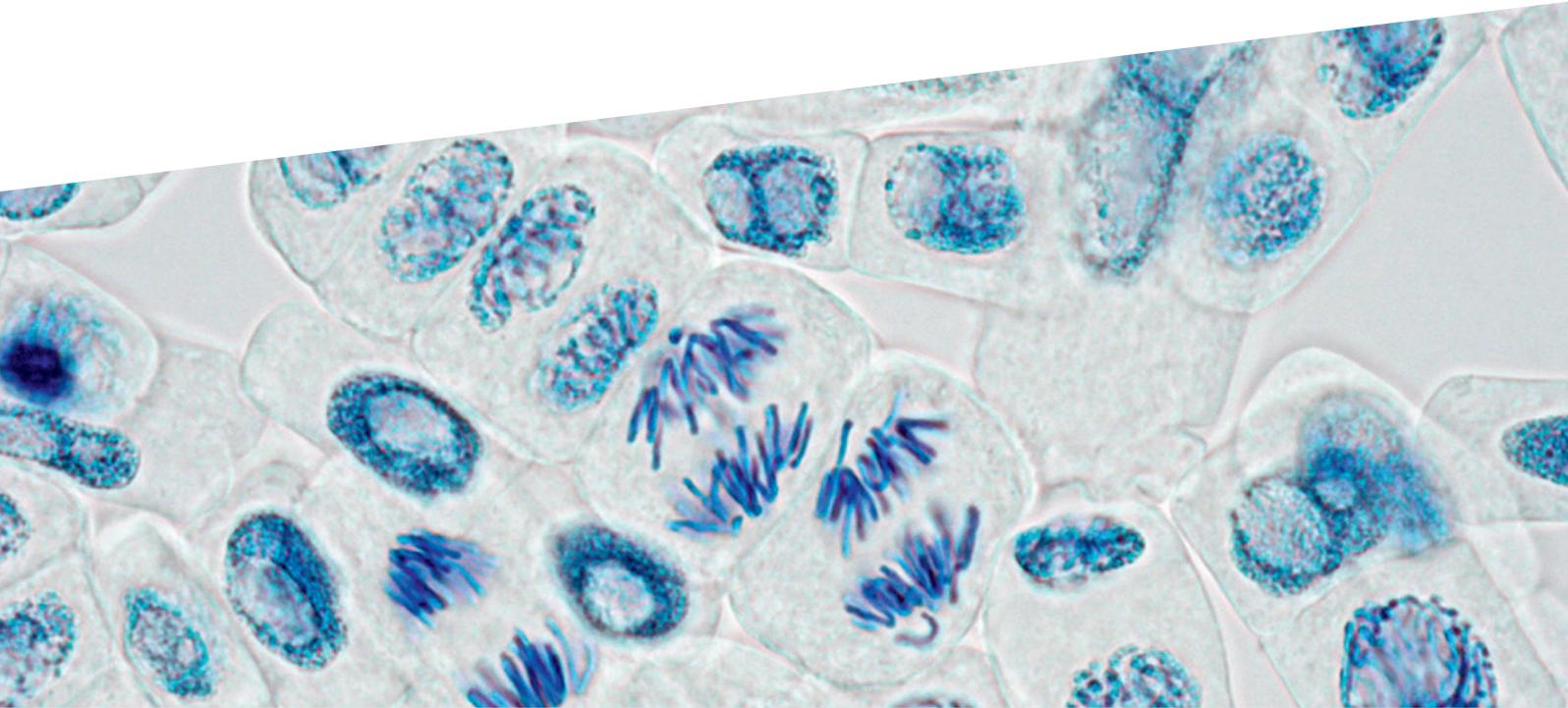


# WHITE PAPER CYTOMÉTRIE



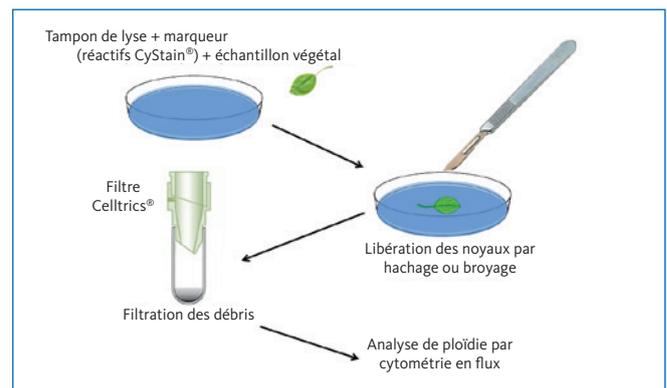
## Cytométrie en flux pour l'analyse de la ploïdie et la taille du génome chez les plantes et autres organismes.

### Introduction :

Dès son origine, la cytométrie en flux fut développée pour mesurer les variations de quantité de matériel génétique dans les cellules dysplasiques. Cette technologie demeure la méthode de référence en biologie végétale pour évaluer la taille d'un génome ou le niveau de ploïdie.

### Principe de la méthode :

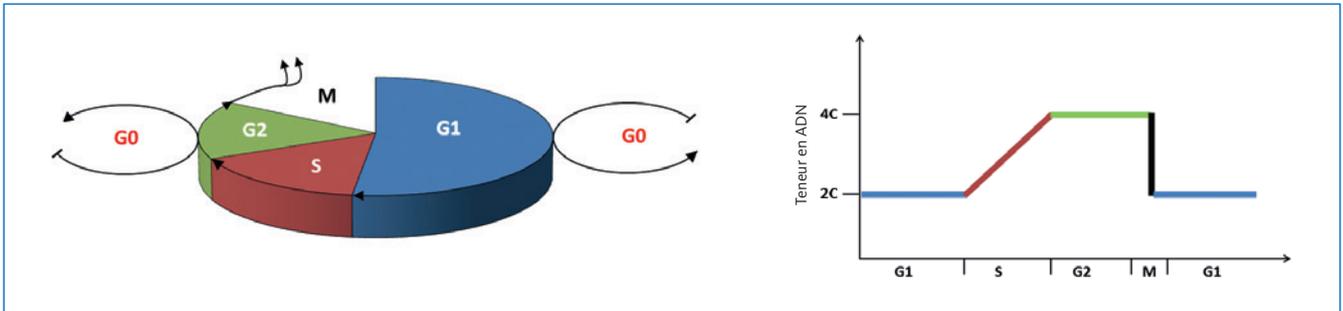
Les noyaux des cellules sont libérés d'un fragment de tissu d'environ 1 cm<sup>2</sup> (ou de 20 mg) par action mécanique en présence d'un tampon d'extraction. Après filtration, les noyaux des cellules sont marqués grâce aux solutions CyStain<sup>®</sup> de Sysmex Partec contenant soit de l'iodure de propidium (IP), soit du DAPI (Figure 1). Cette préparation est alors analysée sur un cytomètre en flux CyFlow<sup>®</sup> comportant une ou plusieurs sources d'excitation verte (IP), bleue (IP), ultra-violette (DAPI), ...



**Figure 1 :** Étape de préparation d'un échantillon végétal pour l'analyse de la ploïdie.

## Le cycle cellulaire :

Dans les conditions physiologiques, les cellules présentent naturellement un profil d'ADN correspondant à un cycle cellulaire avec différentes phases (Figures 2 & 3) :



**Figure 2 :** Rappel du cycle cellulaire. Légendes : phase G0 de repos, phase G1 de 1er intervalle, phase S de synthèse, phase G2 de 2nd intervalle et phase M de mitose.

## Suspension de noyaux :

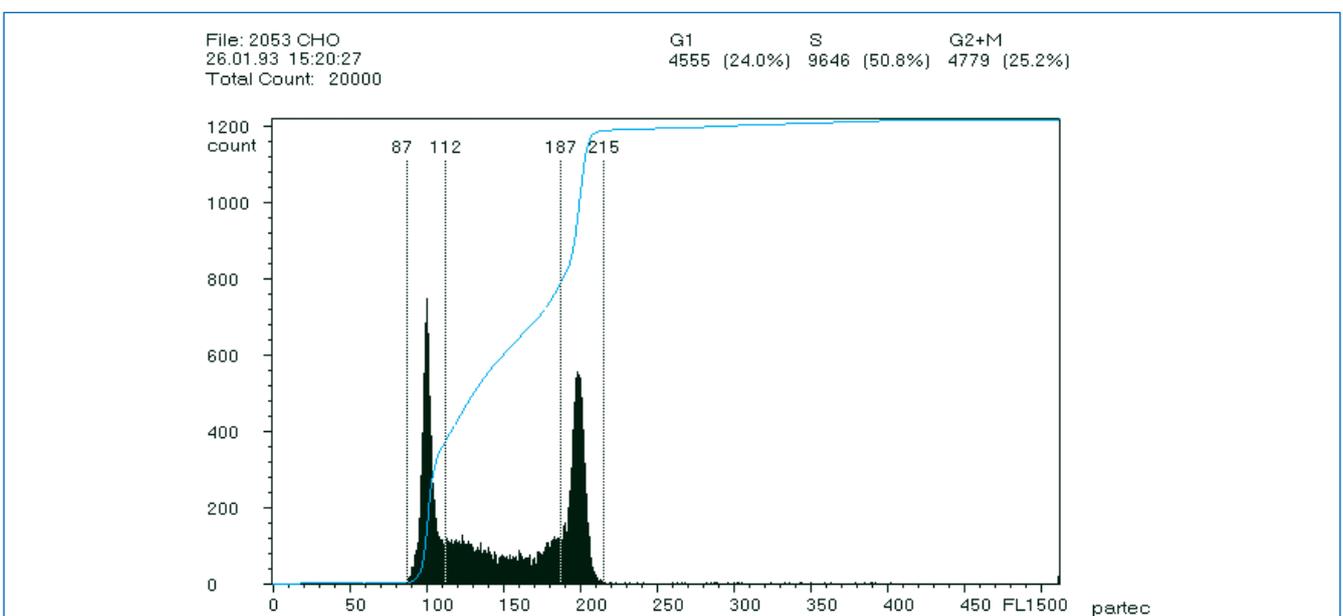
L'étape de filtration enlève les débris des tissus lors de la libération des noyaux. Toutefois, les petits fragments non éliminés pendant l'étape de filtration tels que les chloroplastes, les mitochondries, les substances solubles phénoliques, ainsi que les DNases, RNases... peuvent tous altérer la qualité de l'analyse.

L'ajout d'agents antioxydants (bisulfite, mercaptoéthanol), protecteurs des tanins (PVP), de lyse des chloroplastes (Triton), de lyse de l'ARN (RNases) ainsi qu'une préparation sur bain glacé corrigent les interactions dues aux substances indésirables.

## Utilisation d'un étalon interne :

Il est parfois recommandé d'utiliser un étalon composé de noyaux d'une espèce dont le génome à une taille proche de celui de l'échantillon à analyser. Cet étalon sera préparé en même temps que l'échantillon afin que les interactions s'opèrent de la même façon sur les deux espèces. La position relative des pics entre l'étalon et l'échantillon rend possible une mesure précise de l'échantillon, sous certaines conditions, en connaissant les caractéristiques de l'ADN de cet étalon interne en picogrammes (pg) ou en paires de bases (bp) sachant que :

$$\begin{aligned} \text{Contenu en ADN (paire de bases)} \\ = 0,978 \cdot 10^9 \times \text{Contenu en ADN (pg)} \end{aligned}$$

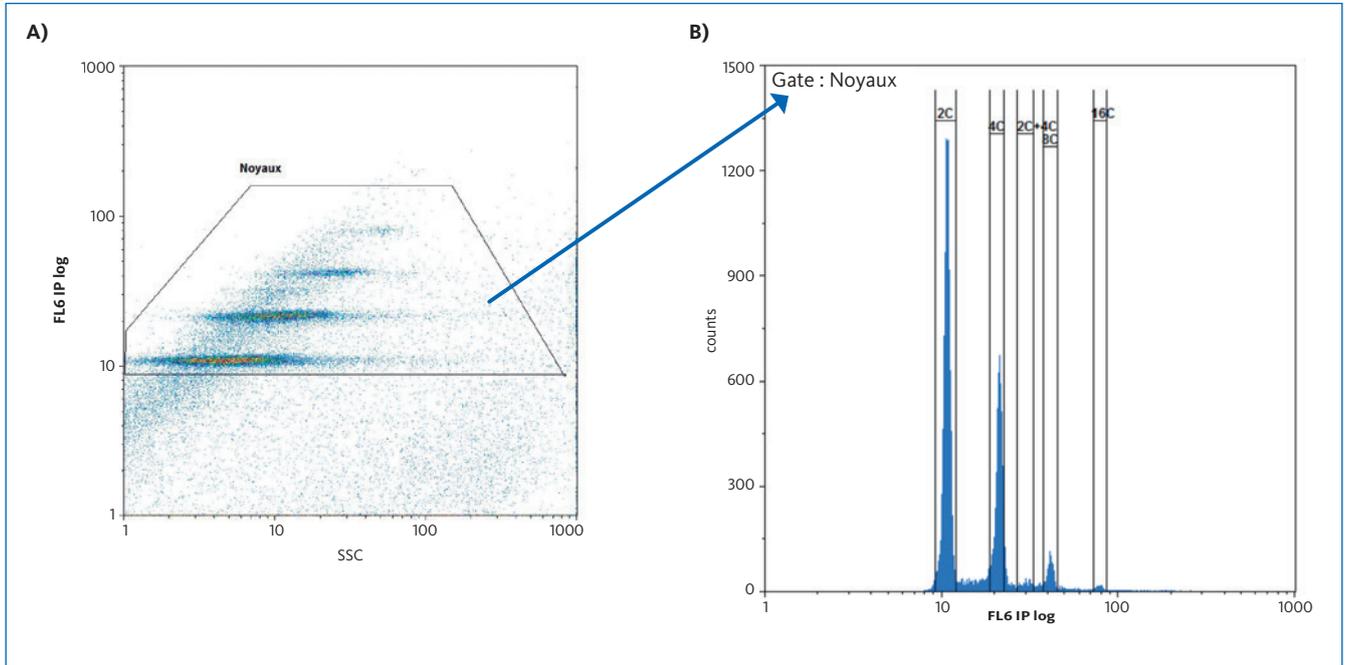


**Figure 3 :** Analyse de cycle cellulaire par cytométrie.

## Analyse par cytométrie en flux :

Afin d'éliminer les débris qui sont passés au travers de la filtration, la cytométrie permet de déclencher une analyse sur un paramètre de fluorescence et de conditionner sur

cette analyse en fluorescence, une fenêtre créée à partir d'un cytogramme de granularité « SSC » versus fluorescence « DAPI ou IP » (Figures 4 A & B).



**Figure 4 :** Analyse de la ploïdie d'un échantillon de tomate (*Lycopersicum esculentum*) ; 4A cytogramme affichant granularité (SSC) vs. fluorescence FL6 émise par l'IP, la fenêtre « Noyaux » est appliquée sur la figure 4B ; 4B histogramme de fluorescence FL6 émise par l'IP et conditionnée sur la fenêtre « Noyaux » affichant les pics de ploïdie.

## Évaluation du niveau d'endoréduplication :

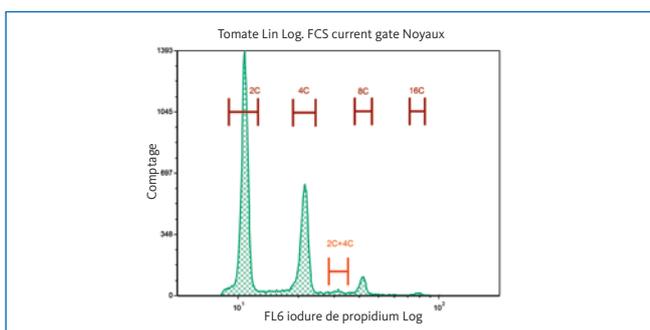
L'exemple précédent (Figures 4) de tomate (*Lycopersicum esculentum*) illustre le phénomène d'endoréduplication correspondant à une réplication de l'ADN, comme une mitose, mais sans division du noyau ni de la cellule. Aux pics du cycle cellulaire classique se superposent les pics d'endoréduplication :



On peut également voir les noyaux les plus abondants analysés simultanément, ces coïncidences génèrent un artefact de pic « 2C + 4C » (Figures 5 & 6).

Region	Gate	% Gated	Count	Mean-x	CV-x %
2C	Noyaux	54,49	18367	10,80	4,17
4C	Noyaux	26,64	9648	21,23	3,76
8C	Noyaux	4,32	1460	41,58	3,72
16C	Noyaux	0,74	260	78,68	3,87
2C+4C	Noyaux	1,95	649	30,40	5,55

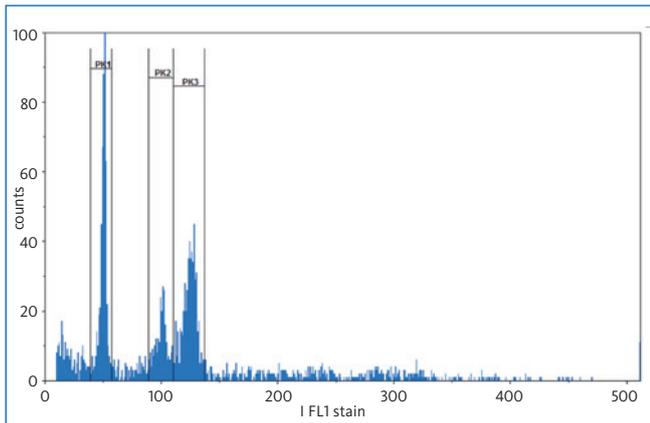
**Figure 6 :** Statistique des régions correspondant aux différents pics d'endoréduplication ou de coïncidences.



**Figure 5 :** Analyse de la ploïdie d'un échantillon de tomate (*Lycopersicum esculentum*) affichant les pics d'endoréduplication.

## Mesure de la taille du génome :

La quantification d'ADN par cytométrie avec étalon interne nécessite l'utilisation d'un colorant sans spécificité de bases, dit « intercalant », pour quantifier les tailles de génome le plus précisément possible. Ces fluorochromes intercalants sont généralement l'iodure de propidium ou le bromure d'éthidium (ex. ci-après RNase et iodure de propidium Figure 7).



Region	Count	% Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%
PK1	500	25.00	49.50	49.59	6.03
PK2	251	12.55	99.60	99.73	5.11
PK3	534	26.70	123.97	124.11	4.74

**Figure 7 :** Analyse de la teneur en ADN d'un échantillon de prêle (*Equisetum sp.*) en utilisant des fragments d'ail (*Allium sativum*) de teneur en ADN déterminée comme référence.

Les régions PK1 et PK2 correspondent respectivement aux pics 2C et 4C de l'ail (*Allium sativum*) utilisées comme référence sachant que 2C = 34,80 pg. La région PK3 de la prêle (*Equisetum sp.*) permet de calculer l'index d'ADN par rapport au PK1 =  $123,97/49,50 = 2,50$ , par conséquent la valeur 2C d'*Equisetum sp.* est de  $2,50 \times 34,80 = 87,15$  pg.

## Mesure du rapport AT/GC :

Le principe repose sur l'utilisation d'un intercalant versus un fluorochrome spécifique de répétition des bases : par exemple, 5 x AT pour Hoechst 33342 et 3 x GC pour la mithramycine.

### Mesure du rapport AT/GC

$R_{IP} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'iodure de propidium  
 soit  $R_{HO} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec Hoechst 33342  
 soit  $R_{CA} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec la Chromomycine A3

$\% \text{AT}_{\text{test}} = \% \text{AT}_{\text{étalon}} \times (R_{HO}/R_{IP})^{1/5}$  et/ou  $\% \text{GC}_{\text{test}} = \% \text{GC}_{\text{étalon}} \times (R_{CA}/R_{IP})^{1/3}$

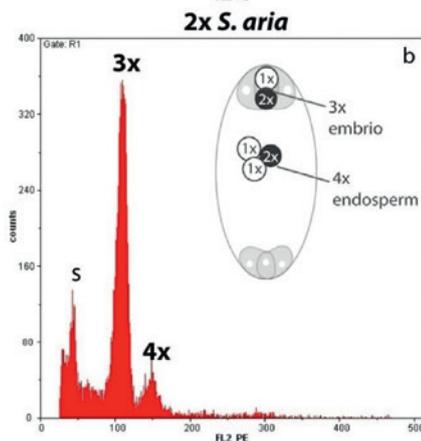
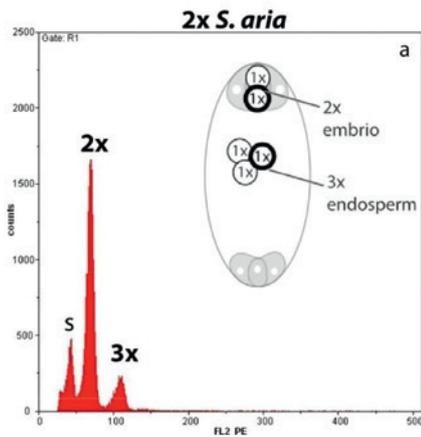
En vérifiant,  $\% \text{AT}_{\text{test}} + \% \text{GC}_{\text{test}}$ , on doit trouver 100 %

## Apomixie et Aneuploïdie :

L'apomixie est la substitution à une reproduction sexuelle classique par une reproduction asexuée sans fertilisation mais produisant des graines. Les plantes apomictiques sont généralement identiques d'une génération à la suivante.

Les pics générés par cytométrie en flux grâce aux cellules de l'embryon et de l'endosperme des graines définissent l'apomixie ou non, ainsi que le type d'apomixie (Figure 8).

### Sexual profiles



### Apomitic profiles

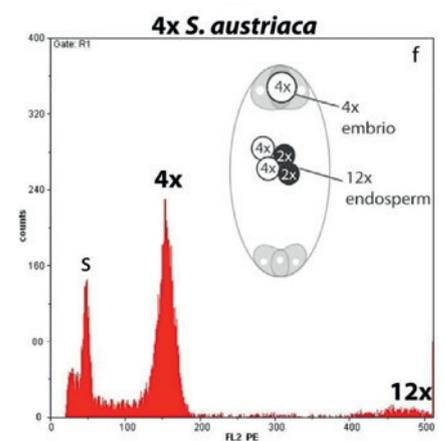
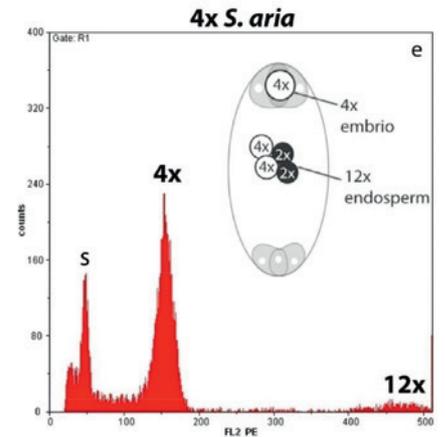
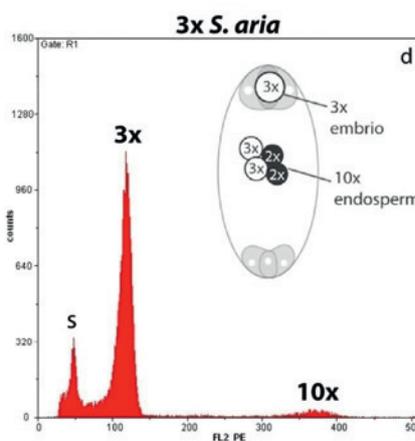
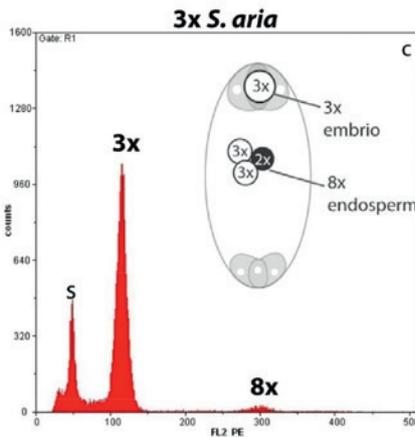


Figure 8 : Étude des modes de reproduction en fonction de la disposition des pics sur les histogrammes de fluorescence par cytométrie en flux (Matzk & al. 2000).

En cas d'aneuploïdie, la position des pics sera affectée et apparaîtra comme dans l'exemple suivant : semis de colza (*Brassica napus*) avec un nombre de chromosomes  $n=16$  et  $n=19$  générant des double-pics.

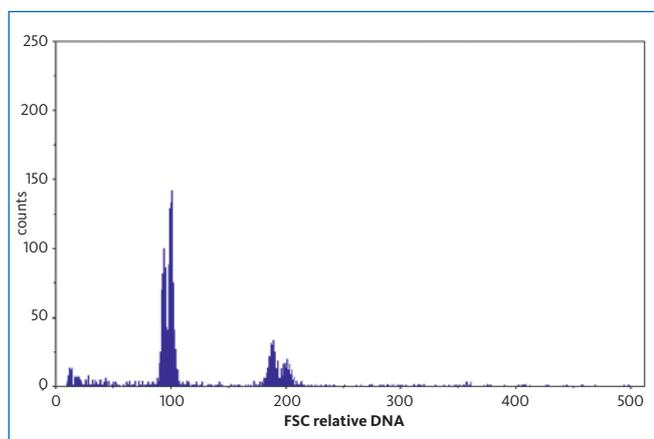


Figure 9 : Analyse de ploïdie d'un échantillon de colza (*Brassica napus*) et présentant un profil d'aneuploïdie avec dédoublement des pics 2C et 4C.

## Remerciements :

Nous remercions Mickaël Bourge (Plateforme de Cytométrie CNRS – FRC3115 – IMAGIF 91 118 Gif-sur-Yvette) pour ses conseils et son aimable relecture du document.

## Bibliographie

- [1] **Bennert W, Lubienski M, Körner S. & Steinberg M.** (2005) : Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Equisetaceae, Pteridophyta) *Annals of Botany* 95 : 807–815.
- [2] **Brown SC, Catrice O, Siljak-Yakolev S, Mergaert P & Satiat-Jeunemaître B.** (2010) : Le cycle et l'endoréduplication chez les végétaux, Dans : *Cycle cellulaire et cytométrie en flux*. X. Ronot, & D. Grunwald, J-F. Mayol, (eds) Tec & Doc – Lavoisier, Paris, pp190 – 213 & 274 – 276.
- [3] **Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H & Greilhuber J.** (2003) : Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A : 127–128.
- [4] **Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC & Siljak-Yakolev S.** (1993) : Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14.6 : 618 – 626. 0196 – 4763.
- [5] **Marie D & Brown SC.** (1993) : A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for seventy species. *Biology of the Cell* 78 : 41–51.
- [6] **Matzk F, Meister A & Schubert I.** (2000) : An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal* 21 : 97–108.
- [7] **Ochatt S.** (2008) : Flow Cytometry in Plant Breeding. *Cytometry Part A* 73A : 581–598.

WP ploidy rev.002 · octobre 2014



© Copyright 2014 – Sysmex Europe GmbH

**Distributeur en France : Sysmex France S.A.S.**  
22 Avenue des Nations, ZAC Paris Nord 2, CS 51414 Villepinte, 95944 Roissy CDG Cedex, France · Téléphone +33 825 007 077 (0,15 € TTC/min) · Téléfax +33 1 48632350  
info@sysmex.fr · [www.sysmex.fr](http://www.sysmex.fr)

**Fabricant : Sysmex Partec GmbH**  
Am Flugplatz 13, 02828 Görlitz, Allemagne · Téléphone +49 3581 8746-0 · Téléfax +49 3581 8746-70 · info@sysmex-partec.com · [www.sysmex-partec.com](http://www.sysmex-partec.com)