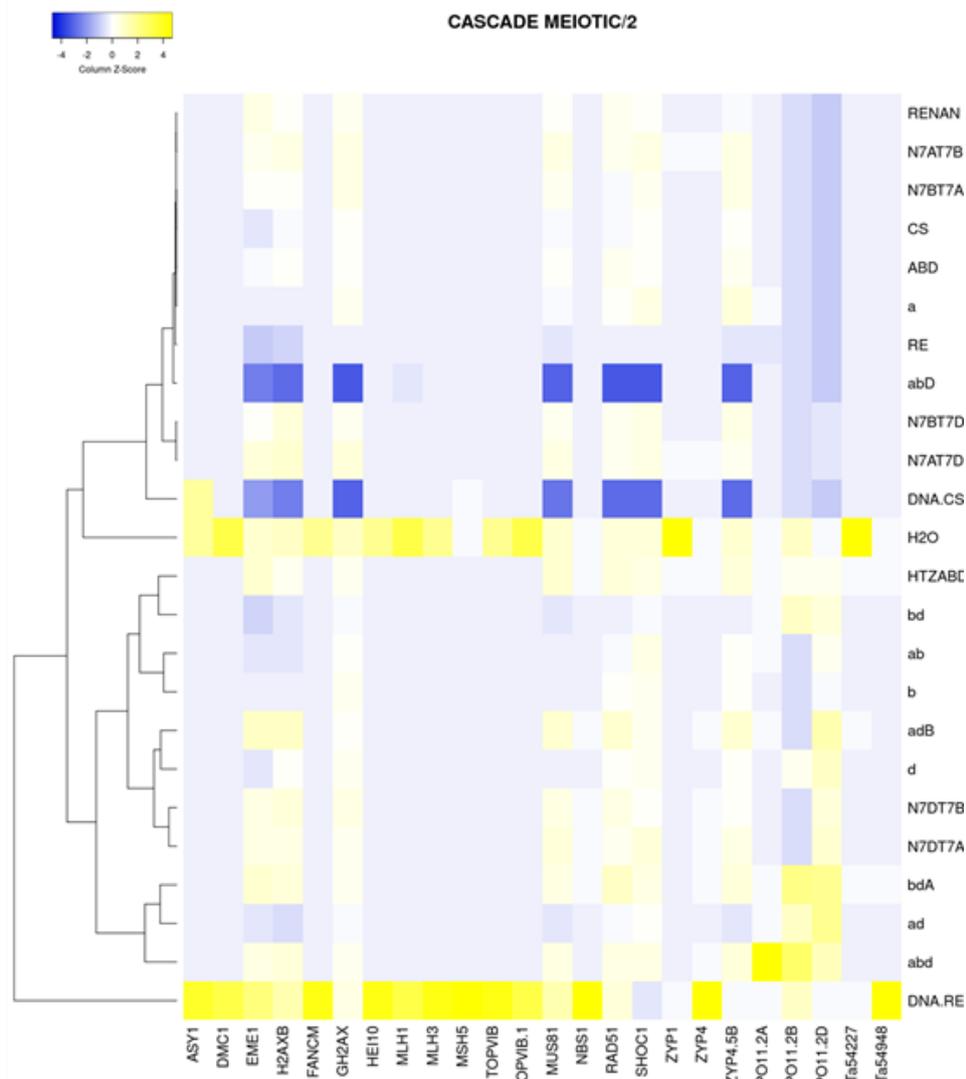


Figure 68 Heatmap Puce Fluidigm 2

Résultats de l'expression des gènes de la cascade de la puce 2 chez les mutants *Ta-spo11-2-Re*

#### 4.2.2.3.2 Analyse chez un blé synthétique

Pour terminer ces études d'expression des gènes de la cascade, nous avons inclus une analyse chez un blé synthétique de première (C0) et de deuxième (C2) générations et les deux parents diploïde et tétraploïde afin de comprendre et soulever des hypothèses sur la mise en place de l'hexaploïdie pour des gènes méiotiques. Nous avons voulu savoir si les niveaux d'expression des gènes de la cascade étaient influencés par leur état en contexte de polyploïdie. Toutefois, cette étude ne reste qu'exploratoire dans la mesure où elle est effectuée sur le grain en cours de maturation et que ce tissu n'est pas forcément le mieux adapté à l'étude des gènes méiotiques (Figure 69, Figure 70 et Figure 71).

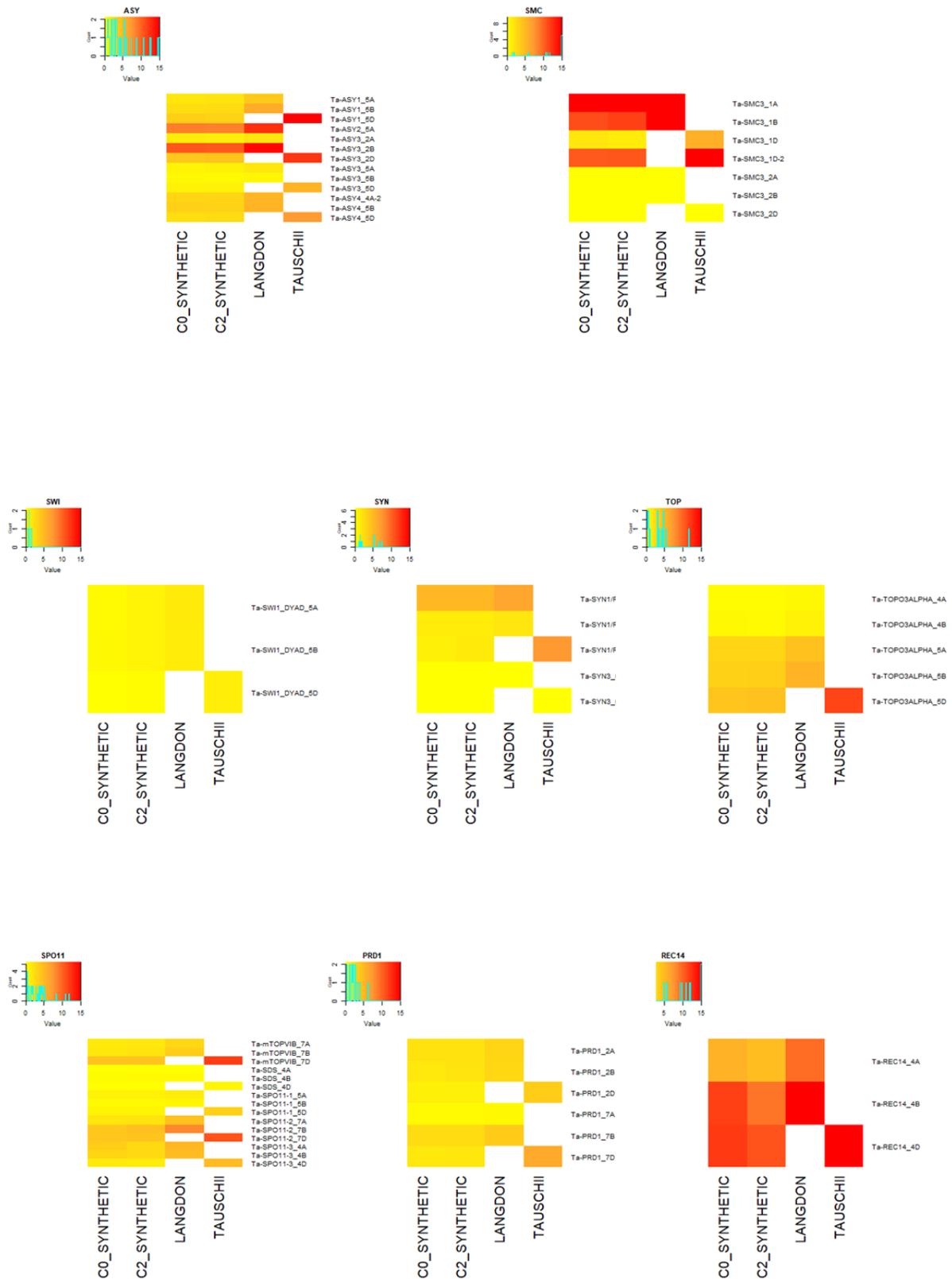


Figure 69 Heatmap-synthétique-initiation

Heatmap représentant l'expression des gènes de l'initiation de la recombinaison dans le grain chez des synthétiques (AABBDD) de première et deuxième génération par rapport aux parents tétraploïdes (AABB) et diploïde (DD) sur des grains.

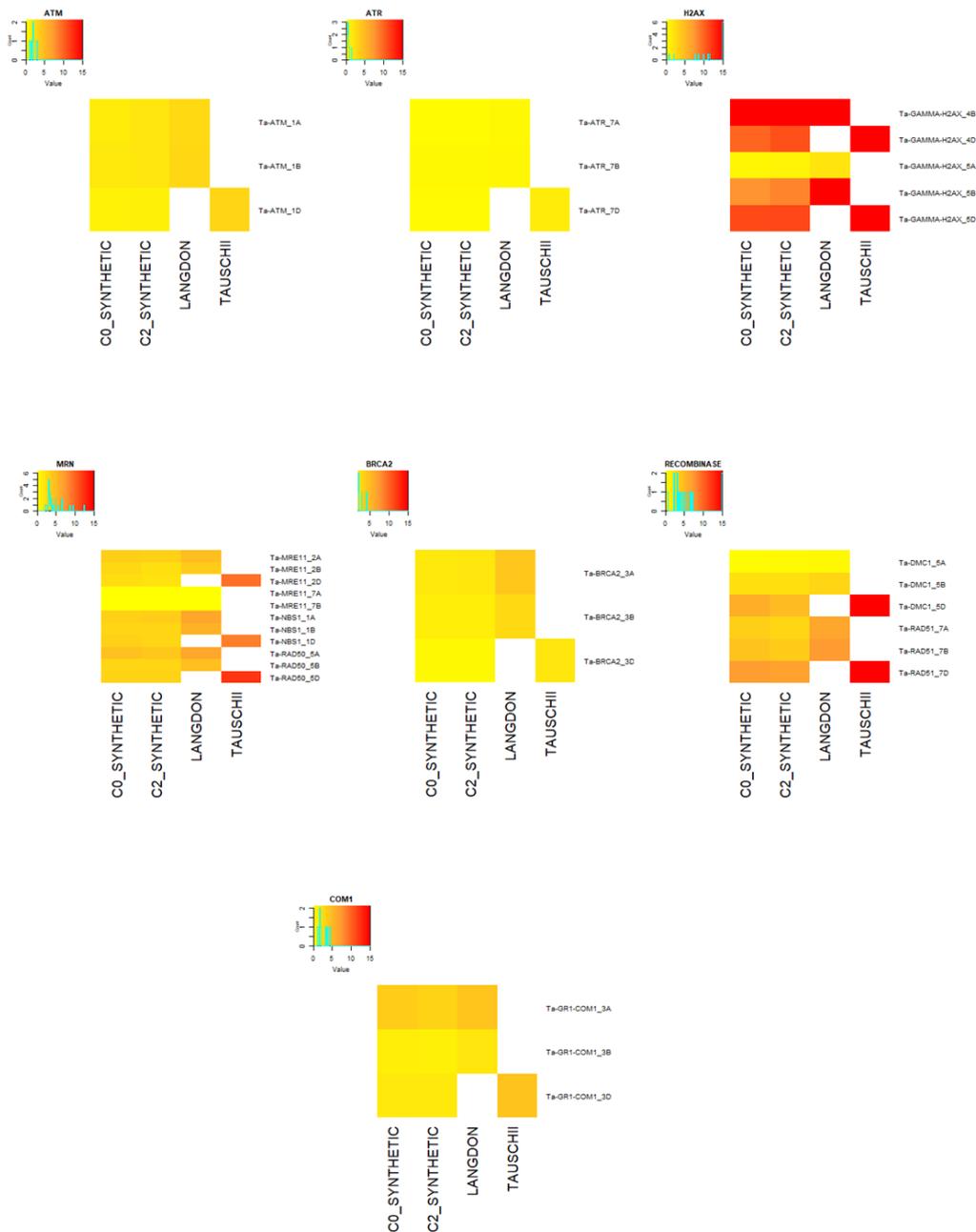


Figure 70 Heatmap-synthétique-maturation

Heatmap représentant l'expression des gènes de la maturation de la recombinaison dans le grain chez des synthétiques (AABBDD) de première et deuxième génération par rapport aux parents tétraploïdes (AABB) et diploïde (DD)

Nous pouvons quand même retenir de cette étude que les gènes méiotiques surexprimés à l'état tétraploïde ont leur abondance conservée en contexte synthétique alors que la réciproque n'est pas valable pour tous les gènes en contexte diploïde. Dans la majorité des cas, les gènes d'*Ae. tauschii* voient leur abondance chuter en contexte synthétique sans toutefois noter de différence majeure entre les générations C0 et C2. De ce fait, l'adaptation des profils d'expression se fait directement lors du gain de ploïdie.

De façon plus précise, concernant les gènes impliqués dans l'initiation des CDB (Figure 69), certains sont surexprimés comme dans les études ci-dessus. C'est le cas par exemple de *SMC3* qui a les trois copies du groupe d'homéologie 1 surexprimées. Cependant, des gènes font exception dans ce groupe. Certains avaient des niveaux d'expression très élevés chez *Ae. tauschii* puis ils sont régulés

négativement chez le synthétique. C'est le cas pour les topoisomérases ou la copie 5D de la protéine Topo alpha, de même pour les copies 1D de REC8 et pour les copies 7D de MTOPVIB et de SPO11-2.

Pour les groupes des protéines impliquées dans la maturation des CDB (Figure 70), nous avons les mêmes remarques. En effet les protéines en contexte diploïde sont plus exprimées et une fois en contexte polyploïde, elles voient leur expression régulée négativement. Ceci est clairement le cas pour les protéines MRN et les recombinaisons.

Pour ce qui est de la résolution de la recombinaison (Figure 71), les profils sont plus ou moins contrastés. Il n'y a pas de différence selon le degré de ploïdie pour les protéines ZYP et les hélicases. Cependant pour les protéines MLH et MSH, cette régulation négative est notable, particulièrement pour les copies D, une fois qu'elles sont en contexte hexaploïde.

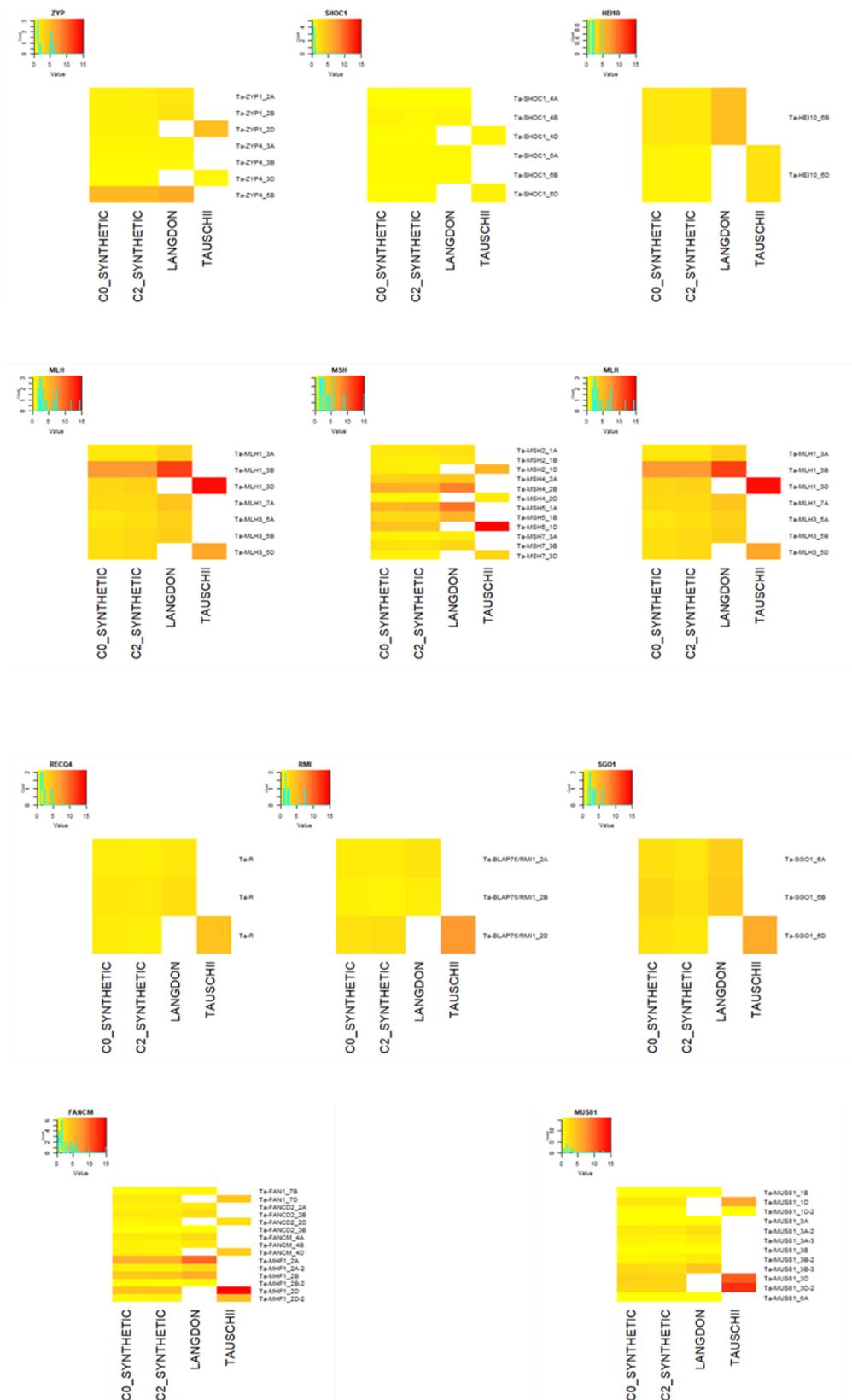


Figure 71 Heatmap-synthétique-résolution

Heatmap représentant l'expression des gènes de la résolution de la recombinaison dans le grain chez des synthétiques (AABBDD) de première et deuxième génération par rapport aux parents tétraploïdes (AABB) et diploïde (DD).

#### **4.2.2.4 Conclusions sur l'analyse d'expression**

En conclusion, nous pouvons dire que l'expression des gènes méiotiques est très variable selon les étapes de la méiose, les copies, les stades et les organes dans lesquels l'expression est mesurée. Cela confirme les résultats qui suggèrent que bien que les gènes méiotiques retournent plus souvent que la moyenne de tous les gènes à un état diploïde après un événement de polyploïdisation (Lloyd et al., 2014), ce retour est progressif, lent et passif, sans qu'un génome donné soit privilégié par rapport aux autres.

La mutation du gène *Spo11-2* n'affecte pas l'expression des autres gènes méiotiques bien qu'il intervienne très tôt dans le processus. Il n'y a donc vraisemblablement pas de feedback des gènes méiotiques les uns par rapport aux autres dans ce processus pourtant finement régulé. La régulation doit donc intervenir à un autre niveau. Pourtant, il semble qu'il y ait des mécanismes de dominance qui soient mis en place dans la mesure où des différences sont observées entre cultivars et que ces différences se retrouvent chez l'hybride.

Ces différences entre parents et descendants sont retrouvées chez un blé synthétique où certains gènes pourtant fortement exprimés chez le diploïde sont éteints chez le néo-hexaploïde. Ces régulations entre le contexte diploïde et hexaploïde doivent être régies par des mécanismes épigénétiques qui permettent de freiner les niveaux d'expression de la copie D. En revanche, il ne semble pas y avoir de différence lorsque l'on passe du contexte tétraploïde au contexte hexaploïde. Ceci peut être dû au fait que les régulations ont déjà été orchestrées précocement, à la suite de l'hybridation des génomes A et B. Afin de tester cette hypothèse il faudrait faire la même étude en incluant les diploïdes *T. monococcum ssp. urartu* et *Ae. Speltoïdes*.

### **4.3 Comportement méiotique d'espèces apparentées**

#### **4.3.1 Analyse évolutive de trois protéines du complexe de CDB**

Nous avons identifié les orthologues des protéines du complexe SPO11 à partir de la séquence d'At (At ; SPO11-1 (AT1G63990), SPO11-2 (AT3G13170) et MTOVIB (AT1G60460)) dans les bases de données des Triticinées et chez l'orge, le sorgho, le maïs, le riz et *Brachypodium distachyon* (Tableau 32) afin d'avoir une vue d'ensemble du complexe chez les poacées. Nous avons considéré que les protéines étaient orthologues si elles avaient le plus haut score, la plus grande longueur de couverture et le plus haut pourcentage d'identité. Les progéniteurs du blé tendre font partie des Triticinées composées des espèces diploïdes porteuses des génomes AA (*T. urartu* : Tu-A-G1812) et DD (*Ae. tauschii* : AET-DD-AL8/78), des espèces tétraploïdes (*T. turgidum* Tt- AABB-Durum et *T. durum* Td- AABB-ZAVITAN) et des variétés hexaploïdes (Cs-AABBDD). Les différents gènes orthologues ont été renommés en fonction des différents parents dans les figures suivantes. Cette analyse encore une fois descriptive ne permet pas de conclure sur ces données *in silico*. En effet elles sont parcellaires (pas de copie A pour la protéine MTOVIB chez ZAVITAN) et les prédictions des CDS ne sont pas très justes car on retrouve des tailles exoniques qui ne sont pas conformes au blé ou At.

**Tableau 32:** Résultats de BLASTP du COMPLEXE SPO11 Poacées

Résultats des BLASTP à partir de la séquence d'Arabidopsis donnant les orthologues des gènes du complexe SPO11 chez 13 céréales

TRITICUM AESTIVUM										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	TraesCS7D02G403500	Ta-MTOPVIB-7D-CS Ta-	208	4,1E-20	45,5	481aa	5304	1446	12 exons
		TraesCS7A02G410300	MTOPVIB-1-7A-CS	207	5,7E-20	45.5	481aa	6128	1446	12 exons
		TraesCS7B02G309700	Ta-MTOPVIB-7B-CS	207	5,7E-20	45,5	480aa	5616	1443	12 exons
SPO11-2	AT3G13170	TraesCS7D02G296000	TaSPO11-2-7D-CS	1130	3,5E-150	64,8	386aa	3076	1307	11 exons
		TraesCS7B02G201200	TaSPO11-2-7B-CS	1116	3,2E-148	64,5	386aa	3353	1478	11 exons
		TraesCS7A02G300300	TaSPO11-2-7A-CS	1114	6,2E-148	66,7	290aa	3085	1353	10 exons
SPO11-1	AT1G63990	TraesCS5B02G396300	TaSPO11-1-5D-CS	919	2,4E-120	65,5	386aa	6743	3866	15 exons
		TraesCS5A02G391400	TaSPO11-1-5A-CS	914	1,2E-119	65,2	387aa	4123	1283	15 exons
		TraesCS5D02G401100	TaSPO11-1-5B-CS	914	1,2E-119	65,2	387aa	4097	1291	15 exons
TRITICUM DICOCCOIDES										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	No copy A	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		TRIDC7BG049650 TRIDC7BG049650.7	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	207	9,3E-20	45,5	185aa	3929	3523	4 exons
SPO11-2	AT3G13170	TRIDC7BG033100 TRIDC7BG033100.9	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	605	3,6E-76	67,7	173aa	1976	1429	9 exons

		TRIDC7AG041910									
		TRIDC7AG041910.9	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	342	3,3E-39	62.9	162aa	2109	1721	9 exons	
SPO11-1	AT1G63990	TRIDC5BG061110									
		TRIDC5BG061110.4	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	759	1,10E-97	63,4	209aa	3773	1662	12 exons	
		TRIDC5AG057080	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	757	2,1E-97	62,9	159aa	3845	1688	10 exons	
TRIDC5AG057080.5											

#### TRITICUM TURGIDUM

Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOVPVIB	AT1G60460	TRITD7Bv1G170120								
		TRITD7Bv1G170120.2	Tt-MTOVPVIB-7B-Durum	207	8,7E-20	45,5	480aa	5616	1443	12 exons
		TRITD7Av1G221100								
		TRITD7Av1G221100.3	Tt-MTOVPVIB-7A-Durum	207	8,7E-20	45,5	481aa	6124	1446	12 exons
SPO11-2	AT3G13170	TRITD7Bv1G113540								
		TRITD7Bv1G113540.3	Tt-SPO11-2-7B-Durum	1116	4,9E-148	64,5	386aa	3031	1161	11 exons
		TRITD7Av1G152830								
		TRITD7Av1G152830.3	Tt-SPO11-2-7A-Durum	643	1,5E-81	72,5	290aa	2420	873	9 exons
SPO11-1	AT1G63990	TRITD5Bv1G200390								
		TRITD5Bv1G200390.2	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	919	3,7E-120	65,5	386aa	3993	1161	15 exons,
		TRITD5Av1G204510								
		TRITD5Av1G204510.4	Tt-SPO11-1-5A-Durum	914	1,9E-119	65,2	387aa	4002	1164	15 exons

#### TRITICUM URARTU

Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOVPVIB	AT1G60460	TRIUR3_02543 TRIUR3_02543-P1	Tu-MTOVPVIB-7A-G1812	177	1,7E-16	50,7	489aa	6004	1470	11 exons
SPO11-2	AT3G13170	TRIUR3_24097 TRIUR3_24097-P1	Tu-SPO11-2-7A-G1812	161	1,2E-14	54.9	441aa	1348	1326	1 exon
SPO11-1	AT1G63990	TRIUR3_12346 TRIUR3_12346-P1	Tu-SPO11-1-5A-G1812	418	1E-50	42.7	243aa	4950	732	10 exons

AEGILOPS TAUSCHII Aet_v4.0										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	AET7Gv20996300 AET7Gv20996300.11	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	208	5,9E-20	45,5	310aa	4046	3784	6 exons
SPO11-2	AT3G13170	AET7Gv20751300 AET7Gv20751300.7	AET-SPO11-2-7D-AL8/78	1130	4,9E-150	64,8	186aa	3028	1559	11 exons
SPO11-1	AT1G63990	AET5Gv20909200 AET5Gv20909200.3	AET-SPO11-1-7D-AL8/78	914	1,7E-119	65,2	218aa	3830	1782	13 exons
HORDEUM VULGARE										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	HORVU7Hr1G095760 HORVU7Hr1G095760.2	Hv-MTOPVIB- Morex	203	2,9E-19	44,3	350aa	1985	1453	4 exons
SPO11-2	AT3G13170	HORVU7Hr1G071060 HORVU7Hr1G071060.15	Hv-SPO11-2- Morex	1133	1,8E-150	66,3	95aa	3698	2260	12 exons
SPO11-1	AT1G63990	HORVU5Hr1G095530 HORVU5Hr1G095530.6	Hv-SPO11-1- Morex	927	2,5E-121	66,6	703aa	3964	5919	15 exons
ZEA MAYS										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	Zm00001d014728 Zm00001d014728_P003	Zm-MTOPVIB-Japonica	190	1,4E-17	54,5	138aa	6248	5357	6 exons
SPO11-2	AT3G13170	Topoisomerase-like enzyme2 Zm00001d049550_P001	Zm-SPO11-2-Japonica	439	5,1E-53	69,5	358aa	2900	1397	10 exons
SPO11-1	AT1G63990	Topoisomerase-like enzyme1 Zm00001d013262_P002	Zm-SPO11-1-Japonica	440	4,4E-53	65,4	1371aa	4421	4738	14 exons
SOGHUM Sorghum bicolor subsp. Bicolor										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I

MTOPVIB	AT1G60460	SORBI_3010G257500 KXG20822	Sb-MTOPVIB-Bicolor	197	4,5E-19	50	478aa	7082	1781	12 exons
SPO11-2	AT3G13170	SORBI_3007G046000 KXG24464	Sb-SPO11-2-Bicolor	1083	4,6E-144	70,2	382aa	3351	1547	11 exons
SPO11-1	AT1G63990	SORBI_3001G087000 EER93438	Sb-SPO11-1-Bicolor	897	9,7E-118	63,2	258aa	4649	1821	15 exons
Oryza sativa Japonica Group										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	OsMTOPVIB Os06t0708200-01	Os-MTOPVIB-Nipponbare	111	2,80E-07	38,5	228aa	6532	2570	9 exons
SPO11-2	AT3G13170	OsTOP6A2 Os08t0156900-01	Os-SPO11-2-Nipponbare	1074	6E-143	67,5	385aa	3272	1667	10 exons,
SPO11-1	AT1G63990	OsTOP6A1 Os03t0752200-01	Os-SPO11-1-Nipponbare	926	5,8E-122	65,4	381aa	3983	1354	15 exons,
ORYZA SATIVA NAVIRA Oryza_nivara_v1.0										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	ONIVA06G29500 ONIVA06G29500.4	Os-MTOPVIB-Spontanea	176	4,00E-16	48,6	491aa	6738	1998	11 exons
SPO11-2	AT3G13170	ONIVA08G03350 ONIVA08G03350.1	Os-SPO11-2-Spontanea	1010	8,8E-134	67,3	359aa	2756	1082	10 exons
SPO11-1	AT1G63990	ONIVA03G14330 ONIVA03G14330.1	Os-SPO11-1-Spontanea	417	2,4E-50	41,8	792aa	4391	2379	2 exons

ORYZA SATIVA INDICA GROUP ASM465v1										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	BGIOSGA023580 BGIOSGA023580-PA	Os-MTOPVIB-93-11	172	1,00E-15	50	461aa	6205	1386	11 exons
SPO11-2	AT3G13170	BGIOSGA027629 BGIOSGA027629-PA	Os-SPO11-2-93-11	1043	1,5E-138	68,7	503aa	8570	1512	10 exons
SPO11-1	AT1G63990	SPO11-1 BGIOSGA013572-PA	Os-SPO11-1-93-11	926	6,4E-122	65.4	381aa	3771	1146	15 exons,
BRACHYPODIUM DISTACHYON Brachypodium_distachyon_v3.0										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	BRADI_1g34717v3 PNT75562	Bd-MTOPVIB-Bd21 strain	187	1,30E-17	51,4	371aa	5679	2617	12 exons
SPO11-2	AT3G13170	BRADI_3g16580v3 KQJ95333	Bd-SPO11-2-Bd21 strain	1129	1,8E-150	64.8	382aa	2983	1426	11 exons
SPO11-1	AT1G63990	BRADI_1g08390v3 PNT74127	Bd-SPO11-1-Bd21 strain	450	6E-55	62,6	364aa	4208	1095	14 exons
Arabidopsis thaliana TAIR10										
Protéine	ARABIDO	REF	Nomenclature	SCORE	E-VALUE	ID	Prot.	Gén.	CDS	E/I
MTOPVIB	AT1G60460	AT1G60460 AT1G60460.1	At-MTOPVIB- Columbia	2594	0	100	473aa	3582	1758	12 exons
SPO11-2	AT3G13170	SPO11-2 AT1G63990.1	At-SPO11-2- Columbia	1890	0	100	383aa	2586	1667	11 exons
SPO11-1	AT1G63990	SPO11-1 AT3G13170.1	At-SPO11-1- Columbia	1739	0	100	265aa	2858	1414	15 exons

### 4.3.1.1 Analyse de MTOPVIB

**Tableau 33:** Résultats de BLASTP de la protéine MTOPVIB des progéniteurs

Résumé des résultats de BLAST de la protéine MTOPVIB concernant les espèces apparentées au blé

BLASTP result Query AtColumbia -		% IDENTITY	% SIMILARITY	E VALUE	SCORE
A GENOME	Ta-MTOPVIB-7A-CS	37.00	55.39	2.03E-96	291
	Tt-MTOPVIB-7A-Durum	37.00	55.39	2.28E-96	291
	Tu-MTOPVIB-7A-G1812	32.66	50.20	5.66E-80	248
B GENOME	Ta-MTOPVIB-7B-CS	37.39	56.19	1.39E-94	286
	Tt-MTOPVIB-7B-Durum	37.39	56.19	1.33E-94	286
	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	36.75	56.43	1.13E-79	245
D GENOME	Ta-MTOPVIB-7D-CS	36.50	56.19	6.24E-93	282
	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	36.17	58.30	1.88E-47	155

Le **Tableau 33** résume les résultats du BLAST avec la protéine MTOPVIB d'At.



**Figure 72** Niveaux de % d'identité pour MTOPVIB selon le génome considéré

Schématisation des relations d'identité entre les séquences de la protéine MTOPVIB chez les blés diploïdes (*Ae. tauschii* (DD ; AET) et *T. urartu* (AA ; Tu)), tétraploïdes (AABB ; *T. durum* (Durum) et *T. turgidum* (Zavitan)), et hexaploïdes (AABBDD ; *T. aestivum* cv. Chinese Spring (CS)).

Les pourcentages d'identité de la protéine MTOPVIB de At et celles de blé sont en moyenne de 36,4 % et vont de 32,7% pour *T. urartu* (Tu-G1812) à 37,4% pour les copies B du blé tendre (Ta-CS) et du blé dur (Tt-Durum) (Figure 72). La conservation est très faible inter-espèce (Arabidopsis/blé **Tableau 33**) mais reste forte chez les Triticées. La copie A de la protéine MTOPVIB de l'espèce diploïde *T. urartu*, partage 89,13% d'identité avec celle du tétraploïde Tt-Durum et 89,33% avec celle du blé tendre. Les autres copies B et D ont un fort taux de conservation supérieur à 99,51%. Il faut noter ici que la copie A de l'espèce tétraploïde Td-ZAVITAN n'a pas été retrouvée dans les bases de données probablement parce qu'elle n'a pas été séquencée et assemblée correctement ou à cause de contraintes

informatiques. Son absence devra être validée expérimentalement. Ces protéines MTOPVIB ont aussi un fort taux d'homéologie supérieur à 95,54%. Ceci nous montre que cette protéine est très conservée et qu'une forte pression de sélection s'exerce sur elle.

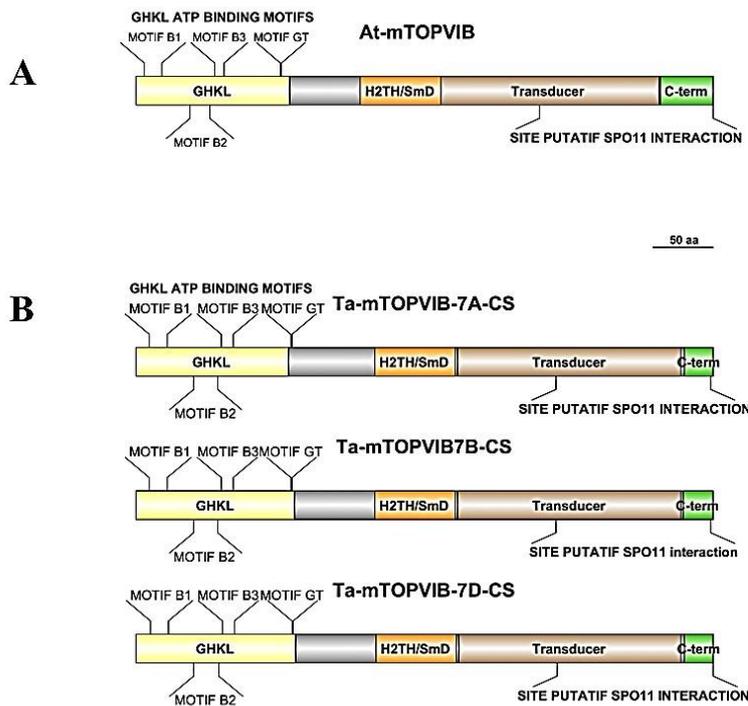


Figure 73 Domaines conservés de la MTOPVIB entre At et le blé tendre

MTOPVIB est composé de quatre domaines délimités par des couleurs ; jaune : Bergerat/GHKL fold, orange : H2TH/SmD ; brun : domaine transducteur ; vert : domaine C-terminal. H2TH : domaine Helix-2Turn-Helix, SmD : (Small domain) petit domaine. Nous avons rajouté les quatre motifs conservés qui constituent la signature des domaines du GHKL ATP BINGING (B1, B3 et GT) (d'après Vrielynck et al 2016). En A c'est la protéine At-MTOPVIB et en B les 3 homologues Ta-MTOPVIB.

Nous avons repositionné les domaines importants à la fonction de la protéine MTOPVIB à partir des données de l'article de Nathalie Vrielynck et collaborateurs (Vrielynck et al., 2016) (Figure 73). Nous avons au préalable aligné les séquences protéiques d'At et celles du blé tendre avec Mafft. Ces figures nous permettent d'avoir une base visuelle permettant une meilleure compréhension du fonctionnement du complexe SPO11.

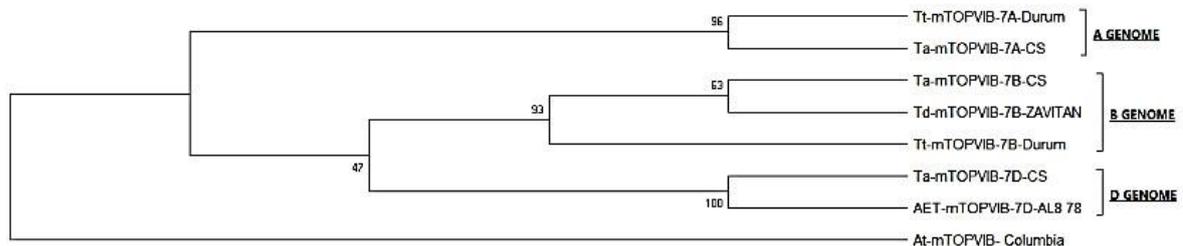


Figure 74 Phylogénie de la protéine MTOPVIB chez les blés

Arbre phylogénétique des protéines MTOPVIB construit à partir des séquences conservées sur MEGA X

La Figure 74 représente un arbre fusionné avec l'arbre des espèces, ce qui nous montre que cette protéine possède au niveau de ses sites conservés beaucoup de divergence inter-copies mais pas au sein des orthologues. En effet chaque génome forme un groupe monophylétique bien distinct.

### 4.3.1.2 Analyse de Spo11-1

Pour les protéines SPO11-1 (**Tableau 34**), les pourcentages d'identité entre At et le blé augmentent fortement jusqu'à atteindre 63,82% avec AET-AL8/78. Les copies A, B et D de ce gène sont quasiment identiques (98,2 à 100%) entre elles chez les différentes espèces (Figure 75). Le niveau d'homéologie est extrêmement fort puisqu'il est supérieur à 98,71%.

**Tableau 34:** Résultats de BLASTP de SPO11-1 des progéniteurs

Résumé des résultats de BLAST de *Spo11-1* concernant les espèces apparentées au blé

BLASTP result Query At-MTOPVIB-Columbia		% IDENTITY	% SIMILARITY	E VALUE	SCORE
A GENOME	Ta-SPO11-1-5A-CS	58.92	76.20	5.52E-145	407
	Tt-SPO11-1-5A-Durum	58.92	76.20	5.52E-145	407
	Tu-SPO11-1-5A-G1812	58.15	74.72	4.45E-141	397
	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	62.911	80.75	1.12E-105	300
B GENOME	Ta-SPO11-1-5B-CS	59.38	76.70	7.98E-146	409
	Tt-SPO11-1-5B-Durum	59.38	76.70	7.98E-146	409
	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	63.13	80.65	5.15E-107	305
D GENOME	Ta-SPO11-1-5D-CS	58.92	77.05	7.47E-149	417
	AET-SPO11-1-5D-AL8/78	63.82	80.26	4.35E-139	390

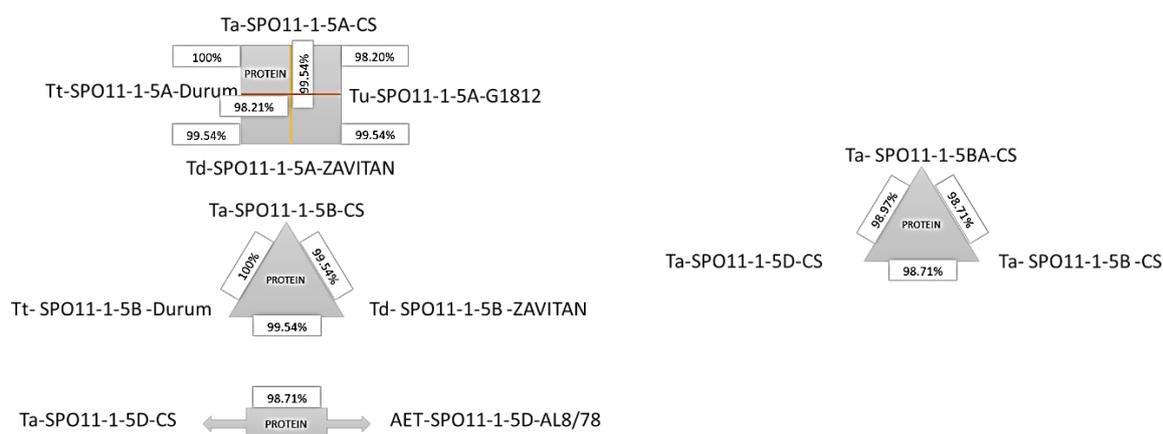


Figure 75 Niveaux de % d'identité pour SPO11-1

Schématisation des relations d'identité entre les séquences de Spo11-1 chez les blés diploïdes (*Ae. tauschii* (DD ; AET) et *T. urartu* (AA ; Tu)), tétraploïdes (AABB ; *T. durum* (Durum) et *T. turgidum* (Zavitan)), et hexaploïdes (AABBDD ; *T. aestivum* cv. Chinese Spring (CS)).

A noter ici que le logiciel obtient 71% des positions de départ très conservées pour la protéine SPO111. Pour SPO11-1, les sept motifs nécessaires à la fonction de la protéine ainsi que les acides aminés clés impliqués dans les interactions à l'ADN ou bien impliqués dans l'activité catalytique sont retrouvés (Da Ines et al., 2020b).

Concernant SPO11-1, la Figure 76 nous confirme que la copie B est bien celle qui a le moins divergée depuis le progéniteur diploïde car elle forme un groupe monophylétique avec une probabilité à 100%. Les copies A et D sont difficilement discernables car les blocks de conservation sont très similaires entre eux.

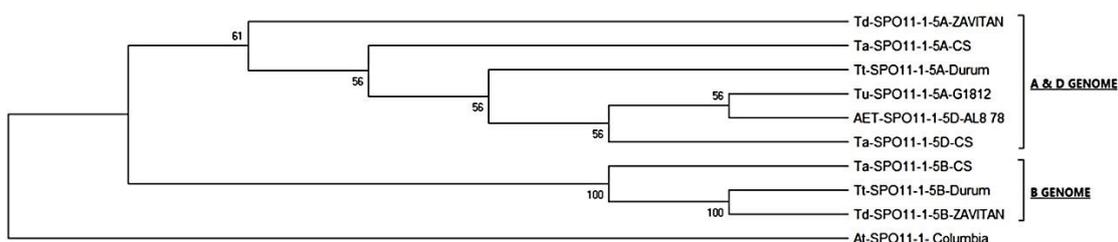


Figure 76 Phylogénie de la protéine SPO11-1 chez les blés

Arbre phylogénétique des protéines SPO11-1 construit à partir des séquences conservées sur MEGA X

### 4.3.1.3 Analyse de Spo11-2

Tableau 35 : Résultats de BLASTP de SPO11-2 des progéniteurs

Résumé des résultats de BLAST de *Spo11-2* concernant les espèces apparentées au blé

BLASTP result Query At-SPO11-2-Columbia % IDENTITY % SIMILARITY E VALUE SCORE					
A GENOME	Ta-SPO11-2-7A-CS	66.67	80.73	9.02E-169	467
	Tt-SPO11-2-7A-Durum	68.97	82.07	2.46E-153	425
	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	66.67	80.48	1.60E-169	470
	Tu-SPO11-2-7A-G1812	65.684	79.36	0	509
B GENOME	Ta-SPO11-2-7B-CS	64.88	78.55	0.00E+00	501
	Tt-SPO11-2-7B-Durum	64.88	78.55	0.00E+00	501
	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	64.88	78.55	0.00E+00	500
D GENOME	Ta-SPO11-2-7D-CS				

AET-SPO11-2-7D-AL8/78	65.15	79.09	0.00E+00 506
	65.15	79.09	0.00E+00 506

Le **Tableau 35** montre que *Spo11-2* présente les plus forts taux d'identité avec la protéine d'At avec des niveaux allant de 64,88% à 68,97%.

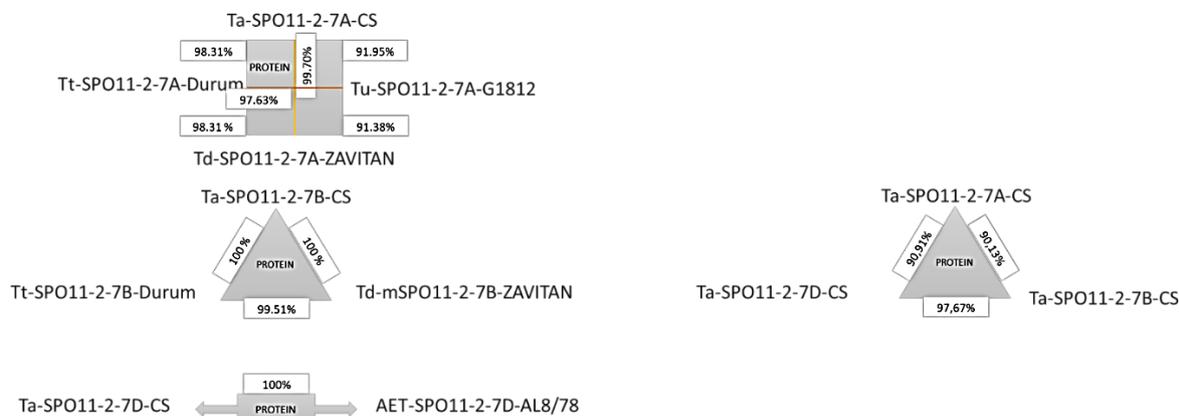


Figure 77 Niveaux de % d'identité pour SPO11-2

Schématisme des relations d'identité entre les séquences de *Spo11-2* chez les blés diploïdes (*Ae. tauschii* (DD ; AET) et *T. urartu* (AA ; Tu)), tétraploïdes (AABB ; *T. durum* (Durum) et *T. turgidum* (Zavitan)), et hexaploïdes (AABBDD ; *T. aestivum* cv. Chinese Spring (CS)).

Ce que l'on peut mettre en avant ici en Figure 77, c'est que la copie A de Tu-G1812 diverge beaucoup avec un taux d'identité chutant à 91,38% avec Td-ZAVITAN-7A et 91,95% avec Cs-7A. Ce qui est surprenant c'est que la copie A de *T. durum* diverge très peu avec celle du progéniteur A (*T. urartu*). Dans la comparaison entre homéologues, la copie A est très divergente car elle ne partage que 90% d'identité avec les copies B et D. Nous savons que cette copie est mutée car un codon stop prématuré apparait et donne une protéine ayant un tout petit résidu d'activité (Benyahya et al., 2020).

Pour SPO11-2, les sept motifs nécessaires à la fonction de la protéine ainsi que les acides aminés clés impliqués dans les interactions à l'ADN ou bien impliqués dans l'activité catalytique sont bien retrouvés. Cependant, pour la protéine SPO11-2-A, le site d'interaction à la protéine MTOPVIB pour Ta-CS, Tt-Durum et pour Td-ZAVITAN est perdu ce qui suggère une activité délétère.

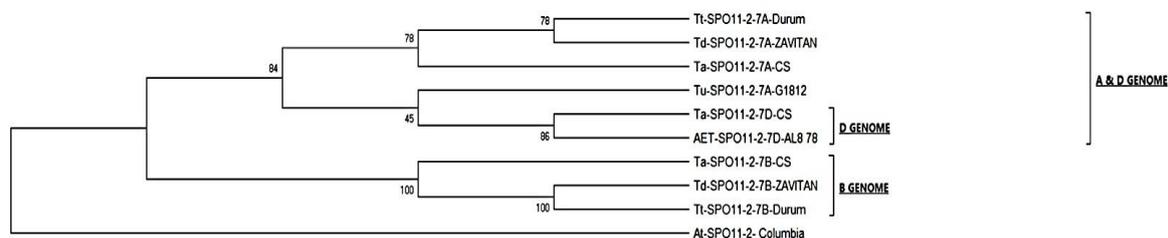


Figure 78 Phylogénie de la protéine SPO11-2 chez les blés

Arbre phylogénétique des protéines *spo11-2* construit à partir des séquences conservées sur MEGA X

Afin de mieux cerner ces différences entre les copies des différents génomes des *Triticées*, nous avons construit des arbres phylogénétiques racinés grâce à la méthode de l'UPGMA et en utilisant 1000 Bootstraps afin de tester la robustesse des branches (Figure 78).

Nous obtenons des résultats similaires pour SPO11-2. Ces analyses *in silico* nous ont aiguillé sur la quantité, la qualité et l'intégrité des protéines du complexe SPO11. Maintenant nous voulons savoir si

ces protéines sont exprimées et dans quelle mesure selon le contexte de ploïdie et selon les croisements interspécifiques pour obtenir un blé synthétique ou en contexte hybride.

### 4.3.2 Analyse d'expression des trois protéines du complexe

Afin d'étudier l'expression des gènes du complexe Spo11 en contexte sauvage et/ou hybride, nous avons semé des graines du cultivar Chinese Spring et du parent Renan ainsi que des graines hybrides CSXRe. Nous avons récolté les anthères de ces plantes jusqu'au stade Métaphase et nous avons extrait les ADNc. Ils ont été séquencés et l'analyse de ces données de RNASeq a permis d'obtenir les lectures brutes qui ont été standardisées en TPM.

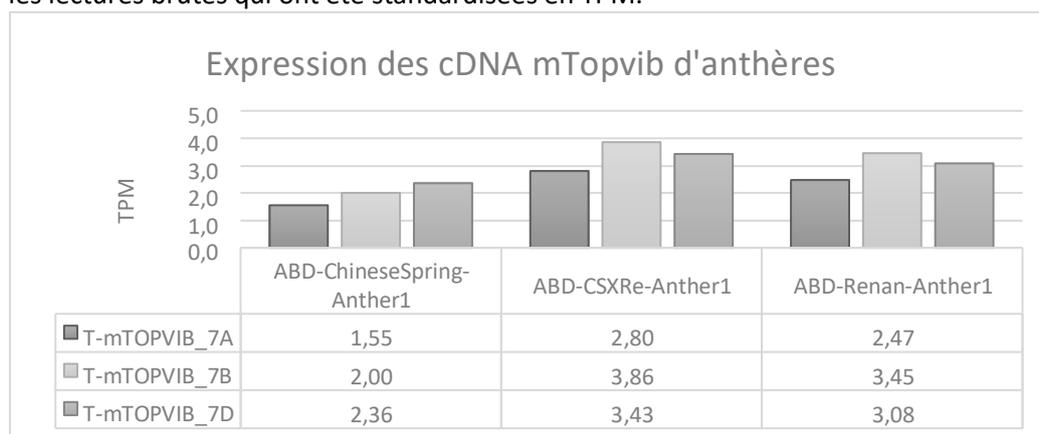


Figure 79 Expression des cDNA MTOpVIB d'anthères

Résultat des analyses d'expression des trois copies homéologues du gène TaMTOpVIB dans des anthères des variétés Chinese Spring et Renan et chez l'hybride dérivé de leur croisement.

Pour la protéine MTOpVIB (Figure 79), les trois copies sont bien exprimées dans les anthères avec une légère supériorité pour les copies B et D pour les trois contextes. L'hybride et le cultivar Renan ont des niveaux d'expression très similaires autour de 3 TPM. Le profil d'expression est identique entre les deux échantillons avec la copie B plus exprimée que la copie D elle-même plus exprimée que la copie A. Chez Chinese Spring, la copie A est également la moins exprimée mais la copie D est plus exprimée que la copie B. Il semble donc que pour cette protéine, le profil d'expression de Renan ait pris le pas sur celui de Chinese Spring.

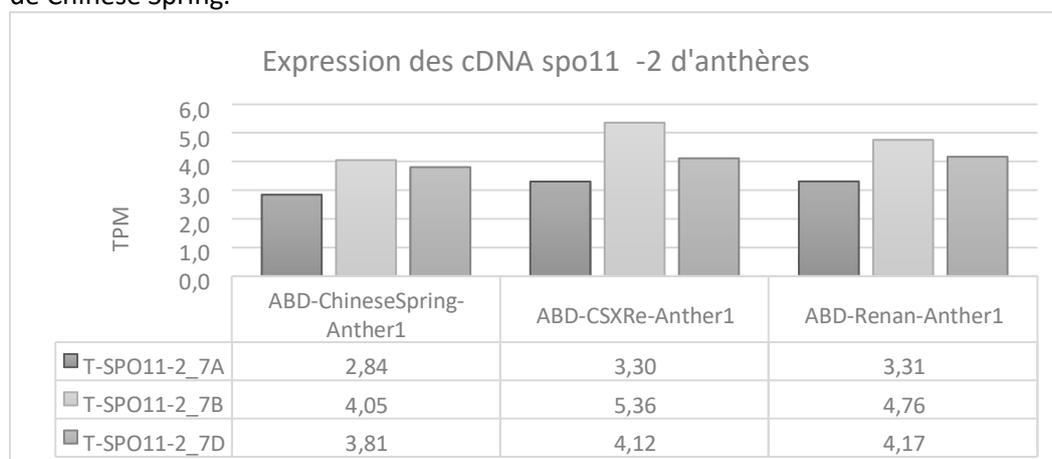


Figure 80 Expression des cDNA SPO11-2 d'anthères

Résultat des analyses d'expression des trois copies homéologues du gène TaSpo11-2 dans des anthères des variétés Chinese Spring et Renan et chez l'hybride dérivé de leur croisement.

Pour le gène *Spo11-2* (Figure 80), il persiste une expression pour la copie A autour de 3 TPM contre 4 pour les autres copies. Les profils des trois échantillons sont identiques avec la copie B plus exprimée que la copie D elle-même plus exprimée que la copie A.

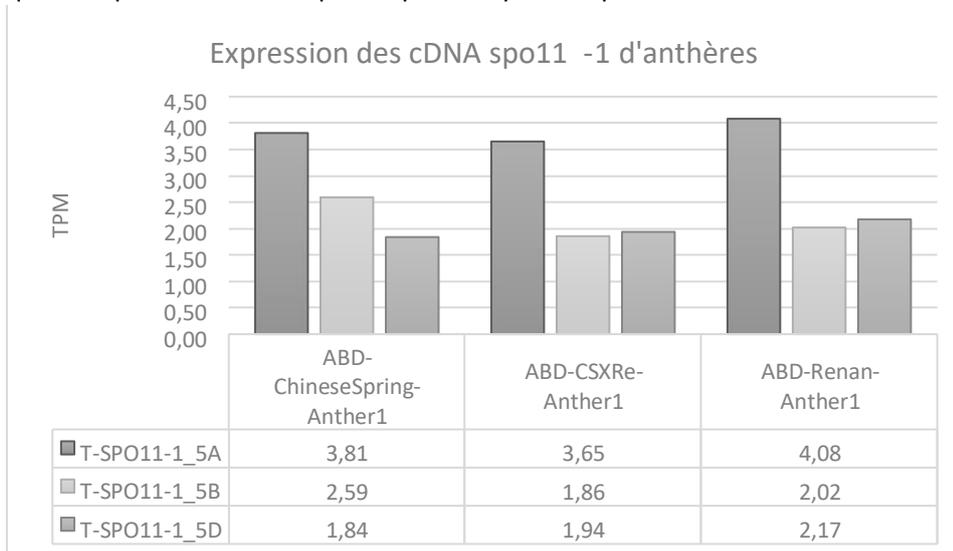


Figure 81 Expression des cDNA SPO11-1 d'anthères

Résultat des analyses d'expression des trois copies homéologues du gène TaSpo11-1 dans des anthères des variétés Chinese Spring et Renan et chez l'hybride dérivé de leur croisement.

Pour le gène *Spo11-1*, la copie A est nettement plus exprimée que les deux autres (3,7 contre 2 TPM) dans les trois échantillons (Figure 81). En revanche, la copie B est plus exprimée que la copie D chez Chinese Spring alors que ces deux copies sont exprimées au même niveau chez Renan et chez l'hybride. Il semble donc là encore que le profil d'expression de Renan ait pris le pas sur celui de Chinese Spring chez l'hybride.

Il semble donc que dans notre cas, le profil d'expression de la plante hybride issue du croisement entre Chinese Spring et Renan, suit celui de Renan et donc du parent mâle. Afin d'affiner ces profils d'expression, nous sommes allés voir si les autres tissus étaient capables d'exprimer ces protéines normalement spécifiques de la méiose.

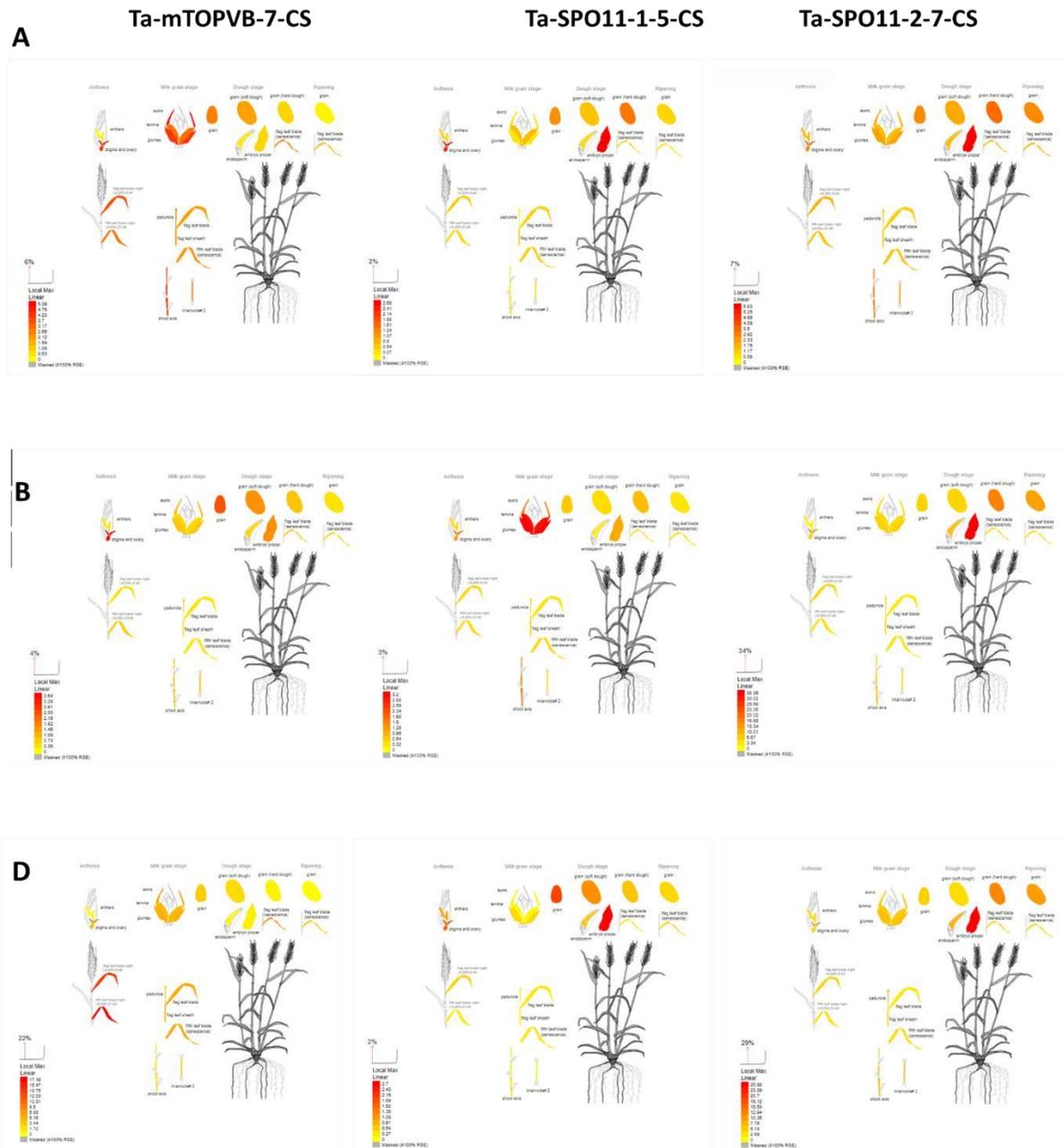


Figure 82 Heatmap Expression Complexes SPO11

Profil d'expression des trois copies homéologues A, B, D des trois gènes Spo11-1, Spo11-2, MTOPVIB dans différents organes du blé. L'intensité d'expression dans un organe donné est matérialisée par une échelle de couleur au niveau de l'organe lui-même. Données publiques bar.utoronto.ca

De manière surprenante, les protéines du complexe SPO11 sont exprimées dans divers tissus non méiotiques (Figure 82). En effet dans la majorité des cas, les protéines méiotiques ont des promoteurs méiose-spécifiques qui ne s'expriment que dans les tissus reproducteurs ou bien des variants spécifiques (Barouki, 1992). Ces contrôles s'effectuent aussi bien sur le plan transcriptionnel que traductionnel. Nos études ne sont donc pas en mesure de préciser les mécanismes de régulation. Elles dressent seulement le paysage des transcrits produits à un instant T dans un tissu X.

Pour la protéine MTOPVIB, les niveaux d'expression de la copie D sont très supérieurs aux deux autres copies et passent de 5 à 17 TPM dans les feuilles. Pour la protéine SPO11-1, cette fois la copie A est très peu exprimée comme en contexte méiotique avec des taux oscillant autour de 3 TPM. Concernant

SPO11-2, la copie A n'est quasiment pas exprimée par rapport aux copies B et D avec un rapport de 5 (5 à 25-30 TPM).

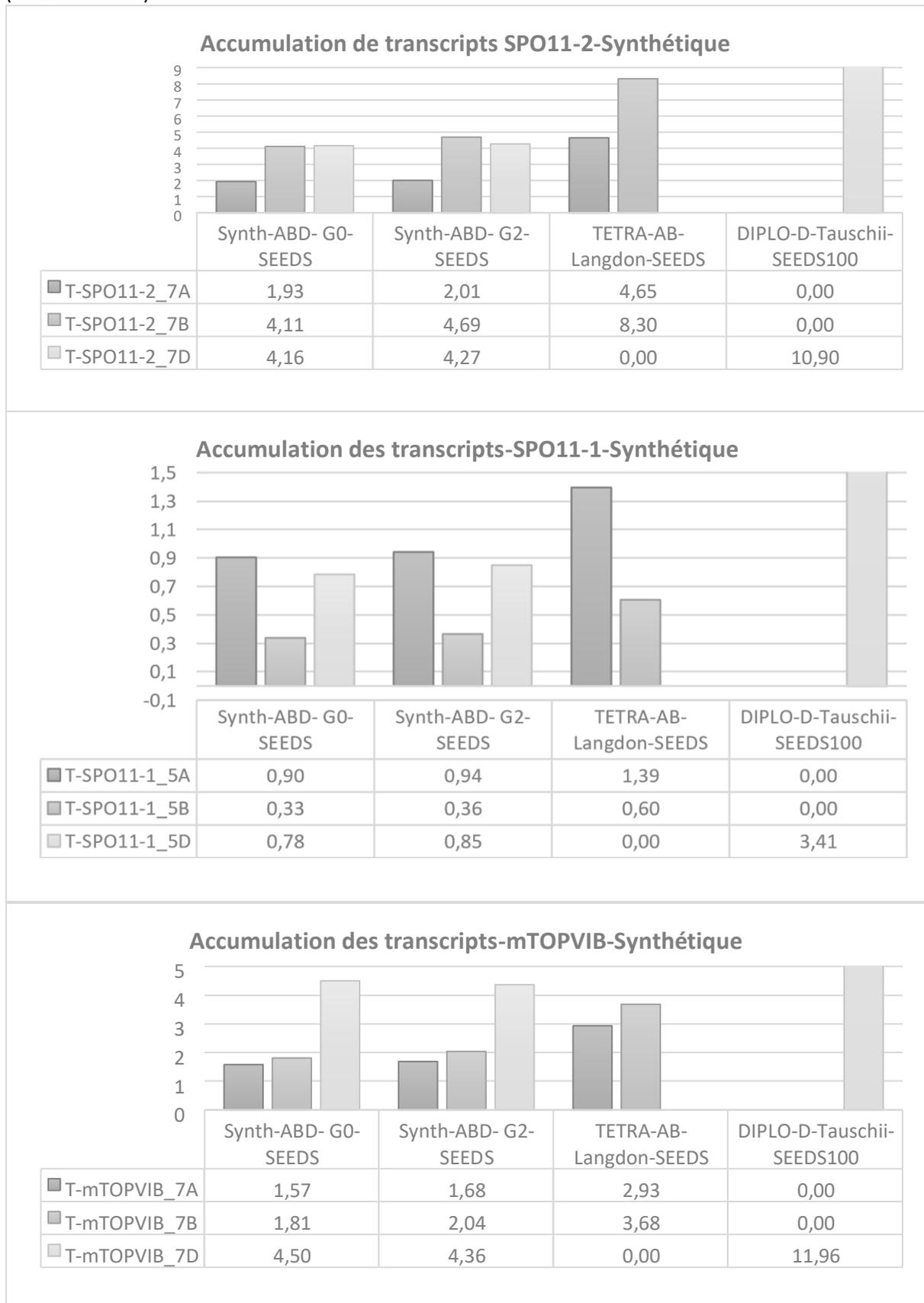


Figure 83 Expression cDNA du complexe SPO11. Etude des synthétiques.

Profil d'expression des trois copies homéologues A, B, D des trois gènes Spo11-1, Spo11-2, MTOPVIB Chez deux générations d'un blé synthétique (G0 et G2) et chez ses parents tétraploïdes et diploïdes.

Nous n'avons aucune preuve que les promoteurs de ces trois gènes soient régulés de manière spécifiques comme chez les autres espèces. Il est légitime de s'interroger sur l'intérêt pour le blé d'exprimer tous les gènes de son génome. Afin d'avoir des éléments de réponse, nous nous sommes intéressés à la néo-polypléidisation en analysant les données d'expression d'un blé synthétique issu du croisement entre un blé tétraploïde Langdon (AABB) et une accession diploïde d'*Ae. tauschii* (DD). La Figure 83, représente l'expression des différentes copies homéologues des trois gènes TaSpo11-1, TaSpo11-2 et TaMTOPVIB chez deux générations d'un blé synthétique (première (G0) et deuxième (G2) générations) et chez ses parents tétraploïdes et diploïdes. Nous pouvons remarquer que les copies A et B ont un comportement similaire chez les blés tétraploïdes, hexaploïdes synthétiques et hexaploïdes « sauvage ». Par exemple, la copie A de SPO11-1 est surexprimée alors que celle de SPO11-2 est sous-exprimée et cela était déjà le cas chez Langdon (4,65 contre 8,3 TPM). En revanche, il existe des différences au niveau des copies D entre synthétiques et blé hexaploïdes. L'espèce diploïde *Ae. tauschii* a des niveaux très forts d'expression pour les trois protéines allant jusqu'à 3 fois plus pour MTOPVIB et pour SPO11-2. Quand le génome D entre en relation avec les génomes A et B, ces taux s'abaissent directement dès la première génération. Cependant, ils peuvent rester plus importants que ceux observés chez l'hexaploïde. Cela est particulièrement vrai pour Spo11-1 et pour MTOPVIB. Ceci nous montre que des mécanismes spécifiques d'épigénétique entrent en jeu dès l'hybridation précoce pour atteindre les mêmes taux que chez un cultivar installé de blé tendre. Afin de préciser le rôle et de décrire les effets de la recombinaison méiotique nous avons analysé le comportement méiotique de différentes espèces de *Triticées*, avec divers degrés de ploïdie.

### **4.3.3 Etablissement d'un atlas méiotique**

Le blé tendre a 42 chromosomes et il y a systématiquement sept bivalents par génome soit au maximum 42 chiasmats pour ce génome de 17Gb. Le blé a une histoire complexe dû à ses deux hybridations ancestrales avec trois espèces diploïdes. De ce fait l'équipe s'est intéressée à l'étude de la méiose des progéniteurs diploïdes et tétraploïdes du blé tendre.

Afin de mener à bien cette analyse, nous avons semé et cultivé des blés diploïdes (*T. monococcum ssp. urartu* et *T. monococcum ssp. monococcum* (AA), *Ae. speltoides* (SS=BB) et *Ae. tauschii* (DD)), tétraploïdes (*T. dicoccoides* et *T. turgidum* cv Maimara) et hexaploïde (*T. aestivum* cvs Saissette de Maninet, Chinese Spring, Cadenza, Renan). Nous avons observé leur croissance ainsi que leurs différences méiotiques avant d'atteindre l'épiaison.

Le plus surprenant a été les observations phénotypiques. En effet les épis des blés diploïdes étaient minuscules et revêtaient une diversité en termes de formes, de barbes, de graines et de couleurs étonnante (Figure 84). Ils donnent des grains tout fins alors que les blés polypléidés (tétra et hexaploïdes) ont des grains bien bombés. Leurs épis sont filiformes par rapport aux autres qui ont un port plus évasé.

A

DIPLOID



B

TETRAPLOID



C

HEXAPLOID



Figure 84 Photos d'épis des progéniteurs et leurs graines

Phénotypes de l'épi et du grain chez des espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes de Triticées.

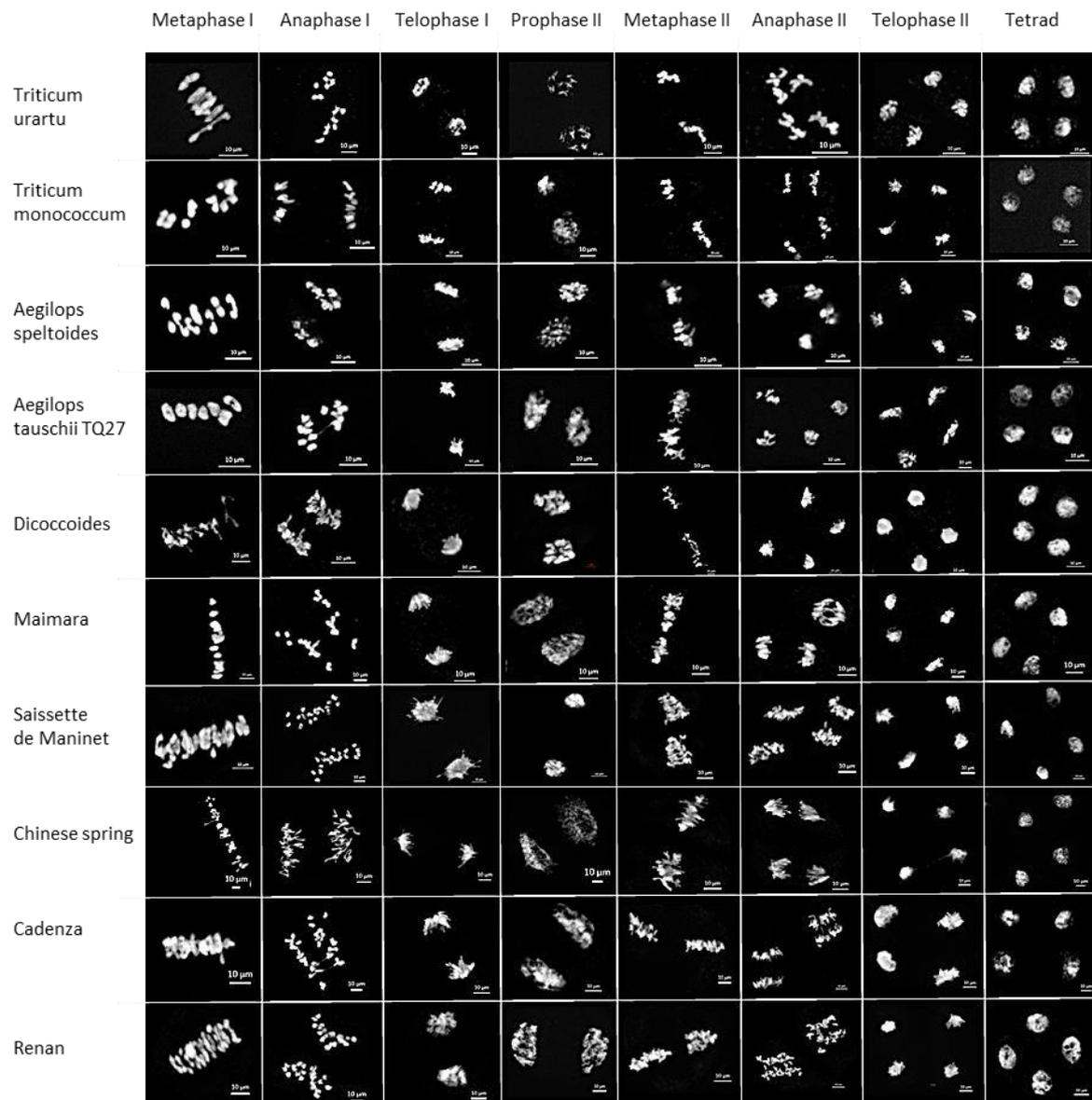


Figure 85 Atlas méiotique des progéniteurs

De la métaphase I jusqu'au stade tétrade de différentes espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes de Triticées.

Afin d'analyser leur méiose nous avons dressé un atlas regroupant les stades principaux (Figure 85). Le comportement suit celui attendu avec des bivalents qui se séparent en anaphase I, et en métaphase II à nouveau les chromosomes cette fois esseulés qui s'alignent sur la plaque métaphasique et leurs chromatides qui se dispersent de part et d'autre en anaphase II pour donner des tétrades équilibrées en fin de méiose.

Nous avons comparé la taille de ces tétrades afin de voir si les produits de méiose étaient proportionnels aux degrés de ploïdie. Les produits de méiose ont des diamètres qui ne sont pas significativement différents les uns des autres et oscillent autour de 10 à 14 microns. Nous avons ensuite analysé le type d'appariement que les bivalents formaient en métaphase I.

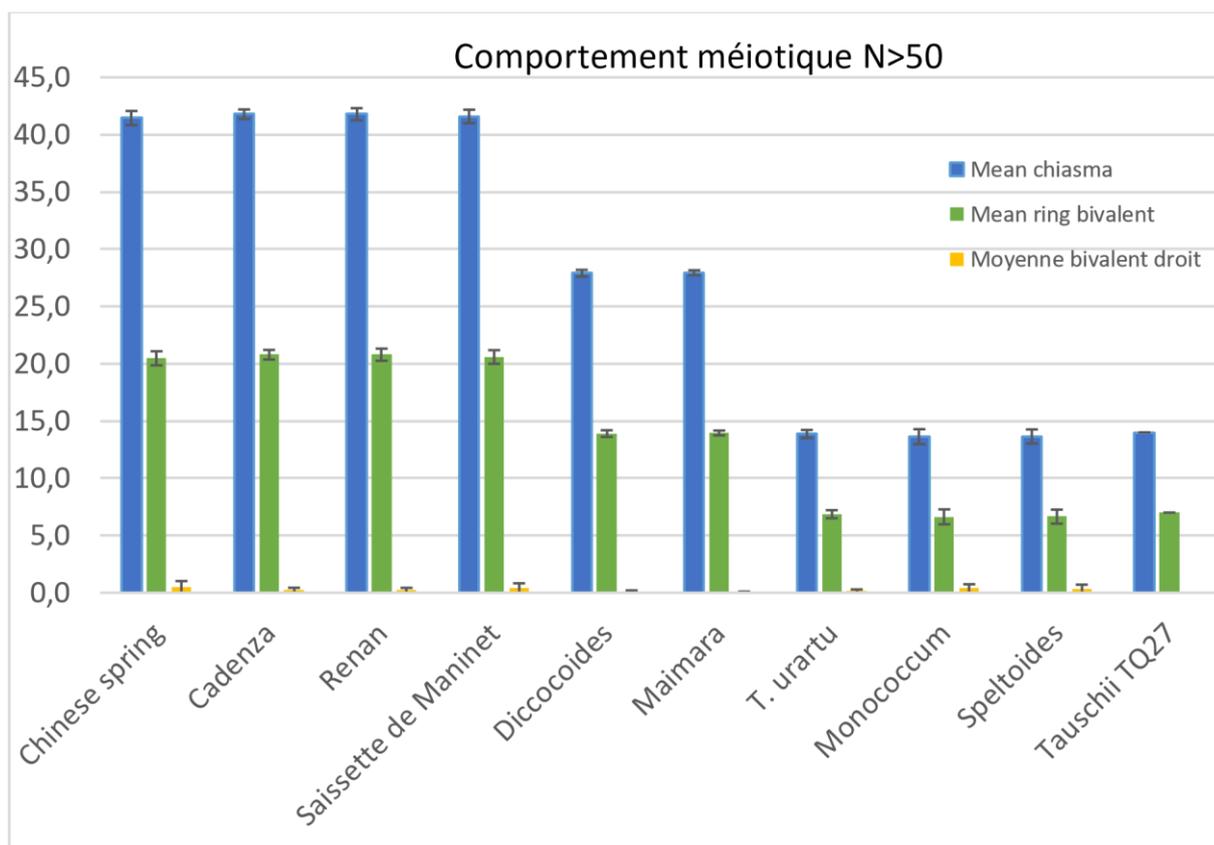


Figure 86 Nombre de bivalents chez les progéniteurs

Nombre de bivalents anneaux (vert) ou droits (jaune) et nombre total de chiasmata qui en résultent (bleu) chez des espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes de Triticées.

Comme attendu (Figure 86), les diploïdes donnent bien sept bivalents en majorité anneaux, les tétraploïdes donnent 14 bivalents et les hexaploïdes donnent bien 21 bivalents anneaux pour la majorité. Certains cultivars ont tendance à former un peu plus de bivalents droits.

#### 4.3.4 Observation des foyers DMC1

Pour finir de caractériser la recombinaison méiotique, nous avons observé le nombre de CDB pour chacun des blés. Les espèces étant fortement apparentés, les anticorps utilisés pour les immunomarquages fonctionnent chez tous les individus.

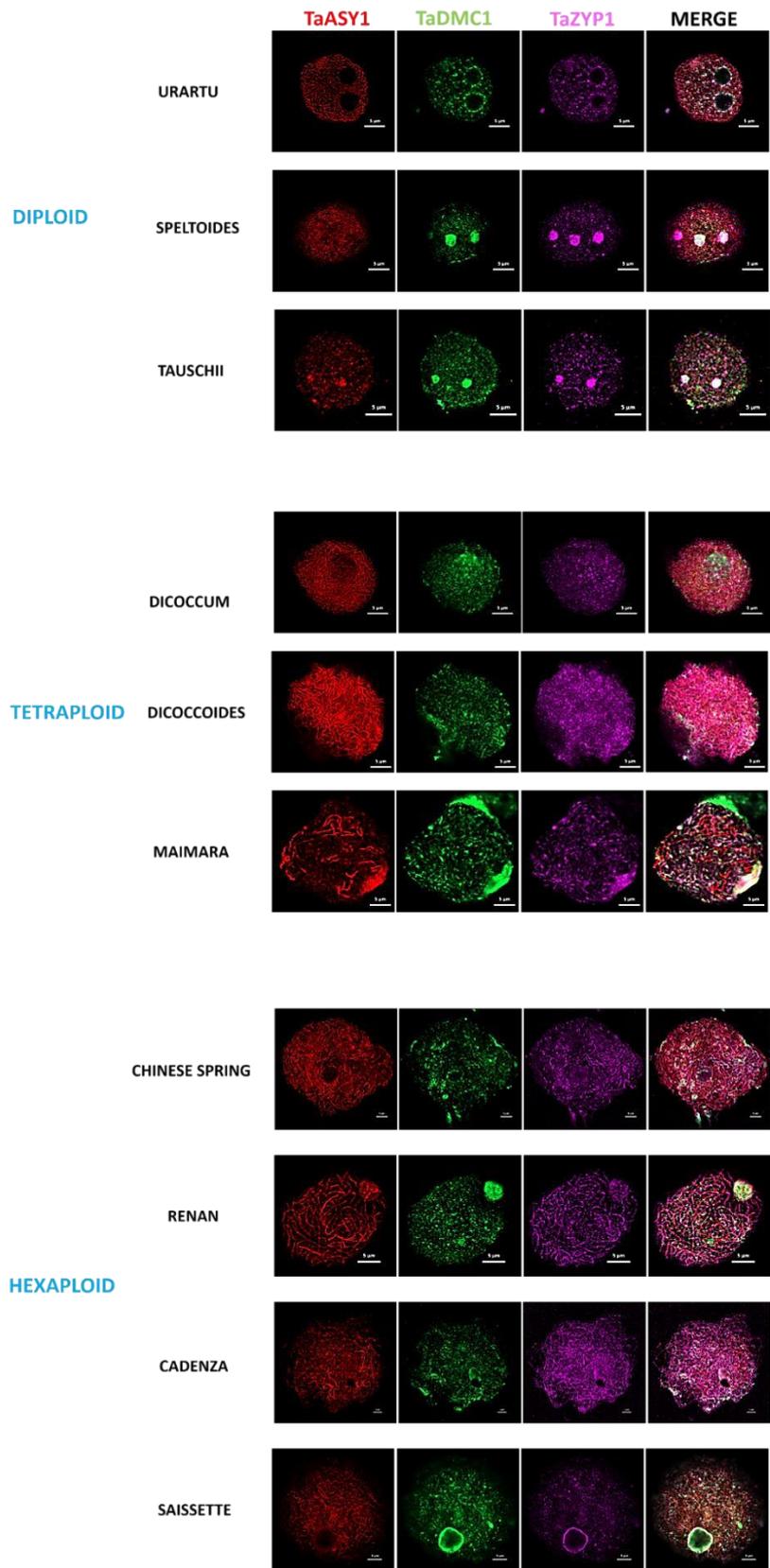


Figure 87 Marquage des protéines ASY1, ZYP1 et DMC1 chez les progéniteurs

Hybridation in situ à l'aide des protéines ASY1 (rouge), DMC1 (vert) et ZYP1 (magenta) chez des espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes de Triticées.

Afin de cibler le stade zygotène, nous avons marqué le complexe synaptonémal à l'aide de deux anticorps dirigés contre les protéines Ta-ASY1 en rouge et contre les protéines Ta-ZYP1 (Figure 87). Nous avons aussi marqué la recombinaison Ta-DMC1 afin de compter les foyers correspondant aux CDB. Pour les diploïdes nous obtenons entre 317 et 353 cassures, pour les tétraploïdes entre 527 et 629 et pour les hexaploïdes les taux déjà démontré autour de 850 CDB (Benyahya et al., 2020).

## 5 Discussion et perspectives

### 5.1 Partie 1 : Comment étudier la méiose chez une espèce hexaploïde ?

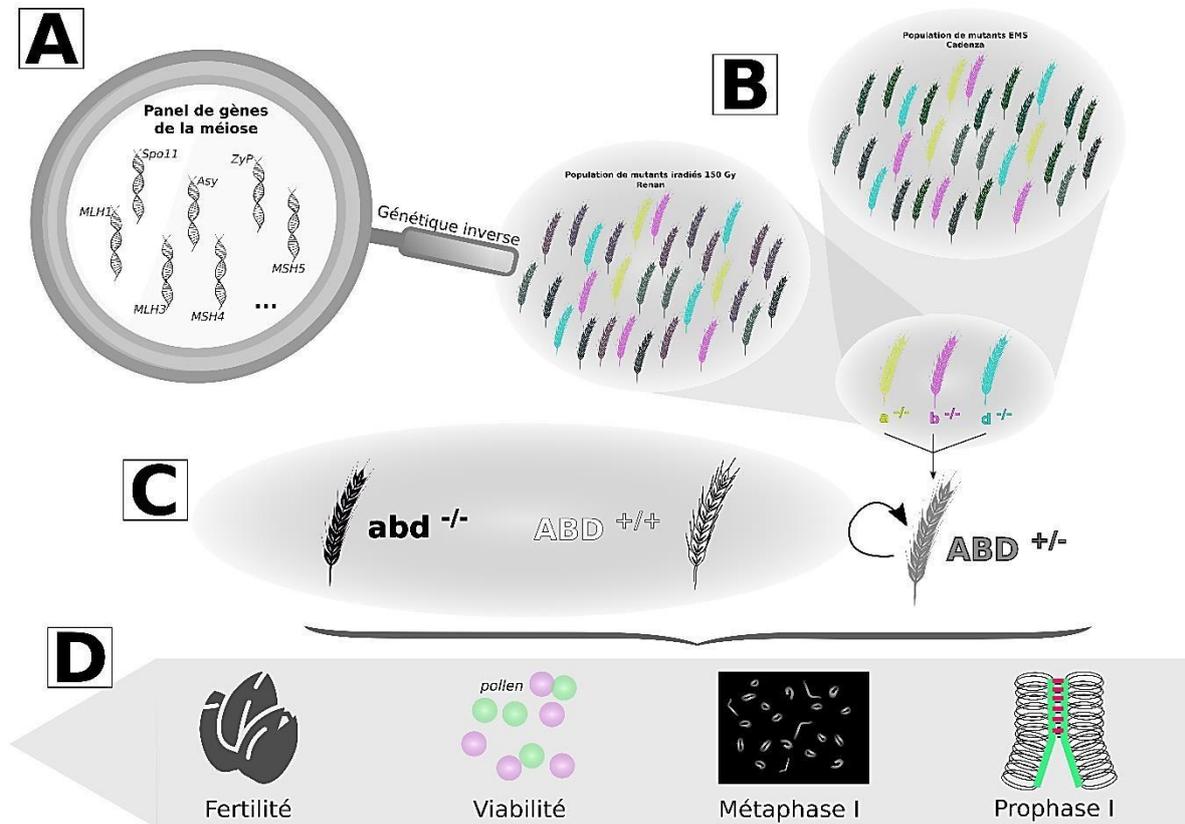


Figure 88 Résumé schématique des des principaux résultats de l'axe 1

En A, nous avons ciblé un panel de gène de la méiose puis nous avons dessiné des amorces sur ceux-ci. En B, nous avons criblé dans les populations Cadenza EMS et dans les populations Renan irradiées, les mutants pour chaque sous génome a, b et d. En C, nous avons croisé les simples mutants afin d'obtenir une plante hétérozygote pour les 3 génomes. C'est à partir de cette plante que les plantes sœurs témoins WT et mutées KO vont être obtenues. En D, Le matériel végétal va être caractérisé en méiose en analysant sa fertilité, la viabilité du pollen, le nombre de chiasmats et la bonne mise en place du CS et l'accumulation du nombre de foyers DMC1.

#### 5.1.1 La génétique directe versus la génétique inverse

Afin de répondre à notre problématique, nous avons utilisé la génétique inverse qui consiste, à partir du gène d'intérêt, à observer les mutants afin de déterminer la fonction de ce gène. La génétique directe est difficile à appréhender chez une espèce hexaploïde. En effet les gènes sont présents en majorité en trois exemplaires et sont redondants (Hou et al., 2019; Krasileva et al., 2017). En méiose, il est fréquent d'utiliser la génétique directe car les phénotypes liés à la fertilité sont facilement observables (stérilité, malformation des organes génitaux ; (Glover et al., 1996)). De manière générale des populations de mutants sont créées via l'incorporation d'agents mutagènes physiques (irradiations aux rayons X) ou chimiques (le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ou l'éthylénitroso-urée (ENU)) chez la souris par exemple (Furnes and Schimenti, 2007) ou *via* la transformation par insertion d'ADN transféré

(T-DNA) par exemple chez *At* avec *Agrobacterium tumefaciens* (Feldmann, 1991) ou la création de population contenant des délétions générées via insertion de cassettes par recombinaison homologue surtout chez la levure (Kim et al., 2010).

En 2012, Crismani et ses collaborateurs (Crismani et al., 2012b) ont utilisé une population de mutants types *zmm* (*zip4*, *shoc1*, *hei10*, *msh4* et *msh5*) qui produisait encore suffisamment de graines par ségrégation aléatoire, qu'ils ont de nouveau muté en utilisant de l'EMS. Ils ont criblé dans cette population de 2000 familles de plantes, huit familles de supresseurs de mutants *zmm* qui avaient par conséquent une fertilité élevée et des siliques longues et un niveau de CO de type sauvage. Parmi ces huit familles, ils ont classé les mutations causales à des loci uniques et récessives en trois groupes de complémentations : FancM (MHF1 et MHF2), Recq4 (TOP3 $\alpha$ , RMI1) et FIDGETIN-Like-1 gene (FLIP (Fidgetin-like-1 interacting protein)) (Girard et al., 2014b, 2015b; Séguéla-Arnaud et al., 2015b). Un exemple plus récent et témoignant encore de l'efficacité de la génétique directe a été réalisé par Vrielynck et ses collaborateurs (Vrielynck et al., 2016), un crible sur une population de mutants d'*At* ayant une faible fertilité a permis d'identifier un cofacteur essentiel dans l'initiation des CDB. Ils ont identifié deux lignées alléliques *MTOPVIB-1* et *MTOPVIB-2*, qui présentaient un phénotype pratiquement stérile (4% de graines par rapport au WT) avec des défauts de développement des gamètes mâles et femelles. La coloration au DAPI des chromosomes en métaphase I de ces mutants a montré la présence d'univalents dans 86% des cas, une absence de synapse en prophase I et pas de foyers DMC1. Ces défauts de méiose observés chez ces mutants rejoignent les défauts observés chez les mutants *spo11*. Ainsi en lien avec Robert et ses collaborateurs (Robert et al., 2016) qui travaillaient sur la souris en utilisant une méthode dite de « phylo-génomique », les deux groupes ont démontré que la protéine MTOPVIB était la sous unité manquante B de la topoisomérase impliquée dans l'induction des CDB avec SPO11-1 et SPO11-2 pour les plantes.

Pour en revenir à la génétique directe, il est à noter que certains loci chez le blé tendre ont été identifiés de cette manière. En effet c'est le cas pour *ph1* en 1959 qui a été identifié comme étant localisé sur le chromosome 5B grâce à l'étude sur des populations de nullisomiques sur deux cultivars Holdfast et CS (Riley et al., 1959). Ce sont des populations développées par Sears et Okamoto à partir d'anomalies du nombre et de structure des chromosomes qui ont eu lieu en méiose (Sears, 1954a). Il est à noter que ce sont uniquement des régions chromosomiques qui ont été identifiées de la sorte et non pas des gènes. Afin de retrouver la mutation causale il a fallu faire un grand travail et aujourd'hui il n'est pas tout à fait vérifié que le locus implique le gène *Zip4* seul (Rey et al., 2017a). Il se peut que tout un lot de CDK2-like défectueuses qui ont un effet de retard de phosphorylation de l'histone H1 et impactent la dynamique de décondensation et de la réplication joue également un rôle (Greer et al., 2012). Peut-être que la combinaison des deux phénomènes va moduler les appariements inter homologues au profit des appariements entre homéologues. Une autre étude, de l'équipe de Graham Moore (Draeger et al., 2019), s'inspirant de l'étude précédente, a permis de mettre en avant un mutant (TTmei1' (TemperatureTolerant meiosis 1) qui ne supporte ni les basses températures (13°C) ni les hautes températures (30°C) pendant le processus de méiose. En effet ces mutants dans ces conditions extrêmes présentent plus d'univalents et une diminution drastique des bivalents, ce qui va impacter la fertilité des plantes. De plus ils présentent des défauts de mise en place de la protéine TaZYP1. Ils ont cartographié le locus TTmei1' à l'aide du phénotypage et génotypage d'une population de 1000 mutants de délétion irradiés à 250 à 300 Gy et ont réussi à restreindre le locus de 16Mb à 4 Mb (sur le Chromosome 5D). Parmi les 41 gènes présents dans cette fenêtre, 18 sont exprimés. Le gène candidat qu'ils ont choisi a été DMC1 car il était le seul à avoir un rôle connu en méiose. Les auteurs ont fait une analyse de comparaison entre les 3 protéines homéologues et ils ont remarqué des SNP non conservés chez le riz et chez l'orge sur leur gène candidat par rapport aux deux autres homéologues. Ils identifient aussi des SNP qu'ils ne retrouvent que sur la copie B. Ces SNP du gène candidat et ceux de la copie B donnent des modifications d'acides aminés au niveau protéique. Leur hypothèse est que ces SNP peuvent expliquer la perte de tolérance aux fortes variations de températures. Pour tester leurs hypothèses ils ont travaillé sur les aneuploïdes sans chromosome 5D N5DT5B et N5DT5A. Les N5DT5B

arborent le même phénotype que leur mutant TTmei1' mais lorsqu'ils analysent les autres nullis N5DT5A ils se comportent comme les témoins WT. Ils évoquent un effet dose de la copie A qui, lorsqu'elle est présente en quatre exemplaires, est apte à résister aux variations de températures, ce qui ne serait pas le cas pour la copie B.

L'observation de phénotypes et la corrélation avec le génotype est une démarche qui se complique du fait de la difficulté des mécanismes biologiques qui sont sous la dépendance de plusieurs gènes ou marqueurs ayant ou non un effet environnement. Ces analyses peuvent être affiliées à la génétique directe puisque l'on part d'une observation (maladie, caractère d'intérêt agronomique) et on essaye de lier les panels de gènes ou de marqueurs et d'estimer l'effet environnement dans ces processus. Ce type d'approche entre dans la catégorie des études d'association génétique pangénomique (Génome wide association study (GWAS)).

## **5.1.2 La mutagenèse aléatoire *versus* la mutagenèse dirigée**

Pour nos études nous avons choisi la mutagenèse aléatoire, or nous aurions pu nous orienter vers la mutagenèse dirigée.

### **5.1.2.1 Contourner les législations OGM**

Nous travaillons sur le blé tendre qui est l'une des trois céréales les plus cultivées à travers le monde devant le maïs et le riz (Faostat 2013). De plus, le blé est la principale source calorique et protéique de l'alimentation humaine avec 19-21% des apports au niveau mondial. Le défi des années à venir est de pouvoir nourrir la population mondiale qui est en constante augmentation tout en diminuant l'usage des intrants. Une des réponses à ce défi est d'augmenter la diversité des espèces cultivées qui pourront acquérir un profil adaptatif plus étendu. Cette diversité est créée en partie au niveau de la recombinaison méiotique et peut devenir un levier permettant d'augmenter le fitness des plantes cultivées. Le choix d'avoir utilisé la mutagenèse aléatoire réside aussi dans le fait que l'on échappe à la réglementation des organismes génétiquement modifiés (OGM) car l'induction de mutations avec un traitement irradiant ou chimique ne laisse pas de « traces » et n'est donc pas soumis aux réglementations contraignantes. De ce fait si on arrive à sélectionner des caractères d'intérêt agronomique ils pourront être directement utilisés par les sélectionneurs.

Une autre alternative peut être l'utilisation de mutagenèse ciblée induite temporairement par un virus (VIGS : virus-induced gene silencing ; (Calvo-Baltanás et al., 2020). Cette technique a été conduite chez At. Les auteurs ont réussi à générer 20 lignées de substitution de chromosomes (chromosome substitution lines (CSLs)) en ne ciblant que le gène AtMSH5. En supprimant la recombinaison méiotique, ils ont pu obtenir des plantes haploïdes doublées et générer leur CSL intégrant sans croisements ni hybridations le chromosome entier émanant d'une ligne d'intérêt. Si ces outils sont développés chez le blé tendre, ils vont permettre de sélectionner des caractères d'intérêt agronomique en générant une seule F1 et en s'affranchissant encore des réglementations liées aux OGM. Cette technique fonctionne chez le blé tendre puisque le gène DMC1 a pu être éteint transitoirement (Desjardins et al., 2020). Néanmoins, elle est lourde à mettre en place et n'est pas encore optimisée pour être utilisée en routine sur n'importe quel gène.

## 5.1.2.2 Essai de la technique CRISPR

Pour aller plus loin et dans un souci de recherche fondamentale, nous nous sommes également impliqués dans le développement de mutants CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dans le projet multiCRISPR en janvier 2017 (RecQ4, FIGL1). A ce jour nous n'avons toujours pas les mutants qui devaient être produits pour les cultivars Cadenza et Fielder. De plus, au laboratoire nous avons aussi une plate-forme de validation fonctionnelle qui travaille depuis plusieurs années sur l'application de la méthodologie CRISPR mais les résultats doivent encore être améliorés et la manière d'utiliser cette technique en routine n'a pas encore été trouvée.

## 5.2 Partie 2 : Quel est le rôle des protéines Spo11-2 chez le blé cv Renan ?

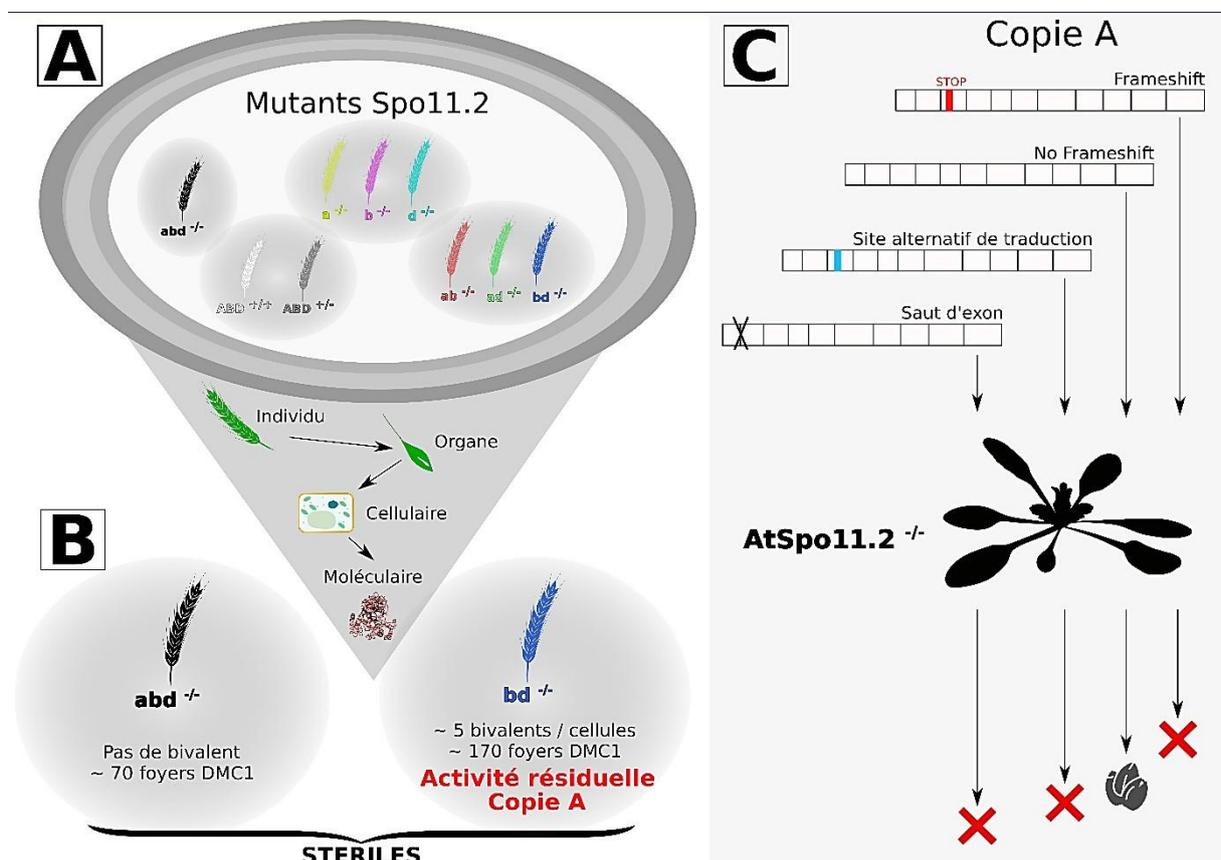


Figure 89 Résumé schématique des principaux résultats de l'axe 2

En A les plantes mutantes sœurs *Tspo11-2* ont été criblées et caractérisées à l'échelle de l'individu, de l'organe, au niveau cellulaire et moléculaire. En B, les résultats majeurs de l'étude pour les mutants nuls et le mutant *bd<sup>-/-</sup>* ; En C, les complémentations hétérologues générées en collaboration avec O. Da Ines chez *At*. Seule la version « no Frameshift » a une fertilité restaurée.

## 5.2.1 Inconvénients de la population EMS

### 5.2.1.1 Absence de mutants *Taspo11-1* et pas de *Taspo112-7A*

Comme expliqué précédemment, il existe des populations de mutants aléatoires disponibles à l'achat et notamment les mutants Cadenza du JIC (John Innes Centre ; <http://wheat-tilling.com/> ; (Krasileva et al., 2017)). Au début de ce projet, nous avons recherché dans cette banque de mutants les mutations avec gain de codon stop pour les gènes de l'initiation de la méiose (*Spo11-1*, *Spo11-2* et *MTOPVIB*) puis pour les gènes ayant un rôle hyper-recombinant identifiés par l'équipe de Raphaël Mercier (*FancM*, *ReCQ4*, *Fidgetin*) et pour certains gènes impliqués dans la prise en charge des IR (*HEI10*, *MSH2*, *RTEL*). La difficulté de ce travail a d'abord résidé dans le fait que le génome du blé n'était pas encore publié et de ce fait l'annotation des gènes était incomplète. Les mutants proposés ne correspondaient pas forcément aux gènes d'intérêt. Pour exemple, le gène *Spo11-1* (Traes5D02g401200) qui a une disposition particulière car il est entouré par un gène codant un phytochrome C (Traes5D02g401000) et un autre, un canal potassique à double pore (Traes5D02g401100) (Figure 90).

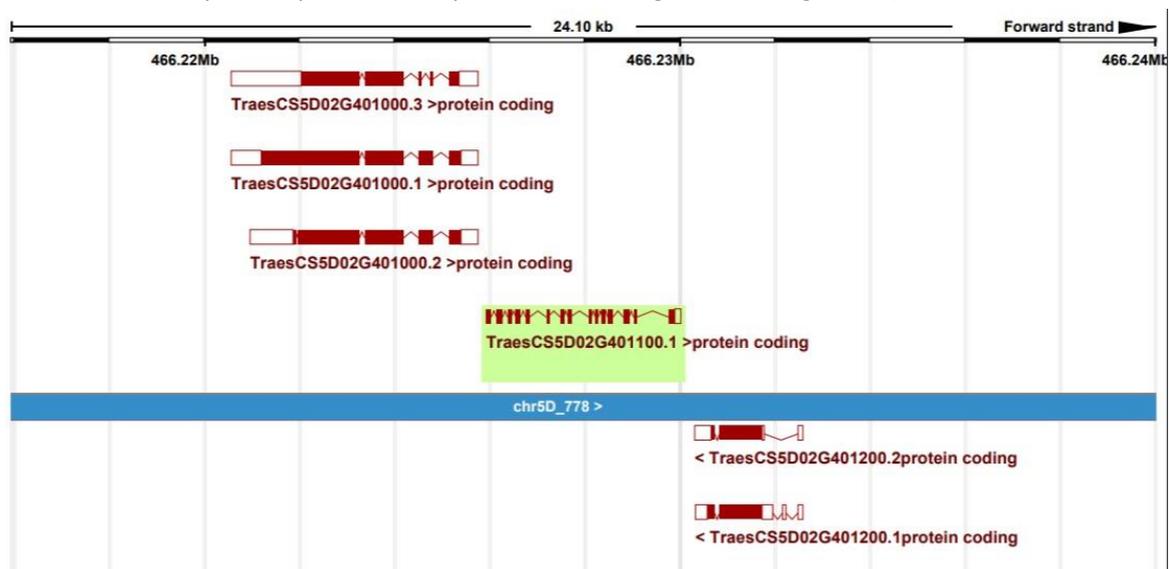


Figure 90 Position du gène *Spo11-1*

Lorsque l'on faisait une recherche à partir de la séquence génomique de *Spo11-1* on avait comme proposition ces mutants. On ne retrouvait pas non plus la mutation stop pour *Spo11-2* du sous-génome A (Tableau 36). Ce problème peut être soulevé dans n'importe quel type de population de mutants.

**Tableau 36:** Liste des mutants EMS *spo11-1* et *spo11-2* ciblés sur le site du JIC

Protéine ciblée	Annotation site wheat tilling	Numéro	Génotype	Type de mutation	Mutation protéique	Mutation CDS	Traes ref seq IGWSC 2018	Protéine réelle
SPO11-1 5AL	Traes_5AL_51E31BF07.1	Cadenza1685	het	stop_gained	<b>W276*</b>	tgG/tgA	TraesCS5A01G541400LC	TPK1 Canal K+ à 2 pores
SPO11-1 5BL	Traes_5BL_12780666F	Cadenza0397	het	stop_gained	<b>Q177*</b>	Caa/Taa	<u>TraesCS5B02G396400</u>	TPK1 Canal K+ à 2 pores
SPO11-1 5DL	Traes_5DL_A98953CFA	Cadenza0361	hom	stop_gained	<b>Q121*</b>	Caa/Taa	TRAES5D02G401200	TPK1 Canal K+ à 2 pores
SPO11-1 5DL	Traes_5DL_0B769D390	Cadenza0269	hom	stop_gained	<b>Q260*</b>	Caa/Taa	<u>TRAES5D02G401000</u>	PHYTOCHROME C
SPO11-1 5DL	Traes_5DL_0B769D390	Cadenza1089	het	stop_gained	<b>W226*</b>	tGg/tAg	TRAES5D02G401000	PHYTOCHROME C
SPO11-2 7BL	Traes_7BL_56B80DB6F	Cadenza1574	het	stop_gained	<b>W14*</b>	tgG/tgA	TraesCS7B02G201200	SPO11-2
SPO11-2 7DL	Traes_7DL_866535B0E	Cadenza1450	hom	stop_gained	<b>Q3*</b>	Cag/Tag	TraesCS7D02G296000	SPO11-2

**Tableau 37:** Liste des mutants EMS *fancM* commandés sur le site du JIC

Protéine ciblée	Annotation site wheat tilling	Numéro	Génotype	Type de mutation	Mutation protéique	Mutation CDS	Traes ref seq IGWSC 2018	Protéine réelle	Taille cds	Taille protéine
FancM 4AL	Traes_4AL_39C161D66	Cadenza0866	het	stop_gained	<b>W317*</b>	tGg/tAg	TraesCS4A02G217700	FANCM	5467	1533aa
FancM 4BS	Traes_4BS_D325D8F34	Cadenza0283	hom	stop_gained	<b>W296*</b>	tGg/tAg	TraesCS4B02G096400	FANCM	5149	1458aa
FancM 4DL	Traes_4DS_68E31FCA6	Cadenza1244	hom	stop_gained	<b>Q292*</b>	Caa/Taa	TraesCS4D02G092800	FANCM	5245	1454aa

### 5.2.1.2 Le cas des mutants *fancM*

Nous avons été confrontés à un autre problème dû au fait que les mutations EMS sont ponctuelles et peuvent quand même donner potentiellement des protéines tronquées qui peuvent s'avérer fonctionnelles. En effet, de la même manière nous avons sélectionné des mutants pour le gène *FancM* avec des gains de codons stop dans les 300 premiers acides aminés des trois homéologues A, B et D (**Tableau 37**).

Nous avons croisé ces mutants entre eux afin d'obtenir une plante hétérozygote de type *abd/ABD* ( $ABD^{+/-}$ ) pour les trois sous-génomes. Puis, à partir de la descendance, nous avons criblé les plantes sœurs mutées de type  $ABD^{+/+}$   $ABD^{+/-}$  et  $abd^{-/-}$  pour le locus *FancM*. Il s'avère que le mutant nul  $abd^{-/-}$  ne présente pas de phénotype particulier par rapport aux plantes sauvages et hétérozygotes aussi bien dans leur croissance qu'au niveau de leur fertilité et en méiose. Ces résultats ne vont pas dans le sens des travaux de Crismani et ses collaborateurs (Crismani et al., 2012b) car nous n'avons pas constaté une augmentation du nombre de chiasmats. Ils ne vont pas non plus dans le sens des travaux de Knoll et ses collaborateurs (Knoll et al., 2012) car leurs mutants présentent des multivalents et une réduction de fertilité (41.36 graines ( $n = 10$ ) contre 51.48 ( $n = 10$ ) pour le sauvage) et un rôle dans l'augmentation de la RH en leur absence. De plus les résultats produits chez le colza et ses progéniteurs est probant (Blary et al., 2018b) et vont dans le sens d'un rôle hyper recombinant. En effet Blary et ses collaborateurs ont montré que la fréquence des CO était augmentée de trois fois chez l'espèce diploïde *Brassica rapa* (AA) et de 1,3 fois chez les espèces euploïdes (*Brassica napus* AACC) et allo-haploïdes (AC). Ils ont aussi démontré que ce rôle de protéine antiCO est indépendant de la voie des ZMM et *in fine* ils ont même précisé un des sites d'action de *FancM* en complétant chez des doubles mutants ( $fancm^{-/-}/msh5^{-/-}$ ) avec des constructions où la glycine 317 est remplacée par une arginine. De même chez le riz, le pois et la tomate (Mieulet et al., 2018b), il a été démontré que les CO étaient augmentés avec la mutation *fancM* (Figure 91).

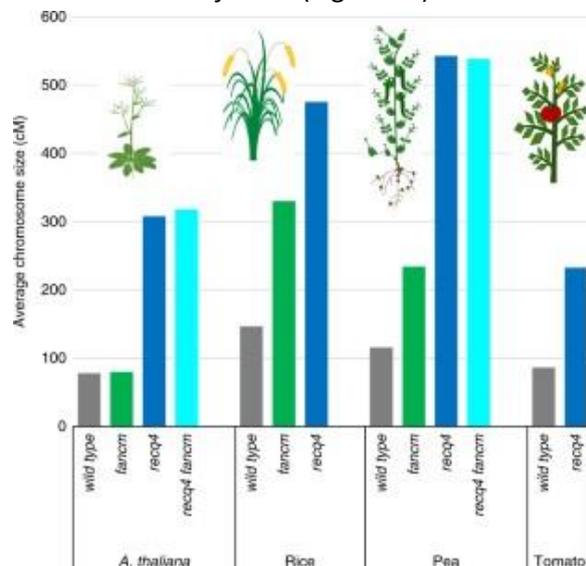


Figure 91 Les mutants agronomiques de *fancM*

Augmentation de la recombinaison chez les mutants *fancm* chez *Arabidopsis*, le riz et le pois (Mieulet et al., 2018a)

Devant ce faisceau d'arguments en faveur de la conservation du rôle hyper-recombinant aussi bien chez les diploïdes que chez les tétraploïdes, on se demande si nos analyses sont suffisantes et si nos mutants générés sont bien impliqués dans cette voie *FancM*. Pourtant, nous avons vérifié que les mutations stop étaient bien en amont des domaines importants pour la protéine *FancM* (**Tableau 38**).

**Tableau 38:** Domaines de la protéine TaFancM  
(source plants.ensembl.org).

Identifiant du gene	Source	Début	Fin	Description	Accession	InterPro
TraesCS4A02G217700	PANTHER	106	1527	FANCM/Mph1-like	PTHR14025:SF20	IPR039686
	SMART	309	502	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	SM00487	IPR014001
	PROSITE profiles	320	488	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	PS51192	IPR014001
	SMART	648	772	Helicase, C-terminal	SM00490	IPR001650
	Pfam	649	771	Helicase, C-terminal	PF00271	IPR001650
	PROSITE profiles	653	822	Helicase, C-terminal	PS51194	IPR001650
	Pfam	312	470	Helicase/UvrB, N-terminal	PF04851	IPR006935
	Superfamily	356	785	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	SSF52540	IPR027417
TraesCS4B02G096400	PANTHER	20	1452	FANCM/Mph1-like	PTHR14025:SF20	IPR039686
	SMART	225	418	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	SM00487	IPR014001
	PROSITE profiles	236	404	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	PS51192	IPR014001
	SMART	564	688	Helicase, C-terminal	SM00490	IPR001650
	Pfam	565	687	Helicase, C-terminal	PF00271	IPR001650
	PROSITE profiles	569	738	Helicase, C-terminal	PS51194	IPR001650
	Pfam	228	386	Helicase/UvrB, N-terminal	PF04851	IPR006935
	Superfamily	272	701	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	SSF52540	IPR027417
TraesCS4D02G092800	PANTHER	20	1448	FANCM/Mph1-like	PTHR14025:SF20	IPR039686
	SMART	229	422	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	SM00487	IPR014001
	PROSITE profiles	240	408	Helicase superfamily 1/2, ATP-binding domain	PS51192	IPR014001
	SMART	568	692	Helicase, C-terminal	SM00490	IPR001650
	Pfam	569	691	Helicase, C-terminal	PF00271	IPR001650
	PROSITE profiles	573	742	Helicase, C-terminal	PS51194	IPR001650
	Pfam	232	390	Helicase/UvrB, N-terminal	PF04851	IPR006935
	Superfamily	276	705	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	SSF52540	IPR027417

On constate que toutes nos mutations sont situées soit dans le premier domaine hélicase soit en et ceci pour les 3 homéo mutations *fancm*. Nos géotypages KASP (Kompetitive allele specific PCR) ont aussi été vérifiés par deux fois. Afin de vérifier que nos protéines de blés sont bien impliquées dans le processus anti CO, nous pourrions compléter les mêmes mutants d'At utilisés dans l'étude que celle de Blary et collaborateurs (Blary et al., 2018b).

### **5.2.1.3 Arguments en faveur de l'irradiation**

Ces arguments nous confortent dans le fait d'avoir utilisé l'irradiation comme technique de mutagenèse aléatoire car elle est radicale et a pour particularité d'induire de grosses délétions. Il est vrai que dans certains cas il peut manquer un bras de chromosome comme cela avait été le cas pour un mutant *msh7* (H Serra, données non publiées). De plus au départ de la thèse nous avons mené les mêmes croisements que pour *Spo11-2* pour les gènes hyper-recombinants *FancM*, *Fidgetin*, *RecQ4*. Nous avons seulement eu des mutants nuls pour les mutants *RecQ4*. Ceci nous permet désormais de garantir que le suivi de nos mutations réside dans notre méthodologie inspirée par Raphaël Mercier lors d'un comité de thèse qui est d'utiliser des plantes sœurs comme témoins internes. En effet les plantes issues du même géniteur ont un fond génétique très proche. Le fait de cribler les différents mutants et témoins au sein de la même descendance a pour incidence de lisser le fond génétique très muté pour ne mettre en exergue que les mutations d'intérêt sur le même locus. De plus, le fait d'avoir géotypé les mutants à l'aide de la puce axiom 35K, nous a permis de développer des outils en collaboration avec une autre équipe nous permettant de dresser la carte d'identité de chaque mutant de la population. Cette carte d'identité nous aidera à l'avenir à prévoir nos croisements et à potentialiser nos chances d'obtenir des mutants nuls. En effet, l'irradiation nous permet de pouvoir cribler en moyenne au moins deux allèles mutagènes par gène recherché. Ainsi, si l'un d'eux est trop délétère il sera écarté dès le début, évitant des croisements inutiles.

## **5.2.2 Réflexions au sujet des résultats obtenus sur les mutants *spo11-2***

### **5.2.2.1 Le casse-tête des foyers chez les mutants**

Nous avons pu voir que le rôle de la protéine SPO11-2 est très conservé au sein de la diversité des plantes, qu'elles soient diploïdes ou hexaploïdes. Un des résultats considérables de ce travail a été de pouvoir donner pour la première fois un chiffre approximatif du nombre de foyers DMC1 chez le blé tendre. En effet un gros travail d'optimisation a été nécessaire afin de ne pas avancer des données trop éloignées de la réalité. En effet, il nous a fallu développer notre anticorps car l'offre commerciale chez la plante reste très limitée même si on commence à voir des anticorps dédiés à la vente. Le point sensible qui nous a demandé des efforts considérables a été de savoir comment discerner un foyer d'une présence en quantité moindre de la protéine. Si l'anticorps est très spécifique et fonctionne bien, la question ne se pose pas ; c'est ce qu'on retrouve dans des immunomarquages faits sur des biopsies de testicules humains ou sur des méiocytes de souris. Il faut savoir que dans toutes les analyses de foyers DMC1, on distingue toujours en fond de l'image de microscopie la présence de protéines TaDMC1 qui, même à la phase pachytène, forment des filaments et suivent le signal de TaZYP1 (supplementary data Figure 7B (Benyahya et al., 2020)). Pour étayer notre propos, nous avons recensé quelques images qui ont été conduites chez les mutants nuls *spo11-2<sup>-/-</sup>* (Figure 92).

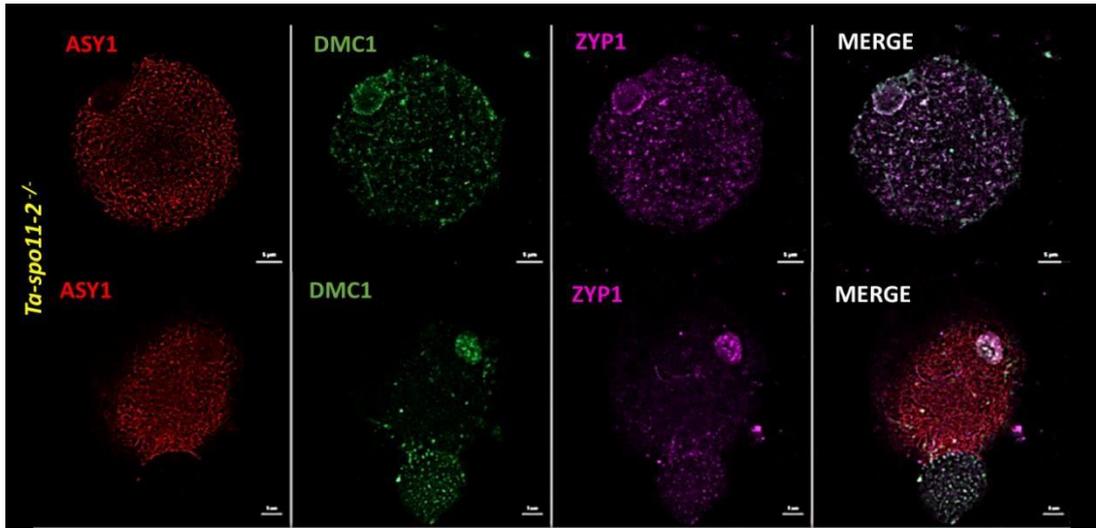


Figure 92 La difficulté d'établir le seuil des foyers en microscopie

Présence de la protéine TaDMC1 au noyau des cellules de méiocytes des mutants *Taspo11-/-*.

Les mutants *AtMTOFVIB* n'ont pas de foyers DMC1 mais des foyers MTOFVIB significativement similaires au mutant *Atspo11-1-3* (entre 50 et 100) (Figure 93) (Vrielynck et al., 2016). On retrouve en revanche des foyers MTOFVIB chez les mutants *Atspo11-2-2*, *Atspo11-2-3* et *Atspo11-2-4* avec des niveaux avoisinants ceux des témoins. Ces mutants sont peut-être hypomorphes ce qui expliquerait pourquoi on retrouve ces foyers.

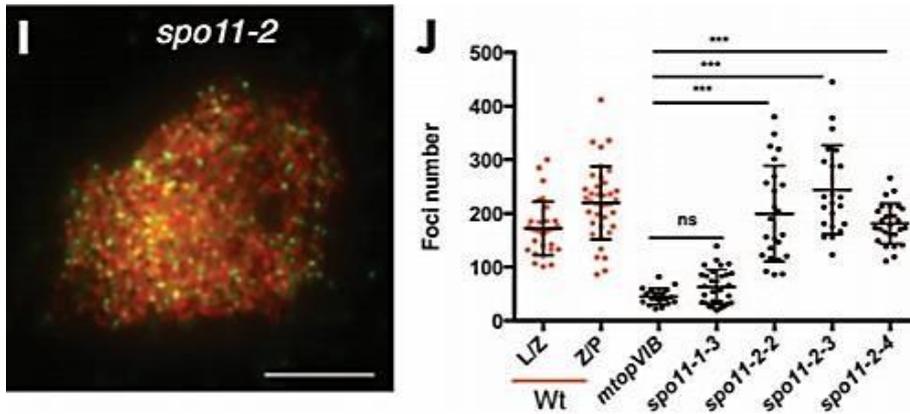


Figure 93 Des foyers MTOFVIB présents chez *Atspo11-2-/-*

Foyers MTOFVIB chez les 3 mutants *Atspo11-2* et foyers MTOFVIB de type bruit de fond chez les mutants *Atspo11-1-3* et le mutant *AtMTOFVIB* (Vrielynck et al., 2016).

En regardant au niveau de la littérature, on ne comprend pas toujours comment sur certaines images des foyers DMC1 peuvent être comptés. Un exemple sur ces images qui datent de 2002 sur des hybrides de Lys ((George et al., 2002a) (Figure 94). Ils ne donnent des chiffres que pour le diploïde au Mid zygotène : 656 foyers (SD = 51) au zygotène précoce : 1015 foyers (SD = 162)

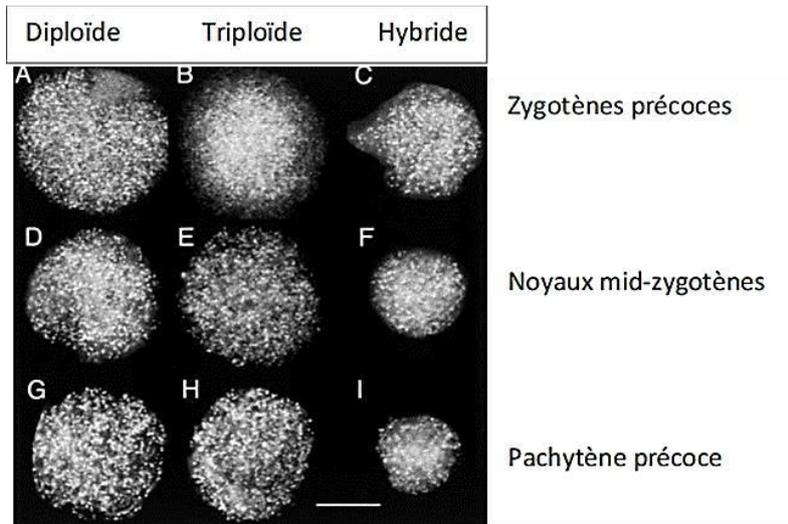


Figure 94 foyers DMC1 détectés chez le lys

(George et al., 2002b)

Un autre exemple peut être cité avec un article beaucoup plus récent pour lequel les auteurs utilisent la microscopie à super résolution afin de révéler la dynamique de position des recombinaisons (Slotman et al., 2020). Au zygotène on peut voir sur la Figure 95 que pour le marquage DMC1, les spots forment des lignes par endroit et il paraît très compliqué de dénombrer des foyers.

### Zygotène

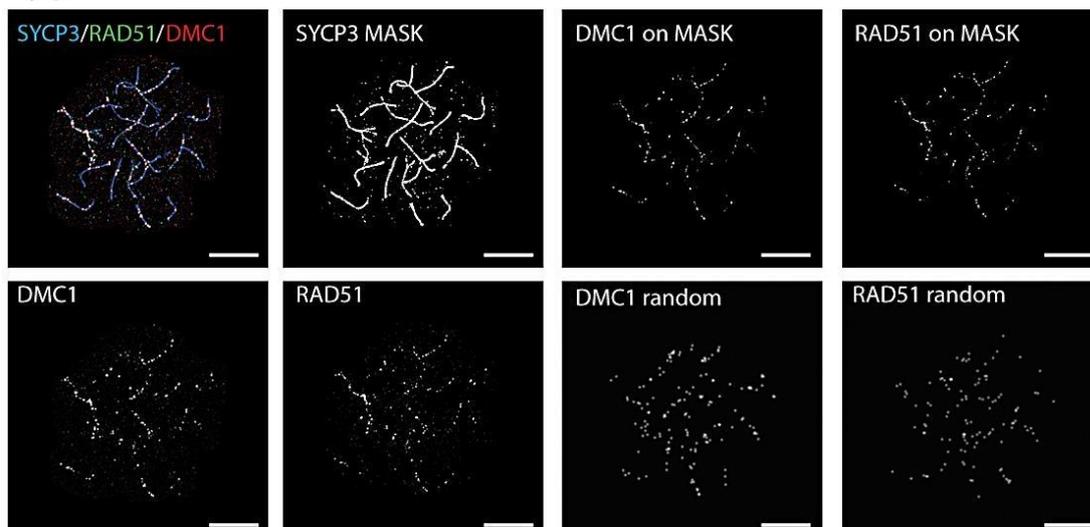


Figure 95 Des foyers difficiles à distinguer même en super-résolution

Analyse de la proximité entre les foyers DMC1 et RAD51 situés sur le complexe synaptonémal au stade zygotène par microscopie confocale (Slotman et al., 2020).

Pour finir sur ce point, au laboratoire nous avons également essayé de caractériser le nombre de CDB en utilisant un anticorps  $\gamma$ H2AX synthétisé chez *At* qui semblait très bien fonctionner mais une fois que nous l'avons utilisé chez les mutants nuls *Taspo11-2<sup>-/-</sup>*, nous avons les mêmes profils de foyers (Figure 96). Nous n'avons pas compris pourquoi nous avons ces profils et par souci de cohérence nous avons préféré écarter ce marqueur et utiliser DMC1.

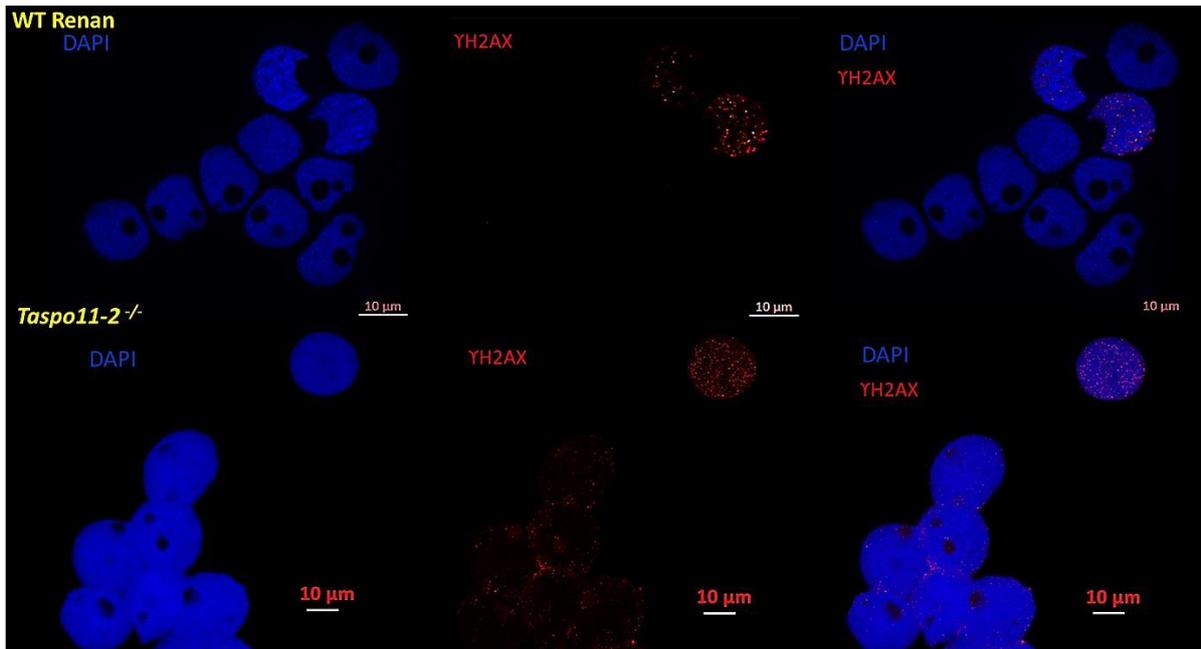


Figure 96 Immunomarquage  $\gamma$ H2AX sur méiocytes de blé

Les foyers  $\gamma$ H2AX sont encore visibles chez le mutant nul *Taspo11-2*<sup>-/-</sup> de manière similaire avec le témoin WT Renan non irradié

Pour valider les foyers de recombinaison il faudrait utiliser un autre marqueur de la recombinaison : soit RAD51 soit un marqueur des CDB comme le TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Cette technique est basée sur la liaison de nucléotides marqués par un fluorochrome aux CDB (Gupta et al., 2017). Ainsi les CDB sont visualisées en microscopie ou bien même au cytomètre en flux afin d'automatiser les analyses. De plus ceci nous permettra d'invalider ou pas l'anticorps  $\gamma$ H2AX.

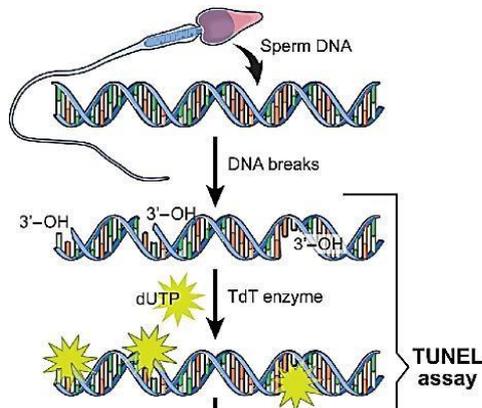


Figure 97 Principe du Tunnel assay

Dans des cellules en apoptose ou cellules sexuelles comme le spermatozoïde, le TUNEL permet la fixation au niveau des CDB des nucléotides qui sont couplés à de la fluorescence qui peut être détectée en microscopie ou bien même en cytométrie en flux (Gupta et al., 2017)

## **5.2.2.2 L'activité résiduelle de la copie TaSPO11-2-7A**

### **5.2.2.2.1 Arguments en faveur de l'hypothèse du saut d'exon 2**

Un autre point très intéressant à mettre en avant est le fait que le mutant *bd*<sup>-/-</sup> est capable encore de générer presque 5 bivalents sur 21 et que l'on compte 1/5<sup>ème</sup> des foyers de recombinaison par rapport au témoin. Cette activité résiduelle de la protéine TaSPO11-2-7A semble insuffisante pour

complémenter les mutants d'*At spo11-2*<sup>-/-</sup>. La question qui reste en suspens ici est de savoir comment cette activité résiduelle est maintenue chez le blé et sous quelle forme la protéine TaSPO11-2-7A est active. Nous n'avons pas encore les éléments expérimentaux nous permettant de répondre à ces deux questions. Cependant, de nombreux arguments bibliographiques peuvent nous permettre de dresser des hypothèses robustes. La plus probable semblerait être que la copie contient un saut de l'exon 2. En effet trois arguments sont en faveur de cette hypothèse : tout d'abord la cellule a horreur de voir deux jonctions exons/exons séparées par un codon stop après l'épissage. Elle met en place la fixation de complexes protéiques que l'on appelle les Exons Junction Complexes ou EJC au niveau de ces jonctions (Figure 98). Ils vont jouer le rôle de senseurs au niveau du cytoplasme lorsque les ribosomes vont traduire l'ARN, ils enlèvent aussi les EJC. Si le ribosome trouve un EJC après avoir lu un codon stop, il va rester bloqué et être pris en charge par la voie du NMD (Non mediated decay) (Chang et al., 2007).

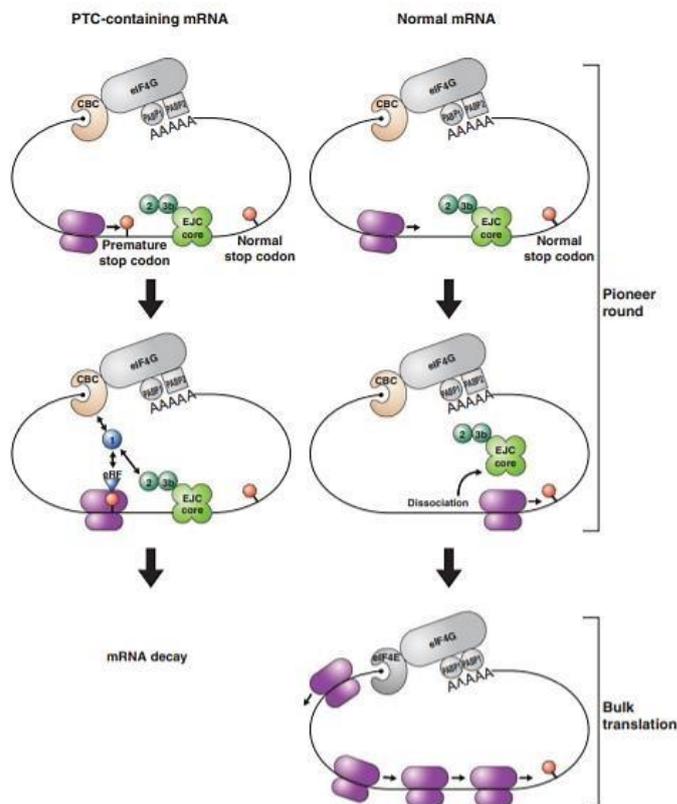


Figure 98 Principe de la voie du Non-mediated-decay

(Chang et al., 2007)

Ce mécanisme permet la dégradation de l'ARN et évite à la cellule de générer des protéines tronquées ou qui vont jouer le rôle de dominant négatif. Cependant, la cellule est capable de mettre en place un tout autre mécanisme aboutissant au saut d'exon que l'on appelle le NAS (Non sense associated altered splicing) (Wang et al., 2002). Les mécanismes moléculaires sont encore peu connus mais néanmoins, de nombreuses observations témoignent de la véracité de ce phénomène. En effet il a été remarqué dans une étude sur 22 mutants CRISPR chez les lapins que lorsqu'un codon stop prématuré était généré par cette transformation dans un exon, l'exon subissait systématiquement un saut d'exon (Sui et al., 2018). De plus, pour lutter contre la myopathie de Duchêne des essais cliniques sont en cours, où à la place du codon stop, de petits oligonucléotides antisens (Aos) ou des molécules appelées morpholinos (PMO phosphorodiamidate morpholino oligo) sont utilisés. Ces molécules vont aller se fixer sur l'exon délétère ce qui va déclencher le mécanisme du saut d'exon.

Le NMD et le NAS peuvent être considérées comme des réponses « yin et yang », respectivement, car elles apportent des solutions négatives et positives au problème de l'éradication des transcriptions aberrantes (Wang et al., 2002).

Le deuxième argument réside dans le fait que le saut de l'exon 2 du gène *Spo11-2* existe déjà chez la plante *Physcomitrella patens* qui est une mousse (Figure 99e) (Sprink and Hartung, 2014).

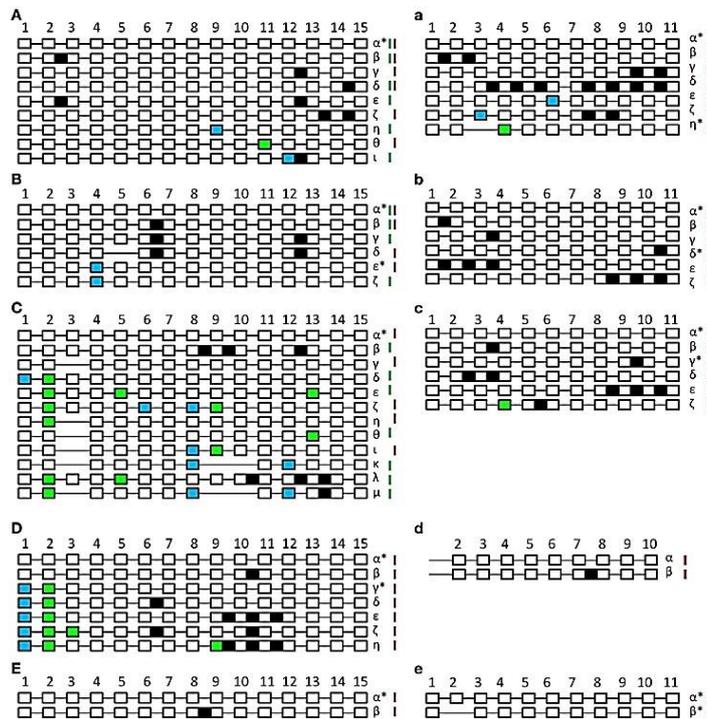


Figure 99 Diversité d'épissage des gènes Spo11 chez différentes espèces.

Schéma sans échelle des différentes formes d'épissage de SPO11-1 (A-E) et -2 (a-e) de *At* (A, a), *Brassica rapa* (B, b), *Carica papaya* (C, c), *Oryza sativa* (D, d), et *Physcomitrella patens* (E, e). (Sprink and Hartung, 2014).

De plus l'épissage alternatif est très répandu chez la plante (Reddy et al., 2013). En effet les exons skipping sont présents à plus de 8% des cas par rapport à la forme commune. On les retrouve à plus de 40% chez l'humain. D'ailleurs chez les mammifères il n'y a qu'une seule protéine SPO11 qui est transcrite sous deux formes nommées  $\alpha$  et  $\beta$ , qui sautent ou incluent respectivement l'exon 2 (38 aa) (Metzler-Guillemain and de Massy, 2000). En effet la version  $\beta$  est impliquée dans la recombinaison tardive des régions pseudo-autosomales (PAR) qui sont utilisées dans la recombinaison des chromosomes sexuels X et Y (Kauppi et al., 2011). Les auteurs de ces études ont d'ailleurs aussi noté que cette région PAR occupe de longs axes chromosomiques avec de courtes boucles qui normalement favorisent la formation des CDB. Or au contraire, ils observent un retard dans l'apparition des foyers de recombinaison au niveau de ces régions spécifiquement. Le mécanisme moléculaire de l'épissage alternatif a été résolu par un gros travail effectué par une équipe italienne (Cesari et al., 2020). Ils ont démontré (Figure 100) que la régulation de l'épissage était dépendant de la processivité de la polymérase RNA PII et que sa célérité était modulée par un facteur d'épissage le hnRNPF/H. En effet lorsque ce facteur est absent au stade P14 de maturation des spermatogonies le facteur Sam68 se fixe sur les sites d'épissage de l'exon2 en les masquant ce qui évite le saut d'exon et l'accumulation des formes  $\beta$ . Au stade P18, quand les cellules entrent en méiose, la RNA PII ralentit et laisse le temps au facteur d'épissage ce qui induit le saut d'exon et l'émergence de la forme  $\alpha$ .

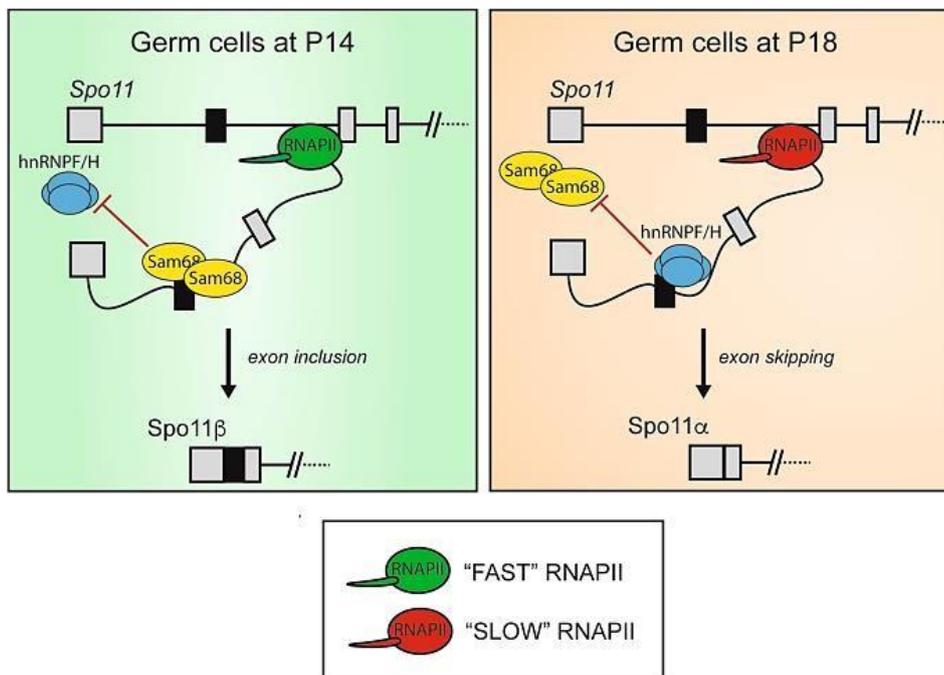
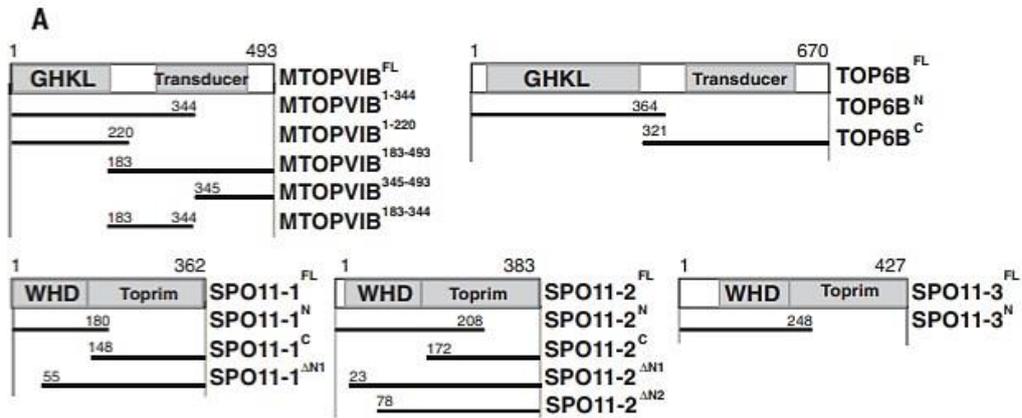


Figure 100 Mécanisme d'épissage alternatif du gène spo11 murin

Représentation schématique du contrôle combinatoire de l'épissage alternatif de Spo11 suscité par la dynamique de RNAPII et le recrutement de hnRNPH ou de Sam68. À P14, le taux d'élongation rapide de RNAPII favorise le recrutement de Sam68 et l'inclusion de l'exon 2, ce qui donne SPO11β. A P18, la réduction de la vitesse de RNAPII favorise le recrutement de hnRNPH, qui concurrence Sam68 et favorise le saut de l'exon 2 et l'épissage de SPO11α (Cesari et al., 2020).

La question qui n'a pas encore été résolue est de savoir comment la forme β, qui doit agir en retard au niveau des régions PAR, est protégée jusqu'à son action. Nous savons aussi que la forme α qui subit un saut d'exon subit aussi une rétention d'intron au niveau des exons 8-9 de 13 acides aminés (MetzlerGuillemain and de Massy, 2000). Donc cette version est deletée au niveau de l'exon 2 mais retient l'intron 8, il serait intéressant de savoir si ces sites sont impliqués dans des interactions avec les autres partenaires du complexe ou d'autres protéines.

Des études d'interaction *in vitro* ont été réalisées en utilisant deux techniques indépendantes. Le test du double hybride chez la levure (Yeast two hybride Y2H Figure 101) le système le BiFC (Bimolecular fluorescence complementation Figure 102) chez le tabac à partir des protéines AtSPO11-1, AtSPO11-2 et la AtMTOPVIB. L'équipe de Mathilde Grelon (Vrielynck et al., 2016) a permis de mettre en exergue que les protéines AtSPO11-1 et AtSPO11-2 interagissent entre elles en présence de AtMTOPVIB uniquement. Il ne se forme jamais d'homodimère contrairement à la protéine AtSPO11-3 qui est capable de s'homodimériser en présence et absence de la AtMTOPVIB dans le BiFC uniquement.



**B**

	SPO11-1				SPO11-2					SPO11-3	
	FL	N	C	$\Delta$ N1	FL	N	C	$\Delta$ N1	$\Delta$ N2	FL	N
MTOPVIB <sup>FL</sup>	++	++	-	-	+	++	-	-	-	++	++
MTOPVIB <sup>1-344</sup>	-	-		-	-	-		-	-	-	-
MTOPVIB <sup>1-220</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MTOPVIB <sup>183-493</sup>	++	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
MTOPVIB <sup>345-493</sup>	+	+		-	-	+		-	-	+	+
MTOPVIB <sup>183-344</sup>		-			-						-
TOP6B <sup>FL</sup>	-			-	-			-	-	++	
TOP6B <sup>N</sup>		-				-					-
TOP6B <sup>C</sup>	-	-		-	-	-		-	-	++	+

**C**

	SPO11-1 <sup>FL</sup>	SPO11-2 <sup>FL</sup>	SPO11-3 <sup>FL</sup>	
SPO11-1 <sup>FL</sup>	-	-	-	In presence of :
SPO11-2 <sup>FL</sup>	-	+	-	
SPO11-3 <sup>FL</sup>	-	-	+	

empty pARC352  
 MTOPVIB  
 TOP6B

Figure 101 Test du double-hybride de levure Y2H sur le complexe SPO11

Set des protéines d'Arabidopsis du complexe SPO11 intègres ou tronquées à divers endroits utilisées dans le test du double hybride (fait chez la levure) afin de déterminer avec précision les aa impliqués dans l'interaction (Vrielynck et al., 2016).

AD \ BD	SPO11-1	SPO11-1 <sup>N</sup>	SPO11-1 <sup>ΔN1</sup>	SPO11-2	SPO11-2 <sup>N</sup>	SPO11-2 <sup>ΔN1</sup>	SPO11-2 <sup>ΔN2</sup>	SPO11-3	SPO11-3 <sup>N</sup>
SPO11-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SPO11-1 <sup>N</sup>									
SPO11-1 <sup>ΔN1</sup>									
SPO11-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SPO11-2 <sup>N</sup>									
SPO11-2 <sup>ΔN1</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SPO11-2 <sup>ΔN2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPO11-3	-	+	-	-	-	-	-	+	+
SPO11-3 <sup>N</sup>									

 empty pARC352

 MTOPVIB

 TOP6B

 not tested

Figure 102 Test du BiFC sur le complexe SPO11

Set des protéines d'Arabidopsis du complexe SPO11 intègres ou tronquées à divers endroits utilisées dans le test du BiFC (fait chez le tabac) afin de déterminer avec précision les aa impliqués dans l'interaction avec en jaune sans vecteur en rouge avec la MTOPVIB et en vert la TOP6B (Vrielynck et al., 2016).

Au niveau du double hybride de levure (Y2H) en revanche, en l'absence de la AtMTOPIVIB, on ne note pas d'homodimérisation de la protéine AtSPO11-3. De même on note aussi une légère contradiction entre les résultats du 2YH et du BiFC pour les formes où l'on ne retrouve que les parties N-terminales des deux protéines AtSPO11 et la partie entière de la AtMTOPIVIB (BiFC) et les 149 aa en C-terminal de la protéine (Y2H). C'est pourquoi il faut la validation par les deux approches pour conclure à des interactions potentiellement réelles *in vitro*. Il ne faut pas perdre de vue aussi qu'en contexte *in vivo*, les protéines sont repliées et de nouvelles interfaces d'interactions ou d'encombrements stériques peuvent se créer. Ce qu'il faut retenir de cette étude pour les transposer à notre modèle est ceci : Les aa en position N-terminale de SPO11-1 ou -2 interagissent avec la partie C-terminale de la MTOPIVIB (**Tableau 39**)

**Tableau 39:** Résumé des interactions du complexe SPO11 d'Arabidopsis

Résultats majeurs des deux études d'interaction protéines protéines (Vrielynck et al., 2016).

Protéine	Déletion des résidus cibles		Nombres d'aa impliqués dans l'interaction
AtSPO11-1	ΔN1	55 à 362	307
AtSPO11-2	ΔN2-ΔN1	23 à 78	55
AtMTOPIVIB	MTOPIVIB <sub>345-493</sub>	345 à 493	149

Afin d'aller plus loin dans la compréhension et dans l'exploitation des données d'interaction nous avons aligné les protéines du blé avec celles d'At (Figure 103).

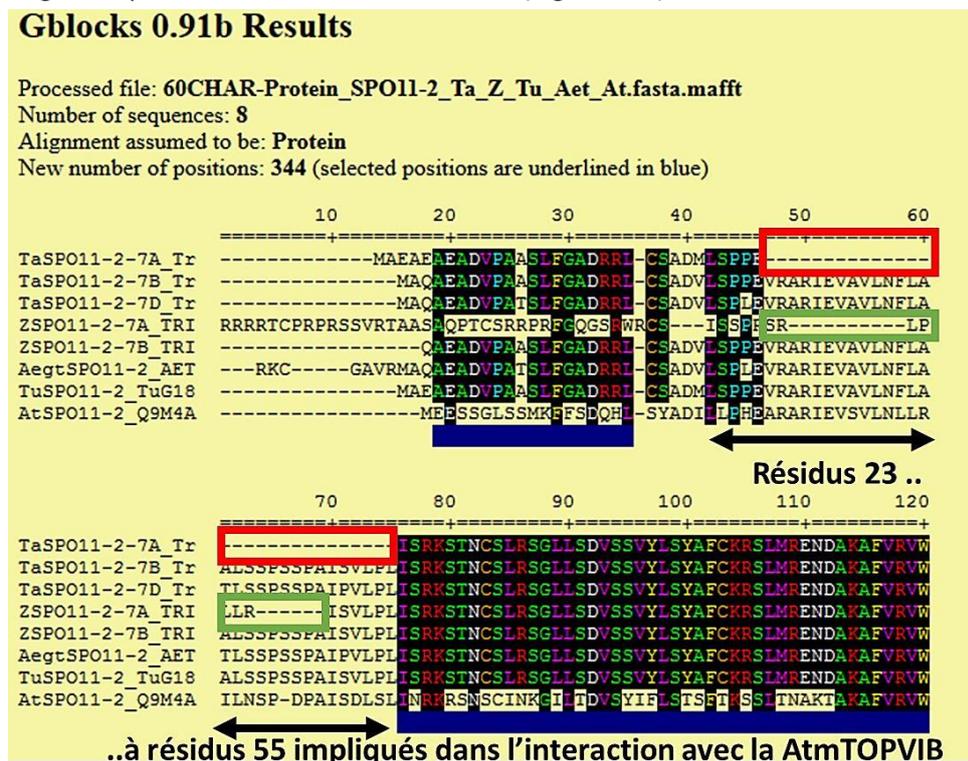


Figure 103 La délétion due au saut d'exon prédit

La délétion due au saut d'exon prédit correspond au site d'interaction avec AtMTOPIVIB. Alignement multiple des protéines SPO11-2 des tritiques : (blé tendre (TaSPO11-2), blé dur (ZSPO11-2), *T. urartu* (TuSPO11-2) et *Ae. tauschii* (AegtSPO11-2)) et de la protéine AtSPO11-2, dans l'objectif de positionner le saut d'exon 2 prédit ab initio (en rouge) pour la protéine TaSPO11-2-7A et le site d'interaction avec la protéine AtMTOPIVIB (flèches noires).

Ces données nous indiquent que la protéine TaSPO11-2-7A naturellement mutée et prédite par TriAnnot soit avec le saut d'exon 2 soit avec le site alternatif de traduction en exon 3 sera privée du site d'interaction putatif à la protéine TaMTOPIVIB. Bien sûr, ces données ne sont pour le moment que des hypothèses qu'il nous faudra impérativement confirmer ou infirmer afin d'étayer les connaissances sur le mode de fonctionnement du complexe SPO11.

Au sein de notre équipe, il a été mis en avant aussi que les motifs 6 et 7 qui sont situés en Cter sont ceux qui sont les plus conservés parmi les 105 espèces considérées chez la protéine SPO11-1 (Da Ines et al., 2020a) (Figure 104).

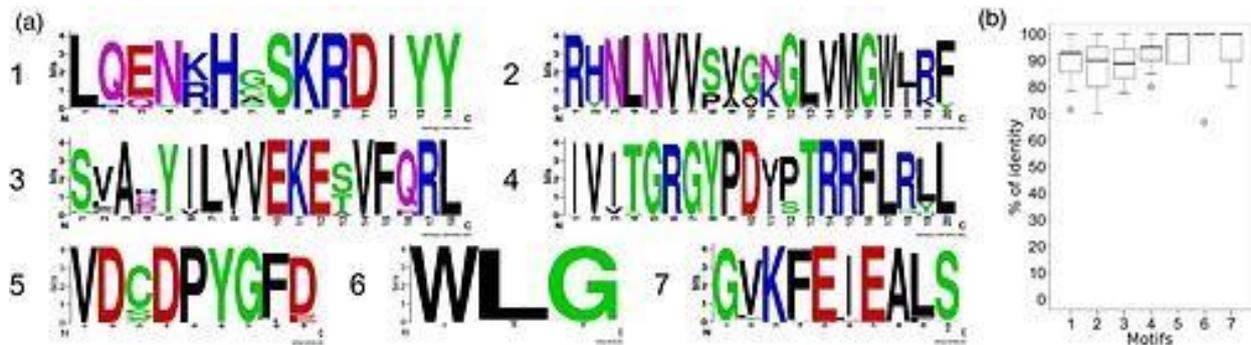


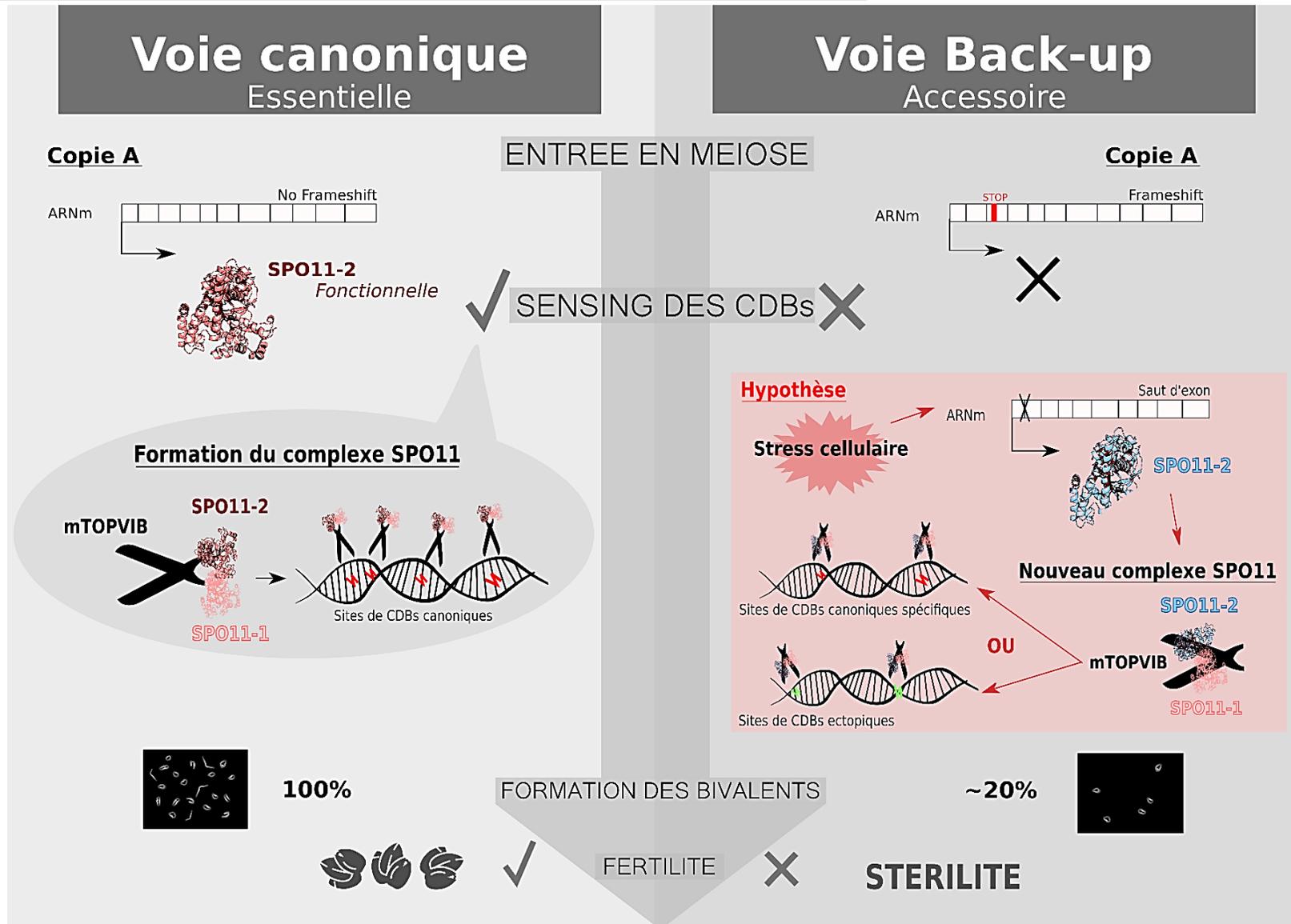
Figure 104 Motifs conservés SPO11-1

Séquences consensus et niveaux de conservation des motifs SPO11-1 chez 105 espèces (Da Ines et al., 2020a)

Il serait intéressant d'étudier de plus près ces motifs qui n'ont pas à ce jour de fonction définie et qui peuvent être des pistes qui expliqueraient l'activité résiduelle de la forme TaSPO11-2-7A. En effet, on pourrait imaginer que comme l'isoforme  $\alpha$  de la protéine SPO11 de souris, on perd l'exon 2 et par extension, l'interaction à la MTOPIVIB sur ce site mais que d'autres sites créés soit par rétention d'intron en Cter soit par accumulation avec les motifs 6 ou 7 permettent à la protéine de former soit le même complexe SPO11 soit un tout autre complexe fonctionnel restaurant son activité nucléasique.

Pour étayer ces hypothèses nous avons construit un modèle soutenu par les arguments bibliographiques observés chez différentes espèces et cités au-dessus.

5.2.2.2.2 Modèle hypothétique du mode de fonctionnement de TaSPO11-2-7A



Nous proposons que la protéine TaSPO11-2-7A possède une activité résiduelle car elle ferait partie de la voie secours ou back up accessoire, permettant d'induire des CDB nécessaires en cas d'échec ou en support de la voie canonique essentielle d'induction des CDB. Elle agirait un peu comme les voies des CO de classe II qui impliquent l'acteur MUS81.

En contexte canonique, la cellule entre en méiose et débute son programme car les conditions environnementales sont favorables (facteurs de croissance). Lorsque l'ARNm Taspo11-2-7A n'a pas de frameshift (décalage du cadre de lecture présent naturellement pour cette copie chez le blé tendre), il est traduit en protéine fonctionnelle TaSPO11-2-7A. Cette protéine va pouvoir se lier grâce à son site d'interaction à ses cofacteurs TaSPO11-1 et à la TaMTOPIVIB afin de former un complexe SPO11 actif. Ce complexe va aller cibler des sites de CDB dits canoniques sur l'ADN sans encombrement physique (chromatine ouverte). Le nombre minimum de CDB nécessaires est atteint et les protéines impliquées dans la surveillance de ces CDB vont déclencher rapidement le passage aux étapes suivantes de la méiose. En Métaphase I le nombre de bivalents nécessaires atteint un pourcentage de 100% et permet ainsi une bonne ségrégation des chromosomes homologues et *in fine* une fertilité tout à fait normale.

En contexte de voie back-up, la cellule entre aussi en méiose pour les mêmes raisons que précédemment et le programme est aussi lancé. Lorsque l'ARNm Taspo11-2-7A possède le frameshift, il commence à être traduit et lorsque le ribosome lit le codon stop prématuré il se bloque, et la voie du NMD est activée. Cette voie va permettre au fur et mesure de la transcription de ce gène, la destruction des ARNm délétères. De ce fait il n'y a pas de protéine traduite et par conséquent pas de formation du complexe SPO11 et donc pas de CDB. Ce manque de CDB attendues en début de méiose va être détecté par des protéines qui régulent l'activité de SPO11 (ATM). Cette situation va générer un allongement de la prophase I afin de tenter de remédier à cette situation. Devant le manque de solutions ce stress va se traduire par des petits défauts de précision ou de régulation au niveau des mécanismes permettant l'expression des gènes en protéines. On pourra voir apparaître des défauts de transcription, d'épissage et de traduction des ARN. Ainsi nous pourrions voir émerger des formes protéiques qui en contexte non stressé sont peu ou pas présentes. Le saut de l'exon 2 de la protéine SPO11-2 est un phénomène qui est partagé par plusieurs espèces et semble avoir un bon degré de conservation évolutif. En contexte de stress métabolique, les machineries de transcription sont ralenties et les machineries d'épissage vont être impactées et vont moduler leur activité en fonction des régulateurs présents ou absents. L'ARNm ne contenant pas l'exon 2 va être traduit en protéine déletée au niveau de la zone sans l'exon et enrichie en résidus protéiques dû à des retentions d'introns en fin de séquence. Nous savons que cette région déletée est impliquée dans l'interaction avec la MTOPIVIB chez Arabidopsis. Nous posons l'hypothèse que ces enrichissements en résidus dû à des rétentions d'introns vont permettre l'apparition de nouvelles interfaces protéiques qui pourraient jouer dans l'interaction avec la TaMTOPIVIB. On suppose qu'un nouveau complexe SPO11 présentant une toute autre conformation 3D se forme, et qu'il pourrait soit difficilement cibler les sites canoniques de CDB spécifiques soit cibler des sites ectopiques de CDB non ciblés en contexte normal. Ces CDB vont ensuite être prises en charge et permettre la formation de presque 20% de bivalents. Cette activité étant parcellaire et accessoire, elle n'est pas apte à rétablir la fertilité.

Afin de tester ce modèle, il serait intéressant de travailler sur les protéines des mutants *bd<sup>-/-</sup>* car ils sont stressés et ne vont exprimer que la forme Frameshit naturelle copie A de TaSPO11-2. Nous proposons d'isoler les protéines totales de ces plantes et de séquencer les résidus par spectrométrie de masse. Si nous trouvons des protéines sans le domaine d'interaction à la MTOPIVIB alors nous pourrions accorder du crédit à ces hypothèses et tenter de résoudre les mécanismes moléculaires qui en sont à l'origine. De plus, pour voir si ce sont toujours les mêmes chromosomes qui recombinent et de ce fait toujours les mêmes régions ciblées nous pourrions faire de la peinture chromosomique basée sur l'hybridation *in situ* (FISH et GISH).

## 5.3 Partie 3 : Comment les gènes du complexe Spo11 ont évolués chez le blé ?

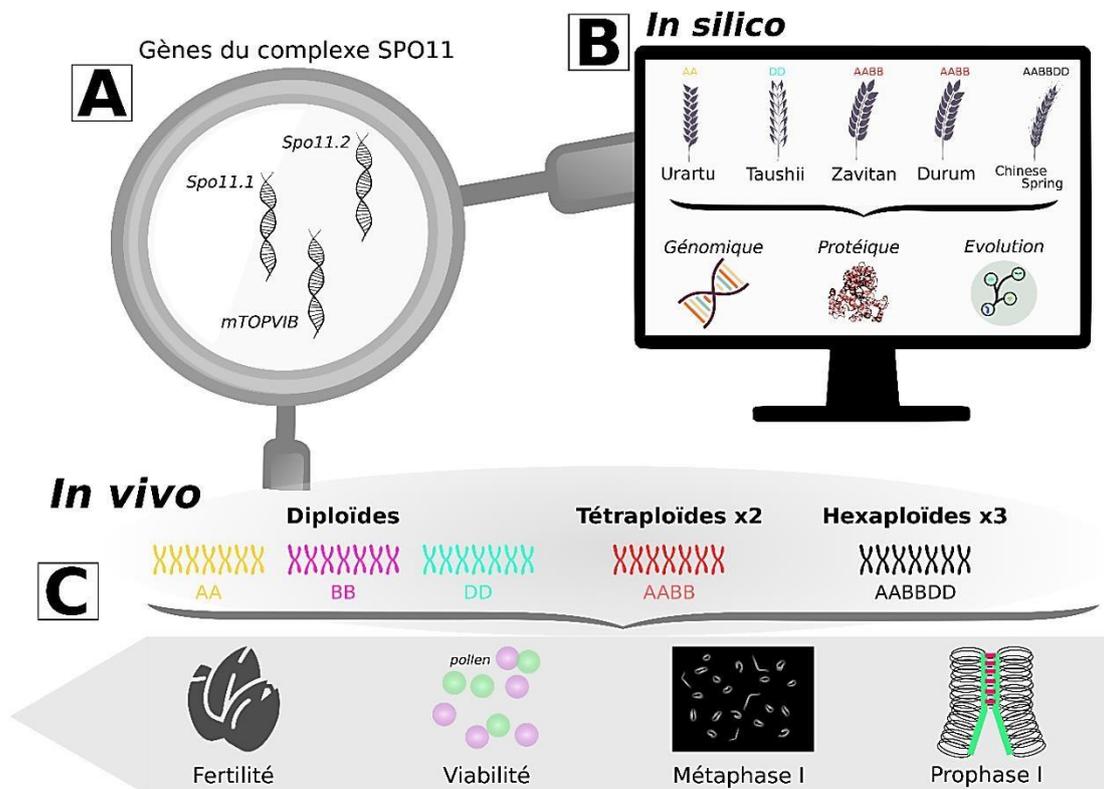


Figure 105 Résumé schématique des principaux résultats de l'axe 3

Résumé schématique de l'axe 3 ; les gènes du complexe SPO11 ont été analysés au travers de deux approches. En B ; les séquences génomiques CDS et protéiques ont été recherchés chez les progéniteurs du blé tendre. En C, l'approche expérimentale a consisté à conduire des caractérisations de la méiose au niveau des progéniteurs diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes.

Le fait de travailler sur le blé tendre qui est une espèce hexaploïde dont on connaît les principaux progéniteurs est une grande opportunité afin de pouvoir déceler et mettre en avant l'histoire évolutive des gènes de la méiose dans les autres contextes ploïdiques. Afin de répondre à cette question de l'évolution du complexe SPO11, nous avons axé nos recherches sur deux aspects. En premier lieu nous avons conduit plutôt des études *in silico* au niveau des gènes, des CDS et des protéines, car nous avons profité de la publication successive des génomes des diploïdes Urartu et Tauschii (Ling et al., 2018; Luo et al., 2017) des tétraploïdes Zavitan et Durum (Avni et al., 2017; Maccaferri et al., 2019) et bien sûr du blé tendre hexaploïde CS (IWGSC et al., 2018b). En second lieu nous avons travaillé sur les plantes progénitrices diploïdes (Urartu, Monococcum, Speltoides et Tauschii) tétraploïdes (Dicoccoides, Dicoccum et Maimara) et hexaploïdes (CS, Renan, Saissette de maninet, Cadenza). Nous avons conduit les analyses méiotiques développées à l'axe 1, à savoir des caractérisations du nombre de chiasmas en métaphase I, du nombre de foyers de recombinaison DMC1 et de l'observation d'atlas méiotique et de la mise en place du complexe synaptonémal.

### 5.3.1 Bioanalyse du complexe SPO11

Une des limites des bases de données utilisées pour ces études est le fait que les annotations ne sont pas toutes maturées ou abouties. En effet nous avons pu voir que le nombre d'exons ou les tailles de protéines étaient très différentes d'une espèce à l'autre alors qu'elles appartiennent toutes au genre Triticé. Les tailles et nombres d'exons sont conservés entre At et le blé tendre (avec pour Spo11-1, 15 exons pour Spo11-2, 11 exons et pour MTOPVIB 12 exons). Pourtant de nombreux pipelines ont été développés permettant de croiser les données obtenues *ab initio* avec les évidences biologiques (TriAnnot, (Leroy et al., 2012)). Faute de temps, nous n'avons pas pu réannoter manuellement chaque gène pour chaque espèce et ces données ne sont donc que parcellaires et peu comparables entre-elles.

Une des informations majeures qui ressort de ces analyses est le fait que la MTOPVIB est la protéine la moins bien conservée. Cette information avait déjà été mise en avant du fait de sa découverte tardive en 2016 alors que les protéines SPO11 sont connues depuis 1997 comme étant impliquée dans la recombinaison méiotique. Ceci est dû au fait que les protéines MTOPVIB sont bien moins conservées avec des scores et des pourcentages d'identité faibles autour de 40% avec At et des scores très bas. Pour les protéines SPO11 nous avons des valeurs plus hautes, autour de 65% (**Tableau 32**). Le niveau de conservation varie entre les protéines SPO11 avec une conservation plus robuste pour la protéine SPO11-2 avec une fourchette autour de 65-67% d'identité avec *Arabidopsis* contre 58-63% pour SPO11-1. Cette remarque a d'ailleurs été observée dans l'équipe lorsqu'il y a eu des complémentations hétérologues faites chez *Arabidopsis* pour les mutants respectifs du complexe avec les constructions respectives des CDS de blé tendre. Il a été constaté une corrélation entre le degré de conservation protéique et la complémentation. Les mutants *MTOPVIB* n'ont pas été complémentés. On peut se demander pourquoi la copie SPO11-2 serait la mieux conservée chez la plante ?

Est-ce que cette caractéristique émane de l'histoire évolutive des topoisomérases 6A/B qui ont donné au sein des eucaryotes la protéine SPO11-3 qui a ensuite subi deux duplications donnant les protéines SPO11-1 et SPO11-2 ? Il s'en est suivi des séries de pertes de SPO11-2,-3 et de la TOP6B chez les animaux et les champignons et chez les plantes le maintien des trois SPO11 (Malik et al., 2007; Sprink and Hartung, 2014). Cette histoire permet juste de mettre en exergue qu'il y a eu des pertes et des duplications mais ne permet pas de savoir pourquoi le degré de conservation de la protéine SPO11-2 est plus fort. C'est peut-être un mécanisme passif et aléatoire n'impliquant aucunes forces de pression de sélection qui a mené à ce résultat car tantôt on perd SPO11-1 chez les Stramenopiles et les algues et tantôt on perd SPO11-2 chez les animaux. Ce schéma évolutif nous permet de constater néanmoins des duplications de gènes qui ont mené à de la sub-fonctionnalisation de gène. En effet comme nous l'avons vu précédemment la protéine SPO11-3 n'a pas de rôle en méiose alors que les protéines SPO11-1 et SPO11-2 sont impliquées dans l'initiation de ce mécanisme. Nous avons vu au cours de notre étude, dans la partie 2, que la protéine TaSPO11-2-7A est mutée naturellement chez le blé tendre et chez le blé dur. Cette mutation qui confère chez le blé tendre une activité résiduelle de cette protéine peut être soit classée comme une voie de pseudogénéisation soit une voie de néo/sub-fonctionnalisation. D'ailleurs le terme de pseudo-pseudogène a été intégré au vocabulaire et inventé lorsqu'un gène codant un récepteur olfactif (le récepteur ionotrope chimiosensoriel du glutamate Ir75a) chez la drosophile avait été classé comme pseudogène car il arborait un codon stop prématuré (Prieto-Godino et al., 2016). Les récepteurs olfactifs de drosophiles sont soumis à de très faibles pressions de sélection car les auteurs expliquent que cette espèce en possède énormément pour en avoir des fonctionnellement redondants ou qui détectent des odeurs nouvellement pertinentes pour le fitness d'une espèce. Cependant il s'est avéré que *in vivo* le Ir75a produisait un récepteur fonctionnel qui permettait aux drosophiles de sentir l'acide acétique ce qui leur a conféré un avantage car le ribosome était passé au travers de la lecture de ce codon stop (Figure 106) (Bidou et al., 2012).

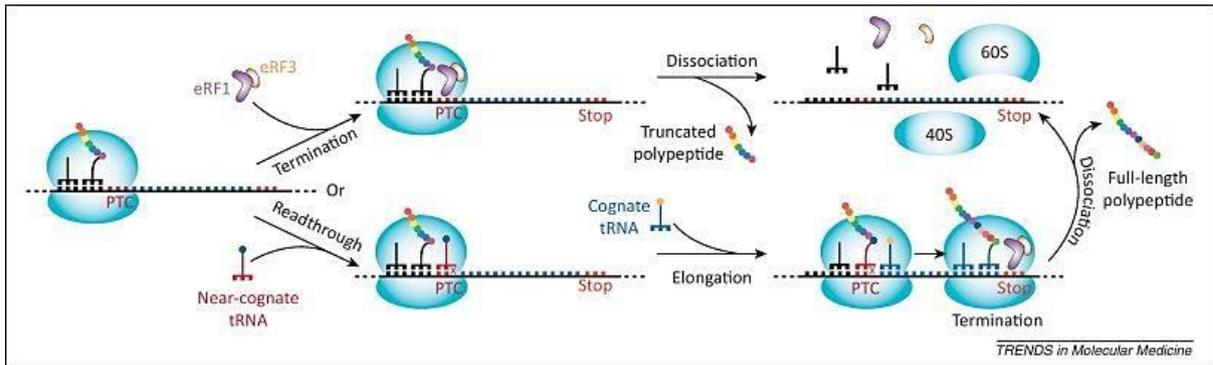


Figure 106 Mécanisme du Stop codon readthrough

Le ribosome est confronté à un PTC en fonction du milieu et du type cellulaire il va soit emprunter une voie de traduction classique et générer une protéine tronquée ou bien rentrer dans le NMD ; soit il va mal lire le codon stop et apporter un aa apparenté qui va induire une mutation faux sens qui n'aura pas trop d'impact sur la fonctionnalité de la protéine finale. (Bidou et al., 2012)

Ce mécanisme se nomme Stop codon readthrough (SCR) et agit essentiellement au niveau des neurones (Wangen and Green, 2020) chez l'humain. De plus une autre étude (Zhang et al., 2020) où les auteurs ont soumis des bactéries *E. coli* K-12 à des stress nutritifs soit sans carbone soit en excès et leur réponse a été le démarrage du SCR. Donc les cellules soumises à un stress peuvent générer des protéines fonctionnelles même en présence d'un codon stop.

### 5.3.2 Description de la méiose chez les progéniteurs du blé tendre

Concernant cette partie, elle s'est révélée être très descriptive et les résultats obtenus étaient attendus. Afin de compléter notre étude et de la rendre un peu plus originale il serait intéressant de générer des nouveaux polyploïdes afin de tenter de déchiffrer comment un néo polyploïde s'adapte à ce stress en analysant les effets sur la méiose. Au niveau de la littérature les données se cantonnent à des aspects de fréquence de recombinaison ou bien à des analyses de chiasmata. Il a cependant été démontré chez *Arabidopsis* que même une espèce diploïde qui est polyploïdisée avec de la colchicine présente une fréquence de recombinaison qui est nettement augmentée chez le mâle et une plus faible augmentation chez la femelle (Pecinka et al., 2011). De plus les auteurs ont aussi démontré que ces néo polyploïdes avaient la même fréquence de recombinaison aussi bien en contexte allo- qu' autopolyploïdie.

Les néo polyploïdes, dotés d'un programme méiotique hérité des diploïdes, forment souvent des associations aberrantes de type multivalents en métaphase I qui peuvent provoquer une mauvaise ségrégation et des pertes de fertilité (Bombliès et al., 2016). La formation de multivalents est-elle activée à la suite de cette néo polyploïdisation ? La solution envisagée est la sélection de la méiose de type diploïde où il y aura petit à petit une suppression des multivalents. Dans cette revue, l'équipe met en avant le fait que la stabilisation cytologique peut être atteinte chez les néo polyploïdes après seulement quelques générations de sélection pour la fertilité. Le mécanisme moléculaire qui sous-tend les changements rapides observés dans les fréquences de multivalents reste inconnu, mais il semble probable que des modifications épigénétiques jouent un rôle. Bien que les jalons de la base moléculaire de la stabilisation autopolyploïdie ne soient pas encore posés, quelques indices permettent l'observation de ce début de comportement diploïde comme chez l'espèce *Arabidopsis arenosa* qui est autotétraploïde. Comme beaucoup d'autres autotétraploïdes, *A. arenosa* a une méiose stable et est

très fertile ; les quatre homologues s'alignent au début de la prophase I, mais ils sont ensuite triés en bivalents ordonnés de type diploïde par la métaphase I.

Concernant la recombinaison, un néo polyploïde d'At, recombine plus qu'un polyploïde établi, que ce soit chez un auto- ou allo tétraploïde (Pecinka et al., 2011). En revanche, le lien entre cassures double brins et recombinaison n'est pas très clair. Avec les outils que nous avons développés, nous pourrions alors caractériser les foyers de recombinaison DMC1 chez les espèces synthétiques qui ont servi dans les études d'expression : le diploïde Tauschii (DD), le tétraploïde Langdon (AABB) et pour le blé hexaploïde synthétique issu du croisement des deux précédents à la génération 0 (C0 ; AABBDD) et à la suite de la seconde autofécondation (C2). De plus, il serait aussi intéressant de conduire la même étude mais à partir des progéniteurs AA Urartu avec les Speltoïdes BB. En effet les diploïdes n'ont pas la version TaZIP4-5B, ainsi ils devraient adopter un comportement de type *ph1* avec des appariements inter-homéologues.

Pour terminer sur l'évolution du complexe SPO11 et la manipulation des progéniteurs, il serait judicieux de travailler sur la population de mutants du JIC EMS et en particulier sur les mutants de la variété Kronos AABB. Sachant que la copie A de SPO11-2 est naturellement mutée, il suffirait de rechercher la sous-mutation BB, si elle existe, ce qui est vraiment peu probable à moins d'avoir été maintenue à l'état hétérozygote. Cependant, si celle-ci n'existe pas, afin d'approfondir les études sur le rôle des domaines de SPO11-2, nous pourrions chercher des mutants BB mutés sur des sites stratégiques des motifs connus et inconnus.

## 6 Conclusions

Ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les initiateurs de la méiose chez le blé tendre *Triticum aestivum* (AABBDD). Nous avons choisi de travailler sur des mutants afin de déchiffrer le rôle des protéines méiotiques. Il nous a fallu développer des outils afin de cribler efficacement en termes de temps et au plus juste les mutants de chaque sous-génome de la population irradiée cv Renan créée au laboratoire. Nous avons aussi sélectionné des mutants STOP EMS cv Cadenza pour chaque sous-génome des mêmes gènes méiotiques que pour la population irradiée dans la mesure de ce qui était disponible dans la population. Ces mutants sous-génomes ont été croisés entre eux afin de générer des plantes hétérozygotes qui a leur tour ont été croisées entre elles. Nous avons criblé sur ces graines les plantes hétérozygotes sur les trois sous-génomes pour le locus d'intérêt et c'est la descendance de cette plante de départ qui a servi pour la caractérisation des mutants puisque nous pouvions obtenir aussi bien le triple nul sur les trois sous-génomes ( $abd^{-/-}$ ) que la plante sœur témoin sauvage pour le même locus ( $ABD^{+/+}$ ). Il nous a fallu aussi au départ optimiser les techniques visant à caractériser ces mutants de méiose en routine. Nous avons utilisé les techniques développées chez les autres espèces à savoir analyser la fertilité, contrôler la qualité du pollen, observer la bienséance de la méiose en dressant un atlas, compter le nombre de chiasmas en métaphase I et enfin voir en prophase I si le complexe synaptonémal se mettait bien et place ainsi que dénombrer les foyers de recombinaison. A noter que c'est la première fois que l'on dénombre des foyers DMC1 chez le blé tendre et que l'on en compte chez les cultivars Chinese Spring et Renan autour de 900 (879,2 ( $\pm$  181,0) et 891,9 ( $\pm$  325,3) respectivement).

Après que tous ces aspects aient été bien calibrés, nous avons pu nous focaliser sur la protéine SPO11-2, afin de connaître son rôle chez le blé tendre. Le résultat majeur de ce travail a été de démontrer que la protéine avait bien le même rôle que chez les espèces diploïdes mais surtout que la copie TaSPO11-2-7A était déjà naturellement mutée. Cette mutation est due à un décalage du cadre de lecture provoqué par la délétion de deux nucléotides, ce qui induit l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'exon 3. Cette mutation s'est révélée être le piment qui a rendu ce travail original. Les mutants  $bd^{-/-}$  pour ce gène étaient encore capables de faire en moyenne 4,6 bivalents par cellule et nous avons aussi observé des foyers DMC1 résiduels (174,1 $\pm$  42,4). Deux hypothèses ont été générées à partir du pipeline TriAnnot, soit la mutation induit une protéine qui a subi un saut de son exon 2 soit une protéine dont la traduction débute dans l'exon 3. Afin de tester ces hypothèses, des plasmides contenant les CDS TaSPO11-2-7A des deux formes énoncées précédemment et de la forme intègre (sans la délétion, ajout de deux nucléotides) ont été importés par trempage dans *Agrobacterium tumefaciens* dans des plantes d'*Arabidopsis* hétérozygotes  $ATspo11-2^{-/-}$ . Les plantes transformées ont été analysées dans la descendance afin d'obtenir tous les témoins intrinsèques à l'expérience. Comme attendu la forme intègre a bien complété le mutant nul d'*Arabidopsis*  $ATspo11-2^{-/-}$  en restaurant une fertilité équivalente à celle du témoin. Les deux formes candidates avec saut d'exon et site alternatif de traduction n'ont pas permis une complémentarité et les niveaux de graines obtenues sont un peu au-dessus de celles obtenues chez le mutant  $ATspo11-2^{-/-}$ . Ce résultat rejoint celui obtenu chez le blé tendre et des analyses plus poussées de cytogénétique, génétique et d'analyse des transcrits fournis sont en cours. A côté de ce travail, des séquençages des isoformes des transcrits de  $Taspo11-2-7A$  sont en cours afin d'établir ou non la réalité biologique des hypothèses proposées *ab initio*.

Le troisième et dernier volet de cette recherche a été centré sur l'évolution du complexe SPO11 chez les blés. Ces analyses sont en majorité descriptives et se sont cantonnées à des analyses comparatives de la séquence du complexe et d'autre part à la caractérisation chez les progéniteurs du blé des foyers de recombinaison et du comportement méiotique. Ce qu'il faut retenir ici c'est qu'on ne peut pas faire de conclusions probantes concernant le volet bioanalyse mais que les copies de chaque membre du complexe se rangent au plus proche de la copie de son parent donateur. De plus les

observations en *wet lab* nous ont amenés à affirmer que le niveau de ploïdie n'a pas impacté la conservation *stricto sensu* des mécanismes moléculaires de la méiose. Ce travail a permis d'ouvrir tout un panel de possibilités d'études de la méiose à travers les futurs mutants hyper-recombinants qui vont être caractérisés grâce aux méthodes développées et optimisées au cours de ces années de labeur. Bien sûr il reste encore tellement d'outils à créer afin d'analyser la méiose de façon approfondie comme pour les espèces modèles. Pour finir, cette étude a pu être possible grâce d'abord à tout le travail qui a été fait en amont par tous les collaborateurs de l'équipe puis par les infrastructures extraordinaires dotées du matériel « dernier cri » et bien sûr par des conditions très favorables à l'épanouissement de la recherche exploratoire et fondamentale.

## 7 Références bibliographiques

Ahuja, J.S., Sandhu, R., Mainpal, R., Lawson, C., Henley, H., Hunt, P.A., Yanowitz, J.L., and Börner, G.V. (2017). Control of meiotic pairing and recombination by chromosomally tethered 26S proteasome. *Science* 355, 408–411.

Allers, T., and Lichten, M. (2001). Intermediates of yeast meiotic recombination contain heteroduplex DNA. *Mol. Cell* 8, 225–231.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

An, X.J., Deng, Z.Y., and Wang, T. (2011). OsSpo11-4, a rice homologue of the archaeal TopVIA protein, mediates double-strand DNA cleavage and interacts with OsTopVIB. *PLoS One* 6, e20327.

Aravind, L., Leipe, D.D., and Koonin, E.V. (1998). Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res.* 26, 4205–4213.

Armstrong, S.J., and Jones, G.H. (2003). Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 54, 1–10.

Arter, M., Hurtado-Nieves, V., Oke, A., Zhuge, T., Wettstein, R., Fung, J.C., Blanco, M.G., and Matos, J. (2018). Regulated crossing-over requires inactivation of Yen1/GEN1 resolvase during meiotic prophase I. *Dev. Cell* 45, 785-800.e6.

Atcheson, C.L., DiDomenico, B., Frackman, S., Esposito, R.E., and Elder, R.T. (1987). Isolation, DNA sequence, and regulation of a meiosis-specific eukaryotic recombination gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8035–8039.

Auton, A., Rui Li, Y., Kidd, J., Oliveira, K., Nadel, J., Holloway, J.K., Hayward, J.J., Cohen, P.E., Grealley, J.M., Wang, J., et al. (2013). Genetic recombination is targeted towards gene promoter regions in dogs. *PLoS Genet.* 9, e1003984.

Avivi, L., and Feldman, M. (1980). Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of plants. *Hum. Genet.* 55, 281–295.

Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S.O., Gundlach, H., Hale, I., Mascher, M., Spannagl, M., Wiebe, K., et al. (2017). Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science* 357, 93–97.

Bagherieh-Najjar, M.B., de Vries, O.M.H., Hille, J., and Dijkwel, P.P. (2005). *Arabidopsis* RecQ14A suppresses homologous recombination and modulates DNA damage responses. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 43, 789–798.

Barouki, R. (1992). Expression des gènes au cours de la spermatogenèse. *médecine/sciences* 8, 532.

Bartrand, A.J., Iyasu, D., Marinco, S.M., and Brush, G.S. (2006). Evidence of meiotic crossover control in *Saccharomyces cerevisiae* through Mec1-mediated phosphorylation of replication protein A. *Genetics* 172, 27–39.

- Bates, A.D., Berger, J.M., and Maxwell, A. (2011). The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* *39*, 6327–6339.
- Baudat, F., and Nicolas, A. (1997). Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5213–5218.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and de Massy, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* *327*, 836–840.
- Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 794–806.
- Bennett, M.D. (1977). The time and duration of meiosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *277*, 201–226.
- Benyahya, F., Nadaud, I., Da Ines, O., Rimbart, H., White, C., and Sourdille, P. (2020). SPO11.2 is essential for programmed double-strand break formation during meiosis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J. Cell Mol. Biol.* *104*, 30–43.
- Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2010). Genetic interference: don't stand so close to me. *Curr. Genomics* *11*, 91–102.
- Berchowitz, L.E., Francis, K.E., Bey, A.L., and Copenhaver, G.P. (2007). The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* *3*, e132.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* *386*, 414–417.
- Bhatt, A.M., Lister, C., Page, T., Fransz, P., Findlay, K., Jones, G.H., Dickinson, H.G., and Dean, C. (1999). The DIF1 gene of Arabidopsis is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *19*, 463–472.
- Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.-P., and Namy, O. (2012). Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* *18*, 679–688.
- Blackwell, A.R., Dluzewska, J., Szymanska-Lejman, M., Desjardins, S., Tock, A.J., Kbir, N., Lambing, C., Lawrence, E.J., Bieluszewski, T., Rowan, B., et al. (2020). MSH2 shapes the meiotic crossover landscape in relation to interhomolog polymorphism in Arabidopsis. *EMBO J.* *39*, e104858.
- Blary, A., Gonzalo, A., Eber, F., Bérard, A., Bergès, H., Bessoltane, N., Charif, D., Charpentier, C., Cromer, L., Fourment, J., et al. (2018a). FANCM Limits Meiotic Crossovers in Brassica Crops. *Front. Plant Sci.* *9*, 368.
- Blary, A., Gonzalo, A., Eber, F., Bérard, A., Bergès, H., Bessoltane, N., Charif, D., Charpentier, C., Cromer, L., Fourment, J., et al. (2018b). FANCM Limits Meiotic Crossovers in Brassica Crops. *Front. Plant Sci.* *9*.
- Bleuyard, J.-Y., Gallego, M.E., and White, C.I. (2004). Meiotic defects in the Arabidopsis rad50 mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* *113*, 197–203.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.-H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., and Russell, P. (2001). Mus81/Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* *107*, 537–548.

- Boden, S.A., Shadiac, N., Tucker, E.J., Langridge, P., and Able, J.A. (2007). Expression and functional analysis of TaASY1 during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*). *BMC Mol. Biol.* 8, 65.
- Boden, S.A., Langridge, P., Spangenberg, G., and Able, J.A. (2009). TaASY1 promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of Ph1. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 57, 487–497.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS Biol.* 3.
- Bombliès, K., Jones, G., Franklin, C., Zickler, D., and Kleckner, N. (2016). The challenge of evolving stable polyploidy: could an increase in “crossover interference distance” play a central role? *Chromosoma* 125, 287–300.
- Borde, V., Lin, W., Novikov, E., Petrini, J.H., Lichten, M., and Nicolas, A. (2004). Association of Mre11p with double-strand break sites during yeast meiosis. *Mol. Cell* 13, 389–401.
- Börner, G.V., Barot, A., and Kleckner, N. (2008). Yeast Pch2 promotes domainal axis organization, timely recombination progression, and arrest of defective recombinosomes during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3327–3332.
- Borrill, P., Ramirez-Gonzalez, R., and Uauy, C. (2016). expVIP: a Customizable RNA-seq Data Analysis and Visualization Platform. *Plant Physiol.* 170, 2172–2186.
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., and Petukhova, G.V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* 485, 642–645.
- Bugreev, D.V., Pezza, R.J., Mazina, O.M., Voloshin, O.N., Camerini-Otero, R.D., and Mazin, A.V. (2011). The resistance of DMC1 D-loops to dissociation may account for the DMC1 requirement in meiosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 56–60.
- Buhler, C., Lebbink, J.H., Bocs, C., Ladenstein, R., and Forterre, P. (2001). DNA topoisomerase VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide overhangs. *J. Biol. Chem.* 276, 37215–37222.
- Buhler, C., Borde, V., and Lichten, M. (2007). Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* 5, e324.
- Burke-Agüero, D.H., and Hearst, J.E. (1990). An RNA holliday junction? Structural and dynamic considerations of the bacteriophage T4 gene 60 interruption. *J. Mol. Biol.* 213, 199–201.
- Bzymek, M., Thayer, N.H., Oh, S.D., Kleckner, N., and Hunter, N. (2010). Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature* 464, 937–941.
- Calvo-Baltanás, V., Wijnen, C.L., Yang, C., Lukhovitskaya, N., Snoo, C.B. de, Hohenwarter, L., Keurentjes, J.J.B., Jong, H. de, Schnittger, A., and Wijnker, E. (2020). Meiotic crossover reduction by virus-induced gene silencing enables the efficient generation of chromosome substitution lines and reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.*
- Capilla-Pérez, L., Durand, S., Hurel, A., Lian, Q., Chambon, A., Taochy, C., Solier, V., Grelon, M., and Mercier, R. (2021). The synaptonemal complex imposes crossover interference and heterochiasmy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118.

- Carlton, P.M., Farruggio, A.P., and Dernburg, A.F. (2006). A link between meiotic prophase progression and crossover control. *PLoS Genet.* *2*, e12.
- Carver, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B.G., and Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *21*, 3422–3423.
- Caryl, A.P., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.C. (2000). A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the Arabidopsis meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* *109*, 62–71.
- Cesari, E., Loiarro, M., Naro, C., Pieraccioli, M., Farini, D., Pellegrini, L., Pagliarini, V., Bielli, P., and Sette, C. (2020). Combinatorial control of Spo11 alternative splicing by modulation of RNA polymerase II dynamics and splicing factor recruitment during meiosis. *Cell Death Dis.* *11*, 240.
- Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 51–74.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., et al. (2005). Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* *17*, 1033–1045.
- Chapman, V., and Riley, R. (1970). Homoeologous meiotic chromosome pairing in *Triticum aestivum* in which chromosome 5B is replaced by an alien homoeologue. *Nature* *226*, 376–377.
- Chelysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Márquez-Lema, A., Bhatt, A.M., Horlow, C., et al. (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J. Cell Sci.* *118*, 4621–4632.
- Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M.-P., Mercier, R., and Grelon, M. (2007). Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* *3*, e83.
- Chen, J.-M., Cooper, D.N., Chuzhanova, N., Férec, C., and Patrinos, G.P. (2007). Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 762–775.
- Chen, S.Y., Tsubouchi, T., Rockmill, B., Sandler, J.S., Richards, D.R., Vader, G., Hochwagen, A., Roeder, G.S., and Fung, J.C. (2008). Global analysis of the meiotic crossover landscape. *Dev. Cell* *15*, 401–415.
- Chen, X., Suhandynata, R.T., Sandhu, R., Rockmill, B., Mohibullah, N., Niu, H., Liang, J., Lo, H.-C., Miller, D.E., Zhou, H., et al. (2015). Phosphorylation of the Synaptonemal Complex Protein Zip1 Regulates the Crossover/Noncrossover Decision during Yeast Meiosis. *PLoS Biol.* *13*, e1002329.
- Choi, K., and Henderson, I.R. (2015). Meiotic recombination hotspots - a comparative view. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *83*, 52–61.
- Choi, K., Zhao, X., Kelly, K.A., Venn, O., Higgins, J.D., Yelina, N.E., Hardcastle, T.J., Ziolkowski, P.A., Copenhaver, G.P., Franklin, F.C.H., et al. (2013). Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.* *45*, 1327–1336.
- Choi, K., Zhao, X., Tock, A.J., Lambing, C., Underwood, C.J., Hardcastle, T.J., Serra, H., Kim, J., Cho, H.S., Kim, J., et al. (2018a). Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in *Arabidopsis thaliana* transposons and gene regulatory regions. *Genome Res.* *28*, 532–546.

- Choi, K., Zhao, X., Tock, A.J., Lambing, C., Underwood, C.J., Hardcastle, T.J., Serra, H., Kim, J., Cho, H.S., Kim, J., et al. (2018b). Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in *Arabidopsis thaliana* transposons and gene regulatory regions. *Genome Res.* *28*, 532–546.
- Choulet, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Pingault, L., Sourdille, P., Couloux, A., Paux, E., et al. (2014). Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* *345*, 1249721.
- Church, K., and Wimber, D.E. (1969). Meiosis in the grasshopper: chiasma frequency after elevated temperature and x-rays. *Can. J. Genet. Cytol. J. Can. Genet. Cytol.* *11*, 209–216.
- Ciccia, A., McDonald, N., and West, S.C. (2008). Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 259–287.
- Claeys Bouuaert, C., Pu, S., Wang, J., Oger, C., Daccache, D., Xie, W., Patel, D.J., and Keeney, S. (2021a). DNA-driven condensation assembles the meiotic DNA break machinery. *Nature* *592*, 144–149.
- Claeys Bouuaert, C., Tischfield, S.E., Pu, S., Mimitou, E.P., Arias-Palomo, E., Berger, J.M., and Keeney, S. (2021b). Structural and functional characterization of the Spo11 core complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *28*, 92–102.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *16*, 735–743.
- Cohen, P.E., Pollack, S.E., and Pollard, J.W. (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr. Rev.* *27*, 398–426.
- Cole, F., Keeney, S., and Jasin, M. (2012). Preaching about the converted: how meiotic gene conversion influences genomic diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1267*, 95–102.
- Connelly, J.C., and Leach, D.R.F. (2002). Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11Rad50 complex. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 410–418.
- Cooper, T.J., Garcia, V., and Neale, M.J. (2016). Meiotic DSB patterning: A multifaceted process. *Cell Cycle Georget. Tex* *15*, 13–21.
- Corbett, K.D., Benedetti, P., and Berger, J.M. (2007). Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 611–619.
- Corredor, E., Lukaszewski, A.J., Pachón, P., Allen, D.C., and Naranjo, T. (2007). Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. *Genetics* *177*, 699–706.
- Cowan, C.R., Carlton, P.M., and Cande, W.Z. (2001). The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rabl organization and the bouquet. *Plant Physiol.* *125*, 532–538.
- Cox, T.S., Murphy, J.P., and Rodgers, D.M. (1986). Changes in genetic diversity in the red winter wheat regions of the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 5583–5586.
- Crickard, J.B., and Greene, E.C. (2018). The biochemistry of early meiotic recombination intermediates. *Cell Cycle Georget. Tex* *17*, 2520–2530.

- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012a). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* 336, 1588–1590.
- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012b). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* 336, 1588–1590.
- Da Ines, O., Degroote, F., Goubely, C., Amiard, S., Gallego, M.E., and White, C.I. (2013). Meiotic recombination in Arabidopsis is catalysed by DMC1, with RAD51 playing a supporting role. *PLoS Genet.* 9, e1003787.
- Da Ines, O., Michard, R., Fayos, I., Bastianelli, G., Nicolas, A., Guiderdoni, E., White, C., and Sourdille, P. (2020a). Bread wheat TaSPO11-1 exhibits evolutionarily conserved function in meiotic recombination across distant plant species. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 103, 2052–2068.
- Da Ines, O., Michard, R., Fayos, I., Bastianelli, G., Nicolas, A., Guiderdoni, E., White, C., and Sourdille, P. (2020b). Bread wheat TaSPO11-1 exhibits evolutionarily conserved function in meiotic recombination across distant plant species. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 103, 2052–2068.
- Darrier, B., Rimbart, H., Balfourier, F., Pingault, L., Josselin, A.-A., Servin, B., Navarro, J., Choulet, F., Paux, E., and Sourdille, P. (2017). High-Resolution Mapping of Crossover Events in the Hexaploid Wheat Genome Suggests a Universal Recombination Mechanism. *Genetics* 206, 1373–1388.
- De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J.-L., Stevens, R., and Grelon, M. (2007). AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* 26, 4126–4137.
- De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., and Lichten, M. (2012). BLM helicase ortholog Sgs1 is a central regulator of meiotic recombination intermediate metabolism. *Mol. Cell* 46, 43–53.
- De Muyt, A., Zhang, L., Piolot, T., Kleckner, N., Espagne, E., and Zickler, D. (2014). E3 ligase Hei10: a multifaceted structure-based signaling molecule with roles within and beyond meiosis. *Genes Dev.* 28, 1111–1123.
- Desjardins, S., Kanyuka, K., and Higgins, J.D. (2020). A Cytological Analysis of Wheat Meiosis Targeted by Virus-Induced Gene Silencing (VIGS). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2061, 319–330.
- Devisetty, U.K., Mayes, K., and Mayes, S. (2010). The RAD51 and DMC1 homoeologous genes of bread wheat: cloning, molecular characterization and expression analysis. *BMC Res. Notes* 3, 245.
- Diaz, R.L., Alcid, A.D., Berger, J.M., and Keeney, S. (2002). Identification of residues in yeast Spo11p critical for meiotic DNA double-strand break formation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1106–1115.
- Dickey, J.S., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Baird, B.J., Sedelnikova, O.A., and Bonner, W.M. (2009). H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma* 118, 683–692.
- Ding, D.-Q., Yamamoto, A., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2004). Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Dev. Cell* 6, 329–341.
- Dluzewska, J., Szymanska, M., and Ziolkowski, P.A. (2018). Where to Cross Over? Defining Crossover Sites in Plants. *Front. Genet.* 9, 609.

- Dobson, M.J., Pearlman, R.E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B., and Moens, P.B. (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* *107 ( Pt 10)*, 2749–2760.
- Dong, F., and Jiang, J. (1998). Non-Rabl Patterns of Centromere and Telomere Distribution in the Interphase Nuclei of Plant Cells. *Chromosome Res.* *6*, 551–558.
- Draeger, T., Martin, A.C., Alabdullah, A.K., Pendle, A., Rey, M.-D., Shaw, P., and Moore, G. (2019). Dmc1 is a candidate for temperature tolerance during wheat meiosis. *Theor. Appl. Genet.* 1–20.
- Duroc, Y., Lemhemdi, A., Larchevêque, C., Hurel, A., Cuacos, M., Cromer, L., Horlow, C., Armstrong, S.J., Chelysheva, L., and Mercier, R. (2014). The Kinesin AtPSS1 Promotes Synapsis and is Required for Proper Crossover Distribution in Meiosis. *PLOS Genet.* *10*, e1004674.
- Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 24–28.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., Kolodner, R., Pollard, J.W., and Kucherlapati, R. (1999). Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat. Genet.* *21*, 123–127.
- Ehmsen, K.T., and Heyer, W.-D. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. *Nucleic Acids Res.* *36*, 2182–2195.
- Endo, T.R., and Gill, B.S. (1996). The Deletion Stocks of Common Wheat. *J. Hered.* *87*, 295–307.
- Enguita-Marruedo, A., Martín-Ruiz, M., García, E., Gil-Fernández, A., Parra, M.T., Viera, A., Rufas, J.S., and Page, J. (2019). Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. *PLOS Genet.* *15*, e1007439.
- Esposito, M.S., and Esposito, E. (Paris-11 U. (1978). Aspects of the genetic control of meiosis and ascospore development inferred from the study of spo (sporulation deficient) mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [yeasts]. *Biol. Cell. Fr.*
- Esposito, M.S., and Esposito, R.E. (1974). Genes controlling meiosis and spore formation in yeast. *Genetics* *78*, 215–225.
- Fan, Q.Q., and Petes, T.D. (1996). Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2037–2043.
- Faris, J.D., Fellers, J.P., Brooks, S.A., and Gill, B.S. (2003). A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* *164*, 311–321.
- Fayos, I., Meunier, A.C., Vernet, A., Navarro-Sanz, S., Portefaix, M., Lartaud, M., Bastianelli, G., Périn, C., Nicolas, A., and Guiderdoni, E. (2020). Assessment of the roles of SPO11-2 and SPO11-4 in meiosis in rice using CRISPR/Cas9 mutagenesis. *J. Exp. Bot.* *71*, 7046–7058.
- Feldmann, K.A. (1991). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J.* *1*, 71–82.

- Fernandes, J.B., Séguéla-Arnaud, M., Larchevêque, C., Lloyd, A.H., and Mercier, R. (2018). Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 2431–2436.
- Feuillet, C., Langridge, P., and Waugh, R. (2008). Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet. TIG* *24*, 24–32.
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gabelle, D., and Serre, M.-C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* *89*, 427–446.
- Fowler, K.R., Sasaki, M., Milman, N., Keeney, S., and Smith, G.R. (2014). Evolutionarily diverse determinants of meiotic DNA break and recombination landscapes across the genome. *Genome Res.* *24*, 1650–1664.
- France, M.G., Enderle, J., Röhrig, S., Puchta, H., Franklin, F.C.H., and Higgins, J.D. (2021). ZYP1 is required for obligate cross-over formation and cross-over interference in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *118*.
- Fricke, W.M., Bastin-Shanower, S.A., and Brill, S.J. (2005). Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease. *DNA Repair* *4*, 243–251.
- Fu, M., Wang, C., Xue, F., Higgins, J., Chen, M., Zhang, D., and Liang, W. (2016). The DNA Topoisomerase VI-B Subunit OsMTOPVIB Is Essential for Meiotic Recombination Initiation in Rice. *Mol. Plant* *9*, 1539–1541.
- Fukuda, T., Daniel, K., Wojtasz, L., Toth, A., and Höög, C. (2010). A novel mammalian HORMA domaincontaining protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Exp. Cell Res.* *316*, 158–171.
- Furnes, B., and Schimenti, J. (2007). Fast forward to new genes in mammalian reproduction. *J. Physiol.* *578*, 25–32.
- Garrido, J., Aguilar, M., and Prieto, P. (2020). Identification and validation of reference genes for RTqPCR normalization in wheat meiosis. *Sci. Rep.* *10*, 2726.
- George, S., Behl, P., deGuzman, R., Lee, M., Rusyniak, S., Hotta, Y., Hiratsuka, K., Takase, H., and Hasenkampf, C. (2002a). Dmc1 fluorescent foci in prophase I nuclei of diploid, triploid and hybrid lilies. *Chromosoma* *111*, 96–105.
- George, S., Behl, P., deGuzman, R., Lee, M., Rusyniak, S., Hotta, Y., Hiratsuka, K., Takase, H., and Hasenkampf, C. (2002b). Dmc1 fluorescent foci in prophase I nuclei of diploid, triploid and hybrid lilies. *Chromosoma* *111*, 96–105.
- Gerton, J.L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P.O., and Petes, T.D. (2000). Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 11383–11390.
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Dürr, J., Focke, M., and Puchta, H. (2009). Two Distinct MUS81/EME1 Complexes from Arabidopsis Process Holliday Junctions. *Plant Physiol.* *150*, 1062–1071.
- Girard, C., Crismani, W., Froger, N., Mazel, J., Lemhemdi, A., Horlow, C., and Mercier, R. (2014a). FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9087–9095.

- Girard, C., Crismani, W., Froger, N., Mazel, J., Lemhemdi, A., Horlow, C., and Mercier, R. (2014b). FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers. *Nucleic Acids Res.* *42*, 9087–9095.
- Girard, C., Chelysheva, L., Choinard, S., Froger, N., Macaisne, N., Lemhemdi, A., Lehmemdi, A., Mazel, J., Crismani, W., and Mercier, R. (2015a). AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genet.* *11*, e1005369.
- Girard, C., Chelysheva, L., Choinard, S., Froger, N., Macaisne, N., Lehmemdi, A., Mazel, J., Crismani, W., and Mercier, R. (2015b). AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genet.* *11*.
- Glover, J.A., Blömer, K.C., Farrell, L.B., Chaudhury, A.M., and Dennis, E.S. (1996). Searching for tagged male-sterile mutants of arabidopsis. *Plant Mol. Biol. Report.* *14*, 330.
- Gonzalo, A., Lucas, M.-O., Charpentier, C., Sandmann, G., Lloyd, A., and Jenczewski, E. (2019). Reducing MSH4 copy number prevents meiotic crossovers between non-homologous chromosomes in *Brassica napus*. *Nat. Commun.* *10*, 2354.
- Graille, M., Cladière, L., Durand, D., Lecointe, F., Gadelle, D., Quevillon-Cheruel, S., Vachette, P., Forterre, P., and van Tilbeurgh, H. (2008). Crystal structure of an intact type II DNA topoisomerase: insights into DNA transfer mechanisms. *Struct. Lond. Engl.* *16*, 360–370.
- Greer, E., Martín, A.C., Pendle, A., Colas, I., Jones, A.M.E., Moore, G., and Shaw, P. (2012). The Ph1 Locus Suppresses Cdk2-Type Activity during Premeiosis and Meiosis in Wheat. *Plant Cell* *24*, 152–162.
- Grelon, M. (2016). Meiotic recombination mechanisms. *C. R. Biol.* *339*, 247–251.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* *20*, 589–600.
- Grelon, M., Gendrot, G., Vezon, D., Pelletier, G., Mathilde, G., Ghislaine, G., Daniel, V., and Georges, P. (2003). The Arabidopsis MEI1 gene encodes a protein with five BRCT domains that is involved in meiosis-specific DNA repair events independent of SPO11-induced DSBs. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *35*, 465–475.
- Grey, C., Barthès, P., Chauveau-Le Friec, G., Langa, F., Baudat, F., and de Massy, B. (2011). Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination. *PLoS Biol.* *9*, e1001176.
- Grey, C., Baudat, F., and de Massy, B. (2018). PRDM9, a driver of the genetic map. *PLoS Genet.* *14*, e1007479.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., and Moore, G. (2006). Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* *439*, 749–752.
- Gupta, S., Sharma, R., and Agarwal, A. (2017). Inter-and Intra-Laboratory Standardization of TUNEL Assay for Assessment of Sperm DNA Fragmentation. *Curr. Protoc. Toxicol.* *74*, 16.11.1-16.11.22.
- Gur, A., and Zamir, D. (2004). Unused Natural Variation Can Lift Yield Barriers in Plant Breeding. *PLOS Biol.* *2*, e245.

- Harper, L., Golubovskaya, I., and Cande, W.Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *J. Cell Sci.* *117*, 4025–4032.
- Hartung, F., and Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1548–1554.
- Hartung, F., and Puchta, H. (2001). Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene* *271*, 81–86.
- Hartung, F., and Puchta, H. (2006). The RecQ gene family in plants. *J. Plant Physiol.* *163*, 287–296.
- Hartung, F., Angelis, K.J., Meister, A., Schubert, I., Melzer, M., and Puchta, H. (2002). An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Curr. Biol. CB* *12*, 1787–1791.
- Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S., and Puchta, H. (2007). The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic double-strand break induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *19*, 3090–3099.
- He, Y., Wang, M., Dukowic-Schulze, S., Zhou, A., Tiang, C.-L., Shilo, S., Sidhu, G.K., Eichten, S., Bradbury, P., Springer, N.M., et al. (2017). Genomic features shaping the landscape of meiotic double-strandbreak hotspots in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 12231–12236.
- Heyting, C., Dietrich, A.J., Moens, P.B., Dettmers, R.J., Offenberg, H.H., Redeker, E.J., and Vink, A.C. (1989). Synaptonemal complex proteins. *Genome* *31*, 81–87.
- Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2005). The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* *19*, 2488–2500.
- Higgins, J.D., Buckling, E.F., Franklin, F.C.H., and Jones, G.H. (2008). Expression and functional analysis of AtMUS81 in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *54*, 152–162.
- Higgins, J.D., Perry, R.M., Barakate, A., Ramsay, L., Waugh, R., Halpin, C., Armstrong, S.J., and Franklin, F.C.H. (2012). Spatiotemporal asymmetry of the meiotic program underlies the predominantly distal distribution of meiotic crossovers in barley. *Plant Cell* *24*, 4096–4109.
- Higgins, J.D., Wright, K.M., Bomblies, K., and Franklin, F.C.H. (2014). Cytological techniques to analyze meiosis in *Arabidopsis arenosa* for investigating adaptation to polyploidy. *Front. Plant Sci.* *4*, 546.
- Hillers, K.J., and Villeneuve, A.M. (2003). Chromosome-wide control of meiotic crossing over in *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* *13*, 1641–1647.
- Hiraoka, Y. (1998). Meiotic telomeres: a matchmaker for homologous chromosomes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *3*, 405–413.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* *5*, 282–304.
- Hou, L., Zhang, A., Wang, R., Zhao, P., Zhang, D., Jiang, Y., Diddugodage, C.J., Wang, X., Ni, Z., and Xu, S. (2019). Brassinosteroid Regulates Root Development with Highly Redundant Genes in Hexaploid Wheat. *Plant Cell Physiol.* *60*, 1761–1777.

- Howard-Till, R.A., Lukaszewicz, A., and Loidl, J. (2011). The recombinases Rad51 and Dmc1 play distinct roles in DNA break repair and recombination partner choice in the meiosis of *Tetrahymena*. *PLoS Genet.* *7*, e1001359.
- Hunter, N. (2015). *Meiotic Recombination: The Essence of Heredity*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*.
- Hunter, N., and Kleckner, N. (2001). The Single-End Invasion: An Asymmetric Intermediate at the Double-Strand Break to Double-Holliday Junction Transition of Meiotic Recombination. *Cell* *106*, 59–70.
- Hurel, A., Phillips, D., Vrielynck, N., Mézard, C., Grelon, M., and Christophorou, N. (2018). A cytological approach to studying meiotic recombination and chromosome dynamics in *Arabidopsis thaliana* male meiocytes in three dimensions. *Plant J.* *95*, 385–396.
- Interthal, H., and Heyer, W.D. (2000). MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 263*, 812–827.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., and Haber, J.E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* *115*, 401–411.
- IWGSC, IWGSC RefSeq principal investigators:, Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., IWGSC whole-genome assembly principal investigators:, Pozniak, C.J., et al. (2018a). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* *361*.
- IWGSC, IWGSC RefSeq principal investigators:, Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., IWGSC whole-genome assembly principal investigators:, Pozniak, C.J., et al. (2018b). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* *361*.
- Jantasuriyarat, C., Vales, M.I., Watson, C.J.W., and Riera-Lizarazu, O. (2004). Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* *108*, 261–273.
- Jessop, L., Rockmill, B., Roeder, G.S., and Lichten, M. (2006). Meiotic chromosome synapsis-promoting proteins antagonize the anti-crossover activity of *sgs1*. *PLoS Genet.* *2*, e155.
- Ji, J., Tang, D., Wang, M., Li, Y., Zhang, L., Wang, K., Li, M., and Cheng, Z. (2013). MRE11 is required for homologous synapsis and DSB processing in rice meiosis. *Chromosoma* *122*, 363–376.
- Jolivet, S., Vezon, D., Froger, N., and Mercier, R. (2006). Non conservation of the meiotic function of the Ski8/Rec103 homolog in *Arabidopsis*. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *11*, 615–622.
- Kaiser, S., Sauer, F., and Kisker, C. (2017). The structural and functional characterization of human RecQ4 reveals insights into its helicase mechanism. *Nat. Commun.* *8*, 15907.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3059–3066.
- Kauppi, L., Jeffreys, A.J., and Keeney, S. (2004). Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 413–424.

- Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P.J., Keeney, S., and Jasin, M. (2011). Distinct Properties of the XY Pseudoautosomal Region Crucial for Male Meiosis. *Science* 331, 916–920.
- Kaur, H., De Muyt, A., and Lichten, M. (2015). Top3-Rmi1 DNA single-strand decatenase is integral to the formation and resolution of meiotic recombination intermediates. *Mol. Cell* 57, 583–594.
- Keeney, S. (2001a). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1–53.
- Keeney, S. (2001b). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1–53.
- Keeney, S., and Kleckner, N. (1995). Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11274–11278.
- Keeney, S., Lange, J., and Mohibullah, N. (2014). Self-organization of meiotic recombination initiation: general principles and molecular pathways. *Annu. Rev. Genet.* 48, 187–214.
- Kerby, K., and Kuspira, J. (1987). The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*.
- Khoo, K.H.P., Jolly, H.R., and Able, J.A. (2008). The RAD51 gene family in bread wheat is highly conserved across eukaryotes, with RAD51A upregulated during early meiosis. *Funct. Plant Biol. FPB* 35, 1267–1277.
- Khoo, K.H.P., Able, A.J., and Able, J.A. (2012a). The isolation and characterisation of the wheat molecular ZIPper I homologue, TaZYP1. *BMC Res. Notes* 5, 106.
- Khoo, K.H.P., Able, A.J., and Able, J.A. (2012b). Poor Homologous Synapsis 1 Interacts with Chromatin but Does Not Colocalise with ASynapsis 1 during Early Meiosis in Bread Wheat. *Int. J. Plant Genomics* 2012.
- Kianian, P.M.A., Wang, M., Simons, K., Ghavami, F., He, Y., Dukowic-Schulze, S., Sundararajan, A., Sun, Q., Pillardy, J., Mudge, J., et al. (2018). High-resolution crossover mapping reveals similarities and differences of male and female recombination in maize. *Nat. Commun.* 9, 2370.
- Kim, J., and Choi, K. (2019). Signaling-mediated meiotic recombination in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 51, 44–50.
- Kim, D.-U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.-O., Won, M., Yoo, H.-S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., et al. (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 28, 617–623.
- Kimber, G., and Sears, E.R. (1980). Uses of Wheat Aneuploids. In *Polyploidy: Biological Relevance*, W.H. Lewis, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 427–443.
- King, J.S., and Mortimer, R.K. (1990). A polymerization model of chiasma interference and corresponding computer simulation. *Genetics* 126, 1127–1138.
- Klapholz, S., Waddell, C.S., and Esposito, R.E. (1985). The role of the SPO11 gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics* 110, 187–216.

- Kleckner, N., Zhang, L., Weiner, B., and Zickler, D. (2012). Meiotic chromosome dynamics. In *Genome organization and function in the mammalian cell nucleus*.
- Knoll, A., Higgins, J.D., Seeliger, K., Reha, S.J., Dangel, N.J., Bauknecht, M., Schröpfer, S., Franklin, F.C.H., and Puchta, H. (2012). The Fanconi Anemia Ortholog FANCM Ensures Ordered Homologous Recombination in Both Somatic and Meiotic Cells in Arabidopsis[W]. *Plant Cell* 24, 1448–1464.
- Kozul, R., Meselson, M., Van Doninck, K., Vandenhoute, J., and Zickler, D. (2012). The Centenary of Janssens's Chiasmotype Theory. *Genetics* 191, 309–317.
- Krasileva, K.V., Vasquez-Gross, H.A., Howell, T., Bailey, P., Paraiso, F., Clissold, L., Simmonds, J., Ramirez-Gonzalez, R.H., Wang, X., Borrill, P., et al. (2017). Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E913–E921.
- Kurzbauer, M.-T., Uanschou, C., Chen, D., and Schlögelhofer, P. (2012). The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 2058–2070.
- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Nonparadoxical evolutionary stability of the recombination initiation landscape in yeast. *Science* 350, 932–937.
- Lamarque, B.J., Orazio, N.I., and Weitzman, M.D. (2010). The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 584, 3682–3695.
- Lambing, C., and Heckmann, S. (2018). Tackling Plant Meiosis: From Model Research to Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 9.
- Lambing, C., Osman, K., Nuntasontorn, K., West, A., Higgins, J.D., Copenhaver, G.P., Yang, J., Armstrong, S.J., Mechtler, K., Roitinger, E., et al. (2015). Arabidopsis PCH2 Mediates Meiotic Chromosome Remodeling and Maturation of Crossovers. *PLOS Genet.* 11, e1005372.
- Lambing, C., Kuo, P.C., Tock, A.J., Topp, S.D., and Henderson, I.R. (2020). ASY1 acts as a dosagedependent antagonist of telomere-led recombination and mediates crossover interference in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 13647–13658.
- Lange, J., Yamada, S., Tischfield, S.E., Pan, J., Kim, S., Zhu, X., Socci, N.D., Jasin, M., and Keeney, S. (2016). The Landscape of Mouse Meiotic Double-Strand Break Formation, Processing, and Repair. *Cell* 167, 695-708.e16.
- Lawrence, E.J., Griffin, C.H., and Henderson, I.R. (2017). Modification of meiotic recombination by natural variation in plants. *J. Exp. Bot.* 68, 5471–5483.
- Lengsfeld, B.M., Rattray, A.J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., and Paull, T.T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol. Cell* 28, 638–651.
- Leroy, P., Guilhot, N., Sakai, H., Bernard, A., Choulet, F., Theil, S., Reboux, S., Amano, N., Flutre, T., Pelegriin, C., et al. (2012). TriAnnot: A Versatile and High Performance Pipeline for the Automated Annotation of Plant Genomes. *Front. Plant Sci.* 3.
- Li, C., Liang, Y., Chen, C., Li, J., Xu, Y., Xu, Z., Ma, H., and Chong, K. (2006). Cloning and expression analysis of TSK1, a wheat SKP1 homologue, and functional comparison with Arabidopsis ASK1 in male meiosis and auxin signalling. *Funct. Plant Biol. FPB* 33, 381–390.

- Ling, H.-Q., Ma, B., Shi, X., Liu, H., Dong, L., Sun, H., Cao, Y., Gao, Q., Zheng, S., Li, Y., et al. (2018). Genome sequence of the progenitor of wheat A subgenome *Triticum urartu*. *Nature* *557*, 424–428.
- Liu, J., Wu, T.C., and Lichten, M. (1995). The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. *EMBO J.* *14*, 4599–4608.
- Lloyd, A.H., Ranoux, M., Vautrin, S., Glover, N., Fourment, J., Charif, D., Choulet, F., Lassalle, G., Marande, W., Tran, J., et al. (2014). Meiotic Gene Evolution: Can You Teach a New Dog New Tricks? *Mol. Biol. Evol.* *31*, 1724–1727.
- Louis, E.J., and Borts, R.H. (2003). Meiotic recombination: too much of a good thing? *Curr. Biol. CB* *13*, R953-955.
- Lukaszewski, A.J., Kopecky, D., and Linc, G. (2012). Inversions of chromosome arms 4AL and 2BS in wheat invert the patterns of chiasma distribution. *Chromosoma* *121*, 201–208.
- Luo, M.-C., Gu, Y.Q., Puiu, D., Wang, H., Twardziok, S.O., Deal, K.R., Huo, N., Zhu, T., Wang, L., Wang, Y., et al. (2017). Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature* *551*, 498–502.
- de Maagd, R.A., Loonen, A., Chouaref, J., Pelé, A., Meijer-Dekens, F., Fransz, P., and Bai, Y. (2020). CRISPR/Cas inactivation of *RECQ4* increases homeologous crossovers in an interspecific tomato hybrid. *Plant Biotechnol. J.* *18*, 805–813.
- Macaisne, N., Kessler, Z., and Yanowitz, J.L. (2018). Meiotic Double-Strand Break Proteins Influence Repair Pathway Utilization. *Genetics* *210*, 843–856.
- Maccaferri, M., Harris, N.S., Twardziok, S.O., Pasam, R.K., Gundlach, H., Spannagl, M., Ormanbekova, D., Lux, T., Prade, V.M., Milner, S.G., et al. (2019). Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nat. Genet.* *51*, 885.
- MacQueen, A.J., Colaiácovo, M.P., McDonald, K., and Villeneuve, A.M. (2002). Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev.* *16*, 2428–2442.
- Malik, S.-B., Ramesh, M.A., Hulstrand, A.M., and Logsdon, J.M. (2007). Protist homologs of the meiotic *Spo11* gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineagespecific loss. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 2827–2841.
- Mancera, E., Bourgon, R., Brozzi, A., Huber, W., and Steinmetz, L.M. (2008). High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature* *454*, 479–485.
- Marand, A.P., Zhao, H., Zhang, W., Zeng, Z., Fang, C., and Jiang, J. (2019). Historical Meiotic Crossover Hotspots Fueled Patterns of Evolutionary Divergence in Rice. *Plant Cell* *31*, 645–662.
- Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., International Wheat Genome Sequencing Consortium, Jakobsen, K.S., Wulff, B.B.H., Steuernagel, B., Mayer, K.F.X., et al. (2014). Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* *345*, 1250092.
- Marsolier-Kergoat, M.-C., Khan, M.M., Schott, J., Zhu, X., and Llorente, B. (2018). Mechanistic View and Genetic Control of DNA Recombination during Meiosis. *Mol. Cell* *70*, 9-20.e6.

- Martín, A.C., Shaw, P., Phillips, D., Reader, S., and Moore, G. (2014a). Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. *Nat. Commun.* *5*, 4580.
- Martín, A.C., Shaw, P., Phillips, D., Reader, S., and Moore, G. (2014b). Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. *Nat. Commun.* *5*, 4580.
- Martín, A.C., Rey, M.-D., Shaw, P., and Moore, G. (2017). Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* *126*, 669–680.
- de Massy, B. (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 563–599.
- de Massy, B., Rocco, V., and Nicolas, A. (1995). The nucleotide mapping of DNA double-strand breaks at the CYS3 initiation site of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *14*, 4589–4598.
- McFADDEN, E.S., and Sears, E.R. (1946). The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.* *37*, 81–107.
- McKim, K.S., and Hayashi-Hagihara, A. (1998). mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev.* *12*, 2932–2942.
- McMahill, M.S., Sham, C.W., and Bishop, D.K. (2007). Synthesis-dependent strand annealing in meiosis. *PLoS Biol.* *5*, e299.
- Melamed-Bessudo, C., and Levy, A.A. (2012). Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E981–988.
- Mello-Sampayo, T. (1971). Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nature. New Biol.* *230*, 22–23.
- Mello-Sampayo, T., and Lorente, R. (1968). The role of chromosome 3D in the regulation of meiotic pairing in hexaploid wheat. *EWAC Newslett* 216–24.
- Meneely, P.M., Farago, A.F., and Kauffman, T.M. (2002). Crossover distribution and high interference for both the X chromosome and an autosome during oogenesis and spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *162*, 1169–1177.
- Mercier, R., Mézard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N., and Grelon, M. (2015). The molecular biology of meiosis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *66*, 297–327.
- Meselson, M.S., and Radding, C.M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 358–361.
- Metzler-Guillemain, C., and de Massy, B. (2000). Identification and characterization of an SPO11 homolog in the mouse. *Chromosoma* *109*, 133–138.
- Meuwissen, R.L., Offenberg, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M., and Heyting, C. (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* *11*, 5091–5100.

- Mézard, C., Vignard, J., Drouaud, J., and Mercier, R. (2007). The road to crossovers: plants have their say. *Trends Genet. TIG* 23, 91–99.
- Miao, C., Tang, D., Zhang, H., Wang, M., Li, Y., Tang, S., Yu, H., Gu, M., and Cheng, Z. (2013). Central region component1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in rice. *Plant Cell* 25, 2998–3009.
- Mieulet, D., Aubert, G., Bres, C., Klein, A., Droc, G., Vieille, E., Rond-Coissieux, C., Sanchez, M., Dalmais, M., Mauxion, J.-P., et al. (2018a). Unleashing meiotic crossovers in crops. *Nat. Plants* 4, 1010–1016.
- Mieulet, D., Aubert, G., Bres, C., Klein, A., Droc, G., Vieille, E., Rond-Coissieux, C., Sanchez, M., Dalmais, M., Mauxion, J.-P., et al. (2018b). Unleashing meiotic crossovers in crops. *Nat. Plants* 4, 1010–1016.
- Miftahudin, Ross, K., Ma, X.-F., Mahmoud, A.A., Layton, J., Milla, M.A.R., Chikmawati, T., Ramalingam, J., Feril, O., Pathan, M.S., et al. (2004). Analysis of Expressed Sequence Tag Loci on Wheat Chromosome Group 4. *Genetics* 168, 651–663.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J.C., and Forejt, J. (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* 323, 373–375.
- Mirouze, M., Lieberman-Lazarovich, M., Aversano, R., Bucher, E., Nicolet, J., Reinders, J., and Paszkowski, J. (2012). Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5880–5885.
- Miura, T., Yamana, Y., Usui, T., Ogawa, H.I., Yamamoto, M.-T., and Kusano, K. (2012). Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the Irc20 and Srs2 DNA helicases. *Genetics* 191, 65–78.
- Mondal, S., Singh, R.P., Mason, E.R., Huerta-Espino, J., Autrique, E., and Joshi, A.K. (2016). Grain yield, adaptation and progress in breeding for early-maturing and heat-tolerant wheat lines in South Asia. *Field Crops Res.* 192, 78–85.
- Moore, G., and Shaw, P. (2009). Improving the chances of finding the right partner. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 99–104.
- Mouka, A. (2017). Analyse des variations du nombre de copies d'ADN dans une cohorte d'hommes infertiles et génération de modèles génétiques d'étude de la méiose à partir de cellules iPS de patients infertiles. phdthesis. Université Paris-Saclay.
- Muyt, A.D., Mercier, R., Mézard, C., and Grelon, M. (2009). Meiotic recombination and crossovers in plants. *Genome Dyn.* 5, 14–25.
- Myers, S., Spencer, C.C.A., Auton, A., Bottolo, L., Freeman, C., Donnelly, P., and McVean, G. (2006). The distribution and causes of meiotic recombination in the human genome. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 526–530.
- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R.E., Freeman, C., MacFie, T.S., McVean, G., and Donnelly, P. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* 327, 876–879.
- Nalam, V.J., Vales, M.I., Watson, C.J.W., Kianian, S.F., and Riera-Lizarazu, O. (2006). Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 112, 373–381.

- Neale, M.J., and Keeney, S. (2006). Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* *442*, 153–158.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* *436*, 1053–1057.
- Nelson, J.C., A. E. VAN DEYNZE, E., AUTRIQUE, M., SORRELIS, Y., and H. LC rl aL (1995). Molecular mapping of wheat, Homoeologous group 2.
- Nibau, C., Lloyd, A., Dadarou, D., Betekhtin, A., Tsilimigka, F., Phillips, D.W., and Doonan, J.H. (2020). CDKG1 Is Required for Meiotic and Somatic Recombination Intermediate Processing in Arabidopsis. *Plant Cell* *32*, 1308–1322.
- Nicolas, A., Treco, D., Schultes, N.P., and Szostak, J.W. (1989). An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *338*, 35–39.
- Nishant, K.T., Plys, A.J., and Alani, E. (2008). A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *179*, 747–755.
- Nonomura, K.-I., Nakano, M., Fukuda, T., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., and Kurata, N. (2004). The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell* *16*, 1008–1020.
- Oh, S.D., Lao, J.P., Hwang, P.Y.-H., Taylor, A.F., Smith, G.R., and Hunter, N. (2007). BLM ortholog, Sgs1, prevents aberrant crossing-over by suppressing formation of multichromatid joint molecules. *Cell* *130*, 259–272.
- Okamoto, M., and Sears, E.R. (2011). CHROMOSOMES INVOLVED IN TRANSLOCATIONS OBTAINED FROM HAPLOIDS OF COMMON WHEAT. *Can. J. Genet. Cytol.*
- Oke, A., Anderson, C.M., Yam, P., and Fung, J.C. (2014). Controlling meiotic recombinational repair - specifying the roles of ZMMs, Sgs1 and Mus81/Mms4 in crossover formation. *PLoS Genet.* *10*, e1004690.
- Osman, K., Sanchez-Moran, E., Higgins, J.D., Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2006). Chromosome synapsis in Arabidopsis: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex. *Chromosoma* *115*, 212–219.
- Osman, K., Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., and Franklin, F.C.H. (2011). Pathways to meiotic recombination in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* *190*, 523–544.
- Osman, K., Algotishi, U., Higgins, J.D., Henderson, I.R., Edwards, K.J., Franklin, F.C.H., and SanchezMoran, E. (2021). Distal Bias of Meiotic Crossovers in Hexaploid Bread Wheat Reflects Spatio-Temporal Asymmetry of the Meiotic Program. *Front. Plant Sci.* *12*, 631323.
- Otto, S.P. (2009). The evolutionary enigma of sex. *Am. Nat.* *174 Suppl 1*, S1–S14.
- Otto, S.P., and Lenormand, T. (2002). Resolving the paradox of sex and recombination. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 252–261.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2001). c(3)G encodes a Drosophila synaptonemal complex protein. *Genes Dev.* *15*, 3130–3143.

- Paigen, K., and Petkov, P.M. (2018). PRDM9 and Its Role in Genetic Recombination. *Trends Genet.* *TIG 34*, 291–300.
- Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H.G., Tischfield, S.E., Zhu, X., Neale, M.J., Jasin, M., Socci, N.D., et al. (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* *144*, 719–731.
- Parvanov, E.D., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* *327*, 835.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., et al. (2008). A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* *322*, 101–104.
- Pecinka, A., Fang, W., Rehmsmeier, M., Levy, A.A., and Mittelsten Scheid, O. (2011). Polyploidization increases meiotic recombination frequency in Arabidopsis. *BMC Biol.* *9*, 24.
- Pelé, A., Falque, M., Trotoux, G., Eber, F., Nègre, S., Gilet, M., Huteau, V., Lodé, M., Jousseume, T., Dechaumet, S., et al. (2017). Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in Brassicas. *PLOS Genet.* *13*, e1006794.
- Pérez, R., Cuadrado, A., Chen, I.P., Puchta, H., Jouve, N., and De Bustos, A. (2011). The Rad50 genes of diploid and polyploid wheat species. Analysis of homologue and homoeologue expression and interactions with Mre11. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* *122*, 251–262.
- Petes, T.D. (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 360–369.
- Phillips, D., Nibau, C., Wnetrzak, J., and Jenkins, G. (2012). High resolution analysis of meiotic chromosome structure and behaviour in barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLoS One* *7*, e39539.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 789–802.
- Powers, N.R., Parvanov, E.D., Baker, C.L., Walker, M., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2016). The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLoS Genet.* *12*, e1006146.
- Prieto-Godino, L.L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J.R., Dal Peraro, M., and Benton, R. (2016). Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature* *539*, 93–97.
- Puizina, J., Siroky, J., Mokros, P., Schweizer, D., and Riha, K. (2004). Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* *16*, 1968–1978.
- Pyatnitskaya, A., Borde, V., and De Muyt, A. (2019). Crossing and zipping: molecular duties of the ZMM proteins in meiosis. *Chromosoma*.
- Qi, L., Friebe, B., Zhang, P., and Gill, B.S. (2007). Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *15*, 3–19.
- RABL, C. (1885). *Über Zelltheilung.* *Morphol Jahrb* *10*, 214–330.

- Radding, C.M. (1982). Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. *Annu. Rev. Genet.* *16*, 405–437.
- Rao, H.B.D.P., Qiao, H., Bhatt, S.K., Bailey, L.R.J., Tran, H.D., Bourne, S.L., Qiu, W., Deshpande, A., Sharma, A.N., Beebout, C.J., et al. (2017). A SUMO-ubiquitin relay recruits proteasomes to chromosome axes to regulate meiotic recombination. *Science*.
- Reddy, A.S.N., Marquez, Y., Kalyna, M., and Barta, A. (2013). Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. *Plant Cell* *25*, 3657–3683.
- Regairaz, M., Zhang, Y.-W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *J. Cell Biol.* *195*, 739–749.
- Reinholdt, L.G., and Schimenti, J.C. (2005). Mei1 is epistatic to Dmc1 during mouse meiosis. *Chromosoma* *114*, 127–134.
- Reitz, D., Grubb, J., and Bishop, D.K. (2019). A mutant form of Dmc1 that bypasses the requirement for accessory protein Mei5-Sae3 reveals independent activities of Mei5-Sae3 and Rad51 in Dmc1 filament stability. *PLOS Genet.* *15*, e1008217.
- Rey, M.-D., Martín, A.C., Higgins, J., Swarbreck, D., Uauy, C., Shaw, P., and Moore, G. (2017a). Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol. Breed. New Strateg. Plant Improv.* *37*, 95.
- Rey, M.-D., Martín, A.C., Higgins, J., Swarbreck, D., Uauy, C., Shaw, P., and Moore, G. (2017b). Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol. Breed.* *37*.
- Ribeiro, J., Abby, E., Livera, G., and Martini, E. (2016). RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* *125*, 265–276.
- Riley, R., and Chapman, V. (1958). Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *Nature* *182*, 713–715.
- Riley, R., Chapman, V., and Kimber, G. (1959). Genetic Control of Chromosome Pairing in Intergeneric Hybrids with Wheat. *Nature* *183*, 1244–1246.
- Rimbert, H., Darrier, B., Navarro, J., Kitt, J., Choulet, F., Leveugle, M., Duarte, J., Rivière, N., Eversole, K., International Wheat Genome Sequencing Consortium, et al. (2018). High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PloS One* *13*, e0186329.
- Ritz, K.R., Noor, M.A.F., and Singh, N.D. (2017). Variation in Recombination Rate: Adaptive or Not? *Trends Genet. TIG* *33*, 364–374.
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Bourbon, H.-M., and de Massy, B. (2016). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* *351*, 943–949.
- Rockmill, B., Voelkel-Meiman, K., and Roeder, G.S. (2006). Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *174*, 1745–1754.

- Rodgers-Melnick, E., Bradbury, P.J., Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Acharya, C.B., Mitchell, S.E., Li, C., Li, Y., and Buckler, E.S. (2015). Recombination in diverse maize is stable, predictable, and associated with genetic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 3823–3828.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 \*. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Mol. Cell* *6*, 975–987.
- Rosenberg, S.C., and Corbett, K.D. (2015). The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling. *J. Cell Biol.* *211*, 745–755.
- Rothenberg, M., Kohli, J., and Ludin, K. (2009). Ctp1 and the MRN-complex are required for endonucleolytic Rec12 removal with release of a single class of oligonucleotides in fission yeast. *PLoS Genet.* *5*, e1000722.
- Safár, J., Bartos, J., Janda, J., Bellec, A., Kubaláková, M., Valárik, M., Pateyron, S., Weiserová, J., Tusková, R., Cíhalíková, J., et al. (2004). Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *39*, 960–968.
- Saintenac, C., Falque, M., Martin, O.C., Paux, E., Feuillet, C., and Sourdille, P. (2009). Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* *181*, 393–403.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 229–257.
- Sanchez-Moran, E., Santos, J.-L., Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2007). ASY1 mediates AtDMC1dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev.* *21*, 2220–2233.
- Sarbajna, S., Davies, D., and West, S.C. (2014). Roles of SLX1–SLX4, MUS81–EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes Dev.* *28*, 1124–1136.
- Sato, H., Miyamoto, T., Yogev, L., Namiki, M., Koh, E., Hayashi, H., Sasaki, Y., Ishikawa, M., Lamb, D.J., Matsumoto, N., et al. (2006). Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J. Hum. Genet.* *51*, 533–540.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 621–627.
- Schild-Prüfert, K., Saito, T.T., Smolikov, S., Gu, Y., Hincapie, M., Hill, D.E., Vidal, M., McDonald, K., and Colaiácovo, M.P. (2011). Organization of the synaptonemal complex during meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *189*, 411–421.
- Schubert, I., and Shaw, P. (2011). Organization and dynamics of plant interphase chromosomes. *Trends Plant Sci.* *16*, 273–281.
- Schwacha, A., and Kleckner, N. (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* *90*, 1123–1135.
- Sears, E.R. (1939). Cytogenetic Studies with Polyploid Species of Wheat. I. Chromosomal Aberrations in the Progeny of a Haploid of *Triticum Vulgare*. *Genetics* *24*, 509–523.

- Sears, E.R. (1944). Cytogenetic Studies with Polyploid Species of Wheat. II. Additional Chromosomal Aberrations in *Triticum Vulgare*. *Genetics* **29**, 232–246.
- Sears, E.R. (1954a). . The aneuploids of common wheat.
- Sears, E.R. (1954b). . The aneuploids of common wheat.
- Séguéla-Arnaud, M., Crismani, W., Larchevêque, C., Mazel, J., Froger, N., Choinard, S., Lemhemdi, A., Macaisne, N., Van Leene, J., Gevaert, K., et al. (2015a). Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 $\alpha$  and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4713–4718.
- Séguéla-Arnaud, M., Crismani, W., Larchevêque, C., Mazel, J., Froger, N., Choinard, S., Lemhemdi, A., Macaisne, N., Van Leene, J., Gevaert, K., et al. (2015b). Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 $\alpha$  and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 4713–4718.
- Séguéla-Arnaud, M., Choinard, S., Larchevêque, C., Girard, C., Froger, N., Crismani, W., and Mercier, R. (2017). RMI1 and TOP3 $\alpha$  limit meiotic CO formation through their C-terminal domains. *Nucleic Acids Res.* **45**, 1860–1871.
- Sepsi, A., and Schwarzacher, T. (2020). Chromosome–nuclear envelope tethering – a process that orchestrates homologue pairing during plant meiosis? *J. Cell Sci.* **133**.
- Serra, H., Lambing, C., Griffin, C.H., Topp, S.D., Nageswaran, D.C., Underwood, C.J., Ziolkowski, P.A., Séguéla-Arnaud, M., Fernandes, J.B., Mercier, R., et al. (2018). Massive crossover elevation via combination of HEI10 and *recq4a recq4b* during *Arabidopsis* meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 2437–2442.
- Serra, H., Svačina, R., Baumann, U., Whitford, R., Sutton, T., Bartoš, J., and Sourdille, P. (2021). Ph2 encodes the mismatch repair protein MSH7-3D that inhibits wheat homoeologous recombination. *Nat. Commun.* **12**, 803.
- Serrentino, M.-E., and Borde, V. (2012). The spatial regulation of meiotic recombination hotspots: are all DSB hotspots crossover hotspots? *Exp. Cell Res.* **318**, 1347–1352.
- Shao, T., Tang, D., Wang, K., Wang, M., Che, L., Qin, B., Yu, H., Li, M., Gu, M., and Cheng, Z. (2011). OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis. *Plant Physiol.* **156**, 1386–1396.
- Shen, Y., Tang, D., Wang, K., Wang, M., Huang, J., Luo, W., Luo, Q., Hong, L., Li, M., and Cheng, Z. (2012). ZIP4 in homologous chromosome synapsis and crossover formation in rice meiosis. *J. Cell Sci.* **125**, 2581–2591.
- Shilo, S., Melamed-Bessudo, C., Dorone, Y., Barkai, N., and Levy, A.A. (2015). DNA Crossover Motifs Associated with Epigenetic Modifications Delineate Open Chromatin Regions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**, 2427–2436.
- Shingu, Y., Mikawa, T., Onuma, M., Hirayama, T., and Shibata, T. (2010). A DNA-binding surface of SPO11-1, an *Arabidopsis* SPO11 orthologue required for normal meiosis. *FEBS J.* **277**, 2360–2374.

- Shingu, Y., Tokai, T., Agawa, Y., Toyota, K., Ahamed, S., Kawagishi-Kobayashi, M., Komatsu, A., Mikawa, T., Yamamoto, M.-T., Wakasa, K., et al. (2012). The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a *Drosophila* bioassay. *BMC Mol. Biol.* *13*, 1.
- Slotman, J.A., Paul, M.W., Carofiglio, F., de Gruiter, H.M., Vergroesen, T., Koornneef, L., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., and Baarends, W.M. (2020). Super-resolution imaging of RAD51 and DMC1 in DNA repair foci reveals dynamic distribution patterns in meiotic prophase. *PLoS Genet.* *16*, e1008595.
- Smith, G.R. (2004). How Homologous Recombination Is Initiated: Unexpected Evidence for Single-Strand Nicks from V(D)J Site-Specific Recombination. *Cell* *117*, 146–148.
- Smolikov, S., Schild-Prüfert, K., and Colaiácovo, M.P. (2009). A yeast two-hybrid screen for SYP-3 interactors identifies SYP-4, a component required for synaptonemal complex assembly and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLoS Genet.* *5*, e1000669.
- Sobhy, M.A., Bralić, A., Raducanu, V.-S., Takahashi, M., Tehseen, M., Rashid, F., Zaher, M.S., and Hamdan, S.M. (2019). Resolution of the Holliday junction recombination intermediate by human GEN1 at the single-molecule level. *Nucleic Acids Res.* *47*, 1935–1949.
- Sprink, T., and Hartung, F. (2014). The splicing fate of plant SPO11 genes. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K., and Sugimoto-Shirasu, K. (2006). Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *48*, 206–216.
- Stahl, F.W. (1979). Special sites in generalized recombination. *Annu. Rev. Genet.* *13*, 7–24.
- Stewart, M.N., and Dawson, D.S. (2008). Changing partners: moving from non-homologous to homologous centromere pairing in meiosis. *Trends Genet. TIG* *24*, 564–573.
- Su, H., Cheng, Z., Huang, J., Lin, J., Copenhaver, G.P., Ma, H., and Wang, Y. (2017). Arabidopsis RAD51, RAD51C and XRCC3 proteins form a complex and facilitate RAD51 localization on chromosomes for meiotic recombination. *PLOS Genet.* *13*, e1006827.
- Subramanian, V.V., Zhu, X., Markowitz, T.E., Vale-Silva, L.A., San-Segundo, P.A., Hollingsworth, N.M., Keeney, S., and Hochwagen, A. (2019). Persistent DNA-break potential near telomeres increases initiation of meiotic recombination on short chromosomes. *Nat. Commun.* *10*, 970.
- Sui, T., Song, Y., Liu, Z., Chen, M., Deng, J., Xu, Y., Lai, L., and Li, Z. (2018). CRISPR-induced exon skipping is dependent on premature termination codon mutations. *Genome Biol.* *19*.
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., and Szostak, J.W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* *338*, 87–90.
- Sun, H., Treco, D., and Szostak, J.W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* *64*, 1155–1161.
- Sun, L., Wang, J., Sang, M., Jiang, L., Zhao, B., Cheng, T., Zhang, Q., and Wu, R. (2017). Landscaping Crossover Interference Across a Genome. *Trends Plant Sci.* *22*, 894–907.
- Sym, M., and Roeder, G.S. (1994). Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. *Cell* *79*, 283–292.

- Sym, M., Engebrecht, J.A., and Roeder, G.S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72, 365–378.
- Székvölgyi, L., Ohta, K., and Nicolas, A. (2015). Initiation of meiotic homologous recombination: flexibility, impact of histone modifications, and chromatin remodeling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25–35.
- Tang, Y., Yin, Z., Zeng, Y., Zhang, Q., Chen, L., He, Y., Lu, P., Ye, D., and Zhang, X. (2017). MTOPVIB interacts with AtPRD1 and plays important roles in formation of meiotic DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 7, 10007.
- Templado, C., Uroz, L., and Estop, A. (2013). New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 634–643.
- Thacker, D., Mohibullah, N., Zhu, X., and Keeney, S. (2014). Homologue engagement controls meiotic DNA break number and distribution. *Nature* 510, 241–246.
- Tiang, C.-L., He, Y., and Pawlowski, W. (2011). Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis, and Meiosis in Plants. *Plant Physiol.* 158, 26–34.
- Trelles-Sticken, E., Adelfalk, C., Loidl, J., and Scherthan, H. (2005a). Meiotic telomere clustering requires actin for its formation and cohesin for its resolution. *J. Cell Biol.* 170, 213–223.
- Trelles-Sticken, E., Bonfils, S., Sollier, J., Géli, V., Scherthan, H., and de La Roche Saint-André, C. (2005b). Set1- and Clb5-deficiencies disclose the differential regulation of centromere and telomere dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis. *J. Cell Sci.* 118, 4985–4994.
- Tung, K.S., and Roeder, G.S. (1998). Meiotic chromosome morphology and behavior in zip1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149, 817–832.
- Uanschou, C., Siwiec, T., Pedrosa-Harand, A., Kerzendorfer, C., Sanchez-Moran, E., Novatchkova, M., Akimcheva, S., Woglar, A., Klein, F., and Schlögelhofer, P. (2007). A novel plant gene essential for meiosis is related to the human CtIP and the yeast COM1/SAE2 gene. *EMBO J.* 26, 5061–5070.
- Umlauf, D. (2015). Le génome intime... et en trois dimensions. *médecine/sciences* 31, 304–311.
- Underwood, C.J., Choi, K., Lambing, C., Zhao, X., Serra, H., Borges, F., Simorowski, J., Ernst, E., Jacob, Y., Henderson, I.R., et al. (2018). Epigenetic activation of meiotic recombination near *Arabidopsis thaliana* centromeres via loss of H3K9me2 and non-CG DNA methylation. *Genome Res.* 28, 519–531.
- Uringa, E.-J., Youds, J.L., Lisaingo, K., Lansdorp, P.M., and Boulton, S.J. (2011). RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 39, 1647–1655.
- Vítor, A.C., Huertas, P., Legube, G., and de Almeida, S.F. (2020). Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Front. Mol. Biosci.* 7.
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., Mézard, C., Mayer, C., and Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* 351, 939–943.

- Wang, J., Chang, Y.-F., Hamilton, J.I., and Wilkinson, M.F. (2002). Nonsense-Associated Altered Splicing: A Frame-Dependent Response Distinct from Nonsense-Mediated Decay. *Mol. Cell* *10*, 951–957.
- Wang, S., Zickler, D., Kleckner, N., and Zhang, L. (2015). Meiotic crossover patterns: obligatory crossover, interference and homeostasis in a single process. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 305–314.
- Wang, Y., Cheng, Z., Lu, P., Timofejeva, L., and Ma, H. (2014). Molecular Cell Biology of Male Meiotic Chromosomes and Isolation of Male Meocytes in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1110*, 217–230.
- Wangen, J.R., and Green, R. (2020). Stop codon context influences genome-wide stimulation of termination codon readthrough by aminoglycosides. *ELife* *9*.
- Werner, J.E., Endo, T.R., and Gill, B.S. (1992). Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 11307–11311.
- Westerman, M. (1971). The effect of x-irradiation on chiasma frequency in *Chorthippus brunneus*. *Heredity* *27*, 83–91.
- Wijnker, E., Velikkakam James, G., Ding, J., Becker, F., Klasen, J.R., Rawat, V., Rowan, B.A., de Jong, D.F., de Snoo, C.B., Zapata, L., et al. (2013). The genomic landscape of meiotic crossovers and gene conversions in *Arabidopsis thaliana*. *ELife* *2*, e01426.
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C.R., Cooke, H.J., Jasin, M., Keeney, S., et al. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet.* *5*, e1000702.
- Wu, T.C., and Lichten, M. (1995). Factors that affect the location and frequency of meiosis-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *140*, 55–66.
- Wulff, B.B.H., and Moscou, M.J. (2014). Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front. Plant Sci.* *5*, 692.
- Xu, L., Ajimura, M., Padmore, R., Klein, C., and Kleckner, N. (1995). NDT80, a meiosis-specific gene required for exit from pachytene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6572–6581.
- Xue, Z., Li, Y., Zhang, L., Shi, W., Zhang, C., Feng, M., Zhang, F., Tang, D., Yu, H., Gu, M., et al. (2016). OsMTOPVIB Promotes Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in Rice. *Mol. Plant* *9*, 1535–1538.
- Yao, Y., Li, X., Chen, W., Liu, H., Mi, L., Ren, D., Mo, A., and Lu, P. (2020). ATM Promotes RAD51 Mediated Meiotic DSB Repair by Inter-Sister-Chromatid Recombination in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* *11*.
- Yeh, H.-Y., Lin, S.-W., Wu, Y.-C., Chan, N.-L., and Chi, P. (2017). Functional characterization of the meiosis-specific DNA double-strand break inducing factor SPO-11 from *C. elegans*. *Sci. Rep.* *7*, 2370.
- Yelina, N.E., Choi, K., Chelysheva, L., Macaulay, M., de Snoo, B., Wijnker, E., Miller, N., Drouaud, J., Grelon, M., Copenhaver, G.P., et al. (2012). Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants. *PLoS Genet.* *8*, e1002844.
- Yelina, N.E., Lambing, C., Hardcastle, T.J., Zhao, X., Santos, B., and Henderson, I.R. (2015). DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *29*, 2183–2202.

- Youds, J.L., Mets, D.G., McIlwraith, M.J., Martin, J.S., Ward, J.D., O'Neil, N.J., Rose, A.M., West, S.C., Meyer, B.J., and Boulton, S.J. (2010). RTEL-1 enforces meiotic crossover interference and homeostasis. *Science* *327*, 1254–1258.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., and Hunter, N. (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell* *149*, 334–347.
- Zamariola, L., Tiang, C.-L., Storme, N., Pawlowski, W., and Geelen, D. (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. *Front. Plant Sci.* *5*, 279.
- Zetka, M. (2009). Homologue pairing, recombination and segregation in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Dyn.* *5*, 43–55.
- Zetka, M.C., Kawasaki, I., Strome, S., and Müller, F. (1999). Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. *Genes Dev.* *13*, 2258–2270.
- Zhang, H., Lyu, Z., Fan, Y., Evans, C.R., Barber, K.W., Banerjee, K., Igoshin, O.A., Rinehart, J., and Ling, J. (2020). Metabolic stress promotes stop-codon readthrough and phenotypic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *117*, 22167–22172.
- Zhang, L., Wang, S., Yin, S., Hong, S., Kim, K.P., and Kleckner, N. (2014). Topoisomerase II mediates meiotic crossover interference. *Nature* *511*, 551–556.
- Zhang, P., Zhang, Y., Sun, L., Sinumporn, S., Yang, Z., Sun, B., Xuan, D., Li, Z., Yu, P., Wu, W., et al. (2017). The Rice AAA-ATPase OsFIGNL1 Is Essential for Male Meiosis. *Front. Plant Sci.* *8*, 1639.
- Zhao, C., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1995). The structure of porcine protegrin genes. *FEBS Lett.* *368*, 197–202.
- Zheng, T., Nibau, C., Phillips, D.W., Jenkins, G., Armstrong, S.J., and Doonan, J.H. (2014). CDKG1 protein kinase is essential for synapsis and male meiosis at high ambient temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 2182–2187.
- Zickler, D. (1977). Development of the synaptonemal complex and the “recombination nodules” during meiotic prophase in the seven bivalents of the fungus *Sordaria macrospora* Auersw. *Chromosoma* *61*, 289–316.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* *33*, 603–754.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*.
- Ziolkowski, P.A., Underwood, C.J., Lambing, C., Martinez-Garcia, M., Lawrence, E.J., Ziolkowska, L., Griffin, C., Choi, K., Franklin, F.C.H., Martienssen, R.A., et al. (2017). Natural variation and dosage of the HEI10 meiotic E3 ligase control *Arabidopsis* crossover recombination. *Genes Dev.* *31*, 306–317.
- Zohary, D., Hopf, M., and Weiss, E. (2000). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin* (Oxford University Press).



## 8 Annexes

### 8.1 Résultats complémentaires

#### 8.1.1 BLASTP des gènes méiotiques

Tableau 40: Taille des protéines de l'initiation de la méiose des triticiées

TAILLE DES PROTEINES EN MOYENNE (aa)							
INITIATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ASY1	381	596	555	366	564	535	519
ASY2	278	1385	606	590	461	137	574
ASY3	858	793	837	853	840	338	788
ASY4	212	212	212	196	212	162	204
DYAD	576	639	774	708	783	1491	801
MTOPVIB	255	493	481	225	481	489	429
PRD1	1293	1330	1276	1033	1282	1808	1289
SDS	464	578	464	336	464	350	438
SMC3	679	1204	1204	1038	1098	1079	1085
SPO11-1	331	362	387	230	387	441	353
SPO11-2	385	383	354	384	338	441	372
SYN4	1324	1031	1499	838	1436	1584	1298
TOP6A	441	427	441	441	432	441	438
TOP6B	615	670	706	672	654		673
VIP3	322	321	322	270	255	323	298
Total général	561	695	673	562	646	687	639

**Tableau 41:** Taille des protéines de la maturation de la méiose des triticiées

TAILLE DES PROTEINES EN MOYENNE (aa)							
MATURATION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
ATM	1305,0	2598,0	2846,7	1658,5	2769,0	3043,0	2434,1
ATR	2371,0	2702,0	2702,7	1128,3	2615,5	1962,0	2159,9
BRCA2	988,0	1155,0	1538,7	987,0	1677,5	1457,0	1354,5
COM1	556,0	588,0	593,0	614,0	554,5	586,0	584,6
DMC1	379,0	344,0	344,7	375,0	344,0	338,0	353,3
G-H2AX	146,5	142,0	142,7	161,5	129,5	109,0	142,0
H2AXB	176,5	142,0	137,0	177,5	129,5	109,0	144,8
MRE11	526,0	720,0	702,0	621,0	695,5	604,0	658,9
NBS1	459,0	542,0	574,0	542,0	536,5	574,0	545,4
RAD50	853,0	1316,0	1316,0	975,0	896,0	1282,0	1114,1
RAD51	359,0	342,0	342,7	356,0	343,0	338,0	346,5
<b>Total général</b>	<b>649,4</b>	<b>962,8</b>	<b>948,6</b>	<b>665,7</b>	<b>971,9</b>	<b>816,9</b>	<b>848,5</b>

**Tableau 42:** Taille des protéines de la résolution de la méiose des triticées

TAILLE DES PROTEINES EN MOYENNE (aa)							
RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON	ESPECE						Total général
	AET	At	Ta	Td	Tt	Tu	
EME1A	345,0	549,0	590,7	518,5	340,0	702,0	508,5
EME1B	375,0	551,0	460,7	704,0	563,0	471,0	531,3
FAN1	495,0	891,0	970,7	505,0	819,0	895,0	784,1
FANCD2	972,0	1484,0	1442,0	1231,5	1136,5		1279,8
FANCM	1483,0	1390,0	1481,7	617,0	1471,0	1086,0	1258,0
HEI10	302,0	304,0	302,7	297,5	297,5	1208,0	391,2
MER3	1164,0	1133,0	1263,7	1016,0	1281,0	2030,0	1271,2
MHF1	109,0	242,0	141,7	127,5	144,0	141,0	142,6
MHF2	712,0	104,0	109,0	91,5	111,0	117,0	172,7
MLH1	720,0	737,0	724,0	600,3	625,7	609,0	664,6
MLH3	785,0	1155,0	1211,0	829,7	1104,0	126,0	945,1
MSH4	848,0	792,0	863,7	1231,5	808,5	626,0	893,7
MSH5	597,0	807,0	721,7	573,5	643,5	1140,0	714,3
MUS81	308,4	659,0	558,0	385,5	468,4	486,4	447,9
RECQ4A	1013,0	1188,0	1153,3	1022,0	904,0	1097,0	1061,0
RECQ4B	1013,0	Nontranslating CDS	1105,7	1129,0	838,0	1097,0	1040,1
SHOC1	1677,0	1594,0	1731,2	1436,3	1661,3	1703,0	1636,3
ZYP1A	790,0	871,0	858,0	763,0	787,5	892,0	822,8
ZYP1B	790,0	856,0	863,0	807,0	848,0	892,0	843,7
ZYP4	693,0	936,0	952,3	654,7	848,3	863,0	831,5
<b>Total général</b>	<b>661,4</b>	<b>854,9</b>	<b>908,2</b>	<b>740,6</b>	<b>815,0</b>	<b>826,3</b>	<b>814,3</b>

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

**Tableau 43:** Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans l'initiation de la recombinaison méiotique sur le blé

Espèce	Cible	Code	Score	E-Value	%ID	Exons	Genomique (pb)	CDS (pb)	Protéine (aa)
At	ASY1	At-ASY1-Columbia	2906	0	100,0	22	4721	2145	596
Ta	TraesCS5D02G294100.1	Ta-ASY1-5D-CS	522	3,10E-62	79,9	22	7358	2186	592
Ta	TraesCS5B02G285800.1	Ta-ASY1-5B-CS	476	5,70E-56	62,1	20	5115	1984	538
Ta	TraesCS5A02G286500.1	Ta-ASY1-5A-CS	471	2,70E-55	65,9	20	5327	2277	535
AET	AET5Gv20666700.4	AET-ASY1-5D-AL8/78	522	4,40E-62	79,9	21	7319	2248	381
Tu	TRIUR3_25109-P1	Tu-ASY1-5-G1812	471	5,50E-56	65,9	19	4546	1608	535
Td	TRIDC5BG046830.5	Td-ASY1-5B-ZAVITAN	476	9,20E-56	62,1	15	4215	1670	366
<b>Td</b>	<b>PAS DE HIT</b>	<b>Td-ASY1-E -ZAVITAN</b>							
Tt	TRITD5Bv1G159710.1	Tt-ASY1-5B-Durum	490	1,10E-57	76,3	23	7514	1782	593
Tt	TRITD5Av1G167820.4	Tt-ASY1-5A-Durum	471	4,20E-55	65,9	19	4545	1608	535
At	ASY2	At-ASY2-Columbia	4352	0	100,0	15	6359	4290	1385
Ta	TraesCS5A02G304300.1	Ta-ASY2-5A-CS	348	9,10E-39	63,2	15	7744	2907	757
Ta	TraesCS5D02G294100.1	Ta-ASY2-5D-CS	373	3,20E-42	63,6	22	7358	2186	592
Ta	TraesCS5B02G285800.1	Ta-ASY2-5B-CS	226	6,20E-22	59,8	20	5115	1984	538
Ta	TraesCS5A02G286500.1	Ta-ASY2-5A-CS	226	6,20E-22	59,8	20	5115	1984	538
AET	AET5Gv20666700.5	AET-ASY2-5D-AL8/78	373	4,60E-42	63,6	10	4118	835	278
Td	TRIDC5BG046830.3	Td-ASY2-5B-ZAVITAN	353	3,00E-39	63,5	20	4817	1773	590
<b>Td</b>	<b>PAS DE HIT</b>	<b>Td-ASY2-E -ZAVITAN</b>							
Tu	TRIUR3_13606-P1	Tu-ASY2-5-G1812	342	1,20E-38	62,4	5	3167	411	137
Tt	TRITD5Bv1G159710.1	Tt-ASY2-5B-Durum	359	4,20E-40	63,3	23	7514	1782	593
Tt	TRITD5Av1G167820.2	Tt-ASY2-5A-Durum	349	1,00E-38	63,2	13	2712	990	329
At	ASY3	At-ASY3-Columbia	2107	0	100,0	10	4859	3073	793
Ta	TraesCS5B02G045200.1	Ta-ASY3-5B-CS	262	3,80E-26	40,5	11	6640	2921	847
Ta	TraesCS5D02G105000.2	Ta-ASY3-5D-CS	250	1,50E-24	39,7	11	9959	3150	861
Ta	TraesCS5A02G092700.2	Ta-ASY3-5A-CS	247	3,80E-24	39,7	9	9735	2409	802
AET	AET5Gv20250300.3	AET-ASY3-5D-AL8/78	251	1,60E-24	39,7	11	10147	3236	858

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC5BG007390.2	Td-ASY3-5B-ZAVITAN	261	8,30E-26	40,5	10	5920	2945	858
Td	TRIDC5AG015400.12	Td-ASY3-5A-ZAVITAN	247	6,20E-24	39,7	10	9926	2547	848
Tu	TRIUR3_12465-P1	Tu-ASY3-5-G1812	250	3,10E-25	39,7	9	4093	1017	338
Tt	TRITD5Bv1G018000.2	Tt-ASY3-5B-Durum	261	7,80E-26	40,5	10	5535	2544	847
Tt	TRITD5Av1G051120.6	Tt-ASY3-5A-Durum	247	5,90E-24	39,7	10	9515	2499	832
At	AT2G33793.1	At-ASY4-Columbia	1069	1,90E-134	100,0	8	2608	1094	212
AET	AET5Gv21154200.1	AET-ASY4-5D-AL8/78	455	4,00E-52	50,0	8	4208	1308	212
Tu	TRIUR3_14191-P1	Tu-ASY4-5-G1812	312	6,40E-34	51,6	7	3119	489	162
Ta	TraesCS5B02G519200.2	Ta-ASY4-5B-CS	461	4,50E-53	51,1	8	4194	1465	212
Ta	TraesCS4A02G353500.2	Ta-ASY4-4A-CS	461	4,50E-53	51,1	8	4095	1221	212
Ta	TraesCS5D02G518500.2	Ta-ASY4-5D-CS	455	2,90E-52	50,0	8	5324	2405	212
Td	TRIDC4AG052970.5	Td-ASY4-4A-ZAVITAN	461	7,40E-53	51,1	8	3887	1080	195
Td	TRIDC5BG077350.2	Td-ASY4-5B-ZAVITAN	461	7,40E-53	51,1	8	3671	950	196
Tt	TRITD5Bv1G240560.1	Tt-ASY4-5B-Durum	461	6,90E-53	51,1	8	3300	639	212
Tt	TRITD4Av1G219870.2	Tt-ASY4-4A-Durum	461	6,90E-53	51,1	8	3504	639	212
At	DYAD	At-DYAD,SWI1-Columbia	1114	1,10E-143	100,0	8	3262	2200	639
Ta	TraesCS5A02G370900.1	Ta-DYAD,SWI1-5A-CS	420	1,80E-48	55,4	11	6275	2899	767
Ta	TraesCS5B02G373300.1	Ta-DYAD,SWI1-5B-CS	418	3,30E-48	56,4	11	6375	2823	779
Ta	TraesCS5D02G380600.1	Ta-DYAD,SWI1-5D-CS	414	1,20E-47	54,7	11	6352	3122	776
AET	AET5Gv20869400.8	AET-DYAD,SWI1-5D-AL8/78	414	1,70E-47	54,7	10	5225	2117	576

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC5AG054250.2	Td-DYAD,SWI1-5A-ZAVITAN	420	2,90E-48	55,4	9	3895	2261	737
Td	TRIDC5BG058250.3	Td-DYAD,SWI1-5B-ZAVITAN	418	5,40E-48	56,4	7	3590	2037	679
Tu	TRIUR3_01990-P1	Tu-DYAD,SWI1-5-G1812	107	2,00E-06	56,8	12	12455	4476	1491
Tt	TRITD5Av1G197720.2	Tt-DYAD,SWI1-5A-Durum	420	2,70E-48	55,4	10	5424	2304	767

Tt	TRITD5Bv1G191060.4	Tt-DYAD,SWI1-5B-Durum	418	5,10E-48	56,4	10	5313	2397	798
At		At-MTOPVIB-Columbia	2594	0	100,0	12	3582	1719	493
Ta	TraesCS7D02G403500.1	Ta-MTOPVIB-7D-CS	208	4,1E-20	45,5	12	5304	1446	481
Ta	TraesCS7B02G309700.1	Ta-MTOPVIB-7B-CS	207	5,7E-20	45,5	12	5616	1443	480
Ta	TraesCS7A02G410300.1	Ta-MTOPVIB-7A-CS	207	5,7E-20	45,5	12	6128	1446	481
AET	AET7Gv20996300.10	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	208	5,9E-20	45,5	11	5366	2420	255
Td	TRIDC7BG049650.9	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	207	9,3E-20	45,5	4	3929	2886	225
Tu	TRIUR3_02543-P1	Tu-MTOPVIB-7-G1812	177	1,7E-16	50,7	11	6004	1470	489
Tt	TRITD7Av1G221100.3	Tt-MTOPVIB-7A-Durum	207	8,70E-20	45,5	12	6124	1446	481
Tt	TRITD7Bv1G170120.3	Tt-MTOPVIB-7B-Durum	207	8,70E-20	45,5	12	5616	1443	480
Td	PAS DE HIT	Td-MTOPVIB-PY-ZAVITAN							
At	PRD1	At-PRD1-Columbia	5434	0	100,0	9	5994	4703	1330
Ta	TraesCS2A02G275100.2	Ta-PRD1-2A-CS	543	1,40E-66	36,4	10	10576	4555	1283
Ta	TraesCS2D02G274100.1	Ta-PRD1-2D-CS	539	5,00E-66	36,5	9	10406	4750	1362

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS2B02G292500.3	Ta-PRD1-2B-CS	539	5,00E-66	36,0	10	16231	3549	1182
Td	TRIDC2AG039690.2	Td-PRD1-2A-ZAVITAN	543	2,30E-66	36,4	11	9914	3677	906
Td	TRIDC2BG042710.5	Td-PRD1-2B-ZAVITAN	539	8,20E-66	36,0	9	10635	3721	1159
Tt	TRITD2Av1G161440.4	Tt-PRD1-2A-Durum	543	2,10E-66	36,4	9	9691	3846	1281
Tt	TRITD2Bv1G136030.6	Tt-PRD1-2B-Durum	539	7,70E-66	36,0	9	9938	3852	1283
AET	AET2Gv20621200.5	AET-PRD1-2D-AL8/78	539	7,10E-66	36,4	9	10218	4497	1293
Tu	TRIUR3_29897-P1	Tu-PRD1-2-G1812	544	2,00E-67	36,4	16	15606	5427	1808
At	VIP3	At-REC14-Columbia	1248	6,80E-163	100,0	2	1771	1278	321
Td	TRIDC4AG026360.3	Td-SKI8,REC14-4A-ZAVITAN	697	9,70E-87	74,7	2	2577	1131	322
Td	TRIDC4BG024920.3	Td-SKI8,REC14-4B-ZAVITAN	695	1,80E-86	75,1	2	2303	814	218

Tt	TRITD4Av1G123360.2	Tt-SKI8,REC14-4A-Durum	697	9,00E-87	74,7	3	2412	768	255
Tt	TRITD4Bv1G073690.2	Tt-SKI8,REC14-4B-Durum	695	1,70E-86	75,1	3	2462	768	255
Ta	TraesCS4A02G165700.1	Ta-SKI8,REC14-4A-CS	697	5,90E-87	74,7	3	2790	1248	322
Ta	TraesCS4D02G145700.1	Ta-SKI8,REC14-4D-CS	696	8,10E-87	75,1	2	2701	1219	322
Ta	TraesCS4B02G144300.1	Ta-SKI8,REC14-4B-CS	695	1,10E-86	75,1	2	2837	1339	322
AET	AET4Gv20312600.1	AET-SKI8,REC14-4D-AL8/78	696	1,20E-86	75,1	2	2946	1460	322
Tu	TRIUR3_08590-P1	Tu-SKI8,REC14-4-G1812	557	1,80E-68	68,7	2	2376	972	323
At	SYN4	At-REC8-Columbia	5186	0	100,0	16	6612	3795	1031

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC3BG063450.11	Td-REC8,SYN4-3B-ZAVITAN	596	1,10E-70	92,0	17	10009	3269	837
Td	TRIDC3AG056590.5	Td-REC8-3A-ZAVITAN	596	1,10E-70	92,0	18	10374	3293	838
Tt	TRITD3Av1G232640.14	Tt-REC8-3A-Durum	596	1,00E-70	92,0	17	10643	4506	1501
Tt	TRITD3Bv1G220550.7	Tt-REC8-3B-Durum	596	1,00E-70	92,0	14	9526	4116	1371
Ta	TraesCS3D02G391700.3	Ta-REC8,SYN4-3D-CS	596	6,70E-71	92,0	15	11501	5477	1496
Ta	TraesCS3A02G397800.2	Ta-REC8,SYN4-3A-CS	596	6,70E-71	92,0	17	10951	4539	1512
Ta	TraesCS3B02G429700.3	Ta-REC8,SYN4-3B-CS	596	6,70E-71	92,0	16	11222	5405	1488
AET	AET3Gv20885500.13	AET-REC8,SYN4-AL8/78	596	9,50E-71	92,0	12	9490	3972	1324
Tu	TRIUR3_09532-P1	Tu-REC8,SYN4-3-G1812	394	1,80E-44	81,9	16	10733	4755	1584
At	SDS	At-SDS -Columbia	1202	8,70E-157	100,0	7	3366	2298	578
Ta	TraesCS4B02G239200.1	Ta-SDS -4B-CS	582	3,80E-71	58,4	7	3725	1392	463
Ta	TraesCS4D02G239200.1	Ta-SDS -4D-CS	577	1,90E-70	57,9	7	4541	1809	464
Ta	TraesCS4A02G062400.1	Ta-SDS -4A-CS	575	3,50E-70	57,4	7	4699	1949	465
AET	AET4Gv20597600.1	AET-SDS -4D-AL8/78	577	2,70E-70	57,9	7	4596	1863	464
Td	TRIDC4BG042040.3	Td-SDS -4B-ZAVITAN	582	6,20E-71	58,4	7	3746	1474	331
Td	TRIDC4AG008980.2	Td-SDS -4A-ZAVITAN	575	5,70E-70	57,4	7	4124	1386	341
Tu	TRIUR3_24359-P1	Tu-SDS -4-G1812	575	7,20E-71	57,4	7	3783	1050	350
Tt	TRITD4Bv1G144490.2	Tt-SDS -4B-Durum	582	5,90E-71	58,4	7	3664	1392	463
Tt	TRITD4Av1G025440.1	Tt-SDS -4A-Durum	575	5,40E-70	57,4	7	4069	1398	465
At	SPO11-1	At-SPO11-1-Columbia	1739	0	100,0	15	2858	1268	362
Ta	TraesCS5B02G396300.1	Ta-SPO11-1-5B-CS	919	2,4E-120	65,5	15	6743	3866	386
Ta	TraesCS5A02G391400.1	Ta-SPO11-1-5A-CS	914	1,2E-119	65,2	15	4123	1283	387

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS5D02G401100.1	Ta-SPO11-1-5D-CS	914	1,2E-119	65,2	15	4165	1291	387
AET	AET5Gv20909200.3	AET-SPO11-1-5D-AL8/78	914	1,7E-119	65,2	13	3830	1184	331
Td	TRIDC5BG061110.4	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	759	1,1E-97	63,4	12	3773	1439	241
Td	TRIDC5AG057080.5	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	757	2,1E-97	62,9	12	3782	1506	218
Tu	TRIUR3_24097-P1	Tu-SPO11-1-5-G1812	418	1E-50	42,7	1	1348	1326	441
Tt	TRITD5Bv1G200390.2	Tt-SPO11-1-5B-Durum	919	3,70E-120	65,5	15	3928	1161	386
Tt	TRITD5Av1G204510.4	Tt-SPO11-1-5A-Durum	914	1,90E-119	65,2	15	4002	1164	387
At	SPO11-2	At-SPO11-2-Columbia	1890	0	100,0	11	2586	1667	383
Ta	TraesCS7D02G296000.2	Ta-SPO11-2-7D-CS	1130	3,5E-150	64,8	11	3076	1307	386
Ta	TraesCS7B02G201200.1	Ta-SPO11-2-7B-CS	1116	3,2E-148	64,5	11	3353	1478	386
Ta	TraesCS7A02G300300.1	Ta-SPO11-2-7A-CS	1114	6,2E-148	66,7	10	3136	1353	290
AET	AET7Gv20751300.26	AET-SPO11-2-7D-AL8/78	1130	4,9E-150	64,8	11	2921	1159	385
Td	TRIDC7AG041910.1	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	1126	2,1E-149	66,7	11	2909	1157	384
Td	TRIDC7BG033100.4	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	1116	5,3E-148	64,5	11	3025	1155	384
Tu	TRIUR3_24097-P1	Tu-SPO11-2-7-G1812	161	1,2E-14	54,9	1	1348	1326	441
Tt	TRITD7Bv1G113540.3	Tt-SPO11-2-7B-Durum	1116	4,90E-148	64,5	11	3031	1161	386
Tt	TRITD7Av1G152830.3	Tt-SPO11-2-7A-Durum	643	1,50E-81	72,5	9	2420	873	290
At	TOP6A	At-Spo11-3-BIN5,RHL2-Columbia	1880	0	100,0	2	1871	1659	427

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS4D02G199200.1.cds1	Ta-SPO11-3-BIN5-4D-CS	1489	0	76,6	2	2112	1776	441
Ta	TraesCS4B02G198400.1.cds1	Ta-SPO11-3-BIN5-4B-CS	1489	0	76,6	2	1924	1595	441
Ta	TraesCS4A02G105600.1.cds1	Ta-SPO11-3-BIN5-4A-CS	1484	0	76,3	2	2204	1764	441
AET	AET0Gv20122400.2	AET-SPO11-3-BIN5-4D-AL8/78	1489	0	76,6	1	1582	1557	441
Td	TRIDC4BG035730.1	Td-SPO11-3-BIN5-4B-ZAVITAN	1489	0	76,6	2	2067	1742	441
Td	TRIDC4AG014350.1	Td-SPO11-3-BIN5-4A-ZAVITAN	1484	0	76,3	1	1348	1326	441
Tu	TRIUR3_24097-P1	Tu-SPO11-3-BIN5-4-G1812	1484	0	76,3	1	1348	1326	441
Tt	TRITD4Bv1G124350.2	Tt-SPO11-3-BIN5-4B-Durum	1489	0	76,6	2	1348	1269	422
Tt	TRITD4Av1G049230.1	Tt-SPO11-3-BIN5-4A-Durum	1484	0	76,3	1	1348	1326	441
At	TOP6B	At-TOP6B-Columbia	3302	0	100,0	19	4931	2390	670
Ta	TraesCS5B02G171400.1	Ta-TOP6B-5B-CS	2128	0	78,0	19	7263	2637	737
Ta	TraesCS5D02G178400.1	Ta-TOP6B-5D-CS	2126	0	78,0	19	7220	2073	690
Ta	TraesCS5A02G173900.1	Ta-TOP6B-5A-CS	2120	0	77,6	19	9436	2581	690
AET	AET5Gv20435400.13	AET-TOP6B-5D-AL8/78	2126	0	78,0	18	6386	1892	615
Td	TRIDC5BG029920.1	Td-TOP6B-5B-ZAVITAN	2122	0	77,8	19	7086	2579	729
Td	TRIDC5AG028510.9	Td-TOP6B-5A-ZAVITAN	2120	0	77,6	18	6749	2350	615
Tu	PAS DE HIT	Tu-TOP6B-5-G1812							
Tt	TRITD5Bv1G107070.1	Tt-TOP6B-5B-Durum	2128	0	78,0	19	6833	2214	737
Tt	TRITD5Av1G127580.9	Tt-TOP6B-5A-Durum	2120	0	77,6	16	5837	1713	570

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

At	SMC3	At-TTN7,SMC3-Columbia	3162	0	100,0	28	8564	4079	1204
Ta	TraesCS1B02G463400.1	Ta-TTN7,SMC3-1B-CS	1197	1,30E-154	57,8	30	12477	4432	1204
Ta	TraesCS1D02G438000.3	Ta-TTN7,SMC3-1D-CS	1193	4,60E-154	57,5	30	12319	4229	1204
Ta	TraesCS1A02G428700.2	Ta-TTN7,SMC3-1A-CS	1189	1,60E-153	57,5	30	11964	4156	1204
AET	AET1Gv21016000.2	AET-TTN7,SMC3 -1D-AL8/78	1193	6,50E-154	57,5	15	23515	2040	679
Tu	TRIUR3_13690-P1	Tu-TTN7,SMC3 -1-G1812	538	3,90E-65	84,6	27	10548	3240	1079
Td	TRIDC1BG072310.9	Td-TTN7,SMC3-1B-ZAVITAN	1197	2,10E-154	57,8	30	12087	4050	1204
Td	TRIDC1AG063000.14	Td-TTN7,SMC3-1A-ZAVITAN	1193	7,40E-154	57,5	28	12464	4240	872
Tt	TRITD1Bv1G223170.14	Tt-TTN7,SMC3-1B-Durum	1197	2,00E-154	57,8	26	10070	3162	1053
Tt	TRITD1Av1G225400.8	Tt-TTN7,SMC3-1A-Durum	1189	2.5E-153	57,5	28	10439	3429	1142

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

**Tableau 44:** Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans la maturation de la recombinaison méiotique sur le blé

Espèce	Cible	Code	Score	E-Value	%ID	Exons	Génomique (pb)	CDS (pb)	Protéine (aa)
At	ATM	At-ATM-Columbia	9750	0	100	77	27719	9734	2598
AET	AET1Gv20795900.27	AET-ATM-1D-AL8/78	723	3,70E-91	70,4	76	27465	9512	1305
Ta	TraesCS1A02G329400.1	Ta-ATATM-1A-CS	723	2,60E-91	70,4	78	28103	9732	3014
Ta	TraesCS1B02G342800.1	Ta-ATATM-1B-CS	723	2,60E-91	70,4	66	24061	8102	2523
Ta	TraesCS1D02G331500.1	Ta-ATATM-1D-CS	723	2,60E-91	70,4	78	27670	9138	3003
Td	TRIDC1AG048910.6	Td-ATM-1A-ZAVITAN	723	4,30E-91	70,4	66	22845	8033	2531
Td	TRIDC1BG055590.5	Td-ATM-1B-ZAVITAN	723	4,30E-91	70,4	34	10385	3985	786
Tt	TRITD1Av1G192760.6	Tt-ATM-1A-Durum	723	4,00E-91	70,4	78	27514	9048	3015
Tt	TRITD1Bv1G183010.3	Tt-ATM-1B-Durum	723	4,00E-91	70,4	66	29563	7572	2523
Tu	TRIUR3_17614-P1	Tu-ATM-1-G1812	612	1,60E-76	44,8	73	32730	9132	3043
At	ATRAD3	At-ATR-Columbia	10562	0	100	16	11357	9206	2702
AET	AET7Gv21309600.5	AET-ATR-7D-AL8/78	1711	0	60,4	11	10574	7695	2371
Ta	TraesCS7A02G543400.2	Ta-ATR-7A-CS	1722	0	60,6	15	11603	8390	2702
Ta	TraesCS7B02G465500.1	Ta-ATR-7B-CS	1709	0	60,1	15	11718	8381	2704
Ta	TraesCS7D02G529300.1	Ta-ATR-7D-CS	1717	0	60,6	15	11806	8261	2702
Td	TRIDC1BG049120.4	Td-ATR-1B-ZAVITAN	609	2,10E-75	65,2	4	3512	2695	464
Td	TRIDC7AG075750.3	Td-ATR-7A-ZAVITAN	1714	0	60,4	16	15903	8033	2626
Td	TRIDC7BG045580.12	Td-ATR-7B-ZAVITAN	543	3,60E-66	64,1	3	3389	3025	295
Tt	TRITD7Av1G274410.2	Tt-ATR-7A-Durum	1722	0	60,6	13	10313	7584	2527
Tt	TRITD7Bv1G227030.1	Tt-ATR-7B-Durum	1709	0	60,1	15	11443	8115	2704
Tu	TRIUR3_17376-P1	Tu-ATR-7-G1812	1719	0	60,6	6	6690	5889	1962
At	BRCA2B	At-BRCA2-Columbia	5827	0	100	20	6360	3929	1155
AET	AET3Gv20214800.39	AET-BRCA2-3D-AL8/78	571	1,20E-68	52,5	19	7062	3538	988

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS3A02G099300.7	Ta-BRCA2-3A-CS	561	1,90E-67	51,5	34	12296	5824	1516
Ta	TraesCS3B02G115500.3	Ta-BRCA2-3B-CS	565	5,40E-68	52	35	12192	5604	1626
Ta	TraesCS3D02G099600.7	Ta-BRCA2-3D-CS	571	8,20E-69	52,5	31	11122	4425	1474
Td	TRIDC3AG011990.29	Td-BRCA2-3A-ZAVITAN	561	3,10E-67	51,5	11	4199	1837	415
Td	TRIDC3BG016060.18	Td-BRCA2-3B-ZAVITAN	565	8,80E-68	52	34	11938	5448	1559
Tt	TRITD3Av1G029880.10	Tt-BRCA2-3A-Durum	561	2,90E-67	51,5	34	11302	4881	1626
Tt	TRITD3Bv1G034480.1	Tt-BRCA2-3B-Durum	565	8,30E-68	52	33	11677	5190	1729
Tu	TRIUR3_17974-P1	Tu-BRCA2-3-G1812	563	2,10E-68	52	32	12863	4374	1457
At	GR1	At-GR1,COM1-Columbia	3020	0	100	2	2384	2199	588
AET	AET3Gv20272100.5	AET-GR1,COM1-3D-AL8/78	207	5,90E-19	85	3	2813	2044	556
Ta	TraesCS3A02G124100.1	Ta-ATGR1,ATCOM1-3A-CS	205	7,80E-19	85	3	2498	1830	609
Ta	TraesCS3B02G143800.1	Ta-ATGR1,ATCOM1-3B-CS	205	7,80E-19	85	2	2930	2339	583
Ta	TraesCS3D02G125600.1	Ta-ATGR1,ATCOM1-3D-CS	207	4,20E-19	85	2	2872	2272	587
Td	TRIDC3AG015450.1	Td-GR1,COM1-3A-ZAVITAN	205	1,30E-18	85	2	2895	2323	664
Td	TRIDC3BG020200.2	Td-GR1,COM1-3B-ZAVITAN	205	1,30E-18	85	2	2603	2018	564
Tt	TRITD3Av1G042990.3	Tt-GR1,COM1-3A-Durum	205	1,20E-18	85	3	2311	1563	520
Tt	TRITD3Bv1G051460.1	Tt-GR1,COM1-3B-Durum	205	1,20E-18	85	2	2323	1770	589
Tu	TRIUR3_33395-P1	Tu-GR1,COM1-3-G1812	205	1,60E-19	85	2	2324	1761	586
At	DMC1	At-DMC1-Columbia	1748	0	100	15	3309	1497	344
AET	AET5Gv20357200.8	AET-DMC1-5D-AL8/78	1456	0	81,4	15	4250	1414	379
Ta	TraesCS5A02G133000.1	Ta-DMC1-5A-CS	1407	0	82,1	14	4118	1638	346
Ta	TraesCS5B02G131900.1	Ta-DMC1-5B-CS	1448	0	80,8	15	4587	1500	344
Ta	TraesCS5D02G141200.1	Ta-DMC1-5D-CS	1456	0	81,4	15	4341	1504	344
Td	TRIDC5AG022500.1	Td-DMC1-5A-ZAVITAN	1446	0	80,8	15	4235	1499	375

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC5BG023380.4	Td-DMC1-5B-ZAVITAN	1460	0	81,7	15	4515	1722	375
Tt	TRITD5Av1G101960.2	Tt-DMC1-5A-Durum	1454	0	81,4	14	3631	1035	344
Tt	TRITD5Bv1G082900.5	Tt-DMC1-5B-Durum	1448	0	80,8	14	4028	1035	344
Tu	TRIUR3_13472-P1	Tu-DMC1-5-G1812	721	9,4E-92	87,3	13	3528	1014	338
At	HTA5	At-G-H2AX-Columbia	342	6,20E-39	100	2	1227	1103	142
AET	AET5Gv20258400.1	AET-G-H2AX-5D-AL8/78	312	2,9E-34	91,2	2	990	1140	154
AET	AET7Gv21225500.2	AET-G-H2AX-7D-AL8/78	301	9,3E-33	88,2	2	903	786	139
Ta	TraesCS5A02G098300.1	Ta-G-H2AX-5A-CS	312	2,1E-34	91,2	2	4814	4640	137
Ta	TraesCS5B02G103600.1	Ta-G-H2AX-5B-CS	312	2,1E-34	91,2	2	831	715	137
Ta	TraesCS5D02G110600.1	Ta-G-H2AX-5D-CS	312	2,1E-34	91,2	2	819	709	137
Ta	TraesCS7A02G501000.1.cds1	Ta-G-H2AX-7A-CS	301	6,50E-33	88,2	1	512	504	167
Ta	TraesCS7B02G408300.1	Ta-G-H2AX-7B-CS	305	1,80E-33	89,7	2	845	706	139
Ta	TraesCS7D02G488500.1	Ta-G-H2AX-7D-CS	301	6,50E-33	88,2	2	829	713	139
Td	TRIDC5AG014580.2	Td-G-H2AX-5A-ZAVITAN	312	3,3E-34	91,2	2	877	767	186
Td	TRIDC5BG017160.2	Td-G-H2AX-5B-ZAVITAN	312	3,3E-34	91,2	2	773	658	169
Td	TRIDC7BG064570.4	Td-G-H2AX-7B-ZAVITAN	305	3,00E-33	89,7	2	558	423	140
Td	TRIDC7AG070160.2	Td-G-H2AX-7A-ZAVITAN	301	1,00E-32	88,2	2	572	456	151
Tt	TRITD5Av1G055110.1	Tt-G-H2AX-5A-Durum	312	3,10E-34	91,2	3	518	363	120
Tt	TRITD7Bv1G211320.2	Tt-G-H2AX-7B-Durum	305	2,80E-33	89,7	2	555	420	139
Tu	TRIUR3_23549-P1	Tu-G-H2AX-5-G1812	312	4,3E-35	91,2	3	815	369	122
Tu	TRIUR3_26855-P1	Tu-G-H2AX-7-G1812	269	3,1E-29	83,3	2	7226	291	96
At	HTA3	At-H2AXB-Columbia	342	5,30E-39	100	2	988	801	142
AET	AET5Gv20258400.1	AET-H2AXB-5D-AL8/78	312	2,6E-34	91,2	2	990	877	214

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

AET	AET7Gv21225500.2	AET-H2AXB-7D-AL8/78	301	8,1E-33	88,2	2	903	786	139
Ta	TraesCS5A02G098300.1	Ta-H2AXB-5A-CS	312	1,8E-34	91,2	2	4814	4640	137
Ta	TraesCS5B02G103600.1	Ta-H2AXB-5B-CS	312	1,8E-34	91,2	2	831	715	137
Ta	TraesCS5D02G110600.1	Ta-H2AXB-5D-CS	312	1,8E-34	91,2	2	819	709	137
Td	TRIDC5AG014580.2	Td-H2AXB-5A-ZAVITAN	312	2,9E-34	91,2	2	877	767	186
Td	TRIDC5BG017160.2	Td-H2AXB-5B-ZAVITAN	312	2,9E-34	91,2	2	773	658	169
Tt	TRITD5Av1G055110.1	Tt-H2AXB-5A-Durum	312	2,70E-34	91,2	3	518	363	120
Tt	TRITD7Bv1G211320.2	Tt-H2AXB-7B-Durum	305	2,40E-33	89,7	2	555	420	139
Tu	TRIUR3_23549-P1	Tu-H2AXB-5-G1812	312	3,8E-35	91,2	3	815	369	122
Tu	TRIUR3_26855-P1	Tu-H2AXB-7-G1812	269	2,8E-29	83,3	2	7226	291	96
At	MRE11	At-MRE11-Columbia	3080	0	100	23	6015	2666	720
AET	AET2Gv21167500.24	AET-MRE11-2D-AL8/78	1871	0	86	18	3859	1580	526
Ta	TraesCS2A02G528700.2	Ta-MRE11-2A-CS	1865	0	86	23	6014	2830	700
Ta	TraesCS2B02G559100.1	Ta-MRE11-2B-CS	1874	0	86,3	21	5200	2456	715
Ta	TraesCS2D02G531600.1	Ta-MRE11-2D-CS	1870	0	86,0	20	5186	2407	691
Td	TRIDC2AG074120.3	Td-MRE11-2A-ZAVITAN	1865	0	86,0	22	5617	2528	527
Td	TRIDC2BG080780.12	Td-MRE11-2B-ZAVITAN	1874	0	86,3	21	4927	2193	715
Tt	TRITD2Av1G280020.4	Tt-MRE11-2A-Durum	1865	0	86	22	5032	2103	700
Tt	TRITD2Bv1G245540.2	Tt-MRE11-2B-Durum	1863	0	86	22	5031	2076	691
Tu	TRIUR3_11119-P1	Tu-MRE11-2-G1812	1204	1,20E-156	69,5	17	4073	1812	604
At	NBS1	At-NBS1-Columbia	1292	8,60E-170	100	14	3309	1928	542
AET	AET1Gv20417500.11	AET-NBS1-1D-AL8/78	317	9,5E-35	34,8	10	3134	1899	459
Ta	TraesCS1A02G162200.2	Ta-NBS1-1A-CS	312	3,3E-34	34,2	13	4341	2331	574

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS1B02G178800.1	Ta-NBS1-1B-CS	315	1,3E-34	34,8	13	4533	2500	574
Ta	TraesCS1D02G159000.1	Ta-NBS1-1D-CS	317	6,7E-35	34,8	13	4409	2378	574
Td	TRIDC1AG024680.8	Td-NBS1-1A-ZAVITAN	312	5,4E-34	34,2	13	3375	1596	531
Td	TRIDC1BG029790.6	Td-NBS1-1B-ZAVITAN	315	2,1E-34	34,8	12	3292	1723	553
Tt	TRITD1Av1G104420.1	Tt-NBS1-1A-Durum	312	5,00E-34	34,2	11	3383	1563	520
Tt	TRITD1Bv1G105100.2	Tt-NBS1-1B-Durum	315	1,90E-34	34,8	12	3229	1662	553
Tu	TRIUR3_25677-P1	Tu-NBS1-1-G1812	307	3,3E-34	33,7	13	3725	1725	574
At	RAD50	At-RAD50-Columbia	3576	0	100	27	8818	4466	1316
AET	AET5Gv20219500.2	AET-RAD50-5D-AL8/78	1891	0	69,4	17	7987	2820	853
Ta	TraesCS5A02G081400.1	Ta-RAD50-5A-CS	1891	0	69,4	27	21671	4629	1316
Ta	TraesCS5B02G085000.2	Ta-RAD50-5B-CS	1893	0	69,4	27	18320	4673	1316
Ta	TraesCS5D02G091200.2	Ta-RAD50-5D-CS	1891	0	69,4	27	19140	4587	1316
Td	TRIDC5AG011970.4	Td-RAD50-5A-ZAVITAN	1891	0	69,4	27	22525	4616	1316
Td	TRIDC5BG013990.1	Td-RAD50-5B-ZAVITAN	1893	0	69,4	26	17932	4489	634
Tt	TRITD5Av1G042900.14	Tt-RAD50-5A-Durum	1891	0	69,4	13	5440	1773	590
Tt	TRITD5Bv1G038320.4	Tt-RAD50-5B-Durum	1893	0	69,4	24	16188	3609	1202
Tu	TRIUR3_18330-P1	Tu-RAD50-5-G1812	1625	0	64,1	26	12259	3846	1282
At	RAD51	At-RAD51-Columbia	1725	0	100	9	2517	1402	342
AET	AET7Gv20941100.3	AET-RAD5-7D-AL8/78	1521	0	86	9	4408	1467	359
Ta	TraesCS7A02G384800.1	Ta-RAD51-7A-CS	1517	0	88,2	9	4330	1552	343
Ta	TraesCS7B02G287700.1	Ta-RAD51-7B-CS	1514	0	87,9	9	4204	1512	343
Ta	TraesCS7D02G381300.1	Ta-RAD51-7D-CS	1521	0	86	9	4557	1499	342
Td	TRIDC7AG053670.2	Td-RAD51-7A-ZAVITAN	1517	0	88,2	9	4192	1032	343

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA MATURATION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC7BG046360.1	Td-RAD51-7B-ZAVITAN	1514	0	87,9	9	4141	1450	369
Tt	TRID7Av1G207460.1	Tt-RAD51-7A-Durum	1517	0	88,2	9	3694	1032	343
Tt	TRID7Bv1G161290.1	Tt-RAD51-7B-Durum	1514	0	87,9	9	3718	1032	343
Tu	TRIUR3_13472-P1	Tu-RAD51-7-G1812	308	1,10E-34	53,8	13	3586	1014	338

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

**Tableau 45:** Résultats des BLASTP des protéines d'At impliquées dans la résolution de la recombinaison meiotique sur le blé

Espèce	Cible	Code	Score	E-Value	%ID	Exons	Genomique (pb)	CDS (pb)	Protéine (aa)
At	EME1A	At-EME1A-Columbia	1637	0	100,0	12,0	3834	1872	549
AET	AET2Gv21133900.9	AET-EME1A-2D-AL8/78	559	2,10E-67	51,5	10,0	7685	2602	345
Ta	TraesCS2A02G514800.1	Ta-EME1A-2A-CS	549	3,40E-66	51,0	11,0	6612	1800	599
Ta	TraesCS2B02G543100.1	Ta-EME1A-2B-CS	556	3,70E-67	51,5	11,0	7203	2109	702
Ta	TraesCS2D02G516300.1	Ta-EME1A-2D-CS	559	1,40E-67	51,5	11,0	7444	1416	471
Td	TRIDC2AG072360.1	Td-EME1A-2A-ZAVITAN	549	5,50E-66	51,0	10,0	6068	2457	335
Td	TRIDC2BG078330.4	Td-EME1A-2B-ZAVITAN	550	4,00E-66	51,5	11,0	6782	2515	702
Tt	TRITD2Av1G276100.3	Tt-EME1A-2A-Durum	479	1,90E-56	44,8	11,0	7340	2107	345
Tt	TRITD2Bv1G240130.2	Tt-EME1A-2B-Durum	556	5,70E-67	51,5	11,0	6790	2020	335
Tu	TRIUR3_08087-P1	Tu-EME1A-2-G1812	339	3,40E-38	57,0	12,0	8001	2109	702
At	EME1B	At-EME1B-Columbia	1552	0	100,0	12,0	4224	2121	551
AET	AET2Gv21133900.12	AET-EME1B-2D-AL8/78	511	7,90E-61	66,9	9,0	7565	2573	375
Ta	TraesCS2A02G514800.1	Ta-EME1B-2A-CS	508	1,40E-60	66,2	11,0	6612	2457	335
Ta	TraesCS2B02G543100.1	Ta-EME1B-2B-CS	504	5,00E-60	66,2	11,0	7203	2515	702
Ta	TraesCS2D02G516300.1	Ta-EME1B-2D-CS	511	5,60E-61	66,9	11,0	7444	2107	345
Td	TRIDC2AG072360.4	Td-EME1B-2A-ZAVITAN	508	2,30E-60	66,2	12,0	6336	2121	706
Td	TRIDC2BG078330.4	Td-EME1B-2B-ZAVITAN	504	8,20E-60	66,2	11,0	6782	2109	702
Tt	TRITD2Av1G276150.1	Tt-EME1B-2A-Durum	461	5,70E-54	67,7	11,0	7527	1275	424
Tt	TRITD2Bv1G240130.2	Tt-EME1B-2B-Durum	504	7,70E-60	66,2	11,0	6790	2109	702
Tu	TRIUR3_08087-P1	Tu-EME1B-2-G1812	461	7,60E-55	67,7	12,0	8001	1416	471
At	FAN1	At-FAN1-Columbia	4088	0	100,0	15,0	4818	3130	891

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

AET	AET7Gv20334700.1	AET-FAN1-7D-AL8/78	1137	9,90E-149	60,5	7,0	2818	1773	495
Ta	TraesCS7A02G132600.2	Ta-FAN1-7A-CS	1139	3,70E-149	60,2	15,0	8057	3055	970
Ta	TraesCS7B02G033200.2	Ta-FAN1-7B-CS	1146	3,90E-150	61,1	15,0	7871	3159	965
Ta	TraesCS7D02G132100.2	Ta-FAN1-7D-CS	1138	5,00E-149	60,5	15,0	7892	3194	977
Td	TRIDC7AG015620.2	Td-FAN1-7A-ZAVITAN	1146	6,40E-150	60,8	14,0	7465	2817	483
Td	TRIDC7BG005010.11	Td-FAN1-7B-ZAVITAN	1153	6,80E-151	61,4	13,0	7525	2833	527

Tt	TRITD7Av1G039400.1	Tt-FAN1-7A-Durum	1143	1,60E-149	60,5	13,0	6640	2460	819
Tt	TRITD7Bv1G012800.2	Tt-FAN1-7B-Durum	1152	8,80E-151	61,4	13,0	6735	2460	819
Tu	TRIUR3_07851-P1	Tu-FAN1-7-G1812	1146	7,90E-151	60,8	14,0	7328	2685	895
At		At-FANCD2-Columbia	3320	0	100,0	30,0	8155	4666	1484
AET	AET2Gv20564400.3	AET-FANCD2-2D-AL8/78	1026	1,80E-132	52,0	29,0	10812	5393	972
Ta	TraesCS2A02G250200.2	Ta-FANCD2-2A-CS	1015	4,20E-131	51,5	25,0	8342	5259	1492
Ta	TraesCS2B02G266400.1	Ta-FANCD2-2B-CS	26	1,30E-132	52,0	30,0	15357	5274	1479
Ta	TraesCS2D02G251400.1	Ta-FANCD2-2D-CS	1026	1,30E-132	52,0	22,0	8546	4068	1355
Td	TRIDC2AG033360.2	Td-FANCD2-2A-ZAVITAN	1021	1,00E-131	51,8	29,0	9422	4330	1231
Td	TRIDC2BG038410.14	Td-FANCD2-2B-ZAVITAN	1026	2,00E-132	52,0	29,0	14516	4325	1232
Tt	TRITD2Av1G135760.2	Tt-FANCD2-2A-Durum	1015	6,40E-131	51,5	16,0	6202	2886	961
Tt	TRITD2Bv1G120300.3	Tt-FANCD2-2B-Durum	1026	1,90E-132	52,0	25,0	13355	3939	1312
Tu	PAS DE HIT	Tu-FANCD2-2-G1812							
At		At-FANCM-Columbia	6914	0	100,0	23,0	7330	4298	1390
AET	AET4Gv20198000.3	AET-FANCM-4D-AL8/78	1169	8,10E-151	57,5	21,0	10513	4797	1483
Ta	TraesCS4A02G217700.1	Ta-FANCM-4A-CS	1175	8,60E-152	57,8	21,0	11384	5467	1533
Ta	TraesCS4B02G096400.1	Ta-FANCM-4B-CS	1163	3,80E-150	57,3	22,0	12885	5149	1458

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Ta	TraesCS4D02G092800.1	Ta-FANCM-4D-CS	1169	5,70E-151	57,5	21,0	10968	5245	1454
Td	TRIDC4AG035040.3	Td-FANCM-4A-ZAVITAN	422	2,20E-48	45,2	14,0	6353	3234	1034
Td	TRIDC4BG014960.1	Td-FANCM-4B-ZAVITAN	695	8,50E-86	70,8	6,0	3227	639	200
Tt	TRITD4Av1G171480.1	Tt-FANCM-4A-Durum	1175	1,30E-151	57,8	21,0	10486	4584	1527
Tt	TRITD4Bv1G035000.1	Tt-FANCM-4B-Durum	1163	5,80E-150	57,3	20,0	10517	4248	1415
Tu	TRIUR3_19527-P1	Tu-FANCM-4-G1812	314	1,70E-34	81,1	18,0	8413	3261	1086
At	HEI10	At-HEI10-Columbia	1607	0	100,0	10,0	3686	2252	304
AET	AET6Gv20505600.18	AET-HEI10-6D-AL8/78	902	2,20E-115	79,9	7,0	1986	909	302
Ta	TraesCS6B02G220900.2	Ta-HEI10-6B-CS	887	1,80E-113	82,0	9,0	3179	1419	303
Ta	TraesCS6D02G182400.2	Ta-HEI10-6D-CS	902	1,60E-115	79,9	9,0	5008	1802	303
Ta	TraesCSU02G080300.1	Ta-HEI10-U0-CS	900	3,00E-115	79,9	8,0	4345	1301	302
Td	TRIDC6AG029580.5	Td-HEI10-6A-ZAVITAN	900	4,80E-115	79,9	8,0	4580	1578	293
Td	TRIDC6BG034410.9	Td-HEI10-6B-ZAVITAN	892	6,00E-114	82,5	7,0	1981	909	302
Tt	TRITD6Av1G106930.2	Tt-HEI10-6A-Durum	900	4,50E-115	79,9	7,0	1975	909	302
Tt	TRITD6Bv1G090660.4	Tt-HEI10-6B-Durum	887	2,70E-113	82,0	7,0	1981	882	293
Tu	TRIUR3_31042-P1	Tu-HEI10-6-G1812	95	3,10E-05	45,9	13,0	6852	3627	1208
At	RCK	At-MER3-Columbia	5710	0	100,0	27,0	6671	3702	1133
AET	AET4Gv20449100.4	AET-MER3-4D-AL8/78	2909	0	71,5	26,0	10472	3492	1164
Ta	TraesCS4A02G136200.1	Ta-MER3-4A-CS	2928	0	71,9	27,0	9444	4233	1281
Ta	TraesCS4B02G168700.1	Ta-MER3-4B-CS	2911	0	71,3	27,0	8862	4129	1281
Ta	TraesCS4D02G171000.1	Ta-MER3-4D-CS	2910	0	71,5	26,0	10648	3690	1229
Td	TRIDC4AG018550.3	Td-MER3-4A-ZAVITAN	1984	0	72,0	25,0	8447	3362	865

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC4BG030700.2	Td-MER3-4B-ZAVITAN	2910	0	71,5	26,0	8773	3501	1167
Tt	TRITD4Av1G072030.2	Tt-MER3-4A-Durum	2928	0	71,9	26,0	8868	3846	1281
Tt	TRITD4Bv1G105210.1	Tt-MER3-4B-Durum	2875	0	70,8	26,0	8423	3846	1281
Tu	TRIUR3_04003-P1	Tu-MER3-4-G1812	342	1,20E-38	40,4	6,0	9299	6093	2030
At	MHF1	At-MHF1-Columbia	1239	7,70E-165	100,0	6,0	2453	893	242
AET	AET2Gv20652700.3	AET-MHF1-2D-AL8/78	335	3,70E-38	58,9	4,0	2777	973	152
AET	AET2Gv20766000.11	AET-MHF2-2D-AL8/78	167	2,70E-15	76,7	3,0	923	393	66
Ta	TraesCS2A02G287800.2	Ta-MHF1-2A-CS	336	1,90E-38	61,5	4,0	1992	648	141
Ta	TraesCS2B02G304500.1	Ta-MHF1-2B-CS	336	1,90E-38	59,8	4,0	2618	800	143
Ta	TraesCS2D02G286100.1	Ta-MHF1-2D-CS	335	2,60E-38	58,9	4,0	2599	798	141
Td	TRIDC2AG041690.3	Td-MHF1-2A-ZAVITAN	336	3,10E-38	61,5	4,0	2179	833	144
Td	TRIDC2BG044620.2	Td-MHF1-2B-ZAVITAN	336	3,10E-38	59,8	4,0	2616	798	111
Tt	TRITD2Av1G174470.1	Tt-MHF1-2A-Durum	336	2,90E-38	61,5	4,0	1766	426	141
Tt	TRITD2Bv1G143800.2	Tt-MHF1-2B-Durum	338	1,50E-38	52,4	4,0	2256	444	147
Tu	TRIUR3_35088-P1	Tu-MHF1-2-G1812	338	2,00E-39	59,8	4,0	1766	426	141
At	MHF2	At-MHF2-Columbia	232	5,70E-25	100,0	8,0	1905	1020	104
AET	AET3Gv21166700.7	AET-MLH1-3D-AL8/78	1351	3,20E-176	72,5	16,0	6462	2690	712
Ta	TraesCS2A02G324100.1	Ta-MHF2-2A-CS	167	1,90E-15	76,7	5,0	1185	410	111
Ta	TraesCS2B02G358000.1	Ta-MHF2-2B-CS	167	1,90E-15	76,7	5,0	1244	491	111
Ta	TraesCS2D02G338800.1	Ta-MHF2-2D-CS	167	1,90E-15	76,7	5,0	2119	318	105
Td	TRIDC2AG049390.4	Td-MHF2-2A-ZAVITAN	167	3,10E-15	76,7	3,0	411	180	59
Td	TRIDC2BG052120.1	Td-MHF2-2B-ZAVITAN	167	3,10E-15	76,7	5,0	1338	552	124

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Tt	TRITD2Av1G206230.1	Tt-MHF2-2A-Durum	167	2,90E-15	76,7	5,0	1110	336	111
Tt	pas de copie B annoté	Tt-MHF2-de-Durum							
Tu	TRIUR3_23024-P1	Tu-MHF2-2-G1812	167	4,10E-16	76,7	5,0	1109	354	117
At	MLH1	At-MLH1-Columbia	3600	0	100,0	16,0	4193	2410	737
Ta	TraesCS3A02G500600.1	Ta-MLH1-3A-CS	1353	1,20E-176	72,5	16,0	6240	2266	724
Ta	TraesCS3D02G507500.2	Ta-MLH1-3D-CS	1351	2,20E-176	72,5	12,0	4326	2746	724
Ta	TraesCS3D02G507500.1	Ta-MLH1-3D-CS	1351	2,20E-176	72,5	17,0	6529	2746	724
Ta	TraesCS7A02G140800.2	Ta-MLH1-7A-CS	1347	7,90E-176	72,2	16,0	6208	2476	724
Td	TRIDC3AG071290.1	Td-MLH1-3A-ZAVITAN	1258	2,10E-163	71,7	14,0	6300	2848	350
Td	TRIDC3BG081500.3	Td-MLH1-3B-ZAVITAN	1351	3,60E-176	72,5	16,0	6626	2581	726
Td	TRIDC7AG016950.1	Td-MLH1-7A-ZAVITAN	1347	1,30E-175	72,2	16,0	5718	2178	725
Tt	TRITD3Av1G274180.1	Tt-MLH1-3A-Durum	1353	1,80E-176	72,5	16,0	6147	2175	724
Tt	TRITD3Bv1G269490.1	Tt-MLH1-3B-Durum	1348	8,80E-176	72,2	11,0	4245	1497	498
Tt	TRITD7Av1G041890.6	Tt-MLH1-7A-Durum	1347	1,20E-175	72,2	14,0	5905	1968	655
AET	AET3Gv21166700.18	AET-MLH1-3D-AL8/78	1351	3,20E-176	72,5	16,0	5870	2161	720
Tu	TRIUR3_24234-P1	Tu-MLH1-3-G1812	968	1,60E-124	69,0	14,0	5059	1830	609
At	MLH3	At-MLH3-Columbia	5648	0	100,0	23,0	6140	3468	1155
AET	AET5Gv20819000.7	AET-MLH3-5D-AL8/78	733	1,00E-91	61,2	23,0	9080	4084	785
Ta	TraesCS5A02G352800.1	Ta-MLH3-5A-CS	726	6,60E-91	60,3	24,0	9008	3639	1212
Ta	TraesCS5B02G355000.1	Ta-MLH3-5B-CS	724	1,20E-90	61,1	25,0	9901	4103	1209
Ta	TraesCS5D02G359800.1	Ta-MLH3-5D-CS	733	7,10E-92	61,2	22,0	7323	4040	1212
Td	TRIDC3BG077580.10	Td-MLH3-3B-ZAVITAN	469	2,90E-55	61,7	15,0	6304	1722	574
Td	TRIDC5AG051560.20	Td-MLH3-5A-ZAVITAN	739	1,70E-92	55,6	15,0	6127	2840	894

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDCSBG055760.5	Td-MLH3-5B-ZAVITAN	729	4,10E-91	61,5	24,0	9722	3980	1021
Tt	TRITD5Av1G192190.2	Tt-MLH3-5A-Durum	728	5,40E-91	60,7	21,0	9903	3384	1127
Tt	TRITD5Bv1G184240.2	Tt-MLH3-5B-Durum	729	3,90E-91	61,5	21,0	6927	3246	1081

Tu	TRIUR3_24575-P1	Tu-MLH3-5-G1812	106	3,80E-06	52,4	3,0	14345	381	126
At	MSH4	At-MSH4-Columbia	3877	0	100,0	24,0	5542	2504	792
AET	AET2Gv20357400.8	AET-MSH4-2D-AL8/78	2991	0	75,0	24,0	12634	2792	848
Ta	TraesCS2A02G171900.1	Ta-MSH4-2A-CS	2986	0	74,6	24,0	11235	2792	810
Ta	TraesCS2B02G198300.1	Ta-MSH4-2B-CS	2996	0	75,0	24,0	11283	2424	807
Ta	TraesCS2D02G352400.1	Ta-MSH4-2D-CS	303	2,30E-33	51,4	12,0	6443	3156	974
Td	TRIDC2AG033360.2	Td-MSH4-2A-ZAVITAN	1021	1,00E-131	51,8	29,0	9579	4330	1231
Td	TRIDC2BG038410.14	Td-MSH4-2B-ZAVITAN	1026	2,00E-132	52,0	29,0	14516	4325	1232
Tt	TRITD2Av1G056320.2	Tt-MSH4-2A-Durum	2986	0	74,6	24,0	10604	2433	810
Tt	TRITD2Bv1G067270.2	Tt-MSH4-2B-Durum	3001	0	75,5	24,0	11617	2424	807
Tu	TRIUR3_16937-P1	Tu-MSH4-2-G1812	296	4,40E-33	52,3	12,0	5416	1881	626
At	MSH5	At-MSH5-Columbia	4129	0	100,0	34,0	7732	2764	807
AET	AET1Gv20755500.6	AET-MSH5-1D-AL8/78	1069	2,90E-140	76,8	32,0	17493	2636	597
Ta	TraesCS1A02G315900.1	Ta-MSH5-1A-CS	1059	5,10E-139	76,0	34,0	20144	2457	818
Ta	TraesCS1B02G328200.1	Ta-MSH5-1B-CS	1059	5,10E-139	76,0	34,0	9575	1759	530
Ta	TraesCS1D02G316200.1	Ta-MSH5-1D-CS	1069	2,10E-140	76,8	34,0	19666	2454	817
Td	TRIDC1AG047190.8	Td-MSH5-1A-ZAVITAN	1059	8,30E-139	76,0	32,0	18380	2426	624
Td	TRIDC1BG053410.1	Td-MSH5-1B-ZAVITAN	1042	2,00E-136	75,3	22,0	9750	1910	523
Tt	TRITD1Av1G188720.1	Tt-MSH5-1A-Durum	1059	7,80E-139	76,0	32,0	19822	2274	757

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Tt	TRITD1Bv1G177460.1	Tt-MSH5-1B-Durum	1059	7,80E-139	76,0	22,0	9408	1593	530
Tu	TRIUR3_00283-P1	Tu-MSH5-1-G1812	705	3,10E-90	76,1	33,0	20104	3423	1140
At	MUS81	At-MUS81-Columbia	3434	0	100,0	15,0	4337	2370	659
AET	AET1Gv20251000.2	AET-MUS81-1D-AL8/78	469	2,50E-55	63,6	15,0	28617	1714	193
AET	AET1Gv20199400.35	AET-MUS81-1D-AL8/78	467	4,70E-55	64,4	11,0	3604	1006	301
AET	AET3Gv21109600.18	AET-MUS81-3D-AL8/78	473	7,10E-56	62,4	10,0	3695	1032	343
AET	AET3Gv20427000.6	AET-MUS81-3D-AL8/78	462	2,30E-54	64,7	10,0	8151	2161	418
AET	AET7Gv21232700.10	AET-MUS81-7D-AL8/78	470	1,80E-55	64,4	10,0	3529	1011	287
Ta	TraesCS3A02G487200.3	Ta-MUS81-3A-CS	481	4,00E-57	63,2	14,0	7039	2294	575
Ta	TraesCS3B02G535000.2	Ta-MUS81-3B-CS	469	1,80E-55	61,7	15,0	6720	2054	546

Ta	TraesCS3D02G482500.3	Ta-MUS81-3D-CS	473	5,00E-56	62,4	15,0	7347	2279	576
Ta	TraesCS7D02G490700.1	Ta-MUS81-7D-CS	470	1,30E-55	64,4	14,0	6380	1608	535
Td	TRIDC1BG017830.1	Td-MUS81-1B-ZAVITAN	473	8,10E-56	65,2	16,0	13110	1705	193
Td	TRIDC3AG068580.3	Td-MUS81-3A-ZAVITAN	481	6,50E-57	63,2	15,0	6462	1728	575
Td	TRIDC3AG026250.11	Td-MUS81-3A-ZAVITAN	463	1,90E-54	64,7	10,0	6836	1702	297
Td	TRIDC3BG030000.2	Td-MUS81-3B-ZAVITAN	461	3,60E-54	64,0	10,0	7362	1953	477
Tt	TRITD3Av1G266320.5	Tt-MUS81-3A-Durum	482	4,40E-57	59,0	16,0	6373	1296	431
Tt	TRITD3Av1G248110.2	Tt-MUS81-3A-Durum	468	3,70E-55	63,6	13,0	4708	1332	443
Tt	TRITD3Av1G094460.1	Tt-MUS81-3A-Durum	463	1,80E-54	64,7	10,0	6836	1572	523
Tt	TRITD3Bv1G094600.4	Tt-MUS81-3B-Durum	461	3,40E-54	64,0	10,0	6743	1224	407
Tt	TRITD3Bv1G260800.3	Tt-MUS81-3B-Durum	468	3,70E-55	61,7	15,0	6306	1617	538
Tu	TRIUR3_18043-P1	Tu-MUS81-1-G1812	475	5,40E-57	65,9	14,0	8864	1830	609
Tu	TRIUR3_28752-P1	Tu-MUS81-1-G1812	351	5,60E-40	65,6	8,0	5149	1137	378
Tu	TRIUR3_27577-P1	Tu-MUS81-3-G1812	482	5,90E-58	59,0	16,0	6372	1572	523

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Tu	TRIUR3_27577-P1	Tu-MUS81-3-G1812	258	3,30E-27	57,3	16,0	6372	1572	523
Tu	TRIUR3_30004-P1	Tu-MUS81-7-G1812	477	2,90E-57	64,4	10,0	4338	1197	399
At	RECQL4A	At-SGS1,RECQ4A-Columbia	5955	0	100,0	26,0	7940	4029	1188
AET	AET2Gv20689900.14	AET-SGS1,RECQ4A-2D-AL8/78	1076	4,60E-138	82,9	24,0	8286	3622	1013
Ta	TraesCS2A02G304900.2	Ta-SGS1,RECQ4A-2A-CS	1079	1,30E-138	83,7	25,0	9498	4377	1058
Ta	TraesCS2B02G321700.1	Ta-SGS1,RECQ4A-2B-CS	1076	3,20E-138	82,9	25,0	9401	4259	1201
Ta	TraesCS2D02G303500.1	Ta-SGS1,RECQ4A-2D-CS	1076	3,20E-138	82,9	25,0	9482	4102	1201
Td	TRIDC2AG044270.3	Td-SGS1,RECQ4A-2A-ZAVITAN	1079	2,00E-138	83,7	25,0	9178	4062	915
Td	TRIDC2BG046980.12	Td-SGS1,RECQ4A-2B-ZAVITAN	1073	1,40E-137	82,5	25,0	7980	3629	1129
Tt	TRITD2Av1G186310.4	Tt-SGS1,RECQ4A-2A-Durum	1079	1,90E-138	83,7	25,0	7569	3075	1024
Tt	TRITD2Bv1G152080.7	Tt-SGS1,RECQ4A-2B-Durum	1076	4,90E-138	82,9	17,0	5391	2355	784
Tu	TRIUR3_34744-P1	Tu-SGS1,RECQ4A-2-G1812	427	5,10E-50	60,7	24,0	9824	3294	1097
At	PAS DE HIT	At-RECQL4B-Columbia				26,0	8266	3876	Nontranslating CDS
AET	AET2Gv20689900.14	AET-RECQL4B-2D-AL8/78	1087	4,60E-140	82,4	24,0	8286	3622	1013
Ta	TraesCS2A02G304900.1	Ta-RECQL4B-2A-CS	1090	1,30E-140	83,3	25,0	9343	4381	1201
Ta	TraesCS2B02G321700.2	Ta-RECQL4B-2B-CS	1087	3,30E-140	82,4	25,0	9401	4255	1058
Ta	TraesCS2D02G303500.2	Ta-RECQL4B-2D-CS	1087	3,30E-140	82,4	25,0	9482	4098	1058
Td	TRIDC2BG046980.12	Td-RECQL-2B-ZAVITAN	1084	1,40E-139	82,0	25,0	7980	3629	1129
Td	TRIDC2AG044270.14	Td-RECQL4B-2A-ZAVITAN	1090	2,10E-140	83,3	25,0	8000	3629	1129
Tt	TRITD2Bv1G152080.7	Tt-RECQL-2B-Durum	1087	5,00E-140	82,4	17,0	5391	2355	784
Tt	TRITD2Av1G186310.6	Tt-RECQL4B-2A-Durum	1090	1,90E-140	83,3	18,0	5778	2679	892
Tu	TRIUR3_34744-P1	Tu-RECQL4B-2-G1812	449	3,10E-53	83,5	24,0	9824	3294	1097
At	SHOC1	At-SHOC1-Columbia	4582	0	100,0	8,0	6436	4914	1594

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

AET	AET6Gv20620800.10	AET-SHOC1-6D-AL8/78	402	1,40E-45	54,7	9,0	7444	5034	1677
Ta	TraesCS4A02G205900.1	Ta-SHOC1-4A-CS	397	4,90E-45	53,7	10,0	8990	5504	1770
Ta	TraesCS4B02G109500.1	Ta-SHOC1-4B-CS	401	1,40E-45	54,4	10,0	8595	5538	1740
Ta	TraesCS4D02G106800.1	Ta-SHOC1-4D-CS	391	3,20E-44	53,1	10,0	9129	5647	1764
Ta	TraesCS6A02G237400.1	Ta-SHOC1-6A-CS	390	4,40E-44	54,7	10,0	8106	5474	1702
Ta	TraesCS6B02G265900.1	Ta-SHOC1-6B-CS	399	2,60E-45	54,1	10,0	7885	5505	1704
Ta	TraesCS6D02G220100.1	Ta-SHOC1-6D-CS	411	5,90E-47	56,1	10,0	7863	5538	1707
Td	TRIDC4AG032750.1	Td-SHOC1-4A-ZAVITAN	397	7,90E-45	53,7	10,0	8796	5049	1682
Td	TRIDC4BG017080.5	Td-SHOC1-4B-ZAVITAN	401	2,20E-45	54,4	9,0	8704	5588	1528
Td	TRIDC6AG036550.2	Td-SHOC1-6A-ZAVITAN	390	7,20E-44	54,7	9,0	8073	5442	1737
Td	TRIDC6BG043390.2	Td-SHOC1-6B-ZAVITAN	399	4,20E-45	54,1	5,0	3358	2568	798
Tt	TRITD4Av1G159460.2	Tt-SHOC1-4A-Durum	397	7,50E-45	53,7	11,0	8796	5124	1707
Tt	TRITD4Bv1G042700.2	Tt-SHOC1-4B-Durum	401	2,10E-45	54,4	11,0	8417	5124	1707
Tt	TRITD6Av1G152710.3	Tt-SHOC1-6A-Durum	390	6,80E-44	54,7	7,0	6962	4584	1527
Tt	TRITD6Bv1G138890.1	Tt-SHOC1-6B-Durum	399	4,00E-45	54,1	10,0	7488	5115	1704
Tu	TRIUR3_02970-P1	Tu-SHOC1-4-G1812	400	3,80E-46	55,4	10,0	7905	5091	1697
Tu	TRIUR3_22285-P1	Tu-SHOC1-6-G1812	397	9,80E-46	53,7	12,0	8921	5127	1709
At	ZYP1A	At-ZYP1a-Columbia	2034	0	100,0	19,0	5713	2953	871
AET	AET2Gv20724800.28	AET-ZYP1a-2D-AL8/78	553	7,00E-65	51,3	17,0	6209	2432	790
Ta	TraesCS2A02G340400.1	Ta-ZYP1a-2A-CS	545	5,90E-64	52,1	19,0	9350	3383	848
Ta	TraesCS2B02G338300.3	Ta-ZYP1a-2B-CS	540	2,70E-63	51,6	20,0	9593	3384	863
Ta	TraesCS2D02G318100.4	Ta-ZYP1a-2D-CS	540	2,70E-63	51,6	20,0	8994	3198	863
Td	TRIDC2AG046770.4	Td-ZYP1a-2A-ZAVITAN	555	4,40E-65	51,5	14,0	5913	2521	763

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Td	TRIDC2BG049450.4	Td-ZYP1a-2B-ZAVITAN	553	8,10E-65	50,3	15,0	5913	2521	763
Tt	TRITD2Av1G195990.4	Tt-ZYP1a-2A-Durum	545	9,00E-64	52,1	16,0	6398	2547	848
Tt	TRITD2Bv1G160450.8	Tt-ZYP1a-2B-Durum	540	4,20E-63	51,6	15,0	5994	2184	727
Tu	TRIUR3_29217-P1	Tu-ZYP1a-2-G1812	450	6,20E-52	48,8	20,0	9203	2679	892
At	ZYP1B	At-ZYP1b-Columbia	1978	0	100,0	19,0	5743	3037	856
AET	AET2Gv20724800.28	AET-ZYP1b-2D-AL8/78	553	7,00E-65	51,3	17,0	6209	2432	790
Ta	TraesCS2A02G340400.2	Ta-ZYP1b-2A-CS	540	1,30E-63	53,2	20,0	9350	3304	863
Ta	TraesCS2B02G338300.2	Ta-ZYP1b-2B-CS	535	5,90E-63	52,7	17,0	6907	3384	863
Ta	TraesCS2D02G318100.3	Ta-ZYP1b-2D-CS	535	5,90E-63	52,7	17,0	6734	3198	863
Td	TRIDC2AG046770.9	Td-ZYP1b-2A-ZAVITAN	558	7,80E-66	46,5	17,0	6552	2433	790
Td	TRIDC2BG049450.4	Td-ZYP1b-2B-ZAVITAN	543	8,10E-64	52,6	18,0	6542	2475	824
Tt	TRITD2Av1G195990.4	Tt-ZYP1b-2A-Durum	540	1,90E-63	53,2	16,0	6398	2547	848
Tt	TRITD2Bv1G160450.3	Tt-ZYP1b-2B-Durum	535	9,10E-63	52,7	16,0	6427	2547	848
Tu	TRIUR3_29217-P1	Tu-ZYP1b-2-G1812	445	1,50E-51	50,0	20,0	9203	2679	892
At	ZIP4	At-ZYP4-Columbia	4770	0	100,0	5,0	3420	2889	936
AET	AET3Gv20896100.1	AET-ZIP4-3D-AL8/78	816	6,30E-104	47,8	6,0	4309	2990	693
Ta	TraesCS3A02G401700.2	Ta-ZIP4-3A-CS	804	2,10E-102	46,5	6,0	3743	3212	957
Ta	TraesCS3B02G434600.2	Ta-ZIP4-3B-CS	814	8,40E-104	48,0	5,0	3556	3144	957
Ta	TraesCS3D02G396500.2	Ta-ZIP4-3D-CS	816	4,50E-104	47,8	5,0	4034	3614	957
Ta	TraesCS5B02G255100.1	Ta-ZIP4-5B-CS	799	1,00E-101	47,7	5,0	3666	3252	938
Td	TRIDC3AG057210.8	Td-ZIP4-3A-ZAVITAN	811	3,60E-103	46,3	6,0	2858	2117	464
Td	TRIDC3BG064160.1	Td-ZIP4-3B-ZAVITAN	814	1,40E-103	48,0	5,0	3272	2865	742
Td	TRIDC5BG042320.3	Td-ZIP4-5B-ZAVITAN	798	2,30E-101	47,7	5,0	2936	2533	758

BLAST DES GENES IMPLIQUES DANS LA RESOLUTION DE LA RECOMBINAISON POUR LES TRITICEAES

Tt	TRITD3Av1G233600.4	Tt-ZIP4-3A-Durum	804	3,10E-102	46,5	5,0	3280	2874	957
Tt	TRITD3Bv1G222230.1	Tt-ZIP4-3B-Durum	814	1,30E-103	48,0	6,0	2513	1953	650
Tt	TRITD5Bv1G144960.1	Tt-ZIP4-5B-Durum	798	2,10E-101	47,7	5,0	3223	2817	938
Tu	TRIUR3_25865-P1	Tu-ZIP4-3-G1812	481	2,50E-58	43,7	5,0	5177	2592	863

## 8.1.2 Comparaisons des séquences du complexe SPO11 chez les poacées

Tableau 46: Comparaison 2 à 2 des séquences spo11-1 entre les 13 espèces de poacées

QUERY ID	TARGET ID	% IDENTITY	SIZE COVER	E VALUE	SCORE	% SIMILARITY
Ta-SPO11-1-5A-CS	Tt-SPO11-1-5A-Durum	100	387	0	796	100
Ta-SPO11-1-5A-CS	Ta-SPO11-1-5A-CS	100	387	0	796	100
Ta-SPO11-1-5A-CS	Ta-SPO11-1-5D-CS	98.966	387	0	788	99.22
Ta-SPO11-1-5A-CS	Tt-SPO11-1-5B-Durum	98.708	386	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5A-CS	Ta-SPO11-1-5B-CS	98.708	386	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5A-CS	Tu-SPO11-1-5A-G1812	98.205	390	0	781	98.21
Ta-SPO11-1-5A-CS	Bd-SPO11-1-Bd21	83.505	364	0	651	88.4
Ta-SPO11-1-5A-CS	Hv-SPO11-1-	94.315	384	0	650	96.9
Ta-SPO11-1-5A-CS	AET-SPO11-1-7D-AL8/78	97.5	331	0	642	97.81
Ta-SPO11-1-5A-CS	Sb-SPO11-1-Bicolor	82.429	383	0	625	89.66
Ta-SPO11-1-5A-CS	Os-SPO11-1-93-11	81.912	381	0	580	90.44
Ta-SPO11-1-5A-CS	Os-SPO11-1-Nipponbare	81.912	381	0	580	90.44
Ta-SPO11-1-5A-CS	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	98.643	241	2.22E-166	456	99.1
Ta-SPO11-1-5A-CS	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	99.541	218	4.35E-165	452	99.54
Ta-SPO11-1-5A-CS	At-SPO11-1-	58.127	356	3.27E-163	453	75.76
Ta-SPO11-1-5A-CS	Zm-SPO11-1-Japonica	81.855	244	1.93E-145	407	89.52

Ta-SPO11-1-5A-CS	Os-SPO11-1-Spontanea	36.332	792	4.73E-63	206	59.52
Ta-SPO11-1-5B-CS	Tt-SPO11-1-5A-Durum	98.708	387	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5B-CS	Ta-SPO11-1-5A-CS	98.708	387	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5B-CS	Ta-SPO11-1-5D-CS	98.708	387	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5B-CS	Tt-SPO11-1-5B-Durum	100	386	0	796	100
Ta-SPO11-1-5B-CS	Ta-SPO11-1-5B-CS	100	386	0	796	100

Ta-SPO11-1-5B-CS	Tu-SPO11-1-5A-G1812	97.692	390	0	776	97.95
Ta-SPO11-1-5B-CS	Bd-SPO11-1-Bd21	83.463	364	0	653	88.63
Ta-SPO11-1-5B-CS	Hv-SPO11-1-	95.596	384	0	654	97.93
Ta-SPO11-1-5B-CS	AET-SPO11-1-7D-AL8/78	96.308	331	0	640	96.62
Ta-SPO11-1-5B-CS	Sb-SPO11-1-Bicolor	82.642	383	0	628	89.9
Ta-SPO11-1-5B-CS	Os-SPO11-1-93-11	81.865	381	0	578	90.67
Ta-SPO11-1-5B-CS	Os-SPO11-1-Nipponbare	81.865	381	0	578	90.67
Ta-SPO11-1-5B-CS	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	99.548	241	3.75E-167	458	99.55
Ta-SPO11-1-5B-CS	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	98.624	218	4.41E-164	449	99.08
Ta-SPO11-1-5B-CS	At-SPO11-1-	58.564	356	5.36E-164	455	76.24
Ta-SPO11-1-5B-CS	Zm-SPO11-1-Japonica	81.781	244	1.74E-144	405	89.88
Ta-SPO11-1-5B-CS	Os-SPO11-1-Spontanea	36.332	792	8.10E-63	206	59.52

Ta-SPO11-1-5D-CS	Tt-SPO11-1-5A-Durum	98.966	387	0	788	99.22
Ta-SPO11-1-5D-CS	Ta-SPO11-1-5A-CS	98.966	387	0	788	99.22
Ta-SPO11-1-5D-CS	Ta-SPO11-1-5D-CS	100	387	0	797	100
Ta-SPO11-1-5D-CS	Tt-SPO11-1-5B-Durum	98.708	386	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5D-CS	Ta-SPO11-1-5B-CS	98.708	386	0	785	99.22
Ta-SPO11-1-5D-CS	Tu-SPO11-1-5A-G1812	97.949	390	0	779	97.95
Ta-SPO11-1-5D-CS	Bd-SPO11-1-Bd21	83.763	364	0	655	88.66
Ta-SPO11-1-5D-CS	Hv-SPO11-1-	95.09	384	0	653	97.42
Ta-SPO11-1-5D-CS	AET-SPO11-1-7D-AL8/78	97.5	331	0	642	97.81
Ta-SPO11-1-5D-CS	Sb-SPO11-1-Bicolor	82.429	383	0	630	90.18
Ta-SPO11-1-5D-CS	Os-SPO11-1-93-11	81.654	381	0	579	90.44
Ta-SPO11-1-5D-CS	Os-SPO11-1-Nipponbare	81.654	381	0	579	90.44
Ta-SPO11-1-5D-CS	Td-SPO11-1-5B-ZAVITAN	98.643	241	1.84E-166	456	99.1
Ta-SPO11-1-5D-CS	Td-SPO11-1-5A-ZAVITAN	99.541	218	5.97E-165	452	99.54
Ta-SPO11-1-5D-CS	At-SPO11-1-	58.127	356	4.14E-164	455	76.31
Ta-SPO11-1-5D-CS	Zm-SPO11-1-Japonica	81.452	244	2.73E-145	407	89.92
Ta-SPO11-1-5D-CS	Os-SPO11-1-Spontanea	36.332	792	5.45E-63	206	59.52

**Tableau 47:** Comparaison des séquences MTOPVIB entre les 13 espèces de poacées

QUERY ID	TARGET ID	% IDENTITY	SIZE COVER	E VALUE	SCORE	% SIMILARITY
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Ta-MTOPVIB-7A-CS	100	481	0	992	100
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Tt-MTOPVIB-7A-Durum	99.792	481	0	991	100
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Ta-MTOPVIB-7B-CS	96.258	480	0	956	98.34
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Tt-MTOPVIB-7B-Durum	96.05	480	0	954	98.34
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Ta-MTOPVIB-7D-CS	95.541	481	0	911	98.3
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Tu-MTOPVIB-7A-G1812	89.336	489	0	873	89.34
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	95.422	414	0	820	97.83
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Bd-MTOPVIB-Bd21	80.297	480	0	784	88.77
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Sb-MTOPVIB-Bicolor	72.234	459	0	683	85.03
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Os-MTOPVIB-93-11	68.22	461	0	633	80.08
Ta-MTOPVIB-7A-CS	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	96.484	255	0	515	98.44
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Hv-MTOPVIB-	94.118	268	2.78E-172	476	96.08
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	72.936	227	4.17E-109	320	82.57
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	68.841	386	9.35E-55	179	84.06
Ta-MTOPVIB-7A-CS	At-MTOPVIB-	36.743	467	4.27E-97	293	55.53
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Os-MTOPVIB-Nipponbare	70.312	215	4.78E-58	182	80.47
Ta-MTOPVIB-7A-CS	Zm-MTOPVIB-Japonica	65.957	138	6.98E-57	176	79.43
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Ta-MTOPVIB-7A-CS	96.258	481	0	956	98.34
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Tt-MTOPVIB-7A-Durum	96.05	481	0	954	98.34
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Ta-MTOPVIB-7B-CS	100	480	0	991	100

Ta-MTOPVIB-7B-CS	Tt-MTOPVIB-7B-Durum	99.792	480	0	989	100
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Ta-MTOPVIB-7D-CS	96.466	481	0	962	99.17
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Tu-MTOPVIB-7A-G1812	86.29	489	0	851	88.1
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	99.758	414	0	857	99.76
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Bd-MTOPVIB-Bd21	81.104	480	0	788	89.17
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Sb-MTOPVIB-Bicolor	71.957	459	0	678	84.78
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Os-MTOPVIB-93-11	68.153	461	0	640	80.89
Ta-MTOPVIB-7B-CS	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	97.647	255	0	523	99.61
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Hv-MTOPVIB-	96.063	268	0	503	97.64
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	72.018	227	9.18E-109	319	82.57
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	70.803	386	1.72E-56	183	85.4
Ta-MTOPVIB-7B-CS	At-MTOPVIB-	37.118	448	2.05E-95	288	56.33
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Os-MTOPVIB-Nipponbare	77.57	199	2.42E-56	178	87.85
Ta-MTOPVIB-7B-CS	Zm-MTOPVIB-Japonica	66.429	138	5.47E-57	176	80
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Ta-MTOPVIB-7A-CS	95.541	481	0	932	98.3
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Tt-MTOPVIB-7A-Durum	95.329	481	0	931	98.3
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Ta-MTOPVIB-7B-CS	96.466	480	0	962	99.17
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Tt-MTOPVIB-7B-Durum	96.258	480	0	961	99.17
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Ta-MTOPVIB-7D-CS	100	481	0	994	100
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Tu-MTOPVIB-7A-G1812	85.685	489	0	848	88.1
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Td-MTOPVIB-7B-ZAVITAN	96.135	414	0	834	99.03
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Bd-MTOPVIB-Bd21	79.83	480	0	776	88.96

Ta-MTOPVIB-7D-CS	Sb-MTOPVIB-Bicolor	71.739	459	0	674	84.57
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Os-MTOPVIB-93-11	66.879	461	0	628	80.47
Ta-MTOPVIB-7D-CS	AET-MTOPVIB-7D-AL8/78	100	255	0	533	100
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Hv-MTOPVIB-	94.094	268	1.72E-174	482	97.24
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	71.101	227	5.40E-106	312	82.57
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Os-MTOPVIB-Spontanea	68.613	386	2.94E-55	180	84.67
Ta-MTOPVIB-7D-CS	At-MTOPVIB-	36.245	448	9.15E-94	284	56.33
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Os-MTOPVIB-Nipponbare	78.505	199	1.53E-57	181	88.79
Ta-MTOPVIB-7D-CS	Zm-MTOPVIB-Japonica	65	138	1.70E-55	172	79.29

**Tableau 48:** Comparaison des séquences spo11-2 entre les 13 espèces de poacées

QUERY ID	TARGET ID	% IDENTITY	SIZE COVER	E VALUE	SCORE	% SIMILARITY
Ta-SPO11-2-7A-CS	Ta-SPO11-2-7A-CS	100	359	0	742	100
Ta-SPO11-2-7A-CS	Tu-SPO11-2-7A-G1812	91.948	386	0	719	92.47
Ta-SPO11-2-7A-CS	Hv-SPO11-2-	90.698	396	0	716	92.25
Ta-SPO11-2-7A-CS	Ta-SPO11-2-7D-CS	90.909	386	0	712	91.95
Ta-SPO11-2-7A-CS	AET-SPO11-2-7D-AL8/78	90.909	393	0	712	91.95
Ta-SPO11-2-7A-CS	Tt-SPO11-2-7B-Durum	90.13	386	0	706	91.69
Ta-SPO11-2-7A-CS	Ta-SPO11-2-7B-CS	90.13	386	0	706	91.69
Ta-SPO11-2-7A-CS	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	90.104	384	0	704	91.67
Ta-SPO11-2-7A-CS	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	99.696	384	0	677	99.7

Ta-SPO11-2-7A-CS	Bd-SPO11-2-Bd21	85.564	382	0	672	89.76
Ta-SPO11-2-7A-CS	Os-SPO11-2-Nipponbare	80.208	385	0	624	85.16
Ta-SPO11-2-7A-CS	Sb-SPO11-2-Bicolor	82.245	382	0	622	87.73
Ta-SPO11-2-7A-CS	Tt-SPO11-2-7A-Durum	98.305	290	0	598	98.31
Ta-SPO11-2-7A-CS	Os-SPO11-2-93-11	83.478	503	0	594	88.41
Ta-SPO11-2-7A-CS	Os-SPO11-2-Spontanea	78.212	359	0	570	84.92
Ta-SPO11-2-7A-CS	Zm-SPO11-2-Japonica	69.091	358	5.13E-175	482	75.84
Ta-SPO11-2-7A-CS	At-SPO11-2-	66.667	383	8.39E-169	467	80.73
Ta-SPO11-2-7A-CS	At-SPO11-2-	28.571	35	4.2	18.9	45.71
Ta-SPO11-2-7B-CS	Ta-SPO11-2-7A-CS	90.13	359	0	706	91.69
Ta-SPO11-2-7B-CS	Tu-SPO11-2-7A-G1812	97.668	386	0	777	99.22

Ta-SPO11-2-7B-CS	Hv-SPO11-2-	96.883	396	0	769	98.7
Ta-SPO11-2-7B-CS	Ta-SPO11-2-7D-CS	97.668	386	0	774	98.19
Ta-SPO11-2-7B-CS	AET-SPO11-2-7D-AL8/78	97.668	393	0	773	98.19
Ta-SPO11-2-7B-CS	Tt-SPO11-2-7B-Durum	100	386	0	793	100
Ta-SPO11-2-7B-CS	Ta-SPO11-2-7B-CS	100	386	0	793	100
Ta-SPO11-2-7B-CS	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	100	384	0	789	100
Ta-SPO11-2-7B-CS	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	90.027	384	0	674	92.45
Ta-SPO11-2-7B-CS	Bd-SPO11-2-Bd21	93.176	382	0	738	96.85

Ta-SPO11-2-7B-CS	Os-SPO11-2-Nipponbare	85.417	385	0	678	91.67
Ta-SPO11-2-7B-CS	Sb-SPO11-2-Bicolor	88.512	382	0	681	94.52
Ta-SPO11-2-7B-CS	Tt-SPO11-2-7A-Durum	95.932	290	0	587	97.29
Ta-SPO11-2-7B-CS	Os-SPO11-2-93-11	81.217	503	0	630	88.1
Ta-SPO11-2-7B-CS	Os-SPO11-2-Spontanea	79.373	359	0	617	86.42
Ta-SPO11-2-7B-CS	Zm-SPO11-2-Japonica	75.065	358	0	539	82.6
Ta-SPO11-2-7B-CS	At-SPO11-2-	64.879	383	0	501	78.55
Ta-SPO11-2-7B-CS	At-SPO11-2-	28.571	35	4.1	18.9	45.71
Ta-SPO11-2-7D-CS	Ta-SPO11-2-7A-CS	90.909	359	0	712	91.95
Ta-SPO11-2-7D-CS	Tu-SPO11-2-7A-G1812	97.927	386	0	779	98.96
Ta-SPO11-2-7D-CS	Hv-SPO11-2-	97.403	396	0	772	98.7
Ta-SPO11-2-7D-CS	Ta-SPO11-2-7D-CS	100	386	0	793	100
Ta-SPO11-2-7D-CS	AET-SPO11-2-7D-AL8/78	100	393	0	793	100
Ta-SPO11-2-7D-CS	Tt-SPO11-2-7B-Durum	97.668	386	0	774	98.19
Ta-SPO11-2-7D-CS	Ta-SPO11-2-7B-CS	97.668	386	0	774	98.19
Ta-SPO11-2-7D-CS	Td-SPO11-2-7B-ZAVITAN	97.656	384	0	769	98.18
Ta-SPO11-2-7D-CS	Td-SPO11-2-7A-ZAVITAN	96.532	384	0	682	97.69
Ta-SPO11-2-7D-CS	Bd-SPO11-2-Bd21	92.913	382	0	736	96.33
Ta-SPO11-2-7D-CS	Os-SPO11-2-Nipponbare	85.677	385	0	682	91.41

Ta-SPO11-2-7D-CS	Sb-SPO11-2-Bicolor	88.512	382	0	682	94.26
Ta-SPO11-2-7D-CS	Tt-SPO11-2-7A-Durum	97.627	290	0	597	98.31
Ta-SPO11-2-7D-CS	Os-SPO11-2-93-11	82.842	503	0	636	88.47
Ta-SPO11-2-7D-CS	Os-SPO11-2-Spontanea	79.634	359	0	620	86.16
Ta-SPO11-2-7D-CS	Zm-SPO11-2-Japonica	74.935	358	0	540	81.72
Ta-SPO11-2-7D-CS	At-SPO11-2-	65.147	383	0	506	79.09
Ta-SPO11-2-7D-CS	At-SPO11-2-	28.571	35	4.2	18.9	45.71

### **8.1.3 Modes opératoires développés en thèse**

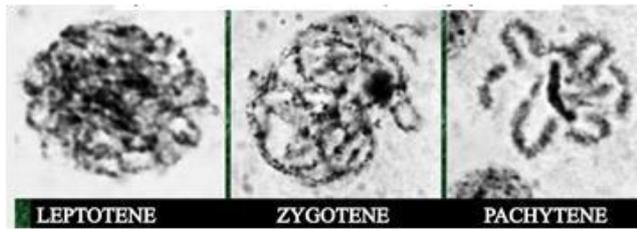
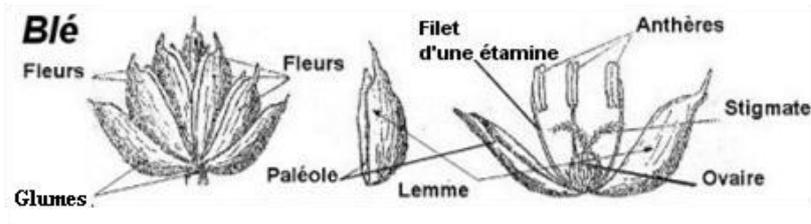
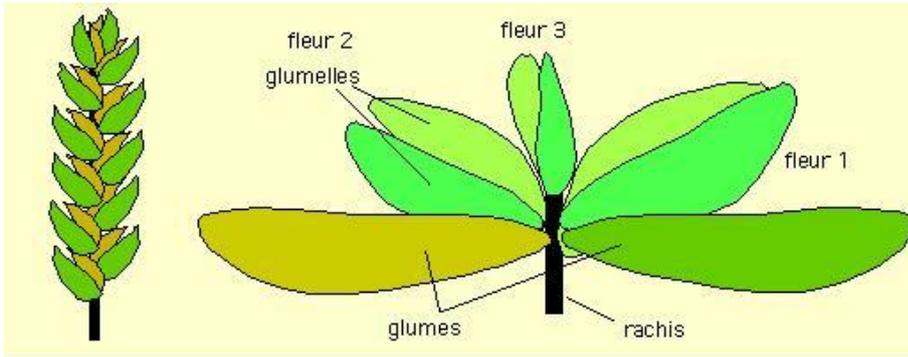
<b>MO-01</b> : Prélèvements d'épis de blé pour la préparation de lames au stade métaphase I de la méiose.....	245
<b>MO-02</b> : Etude du comportement méiotique.....	247
<b>MO-03</b> : Constitution d'atlas de méiose.....	249
<b>MO-04</b> : Triple immunomarquage ASY1-ZYP1-DMC1 sur méiocytes.....	250
<b>MO-05</b> : Procédure d'acquisition d'images en AIRYSCAN.....	253
<b>MO-06</b> : Traitement des images de microscopie avec IMARIS.....	255
<b>MO-07</b> : Extraction d'ARNm à partir d'anthères de blé.....	256
<b>MO-08</b> : Analyse de l'expression de gènes par qPCR.....	258
<b>MO-09</b> : Etape de pré amplification des puces d'expression 192/24.....	266
<b>MO-10</b> : Puce expression 192/24.....	268

**MO-01: Prélèvements d'épis de blé pour la préparation de lames au stade métaphase I de la méiose (à partir des étamines ou anthères) 1-Prélèvement épi**

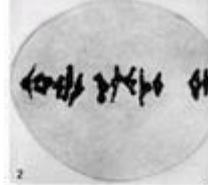
- Prélever l'épi de préférence le matin entre 10h et 12h (meilleur moment pour trouver les métaphases)
- Prélever une tige dont l'épi se trouve dans la gaine et en dessous du 2<sup>ème</sup> nœud (distance variable suivant les espèces ☹ faire des tests préalables pour trouver la bonne hauteur donc prévoir des témoins)
- Identifier la tige et la mettre dans un bac polystyrène contenant de la glace

2- Prélèvement au stade métaphase I • On récupère délicatement l'épi en enlevant la gaine avec la spatule de précision à bout pointu.

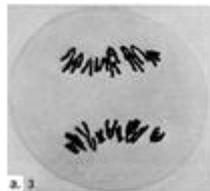
- On récupère délicatement une étamine (ou anthère) dans la 1<sup>ère</sup> fleur du 1<sup>er</sup> épillet du bas avec la spatule de précision à bout pointu (bien laisser les 2 étamines restant dans la fleur) • On pose l'étamine sur une lame porte objet et on dépose dessus une goutte de carmin acétique
- On pose la lamelle suivie d'une petite pression (« tapette »).
- Observation au microscope à x10 ou x25 (voire x40). Si le stade observé est trop vieux (anaphase, tétrade, pollen), passer sur la 2<sup>ème</sup> fleur du même épillet. Si le stade observé est trop jeune (prophase), remonter sur l'épillet du dessus et toujours sur la 1<sup>ère</sup> fleur. Le centre de l'épi est le plus vieux (si on descend ou si on monte à partir du milieu, c'est de plus en plus jeune). Egalement la 1<sup>ère</sup> fleur est toujours plus vieille que la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> fleur.
- Lorsque le stade métaphase est trouvé, récupérer les 2 étamines restant de la même fleur que celle trouvée et les fixer dans un tube contenant du 3:1 (+ un peu de fer si étude comportement méiotique) que l'on bouche puis laisser pendant 48h à température ambiante. Identifier le tube.
- Au bout de 48h, rincer les étamines dans de l'alcool 70° puis les conserver à 4°C toujours dans l'alcool 70°. Conservation possible pendant plusieurs mois.



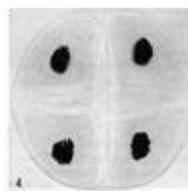
**Métaphase I**



Anaphase I



Fin de méiose



## **MO-02 : Etude du comportement méiotique du blé**

### 1- Montage et coloration

- On place une étamine préalablement conservée dans l'éthanol 70° (voir MOCYTO-01) dans une goutte de Carmin acétique sur une lame.
- Sous la loupe binoculaire, à l'aide des mandrins munis d'aiguille forte, on dissèque l'étamine pour faire sortir les cellules mères du pollen.
- On élimine les débris de l'anthere et on recouvre la préparation d'une lamelle.
- On chauffe un peu la lame en évitant de faire bouillir, puis on rajoute du carmin avec la spatule lancéolée (vérification express au microscope x25 que les cellules sont bien au stade métaphase 1). On laisse monter la coloration quelques minutes tout en continuant à chauffer par intermittence (surveiller le gonflement des cellules au microscope x25); le chauffage doit être suffisant pour faire éclater la paroi des cellules et provoquer la dilatation du cytoplasme. Les bords de la lamelle ne doivent pas sécher, il faut donc maintenir un léger excès de Carmin ; les excédents de liquide sont éliminés avec un buvard.

2- Régression • Elle se fait à l'acide acétique 45% (eau acétique) et permet d'éclaircir le cytoplasme tout en dissociant les configurations chromosomiques au sein de chaque cellule. • On dépose une goutte d'eau acétique sur la lame d'un côté de la lamelle et on aspire de l'autre côté en s'aidant d'un morceau de buvard. Un léger chauffage à ce stade facilite l'opération et accentue la régression.

3- L'étalement • On continue à chauffer légèrement la préparation tout en maintenant un excès d'eau acétique. Lorsqu'un bon contraste entre le cytoplasme et la coloration des chromosomes est obtenu, on procède à l'étalement proprement dit en plaçant un papier Whatman sur la lamelle puis en exerçant une faible pression sur la lamelle à l'aide de l'index.

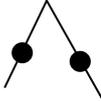
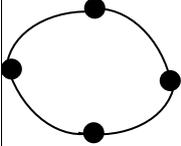
**Il est important que cette pression soit bien verticale** car il faut éviter de faire glisser la lamelle, ce qui aurait pour conséquence de rouler les cellules et de rendre l'observation impossible.

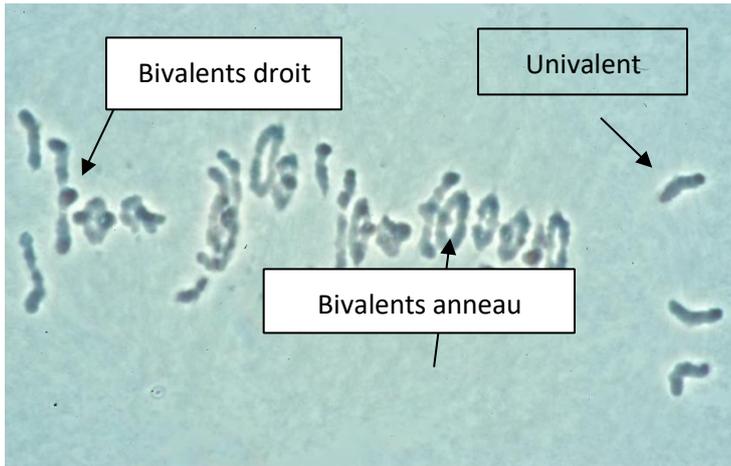
- Si l'on souhaite garder les lames pour de futures hybridations (FISH, GISH), plonger la lame dans l'azote liquide jusqu'à l'arrêt de l'ébullition, faire sauter la lamelle à l'aide d'une lame de rasoir, marquer l'emplacement de la lamelle au stylo diamant en faisant 2 encoches au-dessus des 2 coins supérieurs, puis laisser sécher à l'air libre en mettant les lames à la verticale. Les lames peuvent ensuite être stockées dans des boîtes rack à 4°C pendant plusieurs semaines.  
Si l'on fait de simples observations (non conservation des lames), mettre du vernis transparent autour de la lamelle pour la fixer et procéder immédiatement à l'observation sous microscope.

### 4- Observation

- Observation au microscope en contraste de phase et étude des comportements méiotiques (univalents, bivalents droits ou anneaux, trivalent, etc...) et détermination du nombre de chiasmata.

	Univalent	Bivalent droit	Bivalent anneau	Trivalent	Quadrivalent « N »	Quadrivalent anneau
--	-----------	----------------	-----------------	-----------	--------------------	---------------------

Schéma						
Nombre de chiasma	0	1	2	2	3	4

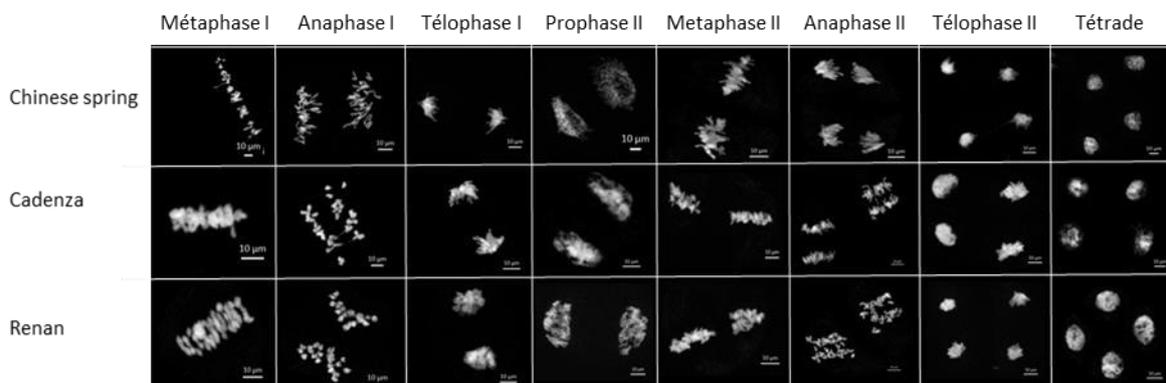


### **MO-03 : Constitution d'atlas de méiose à partir d'anthères de blé**

Mettre de l'azote liquide dans le récipient approprié + couvercle et le poser sur la pailleasse.

- 1- Récupérer une anthère dans le tube contenant le Carnoy à l'aide de la spatule puis la poser sur une lame Superfrost annotée et datée. Rajouter une goutte (15  $\mu\text{L}$ ) de Carmin/acide acétique dessus. Poser une lamelle carrée par-dessus puis taper d'un geste vif sur l'anthère à l'aide du bout de crayon en bois. Remarque : vérifier au microscope classique que le stade de la méiose noté sur le tube en verre est bien celui observé sur cette anthère (il arrive parfois que les anthères ne soient pas tout à fait synchronisées, surtout pour des hybrides interspécifiques ainsi que les blés ancêtres).
- 2- Régression à l'acide acétique : faire cette étape pour le stade métaphase I qui nécessite d'étaler un peu plus les chromosomes : se référer au MO-CYTO-01.
- 3- Plonger la lame dans le seau contenant l'azote à l'aide de la pince en bois. Attendre qu'il n'y ait plus aucun crépitement. Sortir la lame et la déposer dans le bon sens (cellules vers soi) sur un papier essuie-tout.
- 4- Faire 2 encoches au stylo diamant sur les bords du haut de la lamelle.
- 5- Enlever sans attendre mais délicatement la lamelle à l'aide d'une lame de rasoir (enfiler le coin de la lame sur le bord supérieur droit de la lamelle et soulever pour décoller la lamelle).
- 6- Prendre délicatement la lame sur les 2 bords et la placer à la verticale (côté annoté en bas) sur un portoir de lame. Laisser sécher brièvement quelques minutes seulement.
- 7- Mettre la lame sur un portoir de lame horizontal et se placer sous la sorbonne. Repérer les 2 encoches puis déposer au centre de la lame une goutte de DAPI (ou 12  $\mu\text{L}$ ). Placer une lamelle carrée par-dessus délicatement. Attendre minimum 30 min et jusqu'à 2H à température ambiante sinon 24H dans un support cartonné (au noir) à 4°C.
- 8- Observation et prise de photos au microscope inversé à fluorescence Axio Observer Z1 Zeiss.

### Exemple d'atlas



### **Préparation des produits**

Préparer 1 ml d'acide acétique à 45% frais juste avant utilisation. Il est utilisable pour la journée si le bouchon est bien fermé sur le tube (ne doit pas s'évaporer).

## **MO-04 : Triple immunomarquage ASY1-ZYP1-DMC1 sur méiocytes**

**Attention :** Les immunomarquages se font uniquement sur du **matériel frais** (épils et anthères récoltées du matin)

Trouver les stades leptotène, zygotène et pachytène de la prophase I de la méiose. 1-

Prélèvement épi

- Prélever l'épi de préférence le matin vers 9h30  
Prélever une tige dont l'épi se trouve dans la gaine et en dessous du 2<sup>ème</sup> nœud (distance variable suivant les espèces 🌀 faire des tests préalables pour trouver la bonne hauteur donc prévoir des témoins)
- Couper l'épi et le placer dans la glace

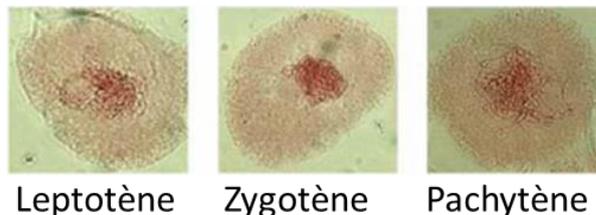
### **2- Isolement des anthères aux stades de la prophase I**

- On récupère délicatement l'épi en enlevant la gaine avec la spatule de précision à bout pointu. Couper les barbes si nécessaires.
- Placer l'épi dans une grande coupelle en verre sur un support noir et mettre le tout sur la glace.
- On récupère délicatement les 3 anthères de la 1<sup>ère</sup> fleur du 1<sup>er</sup> épillet du bas avec la spatule de précision à bout pointu.
- Déposer 15 µl de carmin acétique sur une lame classique puis y déposer l'anthère.
- Placer une lamelle sans faire de bulles
- Taper d'un geste vif sur l'anthère à l'aide du bout d'un crayon en bois.
- Observation du stade au microscope optique classique à x10 ou x25.

Remarque : Si le stade observé est trop vieux, passer sur la 2<sup>ème</sup> fleur interne du même épillet. Le centre de l'épi est le plus vieux (si on descend ou si on monte à partir du milieu, c'est de plus en plus jeune). Egalement la 1<sup>ère</sup> fleur est toujours plus vieille que la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> fleur (en allant vers le centre de l'épi).

- Lorsque le stade recherché est trouvé, récupérer les 2 anthères adjacentes à l'anthère observée et les placer dans un verre de montre contenant 1 ml de PBS1X + 1 µl inhibiteur de protéase. Placer le verre de montre sur la glace.
- Vérifier le stade de chaque lot d'anthères de la même manière jusqu'à en avoir 4 par lame.

Prophase I



- Enlever le PBS1X puis fixer les anthères dans de la PFA 4% pendant 15 min (pas plus) à T° ambiante dans un verre de montre.
- Replacer le verre de montre sur la glace. Procéder à 2 lavages avec 1 ml de PBS1X pendant 5 min (à la pipette).

On peut éventuellement s'arrêter à cette étape jusqu'au lendemain en plaçant le verre de montre (le protéger avec une coupelle en verre par-dessus) à 4°C.

- Placer le verre de montre dans la glace. Les anthères sont incubées dans 1ml solution de perméabilisation pendant 15 min.
- Enlever les 1 ml de solution de perméabilisation.
- Mettre 1 ml de solution de saturation pendant 15 min (verre de montre sur la glace). Les anthères peuvent y rester plus longtemps sans risque.

### **3-Triple immunomarquage**

Pendant ce temps d'attente, préparer la solution avec les 3 anticorps primaires :

- Dans un tube Eppendorf placé dans la glace et pour 3 lames : 188 µl de **solution de saturation** + 1 µl de AC I TaASY1+ 1,5 µl de AC I TaZYP1 + (5 µl Poule 1 + 5 µl Poule 2) AC I TaDMC1. Mélanger doucement en tapotant le tube. Laisser le tube dans la glace.
- Préparer les lames superfrost, les annoter et les dater. Tracer un ovale assez large au stylo diamant.
- Mettre 3 µl de **solution AC IIaire** au centre de la lame Superfrost et décortiquer une à une chaque anthère sous la loupe binoculaire (maximum 5 par lame). **Attention : éviter que le liquide s'évapore.** Bien enlever tous les débris des anthères.
- Mélanger les cellules au centre du cercle à l'aide de la pince au bout arrondie.

**TRES IMPORTANT** : Laisser sécher légèrement la lame (il faut un film cellulaire légèrement humide). Cette opération est assez rapide (quelques minutes) selon la température de la pièce. Vérifier sous microscope la densité et le stade des méiocytes.

- Déposer 50 µl de la solution d'AC I / lame.
- Recouvrir la lame avec un rectangle de parafilm et la placer sur le portoir de lame.
- Placer le portoir de lames dans la chambre d'incubation humide (bassine blanche rectangulaire avec un papier imbibé d'eau). Fermer le couvercle.
- Placer la chambre humide à 4°C pendant 48 heures.
- Sortir la chambre d'incubation et la mettre à T° ambiante quelques instants.
- Enlever le parafilm à l'aide d'une pince et placer les lames dans une cuve en verre dans 100 ml de PBS 1X. Placer la cuve dans un bain-marie agitant non chauffé pendant 5 minutes.
- Répéter l'opération de lavage 3 fois.

**ATTENTION** : **TOUTES les étapes suivantes doivent se faire à l'obscurité**

- Préparer la **solution d'anticorps secondaire** dans 1 tube Eppendorf entouré de papier aluminium contenant : 196 µl de solution AC II aire + 1 µl Anti-rabbit-AF568 + 1,5 µl anti-guinea pig AF647 + 1,5 µl Anti-chicken AF 488.
- Déposer 50 µl d'AC II/lame et recouvrir d'un morceau de parafilm.
- Placer le portoir de lames avec les lames dans une bassine recouverte de papier aluminium à température ambiante pendant 1H (ou directement dans le tiroir du labo).

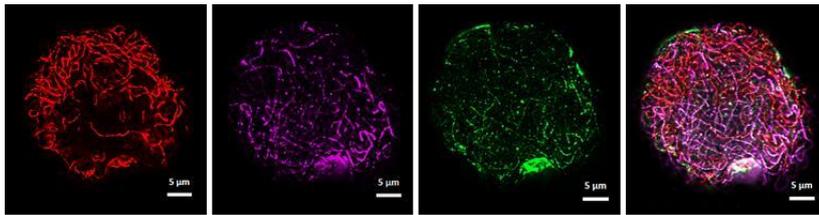
- Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X dans une cuve en verre recouverte de papier aluminium dans un bain-marie agitant non chauffé.
- Drainer les lames (position verticale contre un support) quelques minutes.
- Ajouter 1 goutte de vectashield-DAPI et mettre une lamelle 22X32mm. Laisser 20 min minimum à 4°C.
- A l'aide d'un papier filtre enlever l'excédent de DAPI autour de la lamelle sans écraser au milieu.
- Vernir le pourtour de la lamelle.
- Observation au microscope inversé à fluorescence AxioObserver Z1.

**ASY1**

**ZYP1**

**DMC1**

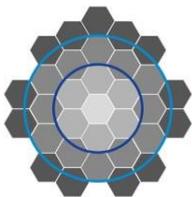
**MERGE**



Stade mid-zygotène-pachytène

## **MO-05 : Procédure d'acquisition d'images en AIRYSCAN**

- 1- Recharger les paramètres d'une ancienne image AIRYSCAN : Ouvrir une ancienne image Airyscan et cliquer sur Reuse (en bas sous l'image). Si c'est la première fois, enregistrer à la fin vos paramètres de détection que vous voulez conserver et donner un nom dans acquisition, new name.
- 2- Parcourir la lame au X20, vérifier la qualité des signaux pour chaque canal puis enregistrer la position sous : Acquisition, onglet Tiles, position : cliquer sur +
- 3- Pour ne pas à avoir à enlever la lame pour changer d'objectif et mettre l'huile (ce qui inévitablement décalerait la position déjà enregistrée dans tiles), procéder comme suit : à l'aide de la manette de direction, déplacer horizontalement la lame en dehors de l'objectif X20 vers le fond de la salle. Sur le boîtier colibri actionner le changement d'objectif (choisir le 63 X). Mettre alors une grosse goutte d'huile sur l'objectif 63X. Faire avancer horizontalement la lame vers soi jusqu'à ce que l'objectif 63 soit en dessous au centre de la lame. Puis répondre à la question « changement d'huile fait » ? par un clic sur Done.
- 3- Décocher Tiles et cocher Z-stack. Cliquer sur Live et à l'aide de la manette (gauche sur appareil) ou manette du boîtier colibri puis chercher la coupe centrale et cliquer sur Center. Choisir le nombre de coupes (slices) autour du centre (5-10).
- 4- Pour chacun des filtres utilisés : faire le focus puis régler les paramètres de détection : puissance du laser (max 850 V) et l'intensité du laser :  
Acquisition, live, range indicator : aller dans l'onglet Acquisition Mode et se mettre à 850 V tout le temps (laser) puis augmenter ou diminuer l'intensité (%) pour avoir une image aussi nette que possible. A la fin, cliquer sur Optimal (très important pour ensuite passer à la détection airyscan).
- 5- Cliquer sur l'onglet Continuous puis Airyscan sur le 2<sup>ème</sup> onglet vertical de l'écran à gauche de l'image. (Vérifiez que range indicator est coché).
- 6- Sous l'image en bas à droite cocher Detector et attendre que l'appareil travaille : la lumière blanche la plus forte doit être centrée sur le carré du milieu, et ceci pour chaque filtre. Visualiser en bas de l'écran la progression de l'analyse par filtre.



10-Cliquer sur Star Experiment

11-Aller dans l'onglet Processing, dans onglet Method cocher Airyscan processing puis dans Paramètres cocher 3D Processing.

12-Choisir dans Input la photo nommée « Experiment »

13-Faire Apply (en haut). Enregistrer la photo en gardant l'extension processing.czi

14- Si l'on veut une image déconvoluée, procéder comme suit :  
Aller dans Processing puis Method, choisir Déconvolution et dans paramètres déconvolution choisir « image good medium ». Dans Input choisir la photo Experiment Airyscan processing

15-Cliquer sur Apply. Enregistrer la photo en gardant l'extension déconvolution.czi

16- Enregistrer les images sur le disque dur externe. Fermer le logiciel ZEN 2.

17- Enlever la lame, nettoyer l'objectif 63X ou 40X avec de l'éthanol 70%. Puis remettre l'objectif 20X ou 10X pour le prochain utilisateur.

## **MO-06 : Traitement des images de microscopie avec le logiciel IMARIS**

1. Identifiant et mot de passe donné par le responsable de la PF CLIC
2. Convertir les fichiers .czi en fichiers .ims avec le logiciel Imaris File Converter (sur le bureau):  
Onglet Add Files : aller chercher les photos à convertir sur le disque dur externe et faire START ALL (à droite). Après la conversion des fichiers en .ims, fermer le logiciel.
3. Ouvrir Imaris X 64 V9.3.1 (sur le bureau)
4. Ouvrir une seule image à la fois
5. Edit Show Display Ajustement : une fenêtre s'ouvre avec les 3 filtres. Décocher celui ou ceux qui ne sont pas utiles (le rouge et le magenta dans notre cas)
6. Add New Spots (icône jaune-orange en haut à gauche de l'écran)
7. Create (à gauche au centre) : chercher prog. Défaut et cocher « Different spot sizes ». Choisir que le canal pour lequel on veut faire les comptage (vert pour DMC1). Estimated XY diameter (choisir le seuil) : 0.336 (paramètre fixé la 1<sup>ère</sup> fois) Garder le gamma à 1. Cocher « Background soustraction »
8. Cliquer sur flèche bleue en bas à gauche de l'écran. Le nombre de spots comptés est affiché en bas à gauche.
9. Affiner le seuil en revenant en arrière au paramètre estimated XY diameter et en augmentant ou abaissant le seuil.
10. Cliquer 2 fois sur la flèche bleue puis sur la flèche verte
11. Aller sur l'icône rouge statistique à gauche au centre de l'écran
12. Cliquer sur Save pour enregistrer les données sous forme de tableau (en bas et à gauche :  
nom de la photo et à la place de .csv, choisir .xls
13. Pour enregistrer l'image avec les spots dénombrés : File, save as, OK
14. Fermer l'image
15. Ouvrir la seconde image et procéder de la même façon.
16. Appliquer la valeur de seuil choisie pour toute la série d'images à analyser.

## MO-07 : Extraction d'ARNm à partir d'anthères de blé

### Préparation des solutions de travail

Attention : le rDNase est stocké à 4°C dès l'arrivée du kit (stable pendant 1 an) Les produits du kit sont stockés à température ambiante entre 18-25°C.

rDNase : pour le kit 50 preps rajouter 550 µL d'H<sub>2</sub>O RNase-free (prendre 1 flacon neuf d'H<sub>2</sub>O stérile de la PF Gentyane). Cocher la case sur le flacon et dater.

Tampon de lavage RA3 (tube de 12 mL) : rajouter 48 mL d'éthanol 96°. Cocher la case sur le flacon et dater. Le RA3 peut être stocké ensuite à température ambiante pendant au moins 1 an.

## RNA isolation from plant

### Protocol-at-a-glance (Rev. 09)

NucleoSpin® RNA Plant			
1	Homogenize sample		100 mg
2	Lyse cells		350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol or 350 µL RAP 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix
3	Filtrate lysate	 	11,000 x g, 1 min
4	Adjust RNA binding conditions		350 µL 70% ethanol Mix
5	Bind RNA	 	Load sample 11,000 x g, 30 s
6	Desalt silica membrane	 	350 µL MDB 11,000 x g, 1 min
7	Digest DNA		95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
8	Wash and dry silica membrane	  	1 <sup>st</sup> wash 200 µL RAW2 2 <sup>nd</sup> wash 600 µL RA3 3 <sup>rd</sup> wash 250 µL RA3 11,000 x g, 30 s 11,000 x g, 2 min
9	Elute RNA	 	60 µL RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g, 1 min

1-Aller chercher les broyats d'anthères (-80°C) et les mettre dans de la glace.

- 2- Lyse: sous la sorbonne ajouter 350  $\mu$ L de tampon RA1 et 7  $\mu$ L de TCEP au broyat et vortexer vigoureusement.
- 3- Filtration du lysat: préparer une colonne violette sous laquelle on aura placé un tube de 2 mL fourni dans le kit. Déposer le mélange sur le haut de la colonne et centrifuger 1 min à 11000 g. Transférer le filtrat dans un nouveau microtube de 1,5 mL (non fourni).
- 4- Enlever la colonne violette et ajouter 350  $\mu$ L d'éthanol à 70% au lysat et mélanger en pipétant doucement de haut en bas 5 fois.
- 5- Prendre une colonne bleue + tube 2 mL et charger le lysat. Centrifuger 30 s à 11000 g. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL
- 6- Dessaler la membrane de silice : ajouter 350  $\mu$ L de MDB et centrifuger 1 min à 11000 g pour sécher la membrane.
- 7- Préparer la rDNase dans un tube de 1,5 mL: pour chaque échantillon, ajouter 10  $\mu$ L de rDNase reconstitué + 90  $\mu$ L de tampon de réaction pour la rDNase. Mélanger par effleurement du tube. Puis ajouter 95  $\mu$ L du mélange au centre de la membrane en silice au centre de la colonne. Incuber 15 min à température ambiante.
- er  
8- 1 lavage : ajouter 200  $\mu$ L de tampon RAW2 à la colonne. Centrifuger 30 s à 11000 g. Placer la colonne dans un nouveau collection tube de 2 mL.
- ème  
9- 2 lavage : ajouter 600  $\mu$ L de tampon RA3 à la colonne. Centrifuger 30 s à 11000 g. Retirer les effluents du tube et replacer la colonne dans ce tube.
- ème  
10- 3 lavage : ajouter 250  $\mu$ L de tampon RA3 sur la colonne. Centrifuger 2 min à 11000 g et sécher la membrane complètement. Placer la colonne dans un nouveau tube collection de 1,5 mL.
- 11- Elution : éluer l'ARN dans 30  $\mu$ L (à vérifier) d'H<sub>2</sub>O RNase-free (placé au centre de la colonne). Attendre 2 min avant de centrifuger 1 min à 11000 g.
- 12- Stocker les ARNm à -80°C.

## MO-08 : Analyse de l'expression de gènes par qPCR

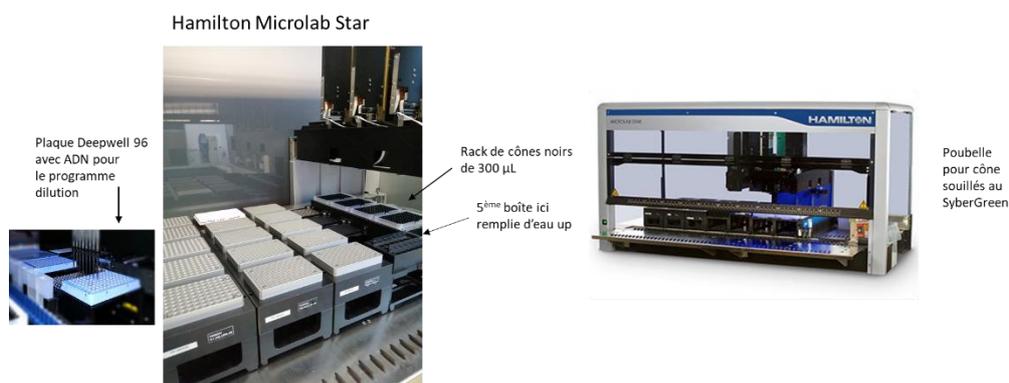
Le protocole est à optimiser pour chaque application spécifique. Ici, le protocole a été optimisé pour la quantification des copies de gènes chez des mutants de gènes de méiose chez le blé tendre (ici, cas de Spo11.2).

### Etape 1 Préparation des appareils et des échantillons d'ADN dilués

- Venir sur la PF avec les extraits d'ADN des mutants et des témoins (parents mutés, génotype sauvage), les amorces, le tout placé dans la glace.
- Préparer une poubelle (poche plastique) à fixer à droite du Hamilton Microlab Star pour que le robot éjecte ses cônes souillés au Sybergreen (cônes) et mettre la date dessus.
- Allumer le LCS 480 situé dans la petite pièce (appuyer fort sur l'interrupteur à gauche de l'appareil) puis l'ordinateur.
- Avant la préparation des réactions de qPCR, bien mélanger l'ADN matrice, les amorces et les sondes (vortexer les plaques puis centrifuger brièvement (programme de 1 min)).
- Dilution des extraits d'ADN au 1/15<sup>ème</sup> :
- Mettre 4 boîtes de cônes noirs de 300 µL dans le rack attribué. A la cinquième place, mettre une plaque remplie d'H<sub>2</sub>O ultra pure tirée du jour.

Préparer les plaques 96 Deepwell (stock à côté du Hamilton): annoter le(s) plaque(s) mères sur le côté, les placer sur la glace et déposer 20 µL/puits d'extrait d'ADN des parents mutés et des Renan pour chacune des plaques à analyser.

- Avant de procéder à la qPCR, il faudra diluer les ADN extraits des plaques mères (le programme est automatisé sur le Hamilton Microlab Star). Le robot met en premier l'eau up qu'il prélève de la 5<sup>ème</sup> boîte et place le volume choisi (93 µL H<sub>2</sub>O up) dans une plaque Deepwell de 96 qu'on a préalablement placée au fond du rack pour plaque 96. Puis il va collecter 7 µL d'ADN de la plaque mère et les ajouter et les mélanger dans la plaque Deepwell 96.



- Programmer sur l'ordi : onglet File puis fichier « Dilution transfert ». Cliquer sur play Plaque type Deepwell 96 OK, mettre volume d'eau /ADN choisi : Exemple: 93 µL eau et 7 µL ADN
- Lancer le programme (dure quelques minutes)
- Après la dilution, enlever doucement la plaque puis mettre un film et la resceller à la machine. Passer le rouleau sur la plaque avant de la conserver à 4°C en attendant de faire le mix.

### Etape 2 : Réaction qPCR

- Préparer les amorces à 10  $\mu\text{M}$ , les mélanger et les centrifuger brièvement.
- Calculer les volumes requis pour tous les échantillons + témoins + une trentaine de volumes en plus de chaque composant selon le tableau suivant et préparer le mix dans un tube de 2 mL

Produit	Concentration	Volume total 12 $\mu\text{L}$
Eau de qualité PCR jusqu'à 20 $\mu\text{l}$		3 $\mu\text{l}$
Master Mix (2X) qPCR (LC480 SYBR Green)	1X	7.5 $\mu\text{l}$
Amorce sens (10 $\mu\text{M}$ )	100 nM	0.75 $\mu\text{l}$
Amorce antisens (10 $\mu\text{M}$ )	100 nM	0.75 $\mu\text{l}$
Matrice ADN	(<10 ng/ $\mu\text{l}$ rxn)	3 $\mu\text{l}$

- **ATTENTION** : La préparation du cocktail de réaction est vitale pour la qPCR afin de réduire l'effet des erreurs de pipetages entre les échantillons. Assembler tous les éléments ci-dessus, à l'exception de la matrice d'ADN ou ADNc.
- Le mix réactionnel est préparé pour chaque marqueur (gène de ménage, génome A, génome B, génome D). Les répartir dans une plaque deepwell 0.8 de façon à ce que le marqueur du gène de ménage soit en A1 la moitié du mix et en B1 l'autre moitié du mix ; celui du génome A en C1 et D1 ; en E1 et F1 pour le génome B et en G1 et H1 pour le génome D (voir tableau page suivante)

Deepwell 0,8	Colonne 1
A-B	Amorces du gène de ménage
C-D	Amorces du génome A
E-F	Amorces du génome B
G-H	Amorces du génome C

- Placer la plaque deepwell dans le robot Hamilton Starlet (salle de mix).

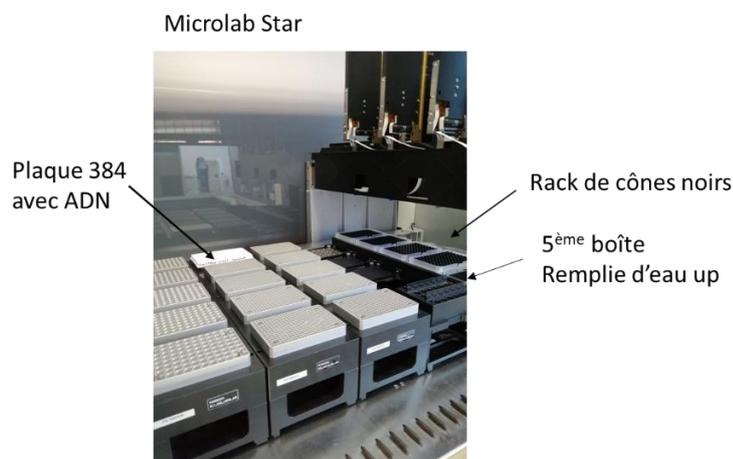
### Etape 3: Configuration de la plaque

NB : Les amorces doivent être utilisées à une concentration mère de 10 mM.

- Dans une plaque 384 puits, ajouter l'ADN avec le robot **Hamilton Starlet** de la salle de Mix (plateforme Gentyane), utilisation pour cela des cônes noirs de 50  $\mu\text{l}$  adaptés au robot (placer 4 boîtes comme sur la photo) Sur le PC :
- Ouvrir l'application microlab star,
- Choisir « Normalisation Inra »,
- Cliquer sur Start
- Lancer le fichier « Norm\_Inra\_ADN\_qPCR-Plaque96 » indiquant au robot les puits donneurs (plaque 96 puits) et les puits receveurs (plaque 384 puits). 3  $\mu\text{L}$  d'ADN vont être déposé dans chaque puits selon le schéma ci-dessous.
- Indiquer au robot que la réception se fait dans une plaque 384 puits.

- Bien vérifier que les plaques soient placées au bon endroit.
- Lancer la répartition des volumes.
- Une fois la répartition terminée, sceller, passer le rouleau sur la plaque puis la centrifuger brièvement (1 min).

qPCR	1-6	7-12	13-18	19-24
A	Plaque X	Plaque X	Plaque X	Plaque X
P	Amorce Gène de ménage	Amorce génome A	Amorce génome B	Amorce génome D



- Dans l'application : suivre les mêmes consignes que précédemment mais ouvrir le fichier « Norm\_Inra\_Mix\_\_qPCR-Plaque96 ». Celui-ci va permettre de répartir les 12  $\mu$ L de mix sur la plaque 384, contenant déjà les ADN.

#### Schéma de la répartition sur la plaque 384 puits

- Couvrir la plaque de réaction avec un film et centrifuger brièvement.

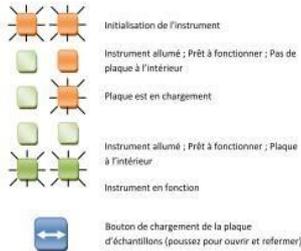
#### **Etape 4: Exécution de la réaction qPCR :**

Sur le Light Cycler 480 :

- Mettre le support de plaque adapté (96 ou 384)

## 2. Mise en marche de l'instrument et de l'ordinateur

- Allumez l'instrument en premier (bouton POWER situé en arrière à droite),
  - Code de lumière de l'instrument :



- Allumez l'ordinateur et l'écran,

- Si possible, sélectionner le mode **rapide** sur l'instrument.
- Programmer le protocole suivant : LG 60SR

Si non préexistant:

Activation enzymatique à 95 °C pendant 20 sec - 3 min (1 cycle)

Dénaturer à 95 °C pendant 1 - 3 sec

Appariement/Elongation/Acquisition à 60 °C moins de 20 sec

Faire 40 cycles des 2 derniers points.

## Etape 5 : Lancer la qPCR avec le logiciel

Username : admin

Mot de passe à rentrer : LightCycler480

- New experiment for template : Appuyer sur le bouton sur le côté
- Donner un nom au programme (pas d'espace dans le nom) exemple « TM58-test-efficaciteQ-RTPCR Spo11.2-Amorces-1-6-initiales-utilisateur-date »  
Ex : Lancer le programme qPCR SR 60
- Mettre plaque de 384 puits avec le code barre à droite
- Start Run
- A la fin de la manip, récupérer la plaque et la placer dans la glace.
- Conservation de la plaque à -20°C.

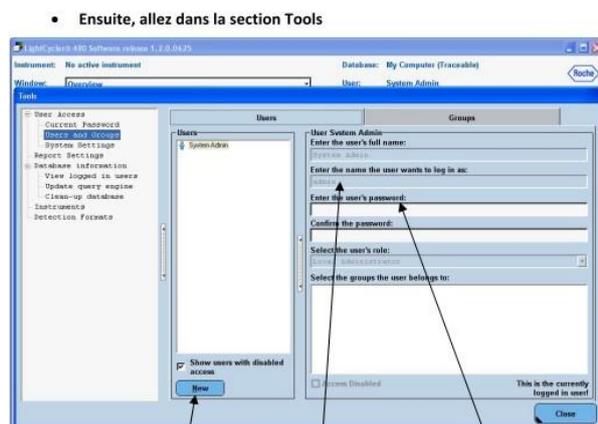
## Etape 6: Analyse des résultats

A la fin de la manip pour voir les résultats :

A gauche icônes bleues

- EXPERIMENT (résumé manip)
- Run Protocol : Data (courbes)
- Subset Editor
  - o New subset : nom des amorces : Ex Q-RTSpo11.2-A1
    - o Clic 1 et Ctrl 2 « Apply » : la case devient bleue foncée
    - o « + » : Nom 2<sup>ème</sup> amorce : Ex A2

Et ainsi toute la plaque de la même manière

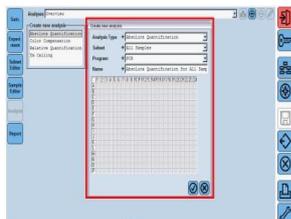


- Sélectionnez **New** et entrez un nom d'utilisateur et un mot de passe.
- Prenez en note votre **User name** ainsi que votre **Password**.

N.B. Vous devez vous assurer d'être dans le compte **admin** de votre base de données pour pouvoir créer de nouveau profil d'utilisateur.

d) Analyse : Quantification absolue

1. Lorsque l'expérience est terminée, sélectionnez le module
2. La fenêtre "Create new analysis" apparaît.



3. Sélectionnez:

i. Analysis Type



ii. Subset



iii. Program



iv. Renommez cette analyse.



Sample Editor : /  
Analysis : 2 para

amplicon)

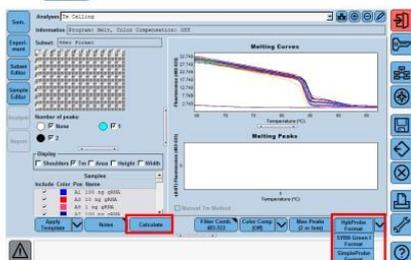
2- L'absorbance quantitative : Abs Quant/ Fit Points

- a) Dans Analysis aller dans Overview puis double clic sur Melt Curve Genotyping Plan de plaque à gauche. Subset B2. V (valider) puis Calculate  
Enlever les concentrations trop basses qui donnent des pics  
1 pic : OK (on vérifie ici l'efficacité des amorces)  
Carré rouge : pas amplifié

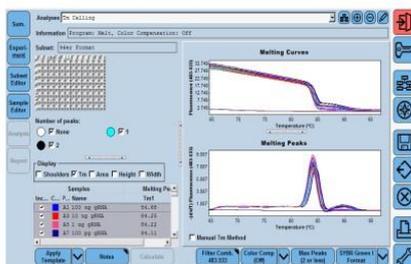
1- L'absorbance  
et la Melt Curve (1 seul

d) Analyse : Courbe de melting (Tm) alias - Tm calling

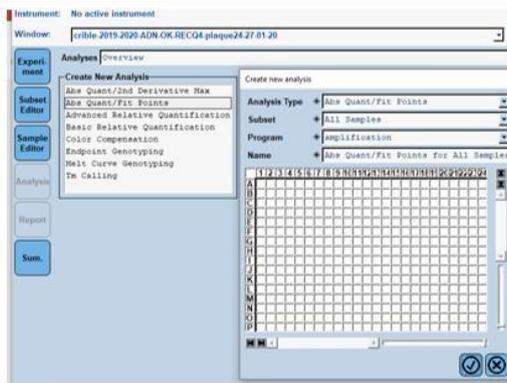
1. Pour générer et vérifier les courbes de melting, créez une nouvelle fenêtre d'analyse en sélectionnant le type d'analyse *Tm Calling*. Lorsque la fenêtre d'analyse apparaît, sélectionnez le format de détection approprié et cliquez sur **Calculate** pour calculer le Tm de chaque courbe individuellement.



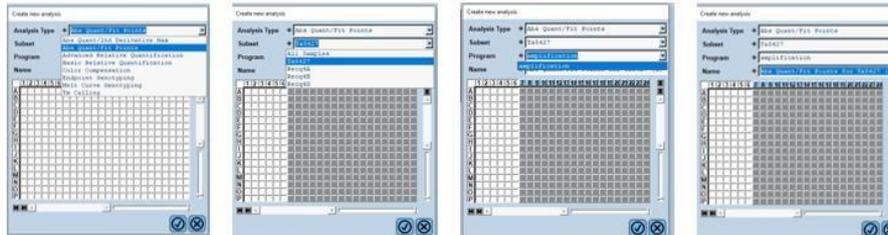
2. Les courbes de melting et la valeur de Tm values seront affichées.



b) Overview: Abs Quant/ Fit Points (à chaque cycle, est-ce qu'on double la quantité de c-DNA?).



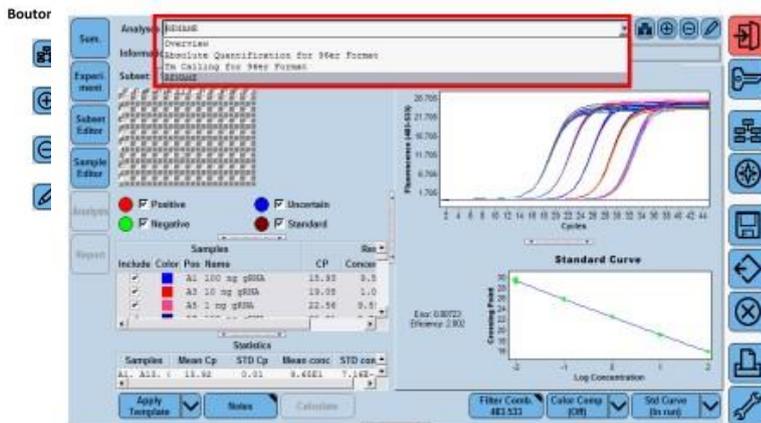
Basé sur la



proportionnalité quantité c-DNA et Absorbance.  
 Enlever toutes les concentrations pas bonnes (trop diluées).  
 Si les répliquats sont très éloignés, les décocher.  
 Il faut une efficacité comprise entre 1.7 et 2 quelle que soit la dilution.  
 Regarder les Cp (24-25 et jusqu'à 27 max) Noter les efficacités et visualiser les courbes.

**d) Analyse : Naviguer à travers les différentes analyses:**

1. Pour naviguer d'une analyse à l'autre, utiliser le menu déroulant.

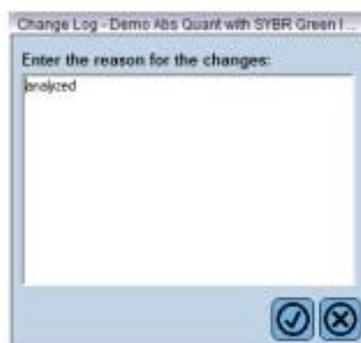


**Etape 7 : Sauvegarder le rapport**

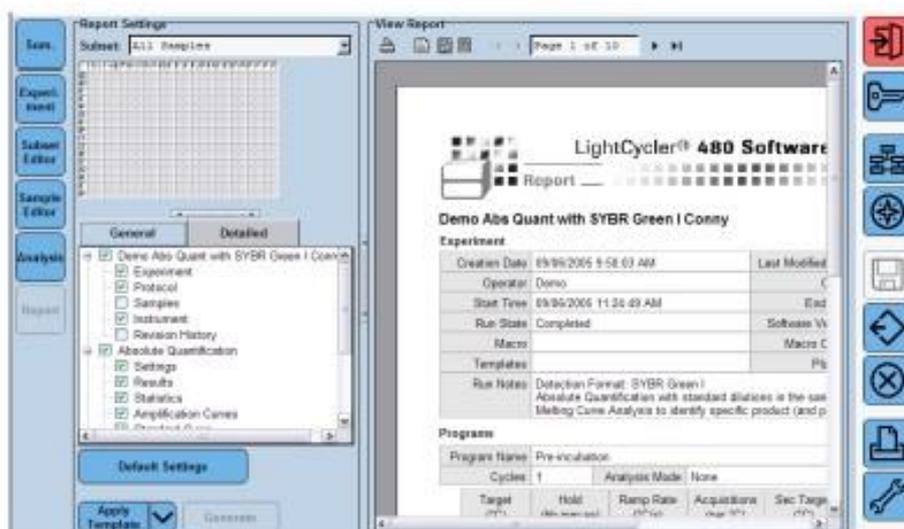
Cocher ce qu'on veut (photo des courbes, tableau avec Cp et concentrations rentrées), fichier pdf proposé, clic pdf, Filename. Enregistrer sur clé USB.

## e) Générer un rapport d'expérience complet

1. Pour générer un rapport d'expérience, les données de l'expérience doivent être enregistrées en utilisant l'icône  du menu d'action globale. Comme il s'agit d'une altération/modification au fichier de données vous devez spécifier une raison pour les changements. À noter qu'il est possible d'appuyer une fois sur la barre d'espace et cela peut suffire comme raison des changements. Ceci peut être fort utile pour les utilisateurs pressés!



2. Après avoir enregistré l'expérience, le bouton  dans le menu Modules est activé.
3. Il est donc possible de sélectionner les différentes informations à inclure dans le rapport en cochant les cases appropriées.
4. Une fois les sélections faites, cliquez sur  pour créer le rapport.



## Etape 8 : Exportation des fichiers de résultats

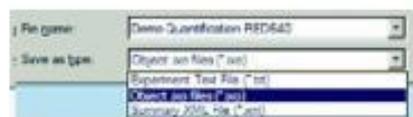
### f) Exportation / Importation de fichiers

Les données d'expérience du logiciel de base du LightCycler® 480 peuvent être exportées du module *Navigator* ou lorsque l'expérience est ouverte dans la fenêtre principale du logiciel. Utilisez une des options suivantes pour exporter un objet provenant du logiciel LightCycler® 480 :

- Sélectionnez-le dans le *Navigator* ou
  - Ouvrez-le dans la fenêtre principale
  - Lorsque vous êtes dans le *Navigator*, cliquez le bouton :
  - Lorsque vous êtes dans la fenêtre principale, cliquez le bouton :
- La fenêtre de dialogue suivante apparaît :
    - Parcourir pour trouver le dossier de destination du fichier à exporter.



- Dans le menu déroulant *Save as type*, sélectionnez le format désiré (\*.ixo, \*.txt, or \*.xml):



- Entrez un nom de fichier et cliquez *Save*.

## **MO-09 : Etapes de pré-amplification des puces d'expression 192 :24**

Prévoir pour 2 puces :

- 1- Constitution du pool d'amorces « pool primers »** Dans un tube de 2 mL mélanger :
- 4  $\mu$ L de chaque primer 100  $\mu$ M (F :Forward et R : Reverse)
  - soit 8 x 24 marqueurs (F + R) qsp 400  $\mu$ L de TE1X EDTA.
  - Conserver dans la glace.

### **2- Préparation de la plaque 96 puits de préamplification**

- a) Dans un tube de 2 mL noté « MIX » réaliser le mélange suivant :

211.2  $\mu$ L de « preamp master mix Fluidigm »

211.2  $\mu$ L de « pool primers »

369.6  $\mu$ L de TE1X EDTA

- b) Dans 2 colonnes 8 puits d'une plaque 96 puits, préparer, aliquoter et bien s'arrêter au 1<sup>er</sup> cran de la pipette multicanaux pour ne pas introduire de bulles, 48  $\mu$ L de MIX réalisé précédemment.
- c) Répartir à l'aide de la pipette multicanaux 3.7  $\mu$ L du Mix dans chaque puit de 2 plques 96 MicroAmp Fast à 0.1 mL.
- d) Mettre un film PCR et centrifuger (pulse), vérifier que le volume au fond du puit soit identique pour tous les puits.

### **3- Préamplification**

- a) Allumer le thermocycler PCR Veriti.
- b) Cliquer sur Browse/New Method plate-forme et sélectionner le programme « Expression\_Preamp » puis start run pour 1H15.

	<b>Hold</b>	<b>14 cycles</b>	<b>TM</b>
<b>Température</b>	95°C	95°C	60°C
<b>Time</b>	10 min	15 seconds	4 min

### **4- Traitement à l'exonucléase**

Cette étape permet de supprimer tous les oligonucléotides encore présents et qui pourraient interférer dans la réaction de qPCR sur le Biomark.

**ATTENTION** : l'exonucléase est fragile. Attendre le dernier moment pour la sortir du congélateur et ne pas la vortexer, homogénéiser avec le doigt doucement.

- a) Dans un tube de 2 mL, réaliser la dilution de l'exonucléase I à 4U/ $\mu$ L à partir du stock à 20U/ $\mu$ L 308  $\mu$ L TE1X EDTA

44 µL de tampon de l'Exonucléase I  
88 µL Exonucléase I (20 U/µL)

- b) Dans 2 colonnes de la plaque de préparartin, mettre 26 µL par puit du mix réalisé précédemment.
- c) Répartir à la multicanaux, 2 µL d'Exonucléase I diluée dans chaque puit des 2 plaques de préamplification. Bien homogénéiser en aspirant-déposant à la pipette.
- d) Mettre un film sur la plaque PCR et centrifuger (pulse) les plaques. Vérifier le volumes final des puits qui doit être de 25 µL par puit.
- e) Sur le thermocycler PCR Verti : Cliquer sur Browse/New Method plate-forme et sélectionner le programme « Exression\_Exo1 » puis start run pour 45 min.

Condition	Digestion	Inactivation	Hold
Température	37°C	80°C	10°C
Durée	30 min	15 min	infini

#### 5- Dilution de la Préamplification

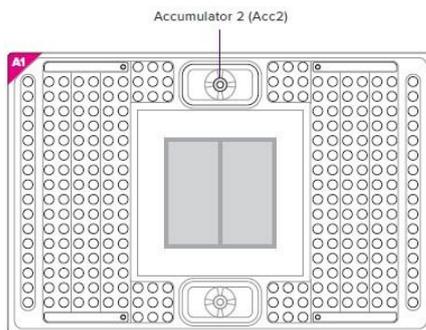
- a) Dans la plaque de préparation, aliquoter sur 2 colonnes 220 µL de TE1X EDTA.
- b) Répartir 18 µL de TE1X EDTA dans les plaques 96, centrifuger (pulse) les plaques et vérifier le volume qui doit être de 25 µL par puit.
- c) Conserver à -20°C ou 4°C.

## MO-10 : Préparation de la puce BIOMARK Fluidigm

**ATTENTION** : Sortir quelques heures avant, le kit « 192 :24 GE DELTAgene Sample and Reagent kit 10 IFCs » stocké à -20°C et les laisser à température ambiante. Les produits doivent être à température ambiante lors de leur utilisation.

### 1- Préparation de la puce

- Vérifier dans le JUNO que le support correspond bien au RX. Sinon, aller dans « tool », « interface plate », « switch ».
- Bien nettoyer le support à l'isopropanol. Faire « load feature ».
- Injecter le « control line fluid » dans l'accumulateur 2 seulement à l'aide de la seringue fournie.



### 2- Préparation du « Sample Pré-Mix »

- Dans un tube de 2 mL distinctement annoté « Sample », réaliser le mélange suivant :

Sample Pré-MIX	192.24
2X TaqMan Gene expression	440 µL
192:24 Delta gene sample reagent PN100-6653	44 µL
20X EvaGreen	44 µL
TE	132 µL
Total	660 µL

- Dans une plaque de préparation 96 puits, aliquoter 40 µL sur 2 colonnes.
- Dans une nouvelle plaque 96 puits distinctement annotée « sample », distribuer dans chaque puit à l'aide d'une pipette multicanaux :

2.5 µL du sample Pre-Mix

1.8 µL de cDNA de la pré-amplification

Filmer la plaque et la conserver dans la glace **à l'abri de la lumière.**

### 3- Préparation du « Primer MIX »

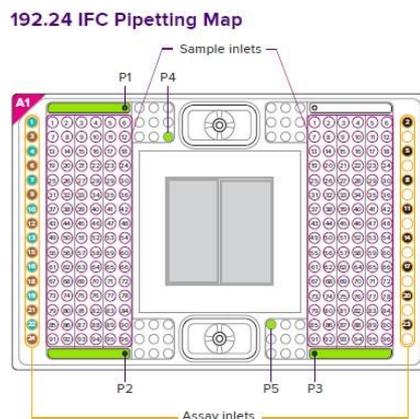
- Dans 24 tubes annotés « Primers Mix » de 100  $\mu$ L, réaliser le mélange suivant
- 12  $\mu$ L de TE1X
  - 1.5  $\mu$ L de mélange primer Reverse/Forward 100  $\mu$ M
  - 15  $\mu$ L de « 2X Assay Loading Reagent » PN 100-5359

### 4- Chargement de la puce

**ATTENTION** : Ne pas faire de bulles : veiller à bien s'arrêter au 1<sup>er</sup> cran de la pipette.

Éliminer les bulles si besoin avec des aiguilles.

- a) Déposer à l'aide d'une pipette, 3 $\mu$ L des 24 « primers Mix » selon le schéma fourni.
- b) Déposer à l'aide de la pipette multicanaux, 3  $\mu$ L des « Samples Pre-Mix » selon le schéma suivant :



- c) Déposer 150  $\mu$ L de « actuation fluid » PN 100-6250 dans la zone P1 de la plaque
- d) Déposer 150  $\mu$ L « Pressure fluid » PN 100-6249 dans les puits P2 et P3 de la plaque.
- e) Déposer 20  $\mu$ L du « pressure fluid » dans les puits P4 et P5 de la plaque.
- f) Retirer le film noir de protection.
- g) Placer la plaque dans le JUNO : « Load Mix 192 :24GE » pour charger les échantillons pendant environ 35 min.
- h) Allumer la lampe du BIOMARK en attendant (25 min de préchauffe) – « BIOMARK Data Collection » puis double clic en bas.

### 5- Lancement du programme RT-PCR

- a) Enlever les débris de la puce à l'aide du scotch.
- b) Cliquer sur « Data collection », puis « Start a New run ». s'assurer que la lampe est bien allumée.
- c) Placer la puce dans le BIOMARK : ATTENTION au côté A1 et code barre vers soi.
- d) Cliquer sur « Load » puis « Next »
- e) Choisir « This is a new Chip run »
- f) Donner un nom au run. Décocher « ajouter un nom au code barre ».
- g) Donner un emplacement sur « Browse Fluidigm experiment doc and setting num de projet » et « Next ».

- h) Sélectionner « Application type gene expression », « Passive reference : ROX », « Assay : single probe », « Robe type FAM-MGB » ou « Robe type EvaGreen », « Next »
- i) Choisir le protocole « GE 192X24 standard v1.pcl. » (60°C) ou « GE 192X24 standard v156.pcl. » (56°C).
- j) Confirmer « auto-exposure » et cliquer sur « Next ».
- k) Vérifier les infos rentrées (modifier la température d'anncaling TM si besoin)
- l) Cliquer sur « Start Run » (environ 60-90 min)

## 6- Analyse des résultats

Utilisation du logiciel « Fluidigm Real-Time PCR Analysis » à télécharger sur le site <https://www.Fluidigm.com/software> « Biomark and EP1 Software ») « Sample Setup » :

- 1- « Mapping-192 sample SBS96 left » pour plate #1 et « Mapping-192 sample SBS96 right pour plate #2.
- 2- Coller les numéros d'échantillons (« S.Name ») et les concentrations (« S. Concentration ») à partir d'une feuille Excel et identifier les « blancs ». **Bien sélectionner** « Source 96 well plate#1 ou #2)

« Detector Setup » :

- 1- « News » puis « Assays Detector Inlets » et copier les marqueurs (« EvaGreen Name) à partir d'une feuille Excel.
- 2- « Analysis Views » : « Analyse »