

# **Cytométrie en flux et système d'eau ultrapure arium® pour comprendre plus facilement les secrets de la reproduction des plantes**

*Cytométrie en flux appliquée à la biologie de la reproduction végétale*

*Pour en savoir plus : [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)*

## **Introduction**

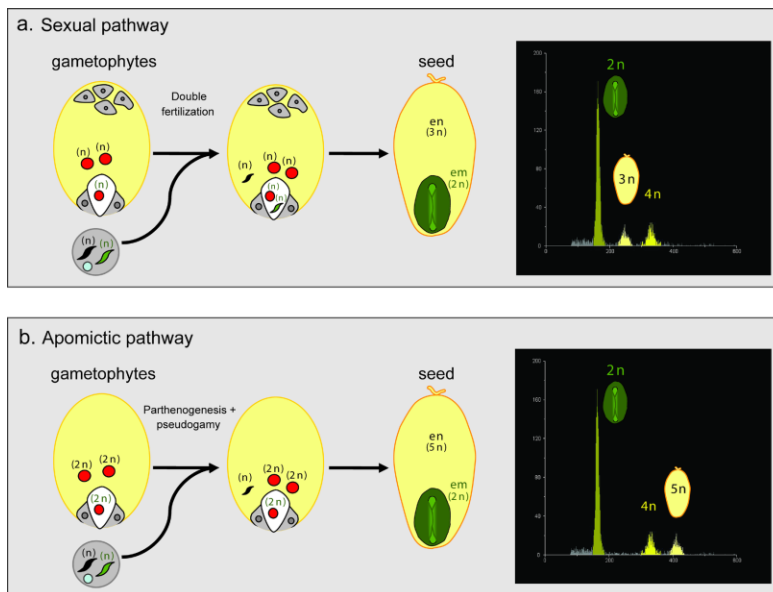
De nos jours, pour préserver la nature, il est primordial de savoir comment la biodiversité est répartie dans la nature et comment elle est affectée par l'activité de l'homme. Par ailleurs quand on analyse la biodiversité, il est essentiel de comprendre la dynamique et la répartition géographique de la variabilité génétique dans les populations naturelles. Les angiospermes (ou plantes à fleurs) présentent différents modes de transmission héréditaire et différents schémas d'information génétique selon les individus. Les principaux mécanismes qui génèrent et exploitent une variation génétique reposent sur diverses stratégies de reproduction utilisées par les plantes, allant de la pollinisation croisée imposée à la multiplication asexuée avec des semences (apomixie) en passant par différents syndromes intermédiaires (par ex. [1]). À la différence des espèces qui se reproduisent sexuellement, les plantes apomictiques facultatives peuvent produire des graines dérivées par reproduction sexuée et asexuée grâce à la formation de gamétophytes femelles non réduits [2].

Il y a quelques décennies encore, l'utilisation de techniques de micro-sectionnement chronophages était la seule manière de connaître avec certitude ces processus de reproduction végétale, et c'est ainsi que la plupart des différents schémas de développement reproducteur actuellement connus avaient été établis [3, 4]. Néanmoins, la mise au point de nouvelles technologies nous permet à présent de comprendre plus facilement et plus rapidement les principaux syndromes reproducteurs des plantes (reproduction sexuée et reproduction asexuée : voir illustration 1) en utilisant des méthodologies spéciales, par ex. la cytométrie en flux (CMF).

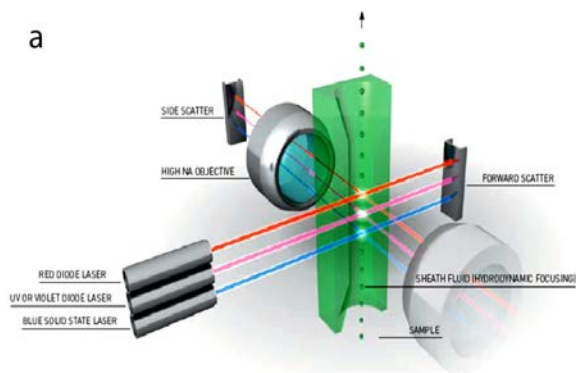
Bien qu'un prototype ait déjà été breveté en 1953, le premier système de cytométrie en flux basé sur la fluorescence n'a été développé par Wolfgang Göhde de l'Université de Muenster (Allemagne) qu'en 1968 et commercialisé pour la première fois en 1968-69 par Partec par l'intermédiaire de Phywe AG (Goettingen) [5, 6].

A l'origine, la cytométrie en flux était destinée à des applications médicales, mais plus tard, elle a été utilisée dans différents secteurs pour des applications telles que le comptage des cellules, le tri cellulaire, la détection par biomarqueur, etc. [6]. Bien que le premier article traitant de l'analyse des noyaux cellulaires des plantes à l'aide de la cytométrie en flux ait été publié en 1973 [7], ce n'est qu'à la fin des années 80 que la cytométrie en flux a fait une percée dans l'analyse de l'ADN des plantes, quand des chercheurs ont commencé à l'appliquer à plusieurs reprises aux plantes. En fait, les botanistes utilisent la cytométrie en flux pour mesurer le taux d'ADN des noyaux cellulaires des plantes. Pour une description détaillée des principes et applications d'analyse cellulaire des plantes par cytométrie en flux, voir [8]. L'illustration 2a montre une vue d'ensemble de la manière dont le cytomètre en flux aligne des particules colorées ou ciblées (de taille comprise entre 0,2 et 150  $\mu\text{m}$ , [6]) en les mettant en suspension dans un flux liquide concentré de manière hydrodynamique à travers un équipement de détection électronique. Dans la recherche sur les plantes, les noyaux

cellulaires (c'est-à-dire les particules) sont colorés avec un marqueur fluorescent (par ex. DAPI ou iodure de propidium). Ensuite, chaque noyau cellulaire en suspension est exposé à un faisceau de lumière (habituellement laser ou lumière UV). Le rayon de lumière est alors dispersé et perçu par des détecteurs qui analysent l'intensité de fluorescence de chaque particule pour fournir des informations sur le taux d'ADN du noyau cellulaire. Les données qui sont regroupées pour plusieurs milliers de noyaux cellulaires intacts fournissent des informations sur le taux d'ADN des tissus respectifs (voir les pics sur l'illustration 1). Etant donné que les caractéristiques physiques et/ou chimiques de milliers de particules par seconde sont analysées simultanément, la qualité et la pureté des solutions utilisées pour préparer et examiner les échantillons jouent un rôle essentiel.



**Illustration 1.** Représentation schématique des voies de reproduction chez les espèces apomictiques facultatives. La structure du sac embryonnaire et la ploïdie de cellules déterminent la proportion relative du taux d'ADN embryon/endosperme. Dans la voie sexuée (a), la double fécondation entraîne la formation d'un embryon  $2n$  ( $2C$ ) et d'un endosperme  $3n$  ( $3C$ ) dont on peut distinguer les cellules grâce à la position relative des pics dans les histogrammes cytométriques en flux. Dans la voie asexuée (b), la fécondation se produit uniquement dans la cellule centrale du sac embryonnaire non réduit. Un embryon parthénogénétique  $2n$  ( $2C$ ) et un endosperme pseudogame  $5n$  ( $5C$ ) se forment, ce qui entraîne une configuration différente des pics de l'histogramme. em : embryon ; en : endosperme (schéma tiré de [9, informations complémentaires]).



**Illustration 2. a.** Vue d'ensemble schématique d'un système typique de cytométrie en flux (reproduite avec l'aimable autorisation de M. Steinberg). Les informations provenant de chaque noyau cellulaire végétal sont recueillies par différents détecteurs : un détecteur aligné sur le faisceau lumineux (diffusion frontale) et plusieurs détecteurs placés à la perpendiculaire (diffusions latérales). **b.** Système CyFlow (Partec) installé dans le Département de Botanique systématique, Institut de sciences végétales Albrecht-von-Haller, Université Georg-August de Goettingen.

Quand on utilise un système d'alimentation en eau de faible qualité ou inappropriée, la présence de particules contaminantes ne faisant pas partie de l'échantillon peut également révéler de la fluorescence et créer du « bruit », ce qui interfère avec les résultats et entraîne des évaluations imprécises. Voilà pourquoi il est obligatoire d'utiliser de l'eau ultrapure de grande qualité.

La société Sartorius de Goettingen en Allemagne propose une série de systèmes qui produisent de l'eau ultrapure ASTM classe I. Afin d'évaluer les effets de l'eau ultrapure (ArUP<sub>H2O</sub>) produite par le système arium® pro VF sur la qualité des résultats obtenus par analyse cytométrique en flux, nous avons examiné ici les voies de reproduction utilisées par un angiosperme apomictique facultatif pour produire des graines. Nous avons utilisé de l'ArUP<sub>H2O</sub> pour réaliser les échantillons et nous avons comparé les résultats à ceux obtenus avec la solution de liquide de gaine standard (0,04% d'azide de sodium, 0,01% de détergent).

## Description du système d'eau ultrapure arium® pro VF

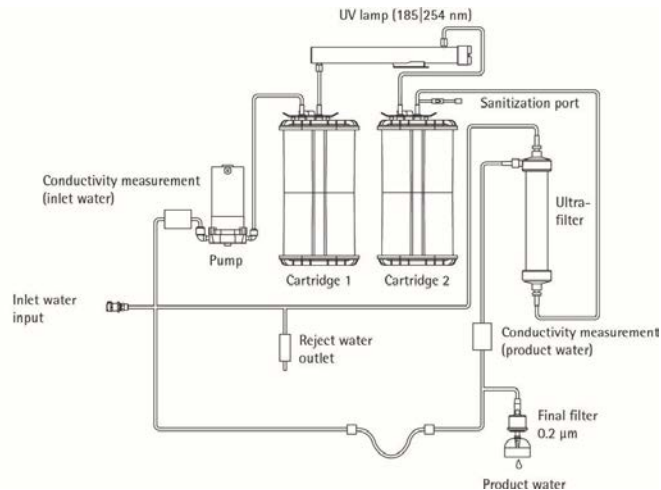


**Illustration 3 :** Système d'eau ultrapure arium® pro VF (photo reproduite avec l'aimable autorisation de Sartorius)

Conçu pour produire de l'eau ultrapure à partir d'une eau potable prétraitée, le système arium® pro VF (ill. 3) élimine tous les contaminants encore présents dans l'eau potable. Un système de pompe avec une pression contrôlée assure une recirculation permanente et un débit d'eau constant, deux critères nécessaires pour produire de l'eau ultrapure. La conductivité de l'eau est mesurée à l'entrée de l'eau d'alimentation et au niveau du port amont, c'est-à-dire à la sortie de l'eau produite.

Le système arium® pro VF utilisé pour les tests décrits dans cet article (modèle précédent du système arium® pro VF représenté sur la photo ci-dessus, mais présentant la même conception technique) fonctionne avec deux cartouches différentes. Ces cartouches sont remplies d'un adsorbant de charbon actif spécial et de résines échangeuses d'ions à lit mélangé pour fournir de l'eau ultrapure avec un faible taux de COT. De plus, le système est équipé d'une lampe UV intégrée qui a un effet oxydant et bactéricide à des longueurs d'onde de respectivement 185 nm et de 254 nm.

Le système d'eau ultrapure arium® est également doté d'un module d'ultrafiltration intégré qui est utilisé comme filtre de filtration tangentielle. La membrane de l'ultrafiltre retient les colloïdes, les microorganismes, les endotoxines, l'ARN et l'ADN. Un filtre final de 0,2 µm installé à la sortie de l'eau sert à éliminer les particules et les bactéries pendant le soutirage de l'eau ultrapure produite. Le processus destiné à produire de l'eau ultrapure est représenté sur l'illustration 4 (diagramme de flux d'arium® pro VF).



**Illustration 4 :** Diagramme de flux schématique du système d'eau ultrapure arium® pro VF (pour plus de clarté, les vannes et leurs régulateurs ne sont pas représentés).

## Matériel et méthodes

Des échantillons de graines de *Ranunculus carpaticola* hexaploïde ont été recueillis dans des conditions de pollinisation ouverte. Des graines ont été coupées dans une boîte de Petri en plastique contenant 300 µl de tampon d'extraction (CyStain UV Precise P, Partec) et ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante, après quoi les noyaux cellulaires ont été filtrés (pâte de 50 µm, CellTric®) dans un tube en plastique de 5 ml. Ensuite, on a ajouté 1,2 ml de tampon colorant (kit CyStain UV Precise P, Partec) et au bout de 60 secondes, les échantillons ont été analysés dans un cytomètre en flux (CyFlow Space, Partec GmbH, Muenster, Allemagne ; voir illustration 2b) dans le canal de fluorescence bleue. Les paramètres de réglage ont été configurés à l'aide de génotypes diploïdes (2x) ou tétraploïdes (4x) connus de *Ranunculus*. La fluorescence relative d'au moins 2000 noyaux cellulaires individuels par échantillon a été quantifiée et représentée dans un histogramme. La position relative des pics a permis de déterminer les niveaux de ploïdie des tissus de l'embryon et de l'endosperme. Les voies de reproduction suivies pendant la formation des graines ont été reconstruites conformément à [10].

Deux liquides différents ont été utilisés pour entraîner les échantillons : A) un liquide de gaine pour systèmes de flux (Partec) et B) de l'eau ultrapure provenant d'arium® pro VF. Des analyses statistiques pour des comparaisons d'essai ont été réalisées avec une feuille de calcul Excel (Microsoft Office 2007).

## Résultats

La voie de reproduction a été reconstruite pour un total de 61 graines. 30 graines ont été entraînées avec du liquide de gaine et 31 avec de l'ArUP<sub>H2O</sub> (conductivité : 0,055 µS/cm ou une résistivité de 18,2 MΩ x cm compensée à 25°C) conformément au mode opératoire recommandé. On a mesuré en moyenne 2329 noyaux cellulaires par échantillon, ce qui représente 73% du nombre total de particules comptées, tandis que les 27% restants étaient représentés par des noyaux cellulaires dans la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire et par des

signaux de fond. Pour toutes les graines analysées, la position moyenne des pics de l'embryon et de l'endosperme a été calculée sur la base d'un nombre total moyen de noyaux cellulaires rassemblés pour chaque pic. La position relative des noyaux cellulaires sur l'axe x de l'histogramme est basée sur leur ploïdie relative en fonction du tissu d'origine (voir l'illustration 1). Par conséquent, un noyau cellulaire tétraploïde (4n) aura approximativement deux fois plus d'ADN qu'un noyau diploïde (2n), puisqu'il émet un double signal de fluorescence intense et il est ainsi placé à deux fois la distance relative sur l'axe x (illustration 5). L'origine reproductive de chaque graine et la proportion de sexualité et d'apomixie ont été établies après la détermination du pic de l'indice (tableau 1). Différents paramètres statistiques ont été pris en compte pour chaque essai et voie de reproduction afin de comparer les traitements (tableau 2). Des valeurs absolues du coefficient de variation (CV%) ont été obtenues pour chaque échantillon, et les plages par essai et par voie de reproduction ainsi que les valeurs de dissymétrie de chaque tissu d'embryon et d'endosperme sont présentés ici pour tous les échantillons apomictiques et sexués (tableau 2). Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé pour des valeurs moyennes des pics d'embryon et d'endosperme mesurées par échantillon et par traitement avec du liquide (tableau 2).

Tableau 1. Classification de la reproduction de graines de *R. carpaticola* en fonction du rapport des pics embryon/endosperme.

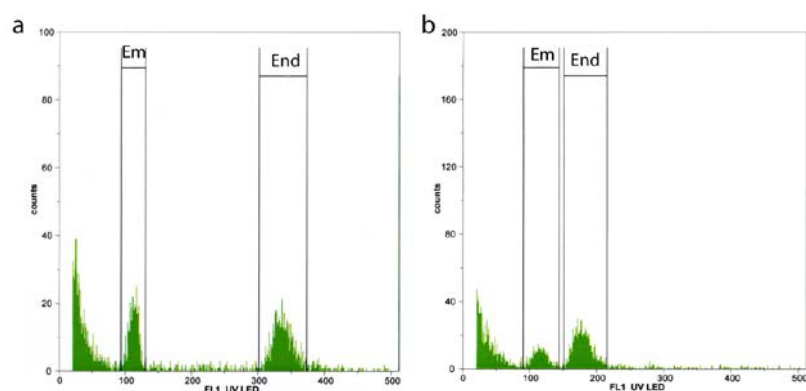
Traitement	Pic de l'indice (plage)	Type de graine	Pourcentage
A	2.67-3.67	Apo	63.3
	1.44-1.96	Sex	36.7
B	2.47-3.85	Apo	71
	1.42-2.06	Sex	29

Apo : graines dérivées par reproduction apomictique. Sex : graines dérivées par reproduction sexuée.

**Tableau 2.** Analyses statistiques des histogrammes de cytométrie en flux de 61 graines de *R. carpaticola*.

Type de graine	Traitement	Tissu	Moyenne	É-type	Dissymétrie	Plage CV%	<i>r</i>
Apo	A	Em	112.75	24.00	2.07	3.74-8.13	0.82
		En	339.16	46.08	0.77	2.8-10.02	
	B	Em	110.00	18.78	1.58	3.74-10.34	0.76
		En	345.78	58.93	-0.07	3.32-11.92	
Sex	A	Em	190.04	43.00	-0.61	4.04-7.48	0.85
		En	297.64	69.07	0.72	3.93-8.22	
	B	Em	170.78	46.97	0.07	3.91-9.69	0.86
		En	299.46	86.94	0.41	4.13-9.23	

Apo : graines dérivées par reproduction apomictique. Sex : graines dérivées par reproduction sexuée. Em : embryon. En : endosperme. MOYENNE : valeur de pic moyenne. É-type : écart-type. *r* : coefficient de corrélation de Pearson.



**Illustration 5 :** Histogrammes de flux de graines de *R. carpaticola* hexaploïde. L'axe *x* représente la fluorescence relative de chaque particule mesurée, tandis que les nombres de particules sont représentés sur l'axe *y*. **a.** Histogramme d'une graine dérivée par reproduction apomictique montrant une valeur de rapport des pics Em:En de 3,15. **b.** Histogramme d'une graine dérivée par reproduction sexuée avec une valeur de rapport des pics Em:En de 1,48.

## Discussion

Les cytotypes hexaploïdes de *Ranunculus carpaticola* sont des plantes apomictiques facultatives qui utilisent diverses stratégies de reproduction pour créer de nouveaux individus dans des populations naturelles (par ex. [11]). Le triage de graines par cytométrie en flux est une méthode utile, facile à appliquer et intemporelle pour l'évaluation des stratégies de reproduction des plantes à graines. Les deux traitements indépendants utilisés ici (liquide de gaine et ArUP<sub>H2O</sub>) ne montrent pas de différences significatives dans la qualité et la position des pics ni dans les plages des pics d'indice.

Le coefficient de variation est une mesure normalisée utilisée pour quantifier la dispersion ou le regroupement d'un ensemble d'évènements observés, en comparaison avec une distribution de probabilité standard ou une distribution de fréquence (un modèle statistique supposé). Les valeurs absolues du CV ou de l'écart-type relatif (RSD ou %RSD) correspondent aux valeurs du CV exprimées en pourcentage. Dans ce cas, bien que les valeurs CV% maximum aient été légèrement plus élevées quand on a utilisé de l'ArUP<sub>H2O</sub>, la différence par rapport au traitement avec du liquide de gaine était toujours inférieure aux valeurs CV% minimum, ce qui montre un niveau identique de dispersion des comptes entre les traitements. De plus, bien que les pics en forme de cloche ont tendance à avoir des queues droites plus longues (dissymétrie positive), les valeurs sont proches de zéro, ce qui indique que le pic a une forme presque symétrique autour de la moyenne. De plus, la corrélation élevée observée entre les valeurs des pics de l'embryon et de l'endosperme indique que l'utilisation d'ArUP<sub>H2O</sub> n'affecte pas l'intensité relative moyenne de la fluorescence mesurée lorsqu'on évalue les populations de noyaux cellulaires, empêchant ainsi des corrélations déformées et maintenant une dispersion des valeurs à l'intérieur des rapports escomptés pour les pics d'embryon/endosperme.

Toutefois, les proportions de graines sexuées et de graines asexuées étaient semblables dans les deux traitements, comme prévu lorsqu'on utilise des échantillons aléatoires. Ces résultats indiquent que la détermination des origines reproductives n'est pas biaisée par un déplacement disproportionné de la position des pics entre les traitements.

Dans l'ensemble, un nombre relativement faible de divergences dans les résultats obtenus montre que le système arium® est une alternative peu coûteuse et efficace en termes de temps pour analyser des ploïdies relatives dans des matières végétales. La qualité élevée de l'eau sans particules produite par le système arium® a prouvé que l'eau est efficace pour fournir des résultats reproductibles dans le triage de graines par cytométrie en flux. Toutefois, étant donné que les additifs tels que les antibiotiques et les détergents ont des effets positifs à court et à long terme sur le fonctionnement fiable du système de cytométrie en flux en empêchant la formation d'un biofilm et en améliorant l'humidification des surfaces intérieures des récipients, des conduites, des vannes et des cellules d'écoulement, il est recommandé à l'utilisateur d'ajouter de telles substances à un liquide de gaine qu'il a préparé lui-même (M. Steinberg, comm. pers. ; Partec).

En résumé, l'ArUP<sub>H2O</sub> peut être facilement utilisé pour la cytométrie en flux de cellules végétales. Étant donné que la cytométrie en flux gagne en importance dans d'autres applications, telles que la détection de cellules tumorales, l'estimation quantitative et la différenciation morphologique de cellules, l'analyse du cycle cellulaire, les estimations du taux d'ADN/ARN, les mesures de l'apoptose, etc., le fait que l'ArUP<sub>H2O</sub> soit parfaitement adapté ouvre de nouvelles possibilités pour le système d'eau ultrapure arium® dans diverses applications qui utilisent la technologie émergente de la cytométrie en flux.

## Bibliographie

- 1.) **Johri BM. 1984.** Embryology of angiosperms. Berlin, G : éditions Springer.
- 2.) **Nogler GA. 1984.** Gametophytic apomixis. Dans : Johri BM ed. Embryology of angiosperms. Berlin, G : éditions Springer, p. 475–518.



- 3.) **Battaglia E. 1951.** The male and female gametophytes of angiosperms - an interpretation. *Phytomorphology* 1: 87-116.
- 4.) **Asker SE, Jerling L. 1992.** Apomixis in plants. Boca Raton, USA: CRC Press.
- 5.) **Dittrich W, Göhde W. 1968.** Brevet DE 1815352, Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion.
- 6.) [http://en.wikipedia.org/wiki/Flow\\_cytometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry)
- 7.) **Heller FO. 1973.** DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437-441.
- 8.) **Doležel J. 1991.** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis* 2: 143-154.
- 9.) **Hojsgaard DH, Martínez EJ, Quarin CL. 2013.** Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist* 197: 336–347. *Informations complémentaires dans la version en ligne de cet article.*
- 10.) **Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000.** An efficient screen for the reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal* 21: 97–108.
- 11.) **Paun O., Hörandl E. 2006.** Evolution of Hypervariable Microsatellites in Apomictic Polyploid Lineages of *Ranunculus carpaticola*: Directional Bias at Dinucleotide Loci. *Genetics* 174: 387-398

## Remerciements

Nous aimerions remercier Matthias Steinberg de Partec GmbH (Muenster) pour ses discussions et suggestions utiles et pour nous avoir fourni le schéma du système de cytométrie en flux. Nos remerciements vont également au Prof. Dr Elvira Hörandl et au Dr Simone Klatt, Département de Botanique systématique, Université Georg-August de Goettingen, pour leur lecture critique du manuscrit.

## Auteurs :

Dr Diego H. Hojsgaard, Institut de sciences végétales Albrecht-von-Haller, Département de Botanique systématique, Université de Goettingen, Allemagne.

E-mail : [Diego.Hojsgaard@biologie.uni-goettingen.de](mailto:Diego.Hojsgaard@biologie.uni-goettingen.de)

Dr Elmar Herbig, Sartorius AG, Goettingen, Allemagne

*Date :15 août 2013*