

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude du cycle cellulaire de protoplastes régénérants de *Festuca arundinacea* (L.) Schreb.

GILLARDIN, Daniel

Award date:
1988

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1988



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Etude du cycle cellulaire de
protoplastes régénérants de
Festuca arundinacea (L.) Schreb.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Daniel GILLARDIN.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.

Facultés des Sciences

rue de Bruxelles,61. B-5000 NAMUR

Tél: 081/22 90 61 Télex 59222 facnam Téléfax 081/23 03 91

Etude du cycle cellulaire de protoplastes régénérants de *Festuca arundinacea* (L.) Schreb.

GILLARDIN Daniel

Résumé

Nous avons étudié les 24 premières heures du cycle de développement de protoplastes de *Festuca arundinacea* (L.) Schreb., une graminée prairiale. Nous avons mis en évidence, chez les protoplastes plurinucléés, une vague de cytokinèse par bourgeonnement sans caryocinèse apparente. Cette étape de bourgeonnement est favorablement influencée par un traitement au diméthyl sulfoxyde (DMSO), un composé connu pour sa capacité à associer la tubuline en microtubules *in vitro*. Une analyse en cytofluorimétrie en flux (FACS) révèle une synthèse simultanée de matériel nucléaire et de polysaccharides pariétaux avant le bourgeonnement. Cette étape, non stimulée par le DMSO, n'impliquerait pas l'action des microtubules.

Memoire de Licence en Sciences Biologiques

Septembre 1988

Laboratoire de Biotechnologie Théorique

Promoteur: Prof. P. VAN CUTSEM

Je m'en voudrais de remettre ce travail sans remercier le professeur P. Van Cutsem et les membres du laboratoire pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté et pour la patience qu'ils ont eu à mon égard.

Sans oublier tout spécialement Philippe et Myriam pour la dactylographie.

Je dédie ce travail à ma famille qui a su me soutenir au cours de cette licence.

TABLE DES MATIERES.

<u>Introduction</u>	p.1
A) La cellule végétale: généralités	p.1
B) La cellule in vitro	p.3
a) Généralités	p.3
b) Les milieux de culture	p.4
c) Clônage et variation somaclonale	p.4
C) Cycle de développement	p.5
D) Les protoplastes	p.6
a) Qu'est-ce qu'un protoplaste?	p.6
b) Régénération de la paroi et division	p.7
c) Quelles peuvent être les causes de la récalcitrance?	p.8
d) Le bourgeonnement	p.9
<u>Démarche de travail</u>	p.10
<u>Matériel et méthodes</u>	p.11
A) Initiation et maintien de la suspension cellulaire	p.11
a) Initiation de la souche	p.12
b) Maintien de la souche	p.12
B) Isolement des protoplastes	p.12
C) Etude de la cinétique de division des protoplastes	p.14
a) Par comptages	p.14
b) Au FACS, après fixation et coloration	p.14
D) Etude de l'action du DMSO sur la régénération des protoplastes en fonction de leur âge	p.18

Résultats et discussion p.20

A) Cytocynèse p.20

- a) Résultats p.20
- b) Discussion p.20

B) Action du DMSO sur la régénération de protoplastes d'âges différents p.24

- a) Surface et variance de la surface des colonies p.24
- b) Poids frais des colonies p.24

C) Analyse des protoplastes au FACS p.25

- a) Protoplastes fixés p.26
- b) Noyaux isolés p.27

Conclusion p.28

Liste des abréviations p.29

Bibliographie

INTRODUCTION.

=====

A. La cellule végétale: généralités.

A l'aube de la vie, il était impossible de faire une distinction entre cellule végétale et cellule animale: les deux types étant fondus en un seul: la cellule primitive. Jusqu'au jour où une de ces cellules endocytas, on suppose, une algue bleue. La cassure était faite entre la cellule primitive qui allait évoluer pour donner nos cellules animales actuelles, et un nouveau type cellulaire résultant d'une symbiose (beaucoup d'arguments plaident en faveur de cette théorie) entre une cellule primitive et une cyanobactérie: l'ancêtre de la cellule végétale. Aujourd'hui, ces deux types cellulaires sont bien distincts.

- La cellule végétale, autotrophe, capable de transformer la matière minérale en matière organique grâce à l'énergie que lui fournit la photosynthèse. Il lui suffit de disposer d'énergie lumineuse, d'eau et de dioxyde de carbone et la cellule fabriquera à bon marché les hydrates de carbone dont elle tirera son énergie.

- La cellule animale, hétérotrophe, ne sait pas convertir la matière minérale en matière organique. Qu'importe, elle utilisera à bon escient la matière organique fabriquée par les végétaux.

Voilà les animaux condamnés à se déplacer continuellement pour chercher leur nourriture. La cellule végétale, quant à elle, va perdre la capacité de se déplacer (elle n'existe plus que chez des algues unicellulaires primitives). Elle va se fixer là où elle trouve tout ce qu'il lui faut (eau, lumière, dioxyde de carbone, sels minéraux). Petit à petit, du niveau unicellulaire, on passe au niveau pluricellulaire. La plante va acquérir des organes ayant des fonctions particulières: les racines puiseront l'eau et les matières minérales, tandis que dans les feuilles s'effectuera la photosynthèse. La complexification va s'intensifier mais qui dit complexification, dit augmentation des besoins en énergie; il faut augmenter la surface photosynthétisante. Le port des plantes va se développer. Mais plus une plante grandit et plus elle est soumise à l'attraction terrestre, il va lui falloir un squelette, une armature rigide, ce sera la paroi cellulaire.

C'est pourquoi, aujourd'hui, on voit tant de différences, sur le plan cytologique entre une cellule végétale et une cellule animale.

La cellule végétale possède outre une vacuole

et divers types de plastes:

* Une paroi cellulaire: composée de deux phases : une phase cristalline, formée par l'assemblage de microfibrilles de cellulose, (1,4 glucose), noyée dans une phase amorphe, non orientée, encore appelée matrice et composée d'autres polysaccharides (hémicellulose, pectine). On distingue la paroi primaire et la paroi secondaire. La paroi primaire se dépose au cours de la croissance cellulaire alors que la paroi secondaire se met en place lorsque la cellule a atteint sa taille définitive: elle peut s'imprégner de lignine, ce qui la rendra dure et ne permettra plus une augmentation en taille. A titre de comparaison, on pourrait dire que la paroi cellulaire est un béton armé dont les fers seraient les microfibrilles de cellulose, et le béton, la matrice amorphe. Cette paroi peut être mise en évidence par une coloration au calcofluor White (Nagata et Takebe, 1970) spécifique des polysaccharides en 1,4 (Maeda et Ishida, 1967).

* Elles possèdent un cytosquelette: celui-ci comprend le système actine - myosine et les microtubules. Ce sont ces derniers qui nous intéressent. Ils sont constitués par l'assemblage de treize microfilaments de tubuline (dimère de P.M.:110.000 composé de deux sous-unités α et β , (Hardham et Gunning, 1982) .

Les microtubules sont très importants pour la cellule végétale: celle-ci s'allonge selon un axe particulier. Ceci est le résultat d'un dépôt orienté, transversal, de microfibrilles de cellulose à la face interne de la paroi (Green et King, 1966). Les microtubules adjacents à la membrane plasmique sont souvent observés avec une orientation parallèle aux microfibrilles (Hogetsu et Shibaoka, 1978). La preuve qu'il existe une relation entre les deux systèmes a été apportée en utilisant des inhibiteurs de l'association des microtubules (Exemple: colchicine): après 24 heures de traitement dans de la colchicine 10^{-3} M, les microtubules sont dépolymérisés mais la cellule garde sa forme allongée. Après un traitement plus long, la cellule devient sphérique et les microfibrilles de cellulose sont déposées au hasard (Palevitz et Hepler, 1976). Cependant, la cellulose est encore déposée en l'absence des microtubules. On a mis en évidence qu'elle était synthétisée dans le voisinage immédiat ou au niveau de la membrane plasmique (MacLachlan, 1977). Les microtubules serviraient de guide pour le dépôt des complexes cellulose synthase à travers le plasmalemma. (Heath, 1974)

Sur le plan physiologique, les cellules végétales possèdent une propriété importante, en ce sens qu'elle sert de base à la culture végétale in vitro: c'est la totipotence.

Isolées à partir d'un organe ou d'un tissu et mises sur un milieu de culture adéquat, ces cellules différenciées ont la capacité de retourner à l'état méristématique, juvénile: elles font montre d'une intense activité de division. On peut les maintenir à l'état dédifférencié tant qu'elles sont en contact avec ce milieu de culture, sous l'action de régulateurs de croissance appropriés. Mais si on change le rapport entre les diverses hormones présentes dans le milieu, ces cellules peuvent se différencier et même régénérer une plante entière.

B. La culture in vitro.

a) Généralités.

La culture in vitro est un ensemble de techniques, en milieu stérile, visant à la régénération de plantes entières à partir d'un fragment de tissu ou d'organe, selon deux modes :

- Soit par organogenèse directe le plus souvent à partir d'un cal, masse spongieuse et lâche provenant de la prolifération de cellules de l'explant retournées à l'état dédifférencié. Cette régénération impliquera plusieurs cellules du cal génotypiquement différentes, les unes donnant la racine, les autres la tige. La plante qui en sera issue sera donc une chimère génétique.

- Soit par embryogenèse somatique . Chaque cellule, en division active, générera un embryon dit somatique, qui se développera de la même manière que n'importe quel embryon sexuel.

b) Les milieux de culture.

En fonction du but recherché (organogénèse ou embryogénèse), la composition des milieux de culture ne sera pas la même. En fait ce sera le rapport entre les divers régulateurs de croissance qui variera, la base du milieu restant inchangée. Il y a plusieurs milieux complets commercialisés, contenant tous les sels minéraux et vitamines dont la cellule a besoin. Il suffit d'y ajouter la source de carbone (saccharose) et les hormones dans le rapport adéquat. Le milieu utilisé au laboratoire est le milieu de MURASHIGE et SKOOG (MS) mais d'autres sont disponibles (B5, White, ...) selon les exigences nutritionnelles des espèces cultivées.

c) Clonage et variation somaclonale.

Il y a deux grands courants dans la culture in vitro:

- la multiplication conforme ou clonage
- La variation somaclonale.

- La multiplication conforme procédera à partir de tissus méristématiques, formés de cellules jeunes, diploïdes et peu mutées (apex, noeuds ou bourgeons). Celles-ci, grâce à leur intense activité de division, vont redonner une plante identique à la plante de départ: un clone.

- Si on ne désire pas obtenir de clone, on peut partir de tissus matures. Leurs cellules sont génotypiquement différentes les unes des autres, ayant subi diverses mutations naturelles au cours de leur différenciation. A celles-ci vont s'ajouter les aberrations chromosomiques engendrées par les conditions de culture in vitro: action mutagène de certains régulateurs de croissance tels que l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique ou 2,4 D. Les plantes régénérées à partir de tels explants ne seront donc plus identiques à la plante mère, ni entre elles. C'est la variation somaclonale. (Zryd, 1988)

Cette propriété est à la fois un avantage et un inconvénient. Si elle s'avère utile pour la sélection de végétaux présentant des caractéristiques plus intéressantes que celles de la lignée parentale (Larkin et Scowcroft, 1981), elle représente néanmoins un sérieux obstacle à la régénération. En effet, le pouvoir morphogène des cellules végétales différenciées n'est que passager. Il n'y a plus moyen de reformer une plante entière à partir d'un cal ou d'une suspension cellulaire âgée, entre autres parce que leur génôme aurait subi trop de mutations.

C. Cycle de développement.

La cellule végétale passe successivement par deux stades de développement.

- 1- division avec séparation en deux cellules filles
- 2- élongation des cellules filles par dépôt de cellulose selon un axe préférentiel: la cellule devient cylindrique.

Dans une plante, la division s'effectue dans les méristèmes. Chaque cellule ne se divise que de manière temporaire: à mesure que les cellules filles s'éloignent du centre germinatif, la durée du cycle de division s'allonge (Furuya, 1984) et elles finissent par perdre toute capacité de se diviser. Elles vont alors croître en taille.

On peut classiquement distinguer quatre étapes dans le cycle cellulaire:

- |- phase G1: 2n chromosomes
- |- phase S (synthèse): répllication du DNA
- |- phase G2: 4n chromosomes
- |- mitose (caryocynèse)

REM.: Bergounioux, 1988, divise la phase G1 en deux, suivant l'état de condensation de la chromatine: la phase G0 et la phase G1 proprement dite.

Les trois premières correspondent à l'interphase.

La cytocynèse suit généralement la caryocynèse. Chez les plantes supérieures, cette cytocynèse résulte de la formation d'un phragmoplaste entre les deux cellules filles.

En fonction du stade de développement, on retrouvera les microtubules sous diverses organisations:

- En interphase, en ce qui concerne les tissus organisés du moins, ils apparaissent sous forme de ruban de préprophase à l'endroit où se formera plus tard le phragmoplaste, (Hardham et Gunning, 1982) déterminant ainsi le plan de division. Ceci est très important pour la morphogenèse de l'organe en ce sens que du plan de division des cellules dépendra l'axe de croissance de l'organe. (De fait, on ne l'observe pas dans des tissus non organisés comme les cals, ce qui laisse supposer que les rubans de préprophase sont associés à des tissus organisés).

- Pendant la phase de division, ils forment le fuseau mitotique (métaphase et anaphase) et, en télophase, le phragmoplaste.

- Lors de l'élongation cellulaire, on observe des faisceaux parallèles de microtubules corticaux reliés entre eux. De nouveaux microtubules s'ajoutent, avec la même densité et la même orientation que les précédents.

- Dans un tissu organisé, lorsque la cellule entre en cycle, les microtubules corticaux disparaissent; ils sont remplacés par le ruban de préprophase. Celui-ci disparaît à son tour pour laisser la place au fuseau mitotique.

- Ils interviendraient aussi dans le déplacement du noyau: en interphase, le noyau se déplace dans la cellule; il n'a pas de position fixe. Mais quelques heures avant la mitose, il va se placer à l'endroit où apparaîtra le fuseau mitotique. Dès lors, sa position restera fixe. (Furuya, 1984)

D. Les protoplastes.

A partir des cellules végétales, on peut isoler des protoplastes.

a) Qu'est ce qu'un protoplaste?

C'est une cellule débarrassée de sa paroi. Anciennement, on arrivait à cette fin par des méthodes mécaniques, mais aujourd'hui, des enzymes dégradant spécifiquement les divers composants pariétaux ont pris le pas sur le scalpel.

Ces cellules "nues" sont attrayantes à plus d'un titre :

-Elles servent de source de matériel commode pour la récupération d'organites cellulaires. (On effectue une lyse modérée du plasmaleme et une centrifugation différentielle pour récupérer les différentes fractions).

-On les utilise aussi dans l'étude du mode de dépôt de la paroi cellulaire.

-Mais ce qui les rend le plus attractifs, c'est la possibilité de réaliser des fusions entre espèces sexuellement isolées et obtenir ainsi des hybrides somatiques. L'utilité majeure de cette technique à l'heure actuelle est le transfert d'une espèce à une autre de caractères polygéniques ou de caractères dont les loci sont inconnus. Les agronomes ont vite compris qu'ils pouvaient utiliser la fusion, induite par des composés chimiques: polyéthylène glycol, (Kao et Michayluk, 1974) high pH, high Ca^{++} (Keller et Melchers, 1973), $NaNO_3$ (Power, 1970) ou par des méthodes physiques: électrofusion (Zimmermann, 1981), pour améliorer génétiquement certaines espèces. Parmi celles-ci figurent les céréales, dont l'importance économique et alimentaire n'est plus à établir et qui ne peuvent pas être transformées par Agrobacterium tumefaciens.

Fusionner des protoplastes est une chose, régénérer des plantes à partir de ces produits de fusion en est une autre: Jusqu'à présent, on n'y est parvenu que pour quelques espèces seulement. Ce sont en majorité des dicotylées, quelques graminées (Festuca arundinacea, Lolium perenne) (Dalton, 1988) mais peu de céréales entre autres le riz Oryza sativa (Thompson, 1986).

Une voie de recherche possible, amorcée il y a quelques années (Hahne et Hoffmann, 1985) est l'étude du cytosquelette et plus particulièrement des microtubules, lors des premières étapes de division des protoplastes.

b) Régénération de la paroi et division.

Un protoplaste ne peut se diviser tant qu'il n'a pas régénéré de paroi cellulaire (Meyer et Abel, 1975b). Il n'est cependant pas nécessaire que celle-ci soit rigide: selon Schilde-Rentschler (1977) une simple enveloppe continue de polysaccharides pariétaux suffit. Le rôle des microtubules dans le dépôt de la paroi est connu depuis longtemps: Hahne et Hoffmann (1985) apportent une précision supplémentaire. Ils constatent en effet que la première division chez Nicotiana glauca Viv., N. tabacum L., Petunia hybrida Hort. et Brassica napus L. se produit beaucoup plus tard si les protoplastes sont isolés à partir de cellules d'un tissu mature que s'ils sont isolés à partir de suspensions cellulaires à taux élevé de division. Ils observent que chez des cellules matures, le réseau de microtubules corticaux n'existe plus: la première chose que fait un protoplaste issu de telles cellules est de se différencier et de reconstituer

un réseau. Le dépôt de la paroi commencera dès la réapparition de celui-ci. Ensuite seulement, ils pourront former un fuseau mitotique. Hahne et Hoffmann en déduisent que :

- 1) le stade de développement cellulaire joue un rôle
- 2) les microtubules corticaux, en contrôlant le dépôt de la paroi, influencent le moment d'apparition de la première division.

Quand on désorganise le réseau, la cellule passe de la forme cylindrique à la forme sphérique. Ce réseau n'est cependant pas dépolymérisé (Lloyd et Slabas, 1980) : la cellulose continue à être déposée, mais avec une orientation aléatoire. Hines et Marchant (1979) ont montré chez l'algue Mougeotia que c'est la rupture des liaisons entre le plasmalemme et les microtubules, provoquée par le passage à une forme sphérique qui désorganise le réseau. Avec le temps ces liaisons réapparaissent de plus en plus nombreuses. La cellule retourne alors à une forme cylindrique : les microfibrilles de cellulose se déposent avec la même orientation transversale au grand axe cellulaire que les microtubules organisés en faisceaux parallèles.

c) Quelles peuvent être les causes

de la récalcitrance?

-1- Blocage physiologique de la division chez des protoplastes d' Hibiscus rosa-sinensis isolés à partir de cellules de cal, dû à une désorganisation du réseau associée à une dépolymérisation telle que la cellule n'arrive plus à le reconstituer. Il semblerait que la cause de cette récalcitrance doive être recherchée du côté de la digestion enzymatique qui induirait une dépolymérisation anormale du réseau (Hahne et Hoffman, 1984). En effet, la simple addition de diméthyl sulfoxyde à cette suspension de protoplastes suffit à initier la division. Le DMSO est un composé qui initie, in vitro, la polymérisation de tubuline dimère en microtubules (Morejohn et Fosket, 1982 ; Mizuno, 1985)

-2- Des altérations du génôme résultant de mutations ou autres aberrations chromosomiques.

-3- Le type de tissus à partir desquels on isole les protoplastes semble aussi jouer un rôle; ceci en relation avec la proportion de noyaux en phase G2 dans ces tissus. Bergounioux (1988) a décrit chez Helianthus annuus, la division de protoplastes issus d'hypocotyle mais n'en observe pas chez des protoplastes isolés à partir de mésophylle foliaire.

Chez Nicotiana plumbaginifolia et Pétunia, les tissus contenant une haute fréquence de noyaux en phase G2 donnent des protoplastes capables de se diviser et ce, pour des plantes d'âge différents. Des protoplastes dont les noyaux sont en phase G1 condensée sont aussi capables de divisions. C'est ce type de noyaux qui prédomine dans les hypocotyles. Des protoplastes isolés à partir de tissus contenant des cellules dont les noyaux sont à prédominance G0 ne se divisent pas. C'est cette phase que l'on observe dans le mésophylle foliaire.

Jusqu'à présent, le seul moyen dont on dispose pour essayer de faire régénérer des espèces récalcitrantes est la manipulation des milieux de culture.

d) le bourgeonnement.

Comme il a été dit précédemment, le mode le plus fréquent de cytokynèse chez les plantes supérieures est la séparation des deux cellules-filles, issues d'une mitose, par cloisonnement.

Cependant, chez les protoplastes, on observe parfois un autre type de cytokynèse: c'est le bourgeonnement.

Les mécanismes le contrôlant sont encore inconnus: il semblerait que les cellules qui y ont recours ne possèdent pas de paroi rigide, mais uniquement une pseudo-paroi (Meyer et Abel, 1975a).

Ce bourgeonnement prévaudrait sous des conditions de culture suboptimales pour la croissance des protoplastes et le développement de leur paroi. (Fowke et Gamborg, 1980)

Le bourgeon se sépare de la cellule-mère par constriction. Généralement, il apparaît à la hauteur du noyau et la caryocynèse se produit au niveau de cet étranglement. Cependant, dans certains cas, la caryocynèse peut précéder le bourgeonnement.

Ce mode de clivage ne serait que temporaire (maximum deux ou trois fois). Dans certains cas, la cellule ne se diviserait plus mais la caryocynèse se produirait toujours, conduisant à des cellules plurinucléées. (Meyer et Abel, 1975a)

Démarche de travail.

Dans ce mémoire, nous essayerons d'abord de caractériser le cycle cellulaire de protoplastes de *E. arundinacea*. Des comptages au microscope optique de protoplastes bourgeonnants, à des temps précis, sur une période de 24 heures après l'isolement seront effectués. On suivra ainsi l'évolution de la cytotinèse au cours du temps, en s'attardant au phénomène de bourgeonnement.

Ensuite, comme plusieurs étapes de ce bourgeonnement feraient intervenir les microtubules (transport des vésicules de Golgi contenant des polysaccharides vers la paroi du bourgeon, déplacement des noyaux...), on étudiera l'action du DMSO mis en présence de la suspension de protoplastes, à des temps de culture différents. Cette action sera évaluée par mesure de la surface des colonies régénérées à partir des protoplastes traités.

Nous réaliserons enfin une étude en cytofluorimétrie en flux (FACS), sur des protoplastes fixés et sur des noyaux isolés, colorés par un fluorochrome spécifique des acides nucléiques, dans le but de mettre en évidence une éventuelle kariocinèse avant la cytotinèse.

MATERIEL ET METHODES

=====

A . Initiation et maintien de la suspension cellulaire

Les protoplastes que nous utiliserons dans ce travail seront isolés à partir de cellules en suspension dans un milieu de culture liquide MS/CSM (pour MURASHIGE et SKOOG / CELL SUSPENSION MEDIUM) : il a pour base les sels de MS

Composition du MS/CSM

-saccharose (fluka)	30 g/l
-2,4 D (sigma)	2 mg/l
-sels de MS (Flow laboratories U.K)	4,7 g/l

Composition des sels de MS (Murashige et Skoog,1962)

Les sels de MS sont un des milieux de base disponibles actuellement en culture végétale in vitro.

Ils contiennent :	mg / l
-----	-----
-CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440
-CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0.025
-CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.025
-FeNa EDTA	36.70
-H ₃ BO ₃	6.20
-KH ₂ PO ₄	170
-KI	0.83
-KNO ₃	1900
-MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370
-MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22.30
-Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
-NH ₄ NO ₃	1650
-ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8.60
-Inositol	100
-Acide nicotinique	0.50
-Thiamine HCl	0.10
-Pyridoxine HCl	0.50
-Glycine	2.00

Le solvant des composants du MS/CSM est l'eau désionisée par un déminéralisateur aqualab 30 (VEL).

Ce milieu de culture est stérilisé par autoclavage 15 minutes à 1 bar (121°C) dans un autoclave Lequeux de 165 litres.

a) Initiation de la souche

La souche de F. arundinacca utilisée provient de la Welsh. Plant. Breeding. station d'Aberystwyth, Pays de Galles. Elle a été initiée en 1984 à partir d'embryons matures de la graminée (pour le protocole, voir Dalton, 1988)

b) Maintien de la souche.

M. Cereghetti (mémoire FUNDP, 1987) a décrit la cinétique de développement de cette suspension cellulaire. Si on ne renouvelle pas le milieu, on observe que:

- La première semaine, la cellule constitue ses réserves: elle absorbe le C organique, le K et probablement les nitrates. La suspension se développe: les poids frais, poids sec et volume cellulaire augmentent, c'est la phase de multiplication cellulaire.

- La deuxième semaine, les cellules se vacuolisent suite à l'hydrolyse de l'amidon de réserve.

- La troisième semaine, il y a sénescence de ces cellules, suivie de leur mort.

On repiquera donc la souche tous les sept jours, de façon à la maintenir constamment dans la phase de multiplication cellulaire, par dilution 1:1 avec du MS/CSM frais.

Les cultures sont conservées en chambre de culture thermostatée à 25°C sous illumination constante de 2000 lux, sur agitateur à déplacement circulaire Buhler VKS 75 (100rpm)

B. Isolement des protoplastes.

* On prélève stérilement un volume de suspension cellulaire âgée de quatre jours à l'aide d'un tube en verre de diamètre intérieur de 5mm, et on le dépose dans un stérilin de 30 ml à fond conique préalablement taré. Après élimination du milieu de culture, le contenu cellulaire est pesé. On y ajoutera la solution enzymatique.

Cette dernière, dont la composition est donnée ci-après, contient toutes les enzymes susceptibles de dégrader la paroi cellulaire, dissoutes dans une solution nutritive de pression osmotique élevée (le MS/PS) destinée à recueillir les protoplastes, à limiter le plus possible leur éclatement et à permettre leur développement.

Composition du MS/PS et du mélange enzymatique

(1) Le MS/PS

- mannitol	100	g/l
- sels de MS	4,71	g/l
- CaCl ₂	1,47	g/l
- sucrose	30	g/l
- 2,4 D	0,1	mg/l
- benzylamino purine	0,1	mg/l

pression osmotique: environ 900 milliosmoles/kg.

(2) Pour préparer la solution enzymatique, on ajoute à ce MS/PS :

- 1% w/v de cellulase Onozuka RS
(Yakult Honsha Co, ltd, Japan)
- 1% w/v de meicelase
(R.W. Unnin and Co, ltd, U.K.)
- 0,3% w/v de macerozyme
(Yakult Honsha Co, ltd, Japan)
- 0,1% w/v de pectolyase Y 23
(Seishin Pharmaceutical Co, ltd, Japan)

Le MS/PS, de même que la solution enzymatique sont stérilisés sur une membrane filtrante Sartorius 0,20 µm.

Le MS/PS est conservé à température ambiante et à l'obscurité.

Le mélange enzymatique est conservé à -18°C au congélateur.

* Après une digestion de 24 heures, le mélange enzymes-cellules-protoplastes est filtré successivement sur des tamis en nylon de 90 µm puis de 25 µm, dans le but de séparer les plus gros débris et les cellules encore entières des protoplastes. Ces dernières sont isolées des enzymes après une centrifugation (3', 100g) puis rincées trois fois avec du MS/PS, chaque rinçage étant suivi d'une centrifugation (3', 100g). Après la dernière centrifugation de rinçage, le culot est resuspendu dans 10 ml de MS/PS et la densité de la suspension est estimée sur une cellule de comptage de Fuschs-Rosenthal. Par dilution, on l'ajuste à 100.000 protoplastes par ml. On répartit ensuite ce volume entre plusieurs tubes stérilin de 13,5 ml à fond conique ou entre plusieurs boîtes de Pétri que l'on scellera avec du nesofilm. (Nesco, Nippon Shoji Kaisha, ltd, Japan) Tubes et boîtes de Pétri sont déposés au noir à 25°C en chambre de culture.

L'âge 0 des protoplastes est considéré comme étant l'heure à laquelle on les resuspend dans 10 ml de MS/PS.

C. Etude de la cinétique de division des protoplastes.

a) Par comptages.

Les méthodes utilisées .

A des temps fixés, correspondant à des âges de protoplastes compris entre 0 et 24 heures, on comptera

- soit le nombre de protoplastes bourgeonnants (expérience du 28/01/88.)

- soit le nombre de non ronds (expérience du 31/03/88)

Les raisons de ce changement de critère seront expliquées plus loin.

Un protocole différent pour chaque expérience a aussi été utilisé.

- Le premier consiste à prélever dans un des tubes, sous hotte à flux laminaire, une goutte de suspension lorsque les protoplastes ont atteint l'âge voulu et à la déposer entre lame et lamelle. Sous microscope optique Zeiss axioplan, en contraste de phase, on compte le nombre de protoplastes bourgeonnants dans des champs du microscope déterminés au hasard. Un pourcentage des premiers par rapport aux seconds est alors établi pour chaque âge.

- La seconde méthode consiste à déposer une boîte de Pétri, (5,5cm de diamètre) contenant 4 ml de suspension à 100.000/ml et scellée au nescofilm sous microscope inversé Zeiss IM lorsque les protoplastes ont atteint l'âge voulu. En contraste de phase, on détermine alors le pourcentage de non ronds par rapport aux ronds.

b) Au FACS, après fixation et coloration.

(1) Qu'est-ce que le FACS ?

Le FACS, (Fluorescence Activated Cell Sorter) commercialisé par la firme Becton-Dickinson est un analyseur-trieur de cellules.

* Description de la méthode (Greimers, 1988)

.....

Le FACS est un appareil capable d'analyser simultanément 4 paramètres d'une cellule, en l'occurrence la taille, la granulosité et 2 lumières de fluorescence de longueurs d'onde différentes et ce, au rythme de plusieurs centaines de cellules par seconde.

Si une de ces cellules possède des paramètres correspondant à des critères de sélection posés par l'expérimentateur, le FACS la séparera de toute autre cellule ne présentant pas ces caractères: c'est la fonction "trieur".

Les deux atouts majeurs du FACS sont:

- d'une part, la rapidité de l'analyse et du tri.
- d'autre part, une grande précision dans le tri: plus de 95% des cellules récupérées correspondent à la cellule-type fixée par l'expérimentateur; et ce, même si les cellules à récupérer ne représentent qu'un infime pourcentage de la population totale.

* Principes de fonctionnement (Greimers, 1988)

.....

Les cellules à analyser, en suspension dans un milieu liquide à une densité suffisante (au moins 100.000 /ml), sont entraînées dans une veine liquide à la vitesse d'environ 10 m/sec à travers un gicleur calibré à 100 um. Elles sortent à l'air libre une par une et traversent un faisceau lumineux situé 1/4 mm plus bas que la sortie du gicleur. Cette lumière monochromatique, de 488 nm de longueur d'onde, est émise par un laser à argon.

La lumière incidente, frappant la cellule, sera réfléchiée dans toutes les directions avec la même longueur d'onde:

- la composante diffractée qui sera captée aux petits angles (2-10°) constituera le forward scatter (FSC): il est proportionnel à la taille des cellules, mais aucune unité de taille ne peut être associée à une valeur de scatter.

- la granulosité de la cellule (taille du noyau, richesse en organites cytoplasmiques,...) est responsable de la majeure partie de la lumière diffractée aux grands angles: cette composante, captée à 90° par rapport au faisceau incident, constituera le SSC (scatter orthogonal)

- Si la cellule porte des fluorochromes pouvant être excités par la lumière émise par le laser (longueur d'onde adéquate), ceux-ci réémettront une lumière de fluorescence de longueur d'onde supérieure (car il y a eu une perte d'énergie) et de plus faible intensité que la lumière incidente.

Cette fluorescence ne pourra pas être captée aux petits angles, étant complètement noyée dans la forte intensité de la lumière réfractée. On la captera à 90°, comme le SSC; sous cet angle, l'intensité de la lumière réfractée étant plus faible.

Des filtres placés en avant des détecteurs permettent de sélectionner les longueurs d'onde auxquelles les fluorochromes réémettent.

Ces filtres sont de différents types:

- neutres, atténuateurs d'intensité, qui n'arrêtent aucune longueur d'onde particulière, mais qui réduisent l'intensité de toute lumière qui les traversent. De tels filtres sont mis en avant du détecteur de FSC, réduisant l'intensité de la lumière réfractée à un niveau acceptable pour celui-ci et celle de la lumière de fluorescence à un niveau tel qu'elle ne peut faire varier de manière significative la valeur du FSC.

- Filtres à bande passante c'est-à-dire des filtres ne laissant passer qu'une gamme particulière de longueur d'onde.

- Filtres "long pass" qui laissent passer toute longueur d'onde supérieure à une valeur critique.

- Filtres "short pass" qui ne laissent passer que les longueurs d'onde inférieures à une valeur critique.

REM.: les 2 lumières de fluorescence peuvent être émises

- par un même fluorochrome métachromatique. Par exemple: l'acridine orange qui fluoresce dans le vert quand elle est liée au DNA, et dans le rouge quand elle est liée au RNA (Darzynkiewicz, 1976)

- par deux fluorochromes différents dont la longueur d'onde d'excitation est identique.

Après avoir traversé les filtres, la lumière est captée par des photomultiplicateurs qui transforment le signal lumineux en signal électrique et le transmettent à un ordinateur.

Quand le nombre de cellules fixé par l'expérimentateur (3000, 5000, 20000,...) est atteint, les données recueillies pour chaque cellule sont mises en mémoire sur le disque dur de l'ordinateur et pourront être visualisées sous forme:

- d'histogramme: les valeurs pouvant être prises par un paramètre sont réparties en 256 classes, puis l'ordinateur fait un histogramme à partir du nombre de cellules pour chaque classe de valeur du paramètre considéré.

- de dot plot: deux paramètres sont considérés à la fois.

- de courbes d'isodensité.

(2) Méthode utilisée

On passera au FACS des protoplastes fixés et des noyaux isolés.

Le colorant utilisé est l'iodure de propidium (I P), qui, à pH 7, est spécifique des acides nucléiques à double brin, entre lesquels il s'intercale. Il est excité à 488 nm et réémet dans une gamme de longueur d'onde comprise entre 580 et 660 nm. Cette fluorescence sera captée sur le second canal de l'appareil (FL2) dotée d'un filtre "long pass" LP 620, qui ne laisse passer que toutes les longueurs d'onde supérieures à 620 nm: la lumière réfractée est donc arrêtée et n'interférera pas avec la lumière de fluorescence.

L'iodure de propidium ne peut pénétrer que des cellules mortes, c'est pourquoi on réalise une fixation des protoplastes. L'intensité de la fluorescence sera proportionnelle à la quantité d'ADN.

* fixation des protoplastes

.....

On centrifuge (3', 100g) un tube contenant 5 ml de suspension de protoplastes d'âge identique (compris entre 0 et 24 heures). On ne conserve que 500 µl de surnageant auxquels on ajoute 4,5 ml de fixateur frais (9 volumes d'éthanol, 3 volumes d'acide acétique glacial, 1 volume d'eau désionisée, 13% (w/v) de sorbitol) (Gould, 1984). Après 5 minutes, on centrifuge et on ne conserve à nouveau que 500 µl de surnageant. On porte à 5 ml avec du liquide de resuspension (45 mM MgCl₂, 30 mM citrate de Na, 20 mM tris, 0,1% triton X-100; pH 7; conservé au frigo) (Galbraith, 1984). Après centrifugation, on élimine 4 ml de surnageant et on resuspend le culot dans le ml résiduel. Les tubes traités sont conservés au frigo jusqu'au moment de les passer au FACS.

* Isolement des noyaux. (Bergounioux, 1988)

.....

On ajoute 100 µl de triton X-100 à 5 ml de suspension de protoplastes d'âge compris entre 0 et 24 heures pendant 15 minutes. Passé ce délai, on centrifuge 5 minutes à 100g et on élimine totalement le surnageant. Le culot est ensuite resuspendu dans 500 µl de MS/PS. Les tubes traités sont conservés au frigo.

Le triton X-100 a la propriété de dissoudre le plasmalemme, ce qui permet de récupérer des noyaux isolés après centrifugation. Cependant, un traitement de durée prolongée avec du triton à cette concentration entraîne la lyse de la membrane nucléaire.

* Coloration et passage au FACS.

.....

(1) Protoplastes fixés.

On passe les protoplastes une première fois au FACS avant addition du colorant: ce seront les témoins, qui permettront d'évaluer l'importance de l'autofluorescence. On ajoute ensuite 10 μ l d'I.P. (d'une solution stock à 1 mg/ml d'eau) à chaque tube qu'on conserve à l'obscurité en attendant l'analyse, l'I.P. étant assez rapidement dégradé par la lumière. La coloration est immédiate.

(2) Noyaux isolés .

Les noyaux non colorés sont aussi analysés une première fois (ce seront les témoins) avant addition de 5 μ l d'I.P. à chaque échantillon. Un deuxième passage au FACS permettra la mesure de la fluorescence spécifique des noyaux marqués.

D. Etude de l'action du DMSO sur la régénération

des protoplastes en fonction de leur âge.

Des tubes contenant chacun 1 ml de suspension de protoplastes à 100.000/ml sont incubés à 25°C au noir. Les protoplastes de ces différents tubes ont tous le même âge.

D'heure en heure pendant 24 heures, on ajoute à un premier tube 100 μ l de DMSO à 11% (concentration finale 1%) et à un second tube, 100 μ l de MS/PS (témoin). DMSO et MS/PS sont ajoutés 1/2 heure avant que les protoplastes n'atteignent l'âge considéré. Ils resteront une heure en contact avec la suspension: la durée du traitement est donc centrée sur l'âge. Après incubation au noir à 25°C, les tubes sont centrifugés (3', 100g) et les culots resuspendus dans 1 ml de MS/PS. Ils retournent ensuite à l'obscurité jusqu'à ce que les deux derniers tubes (protoplastes âgés de 24 heures) aient été traités.

A ce moment, le contenu des tubes est transféré en boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre que l'on scelle avec du nescofilm. Les boîtes sont déposées en chambre de culture à 25°C à l'obscurité pour un mois. Des colonies vont se former par division des protoplastes.

Après un mois de culture, les tailles (longueur X largeur) de 15 colonies par boîte seront mesurées sous microscope inversé Zeiss IM, en contraste de phase, avec un objectif 10X et un oculaire micrométrique Wild SK 15X. On pourra ainsi calculer la taille moyenne des colonies en fonction de l'âge des protoplastes ayant subi le traitement au DMSO. L'écart-type et la variance sont aussi calculés.

Après deux mois, on estime le poids frais des colonies de chaque boîte par pesée: un tamis pour protoplastes à mailles de 25 μm est rincé à l'eau désionisée, séché sur papier Whatman III puis taré. On verse le contenu d'une boîte dans le filtre qui est séché de la même façon et pesé. Par différence, on trouve le poids.

PHOTO.1: Contraste de phase, 40 X.
Fusion de protoplastes: 1 heure après l'isolement.

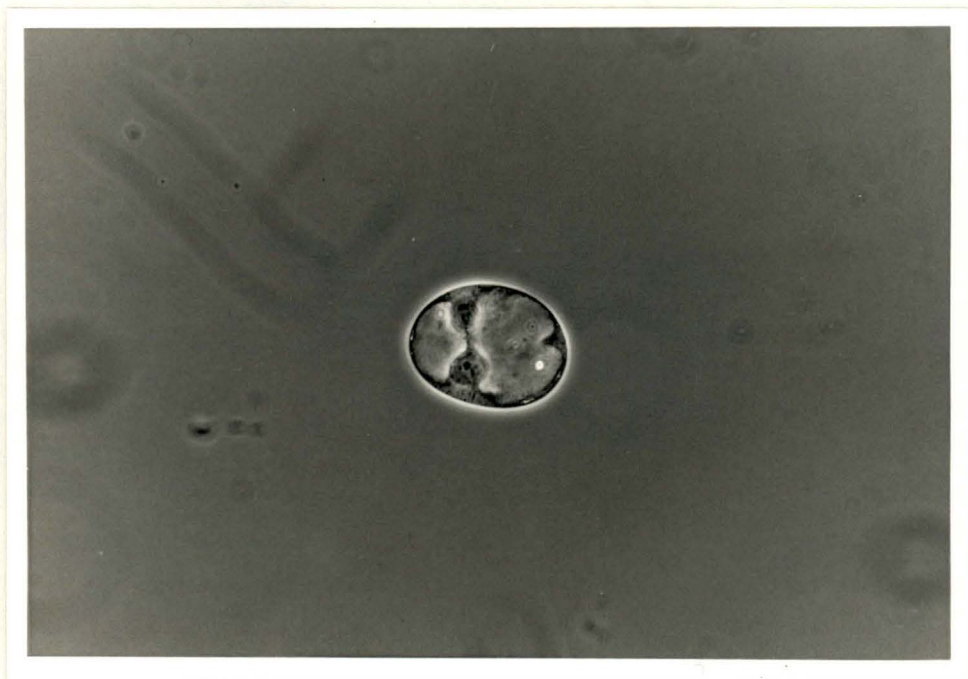
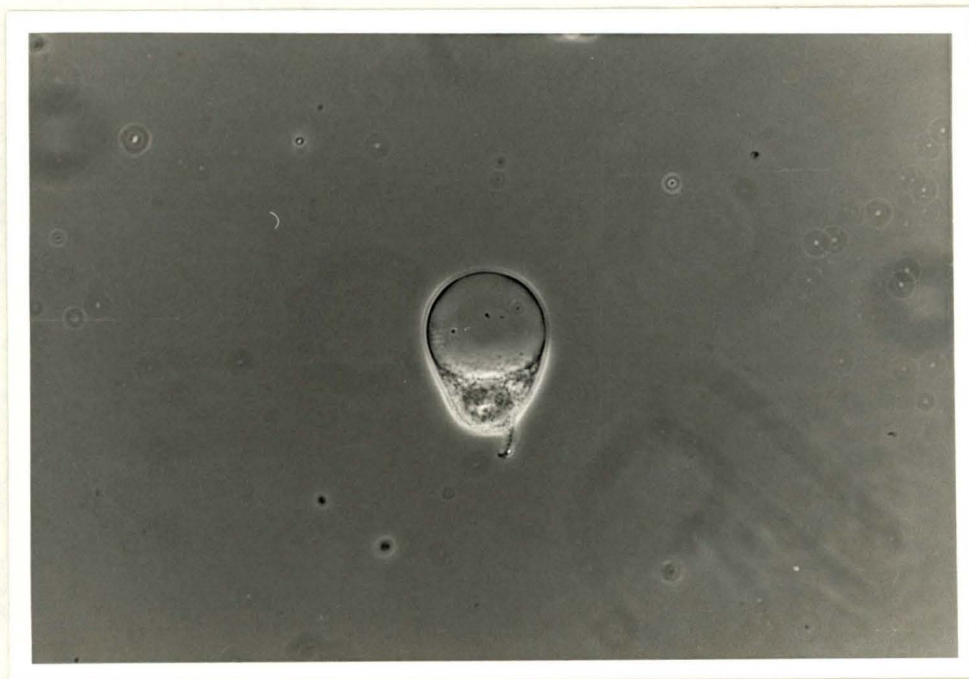


PHOTO.2: Contraste de phase, 40 X.
Protoplaste polarisé; âgé de 7 heures.



Résultats et discussion.

=====

A. Cytocynèse.

a) Résultats

(1) Cinétique de bourgeonnements sur 24 heures (Fig.1)

On constate qu'entre 0 et 6 heures, le nombre de protoplastes bourgeonnants est dans l'ensemble, très faible.

Après 6 heures, il y a une augmentation notable de ce nombre.

Il semblerait y avoir 2 pics:

- le premier entre 11 et 14 heures
- le second entre 18 et 24 heures.

(2) Evolution du nombre de protoplastes non-ronds en fonction de leur âge. (Fig.2)

On observe une diminution du nombre de protoplastes non-ronds entre 4 et 5 heures.

Elle est suivie d'une augmentation progressive de ce nombre à partir de 8 heures, avec un pic entre 11 et 14 heures.

b) Discussion:

Par microscopie optique en contraste de phase, on observe que des protoplastes fraîchement isolés fusionnent spontanément jusqu'à cinq heures après isolement du mélange enzymatique. Cette fusion est clairement à l'origine de la non-sphéricité d'une partie des protoplastes observés (photo n°1). Une coloration au calcofluor White, un marqueur non-spécifique des polysaccharides de la paroi, fait apparaître un début de fluorescence localisée en surface des protoplastes, à peu près quatre heures après leur isolement.

Fig. 1 : Cinétique de bourgeonnements sur 24 h.

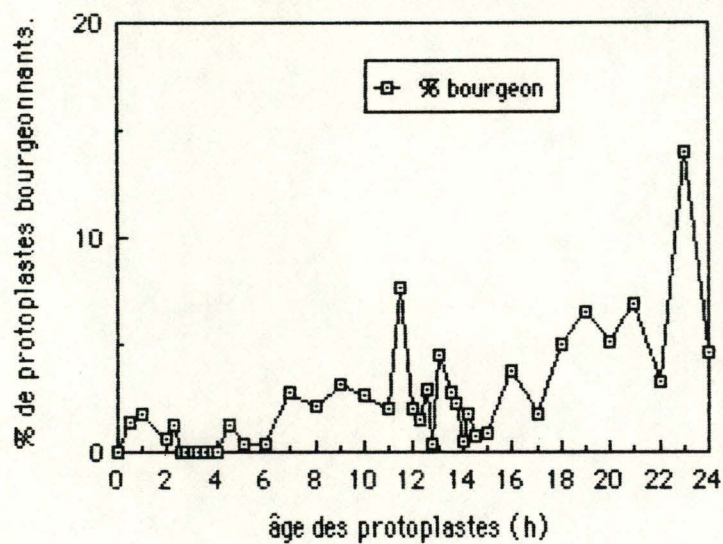
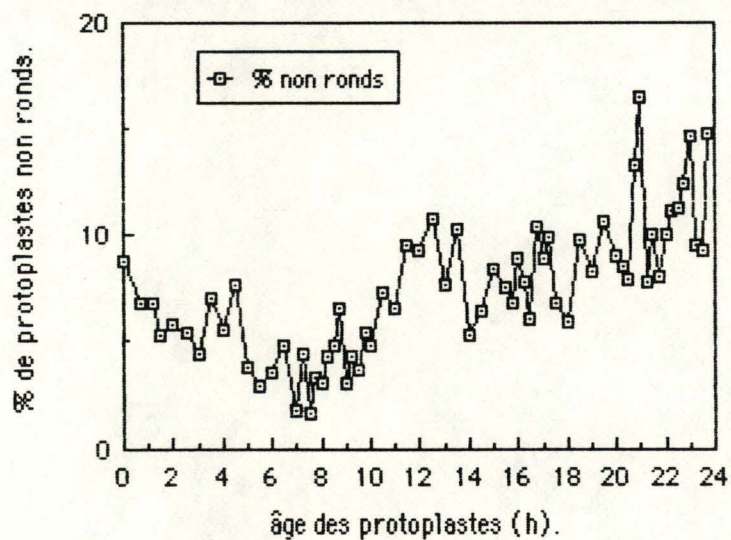


Fig. 2 : Evolution du nombre de protoplastes non-ronds sur 24 h.



STADES DE BOURGEONNEMENT SUCCESSIFS.

PHOTO.3: Contraste de phase, 40 X.
Protoplaste bourgeonnant; âgé de 11.30 heures.

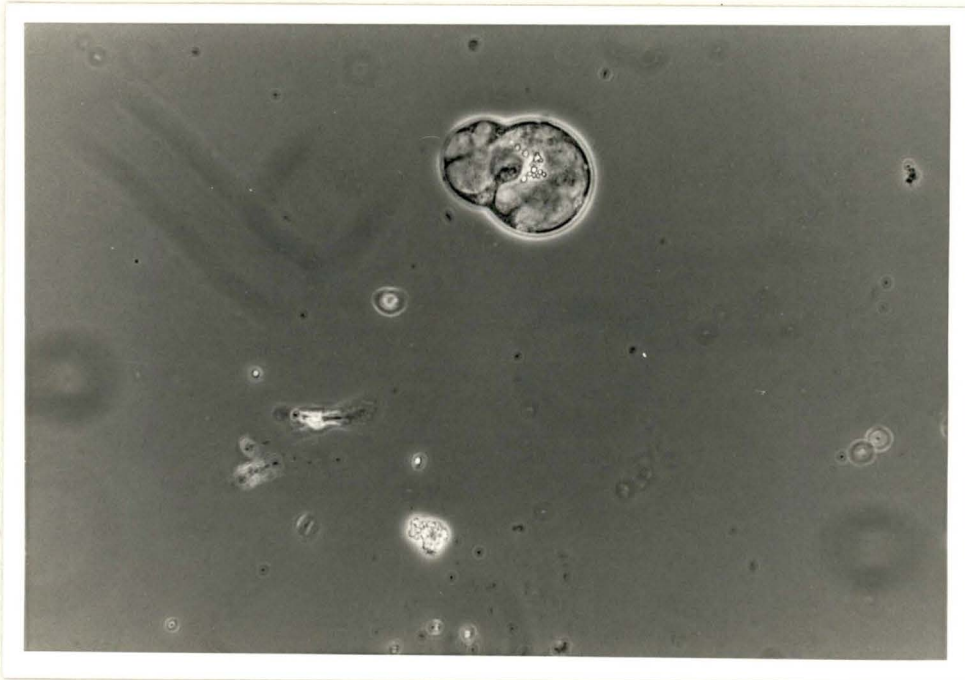


PHOTO.4: Contraste de phase, 40 X.
Ensemble de protoplastes dont un bourgeonne; âge:18.30 h.

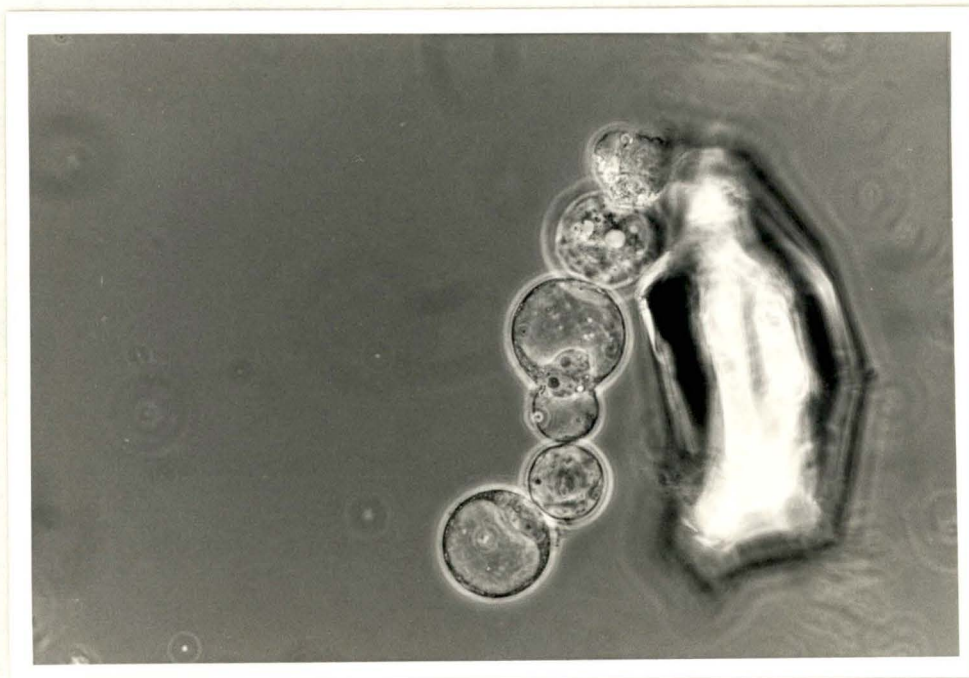


PHOTO.5: Contraste de phase, 40 X.

Deux protoplastes dont un bourgeonne; âge:23.15 h.

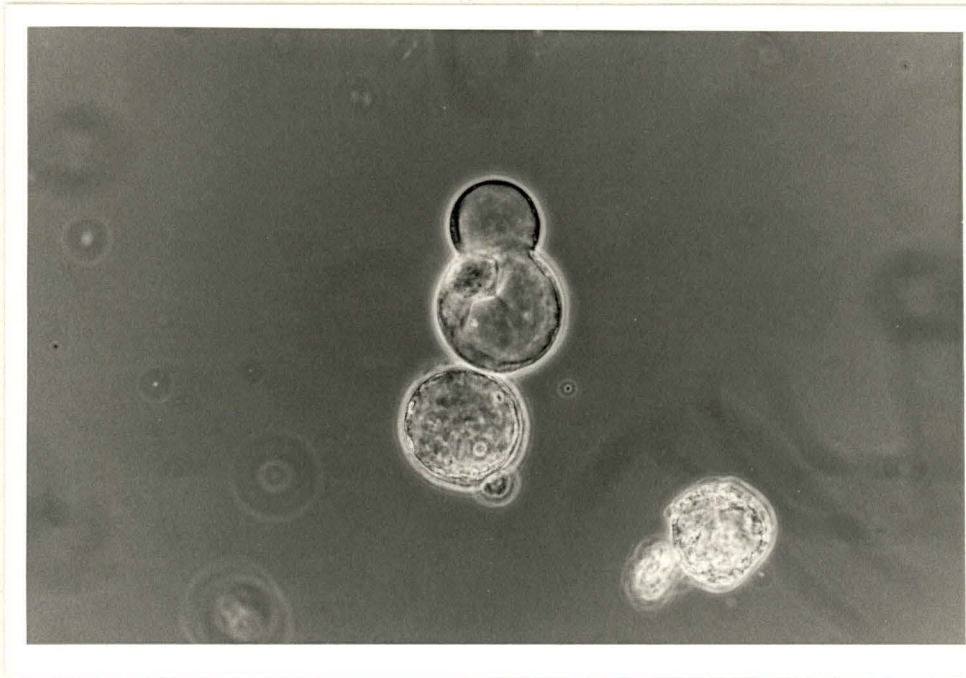


PHOTO.6: Contraste de phase, 40 X.

Protoplaste bourgeonnant; âge:23.30 h.



La régénération d'une paroi empêchant toute fusion expliquerait la moindre proportion de protoplastes non-sphériques après cinq heures de culture.

A partir de huit heures, on observe une augmentation quasi linéaire de la proportion de protoplastes non-ronds, avec un pic entre onze et quatorze heures. La "tendance lourde" de cette deuxième partie du graphique pourrait être attribuée à une différenciation progressive des protoplastes ronds en cellules allongées, cylindriques, dont la forme est déterminée par l'orientation de microfibrilles cellulosiques de la paroi, elles-mêmes alignées par les microtubules corticaux.

Le pic compris entre onze et quatorze heures correspond à une modification morphologique particulière des protoplastes, à savoir l'apparition d'un bourgeon à la surface de la paroi.

La formation d'un bourgeon, classiquement attribuée à une faiblesse localisée de la paroi qui permet l'extrusion de cytoplasme, semble cependant, dans ce cas, n'être qu'une étape dans un processus plus large de division cellulaire.

Ainsi, l'observation des protoplastes, quelques heures après isolement, révèle l'apparition d'une polarisation du contenu cellulaire. Une grande vacuole occupe une extrémité de la cellule, l'autre extrémité concentrant le cytoplasme et les noyaux dans une excroissance (photo n°2). Cette polarisation est similaire à celle que subit l'oeuf de Fucus vésiculosus après fécondation, lorsqu'il entame les premiers stades de développement embryonnaire (Quatrano, 1978).

Progressivement, l'excroissance s'arrondit en un bourgeon. A ce stade, la cellule-mère est nettement fluorescente après incubation dans le calcofluor White, tandis que le bourgeon apparaît totalement dépourvu de matériel pariétal polysaccharidique. (Photos n°3, n°4, n°5 et n°6)

Il semble qu'une synchronisation au moins partielle, induite par le processus d'isolement enzymatique, soit à l'origine de la vague de bourgeonnement observé en microscopie optique, à des temps compris entre onze et quatorze heures. Un accroissement ultérieur de la taille du bourgeon précède une division des contenus cytoplasmiques (cytokynèse) entre les deux cellules-filles.

Aucune figure de mitose n'a pu être décelée pendant cette période, quoique les cellules-filles soient toutes nucléées. La majorité des protoplastes étant plurinucléée suite au phénomène de fusion spontanée décrit ci-dessus, on en conclut que les noyaux se partagent entre cellule-mère et bourgeon en absence de karyocynèse.

La majorité des protoplastes bourgeonneront en même temps (pic). Cependant, la culture n'étant pas totalement synchrone, plusieurs le feront plus tôt ou plus tard. Ces derniers seront encore au stade bourgeonnant que les protoplastes du pic seront déjà au stade non-rond. Ceci explique que le pourcentage de protoplastes non-ronds augmente progressivement après 8 heures.

* Pourquoi avoir remplacé le comptage au microscope droit par un comptage au microscope inversé ?

Entre lame et lamelle, on ne sait faire les estimations que sur un nombre restreint de protoplastes (environ 150 à 300 sur une lame car beaucoup éclatent); or, un pourcentage établi sur un petit nombre d'observations est peu fiable. C'est pourquoi on s'est tourné vers une autre méthode.

Travailler avec une boîte de Pétri présente plusieurs avantages: on dispose d'un plus grand nombre de protoplastes, déposés dans un récipient tel qu'on peut observer l'ensemble de la suspension sur microscope inversé, sans avoir à ouvrir la boîte pour faire des prélèvements, d'où diminution des risques de contamination.

* Signification des critères "bourgeonnant" et "non rond"

Le graphique "nombre de protoplastes bourgeonnants en fonction de l'âge" ne prend en compte que les protoplastes bourgeonnants mais pas les polarisés.

Le graphique "nombre de protoplastes non-ronds en fonction de l'âge" prendra en compte tant les protoplastes bourgeonnant que les protoplastes fusionnant ou retournant à la forme cylindrique.

Cependant, on pourrait confondre un bourgeonnement avec une fusion.

Comment reconnaître une fusion d'un bourgeonnement?

- Une fusion se produit entre deux protoplastes de tailles non négligeables. Par contre, un bourgeon est, au début de sa formation, nettement plus petit que la cellule-mère. Sa taille augmentera et ne sera comparable à celle de la cellule-mère que peu de temps avant sa séparation.

- Les fusions se produisent beaucoup plus tôt que le bourgeonnement dans une culture.

- Les protoplastes qui bourgeonnent sont polarisés alors que les protoplastes qui fusionnent ne le sont pas nécessairement.

* Pourquoi avoir remplacé "bourgeonnant" par "non-rond"?

- d'une part, le nombre de protoplastes bourgeonnants observés étant faible, les valeurs obtenues au cours du temps sont peu différentes les unes des autres, ce qui rend plus difficile l'interprétation des résultats.

- d'autre part, le critère "bourgeonnant" n'est pas objectif: tel expérimentateur considèrera un protoplaste comme bourgeonnant, tel autre pas; on n'obtiendra donc pas des résultats comparables.

Nous devons donc considérer les résultats avec précautions.

B. Action du DMSO sur la régénération de protoplastes

----- d'âges différents -----

a) Surface et variance de la surface des colonies. (Fig.3 et 4) -----

Un protoplaste mis en culture va, par division, régénérer une colonie. Cependant, sur 100.000 protoplastes au départ, on n'obtiendra au maximum qu'une centaine de colonies. De tels rendements sont fréquemment observés. La taille d'une colonie dépendra évidemment du nombre de cellules qui la composent et donc, du nombre de divisions qui ont eu lieu.

Lorsque les manipulations ont lieu entre 0 et 4 heures, le nombre et la taille moyenne, tant des colonies témoins que des colonies traitées diminuent (entre 0 et 4 heures).

Les protoplastes sembleraient donc passer par une période de plus grande sensibilité aux manipulations expérimentales (centrifugations, pipetages, ...). Passée cette période critique, la taille moyenne tant des colonies témoins que des colonies traitées augmente.

De 6 à 24 heures, la surface et la variance de la surface des colonies témoins semblent constantes, vu la reproductibilité limitée des mesures.

Entre 4 et 8 heures, le DMSO ne semble pas avoir d'effet.

Entre 8 et 14 heures, son effet serait maximal sur la surface et la variance de la surface des colonies. Ce pic semble correspondre au pic de cytocynèse observé précédemment.

Après 14 heures, témoins et traités sont confondus.

On constate cependant une variation dans la taille moyenne des colonies témoins: celle-ci pourrait provenir d'un nombre insuffisant de colonies mesurées par boîte, d'un protocole de mesures non aléatoire ou d'erreurs dans les mesures des surfaces.

b) Poids frais des colonies. (Fig. 5) -----

On constate que les témoins pèsent plus lourd après deux mois que les colonies traitées, alors qu'après un mois elles sont plus petites. Pour expliquer cela, on pourrait supposer que les grosses colonies, à croissance rapide, épuisent plus vite le milieu de culture et stagnent ensuite. Tandis que les petites colonies se développent moins rapidement mais plus régulièrement et après deux mois de culture sont devenues les plus importantes en poids et en taille.

Du reste, on constate un parallélisme avec les graphiques

Fig. 3 : Surface des colonies

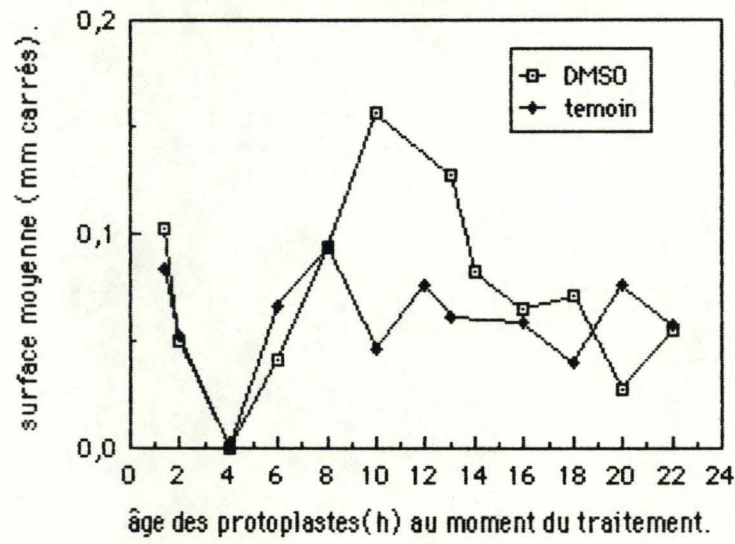


Fig. 4 : Variance de la surface des colonies

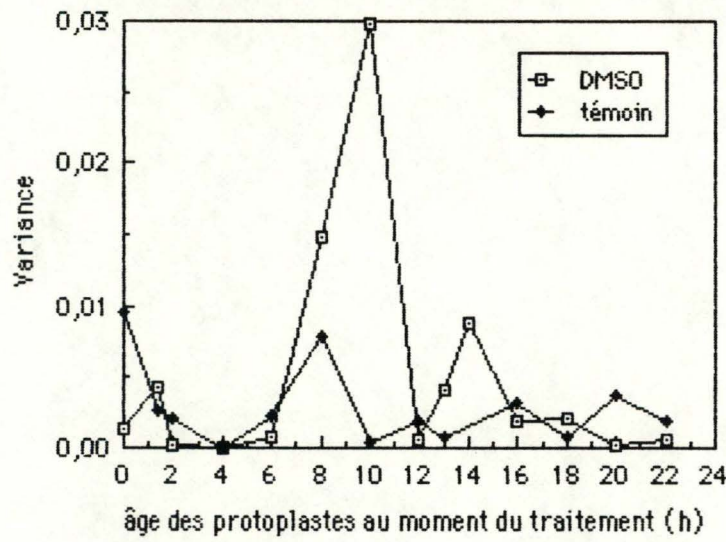
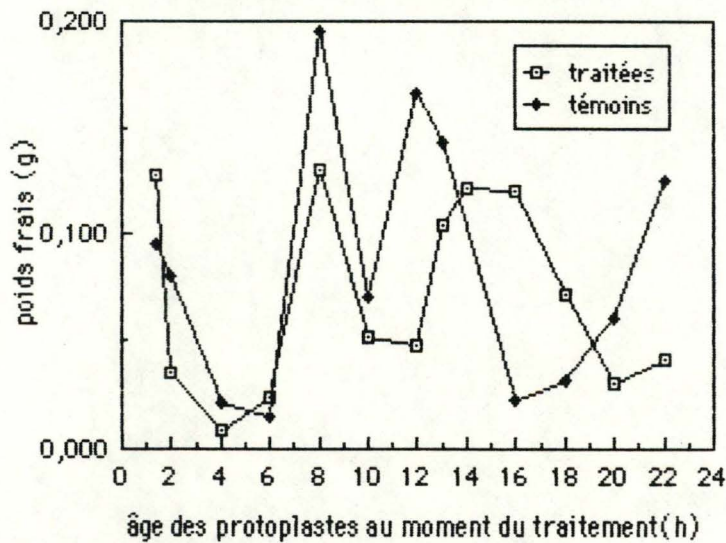


Fig. 5: Poids frais des colonies.



donnant la surface et la variance de la surface des colonies pour la période comprise entre 0 et 4 heures. Ceci est logique d'ailleurs : s'il y a moins de colonies, et de surcroît plus petites, le poids frais doit être lui aussi plus faible. Malheureusement, ce parallélisme est perdu pour ce qui est du reste du graphique, les poids des colonies témoins étant, comme on l'a dit précédemment, supérieurs aux poids des colonies traitées alors qu'on s'attendrait à l'inverse.

Les fortes variations qui existent entre deux colonies témoins nous incitent à remettre en question la méthode d'estimation des poids frais que nous avons utilisée.

Entre 8 et 14 heures, nous l'avons vu, le DMSO semble avoir un effet favorable sur la cytocynèse. Or, il agit sur la polymérisation des microtubules (Hahne et Hoffmann, 1984). Cette action sur la cytocynèse doit donc, selon toutes vraisemblances, se faire via les microtubules.

On suppose que le DMSO a un effet favorable à un moment donné du cycle cellulaire peut-être parce que, à ce moment, les microtubules s'associent pour influencer la migration du (des) noyau(x) à l'interface cellule-mère/bourgeon ou bien pour transporter les vésicules de Golgi contenant les polysaccharides qui formeront la paroi du bourgeon ou enfin pour former un ruban de préprophase. Cette dernière hypothèse serait néanmoins à écarter étant donné que le ruban de préprophase n'est observé que dans des tissus organisés.

C. Analyse des protoplastes au FACS.

L'analyse a été réalisée sur des protoplastes fixés et sur des noyaux isolés. Plus de la moitié des protoplastes après 24 heures de digestion enzymatique sont plurinucléés. Une analyse de leur contenu en DNA doit donc différer si l'on étudie une population de protoplastes entiers ou des noyaux isolés à partir de ces protoplastes. Il faut noter que les valeurs de fluorescence obtenues avec un cytofluorimètre en flux ne sont comparables que si elles ont été acquises lors d'une même série de mesures. Chaque mise en marche de l'appareil nécessite des réglages différant inévitablement d'une fois à l'autre. On peut cependant comparer la distribution des particules et son évolution au cours du temps.

a) Protoplastes fixés.

Les protoplastes ont été analysés d'heure en heure jusqu'à 16 heures. Les paramètres acquis comprennent la taille (FSC), la granulosité (SSC) et la fluorescence de longueur d'onde supérieure à 620 nm (FL2) pour 3000 particules par échantillon. Les résultats les plus significatifs sont présentés aux figures 6 à 11.

On constate (Fig. 6 à 8) à toutes les heures, l'existence de 3 populations qui diffèrent par l'intensité de leur coloration à l'IP. Après observation au microscope optique, on peut assimiler la population de plus faible fluorescence à des débris cellulaires colorés par l'IP. La proportion de ces débris augmente constamment avec l'âge des protoplastes (Fig.9). Ceci n'implique pas une plus grande fragilité des protoplastes âgés. Nous avons en effet vu (Fig. 3 à 5) que des protoplastes de 4 heures sont beaucoup plus sensibles aux manipulations que des protoplastes de 12 heures. L'accroissement du nombre de débris mesurés traduirait l'augmentation de la taille de ces débris au-delà du seuil de détection de l'appareil, ce qui coïncide avec la régénération d'une paroi cellulaire faiblement colorée à l'IP. Cette hypothèse est confortée par les résultats de la figure 3 où l'on observe un plafonnement dans l'évolution du pourcentage de débris après 14 heures, lorsque la paroi est clairement visible.

Sur la figure 6, on constate que la population de fluorescence intermédiaire contient un important groupe de particules de faibles tailles qui sont vraisemblablement des noyaux isolés. Ces noyaux apparaissent encore 6 heures après l'isolement (Fig.7) mais ont quasiment disparu après 16 heures (fig.8). Il s'agit probablement de noyaux libérés par l'éclatement de protoplastes multinucléés lors de la filtration à 25 μm qui précède la mise en culture. Ces noyaux seraient graduellement lysés lors du développement des protoplastes.

Les deux populations de fluorescence supérieure correspondraient à des protoplastes dont les noyaux se trouvent en G1 et en G2, le niveau de fluorescence de ces populations différant d'un facteur 2 (fig. 10). Des protoplastes binucléés en G1 sont ainsi indiscernables des protoplastes mononucléés en G2. La présence de protoplastes plurinucléés en G1 ou G2 expliquerait les valeurs de fluorescence hors d'échelle (extrême droite de la figure 10). Le diamètre d'un protoplaste étant proportionnel à la racine cubique de son volume, on n'observe pas d'étalement similaire des mesures de tailles (FSC) des protoplastes.

La distribution des tailles des 2 populations de protoplastes (débris non compris) est reprise en histogramme à la figure 11 (6, 10, 12 et 16 heures après l'isolement). On constate une diminution marquée de la taille des protoplastes entre 10 et 12 heures. Cette période est précisément celle où l'on observe un bourgeonnement synchronisé des protoplastes (fig.1). La diffraction lumineuse par des particules non-sphériques dépendant de l'orientation de celle-ci dans le faisceau laser, deux cellules identiques orientées perpendiculairement l'une à l'autre produiront des mesures de diffraction lumineuse aux petits angles (FSC) radicalement différentes (D.R. Parks). On peut supposer que les protoplastes bourgeonnants adoptent une orientation dans le faisceau laser telle que leur diffraction diminue, suggérant trompeusement que leur taille est moindre.

b) Noyaux isolés.

Dans les diagrammes "dot plot" fluorescence-taille des noyaux isolés, on distingue à nouveau trois populations (fig.12 à 15). La population qui occupe la partie inférieure de ces diagrammes pour 8 et 13 heures (Fig.13 à 15) est formée de débris. En ce qui concerne les deux autres populations, l'une est partiellement hors d'échelle de fluorescence au sommet des diagrammes. Ces deux populations représentent vraisemblablement des noyaux en phase G1 et G2: on peut en effet observer un doublement de la fluorescence entre ces deux populations lorsqu'on diminue l'amplification de ce paramètre d'un facteur 4 lors de l'acquisition des données (Fig.15). La valeur de fluorescence des noyaux en G1 augmente lors des premières heures après isolement pour plafonner ensuite à partir de 13 heures (Fig.16). Ceci traduit une synthèse de matériel nucléaire sans caryocynèse, du moins pendant la période étudiée. Il est intéressant de remarquer le parallélisme étroit qui existe entre l'augmentation progressive de la proportion de débris (mise en évidence lors de l'analyse des protoplastes) que nous avons attribuée à la régénération de la paroi, et l'augmentation de la quantité d'acides nucléiques présente dans les noyaux (Fig.17).

Evolution de la fluorescence (FL2) en fonction de la taille (FSC) de protoplastes au cours de la culture.

Fig.6: protoplastes âgés d'1 heure.

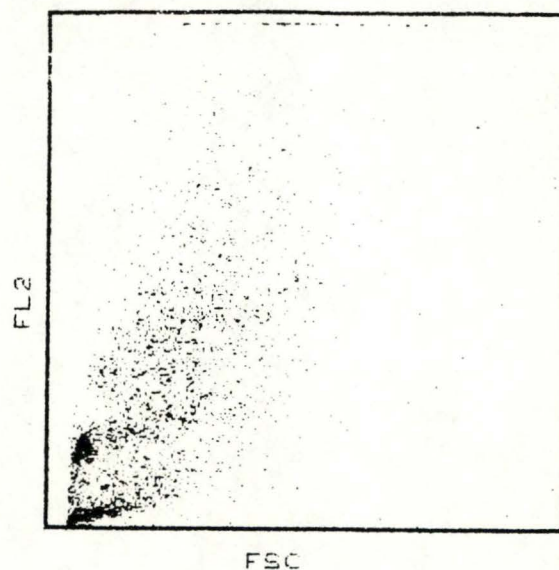


Fig.7: protoplastes âgés de 6 heures.

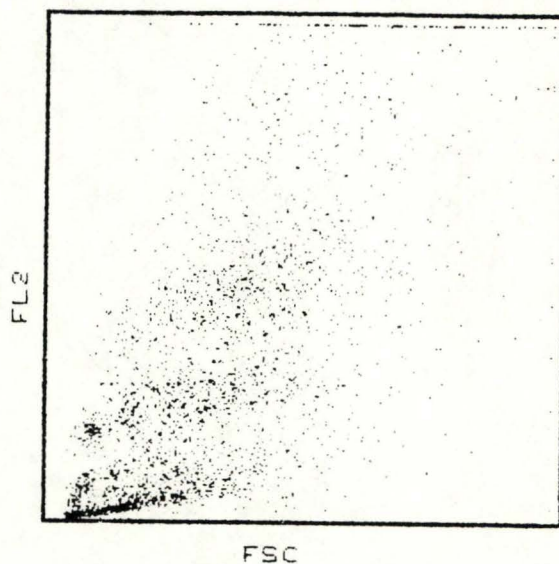


Fig.8: protoplastes âgés de 16 heures.

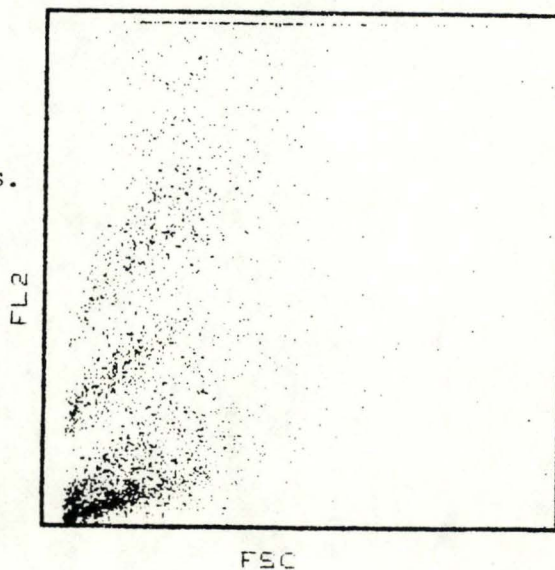
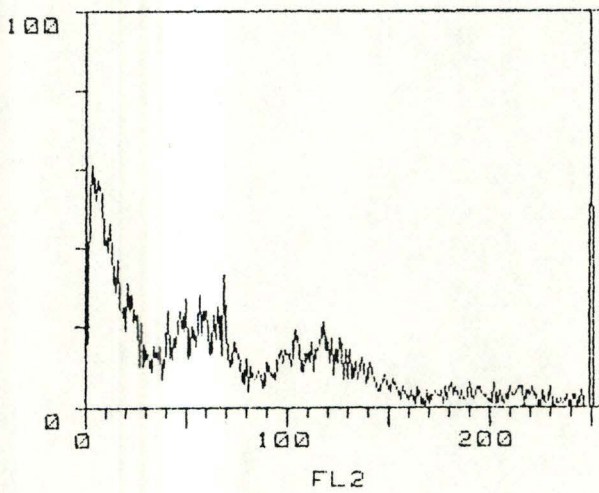
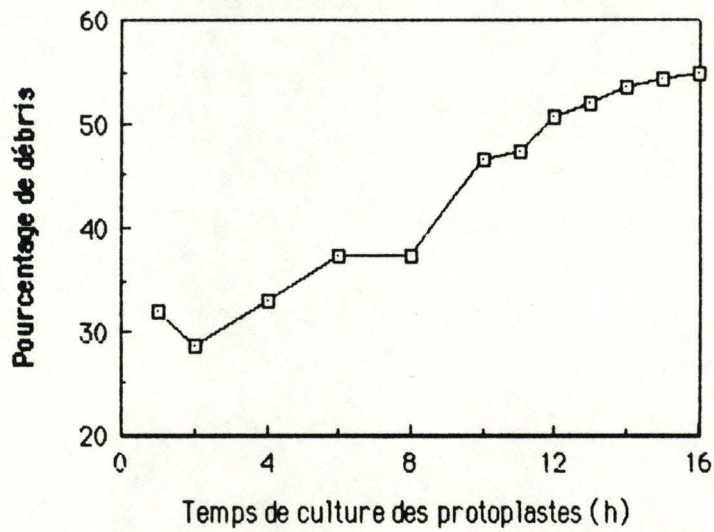


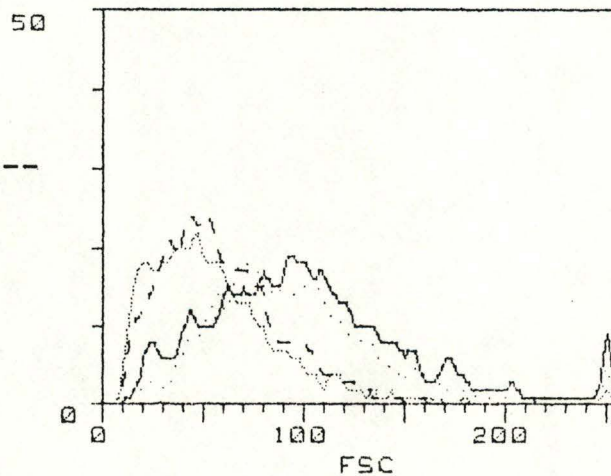
Fig. 9 : Pourcentage de débris en fonction du temps de culture



----- Fig.10: distribution de la fluorescence pour des protoplastes âgés de 6 heures.

Fig.11: Evolution de la taille des protoplastes en fonction de l'âge:

6 h: ———
 10h: . . .
 12h:
 16h: -----



Evolution de la fluorescence(FL2) en fonction de la
taille(FSC)de noyaux au cours de la culture.

Fig.12:noyaux âgés de 1 heure.

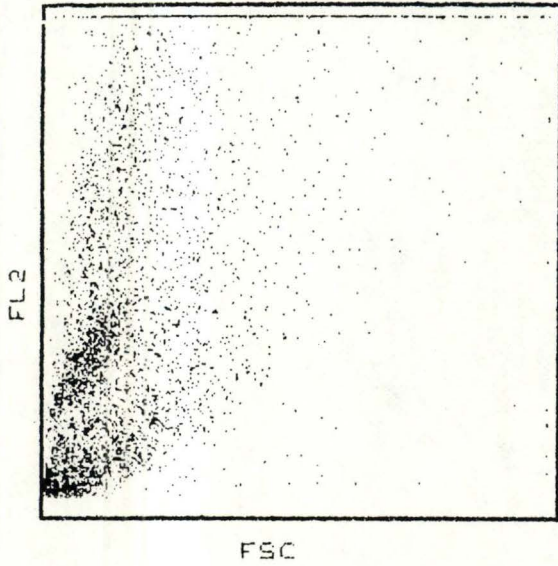


Fig.13:noyaux âgés de 8 heures.

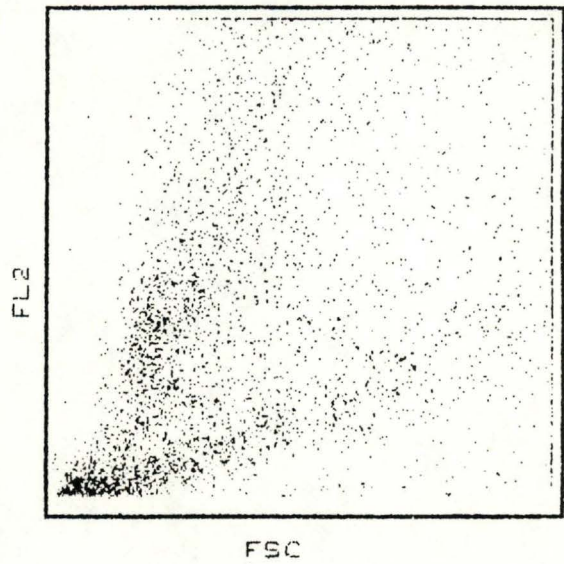


Fig.14:noyaux âgés de 13 heures.
amplification 4 fois.

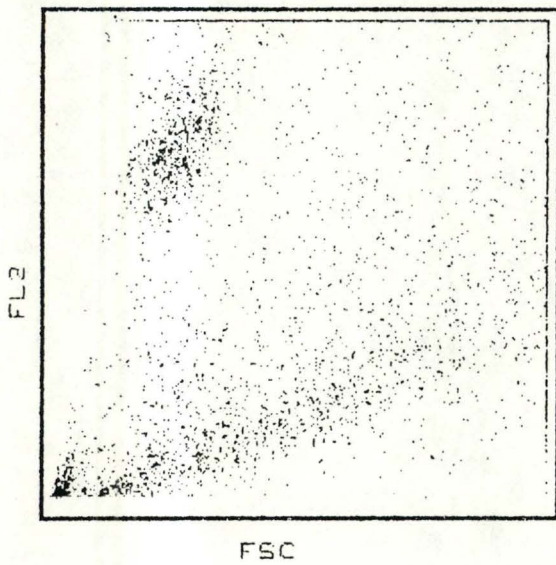


Fig.15:noyaux âgés de 13 heures.
amplification 1 fois.

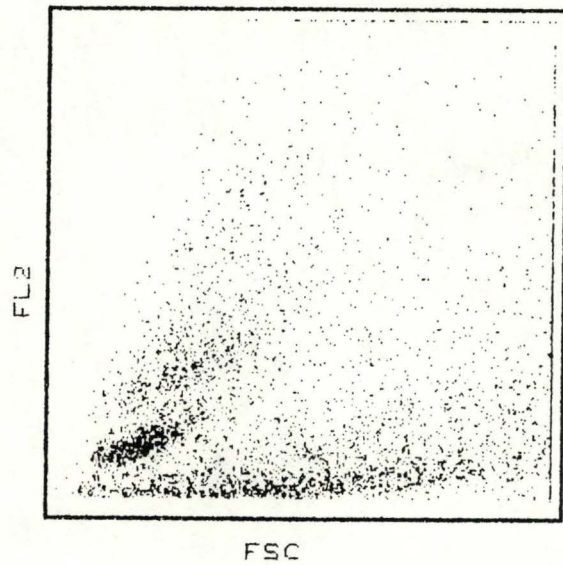


Fig. 16 : Fluorescence des noyaux en fonction de l'âge des protoplastes

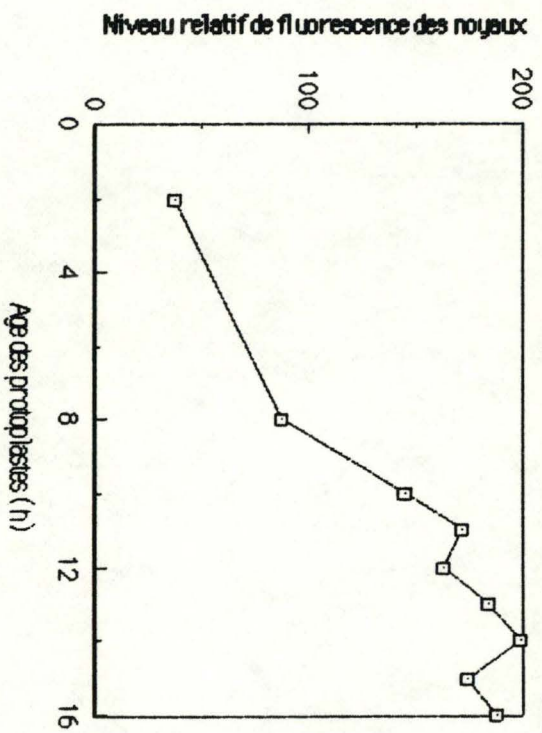
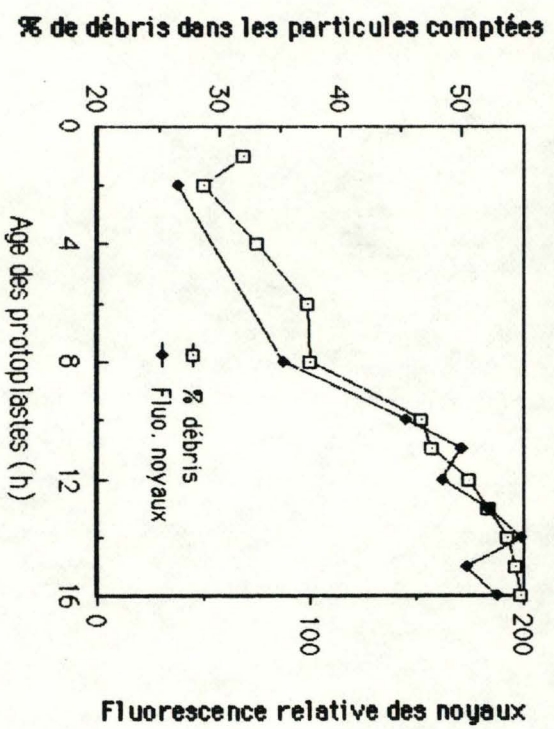


Fig. 17 : Régénération de la paroi et contenu en ADN



CONCLUSION

=====

Par comptage au microscope optique, nous avons pu localiser chez les protoplastes une vague de cytotinèse par bourgeonnement entre 11 et 14 heures après la mise en culture. Une polarisation des protoplastes précède le bourgeonnement et est très similaire à la polarisation de l'oeuf de Fucus après fécondation, lors des premiers stades de l'embryogenèse.

Ces protoplastes régénérants sont sensibles aux manipulations lorsqu'ils sont âgés de moins de 6 heures et ils répondent favorablement au DMSO entre 8 et 14 heures après isolement. Il s'agit probablement d'un effet positif dû à la stabilisation des microtubules qui interviendraient dans le processus de bourgeonnement.

Il y a synthèse simultanée de matériel nucléaire et de matériel pariétal. Cette synthèse serait quasiment terminée à 12 heures, c'est-à-dire au début de la vague de cytotinèse par bourgeonnement.

Notre travail a permis de caractériser le cycle cellulaire des protoplastes de F. arundinacea lors des premières heures après isolement. Une meilleure connaissance de ce cycle cellulaire facilitera peut-être la mise au point de techniques de culture *in vitro* des graminées telles que l'embryogenèse somatique et son application à la production de semences artificielles.

Liste des abréviations:

Sels de MS : sels de MURASHIGE et SKOOG
MS/CSM : MURASHIGE et SKOOG/CELL SUSPENSION MEDIUM
MS/PS : MURASHIGE et SKOOG/PROTOPLAST SUSPENSION
2,4 D : ACIDE 2,4 DICHLOROPHENOXYACETIQUE
BAP : BENZYLQMINOPURINE
FACS : FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER
IP : IODURE DE PROPIDIUM
SSC : SIDE SCATTER
FSC : FORWARD SCATTER
DMSO : DIMETHYL SULFOXYDE
DNA : ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
RNA : ACIDE RIBONUCLEIQUE

BIBLIOGRAPHIE

Bergounioux C., C.Perennes, S.C. Brown, C. Sarola, P.Gadal (1988)
Relation between protoplast division, cell-cycle stage and nuclear chromatin structure
Protoplasma 142: 127-136

Cereghetti M. (1987)
Etude de la cinétique d'isolement et de fusion de protoplastes de Festuca arundinacea
(L.) Schreb.
Memoire FUNP

Dalton S.J. (1988).
Plant regeneration from cell suspension protoplasts of Festuca arundinacea (L.) Schreb.
and Lolium perenne L.
J. Plant physiol. 132: 170- 175

Darzynkiewicz Z. , F. Traganos, T. Sharpless, M. R. Melamed (1976)
Lymphocyte stimulation: A rapid multiparameter analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

Fowke L.C., O.L. Gamborg (1980)
Applications of protoplasts to the study of plant cells
Int. review of cytol. 68

Furuya M. (1984)
Cell division patterns in multicellular plants
Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 349-373

Galbraith D.W. (1984)
Flow cytometric analysis of the cell cycle
In: cell culture and somatique cell genetics of plants
Vasil, I.K.; editor : (1) chapitre 83: 765-777

Gould A.R. (1984)
Cell cycle analysis by conventional methods
In: cell culture and somatique cell genetics of plants
Vasil, I.K.; editor: (1), chapitre 82: 753-764

Green P.B., A. King (1966)

A mechanism for the origin of specifically orientated textures in development with special reference to Nitella wall texture.

Aust. J. Biol. Sci. 19 : 421-437

Greimers R. (1988)

Cytofluorimetrie de flux: analyses multiparamétriques
et tri cellulaire

Gunning E.S., A.R. Hardham (1982)

Microtubules

Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 651-698

Hahne G., W Herth, F. Hoffmann (1983)

Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts

Protoplasma 115: 217-221

Hahne G., F. Hoffmann (1984)

Dimethyl sulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5449-5453

Hahne G., F. Hoffmann (1985)

Cortical microtubular lattices: Absent from mature mesophyll and necessary for cell division?

Planta 166: 309-313

Heath I.B. (1974)

A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis.

J.Theor. Biol. 48: 445-449

Hogestu T., H. Shibaoka (1978)

The change of pattern in microfibril arrangement on the inner surface of the cell wall of Closterium accrosum during cell growth

Planta 140: 7-14

Kao K.N., M.R. Michayluk (1974)

A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts

Planta 115: 355-367

Keller W.A., G.Z. Melchers (1973)

Effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion

Naturforsch. 28: 737-741

Larkin P.J., W.R. Scowcroft (1981)

Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement.
Theor. Appl. Genet. 60: 197-214

Lloyd C.W., A.Slabas, A.J. Powell, S.B. Lowe (1980)

Microtubules, protoplasts, and plant cell shape: an immunofluorescent study
Planta 147: 500-506

MacLachlan G.A. (1977)

Cellulose metabolism and cell growth.

In: Plant Growth Regulation,
9th International Conference on Plant Growth Substances.
13-20, P.E. Pilet ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Maeda H., N. Ishida (1967)

Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener
J.Biochem. 62: 276-278

Marchant H.J., E.R. Hines (1979).

The role of microtubules and cell-wall deposition in elongation of regenerating protoplasts of
Mougeotia
Planta 146: 41-48

Meyer Y., W.O. Abel (1975a)

Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall
formation
Planta 125: 1-13

Meyer Y. , W.O. Abel (1975 b)

Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco
protoplasts.
Planta 123: 33-40

Mizuno K. (1985)

In vitro assembly of microtubules from tubulins of several higher plants.
Cell Biology International Reports 9 , (1): 13-21

Morejohn L.C., D.E. Fosket (1982)

Higher plant tubulin identified by self assembly into microtubules in vitro
Nature 297: 426-428

Murashige T., F. Skoog (1962)

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures
Physiol. plant. 15: 473-497

Nagata T., I. Takebe (1970)

Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts
Planta 92: 301-308

Palevitz B.A., P.K. Hepler (1976)

Cellulose microfibril orientation and cell shaping in developing guard cell of Allium: the role of microtubules and in accumulation
Planta 132: 71-93

Parks D.R., L.L. Lanier , L.A. Herzenberg

Flow cytometry and fluorescence activated cell sorter

In: Handbook of experimental immunology ,vol 1: Immunochemistry
Chapitre 29 . Blackwell Scientific Publications

Power J.B., S.E. Cummins, E.C. Cocking (1970)

Fusion of isolated plant protoplasts
Nature 225: 1016-1018

Quatrano R.S. (1978)

Development of cell polarity
Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 487-510

Schilde - Rentschler L. (1977)

Role of the cell wall in the ability of tobacco protoplasts to form callus
Planta 135: 177-181

Thompson J.A., R. Abdullah, E.C. Cocking (1986)

Protoplast culture of rice (Oryza sativa L.) using media solidified with agarose
Plant. Sci. 47: 123-133

Zimmermann U., P. Scheurich (1981)

High frequency fusion of protoplasts by electric fields.
Planta 151: 26-32

Zryd J.P. (1988)

In: culture de cellules, tissus et organes végétaux.
Fondements théoriques et utilisations pratiques.