

Anomalies du développement du pollen

Après avoir caractérisé le développement normal du pollen chez nos deux espèces modèles, nous nous sommes intéressés aux anomalies qui pouvaient intervenir lors de ce développement et produire des structures reproductrices non conformes. Dans un premier temps, nous avons recherché et identifié les anomalies et les structures qui en résultent. Puis dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à un phénomène particulier, la dégénérescence des cellules reproductrices dont nous avons évalué le taux en fonction des stades ontogéniques. Enfin, nous nous sommes attachés à caractériser et à quantifier les produits post-méiotiques anormaux qui sont à l'origine de grains de pollen non conformes.

1. Identification des structures anormales et des anomalies

1.1. Matériels et Méthodes

Cette étude a été réalisée en utilisant les sections préparées pour l'étude de l'ontogénèse. Les sections ont été analysées en vue d'identifier les structures anormales.

1.2. Résultats

Identification des structures anormales et des anomalies chez E. elaterium

L'ensemble des observations réalisées sur les sections de boutons floraux d'*E. elaterium* nous ont permis de mettre en évidence que l'ontogénèse du pollen s'accompagnait d'un certain nombre d'anomalies développementales. Celles-ci se manifestaient par la formation de structures anormales dont les plus fréquentes étaient : (i) des cellules dégénérantes, (ii) des produits post-méiotiques anormaux, (iii) des microspores et des grains de pollen de plus grande taille et multinucléés et (iv) des grains de pollen vides.

Des cellules dégénérantes ont été observées à tous les stades ontogéniques. Contrairement aux cellules normales qui ont un cytoplasme clair, diffus et parsemé de petites vacuoles, les cellules dégénérantes présentaient un cytoplasme beaucoup plus dense, qui se rétractait ou encore se résorbait (Figure 17A, B et F).

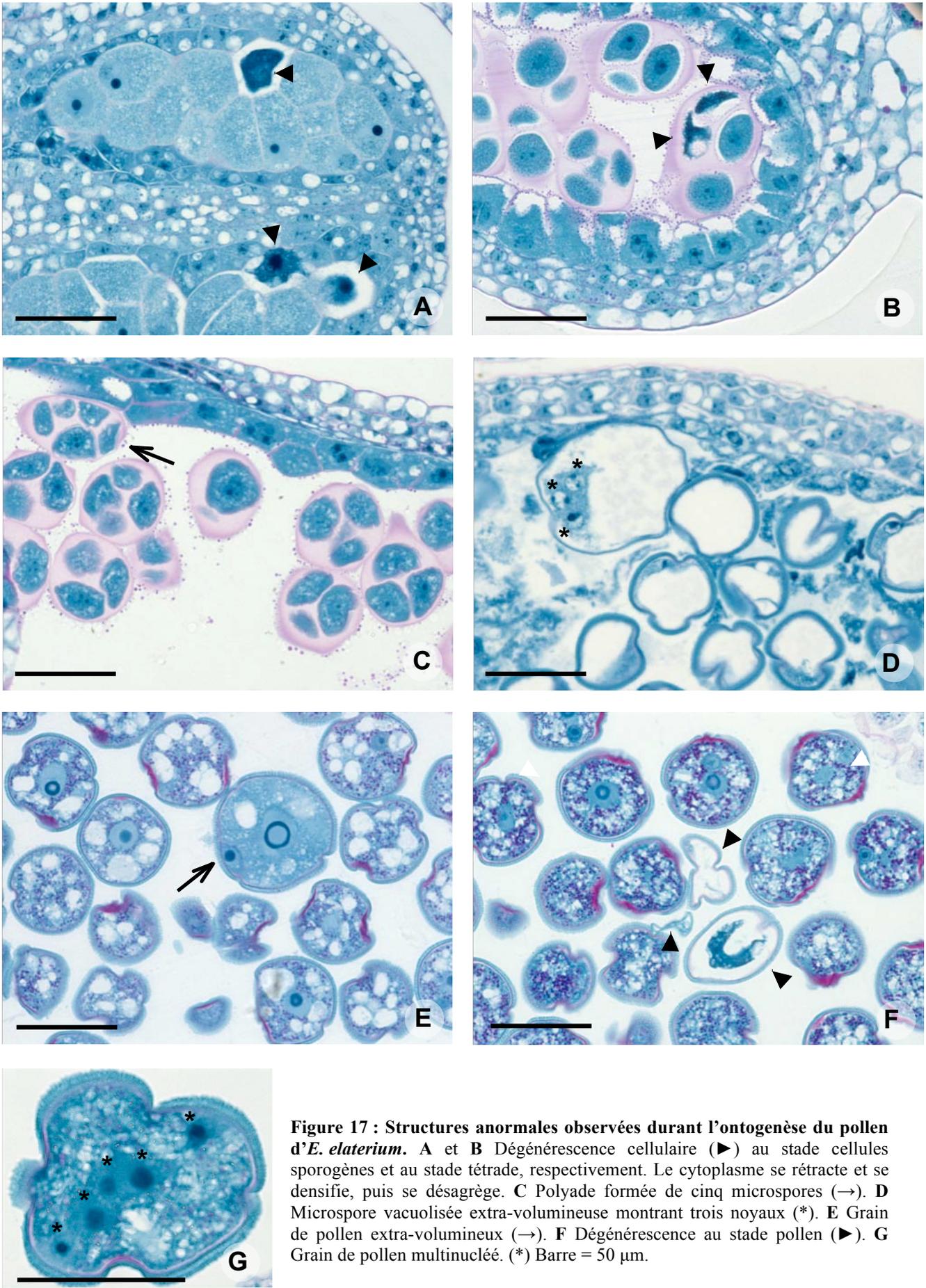


Figure 17 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium*. A et B Dégénérescence cellulaire (▶) au stade cellules sporogènes et au stade tétrade, respectivement. Le cytoplasme se rétracte et se densifie, puis se désagrège. C Polyade formée de cinq microspores (→). D Microspore vacuolisée extra-volumineuse montrant trois noyaux (*). E Grain de pollen extra-volumineux (→). F Dégénérescence au stade pollen (▶). G Grain de pollen multinucléé. (*) Barre = 50 µm.

Au stade tétrade, nous avons noté la présence de produits post-méiotiques anormaux. En effet, certains de ces produits n'étaient pas composés de quatre microspores regroupées dans une paroi de callose mais de cinq microspores constituant une polyade (Figure 17C).

Des structures dont la taille était largement supérieure à la normale ont été observées au stade microspore libre et au stade jeune pollen. Au stade microspore vacuolisée (Figure 17D), les structures volumineuses montraient un cytoplasme plurinucléé. Au stade pollen jeune, nous avons observé deux types d'organisation en fonction du nombre de noyaux et du nombre de cellules : (i) des grains de pollen bicellulaires avec des noyaux plus volumineux en comparaison avec les noyaux des grains de pollen normaux (Figure 17E) et (ii) des grains de pollen pluricellularisés (Figure 17G). Dans ces deux cas, les structures présentaient un épaissement prononcé du système pariétal.

A l'opposé de ces pollens volumineux, nous avons observé des grains de pollen vides, c'est-à-dire sans contenu cellulaire et constitués uniquement de leur sporoderme (Figure 17F).

Identification des structures anormales et des anomalies chez C. melo

L'examen des sections de boutons floraux de *C. melo* a révélé que son ontogenèse pollinique était également accompagnée d'anomalies. Comme chez *E. elaterium*, des cellules dégénérantes ont été observées à différents stades (Figure 18A, B et D). De plus, au stade pollen, différents types d'anomalies ont été observées, des grains de pollen à accumulation très importante d'amidon et des grains de pollen formés de deux cellules de même taille (Figure 18C).

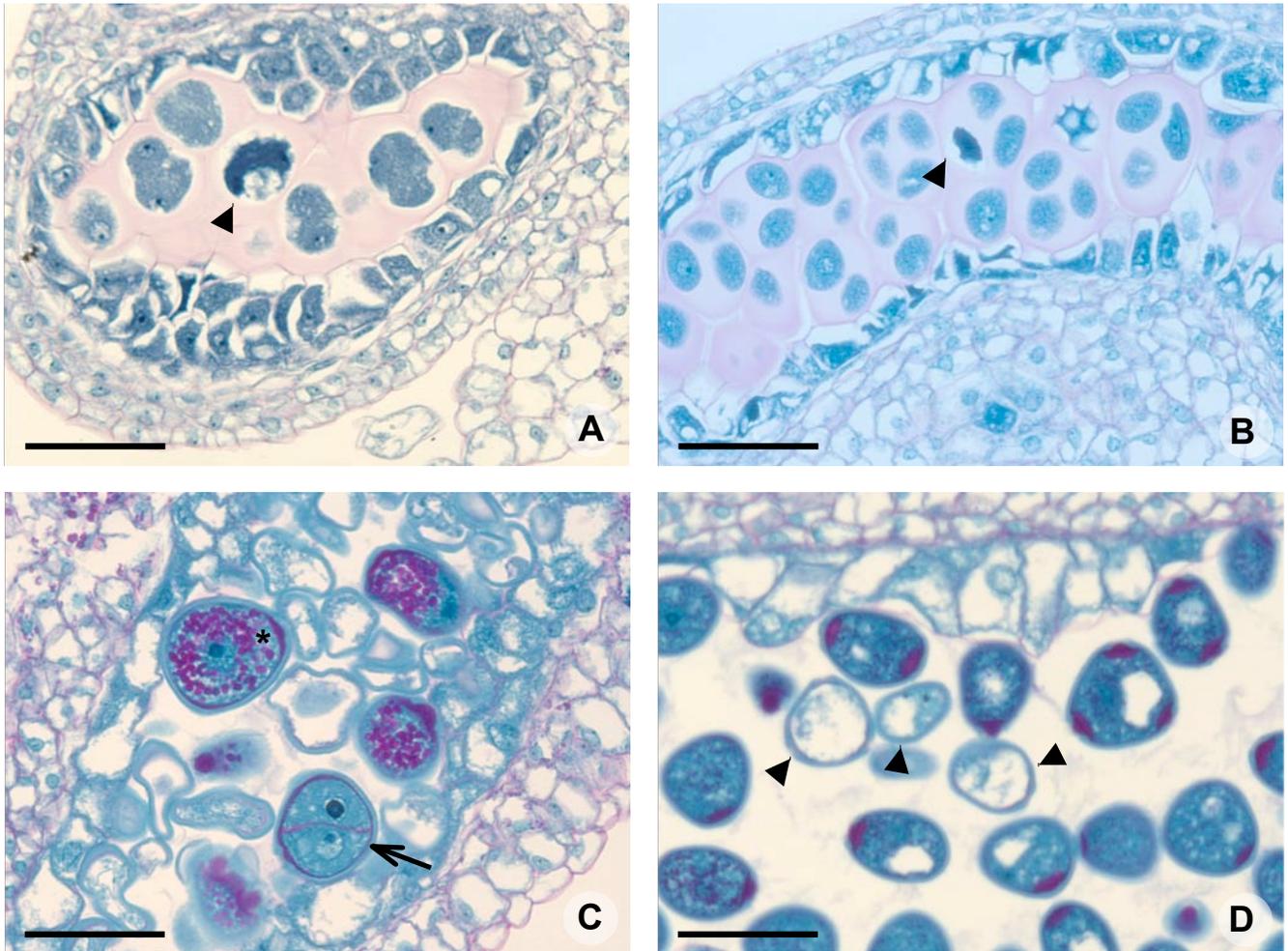


Figure 18 : Structures anormales observées durant l'ontogenèse du pollen de *C. melo*. A et B Cellules dégénérantes (▸) à la fin de la deuxième division méiotique des CMM et au stade tétrade, respectivement. C Grains de pollen à accumulation anormale d'amidon (*) et grain de pollen ayant subi une division pollinique symétrique (→). D Grains de pollen dégénérants (▸). Barre = 50 μ m.

1.3.Discussion

Ce travail a permis de mettre en évidence la présence d'anomalies lors de l'ontogenèse du pollen chez *E. elaterium* et *C. melo*, et d'identifier les structures non conformes qui en résultaient. Les anomalies étaient de deux types : (i) létales comme les cellules dégénérantes et les grains de pollen vides et (ii) modificatrices avec les produits post-méiotiques différents des tétrades et les microspores et les grains de pollen plus volumineux que la normale.

L'anomalie la plus fréquemment observée était la dégénérescence des cellules reproductrices mâles. Les cellules dégénérantes étaient si nombreuses que nous avons choisi de les

étudier de manière plus détaillée, en les caractérisant morphologiquement et en évaluant leur proportion. Cette étude approfondie fait l'objet du prochain point.

Ces travaux ont également montré que, durant l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium*, des anomalies survenaient lors de la méiose des CMM conduisant à la formation de produits post-méiotiques non conformes, tels des polyades de cinq microspores. Cependant, la méthode utilisée ici, c'est-à-dire l'observation de sections de boutons floraux ne permettait pas de visualiser les produits post-méiotiques dans leur totalité mais seulement dans un plan donné. En effet, pour la majorité d'entre eux, la section ne permettait d'observer que trois microspores des quatre présentes normalement. De ce fait, l'identification ou l'évaluation de produits post-méiotiques anormaux n'était pas exhaustive. Nous avons donc choisi d'étudier plus soigneusement les produits post-méiotiques avec une méthode qui permet de garder et d'observer ces produits dans leur totalité. Ce travail sera décrit dans la partie III-3.

La production de pollen chez *E. elaterium* s'est révélée être accompagnée d'erreurs comme le montre la présence de grains de pollen de grande taille et/ou extranucléés. Leur plus grand diamètre révèle que ces grains possèdent une plus grande quantité d'ADN. En effet, le volume de la cellule, et donc son diamètre, augmentent avec l'augmentation de la quantité d'ADN nucléaire (Bretagnolle and Thompson, 1995). Ces grains de pollen peuvent être diploïdes, tétraploïdes (jumbo pollen), aneuploïdes ou plurinucléés. La caractérisation du niveau de ploïdie basée sur la morphologie aurait nécessité la mesure du diamètre d'un grand nombre de grains, pour discriminer les haploïdes, diploïdes ou tétraploïdes (Tondini *et al.*, 1993). Une mesure plus précise du niveau de ploïdie ainsi que de la fréquence d'apparition des différents types aurait pu être faite par cytométrie en flux (Bretagnolle and Thompson, 1995). Cependant, ces deux méthodes demandant une importante calibration, n'ont pu être mises en place durant cette étude. Ces grains de pollen anormaux pourraient résulter de dysfonctionnements méiotiques conduisant à une division non réductrice. Ce processus, appelé restitution nucléaire méiotique, a été décrit par Ramanna (1979) comme : « la formation d'un seul noyau avec un nombre de chromosomes non réduit, dû à l'échec de la première ou de la seconde division méiotique » (cité par Bretagnolle and Thompson, 1995). Lors de la restitution de la première division, celle-ci se déroule comme une mitose, sans qu'il y ait appariement et séparation des chromosomes homologues. La seconde division, par contre, se déroule normalement. En revanche, lors de la restitution de la deuxième division, la première division entraîne normalement la séparation des chromosomes homologues, mais les chromatides sœurs ne se séparent pas lors de la deuxième division. Ces restitutions peuvent

résulter d'un positionnement anormal des fuseaux (parallèles, fusionnés ou tripolaires), d'une cytokinèse anormale ou absente à la fin de la deuxième division, ou d'une cytokinèse prématurée à la fin de la première division méiotique, conduisant à la formation de grains de pollen diploïdes ou tétraploïdes. Ces grains de pollen non conformes génétiquement sont néanmoins viables, capables de germer et d'assurer la fécondation et donc la production de zygote non conformes. En effet, la production de gamètes diploïdes est la source principale d'autopolyploïdie (Bretagnolle and Thompson, 1995).

Chez *C. melo*, aucun produit post-méiotique anormal, ni microspores ni grains de pollen extra-volumineux n'ont été observés durant nos investigations. Ceci suggère qu'il y a, chez cette espèce, peu d'erreurs lors de la méiose des CMM. En revanche, l'observation de grains de pollen dont les deux cellules sont de même volume suggère qu'il peut y avoir des erreurs lors de la division pollinique. En effet, cette mitose habituellement asymétrique produit la cellule végétative de grande taille et la cellule génératrice très réduite. Dans le cas de ce type de grain de pollen, la cytokinèse a été symétrique. Ce type de division pollinique a été observé chez des mutants *sidecar* d'*Arabidopsis thaliana* (Chen and McCormick, 1996).

2. Caractérisation du phénomène de dégénérescence lors de la microsporogénèse¹

2.1. Matériels et Méthodes

a. Observation des échantillons

Cette étude a été conduite sur les sections préparées pour la description de l'ontogénèse. Pour chaque stade et espèce végétale, une section entière a été étudiée. Toutes les cellules dans les sacs polliniques ont été analysées à la seule condition que les tissus sporophytiques entourant les sacs polliniques soient normaux (présence de toutes les couches cellulaires, absence de dégénérescences).

¹ Cette partie a fait l'objet d'un article soumis.

b.Analyses statistiques

Pour chaque espèce, la distribution des proportions de dégénérescence en fonction des stades ontogéniques a été testée avec un test de Kruskal-Wallis (KW). Si ce dernier révélait une différence significative, les proportions de dégénérescences par stade étaient ensuite comparées deux à deux avec un test post-hoc de Wilcoxon intégrant la correction de Holm. L'ensemble de ces tests a été fait sous le logiciel R (R Core Team).

2.2.Résultats

Des dégénérescences cellulaires ont été observées à tous les stades de l'ontogenèse d'*E. elaterium* (Figure 19) et de *C. melo* (Figure 22). Elles se caractérisent au niveau du cytoplasme par sa forte condensation comme le montre sa coloration plus intense (Figure 19A) et sa rétractation entraînant un détachement de la paroi (Figure 19B et C). Le noyau se condense également et devient pycnotique, le nucléole n'est plus visible (Figure 19A). Par la suite, le cytoplasme se fragmente (Figure 19F). Dans les stades les plus avancés, où le sporoderme est déjà mis en place, la dégénérescence totale du contenu cellulaire conduit à la formation de produits constitués uniquement d'exine (Figure 19H). Ces corps repliés persistent sous cette forme dans l'anthère jusqu'à l'anthèse.

Chez *E. elaterium*, ces dégénérescences n'ont pas été observées en même proportion à tous les stades (KW, $H=29,42$, $df=5$, $p=1,9.10^{-5}$; Figure 20). Au stade cellules sporogènes (Figure 19A), 32,4% des cellules étaient dégénérescentes (Figure 20). Cette proportion s'accompagnait d'une importante variabilité car deux boutons floraux étaient quasiment exempts de dégénérescence. Les CMM (Figure 19B et C) montraient 19,2% de dégénérescence, avec encore une très grande variabilité (Figure 20).

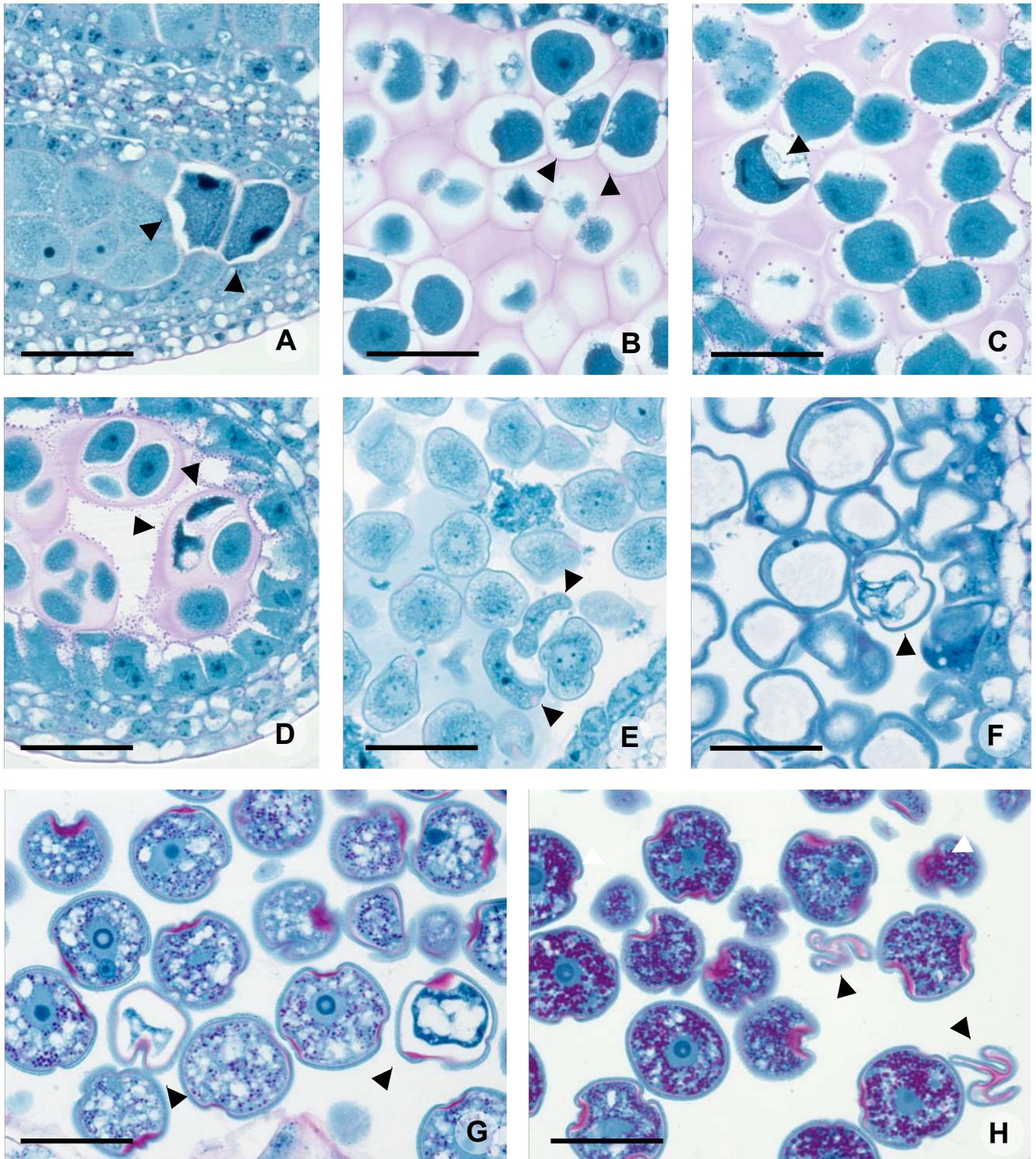


Figure 19 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez *E. elaterium*. A – C Dégénérescences (▶) durant le développement préméiotique et méiotique. A Cellules dégénérantes au stade cellules sporogènes montrant un cytoplasme condensé. B et C Dégénérescence des CMM et lors première division méiotique présentant une rétraction du cytoplasme. D – H Dégénérescences (▶) durant le développement post-méiotique. D Cellules dégénérantes lors du stade tétrade. E Microspore libre en dégénérescence sous forme de croissant. F Microspore vacuolisée dégénérante montrant la fragmentation du cytoplasme. G et H Deux états de dégénérescence au stade pollen, la rétraction du cytoplasme et la dégénérescence complète du contenu cellulaire conduisant à la formation de grains de pollen vides. Barre = 50 μm.

Chez *C. melo*, en revanche, très peu de dégénérescences ont été observées, et du fait du faible nombre de boutons floraux analysés par stade, aucune différence n'a été mise en évidence entre les stades (KW, $H=9,649$, $df=5$, $p=0,085$). Les cellules sporogènes étaient exemptes de dégénérescences (Figure 22A et Figure 21). Les stades tétrade, microspores libres et microspores vacuolisées n'ont montré que de rares cellules dégénérées, respectivement 0,67%, 0,34% et 0,18% (Figure 22C, D, E et Figure 21). Seuls les stades CMM et pollen montraient de nombreuses cellules dégénérées. La proportion de CMM dégénérées atteignait 9,31% mais avec une très forte variabilité (Figure 22B et Figure 21). En effet, 10 boutons sur 18 étaient complètement exempts de dégénérescence alors qu'un bouton montrait une très forte dégénérescence qui touchait 66% de ses cellules (Figure 21). Au stade pollen, une moyenne de 3,77% de cellules dégénérées a été enregistrée, mais les dégénérescences variaient entre 0% et 32,3% d'un bouton à l'autre (Figure 22F et Figure 21).

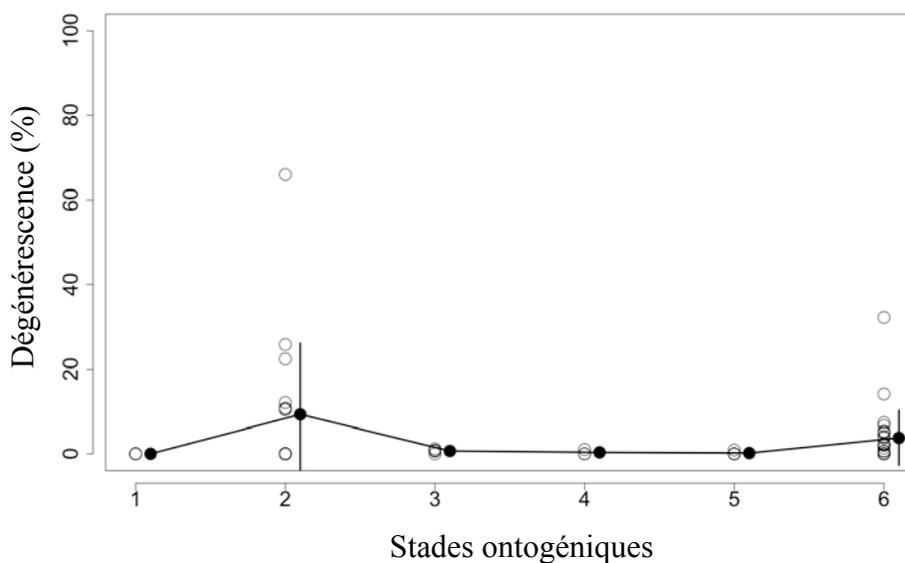


Figure 21 : Proportions de cellules dégénérées en fonction du stade ontogénique chez *C. melo*. ● = proportion moyenne de cellules dégénérées par stade, ○ = proportion de cellules dégénérées par bouton analysé, les barres représentent l'écart-type, n = nombre de boutons floraux analysés par stade. **1-2** Développement pré-méiotique et méiotique. **1** Stade cellules sporogènes, n = 4. **2** Stade CMM, n = 18. **3-6** Développement post-méiotique. **3** Stade tétrade, n = 5. **4** Stade microspores libres, n = 3. **5** Stade microspores vacuolisées, n = 5. **6** Stade pollen, n = 27.

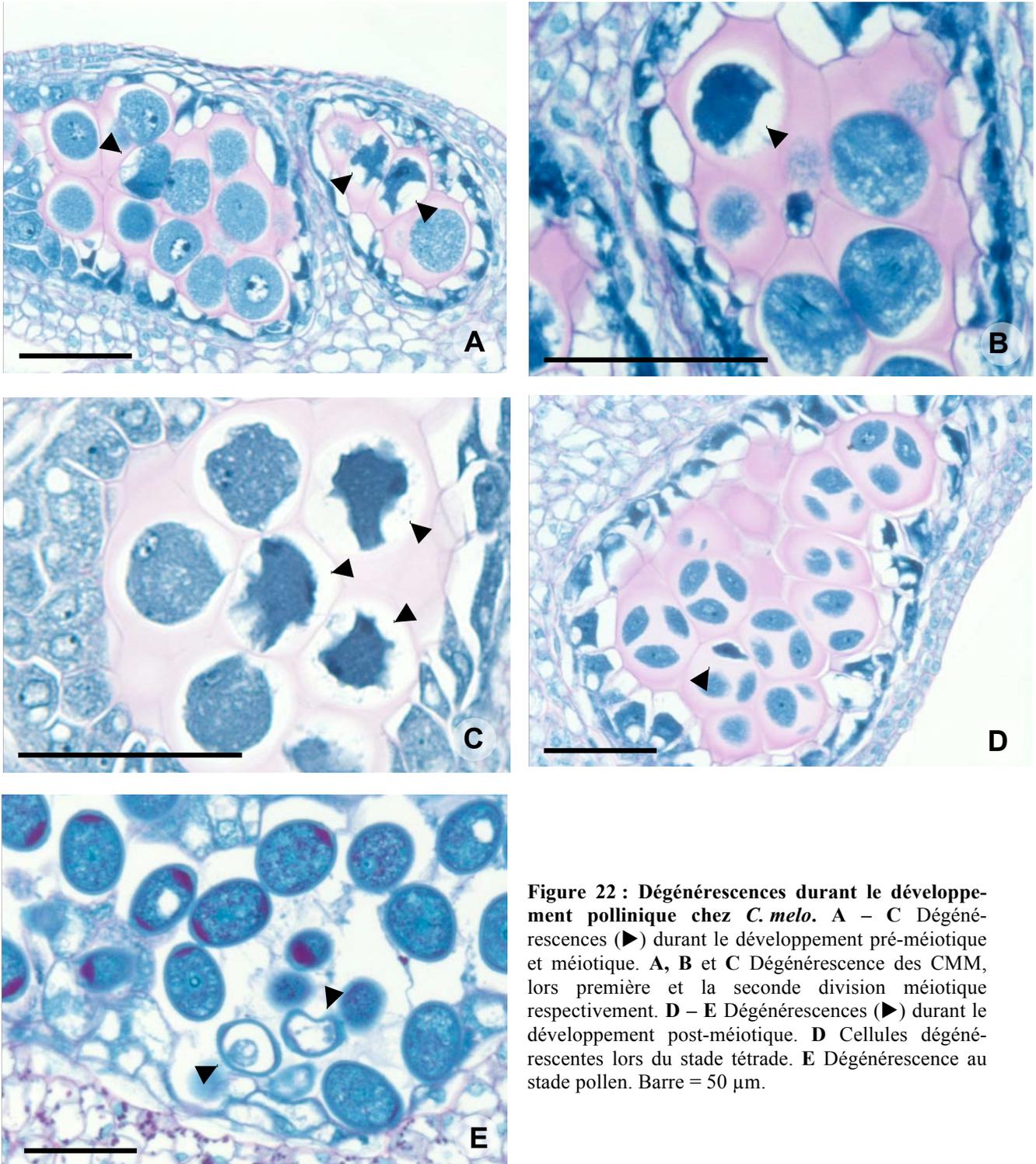


Figure 22 : Dégénérescences durant le développement pollinique chez *C. melo*. A – C Dégénérescences (▶) durant le développement pré-méiotique et méiotique. A, B et C Dégénérescence des CMM, lors première et la seconde division méiotique respectivement. D – E Dégénérescences (▶) durant le développement post-méiotique. D Cellules dégénérantes lors du stade tétrade. E Dégénérescence au stade pollen. Barre = 50 μ m.

2.3.Discussion

Nos résultats indiquent que des dégénérescences cellulaires sont susceptibles d'avoir lieu chez une espèce diploïde sauvage, *E. elaterium* et chez une espèce diploïde cultivée, *C. melo*. Les caractéristiques morphologiques des cellules dégénérantes, c'est-à-dire la pycnose du

noyau, la condensation du cytoplasme puis l'élimination complète de cellules, décrites pour d'autres cellules (Wu and Cheung, 2000) indiquent que ces dégénérescences ont lieu par mort cellulaire programmée (MCP). Il s'agit d'un processus actif de mort cellulaire permettant l'élimination sélective de cellules (Ellis *et al.*, 1991). La MCP a été grandement étudiée chez les animaux puis chez les végétaux (Greenberg, 1996 ; Pennell and Lamb, 1997). Elle intervient dans le développement des plantes notamment lors de la genèse des vaisseaux de xylème (Beers, 1997), dans les phénomènes de défense (Jones, 2001) et dans la reproduction (Wu and Cheung, 2000). En effet, c'est par ce processus que trois des quatre mégasporocytes sont éliminées ou que les anthères s'ouvrent. En ce qui concerne l'ontogénèse du pollen, la dégradation totale du tapis par MCP est maintenant bien connue (Wu and Cheung, 2000). Quelques études relatent des événements de MCP chez les cellules reproductrices mâles, comme la MCP des microspores chez *Actinidia deliciosa* qui induit une stérilité mâle (Coimbra *et al.*, 2004).

Chez nos modèles, ces dégénérescences cellulaires n'ont pas été observées à un stade donné mais tout au long du développement pollinique. En revanche, elles n'apparaissent pas dans les mêmes proportions selon le stade observé.

La première partie du développement, c'est-à-dire la phase préméiotique et la phase méiotique présente de fortes proportions de dégénérescence. Dès le stade cellules sporogènes, environ un tiers de ces cellules dégénèrent chez *E. elaterium* alors qu'aucun mécanisme cellulaire susceptible d'introduire des anomalies n'a lieu. D'après nos observations chez *C. melo*, en revanche, les cellules sporogènes ne subissent aucune dégénérescence. A notre connaissance, aucune étude n'a montré des dégénérescences cellulaires à ce stade. L'importante proportion d'élimination cellulaire chez *E. elaterium* reflète probablement un ajustement contrôlé au niveau développemental des populations de cellules en fonction des ressources pouvant être allouées à la fonction mâle. Selon la théorie de l'allocation des ressources pour la reproduction sexuée, les plantes, comme les autres organismes, investissent énormément de ressources pour assurer leur succès reproductif. L'investissement de ces ressources est modulé selon les capacités biosynthétiques et les allocations de ressources pour les autres fonctions (Campbell, 2000 ; de Jong and Klinkhamer, 2005).

Lors du stade CMM, les dégénérescences sont encore importantes (près de 20% pour *E. elaterium* et près de 10% pour *C. melo*). Il a été montré chez d'autres espèces que les CMM ou méiocytes étaient susceptibles de dégénérer par MCP. Chez des croisements interspécifiques du genre *Bracharia*, la mort programmée des méiocytes entraînant la stérilité

des fleurs a été attribuée à l'état polyploïde du génome (Fuzinatto *et al.*, 2007). La mort précoce de cellules durant la méiose a également été rapportée chez un mutant mâle-stérile d'*A. thaliana* dont le gène nommé MALE MEIOCYTE DEATH1 a été isolé. Ce dernier code pour une protéine nécessaire à la méiose (Yang *et al.*, 2003). Chez nos modèles, les dégénérescences observées à ce stade peuvent résulter de l'élimination des cellules incapables de déclencher ou de réaliser correctement la méiose, mais elles peuvent également résulter d'un ajustement cellulaire.

Comparée à la première partie du développement pollinique, lors de la seconde partie, c'est-à-dire lors du développement post-méiotique, les dégénérescences ont lieu en faibles proportions et interviennent de manière comparable chez nos deux modèles. Durant cette phase, nous pouvons supposer que les rares dégénérescences correspondent plutôt à un processus d'élimination de cellules incapables de fonctionner correctement (Pennell and Lamb, 1997).

Au stade tétrade, chez *E. elaterium*, bien que la majorité des boutons floraux montrent des dégénérescences limitées comme chez *C. melo*, certains boutons exhibent des proportions notables de dégénérescences, probablement dues à des défaillances développementales. En effet, une multitude de mécanismes complexes interviennent durant ce stade, notamment durant la cytokinèse post-méiotique et durant la dissolution de la callose et peuvent entraîner des erreurs (Bathia and Malik, 1996 ; Boavida *et al.*, 2005). Il serait nécessaire d'analyser un plus grand nombre de boutons floraux de *C. melo* pour pouvoir conclure avec certitude que ce stade est exempt de dégénérescence ou au contraire qu'il en présente en mêmes proportions que chez *E. elaterium*.

Les microspores libres et vacuolisées montrent des dégénérescences très réduites, suggérant que les microspores défectueuses ont été éliminées dès le stade tétrade. En revanche, les proportions de dégénérescences enregistrées durant le processus de différenciation du pollen sont plus élevées (2,5% et 3,8% pour *E. elaterium* et *C. melo* respectivement). A ce stade a lieu la division pollinique ou mitose de la microspore qui peut entraîner des erreurs et créer des cellules aberrantes. La dégénérescence de ces cellules induit la désintégration du contenu cellulaire uniquement, mais l'exine persiste, conduisant à la formation de grains de pollen vides. Ces anomalies du pollen ont déjà été décrites chez des mutants et des espèces à niveau de ploïdie altéré (Piven *et al.*, 2001), incluant un membre de la famille des Cucurbitacées, un *Cucumis* allotriploïde (Guo *et al.*, 2004). Dans ces cas, ces anomalies ont été attribuées aux altérations génétiques et aux stress environnementaux. Chez les espèces à niveau de ploïdie

conforme qui ont été étudiées pour l'ontogenèse de leur pollen, il a été montré que ce processus produisait aussi des grains structurellement et fonctionnellement aberrants. Par exemple, chez *Passiflora edmundoi*, 2,19% des grains de pollen sont avortés à l'anthèse (Souza *et al.*, 2003), ce qui est en accord avec nos résultats (pour le même stade). Néanmoins, certaines espèces montraient des anomalies polliniques beaucoup plus élevées (> 40%) comme chez *Agave tequilana* (Ruvalcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002).

Comme ces grains de pollen avortés persistent dans l'anthère, ils participent à la proportion de grains de pollen non viables observés à l'anthèse chez plusieurs espèces (Nepi *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2004 ; Erickson and Markhart, 2002) et sont susceptibles d'être présentés. Ils peuvent alors être récoltés par des pollinisateurs et déposés sur des stigmates conspécifiques (Mayer and Gottsberger, 2000), mais sont toutefois incapables de permettre la fécondation. De plus, ils n'assurent pas leur fonction de récompense florale pour les pollinisateurs car le cytoplasme riche en nutriments est absent et l'exine riche en hydrocarbures résiste à la digestion (Roulson and Cane, 2000).

Nos résultats montrent que des proportions notables de cellules mâles dégénérantes ont été observées dans des anthères apparemment saines et produisant aussi des cellules normales. Ces observations suggèrent que le phénomène de dégénérescences est cellule-spécifique. De plus, la forte variabilité observée parmi les boutons floraux à un même stade, suggère que la dégénérescence semble ne pas être régulée au niveau de l'espèce, mais au niveau de la fleur. A notre connaissance, il n'y a pas d'information dans la littérature sur la variabilité de la dégénérescence. Chez les espèces étudiées, la dégénérescence a été évaluée sans considération du bouton floral individuel (Souza *et al.*, 2003 ; Ruvalcaba-Ruiz and Rodriguez-Garay, 2002 ; Fuzinatto *et al.*, 2007).

En conclusion, nos résultats montrent clairement qu'une importante dégénérescence cellulaire a lieu, *via* la MCP lors de la différenciation des cellules mâles chez *E. elaterium* et *C. melo* et qu'elle a lieu à différents stades de l'ontogenèse et non pas uniquement lors de la méiose. Cette étude a permis de montrer que le processus de MCP n'intervenait pas de la même façon chez les deux espèces, suggérant que chez *E. elaterium* qui est une espèce sauvage et dont les ressources sont limitées, un important réajustement cellulaire est nécessaire pour mener à bien le développement pollinique alors que chez *C. melo* dont le génome a été amélioré et qui est cultivé dans un milieu riche en ressources, ce réajustement n'est pas nécessaire. Enfin, cette étude a montré que les dégénérescences intervenant lors de la différenciation du pollen

conduisaient à la production de taux notables de grains de pollen vides qui pourront participer à l'interaction plante-abeille.

Bien que la MCP soit un phénomène très présent lors de l'ontogenèse du pollen chez ces deux espèces pour éliminer les cellules défectueuses, elle ne permet cependant pas l'élimination de toutes les cellules résultant de méioses anormales.

3. Anomalies post-méiotiques chez *E. elaterium*

3.1. Matériels et Méthodes

a. Matériel végétal

Des graines d'*E. elaterium* ont été obtenues à partir de fruits matures récoltés dans une population cultivée à l'INRA d'Avignon. Après récolte, les graines ont été lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le mucilage qui les entoure, puis elles ont été séchées à l'étuve à 40°C. Pour faciliter la germination des graines, les téguments ont été partiellement enlevés à l'aide d'un scalpel. Les graines ainsi scarifiées ont été mises à germer sur papier-filtre humide en boîte de Pétri à 26°C. Après germination, les jeunes plantules ont été repiquées en pots et irriguées deux fois par semaine. Au stade deux feuilles, elles ont été transplantées dans un tunnel insect-proof à l'INRA d'Avignon.

b. Récolte, préparation et observation des échantillons

Dans l'étude précédente, nous avons montré que le stade tétrade qui nous intéresse dans cette étude se déroulait dans les boutons floraux mâles de 3 à 5 mm de diamètre. Ainsi, des boutons floraux mâles de ce diamètre et provenant tous de plantes différentes ont été récoltés en mai 2009. Immédiatement après récolte, ces boutons ont été disséqués pour éliminer le péricarpe. Ils ont été fixés dans un mélange éthanol-acide acétique (3/1, v/v) une nuit à température ambiante, puis stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

Des lames temporaires ont été préparées en écrasant les anthères d'un bouton floral dans une goutte de carmin acétique à 1%. Les observations ont été faites avec un microscope (Leica DMR). Les coupes ont été photographiées avec une caméra digitale (Leica DFC 300 FX).

c. Fréquence des différents types de produits post-méiotiques et leurs combinaisons nucléaires

Dix-huit boutons floraux ont été préparés, chacun constituant une répétition. Pour chaque bouton floral, au moins 319 produits post-méiotiques ont été analysés. Pour certains produits post-méiotiques anormaux, le nombre de noyaux par cellule a été déterminé.

3.2. Résultats

L'observation des écrasements de boutons floraux au stade tétrade a montré en majorité des produits post-méiotiques conformes, c'est-à-dire quatre microspores maintenues ensemble par une épaisse paroi de callose (Figure 23A). Cependant, d'autres produits ont été observés et se sont révélés être non conformes. Des monades sous forme d'une seule microspore très volumineuse entourée de callose (Figure 23B, C et D) étaient présentes. Nous avons également observé des diades formées de deux microspores. Deux types de diades ont été identifiées : (i) des diades avec deux microspores de tailles équivalentes (Figure 23E), et (ii) des diades avec une microspore volumineuse et une microspore de plus petite taille (Figure 23F et G). Des triades composées d'une importante microspore et de deux microspores de taille normale (Figure 23H et I) ont été également observées. Parmi ces produits post-méiotiques, des polyades étaient également présentes. Celles-ci étaient composées de cinq à six microspores, dont quatre de taille égale et les surnuméraires de plus petit volume (Figure 23J).

Bien que les tétrades conformes étaient grandement majoritaires (95,1% ; Tableau 2), les monades, diades, triades et polyades étaient présentes en proportions non négligeables (respectivement 1%, 0,6%, 2% et 1,3% ; Tableau 2).

Répétitions	Monades	Diades	Triades	Tétrades	Polyades
n = 18	87	68	179	8232	95
% ± ET	0,98±1,19	0,61±0,72	2,03±0,96	95,09±2,26	1,29±1,05

Tableau 2 : Proportion des différents types de produits post-méiotiques observés chez *E. elaterium*. ET = écart-type.

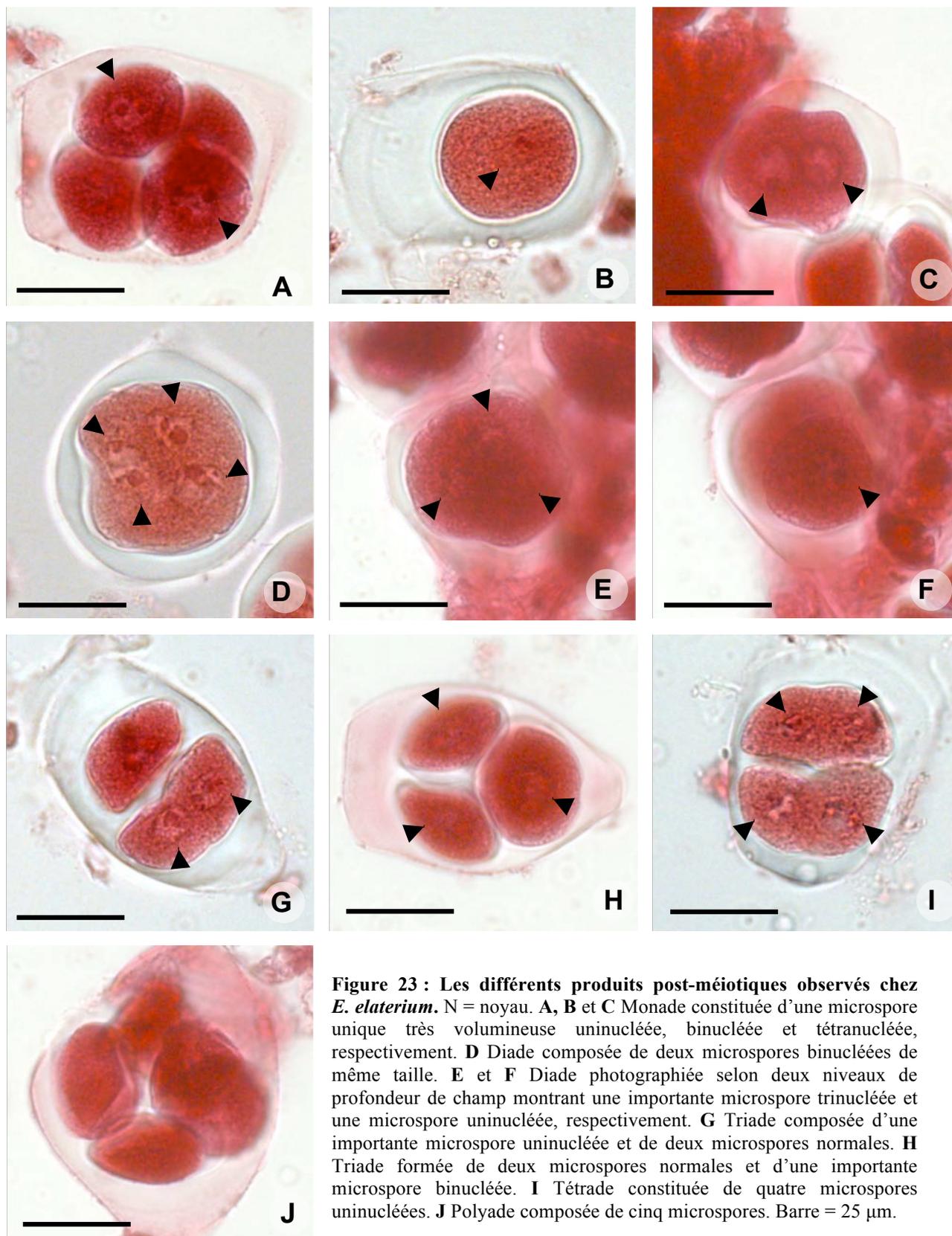


Figure 23 : Les différents produits post-méiotiques observés chez *E. elaterium*. N = noyau. **A, B** et **C** Monade constituée d'une microspore unique très volumineuse uninucléée, binucléée et tétranucléée, respectivement. **D** Diade composée de deux microspores binucléées de même taille. **E** et **F** Diade photographiée selon deux niveaux de profondeur de champ montrant une importante microspore trinucleée et une microspore uninucleée, respectivement. **G** Triade composée d'une importante microspore uninucleée et de deux microspores normales. **H** Triade formée de deux microspores normales et d'une importante microspore binucléée. **I** Tétrade constituée de quatre microspores uninucleées. **J** Polyade composée de cinq microspores. Barre = 25 μm .

L'observation plus fine de quelques-uns de ces produits post-méiotiques anormaux a révélé, de manière inattendue, une importante variabilité au niveau de la composition nucléaire. Les monades observées pouvaient être uninucléées (Figure 23A), binucléées (Figure 23B) ou tétranucléées (Figure 23C). En ce qui concerne les diades, les deux microspores de même taille pouvaient être uninucléées ou binucléées (Figure 23D). Sinon, la plus petite microspore était uninucléée (Figure 23F) alors que la plus volumineuse était trinucléée (Figure 23E). Dans le cas des triades, la plus grande microspore pouvait être uninucléée (Figure 23G) ou binucléée alors que les deux autres étaient normalement uninucléées (Figure 23H). Aucune observation de la composition nucléaire de polyades n'a pu être faite.

3.3.Discussion

La microsporogénèse normale chez *E. elaterium* est de type simultanée, c'est-à-dire que la CMM subit une première division méiotique formant deux noyaux qui vont subir la seconde division méiotique. Le méiocyte à quatre noyaux subit ensuite une seule cytokinèse qui individualise quatre microspores rassemblées en tétrade par la couche de callose. Or, nos résultats montrent que la microsporogénèse chez *E. elaterium* s'accompagne également de la formation de produits post-méiotiques anormaux, c'est-à-dire des monades, des diades, des triades et des polyades. De tels produits post-méiotiques ont été observés chez d'autres espèces, aussi bien polyploïdes que diploïdes (Misset, 1992 ; Bosco *et al.*, 1999 ; Souza *et al.*, 2003 ; Taschetto and Pagliarini, 2003 ; Boldrini *et al.*, 2006 ; Gallo *et al.*, 2007). Les espèces polyploïdes, plus propices aux erreurs durant la méiose, génèrent des produits post-méiotiques en plus grande proportion que les espèces diploïdes (Bosco *et al.*, 1999 ; Taschetto and Pagliarini, 2003). Cependant, certaines espèces diploïdes sont plus susceptibles que d'autres de former des produits post-méiotiques anormaux. C'est le cas de *Citrus sinensis* et *C. limon* qui produisent respectivement 27% et 7,6% de polyades (Bosco *et al.*, 1999) ou de *Pfaffia glomerata* qui produit 14% de triades (Taschetto and Pagliarini, 2003). D'autres espèces comme *Passiflora edmundoi* génèrent des produits post-méiotiques anormaux en faibles quantités comparables à celles que nous avons enregistrées chez *E. elaterium* (Souza *et al.*, 2003). Le niveau de ploïdie et l'espèce ne sont pas les seuls facteurs favorisant les anomalies méiotiques, les stress environnementaux comme la sécheresse ou la salinité augmentent également la formation de produits post-méiotiques anormaux (Misset, 1992). Ces produits résultent soit d'anomalies lors de la méiose comme une orientation anormale des fuseaux ou l'absence d'une division méiotique, soit d'anomalies ou d'absence de cytokinèse (Taschetto

and Pagliarini, 2003 ; Boldrini *et al.*, 2006 ; Gallo *et al.*, 2007). La formation de ces produits post-méiotiques anormaux implique la production de gamètes avec plus ou moins de chromosomes (Goluboskaya, 1989) et de grains de pollen non réduits ou stériles (Bosco *et al.*, 1999). Nos observations ont montré qu'à chaque type de produits post-méiotiques anormaux rencontrés chez *E. elaterium* correspondaient plusieurs compositions nucléaires. Certaines microspores anormales présentaient un volume plus important que les autres et un état uninucléé. Ces caractéristiques indiquent un niveau de ploïdie anormalement élevé. Les mécanismes impliqués dans la mise en place de ces microspores polyploïdes ont été résumées par Bretagnolle et Thompson (1995) et représentées sur la figure 24. Ces microspores diploïdes, triploïdes ou tétraploïdes sont à l'origine de grains de pollen polyploïdes, comme ceux qui ont été observés chez notre modèle. Des grains de pollen diploïdes ont également été observés chez des clones de *Solanum phureja* et des hybrides de *Solanum* (Veilleux and Lauer, 1981 ; Bani-Aameur *et al.*, 1992) alors que la présence de jumbo pollen (4n) a été montrée chez *Medicago sativa* (McCoy and Smith, 1983). Taschetto et Pagliarini (2003) ont observé des grains de pollen diploïdes et tétraploïdes chez *Pfaffia glomerata* et *P. tuberosa*, les espèces tétraploïdes produisant entre 2 et 10 fois plus de ces grains de pollen. En dehors de ces microspores polyploïdes déjà connues, nous avons identifié des microspores présentant un état plurinucléé. Ce résultat est concordant avec nos précédentes observations sur sections qui montraient une microspore au minimum trinuéclée. Des microspores bi-, tri- et tétranuéclées ont déjà été observées chez des mutants de soja et d'*A. thaliana* (Brim and Young, 1971 ; Spielman *et al.*, 1997 ; Tavoletti *et al.*, 2000). Chez ces mutants, des cytokinèses partielles ou absentes en sont à l'origine. McCoy et Smith (1983) ont montré que, dans la plupart des cas, les noyaux de ces microspores fusionnaient ensuite pour former une microspore polyplôïde. Cependant, lorsque la fusion nucléaire n'a pas lieu, ces microspores plurinucléées conduisent à la formation de grains de pollen également plurinucléés, comme nous avons pu en observer chez *E. elaterium*.

La figure 24, résumant les différents produits post-méiotiques rencontrés ainsi que les étapes de leur formation, montre que plusieurs anomalies peuvent conduire à la formation d'un même type de produit. Par exemple, quatre voies différentes peuvent résulter en la formation d'une diade contenant deux microspores diploïdes. Cependant, le présent travail ne permet pas de déterminer, dans ce cas, le type d'anomalie impliquée.

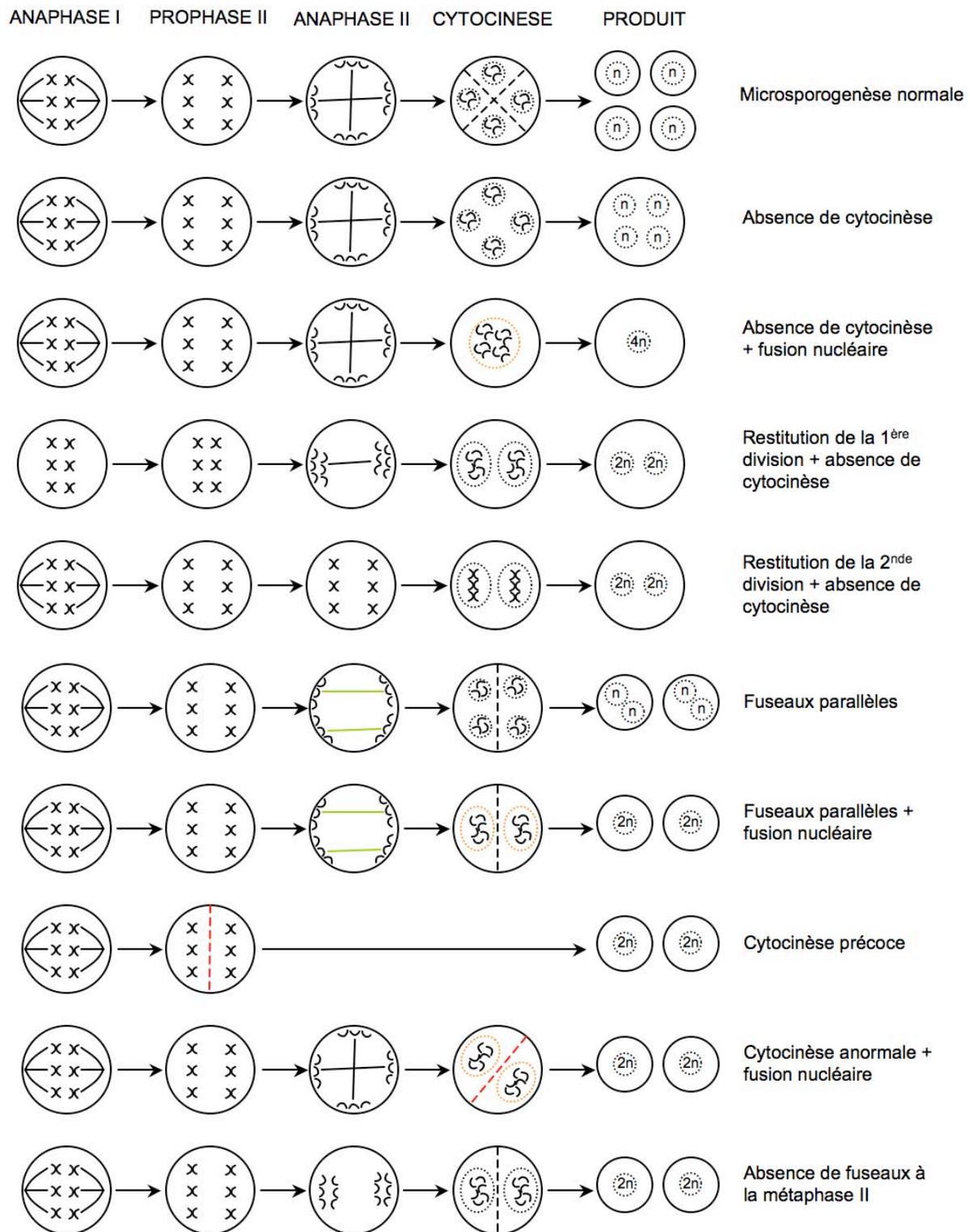


Figure 24 : Les principales anomalies cytologiques responsables de la formation de produits post-méiotiques anormaux et les grains de pollen qui peuvent en résulter. Modifié d'après Bretagnolle and Thompson (1995) et complété.

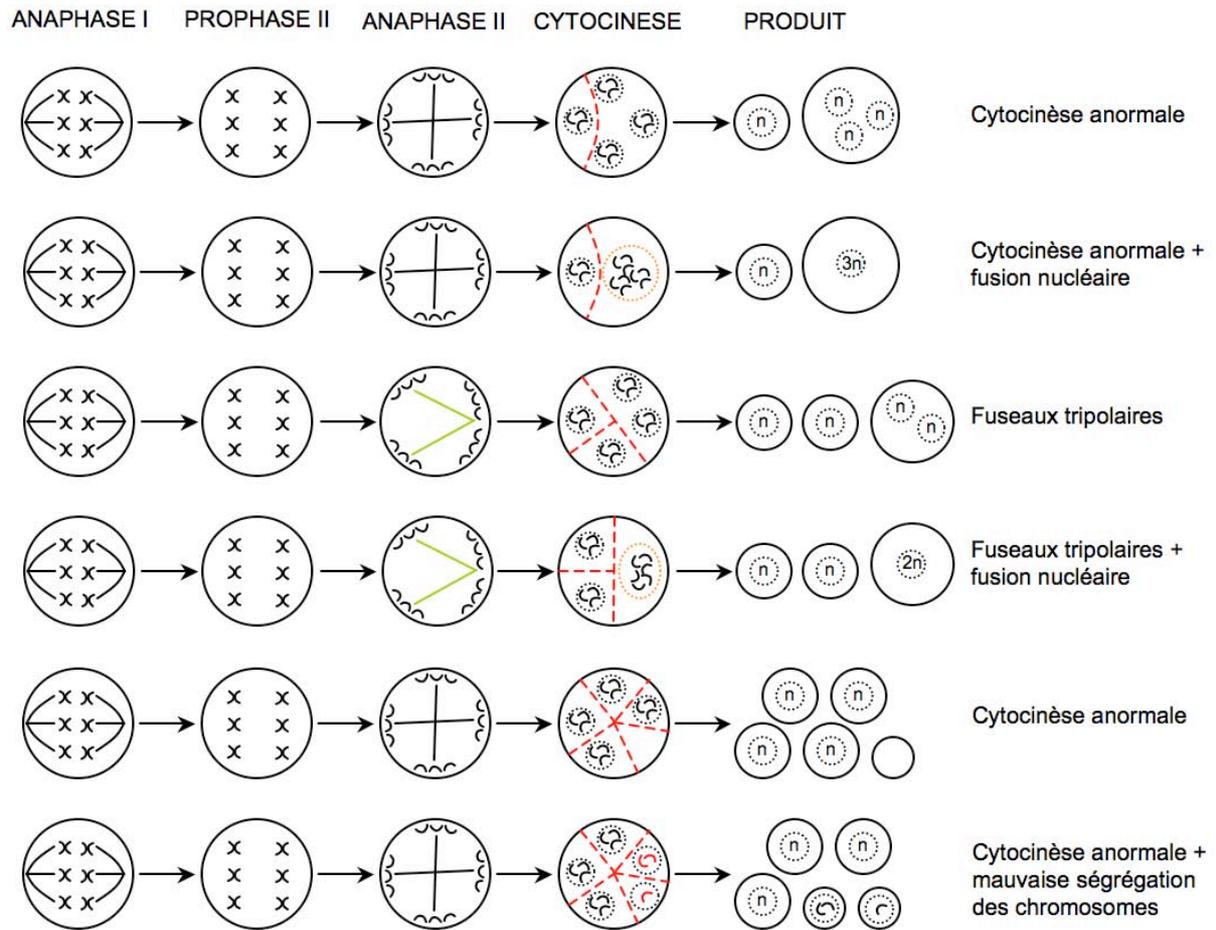


Figure 14 (suite).

IV. Conclusions

Cette étude a montré que l'ontogenèse du pollen d'*E. elaterium* et celle de *C. melo* différaient peu. En effet, elles sont toutes les deux marquées par une microsporogénèse de type simultanée et une microgamétogénèse normale conduisant à la libération de grains de pollen bicellulaires. En revanche, les étapes de maturation du pollen diffèrent. A l'anthèse, le pollen d'*E. elaterium* est partiellement déshydraté, donc moins sensible aux stress environnementaux et à longévité plus importante alors que le pollen de *C. melo* est partiellement hydraté et donc plus sensible aux changements environnementaux et à longévité réduite. Le niveau d'hydratation du pollen peut avoir une influence sur l'interaction pollen-abeille. En effet, une plante à pollen hydraté dont la longévité est réduite nécessite que la pollinisation soit faite rapidement après anthèse. On peut penser alors qu'une telle plante mette en place des stratégies pour être très attractive comme une plus grande quantité ou une meilleure qualité de ses récompenses florales. Si *C. melo* ne produit pas autant de pollen qu'*E. elaterium*, il offre, en revanche, une plus grande quantité de nectar (3µl/fleur pour *C. melo* contre 0,65 µl/fleur pour les populations locales d'*E. elaterium* ; Rust *et al.*, 2003).

Nous avons mis en évidence que l'ontogenèse du pollen chez ces deux modèles était accompagnée d'une importante dégénérescence cellulaire réalisée par MCP, conduisant à la production d'environ 3% de grains de pollen vides. Ces derniers, composés uniquement de leur exine, sont stériles et non nutritifs pour l'abeille alors qu'ils peuvent être récoltés par cette dernière, déposés sur des stigmates où ils ne pourront germer. Par ailleurs, s'ils sont ramenés et stockés dans la ruche, ils ne pourront pas être digérés par les abeilles.

Cette étude a également montré que la microsporogénèse chez *E. elaterium* était sujette à des erreurs méiotiques. Ces dernières peuvent être favorisées par les stress environnementaux comme la sécheresse et conduisent à la formation de 5% de produits méiotiques anormaux. Ces derniers n'étant pas éliminés par dégénérescence se développaient ensuite en grains de pollen diploïdes, tétraploïdes ou encore aneuploïdes. Dans l'hypothèse que ces grains de pollen non garants de la conformité génétique de la population et de l'espèce interviennent dans la reproduction, nous pouvons nous attendre à la formation de descendants polyploïdes (Bretagnolle and Thompson, 1995). Bien que la littérature ne fasse pas, à notre connaissance, état de génotypes polyploïdes chez *E. elaterium*, il a été rapporté chez des espèces du genre

Cucumis (Singh and Yadav, 1984), *Momordica* (Agarwal and Roy, 1976) et *Trichosantes* (Thakur, 1973) la formation de génotypes naturellement autoploïdes.