



**HAL**  
open science

# Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs

Mickael Bourge, Béatrice Satiat-Jeunemaître

## ► To cite this version:

Mickael Bourge, Béatrice Satiat-Jeunemaître. Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs. La cytométrie en flux, 2020. hal-03100283

**HAL Id: hal-03100283**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03100283>**

Submitted on 6 Jan 2021

**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.

# **Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs.**

Mickael BOURGE & Béatrice SATIAT-JEUNEMAITRE

## 1. Introduction

## 2. Les classiques de la cytométrie

### 2. 1. Prolifération et développement

#### 2.1.1. Cycle cellulaire

2.1.1.1. Incorporation d'EdU pour un marquage multiparamétrique

2.1.1.2. Quenching de Hoechst pour identifier les cellules BrdU<sup>+</sup>

#### 2.1.2. Endoréplication (ou endoreduplication)

### 2.2. Quantification de l'ADN

2.2.1. Mesure de la taille de génome

2.2.2. Mesure du rapport AT/GC

## 3. Autres applications exploratoires

3.1. Analyse d'activités métaboliques : pH, état énergétique

3.2. Analyses sur cellules entières ou sur amas cellulaires

3.3. Analyse d'organites

3.4. Tri de chromosomes, noyaux, protoplastes et pollen

## 4. Conclusion

## Remerciements

## Bibliographie

Protocole 1 : Protoplastes

Protocole 2 : Extraction de noyaux

2a Par lyse de protoplastes

2b En coupant une pâte cellulaire ou de tissus frais

2c En fixant les cellules ou tissus avant d'en extraire les noyaux

2d En congelant des culots cellulaires dans l'azote liquide

Protocole 3 : Incorporation de BrdU

Protocole 4 : Incorporation d'EdU

Figures 1-6

Tableau 1

## **1. Introduction**

Le but de ce chapitre est de montrer à travers des exemples fondamentaux et appliqués, quelques utilisations de la cytométrie en flux pour la biologie végétale. Comme pour toutes cellules eucaryotes, la cytométrie en flux « végétale » présente des avantages sur la microscopie pour une quantification de la fluorescence lorsque des données morphologiques ne sont pas nécessaires, à condition que l'objet puisse être correctement isolé pour être identifié par le cytomètre. Cependant leur taille, la présence d'une paroi et d'organites très réfringents, voire opaques, et de nombreux composés autofluorescents rendent très difficiles les approches d'exploration subcellulaires par cytométrie en flux.

Rappelons que les cellules végétales diffèrent des autres cellules eucaryotes par certains aspects. Elles sont généralement incluses dans des tissus ou des organes « rigides », et entourées d'une paroi pecto-cellulosique. Cette particularité ainsi que la présence de chloroplastes – contenant de l'ADN, des pigments fluorescents pour la photosynthèse – ainsi que des cofacteurs du métabolisme et des métabolites secondaires fluorescents, biaisent généralement la mesure de cycles cellulaires ou de fonctions physiologiques.

Ces contraintes peuvent être contournées par différentes stratégies expérimentales qui seront abordées au cours de cette revue. Les méthodes sont disponibles en détail dans des livres (de La Pena and Brown 2001), ou des revues (Doležel, Greilhuber, and Suda 2007).

## **2. Les classiques de la cytométrie**

La plupart des travaux menés par cytométrie en flux sur des cellules végétales l'ont été sur des formes particulières de ces cellules nommées protoplastes (figure 1 et Protocole 1). Il s'agit de cellules débarrassées de leurs parois par hydrolyse enzymatique dans un milieu hyperosmotique. Une autre approche consiste en l'analyse des organites isolés de la cellule, des noyaux par exemple. Cette étape d'isolement préalable étant opérée généralement sur tissus frais et non sur échantillons fixés (Protocole 2).

### **2.1. Prolifération et développement**

#### **2.1.1. Cycle cellulaire**

Le cycle de prolifération des cellules végétales comporte de nombreux points communs avec ceux des autres eucaryotes couramment étudiés. Il se constitue d'une phase G1 de croissance

cellulaire, d'une phase S de synthèse d'ADN, d'une phase G2 de préparation à la mitose, puis de la phase M de mitose.

La mesure de la quantité d'ADN nucléaire afin d'apprécier la progression du cycle par cytométrie en flux nécessite de s'affranchir de la paroi afin de réduire un marquage non spécifique et les interférences optiques. Les protoplastes ainsi isolés peuvent être colorés et analysés par cytométrie. Toutefois l'interférence optique des organites et notamment la présence de plastides contenant de l'ADN biaisent la mesure du cycle, élargissant le Coefficient de Variation (CV) des pics, et les cycles ainsi obtenus sont plus difficilement interprétables que ceux obtenus avec d'autres eucaryotes ou sur des noyaux isolés (figure 2).

Les cellules végétales ont des propriétés membranaires différentes de celles des cellules animales qui empêchent ou gênent l'emploi de la plupart des sondes nucléiques vitales comme les bisbenzimidés Hoechst, le DAPI, SYTOs (Life technologies), DRAQ5, etc., notamment si un marquage stœchiométrique est recherché.

Une autre approche simple, rapide et précise consiste à extraire sommairement les noyaux des cellules et à faire la mesure du cycle sur ces noyaux isolés (Protocole 2). Evidemment, cette stratégie n'est pas valable quand on souhaite associer le cycle avec d'autres marquages immunologiques ou avec une GFP dans une analyse multiparamétrique, sauf si cela concerne uniquement un facteur nucléaire.

L'interprétation d'un histogramme représentant la quantité d'ADN nucléaire est relativement simple dans le cas d'une culture cellulaire en pleine prolifération, et sert pour les études de synchronisation. La prolifération cellulaire des végétaux a lieu normalement dans des méristèmes entourés de cellules en voie de différenciation. Cette prolifération n'est pas uniforme, la durée du cycle étant très variable entre une zone et une autre, des cellules peuvent entrer en quiescence passagère et ceci à des niveaux de ploïdie variés (2C, 4C, 8C, etc.), alors que le phénomène d'endoréplication est majeure (voir chapitre 2.1.4). De plus on ne peut jamais extraire uniquement le méristème d'un tissu, et donc la charge de cellules différenciées environnantes va varier d'un échantillon à un autre. D'autres préparations pour la cytométrie peuvent inclure des cellules non proliférantes. L'utilisation d'un histogramme d'ADN pour déterminer les phases G1, S et G2-M dans une zone méristématique sera alors hasardeuse sans pouvoir cerner la charge de cellules quiescentes ou en cours de différenciation. La même critique tient pour l'analyse de cellules proliférantes en présence de différenciation à partir de G2, à l'état 4C.

Il est alors conseillé d'utiliser une méthode d'identification des cellules passant (ou étant passé) par une phase de synthèse d'ADN, avec l'incorporation de la 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) ou de la bromo-déoxyuridine (BrdU).

### **2.1.2. Incorporation d'EdU pour un marquage multiparamétrique**

Lorsque les histogrammes monoparamétriques de marquage d'ADN ont une résolution insuffisante (figure 2a), ou lorsque que l'on veut associer une ou plusieurs protéines fluorescentes du cytoplasme à l'analyse du cycle, il est nécessaire d'ajouter une dimension pour une meilleure précision d'analyse. L'EdU est un analogue de la thymidine, dans lequel un groupement alkyne terminal remplace le groupement méthyl en position 5. L'EdU est incorporé dans l'ADN nucléaire pendant la phase de réplication (phase S) *via* un mécanisme présent dans toutes les cellules eucaryotes. La détection d'EdU est basée sur la chimie « click » après fixation ou perméabilisation des cellules, qui est plus facile à maîtriser que l'immunomarquage dans la technique similaire du BrdU. En présence du catalyseur, le cuivre I, le groupement alkyne de l'EdU réagit avec un groupement azide contenu dans un fluorochrome au choix pour former une liaison covalente. L'avantage de cette révélation, plus spécifique que l'immunomarquage de la BrdU, est qu'elle ne nécessite pas de dénaturation de l'ADN. Après quelques minutes d'incubation en présence d'EdU, les cellules ayant subis la phase S auront un marquage fluorescent positif. Couplé à un marquage d'ADN « classique » (DAPI, PI, etc.), l'analyse biparamétrique du cycle devient plus précise (figure 2c). Bien que le cuivre éteigne la fluorescence des protéines fluorescentes (GFP, YFP, etc.), il est possible d'inverser le processus avec une incubation en EDTA acide, suivi d'un lavage à pH neutre (protocole 4). Ce protocole permet non seulement d'améliorer la résolution du cycle, mais aussi de suivre des protéines fluorescentes au cours du cycle cellulaire (Bourge et al. 2015).

### **2.1.3. Quenching de Hoechst pour identifier les cellules BrdU<sup>+</sup>**

Tout comme l'EdU, la BrdU exogène est incorporée dans l'ADN comme analogue de la thymidine. La présence d'un résidu brome est alors détectée par son effet extincteur de la fluorescence de fluorochromes (bisbenzimidazole Hoechst, DAPI) qui reconnaissent les motifs riches en AT (Protocole 3 et figure 3). Alternativement, il existe des anticorps anti-BrdU pour une analyse de la quantité d'ADN versus immunomarquage de ces noyaux contenant la BrdU (similaire au EdU dans la figure 2c). L'avantage de cette analyse pour des tissus hétérogènes comme chez les végétaux est que les données cytométriques peuvent être retraitées pour s'adresser uniquement à la fraction active pendant la phase d'administration de la BrdU

(jusqu'à 24 heures, avant qu'elle ne soit dégradée). Typiquement, dans la zone méristématique racinaire, environ 10-20% des cellules seront BrdU-positives après 24 h : pour cette fraction, on détermine la proportion toujours en cours de Synthèse, celle en G2, celle en G1 suite à des Mitoses, ou au contraire celle repartant en Synthèse sans Mitose à cause d'une endoréplication. Ainsi, on contourne le problème de la charge de cellules quiescentes des tissus environnants.

#### **2.1.4. Endoréplication (ou endoreduplication)**

Une particularité du cycle cellulaire des plantes est l'endoréplication : il s'agit d'un cycle cellulaire modifié, sans phase de mitose qui a pour effet de donner une cellule avec un niveau de ploïdie supérieur (figure 4). Les cellules végétales peuvent ainsi avoir au sein d'un même tissu ou d'un même organe, des niveaux de ploïdie différents, dite polysomatie (figure 5). Toutefois ces cycles d'endoréplication (ou endopolyploïdie) sont très régulés pour une espèce donnée, pour un organe donné, et à un stade de développement donné. Ce phénomène d'endoréplication est d'une importance majeure dans le développement des plantes, et une modification dans la distribution des niveaux de ploïdie peut conduire à un phénotype développemental dramatique (Raynaud et al. 2005). L'endoréplication est associée également au développement des fruits (Pirrello et al. 2014), des tissus de réserves, et à certaines invasions de pathogènes, comme des galles de nématodes racinaires, ou plus simplement au grandissement cellulaire. Un corollaire est qu'une analyse en cytométrie demande souvent une représentation des quantités d'ADN nucléaire sur des échelles à la fois linéaire et logarithmique (Voir protocole dans (Pirrello et al. 2014)).

## **2.2. Quantification de l'ADN**

### **2.2.1. Mesure de la taille de génome**

Il est facile par cytométrie de mesurer la taille du génome des cellules végétales, comme d'autres eucaryotes.

Cette taille donne une estimation de la ploïdie probable d'un individu. Ceci est d'une importance particulière en écologie et systématique pour comprendre les mécanismes évolutifs qui surviennent entre des populations d'une même espèce ou entre plusieurs espèces. La ploïdie est strictement définie par la génétique ou la cytogénétique, d'après le nombre de compléments chromosomiques présents. Ainsi, avec les résultats de cytométrie on parlera de « ploïdie en ADN » (« DNA ploidy ») où, connaissant la taille du génome

d'une plante référence de ploïdie connue, on déduit la ploïdie par comparaison de quantités d'ADN et non pas formellement par comptage chromosomique. L'intérêt de l'approche cytométrique est de pouvoir faire des centaines d'analyses par jour, sans les difficultés de la cytogénétique, qui reste néanmoins indispensable pour valider cette estimation.

De plus cette méthode permet d'estimer rapidement la ploïdie de grands lots de plantes lors de la création variétale, ce qui représente un gain de temps substantiel pour l'agronomie et l'industrie semencière. Par exemple, la production de semences hybrides triploïdes de betterave implique un croisement de lignée femelle diploïde et pollen mâle tétraploïde. Le contrôle de ces plantes est fait rapidement par la cytométrie, et plus rarement par la cytogénétique classique. Ainsi, dans l'industrie semencière et la création variétale, on retrouve de petits cytomètres efficaces, souvent à base de lampes.

Il est souvent nécessaire de vérifier la ploïdie des spécimens utilisés dans la recherche au laboratoire. Effectivement, la manipulation *in vitro* ou la transformation peuvent produire des individus polyploïdes, voire aneuploïdes, qu'il vaut mieux identifier ou écarter.

Il est également possible de déterminer le mode de reproduction d'une population de plantes par la méthode FCSS (Flow Cytometric Seed Screening) qui consiste à couper les graines et analyser les profils contenant les pics de ploïdie de l'embryon et de l'endosperme, en les comparant avec ce qui est connu sur le mode de fonctionnement de la reproduction sexuée et l'apomixie (Hajrudinović et al. 2015).

Pour tout ceci il est important d'avoir une collection d'étalons connus, avec la mention de la variété. Des différences intra-espèces sont fréquentes, surtout chez les plantes cultivées. Nous gardons à disposition les semences des espèces mentionnées dans le tableau 1. La principale base de données concernant la taille des génomes de plantes est maintenue par le Jodrell Laboratory à Kew Gardens (<https://www.kew.org/data/>). Il est préférable que pour de telles mesures, la taille du génome de l'étalon soit plus grande que celui de la plante à mesurer: il vaut toujours mieux faire une interpolation qu'une extrapolation.

Rappelons que la fluorescence de certains marqueurs d'ADN est dépendante non pas de la quantité d'ADN mais aussi de sa composition en bases : ces fluorochromes donnent alors des indications de taille approximatives. Les intercalants à stœchiométrie simple (bromure d'Ethidium, iodure de Propidium) sont nécessaires pour une mesure de la quantité d'ADN absolue (figure 6). En utilisant un colorant intercalant (Propidium ou Ethidium), on est insensible aux différences de composition en bases. En comparant le blé et le pétunia par exemple, leurs génomes diffèrent par un rapport de 10,8 (mesuré avec l'iodure de Propidium).

La même analyse faite avec un bisbenzimidazole Hoechst, qui fluoresce sur une suite de cinq AT, ce rapport expérimental n'est que 8,6 soit une erreur de 21%, car le génome de blé est moins riche en bases AT que celui du pétunia.

Pour la mesure de la taille du génome, on extrait ensemble les noyaux de l'échantillon et d'un étalon dont la taille du génome est connue avec précision (pétunia, tomate, poulet, truite arc-en-ciel, ...), et on les colore avec un intercalant stœchiométrique (iodure de Propidium ou bromure d'Ethidium). La quantité de colorant à ajouter est dépendante de la taille de génome, pour assurer une saturation (10 µg/mL d'IP pour *Arabidopsis thaliana*, 50 µg/mL pour la tomate et le pétunia, 100 µg/mL pour le blé). On souligne ici l'importance de hacher l'échantillon et l'étalon ensemble en même temps.

Par le rapport des intensités de la fluorescence des noyaux 2C de l'échantillon et de l'étalon, on déduit la taille du génome de la plante à tester (2C<sub>test</sub>).

$$2C_{\text{test}} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}} * 2C_{\text{étalon}} \quad \text{Equ. 1}$$

### 2.2.2. Mesure du rapport AT/GC

La composition en bases d'un génome peut être mesurée en utilisant différents colorants (Godelle et al. 1993). Ce calcul du GC% est basé sur la comparaison des rapports entre le test et l'étalon obtenus avec deux ou si possible trois types de fluorochromes différents: un intercalant (bromure d'Ethidium ou iodure de Propidium), un colorant dépendant de la composition en AT (bisbenzimidazole Hoechst 33342) et/ou un colorant dépendant de la composition en GC (Chromomycine A3 ou Mithramycine). Il est cependant nécessaire d'avoir accès à un cytomètre équipé de plusieurs lasers capables d'exciter ces trois classes de marqueurs.

L'optimum d'émission du Hoechst 33342 est produit lorsqu'il est lié à cinq AT à la suite. De même l'optimum d'émission de la Chromomycine A3 a lieu lorsqu'elle est liée à 2-3 GC à la suite. En raison de ces stœchiométries de liaison différentielle on appliquera pour la détermination de la composition en base la formule suivante :

$R_{IP} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'iodure de Propidium (ou bromure d'Ethidium)

$R_{HO} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'Hoechst 33342

$R_{CA} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec la Chromomycine A3 (ou la Mithramycine)

$$\% \text{AT}_{\text{test}} = \% \text{AT}_{\text{étalon}} \times (R_{HO} / R_{IP})^{1/5} \quad \text{Equ. 2}$$

$$\% \text{GC}_{\text{test}} = \% \text{GC}_{\text{étalon}} \times (R_{CA} / R_{IP})^{1/3} \quad \text{Equ. 3}$$



Vérification : en principe  $\% GC_{\text{test}} + \% AT_{\text{test}} = 100 (\%)$

Cette méthode, applicable à d'autres règnes, permet de mesurer rapidement la composition en bases d'un génome et de compléter les études systématiques sur l'évolution génomique (Siljak-Yakovlev et al. 2005).

### **3. Autres applications exploratoires**

#### **3.1. Analyse d'activités métaboliques : pH, état énergétique**

Des mesures simples et efficaces existent pour mesurer le pH cytoplasmique, le calcium libre, l'activité mitochondriale dans les cellules de mammifères. Le problème pour les cellules végétales est de faire entrer les sondes avec les difficultés mentionnées plus haut, sans perdre leur spécificité. Par exemple, la sonde calcique Indo-1/AM pénètre dans des cellules mais sera immobilisée en quelques minutes, un état qu'on peut démontrer par l'anisotropie de son émission (S. C. Brown, communication personnelle). Elle ne fonctionne alors plus comme une sonde à calcium.

Ces difficultés contournées, il est tout à fait possible de faire des mesures notamment sur protoplastes. Ainsi ont été évalués par cytométrie de protoplastes, en identifiant des sous-populations et des cinétiques, le pH vacuolaire (Brown et al. 1984), le pH cytoplasmique, la microviscosité de la membrane plasmique, la poussée oxydative (Weir et al. 2005), la viabilité, etc. Des protoplastes ont aussi été triés d'après leur teneur en alcaloïdes, afin d'établir des cultures (Brown et al. 1984). Desikan et coll. (Desikan et al. 1999) utilisent la GFP comme rapporteur d'une signalisation de l'acide abscissique, en quantifiant son expression sur protoplastes.

#### **3.2. Analyses sur cellules entières ou sur amas cellulaires**

Malgré les difficultés exposées précédemment il est possible, avec certains tissus et en adaptant le cytomètre, de travailler sur des cellules ou des amas cellulaires directement issus de cultures. Une suspension cellulaire de tabac cv. Xanthi se prête ainsi à l'analyse cytométrique de l'activité mitochondriale, de la production de NO, et de la mortalité cellulaire (Lamotte et al. 2004) : la suspension est filtrée, et le cytomètre équipé d'une buse de 200  $\mu\text{m}$ . Des feuilles de certaines espèces (asperge, *Zinnia elegans*, etc.), simplement broyées, donnent des cellules individuelles de mésophylle. Ainsi, Weir et coll. (Weir et al. 2005) analyse des cellules de *Zinnia* au cours de leur différenciation *in vitro*, mesurant le pH, le

calcium, l'oxygène activé, le glutathion réduit et l'apoptose. Les cellules ou amas sont souvent de grande taille. Ceci peut déclencher intempestivement une mesure si le déclencheur (*Trigger*) est mis sur un paramètre de diffraction de la lumière (FSC ou SSC). Ce déclenchement se fait alors de manière irrégulière, précoce.

### 3.3. Analyse d'organites

Les plastes et les mitochondries isolés ont été étudiés par cytométrie en flux, pour leur potentiel de Nernst, leurs propriétés de surface telle que la fixation de lectines et pour l'oxydation liée à l'apoptose (Weir et al. 2005). Cette tâche est difficile par imagerie cellulaire *in situ*, en revanche il est relativement facile d'isoler des plastes (par coupe de tissu ou par lyse de protoplastes) afin de quantifier leur fluorescence et la diffraction de la lumière objet par objet. Chez *Arabidopsis*, Raynaud et coll. (Raynaud et al. 2005) ont ainsi démontré la formation de plastes vingt fois plus grands, suite à l'atténuation de l'expression d'un facteur du complexe de pré-réplication agissant à la fois sur la division nucléaire et plastidiale. Pfundel et Meister (Pfundel and Meister 1996) ont utilisé la cytométrie en flux pour trier les chloroplastes de différents tissus sur la base de leur composition différentielle en pigments photosynthétiques.

Les noyaux isolés se prêtent à la cytométrie non seulement pour quantifier leur ADN, mais également par des analyses multiparamétriques avec immunomarquage d'autres facteurs nucléaires tels que des polymérases (Bourbousse et al. 2015; Pirrello et al. 2014), ou avec des protéines fluorescentes.

La cytométrie en flux permet en outre des études multiparamétrées rarement envisagées en biologie cellulaire chez les végétaux. Par exemple, l'évolution des différents composants cellulaires en fonction du cycle : quantité de chlorophylle, quantité de membranes golgiennes (Bourge et al. 2015), etc. Ces mesures effectuées par cytométrie peuvent être vérifiées et approfondies par microscopie. Ainsi l'évolution de l'appareil de Golgi au cours du cycle cellulaire a été mesurée sur des cellules de tabac (BY2) par immunomarquage de glycoprotéines du Golgi (JIM84) ou par l'expression d'une protéine de fusion entre le motif membranaire golgien de sialyl-transférase murine et la Green Fluorescent Protein (GFP) (Bourge et al. 2015; Brown et al. 2010). Ces mesures ont révélé que l'accroissement de masse de l'appareil de Golgi se faisait majoritairement pendant la phase G1. Les études par microscopie quantitative d'échantillons triés d'après leur phase dans le cycle de prolifération suggèrent que cet accroissement de masse se fait par un doublement du nombre de corps de

Golgi (ou dictyosomes) mais que le volume individuel de chaque corps reste constant au cours du cycle (Satiat-Jeunemaître, communication personnelle).

### **3.4. Tri de chromosomes, noyaux, protoplastes et pollen**

De nombreuses publications des années 80 traitent du tri de protoplastes par cytométrie, soit pour faire ensuite de la biochimie, soit et surtout pour les mettre en culture. Ainsi, des plantes entières (hybrides somatiques) ont été régénérées à partir d'hétérokaryons isolés par tri de protoplastes en fusion somatique (Waara and Glimelius 1995). Trier des protoplastes nécessite une buse assez grosse ( $\text{Ø} \geq 120 \mu\text{m}$ ), un milieu de gaine (*sheath*) de forte valeur osmotique (par exemple,  $\approx 600 \text{ mM}$  sorbitol, et non pas mannitol qui laisse des cristaux) sous pression réduite ( $\approx 10 \text{ psi}$ ), une fréquence de résonance réduite ( $\approx 18 \text{ kHz}$ ) et un débit réduit ( $< 1.000$  protoplastes par seconde). La préparation doit être fraîchement filtrée (porosité  $75 \mu\text{m}$ ). Il est possible de nettoyer la machine et tuyaux à l'éthanol  $70^\circ$  supplémenté de  $0,1 \text{ mM}$  HCl, rincer, puis travailler stérilement, afin d'éviter l'utilisation d'antibiotiques qui sont inadéquats pour les cultures de cellules végétales. L'eau de javel est à proscrire au niveau des tuyaux et de leurs filtres !

Une manière d'obtenir des noyaux de différentes phases du cycle cellulaire, avec une pureté bien supérieure à toute synchronisation chimique, est de les isoler simplement puis trier par cytométrie. Les rendements seront faibles mais suffisants pour des expériences de biologie moléculaire (Pirrello et al. 2014). En triant des noyaux en G1, S et G2 de tissu foliaire fraîchement haché, Accotto et coll. (Accotto et al. 1993) ont ainsi mis en évidence la forme particulière d'un gemini-virus quand les cellules hôtes étaient dans la phase S.

L'actualité est au tri de chromosomes des grands génomes de végétaux comme le blé. Pour référence : le blé (*Triticum aestivum*)  $1\text{C} \approx 17 \text{ Gbp}$  ( $2n = 6x = 42$ ), l'orge (*Hordeum vulgare*)  $1\text{C} \approx 5,4 \text{ Gbp}$  ( $2n = 2x = 14$ ), alors que le riz (*Oryza sativa*)  $1\text{C} = 0,48 \text{ Gbp}$  et *Arabidopsis thaliana*  $1\text{C} = 0,16 \text{ Gbp}$  ( $2n = 2x = 10$ ), et *Homo sapiens sapiens*  $1\text{C} = 3,147 \text{ Gbp}$  ( $2n = 2x = 46$ ). Divers projets et méthodes de tri de chromosomes des plantes ont été entrepris depuis 20 ans, sur le pétunia, le tabac, la tomate, l'orge, le pois, etc. (voir références dans la revue (Doležel, Greilhuber, and Suda 2007)). Des publications montrent un réel progrès: une excellente maîtrise en cytométrie (Šafář et al. 2004) rencontre son équivalent en biologie moléculaire, notamment pour la production de BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) de grande taille à partir des petites quantités d'ADN triées. La juxtaposition des deux est essentielle. Trois chromosomes de blé ont ainsi été purifiés et clonés en BAC. Un tri de 150 h

a fourni 1,8 million de copies du chromosome 3B, pour la préparation de 68.000 BAC. Dans la perspective de réduire les quantités nécessaires et augmenter le rendement, il faut veiller aux stratégies de clonage d'ADN génomique. Par exemple, la polymérase Phi29 permet une amplification de 10.000 fois partant d'oligos hexamères aléatoires pour des produits 10-100 kb (Qiagen).

Un excellent exemple de biologie intégrée concerne le tri de cellules végétales (ou malheureusement, de protoplastes) pour l'étude du transcriptome. Les différents types cellulaires de la racine (comme ceux de la figure 1a) sont étiquetés avec la GFP. Des protoplastes issus de racine, ont été triés par cytométrie d'après le paramètre GFP (Birnbaum et al. 2003). Il y a un vif intérêt pour de telles stratégies afin de purifier des cellules, protoplastes ou organites pour une analyse du transcriptome, du protéome ou du métabolome.

Récemment des grains de pollens de mutants d'*Arabidopsis thaliana* ont été analysés selon leur ploïdie puis triés pour observation en microscopie, afin de mieux les identifier mais également d'apporter une complémentarité « moléculaire » sur les mesures du cytomètre (Domenichini et al. 2012).

#### **4. Conclusion**

Malgré l'explosion de l'outil cytométrie, la discipline reste limitée en biologie végétale par cette contrainte de protoplastes. Néanmoins, faire rigoureusement des analyses de cycle cellulaire, décrire la polysomatie, simplifier les contrôles de ploïdie, cerner la variabilité des génomes des populations en écologie ou en systématique, sont des méthodes utiles et toujours d'actualité. De forts progrès dans l'imagerie - polyvalente, multiparamétrique et spectrale - notamment avec la microscopie confocale, a offert d'autres manières de résoudre nos besoins expérimentaux (Brown et al. 2010). Néanmoins, la cytométrie reste un outil incontournable par sa capacité à quantifier précisément et sur plusieurs paramètres des caractères cellulaires. De nombreux problèmes d'imagerie quantitative sont parfois simplement résolus par la combinaison de la cytométrie et de la microscopie (Bourge et al. 2015; Pirrello et al. 2014).

Bien des méthodes et applications restent à cerner. De petits cytomètres de paillasse et portables sont disponibles et on peut songer à la cytométrie tout terrain, pour la biologie végétale, la biodiversité, la microbiologie, l'épidémiologie ou l'hydrobiologie. Dans d'autres secteurs la cytométrie est à la fois un outil de travail et une méthodologie en pleine innovation. L'émergence continue des protéines photoconvertibles et d'autres biosenseurs

offre un énorme potentiel à développer. Il est donc important que le biologiste végétal, et ses collègues industriels restent conscients de l'offre et des possibilités de cette cytométrie.

## **Remerciements**

Les défis expérimentaux et les protocoles sont toujours en développement pour faire face aux demandes de la communauté scientifique. Nous remercions nos utilisateurs et la richesse de leurs projets moteurs pour lever les verrous méthodologiques. Nous remercions Peter Mergaert et Eva Kondorosi pour les éléments de la figure 4. Les exemples pris dans cette revue ont bénéficié de l'expertise de la plateforme Imagerie-Gif (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article1138>). Ces plateformes sont membres des Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), et sont soutenues par l'Agence Nationale de Recherche sous les investissements pour les programmes d'avenir « France-BioImaging », et le Labex « Saclay Plant Science » (ANR-10-INSB-04-01 et ANR-11-IDEX-0003-02, respectivement).

## **Protocole 1 : Protoplastes**

Pour faire des protoplastes de cultures cellulaires, les parois des cellules vivantes ou fixées sont digérées par des enzymes : 0,5% (p/v) de Cellulase RS (Yakult), 0,5% de Macerozyme R10 (Yakult) et 0,05% de Pectolyase Y23 (Sigma) en solution hypertonique (milieu de culture additionné de 0,5 M sorbitol) pendant environ trois heures sous agitation continue (30 rpm) à l'obscurité, puis rincées deux fois avec cette même solution en centrifugeant 5 minutes à 50 g. La suspension de protoplastes est ensuite filtrée séquentiellement sur des filtres de nylon à pores calibrés de 200 puis 75  $\mu\text{m}$ . Les protoplastes issus de cellules en cultures peuvent continuer leur progression dans le cycle pendant le temps de digestion. Il est courant de trouver des protoplastes dicaryotiques qu'on élimine de la mesure par l'application de « fenêtres » contre les doublets, sur l'histogramme bivarié « aire du signal contre pic du signal ».

## **Protocole 2 : Extraction de noyaux**

### **2a Par lyse de protoplastes**

Les protoplastes frais sont injectés dans une solution hypotonique et vigoureusement pipetés. A la suite d'un tel traitement ils éclatent et leur contenu cellulaire, ainsi que les noyaux intacts, se retrouve en suspension dans le milieu. Une solution hypotonique adéquate est le

milieu d'isolement de protoplastes diluée à volume égale avec le tampon d'extraction nucléaire (ci- dessous, tableau 2).

### **2b En coupant une pâte cellulaire ou de tissus frais**

Il est possible d'extraire rapidement et simplement des noyaux en hachant l'échantillon avec une lame de rasoir (de type léger cassable, Gillette Blue) dans 1 mL de tampon froid dans une boîte de Petri. Ensuite, on filtre cette préparation sur un nylon à pores calibrés de 50 µm (CellTrics de Partec-Sysmex).

Le tampon le plus couramment utilisé est celui inspiré de Galbraith (tableau 2).

Ce tampon est souvent modifié extemporanément, par exemple en poussant le Triton X-100 à 0,5% (nécessaire pour éclater les chloroplastes ambiants), parfois à 1% même 2% pour des tissus riches en terpènes.

L'utilisation de 1% (m/v) polyvinyl-pyrrolidone (PVP) 10.000 permet de complexer des polyphénols fluorescents et empêche leur polymérisation. Un agent réducteur stabilise certains échantillons : 10 mM métabisulfite de sodium ( $S_2O_5.Na_2$  PM 190 syn. pyrosulfite).

En tout cas, il est utile d'avoir toujours à disponibilité des stocks de ces suppléments : 10% Triton ; 10% (m/v) PVP 10.000 (tous deux passés à l'autoclave, stocké 4°C) ; 1 M métabisulfite de sodium (en aliquotes à -20°C).

Les noyaux isolés peuvent être conservés plusieurs heures à 4°C avec rajout de 1 à 2% de formaldéhyde.

D'autres tampons sont détaillés dans Coba de la Peña et Brown (2001). La coupe de tissus congelés (congélation soudaine à l'azote liquide, pas de congélation progressive en laissant à -20°C), de feuilles et graines sèches, ont aussi donnée de bons résultats, comme la fixation à l'acide citrique (2c ci-dessous).

Les noyaux sont finalement colorés et lus au cytomètre. Ces préparations seront peu concentrées, parfois <50.000 noyaux /mL, avec beaucoup de débris cellulaires. Le fenêtrage (*Gating*) est essentiel pour sélectionner les noyaux sur un cytogramme de *Forward Scatter* ou *Side Scatter* contre « Fluorescence nucléaire ».

### **2c En fixant les cellules ou tissus avant d'en extraire les noyaux**

Une autre manière de conserver des échantillons, ou de prélever lors d'une cinétique loin du cytomètre, est une fixation à l'acide citrique (d'après la méthode Otto, dolezel et al. 2007 et

référence dedans).

Réactifs pour traitement :

acide citrique 0,1 M avec 0,5 % (m/v) Tween20 (autoclavé et gardé à 4°C)

phosphate di-sodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,4 M (autoclavé et gardé à température ambiante)

Un culot cellulaire (ou le tissu) est suspendu dans 100 µL du mélange citrique/Tween. Après au moins 30 minutes, les cellules sont centrifugées ; le culot est alors repris dans 200 µL du mélange citrique/Tween. Les échantillons peuvent être conservés des jours à 4°C. Pour la cytométrie, on extrait les noyaux en hachant l'échantillon (ou la pâte cellulaire) avec une lame de rasoir comme ci-dessus (Protocole 2a), puis on ajoute 1000 µL phosphate di-sodique 0,4 M pour neutraliser l'ensemble (température ambiante), avant de procéder à une filtration sur 50 µm, la coloration et l'analyse cytométrique. Une fois neutralisés, les échantillons ne se conservent plus.

## **2d En congelant des culots cellulaires dans l'azote liquide**

Une fois les cellules culotées, le surnageant est éliminé et le culot est plongé dans l'azote liquide. Il est alors possible de stocker les échantillons à -80°C pour les analyser ultérieurement. Il faut ensuite décongeler les culots en les laissant sur la paillasse. Pour « fractionner » et « casser » les membranes cellulaires, on ajoute du tampon inspiré de Galbraith (tableau 2), puis les échantillons sont vortexés et pipetés vigoureusement à plusieurs reprises. La préparation est filtrée à travers des pores de 50µm, les noyaux isolés sont colorés et lus au cytomètre.

## **Protocole 3 (et figure 3) : Incorporation de BrdU**

Les plantes ou les cellules sont incubées avec de la bromo-déoxyuridine pendant 24 h à l'obscurité. La concentration de BrdU dépend du matériel utilisé. Pour des cellules en culture 30 à 50 µM de BrdU est amplement suffisant. À de plus fortes concentrations le risque d'enclencher des mécanismes de mort cellulaire est élevé. Sur des plantes ou des organes entiers la concentration peut monter jusqu'à 300 µM de BrdU. L'ajout de BrdU se fait à partir d'une solution stock de moins de 24 h à 30 mM.

Lorsqu'on travaille sur le développement de la racine, les cellules proliférantes sont peu nombreuses. Aussi il est possible d'ajouter de l'acide-indole-acétique 1 µM (AIA ou auxine) 24 à 48 heures avant l'ajout de BrdU pour favoriser l'émergence de racines latérales et ainsi

augmenter le nombre de cellules en prolifération.

Généralement, les noyaux sont extraits en hachant le tissu avec un rasoir.

Ce protocole nécessite un cytomètre avec excitation UV (efficace à la fois pour le Hoechst et l'iodure de propidium). Une analyse alternative avec iodure de propidium et TO-PRO3 utilise deux lasers, 488 nm et 633 nm.

### **Réactifs pour analyse :**

100 µg/mL bisbenzimidazole Hoechst 33258

~50 Unités/mg Ribonuclease A (DNase-free) dans Tris saline (12 g/L Tris et 6 g/L NaCl pH 7.6). Un stock 1% (m/v) RNase est bouilli 20 min pour inactiver toute DNase résiduelle, puis conservé en aliquote à -20°C.

100 µg/mL iodure de Propidium

38% (m/v) formaldéhyde.

1. Les échantillons doivent être gardés sur la glace. Ajoutez 5 unités/mL de RNase A et 1 µg/mL de Hoechst 33258 (HO) pendant 10 minutes ; ajoutez alors 3 µg/mL d'iodure de propidium (IP) pendant au moins 10 minutes. Protégez de la lumière.
2. Réglez le cytomètre pour la discrimination de doublets, l'enregistrement de listmode et utilisez des amplifications linéaires, et logarithmiques dans le cas de cellules en cours d'endoréplication. La visualisation de l'incorporation de BrdU se fait sur un histogramme biparamétré : fluorescence bleue (x: 400 nm < HO < 500 nm) contre le rouge (y: IP > 610 nm), de préférence sur les échelles linéaires. Les amplifications du HO et de l'IP doivent être équivalentes de sorte que la pente (y/x) soit d'environ 0,8. Les noyaux inactifs (sans BrdU) se trouvent alors sur une droite presque diagonale ; les noyaux ayant incorporé la BrdU se trouvent sur une droite de pente plus forte (figure 3).
3. Les données enregistrées en listmode peuvent être rejouées pour évaluer le nombre de cellules dans chaque sous-population. Nous proposons la terminologie qui distingue par des astérisques le nombre de phases de la synthèse d'ADN commencés ou terminés : 2C°, 4C°, 8C° pour les noyaux des cellules inactives ; S \*, G2 \*, G1 \* pour la première génération ; S \*\*, G2 \*\*, G1\*\* pour la deuxième génération ... Ces "populations en prolifération" peuvent être comptabilisées comme fréquences ou, mieux, comme probabilités qu'une cellule donnée au temps zéro progresserait à une certaine phase (détaillé dans Coba de la Peña et Brown 2001). Car une expression en « fréquences » souffre de l'évolution de l'effectif total par la division cellulaire : ainsi, une cohorte inactive (2C°) voit sa fréquence diminuer dès que



d'autres cellules se divisent.

4. Les échantillons témoins courants sans BrdU doivent donner une corrélation forte entre les deux émissions fluorescentes. Passez ces derniers au début et à la fin de chaque série afin de mesurer le bruit de fond des faux positifs (généralement plusieurs pour cent des noyaux).

#### **Protocole 4 (figure 2) : Incorporation d'EdU**

Les cellules ou plantules sont incubées 3 à 24h (selon la durée du cycle de l'espèce choisie et le but de l'expérience) avec du 5-éthynyl-2'-deoxyuridine (EdU, classiquement 10 $\mu$ M).

Les étapes suivantes peuvent se faire sur cellules ou sur noyaux isolés à partir de racines ou autres organes. Attention à bien adapter les vitesses et les temps de centrifugation au matériel biologique.

Après un lavage, les cellules (ou noyaux isolés) sont fixées avec 3% (m/v) de paraformaldéhyde (PFA) dans du PBS pendant 30 min à température ambiante (TA), puis lavées 2 fois avec du tampon PHB (PBS, 10 mM HEPES, pH 7.4, 30 mg/ml BSA). Pour optimiser la réaction « click » entre le EdU-alkyl et l'AlexaFluor-azide, les cellules fixées sont incubées 30 min à température ambiante dans le tampon de réaction (PHB, pH 7.4, 1,3 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 mM ascorbate de sodium, et 4  $\mu$ M d'AlexaFluor-azide), puis lavées une fois dans du tampon PHB.

On peut ajouter un autre marqueur d'ADN (PI, DAPI, etc.) pour avoir une analyse du cycle biparamétrée (figure 2).

Cette méthode de révélation tend à éteindre la fluorescence des protéines telles que la GFP et ses homologues chromatiques. Pour analyser simultanément le cycle et les protéines fluorescentes, il est indispensable de restaurer la fluorescence éteinte par le cuivre.

Les cellules (ou noyaux isolés) sont incubées pendant 60-90 min à TA dans du tampon PMB (PBS, 10 mM MES, pH 5.0, 30 mg/ml BSA) avec 40 mM EDTA.Na<sub>2</sub>. Les cellules (noyaux isolés) sont ensuite lavées une fois et resuspendues dans du PHB (pH 7.4).

Différentes stratégies de gating sont développées dans (Bourge et al. 2015).

## Références bibliographiques

- Accotto, G-P, PM Mullineaux, SC Brown, and D Marie. 1993. 'Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells', *Virology*, 195: 257-59.
- Birnbaum, Kenneth, Dennis E Shasha, Jean Y Wang, Jee W Jung, Georgina M Lambert, David W Galbraith, and Philip N Benfey. 2003. 'A gene expression map of the Arabidopsis root', *Science*, 302: 1956-60.
- Bourbousse, Clara, Imen Mestiri, Gerald Zabulon, Mickaël Bourge, Fabio Formiggini, Maria A Koini, Spencer C Brown, Paul Fransz, Chris Bowler, and Fredy Barneche. 2015. 'Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: E2836-E44.
- Bourge, Mickaël, Cécile Fort, Marie-Noëlle Soler, Béatrice Satiat-Jeunemaître, and Spencer C Brown. 2015. 'A pulse-chase strategy combining click-EdU and photoconvertible fluorescent reporter: tracking Golgi protein dynamics during the cell cycle', *New Phytologist*, 205: 938-50.
- Brown, Spencer C, Susanne Bolte, Marie Gaudin, Claudia Pereira, Jessica Marion, Marie-Noëlle Soler, and Béatrice Satiat-Jeunemaitre. 2010. 'Exploring plant endomembrane dynamics using the photoconvertible protein Kaede', *The Plant Journal*, 63: 696-711.
- Brown, Spencer, Jean-Pierre Renaudin, C Prevot, and Jean Guern. 1984. 'Flow cytometry and sorting of plant protoplasts: technical problems and physiological results from a study of pH and alkaloids in *Catharanthus roseus*', *Physiol Veg*, 22: 541-54.
- de La Pena, Teodoro Coba, and Spencer Brown. 2001. "Flow cytometry." In.: Oxford University Press.
- Desikan, Radhika, Dik Hagenbeek, Steven J Neill, and Christopher D Rock. 1999. 'Flow cytometry and surface plasmon resonance analyses demonstrate that the monoclonal antibody JIM19 interacts with a rice cell surface component involved in abscisic acid signalling in protoplasts', *FEBS letters*, 456: 257-62.
- Doležel, Jaroslav, Johann Greilhuber, and Jan Suda. 2007. 'Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry', *Nature protocols*, 2: 2233.
- Domenichini, Séverine, Moussa Benhamed, Geert De Jaeger, Eveline Van De Slijke, Sophie Blanchet, Mickaël Bourge, Lieven De Veylder, Catherine Bergounioux, and Cécile Raynaud. 2012. 'Evidence for a role of Arabidopsis CDT1 proteins in gametophyte development and maintenance of genome integrity', *The Plant Cell*, 24: 2779-91.
- Godelle, Bernard, Delphine Cartier, Dominique Marie, Spencer C Brown, and Sonja Siljak-Yakovlev. 1993. 'Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition', *Cytometry Part A*, 14: 618-26.
- Hajrudinović, Alma, Sonja Siljak-Yakovlev, Spencer C Brown, Fatima Pustahija, Mickael Bourge, Dalibor Ballian, and Faruk Bogunić. 2015. 'When sexual meets apomict: genome size, ploidy level and reproductive mode variation of *Sorbus aria* sl and *S. austriaca* (Rosaceae) in Bosnia and Herzegovina', *Annals of botany*, 116: 301-12.
- Lamotte, Olivier, Kevin Gould, David Lecourieux, Anabelle Sequeira-Legrand, Angela Lebrun-Garcia, Jörg Durner, Alain Pugin, and David Wendehenne. 2004. 'Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein', *Plant Physiology*, 135: 516-29.
- Pfündel, Erhard, and Armin Meister. 1996. 'Flow cytometry of mesophyll and bundle sheath chloroplast thylakoids of maize (*Zea mays* L.)', *Cytometry Part A*, 23: 97-105.
- Pirrello, Julien, Matthieu Bourdon, Catherine Cheniclet, Mickaël Bourge, Spencer C Brown, Jean-Pierre Renaudin, Nathalie Frangne, and Christian Chevalier. 2014. 'How fruit developmental

- biology makes use of flow cytometry approaches', *Cytometry Part A*, 85: 115-25.
- Raynaud, Cécile, Claudette Perennes, Christophe Reuzeau, Olivier Catrice, Spencer Brown, and Catherine Bergounioux. 2005. 'Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 8216-21.
- Šafář, Jan, Jan Bartoš, Jaroslav Janda, Arnaud Bellec, Marie Kubaláková, Miroslav Valárik, Stéphanie Pateyron, Jitka Weiserová, Radka Tušková, and Jarmila Číhalíková. 2004. 'Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat', *The Plant Journal*, 39: 960-68.
- Siljak-Yakovlev, Sonja, ME Solic, Olivier Catrice, Spencer C Brown, and D Papes. 2005. 'Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from the Dalmatia region', *Plant Biology*, 7: 397-404.
- Waara, Sylvia, and Kristina Glimelius. 1995. 'The potential of somatic hybridization in crop breeding', *Euphytica*, 85: 217-33.
- Weir, Iona E, Ratnasiri Maddumage, Andrew C Allan, and Ian B Ferguson. 2005. 'Flow cytometric analysis of tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cells', *Cytometry Part A*, 68: 81-91.

**Figure 1.** Le tissu végétal se prête mal à la cytométrie en flux. (a) Racine intacte d'*Arabidopsis thaliana* avec marquage des parois, imagée par microscopie confocale. Les astérisques marquent les cellules du centre quiescent, qui est entouré de quelques cellules souches. (b) Les cultures cellulaires ne donnent pas de cellules individualisées : ici, un amas typique de quatre cellules de tabac BY2, avec les vacuoles en rendu surfacique. (c, d) La digestion des parois dans un milieu de forte osmolarité (500-800 mosmol) libère des protoplastes convenables pour la cytométrie : (c) protoplaste de mésophylle (foliaire), avec de nombreux chloroplastes et de l'amidon fortement réfringent et diffusant ; (d) protoplaste de cellule BY2 en culture. n, noyau ; v, vacuole centrale. L'analyse cytométrique de la quantité d'ADN nucléaire est optimale sur des noyaux isolés. (e) Le tri de noyaux spécifiques est intéressant, comme ici, montrant une partie des 50 000 noyaux recueillis sur une membrane pour la biologie moléculaire (vue en épifluorescence ; échelle en  $\mu\text{m}$ ).

**Figure 2.** Histogrammes obtenus par cytométrie après marquage nucléaire d'une culture de tabac BY2 par l'iodure de propidium (a,b). (a) Protoplastes entiers fixés : la quantification est décalée vers les hautes valeurs. Ceci est dû à des marquages non spécifiques et la contribution des nucléoïdes des organites endosymbiotiques (plastides, mitochondries). Le Coefficient de Variation est d'environ 9% et une analyse statistique pour déterminer les proportions G1, S, G2 sera peu précise. (b) Noyaux extraits de ces mêmes protoplastes : le CV est d'environ 4% et une analyse statistique sera justifiée et plus fiable. Les fréquences déduites sont 60% en G0-G1, 15% en S et 25% en G2. Les Mitoses sont éclatées par l'étape d'isolement. « C » est la quantité d'ADN correspondant à un complément de chromosomes. (c) Analyse biparamétrée du cycle cellulaire de protoplastes de BY2. Après 90 min d'incubation d'une culture cellulaire de BY2 avec EdU, les protoplastes sont préparés et fixés, l'EdU est révélé par un AlexFluor647-azide et l'ADN est contre-marqué avec 5µg/ml DAPI. Contrairement au marquage monoparamétré en (a), les phases G1 et G2 négatives en EdU sont clairement délimitées, pendant que l'incorporation du EdU identifie les cellules entrant en phase S celle en pleine phase S, en plus de celles qui ont fini la phase S et entrent en G2 pendant l'incubation de 90 min.

**Figure 3.** *Hoechst Quenching Assay* : Identification des cellules passant (ou ayant passé) par une phase de synthèse d'ADN d'après l'extinction de la fluorescence de bisbenzimidazole Hoechst (Protocole 3). Cytogrammes de noyaux isolés de cultures cellulaires A2 de luzerne  $\pm$  BrdU, marqués à Hoechst 33258 (HO) et iodure de Propidium (IP). (a) Contrôle sans BrdU. Tous les noyaux, actifs ou pas, se trouvent sur une simple corrélation des deux fluorescences. (b) Culture synchronisée avant l'addition de BrdU pendant 4 h. Pour les noyaux actifs, le marquage IP augmente proportionnellement plus que celui du Hoechst, se déplaçant par S\* et G2\*. Beaucoup de cellules 2C° (inactives) et quelques 4C° inactives apparaissent. (c) Culture asynchrone avant l'addition de BrdU pendant 4 h. Les noyaux actifs forment une courbe typique, avec S\* entre 2C° et G2\* : d'autres, déjà en S lors de l'apport de BrdU, forment une courbe entre G2\* et 4C°. (d et e) Culture asynchrone lente sans (d) ou avec (e) auxine, avec BrdU pendant 30 h. L'ajout d'hormone a fait progresser une cohorte cellulaire à travers G2\* suivi d'une cytokinèse, jusqu'à G1\*, positionné exactement à mi-chemin en direction de l'origine (0,0). On relève de ces cytogrammes que la probabilité qu'une cellule entre en prolifération passe de 0,167 à 0,652 en présence d'auxine. Voir #3 sous Protocole 3. (D'autres expériences ont révélé parfois un deuxième tour de synthèse, vers G2\*\*, et même un nuage de points à la position marquée « A » correspondant aux noyaux apoptotiques.) (f) Utilisant des échelles logarithmiques, cette méthode permet l'analyse de plusieurs cycles imbriqués dus à la polysomatie. (Figure 3 de Coba de la Peña et Brown (2001) reproduit avec l'autorisation d'Oxford University Press).

**Figure 4.** Au cours du développement, des cellules végétales peuvent proliférer de manière classique (G1/S/G2/M/Gap1...) comme dans le méristème (en haut) de nodosité racinaire chez la luzerne annuelle (*Medicago truncatula*). L'endoréplication résulte d'une entrée des cellules dans des nouveaux tours de Synthèse, interrompus d'un « *Gap endoreplication (Ge)* » sans passer par la Mitose, aboutissant à d'énormes cellules polyploïdes. Les histogrammes représentant la distribution des quantités d'ADN nucléaire de ces tissus sont indiqués. Le passage du cycle mitotique au cycle d'endoréplication est irréversible (collaboration P.Mergaert et E.Kondorosi).

**Figure 5.** L'endoréplication nucléaire dans le développement d'*Arabidopsis thaliana* ecotype Bensheim. Les tissus ont été hachés pour isoler des noyaux qui sont ensuite analysés par cytométrie après coloration avec bisbenzimidazole Hoechst 33342, DAPI ou iodure de propidium. Les histogrammes correspondants indiquent des noyaux jusqu'au 64C (C = quantité d'ADN dans un complément chromosomique), notamment dans les tissus complexes comme le pétiole de la feuille de rosette. Les noyaux ayant une ploïdie 2C sont plutôt rares dans les organes matures, toutefois ils abondent dans les pointes méristématiques et les cellules de garde des stomates.



**Figure 6.** Quantification d'ADN par cytométrie avec étalon interne. Utilisant un fluorochrome intercalant de l'ADN de manière stœchiométrique, on calcule le rapport d'intensité d'émission de fluorescence des noyaux des deux espèces. Par exemple, dans cet histogramme ce rapport est 0,430.

Etant donné que la taille du génome de *Petunia hybrida* PxPC6 est  $2C = 2,85$  pg (soit 2,790 milliards de paires de bases, Gbp), on déduit  $2C_{\text{bananier}} = 1,23$  pg (1,200 Gbp), ici *M. ornata* ( $2n=2x=22$ ). La présence de noyaux en prolifération ou à d'autres niveaux de ploïdie n'interfère pas avec ce calcul fait à partir de la position (moyennes ou modes) des pics majeurs,  $2C$ .

Figure 1

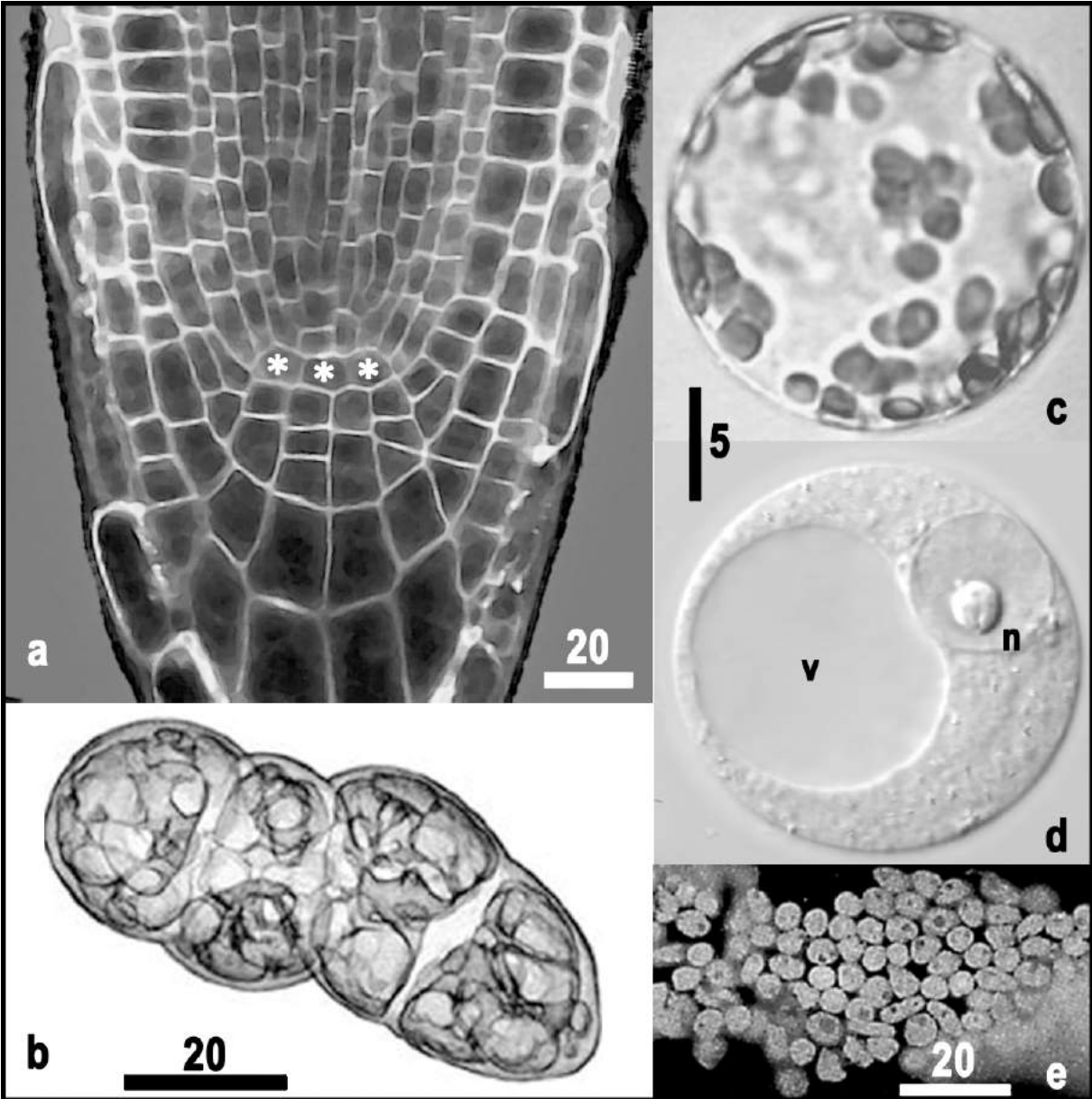


Figure 2

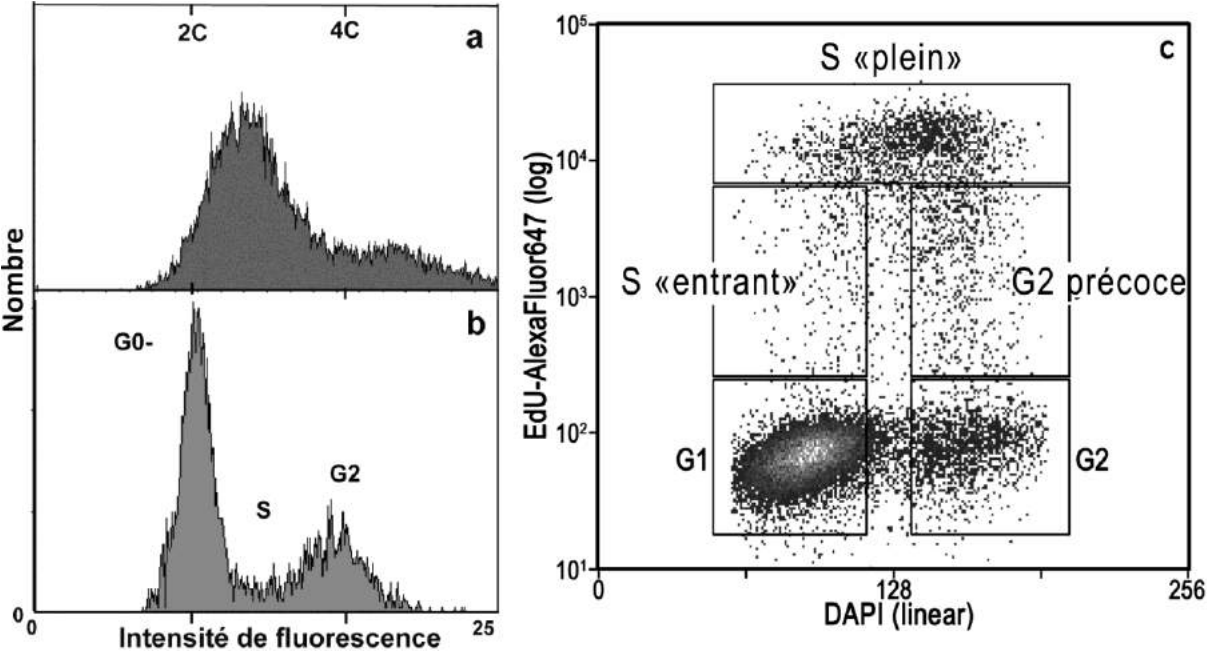


Figure 3

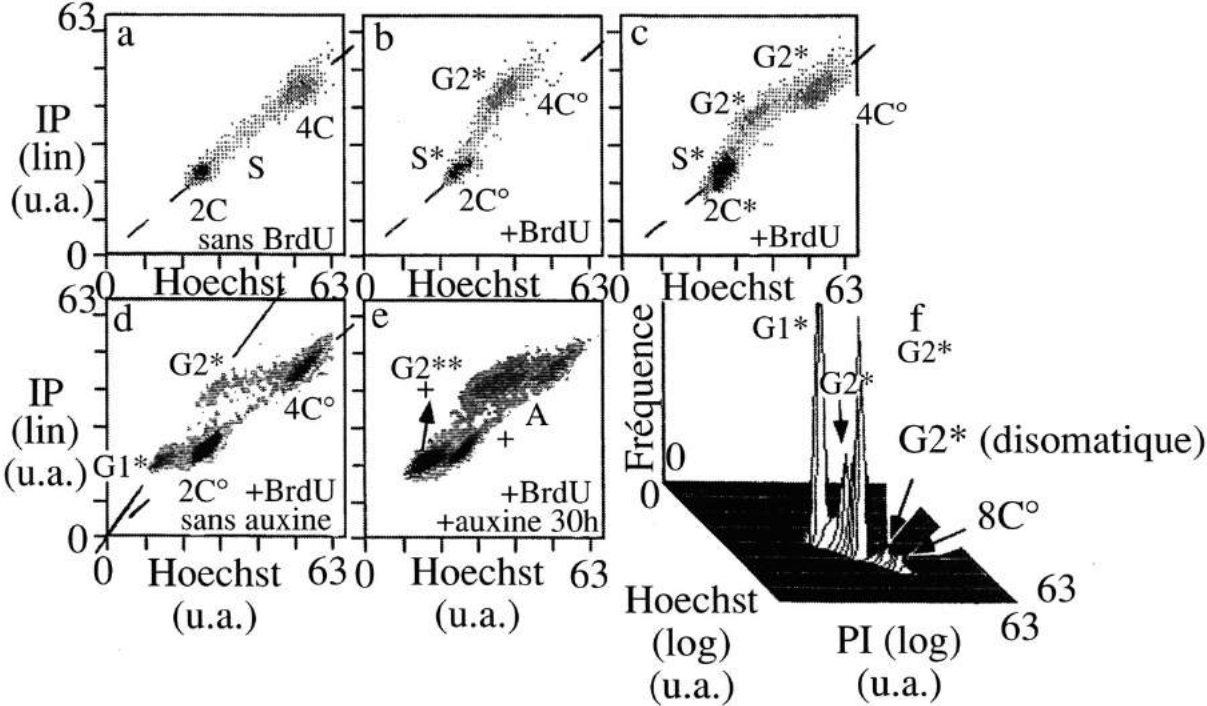


Figure 4

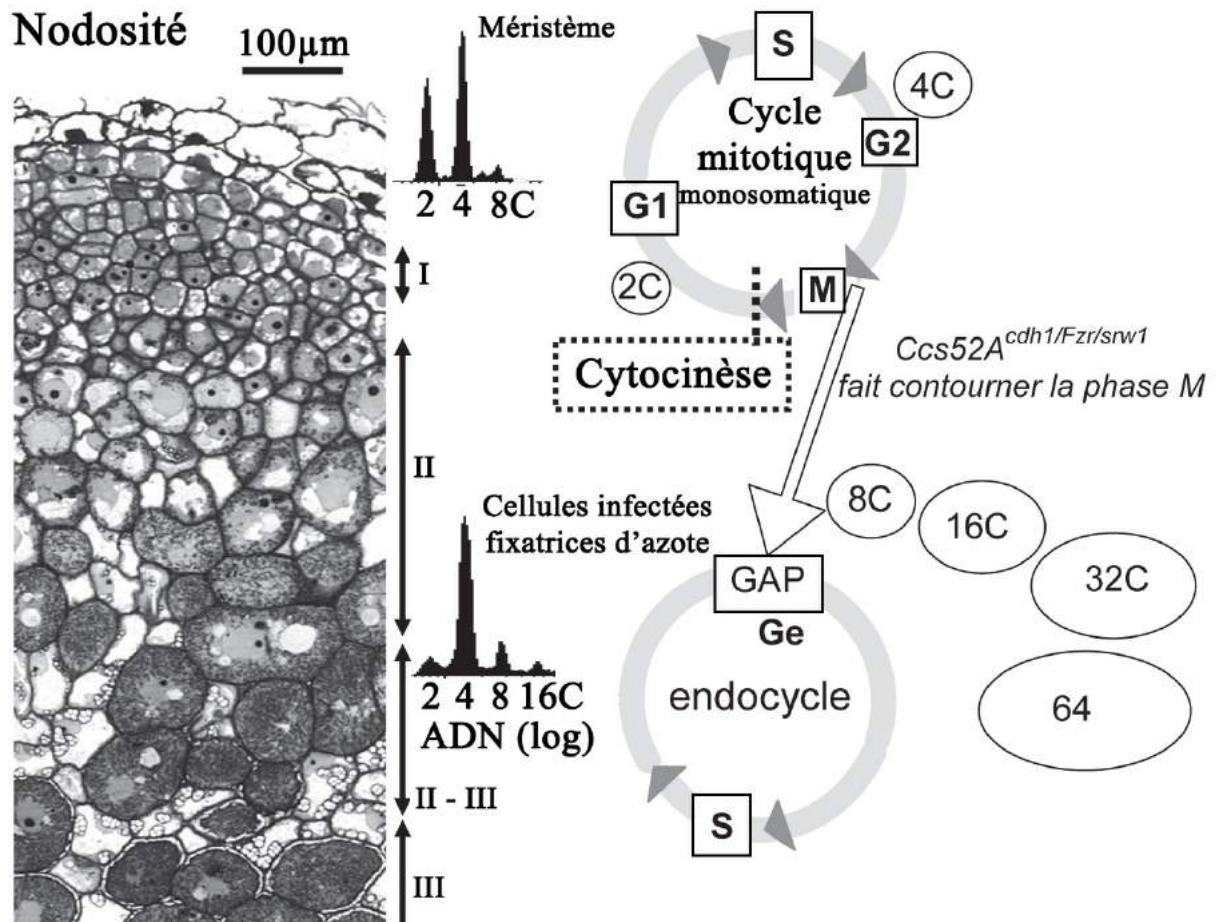


Figure 5

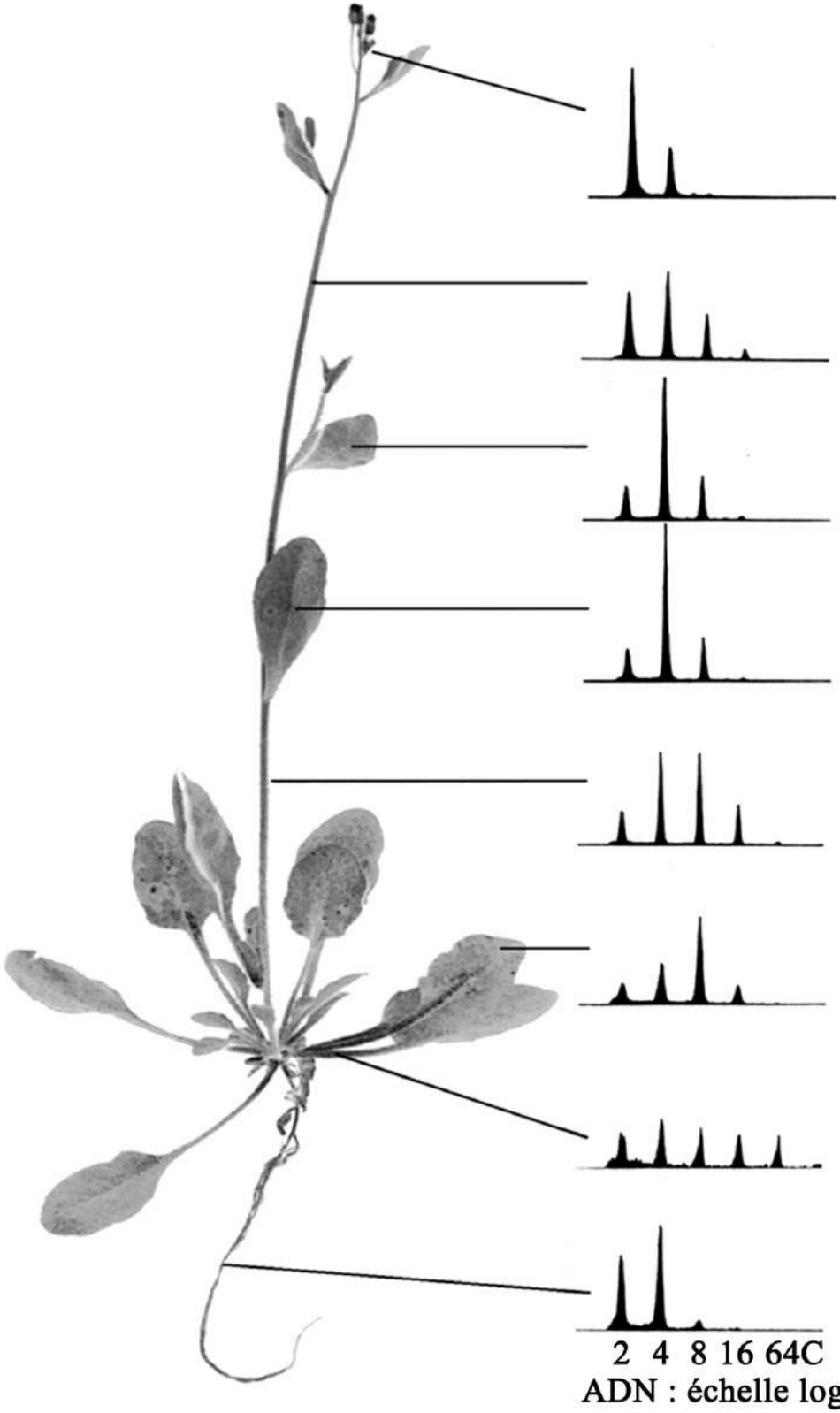
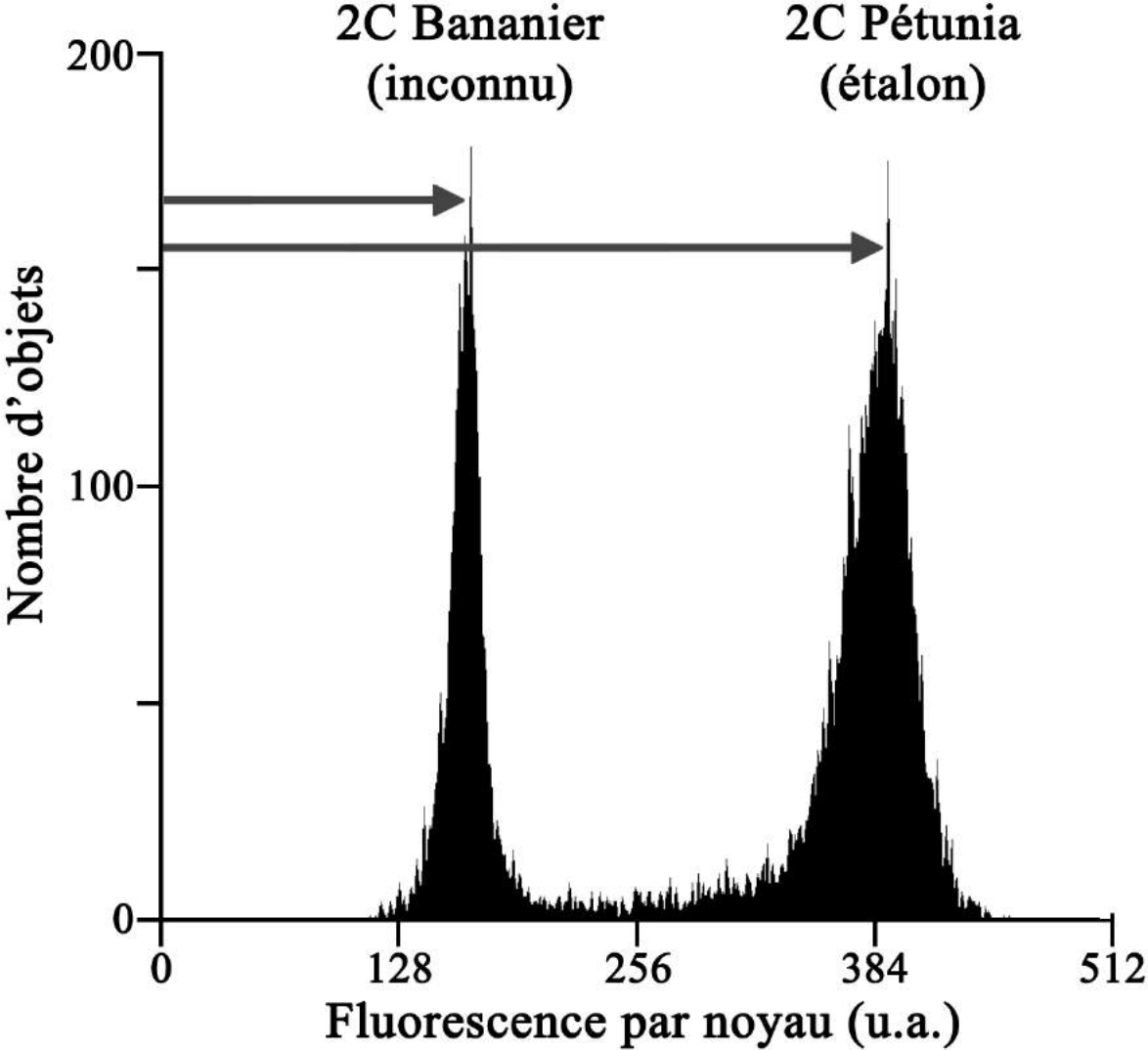


Figure 6

$$2C_{\text{bananier}} = \frac{\text{intensité}_{\text{test}}}{\text{intensité}_{\text{étalon}}} \times 2C_{\text{étalon}}$$



**Tableau 1.** Quelques plantes supérieures utiles comme étalon pour la mesure de taille de génome

| Nom courant <sup>a</sup> | Espèce et cultivar   | 2C ADN (pg) <sup>b</sup> | Composition en base (GC %) |
|--------------------------|--|--------------------------|----------------------------|
| Arabidopsis              | <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh ecotype Columbia ou Bensheim        | 0,33                     | 40,3                       |
| sauge                    | <i>Salvia brachyodon</i> Vandas  | 0,95                     | 38,5                       |
| luzerne annuelle         | <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. cv R108-1                             | 0,98                     | 38,1                       |
| riz                      | <i>Oryza sativa</i> L. "IR-36"   | 1,00                     | -                          |
| riz                      | <i>Oryza sativa</i> ssp. Japonica 'Nipponbare'                           | 0,90                     | -                          |
| tomate                   | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill, cv Roma (ou Montfavet 3/5)          | 1,99                     | 40,0                       |
| pétunia                  | <i>Petunia hybrida</i> (Hort.) PxPc6                                     | 2,85                     | 41,0                       |
| luzerne pérenne          | <i>Medicago sativa</i> L. subsp x varia (Martyn) Arcangeli cv Rambler A2 | 3,47                     | 38,7                       |
| petit pois               | <i>Pisum sativum</i> L. cv Express Long                                  | 8,37                     | 40,5                       |
| orge                     | <i>Hordeum vulgare</i> L. cv Sultan                                      | 9,81                     | -                          |
| armoise                  | <i>Artemisia arborescens</i> L. (origine Crête)                          | 11,43                    | -                          |
| blé                      | <i>Triticum aestivum</i> L. cv Triple Dirk (ou Chinese Spring)           | 30,90                    | 43,7                       |

<sup>a</sup> Il s'agit de plantes diploïdes sauf pour la luzerne pérenne tétraploïde et le blé hexaploïde.

<sup>b</sup> 1 pg ADN = 978 Mbp (from Dolezel)

**Tableau 2.** Tampon d'extraction nucléaire Gif Nuclear Buffer (GNB)

| Concentration Finale | Produit  | PM  | Masse/Volume Final      |
|----------------------|--|-----|-------------------------|
| 45 mM                | MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                                     | 203 | 9,15 g/L                |
| 30 mM                | citrate.Na <sub>3</sub>  | 294 | 10,72 g/L               |
| 60 mM                | MOPS acide pH 7,0  | 209 | 12,57 g/L               |
| 1%                   | PVP 10000  | -   | solution stock à 10%    |
| 0,1 % (m/v)          | Triton X-100   | -   | 10 mL/L d'un stock 10 % |
| 10 mM                | Metabisulfite de sodium (S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> ) | 190 | Solution stock à 1M     |