



## THESIS / THÈSE

### MASTER

**Cycle cellulaire et synthèse de polysaccharides pectiques. Étude par cytométrie en flux et marquage immunologique de protoplastes régénérants de *Daucus carota*.**

DAVID, Christine

*Award date:*  
1991

[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.

Cycle cellulaire et synthèse de  
polysaccharides pectiques.  
Etude par cytométrie en flux et  
marquage immunologique de  
protoplastes régénérants de  
*Daucus carota*.

DAVID Christine

**Cycle cellulaire et synthèse de polysaccharides pectiques. Etude par cytométrie en flux et marquage immunologique de protoplastes régénérants de *Daucus carota*.**

DAVID Christine

Résumé

Nous avons suivi la régénération de la paroi végétale, plus précisément d'un de ses constituants: la pectine acide, sur protoplastes isolés enzymatiquement de culture de cellules en suspension de *Daucus carota*. Cette étude a été menée par cytométrie en flux. Dans un premier temps, nous avons mis au point un marquage immunologique. Le marqueur étant constitué d'un anticorps monoclonal, dirigé contre une région homopolygalacturonique en dimères d'"egg-box", détecté par un second anticorps couplé à un fluorochrome, le FITC. Nous avons étudié la régénération de la paroi en corrélation avec le déroulement du cycle cellulaire. A cette fin, nous avons utilisé un agent de synchronisation: l'aphidicoline et un deuxième marqueur, spécifique de l'ADN: l'iodure de propidium.

Nous avons ainsi déterminé la durée du cycle cellulaire de nos protoplastes, cycle qui s'étale sur trois jours et demi dont douze heures de phase S. Cette dernière serait synonyme de stabilité pour la taille et pour la granulosité du protoplaste et de diminution pour l'excrétion de pectine. Une activité de synthèse intense, un dépôt pariétal de pectine et une augmentation de volume se réaliseraient au cours des phases M et G<sub>1</sub>. Nous avons également fait usage de la fonction tri du cytomètre en flux, qui nous a entre autres permis de confirmer que seule une partie ( $\pm 45\%$ ) des protoplastes régénèrent une paroi et se divisent.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques  
Septembre 1991  
Promoteur : Prof. P. VAN CUTSEM

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Van Cutsem pour l'accueil dans son laboratoire ainsi que pour ses conseils et son entière disponibilité.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur Letesson pour l'accueil dans son département.

Je tiens à remercier vivement Christian Didembourg pour son dévouement, sa patience et sa bonne humeur, mais surtout pour sa précieuse contribution concernant l'installation du tri cellulaire.

Je remercie le Docteur R. Greimers du laboratoire d'anatomie pathologique de l'université de Liège et Monsieur Janssens de la société Smith-Kline-Rit pour leurs conseils judicieux concernant le tri cellulaire.

Toute ma gratitude au Docteur C. Bergounioux de l'université de Paris-sud à Orsay pour son avis général sur le travail.

Merci aussi à toute l'équipe du labo: Albert Charlier, Françoise Liners, Peter Baes, Johan Messian, Pierre Cambier et Michel Voué.

# Table des matières

## Introduction

1. <u>La paroi végétale</u>	1
1.1. <u>Organisation de la paroi</u> .....	1
1.2 <u>Les pectines</u> .....	3
a) Structure .....	3
b) Gélification .....	3
c) Localisation.....	4
1.3 <u>Biosynthèse de la paroi</u> .....	5
a) Synthèse des polysaccharides non-cellulosiques .....	5
b) Synthèse de la cellulose .....	7
c) Régulation de la synthèse .....	7
2. <u>Les protoplastes</u>	8
2.1 <u>Intérêt des protoplastes</u> .....	9
2.2. <u>Isolement de protoplastes</u> .....	9
2.3. <u>Protoplastes et cycle cellulaire</u> .....	10
a) Déroulement du cycle cellulaire .....	10
b) Régulation du cycle cellulaire.....	11
3. <u>Régénération de la paroi</u>	12
3.1. <u>Une situation artificielle?</u> .....	12
3.2. <u>Critères de régénération</u> .....	13
3.3 <u>Connaissances actuelles</u> .....	14
a) Régénération de la cellulose .....	14
b) Composition des polysaccharides non-cellulosiques .....	15

c) Synthèse de polysaccharides extracellulaires .....	15
d) Retour à la forme cellulaire in situ .....	16
4. <u>But du travail</u>	17
 <b><u>Matériels et méthodes</u></b>	
I. <u>Préliminaires</u>	18
1. <u>Obtention d'une culture en suspension de     cellules de carotte</u> .....	18
a) La callogénèse .....	18
b) Initiation de la suspension cellulaire .....	18
c) Entretien de la suspension cellulaire .....	19
2. <u>Isolement de protoplastes</u> .....	19
3. <u>Purification des protoplastes</u> .....	21
a) Purification selon la taille .....	21
b) Purification selon la densité .....	22
4. <u>Fixation des protoplastes</u> .....	23
II. <u>Marquage de la paroi</u>	24
1. <u>Principe général du marquage immunologique</u> .....	24
2. <u>Cytométrie en flux</u> .....	25
a) Fonction analyseur du FACS .....	25
b) Fonction trieur du FACS .....	26
3. <u>Protocole de marquage pour le FACS</u> .....	27
4. <u>Test Elisa</u> .....	30
III. <u>Synchronisation des cellules</u>	32
1. <u>Par traitement à basse température</u> .....	33
2. <u>Par l'aphidicoline</u> .....	33

IV. <u>Marquage de l'ADN</u>	35
1. <u>L'iodure de propidium</u> .....	35
2. <u>Protocole de marquage pour le FACS</u> .....	36
a) Dégradation à l'HCl.....	37
b) Dégradation à la ribonucléase .....	38
c) Analyse de l'ADN sur noyaux.....	38

## **Résultats**

I <u>Mise au point des protocoles expérimentaux</u>	41
1. <u>Détermination d'une méthode de purification</u> .....	41
1. Présentation "dot plot" .....	41
2. Présentation "histogramme" .....	42
3. Marquage des deux populations au 2F4 .....	44
2. <u>Cinétique enzymatique</u> .....	46
3. <u>Choix du fixateur</u> .....	48
4. <u>Dégradation de l'ARN</u> .....	49
II. <u>Régénération de la paroi</u>	50
1. <u>Définitions de trois sous-populations de la population 2</u> .....	50
a) Evolution du pourcentage des sous-populations.....	51
b) Intensité du marquage .....	54
2. <u>Régénération sur cellules non-synchronisées</u> .....	55
a) Evolution des différents paramètres.....	55
b) Pectine déestérifiée .....	59
c) Test Elisa .....	61

3. <u>Régénération sur cellules synchronisées</u> .....	62
a) Nombre de noyaux par protoplaste .....	62
b) Traitement de synchronisation .....	63
c) Cycle cellulaire et sous-populations .....	64
d) Evolution des parametres et cycles cellulaires .....	66
4. <u>Tri cellulaire en cytométrie en flux</u> .....	72
a) Tri de la population 1 .....	72
b) Tri de la sous-population 2A .....	73
c) Tri de la sous-population 2B .....	73
d) Tri de la sous-population 2C .....	74
<b><u>Conclusion et perspectives</u></b> .....	76
<b><u>Bibliographie</u></b> .....	78

# INTRODUCTION

# 1. La paroi végétale

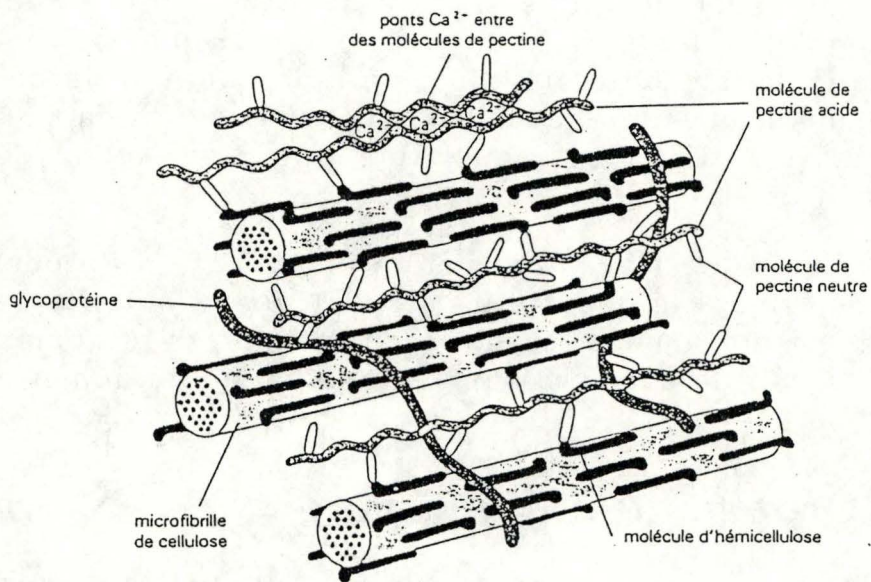
La plupart des différences entre le règne animal et végétal résultent de diversifications opérées au cours de l'évolution et qui remontent à deux événements fondamentaux : la capacité à fixer le dioxyde de carbone par photosynthèse et la production d'une paroi rigide. C'est l'existence de cette dernière qui confère notamment aux végétaux les caractères distinctifs suivants: perte de l'aptitude à se mouvoir (aucun développement de systèmes musculaires, osseux et nerveux), différenciations notables également concernant leur morphologie, leurs modes de nutrition, de digestion, d'osmorégulation, de croissance, de reproduction, de communication intercellulaire et leurs mécanismes de défense; la paroi faisant à elle seule aussi, office de squelette, peau et système circulatoire (Alberts, 1989).

L'objet de ce travail consistera justement en l'étude de la paroi, plus précisément le dépôt d'un de ses constituants: la pectine. Cette recherche sera menée essentiellement par la cytométrie en flux, discipline dont le champ d'application s'étend au domaine végétal.

## 1.1. Organisation de la paroi

Au sens physique, on distingue la paroi primaire, paroi des cellules en croissance, de la paroi secondaire, nouvelles couches de compositions différentes déposées lorsque la cellule a terminé sa croissance.

Ces différences de composition répondent à des rôles biologiques distincts. La paroi primaire doit faire preuve simultanément d'une rigidité suffisante pour éviter l'éclatement du protoplaste et d'une plasticité permettant la croissance cellulaire. Quant à la paroi secondaire, elle doit assurer les rôles de défense, de support et de stockage (Fry, 1988), (stockage, par exemple, de polysaccharides dans les graines pour la germination (Brett, 1990)). Elle est d'ailleurs composée d'une succession de couches compactes, généralement au nombre de trois (S1, S2 et S3), où dans chacune d'elles, des microfibrilles de cellulose sont agencées parallèlement. D'une couche à l'autre, l'orientation diffère, ce qui augmente la résistance mécanique de la paroi. Elle comprend aussi des polymères aromatiques (lignine) qui confèrent rigidité et protection contre les pathogènes (Duffus, 1984).

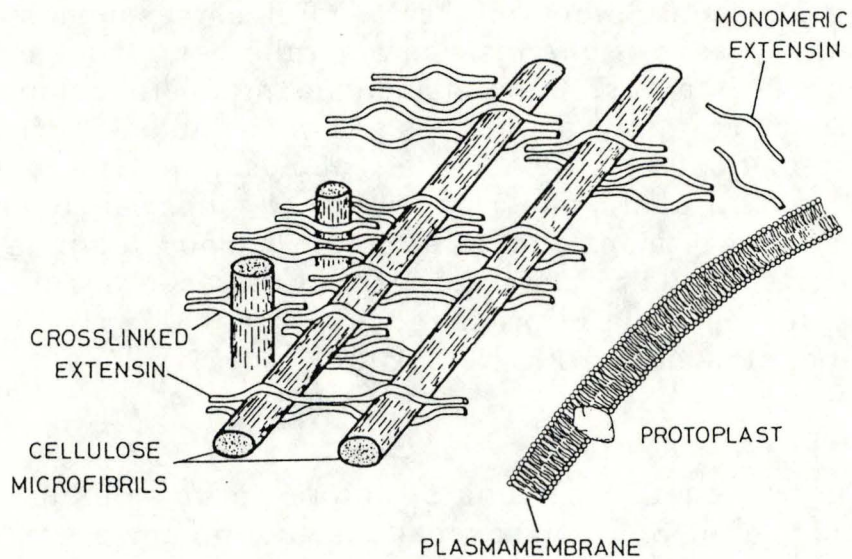


**Figure 1:** Représentation schématique de la paroi montrant les deux constituants essentiels: la matrice amorphe (hémicelluloses, pectines et protéines) et les fibres de cellulose. (Alberts, 1989).

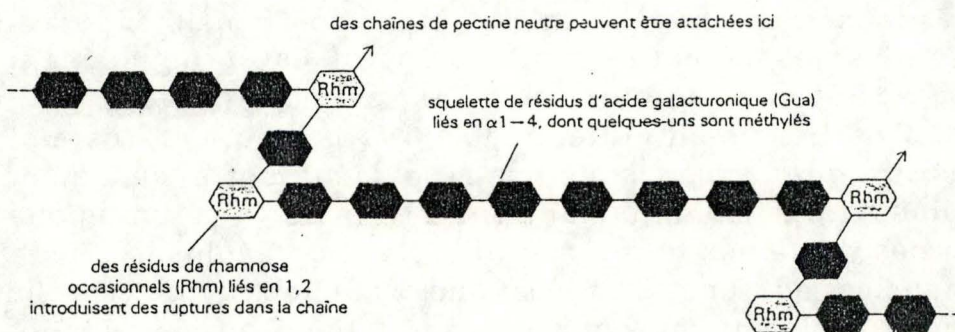
Le principe architectural de la paroi est assimilable à celui du béton armé, à savoir, une matrice amorphe dans laquelle sont noyées des fibres résistantes. Généralement la première composante est le fait de deux polysaccharides: hémicellulose et pectine et accessoirement de protéines; la cellulose, polymère de  $\beta$ -1,4-D-glucane, constituant, elle, les fibres longues et résistantes. Ces dernières apporteraient une contribution majeure dans la composition de la paroi secondaire alors qu'elles ne représentent que 20 à 30 % en poids sec de la paroi primaire, présentant là aussi, un plus faible degré de cristallisation (Mc Neil, 1984). (Fig.1).

La paroi végétale est une structure de complexité élevée sur le plan moléculaire. Ses polysaccharides, contenant au minimum douze types de monosaccharides ou dérivés, sont unis les uns aux autres par des liens glycosidiques (Waldron, 1985). Ce sont soixante-quatre combinaisons possibles différentes que peuvent former deux molécules d'un sucre à six atomes de carbone pour s'assembler et plus de mille façons différentes pour trois molécules de sucres (Albersheim, 1985). Cette complexité s'accroît encore par la nature des interactions que ces constituants peuvent établir avec les autres (protéines, lignine, ions, lipides, eau...) (Waldron, 1985). La principale force de cohésion de ces constituants provient sans doute des ponts hydrogène érigés essentiellement entre les polysaccharides. Des liens covalents et des interactions ioniques, des forces hydrophobes et des ponts calcium, contribuent de même à la cohésion pariétale (Bolwell, 1988).

Proposer un modèle unique et compréhensible des interactions entre tous les composants de la paroi est probablement utopique (Brett, 1990). Différents modèles permettent tout de même de clarifier partiellement cette complexité. Lamport et Epstein proposent à ce titre, des liaisons de type covalent entre des monomères de protéines (extensine) conduisant de la sorte à un enchevêtrement entre ces protéines et les microfibrilles de celluloses (Epstein, 1984). L'extensine est une glycoprotéine riche en hydroxyproline, sérine, tyrosine et lysine et dont les deux tiers du poids sont dûs aux carbohydrates (Tierney, 1987). Certains auteurs avaient imaginé ces protéines comme des trames de porosité définie, interpénétrées par une chaîne de microfibrilles de cellulose (Epstein, 1984). C'est le terme "warp and weft hypothesis" qui désigne ces deux réseaux semi-indépendants en interaction (Everdeen, 1988). (Fig.2).



**Figure 2:** Modèle de la paroi selon Lamport et Epstein: "warp and weft hypothesis". Ils proposent des liaisons de type covalent entre des monomères d'extensine, ce qui amène un enchevêtrement entre ces protéines et les microfibrilles de cellulose. (Brett, 1990).



**Figure 3:** Exemple de molécule de rhamnogalacturonane (pectine acide). Des ruptures dans la chaîne de résidus d'acide galacturonique chargés négativement sont introduites de temps à autre par des résidus de rhamnose. (Alberts, 1989).

## 1.2. Les pectines

### a) Structure

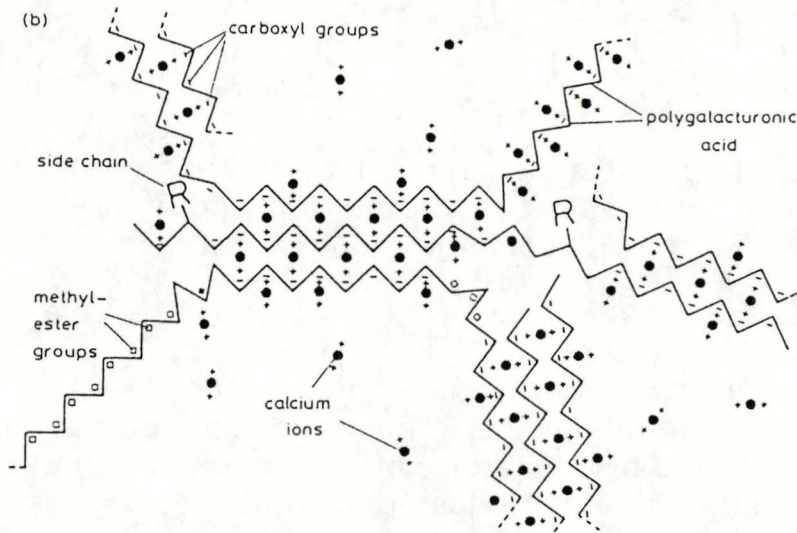
Il s'agit de polysaccharides hétérogènes, tant en taille qu'en composition, ramifiés et hydratés, qui contiennent de nombreux résidus acides  $\alpha$ -1,4D-galacturoniques chargés négativement parmi lesquels s'incorporent des résidus rhamnoses.

Ces polymères sont apparemment sécrétés avec la plupart de leurs groupes uroniques estérifiés par des groupements méthyles (Varner, 1989). Dans la paroi, cette organisation peut être soumise à l'action de la pectine méthylestérase végétale, qui, par blocs, ôte les groupes méthyles (Taylor, 1982). Le clivage de ces groupes permet alors aux anions carboxylates d'établir des liaisons ioniques avec des cations bivalents (Carpita, 1988). Au cours du vieillissement, les tissus abaissent progressivement le degré d'estérification de leurs pectines. Deux hypothèses sont dès lors possibles: soit les tissus sont continuellement soumis à l'action de l'enzyme pré-citée, soit la pectine qui se dépose plus tardivement, est synthétisée avec moins de groupements méthyles (Fry, 1985).

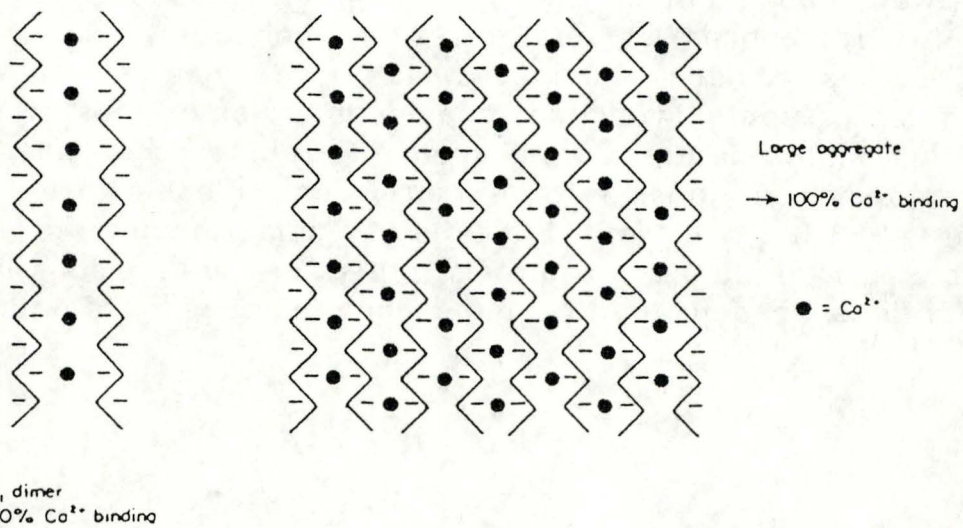
On distingue chez les dicotylédones, les rhamnogalacturonanes I et II. Les premiers, d'un degré de polymérisation approximativement de 2000, consistent en un squelette alternant successivement deux résidus rhamnoses et quatre résidus galacturoniques. Environ la moitié des résidus rhamnoses est glycosylée sur le quatrième carbone, présentant ainsi des chaînes latérales de plus ou moins sept résidus sucres neutres, principalement arabinoses et galactoses. Les rhamnogalacturonanes II sont, eux, des molécules très différentes (Varner, 1989). Ils ont pour nature une soixantaine de résidus glycosylés, la plupart inhabituels, qui se présentent sous la forme de répétitions de deux motifs heptasaccharidiques différents (Mc Neil, 1984). (Fig.3).

### b) Gélification

A l'échelle moléculaire, un gel aqueux se compose de trois éléments: (1) des zones de jonction où s'assemblent des polymères, (2) des segments inter-jonctions et (3) de l'eau emprisonnée par ce réseau de polymères. Les polysaccharides pectiques peuvent former deux types de gel:



**Figure 4:** Modèle en "egg-box" de Rees et ses collègues: association coopérative de monomères de pectine par l'intermédiaire d'ions calcium. (Brett, 1990).



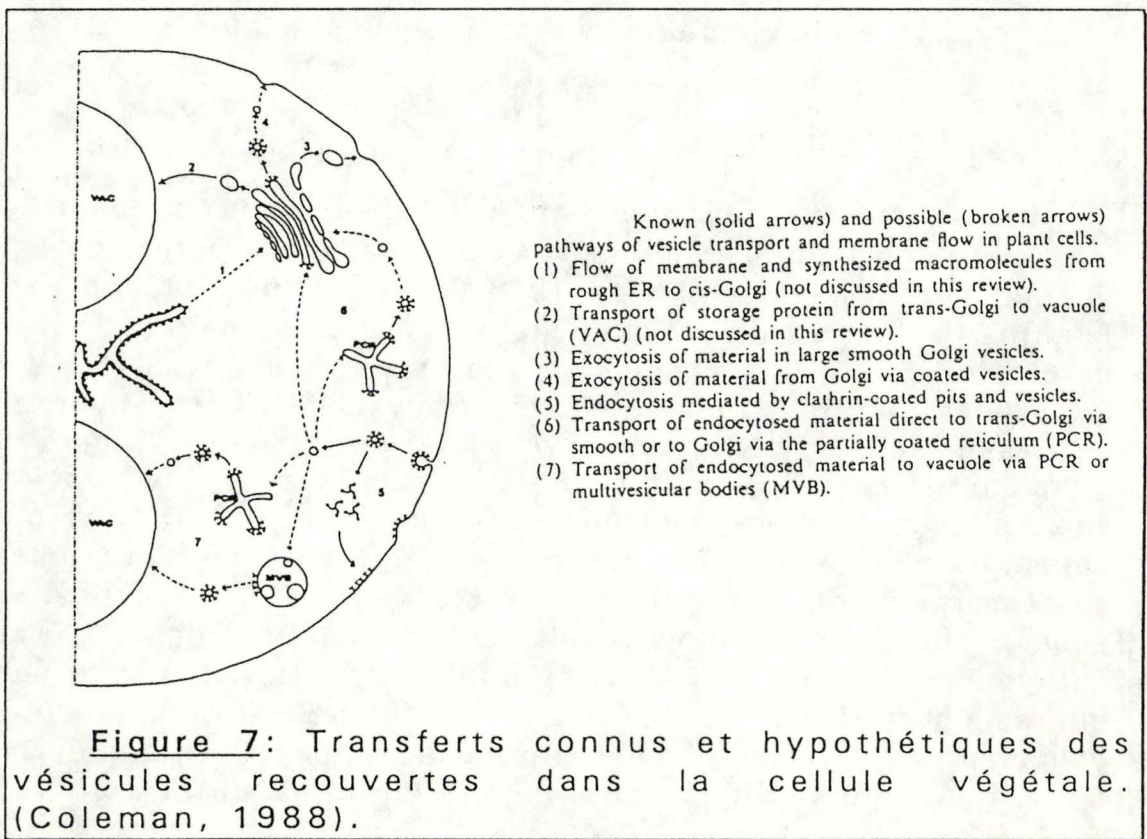
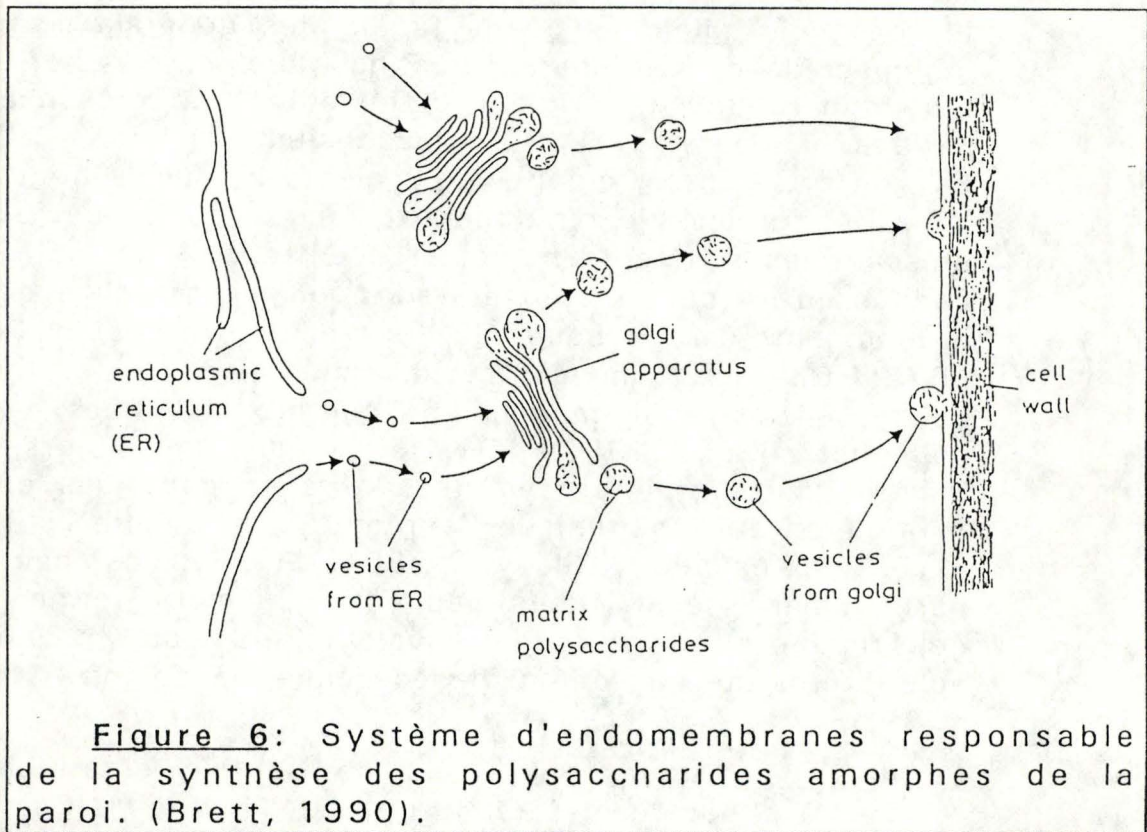
**Figure 5:** Dimères et multimères pectiques. (Morris, 1982).

(1) Les gels calciques ou de façon plus générale les gels ioniques: ils concernent les pectines faiblement estérifiées qui donnent des gels rigides et insolubles en présence de cations bivalents, excepté le magnésium (Thibault, 1986). En effet, une région polygalacturonique, dont la conformation en "zig-zag" due aux liens glycosidiques axiaux unissant les différents monomères entre eux, délimite des cavités où les cations peuvent se loger et interagir avec les groupements carboxyliques de l'une et l'autre chaîne (Rees, 1977). De façon imagée, cette association coopérative a donné naissance au modèle en "egg-box" de Rees et ses collègues (Darvill, 1980) (Fig.4). On distingue alors, les dimères qui font intervenir deux chaînes pectiques et les multimères qui résultent de l'agrégation de dimères s'il y a excès de calcium (Gildey, 1980) (Fig.5). Les pectines partiellement déestérifiées peuvent également former des gels rigides en présence des bivalents, pour autant que les acides uroniques soient disposés séquentiellement (Varner, 1989).

(2) Les gels acides: ces gels de pectine estérifiée se forment à pH acide et à faible potentiel hydrique. Ces gels sont lâches, expansibles (Thibault, 1986). De telles conditions physico-chimiques minimisent la répulsion électrostatique intermoléculaire et favorisent l'interaction chaîne-chaîne plutôt que chaîne-solvant (Morris, 1980).

### c) Localisation

Les substances pectiques sont particulièrement abondantes dans les tissus non lignifiés, tels ceux des fruits, où la paroi des cellules végétales est mince (Wilkie, 1985). La pectine est présente en quantité beaucoup plus élevée dans la paroi primaire que dans la paroi secondaire, raison pour laquelle on lui suggère un rôle dans la croissance. Effectivement, ses polysaccharides hydrophiles, autorisant l'entrée d'eau dans la matrice, permettent à la paroi de se relâcher et ainsi au squelette de microfibrilles de cellulose de se séparer, laissant place pour une expansion cellulaire. D'autre part, la capacité de la pectine à s'associer en "egg-box" constituerait là un système pouvant s'opposer à la distension. C'est à concentration élevée que l'on retrouve également la pectine dans la lamelle mitoyenne, exerçant là sans doute une fonction de ciment intercellulaire (Fry, 1988). Outre ces rôles physiques, un rôle chimique lui est aussi attribué en tant qu'échangeur d'ions ou encore en tant que source d'oligosaccharines (Varner, 1989).



### 1.3. Biosynthèse de la paroi

La complexité de la paroi est loin d'être élucidée et peu de choses sont connues quant à sa biosynthèse (Waldron, 1985). Ceci n'est pas surprenant quand on sait que, (1) chaque polysaccharide de la matrice de la paroi cellulaire est composé plusieurs glucides, (2) au moins douze types de monosaccharides interviennent dans la synthèse de la paroi, (3) la plupart des polysaccharides sont ramifiés, et (4) de nombreuses modifications covalentes sont introduites dans les polysaccharides après leur synthèse (Alberts, 1989). Les recherches à ce sujet sont d'autant plus laborieuses que les systèmes catalytiques responsables de la synthèse de ces polymères nécessitent des réactions enzymatiques multiples et une coordination étroite, rendant toute expérience *in vitro* hasardeuse (Darvill, 1980). Rien que pour la synthèse des polysaccharides pectiques, on estime qu'une centaine d'enzymes différentes interviennent.

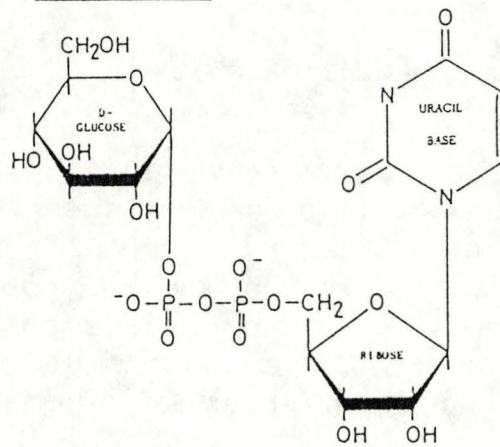
#### a) Synthèse des polysaccharides non-cellulosiques

Les polysaccharides amorphes de la paroi, abstraction faite de la callose, sont synthétisés principalement, voire même exclusivement par le système d'endomembranes (Fry, 1988). Les organites impliqués dans la biosynthèse sont (1) le réticulum endoplasmique rugueux, (2) des vésicules transitoires entre ce dernier et l'appareil de golgi, (3) le golgi et (4) des vésicules de sécrétion contenant protéines et polysaccharides pour les exporter en surface de la cellule (Carpita, 1988). (Fig.6).

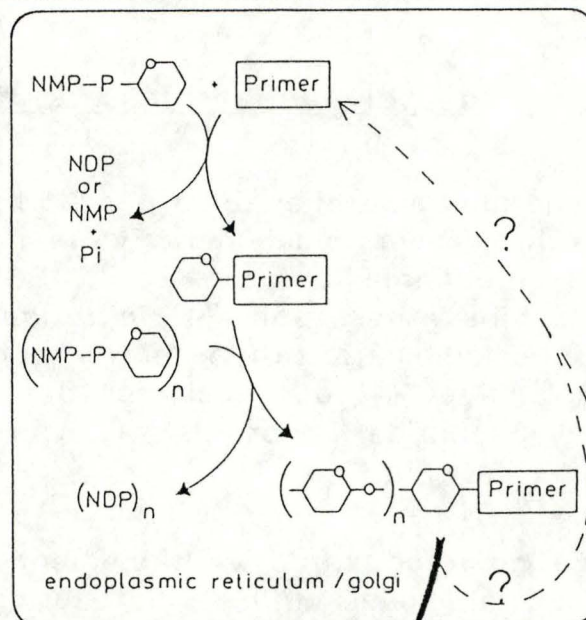
L'appareil de golgi constitue véritablement le premier site de synthèse, il se pourrait même qu'il soit le seul site de synthèse des polysaccharides non-cellulosiques, il contient d'ailleurs toute la batterie d'enzymes requises, dont les arabinosyl-, glycosyl-, xylosyl- et fucosyl-transférases. Cela n'exclut pas qu'il puisse exister des précurseurs protéoglycanes dans le réticulum endoplasmique (Moore, 1988).

Toute la glycosylation a pour ainsi dire lieu dans la membrane de l'appareil de golgi qui reçoit ses précurseurs par le courant de cyclose et par des fusions de vésicules provenant du réticulum endoplasmique (Northcote, 1982). D'autres vésicules, contenant alors les polymères nouvellement synthétisés, émergent du golgi pour se diriger vers la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent, libérant ainsi leur contenu par exocytose (Fry, 1988).

UDP-D-glucose



**Figure 8:** Structure d'un sucre nucléotide, pour exemple: l'UDP-D-glucose. (Brett, 1990).



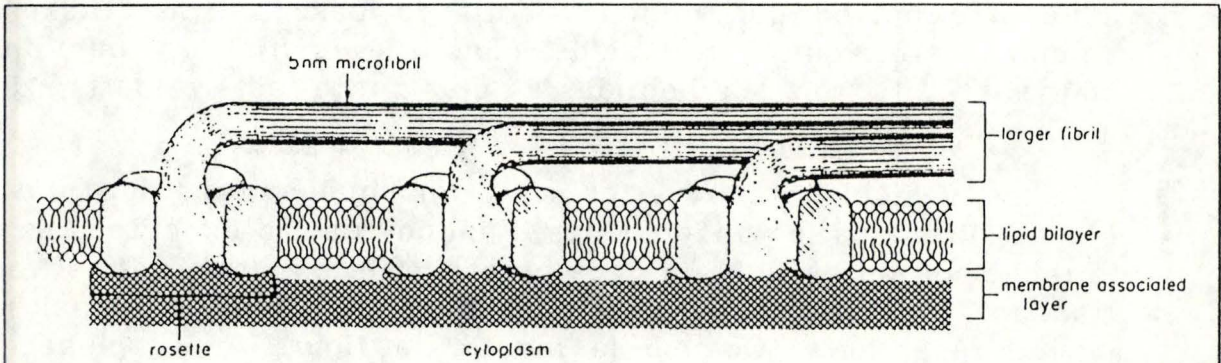
**Figure 9:** Mécanismes possibles impliquant un primer dans la synthèse des polysaccharides non-cellulosiques. NMP: nucléoside monophosphate, NDP: nucléoside diphosphate. (Brett, 1990).

Toutes ces unités peuvent être regroupées sous le terme plus général de "vésicules recouvertes". Elles sont définies par leur membrane qui contient plusieurs protéines majeures dont la mieux caractérisée est la clathrine, une protéine fibreuse. Celle-ci s'assemble avec un peptide de plus petite taille afin de former une enveloppe polyédrique dont le motif de base est le "triskélion": complexe protéique à trois pieds, constitué de trois polypeptides de clathrine et de trois polypeptides de plus petite taille (Alberts, 1989).

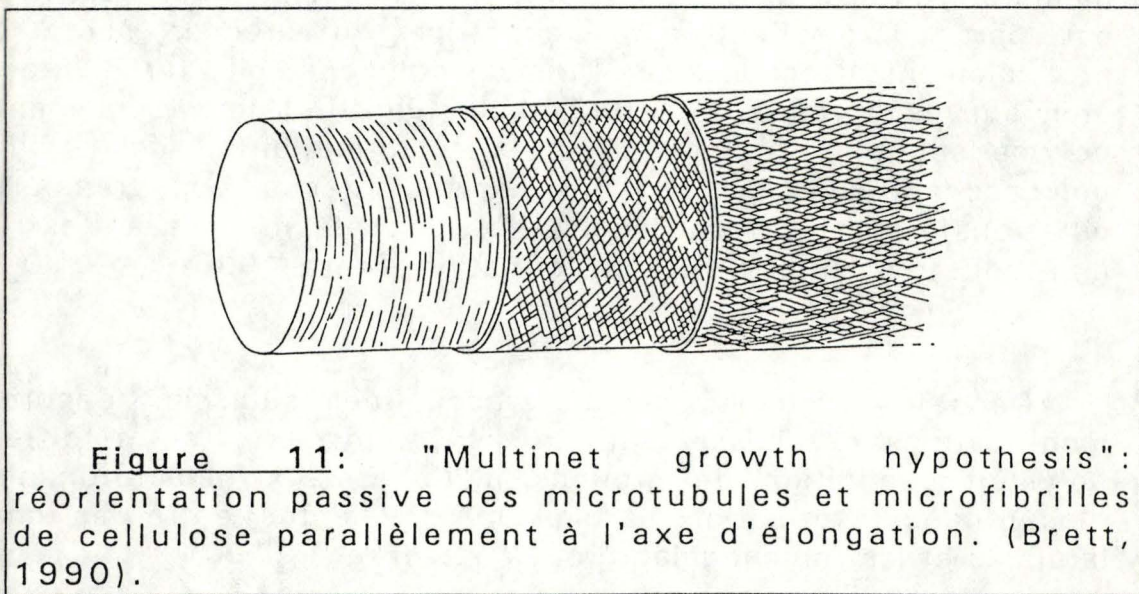
Les vésicules recouvertes sont impliquées dans le transport, c'est-à-dire dans les phénomènes d'endocytose, d'exocytose et dans le recyclage des membranes. La présence de clathrine permettrait un transport de molécules biologiques spécifiques par reconnaissance ligands-récepteurs. Comme le montre la **figure 7**, la plupart des connaissances dans ce domaine sont encore fragmentaires (Coleman, 1988).

Hormis certains aspects du transport et de la sécrétion, il est probable que les sites de glycosylation et les étapes opérées par le système endomembranaire soient analogues à ce qui s'accomplit dans la cellule animale (Bolwell, 1988). Les précurseurs des polysaccharides sont des sucres nucléotides synthétisés par des enzymes localisées dans le cytosol, soit libres, soit attachées à une membrane interne (**Fig.8**). La formation du premier lien glycosidique est particulière, l'extrémité réductrice du premier sucre étant probablement attachée à un "primer" aglycone, elle ferait intervenir une enzyme propre à cette étape (**Fig.9**). Alors seulement, la polymérisation permettrait la formation de chaînes polysaccharidiques grâce à des enzymes, les glycosyltransférases, qui transfèrent les monosaccharides des précurseurs à l'extrémité non-réductrice du polymère en formation (Brett, 1990).

Dans les vésicules, les polysaccharides subissent encore des modifications: établissement de liens covalents entre différents polymères, addition de groupes méthyles aux galacturonanes et glucuronanes, formation de liaisons covalentes entre les chaînes latérales et les rhamnogalacturonanes... (Brett, 1990).



**Figure 10:** Configuration des synthétases (rosettes) responsables de la synthèse des microfibrilles de cellulose. (Brett, 1990).



**Figure 11:** "Multinet growth hypothesis": réorientation passive des microtubules et microfibrilles de cellulose parallèlement à l'axe d'élongation. (Brett, 1990).

## b) Synthèse de la cellulose

La cellulose quant à elle, est synthétisée à la surface de la cellule par un complexe enzymatique lié à la membrane plasmique, la cellulose synthétase, qui utilise un précurseur nucléotide-ose fourni par le cytosol, l'UDP-glucose (Alberts, 1989).

Les chaînes de cellulose naissantes, formées par un agrégat isolé de rosettes, s'auto-assemblent spontanément en microfibrilles avec leurs voisines, selon une orientation qui est déterminée par le réseau de microtubules, lui-même défini par l'orientation des microfilaments d'actine (Varner, 1989). Les rosettes désignent la configuration prise par les synthétases ou "terminal complex" à la face interne du feuillet externe du plasmaleme (Preston, 1988). (Fig.10).

Le mécanisme par lequel les microtubules dirigent l'orientation des microfibrilles de cellulose est encore obscur. Le processus le plus vraisemblable est le suivant: les complexes enzymatiques synthétiseraient le matériel neuf à l'extrémité de la microfibrille immobile en se déplaçant dans le plan de la membrane (Brett, 1990). Cependant, il n'est pas rare de constater, dans la paroi primaire, des couches de microfibrilles disposées perpendiculairement: en grandissant longitudinalement, la cellule amène les couches les plus externes à s'agencer parallèlement à l'axe d'élongation (Varner, 1989). Cette réorientation passive des microtubules est le propre de la "multinet growth hypothesis" (Brett, 1990). (Fig.11).

La callose, un  $\beta$ -1,3-D glucane, produite en cas de stress ou de façon transitoire dans des parois spécialisées telles celles des tubes polliniques ou des fibres de coton, est synthétisée de manière semblable (Carpita, 1988).

## c) Régulation de la synthèse

Une régulation de la synthèse des polysaccharides pariétaux est possible à différents niveaux et est d'importance considérable étant donné les modifications opérées dans la composition de la paroi au cours du cycle cellulaire, de la croissance ou du développement (Fry, 1988).

Le contrôle peut s'établir aux niveaux des deux processus distincts de la biosynthèse, à savoir d'une part, la synthèse biochimique des polymères et d'autre part, le transport des vésicules et leur fusion avec la membrane. On discerne des signaux de contrôle à la surface cellulaire. Parmi bien d'autres facteurs, la fusion dépend par exemple, des charges à la surface membranaire, de la présence de calcium ou de magnésium et de protéines spécifiques. Les hormones de croissance constituent un autre type de signal (Northcote, 1982). On a notamment démontré que l'auxine augmente le taux de synthèse des polysaccharides non-cellulosiques, tout comme en présence de cette hormone, on a aussi observé une recrudescence des activités synthétases  $\beta$ -glucanes et xyloglucanes, une augmentation des enzymes responsables de la dégradation de la paroi et une solubilisation de certaines portions de la matrice (Varner, 1989). C'est pourquoi on suppose que le dépôt d'une matrice nouvelle est accompagné de dégradations (hydrolyse) ou de réarrangements (transglycosylation...) de composants préexistants (Taiz, 1984).

On a récemment démontré une voie d'endocytose en phase liquide par contrôle de l'absorption de marqueurs denses aux électrons dans des protoplastes. Ces marqueurs sont d'abord transférés au réticulum partiellement recouvert (organite fonctionnellement équivalent au compartiment endosomal des cellules animales), ensuite à de grandes vésicules et, en fin de compte, dans la vacuole (Alberts, 1989).

## 2. Les protoplastes

Oter la paroi d'une cellule végétale signifie, entre autres, supprimer toute contrainte d'ordre physique au corps cellulaire, ce dernier adoptant alors une forme sphérique. Une telle structure reçut dès 1880 la dénomination de protoplaste (Hanstein). Cependant le protoplaste n'est pas simplement une cellule dépourvue de sa paroi. En effet, le processus d'obtention des protoplastes implique à lui seul une série de stress qui engendrent des modifications des propriétés physiologiques et une diminution de la viabilité (Pilet, 1985).

## 2.1. Intérêt des protoplastes

Certains protoplastes végétaux ont la capacité de régénérer une paroi, de subir des divisions mitotiques, donnant naissance ainsi à des clones de cellules en croissance illimitée, capables de se différencier ou même, de régénérer une plante entière (Potrykus, 1986). Ils constituent de la sorte un outil de travail dans des disciplines aussi variées que la génétique végétale, la phytopathologie, les études concernant la biosynthèse de la paroi, la physiologie des membranes... (Larkin, 1976). Ils permettent aussi l'isolement d'organites (chloroplastes photosynthétiquement actifs, vacuoles intactes (Browse, 1988)), des clonages et des fusions cellulaires (Fowke et Constabel, 1985). On a même utilisé des protoplastes dans le domaine de la recherche spatiale, afin d'étudier l'effet de la microgravité sur les processus biologiques cellulaires de base: synthèse de la paroi, division cellulaire, formation d'agrégats cellulaires ou toute altération ultrastructurale durant les premières étapes de la différenciation (Rasmussen, 1989).

Les protoplastes constituent un outil intéressant, en cytométrie en flux, pour toute expérimentation impliquant du matériel végétal, car, cette technique requiert impérativement des objets individuels. A l'exception du pollen, de telles préparations cellulaires ne sont pas disponible de façon naturelle, pas même les cultures en suspension cellulaire *in vitro*, puisqu'il s'agit en fait de microcolonies (Brown, 1986).

## 2.2. Isolement de protoplastes

On isole des protoplastes en mettant un tissu ou des cellules végétales en présence d'une solution enzymatique comprenant des cellulases, des hémicellulases, des pectinases et des agents osmotiques. Cette méthode, bien qu'offrant des rendements élevés, de l'ordre de 1 à 10 millions de protoplastes par gramme en poids frais de cellules, présente néanmoins quelques inconvénients.

A l'origine, on suspectait les impuretés et autres activités enzymatiques présentes dans les préparations commerciales d'enzymes de jouer un rôle toxique pour l'intégrité et la viabilité des protoplastes. Toutefois, ce sont d'autres facteurs ou du reste des facteurs concomitants à ces préparations qui ce sont révélés

dommageables. Des fragments de parois, dont les oligoarabinoxylsides, la synthèse d'éthylène provoquée par l'isolement enzymatique ou encore la libération de radicaux superoxydes par les parois soumises à l'action des enzymes et par les protoplastes eux-mêmes seraient responsables des effets toxiques (Ishii, 1988).

Browse (1988), démontre également un changement de la composition en lipides au cours de l'isolement des protoplastes: une perte de lipides membranaires et une conversion de lipides polaires en lipides neutres. Cette dernière résulterait de l'activation d'enzymes (hydrolases) suite au stress de l'isolement. Ces modifications ne seraient à prendre en considération que pour des expériences physiologiques ayant trait à la fonction des membranes, les processus cellulaires ne semblant pas être perturbés (Browse, 1988)

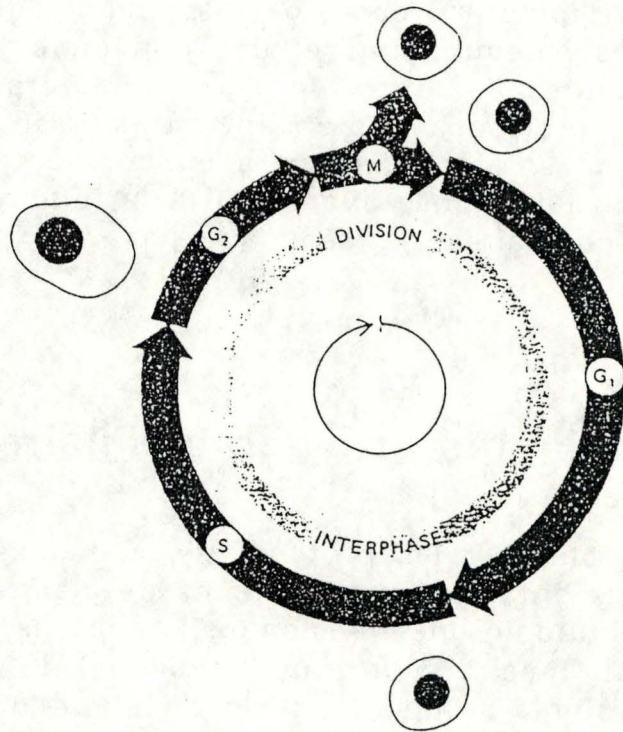
### 2.3. Protoplastes et cycle cellulaire

On peut comparer les protoplastes à des cellules blessées qui doivent d'abord entamer un programme de cicatrisation avant d'être capables de soutenir une division cellulaire. Ils subissent donc un développement linéaire plutôt que cyclique. Il n'est toutefois pas aberrant de vouloir étudier le cycle cellulaire des protoplastes. En effet, la cellule comme le protoplaste ont en commun tous les signaux nécessaires à la progression du cycle cellulaire (Fowke et Constabel, 1985).

#### a) Déroulement du cycle cellulaire

Le phénomène de division cellulaire (phase M), brève période du cycle cellulaire, est le résultat de deux étapes séquentielles: la mitose ou karyocinèse qui est la division nucléaire, et la cytokinèse, la division cytoplasmique (Alberts, 1989).

Avant cette phase M, le noyau se dispose dans une région de la cellule appelée: position prémitotique du noyau (PPN), grâce à une variation de la viscosité. Celle-ci augmente localement dans la zone périnucléaire, une fois la localisation adéquate atteinte. On n'observe d'ailleurs plus aucun mouvement d'organites protoplasique pendant la division (Mineyuki, 1984).



**Figure 12:** Déroulement d'un cycle cellulaire.  
(Alberts, 1988).

Avant qu'une cellule soit en état de se diviser, elle doit avoir doublé de volume et dupliqué entièrement son contenu, c'est le rôle de l'interphase. Cette période est elle-même subdivisée en trois phases : G1, S et G2. G1 est l'étape comprise entre la phase M et le démarrage de la synthèse de l'ADN; S est la période pendant laquelle l'ADN est répliqué; G2 est la phase située entre la fin de la synthèse de l'ADN et le début de la phase M suivante. (Fig.12).

A propos de G1, on distingue G0, période pendant laquelle la cellule n'est pas apte à entrer en phase S; une telle cellule est dite quiescente. G1 est alors défini comme étant précisément la période pendant laquelle la cellule se prépare à la phase S, essentiellement en synthétisant les enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN (Bryant, 1982).

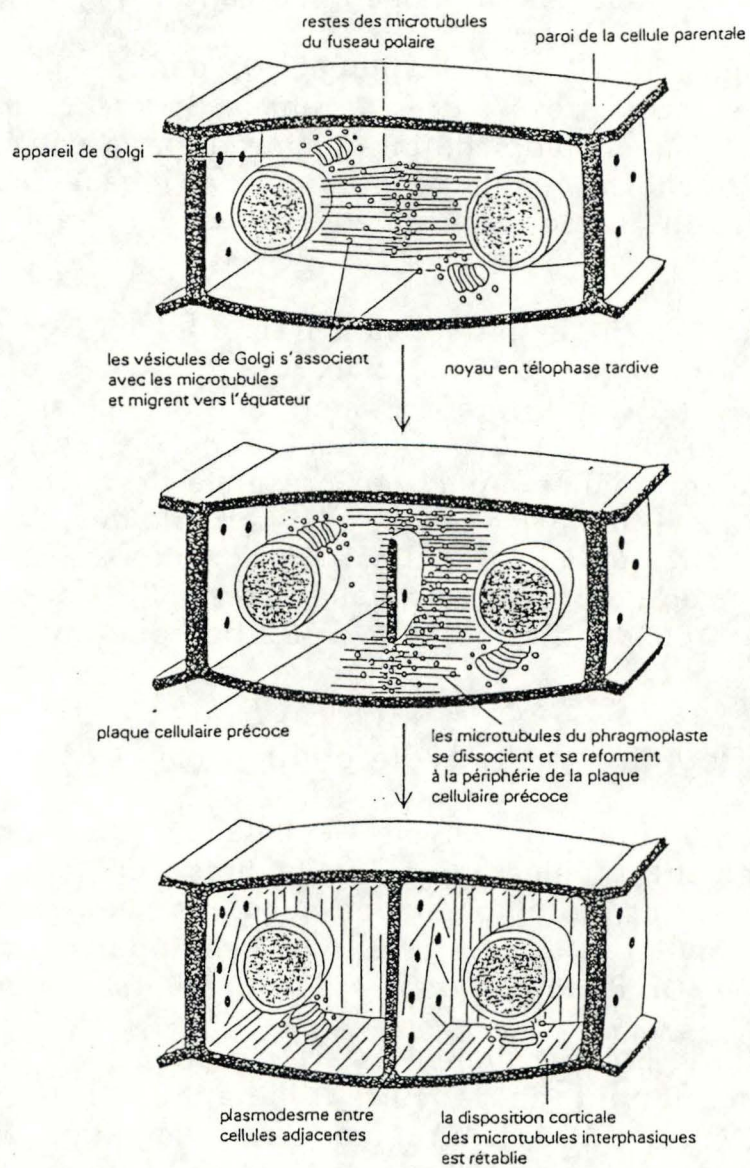
Bayliss (1975) a estimé la durée du cycle cellulaire pour des cellules de racines de *Daucus carota* cultivées en suspension. Il obtient des temps différents selon que le milieu de régénération contienne ou non du 2,4-D et selon qu'il s'agisse d'une culture diploïde ou tétraploïde. Ainsi, en présence de 2,4-D, les cellules des cultures, aussi bien diploïdes que tétraploïdes, accomplissent un cycle cellulaire en  $\pm 51$  heures. En absence de 2,4-D, les cellules diploïdes effectuent un cycle cellulaire en 33 heures, alors que les cellules tétraploïdes l'effectuent en 82 heures (Bayliss, 1975).

### b) Régulation du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire, bien qu'elle ait été essentiellement étudiée chez les levures, présente des similarités fonctionnelles et structurales avec celle des cellules humaines, ce qui plaide en faveur d'un système universel pour tous les eucaryotes (Lee, 1987). On distingue deux stades majeurs de contrôle:

(a) le premier appelé "start" se situe juste avant la phase S, permettant de la sorte l'initiation de la synthèse d'ADN (Murray, 1989). Il requiert la participation de deux protéines codées par les gènes *cdc2* et *cdc10* (Lee, 1988). "Start" est aussi le stade où les cellules arrêtent leur croissance et leur division si elles manquent de nutriments (Rine, 1986).

(b) le second point de contrôle est localisé à la fin de la phase G2, déterminant ainsi l'entrée ou non en mitose. Le produit de quatre gènes, *cdc2*, *wee1*, *cdc25* et *nim1*, est requis. Les deux derniers jouent un rôle activateur sur *cdc2*, quant à *wee1*, il agit en tant qu'inhibiteur sur ce dernier (Lee, 1987).



**Figure 13:** Cytocinèse chez une cellule végétale possédant une paroi cellulaire rigide. (Alberts, 1989).

Le contrôle du cycle cellulaire repose donc principalement sur le gène *cdc2* qui code pour une protéine de 34 kDa: pp34, une phosphoprotéine à activité kinase. Diverses protéines, telles les histones et les lamines qui sont impliquées dans l'organisation de la chromatine et du nucléosquelette, subissent des modifications de phosphorylation durant le cycle cellulaire. On pense que pp34 pourrait initier l'entrée en phase S et en mitose en phosphorylant de telles protéines (Lee, 1988).

### 3. Régénération de la paroi

#### 3.1. Une situation artificielle?

La biosynthèse de la paroi est un processus fondamental de la croissance de la plante et de la cytodifférenciation. Une meilleure compréhension de ce processus est un pré-requis, pour l'étude de l'effet des régulateurs de croissance sur la paroi ou pour des techniques de biologie moléculaire visant à modifier le génome végétal (Mock, 1990).

Pareille situation ne se présente pas en condition naturelle, ou du moins, pas de façon aussi rigoureuse. Une cellule végétale, constitutive d'un organisme, élaborera une nouvelle paroi cellulaire ou plaque cellulaire lors de la cytokinèse. Celle-ci se forme par l'accumulation dans le plan de division, de petites vésicules qui, rapidement, fusionnent entre elles. La plaque cellulaire croît du centre vers la périphérie où elle rejoint les parois pré-existantes. à l'endroit de la bande de préprophase. Cette zone, où se forme la nouvelle paroi se nomme phragmoplaste; elle est caractérisée par de nombreux microtubules disposés parallèlement les uns aux autres et perpendiculairement au plan de division. Leur rôle est de guider les vésicules vers les bords de plaque. Certains maintiennent même leur position dans le phragmoplaste, alors que la paroi les englobe, afin de créer des canaux permettant des connections cytoplasmiques entre les deux cellules-filles, ce sont les plasmodesmes. Lorsque la nouvelle paroi a rejoint l'ancienne, la paroi primaire se forme véritablement et ce qui était la plaque cellulaire devient la lamelle mitoyenne. La croissance de la cellule terminée, une paroi secondaire pourra alors se déposer (Brett, 1990). (Fig.13).

Bien que le contexte de régénération soit différent pour les protoplastes, ils n'en constituent pas moins un modèle utile pour étudier l'assemblage des polysaccharides et des protéines à la surface cellulaire (Shea, 1989).

### 3.2. Critères de régénération

Les premières études concernant la régénération de la paroi de protoplastes portaient sur des observations indirectes liées à des propriétés mécaniques plutôt qu'à des déterminations biochimiques de composants pariétaux. C'est ainsi que furent utilisées les trois méthodes suivantes. La première imposait la mesure du nombre de protoplastes lysés lorsque placés dans des milieux de pression osmotique faible; la seconde consistait en l'opération inverse, c'est-à-dire à augmenter progressivement la pression osmotique du milieu afin de suivre la plasmolyse, enfin, la dernière nécessitait le comptage des protoplastes bourgeonnants, le bourgeonnement requérant naturellement une certaine rigidité de la surface, causée par la présence de polysaccharides pariétaux (Burgess, 1983).

D'autres méthodes, un peu plus rigoureuses, ont fait leur apparition. La plus classique fait appel à un colorant fluorescent spécifique d'un composant pariétal, comme le calcofluor white, caractéristique de la cellulose et de la chitine mais qui réagit aussi avec d'autres polysaccharides comprenant des liaisons  $\beta$ -1,4 (Hahne, 1983). On utilise aussi le bleu d'aniline, spécifique de la callose (Hayashi, 1986) et le cellufluor caractéristique à la fois de la callose et de la cellulose (Shea, 1989).

La microscopie électronique a également apporté sa contribution concernant la régénération pariétale et ce de façon précise, éclaircissant principalement les premières étapes de la régénération. Des colorants cytochimiques pour polysaccharides enrichissent cette technique. S'ajoutent à la liste, le freeze etching et la microscopie électronique à balayage (Burgess, 1983).

D'autres manipulations, tels l'utilisation de précurseurs radioactifs de polysaccharides, la détection d'enzymes impliquées dans la régénération de la paroi, le fractionnement de matériel pariétal et les électrophorèses, les dosages et chromatographies s'y rapportant, ont permis d'accroître les connaissances, aussi bien qualitatives que quantitatives de la paroi cellulaire en régénération (Mock, 1990; Shea, 1989).

### 3.3. Connaissances actuelles

Maintes études démontrent que les parois régénérées par les protoplastes sont différentes, sous plusieurs aspects, de celles des cellules cultivées en suspension ou des tissus d'origines. Ces différences se situent à trois niveaux: (1) synthèse préférentielle de callose plutôt que de cellulose, (2) composition différente en polysaccharides et (3) synthèse de polysaccharides extracellulaires.

#### a) Régénération de la cellulose

Mock et ses collaborateurs (1990), en travaillant sur la carotte, *Daucus carota*, ont observé que la cellulose constitue 20 à 45% de la paroi des tissus d'origine, alors que la paroi des protoplastes régénérants contient moins de 10% de  $\beta$ -1,4-D-glucanes. Cela peut résulter d'une perturbation dans les processus de régulation de la synthèse ou dans la sécrétion des précurseurs. En revanche, la quantité d'extensine ou de ses précurseurs est relativement élevée, ce qui amène à conclure que l'extensine peut jouer un rôle de consolidation par elle-même, autre que celui qu'elle remplit dans le cadre de la "warp and weft hypothesis" (Mock, 1990).

Blaschek *et al* font état des mêmes observations à propos du tabac, *Nicotiana tabacum*, la cellulose participant respectivement pour 45% dans les parois des cellules extraites directement de la feuille et pour 5% seulement dans celles des protoplastes régénérants. Parallèlement à cette diminution, on note un accroissement de la synthèse en callose. Sa formation étant habituellement corrélée à un stress, sa prépondérance ici, s'expliquerait par les conditions non physiologiques auxquelles sont soumis les protoplastes lors de leur isolement et de leur culture (Blaschek, 1981). La cellulose et la callose seraient en effet synthétisées par le même système enzymatique, de sorte que tout dommage de la membrane plasmique (par des enzymes protéolytiques par exemple) engendrerait une synthèse préférentielle de callose (Shea, 1989). La callose permettrait à la cellule de résister à la pression de turgescence et ainsi de lui maintenir son intégrité. La cellulose ne pouvant en effet plus remplir ce rôle car, outre sa faible teneur, elle montre, en début de régénération, une orientation aléatoire des microfibrilles, une cristallinité modérée et un faible poids moléculaire (Hayashi, 1986). Près de 70% de la cellulose possède un degré de polymérisation inférieur à 200, ce pourcentage diminue au cours du temps, alors que l'orientation des microfibrilles devient progressivement parallèle au plasmalemme (Asamizu, 1977).

Dans les protoplastes de tabac, la synthèse de la cellulose semble être initiée en différents endroits. Les complexes enzymatiques de synthèse, en se déplaçant, permettraient alors à la cellulose de couvrir l'entièreté de la surface (Hahne, 1983). Le cellulfluor permet les mêmes observations chez la carotte (Shea, 1989), ainsi que le calcofluor white chez le pois (Hayashi, 1986).

### b) Composition des polysaccharides non-cellulosiques

La composition en sucres neutres des polysaccharides non-cellulosiques diffère significativement selon qu'il s'agisse d'une cellule cultivée en suspension ou d'un protoplaste régénérant. Chez ce dernier, le monosaccharide prédominant est le glucose qui contribue à raison de 70% des sucres neutres. On note également un taux plus élevé en mannose: 17%. On suppose par ailleurs que ces deux sucres sont associés pour constituer du glucomannane, car outre leur apparition simultanée, on observe une activité accrue d'une des enzymes responsables de sa synthèse: la glycosyl transférase IG (Mock, 1990).

De même, la quantité d'acides uroniques constitutifs de la fraction pectique, est plus importante: 24% pour la carotte (Asamizu, 1980).

### c) Synthèse de polysaccharides extracellulaires

Les protoplastes, dans leur milieu de régénération, libèrent une quantité appréciable de polysaccharides dont la composition semble davantage complexe que celle des polysaccharides des parois régénérées (Mock, 1990). Les polysaccharides extracellulaires (PEC) se composent essentiellement de galactose, d'arabinose et d'acides uroniques, c'est-à-dire principalement de substances pectiques, et d'hémicellulose (Asamizu, 1980).

Le composant majeur de l'hémicellulose excrétée est le xyloglucane (Hayashi, 1986). Au début de la régénération pariétale, on retrouve autant de polysaccharides, parfois même davantage, dans le milieu de culture que dans la paroi elle-même.

La pectine présente dans le milieu extracellulaire est hautement estérifiée, donc inapte à former un gel rigide. Lors du dépôt progressif de la paroi, la pectine devient graduellement moins estérifiée, plus chargée par déprotonation, en conséquence, plus apte à la rétention par le protoplaste et on constate une diminution

des PEC (Blaschek, 1981; Shea, 1989). Mock (1990) attribue la sécrétion de PEC à l'absence d'un réseau imbriquant polysaccharides et protéines qui empêche leur libération. En 1971, Prat et Roland émettaient déjà l'hypothèse que, sans un réseau de cellulose, les autres substances pariétales nouvellement synthétisées ne peuvent être retenues par le protoplaste. Shea (1989) propose un nouveau modèle n'impliquant aucune relation entre la formation du gel matriciel pectique et la synthèse de cellulose. Ce modèle fait intervenir un processus en deux étapes:

(1) la première est la synthèse de pectines, d'hémicellulose aussi bien que de cellulose. En absence de paroi, les enzymes pariétales font également défaut, ce qui prévient la déestérification enzymatique de la pectine qui n'établit alors aucun lien calcique. Peu à peu, de nouvelles enzymes sont élaborées et permettent la gélification de la pectine qui, elle-même, permet la rétention d'autres enzymes et la constitution, ainsi, d'une véritable matrice. Cette matrice facilite alors l'organisation en une structure de base de l'hémicellulose et des microfibrilles de cellulose.

(2) la seconde étape verrait l'acquisition de forces de cohésion impliquant aussi bien des liens covalents que non-covalents.

#### d) Retour à la forme cellulaire *in situ*

Quelles que soient les différences pré-citées, tout protoplaste qui régénère une paroi passe progressivement de la forme sphérique à la forme cylindrique. Les éléments impliqués dans la morphogénèse de la cellule sont d'une part, l'actine et la tubuline, deux protéines intracellulaires constitutives des filaments d'actine et des microtubules corticaux, et d'autre part, les fibrilles de cellulose extracellulaires.

L'élongation de la cellule se déroule en trois phases. La première, phase précoce, de l'ordre de trois jours, consiste en la mise en place de l'axe d'élongation. Les filaments d'actine sont orientés aléatoirement, mais une réorganisation des microtubules et des fibrilles de cellulose s'opère. Après trois jours, on peut discerner quatre types d'orientation des filaments d'actine: (1) un réseau englobant le noyau, (2) des chaînes épaisses au sein du cytoplasme, (3) des amas dans le cytoplasme cortical et (4) des rangées transversales en périphérie cellulaire. Ce serait en fait le noyau qui initierait l'élongation en influant sur la disposition verticale des

des PEC (Blaschek, 1981; Shea, 1989). Mock (1990) attribue la sécrétion de PEC à l'absence d'un réseau imbriquant polysaccharides et protéines qui empêche leur libération. En 1971, Prat et Roland émettaient déjà l'hypothèse que, sans un réseau de cellulose, les autres substances pariétales nouvellement synthétisées ne peuvent être retenues par le protoplaste. Shea (1989) propose un nouveau modèle n'impliquant aucune relation entre la formation du gel matriciel pectique et la synthèse de cellulose. Ce modèle fait intervenir un processus en deux étapes:

(1) la première est la synthèse de pectines, d'hémicellulose aussi bien que de cellulose. En absence de paroi, les enzymes pariétales font également défaut, ce qui prévient la déestérification enzymatique de la pectine qui n'établit alors aucun lien calcique. Peu à peu, de nouvelles enzymes sont élaborées et permettent la gélification de la pectine qui, elle-même, permet la rétention d'autres enzymes et la constitution, ainsi, d'une véritable matrice. Cette matrice facilite alors l'organisation en une structure de base de l'hémicellulose et des microfibrilles de cellulose.

(2) la seconde étape verrait l'acquisition de forces de cohésion impliquant aussi bien des liens covalents que non-covalents.

#### d) Retour à la forme cellulaire *in situ*

Quelles que soient les différences pré-citées, tout protoplaste qui régénère une paroi passe progressivement de la forme sphérique à la forme cylindrique. Les éléments impliqués dans la morphogénèse de la cellule sont d'une part, l'actine et la tubuline, deux protéines intracellulaires constitutives des filaments d'actine et des microtubules corticaux, et d'autre part, les fibrilles de cellulose extracellulaires.

L'élongation de la cellule se déroule en trois phases. La première, phase précoce, de l'ordre de trois jours, consiste en la mise en place de l'axe d'élongation. Les filaments d'actine sont orientés aléatoirement, mais une réorganisation des microtubules et des fibrilles de cellulose s'opère. Après trois jours, on peut discerner quatre types d'orientation des filaments d'actine: (1) un réseau englobant le noyau, (2) des chaînes épaisses au sein du cytoplasme, (3) des amas dans le cytoplasme cortical et (4) des rangées transversales en périphérie cellulaire. Ce serait en fait le noyau qui initierait l'élongation en influant sur la disposition verticale des

filaments d'actine. La deuxième phase, intermédiaire, s'échelonnant du jour 4 au jour 7, verrait s'établir une disposition analogue entre les filaments d'actine corticaux, les microtubules corticaux et les fibrilles de cellulose; tous sont disposés perpendiculairement à l'axe d'élongation. L'orientation de la cellulose restera inchangée par la suite. Enfin, au-delà de huit jours, l'élongation arrive à son terme, c'est la phase tardive. Les filaments d'actine qui, lors de la première phase, englobaient le noyau et qui au cours de la seconde, se sont disposés le long de l'axe d'élongation, s'assemblent ici et se disposent en périphérie du cytoplasme. Ils amèneraient, dans leur migration, le noyau auprès de la membrane plasmique. Quant aux filaments d'actine horizontaux, ils adoptent une configuration éparse et aléatoire qui est suivie par les microtubules qui, finalement, s'effondrent (Hasezawa, 1989).

## 4. But du travail

Le but du travail était d'étudier la régénération de la paroi à partir de protoplastes isolés enzymatiquement de culture de cellules en suspension de carotte: *Daucus carota*. Nous avons suivi plus spécifiquement la régénération d'un des constituants de la paroi, la pectine, à l'aide d'une sonde fluorescente. Cette sonde est constituée d'un anticorps monoclonal dirigé contre une région homopolygalacturonique, en dimères d'"egg-box" détecté par un second anticorps couplé à un fluorochrome. Dans un premier temps, il a fallu mettre au point un système de marquage adéquat pour la cytométrie en flux. Ce marquage mis au point, nous avons pu suivre la régénération pariétale au cours du temps. L'objectif final était de pouvoir suivre cette régénération au cours du cycle cellulaire. Ce qui nécessitait de travailler sur des cellules synchronisées, en utilisant un deuxième marqueur fluorescent spécifique cette fois de l'ADN.

# MATERIELS ET METHODES

# I. Préliminaires

## 1. Obtention d'une culture en suspension de cellules de carotte

### a) La callogénèse

Cette étape est essentielle pour l'obtention d'une culture en suspension de cellules. Elle consiste à placer un fragment de tissu différencié et stérile sur un milieu nutritif solide. Dans notre cas, il s'agissait d'un explant racinaire de carotte. En quelques semaines, des amas de cellules désorganisées, ou cals, se forment. Ces cals sont repiqués à plusieurs reprises dans des milieux nutritifs frais. La dédifférenciation cellulaire exige la présence d'hormones: l'acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D) qui est une auxine inhibitrice de la morphogénèse et la kinétine, une cytokinine stimulatrice de la division cellulaire.

#### Composition du milieu nutritif solide:

Pour un litre:

- 4,708 g sels de M.S.
- 30,0 g sucrose
- 1 mg 2,4-D
- 0,2 mg kinétine
- 8,0 g agar (Sigma n°A-7002)

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 5,7.

On autoclave ensuite 20 minutes à 120°C (1 bar) afin de stériliser le milieu et de dissoudre l'agar.

On répartit alors stérilement le milieu en boîtes de Pétri.

### b) Initiation de la suspension cellulaire

Les cals, séparés des tissus d'origine de la racine, sont hachés au scalpel et transférés en milieu liquide ( $\pm 0,3$  g de cals pour 15 ml de milieu dans un erlen de 50 cc). On obtient ainsi une suspension

formée d'agrégats cellulaires et de quelques cellules isolées, que l'on place sur agitateur circulaire à 100t/min en chambre de culture à 25°C. Une semaine plus tard, on réalise une filtration stérile à travers un tamis à mailles de 300  $\mu\text{m}$  que l'on rince avec 15 ml de milieu de culture liquide. Sept jours plus tard, on ajoute 20 ml de milieu et l'on transfère la suspension en erlen de 250 cc.

Composition du milieu de culture liquide:

Pour un litre:

- 4,708 g sels de M.S.
- 30,0 g sucrose
- 1 mg 2,4-D

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 5,7.

Stérilisation par autoclavage.

c) Entretien de la suspension cellulaire

Tous les sept jours, la suspension cellulaire est repiquée dans un rapport 1/4, c'est-à-dire 10 ml de suspension cellulaire et 40 ml de milieu de culture liquide frais. La multiplication cellulaire s'effectue en erlen de 250 cc sur agitateur circulaire à 100t/min et en chambre de culture thermostatisée de 25°C.

## 2. Isolement de protoplastes

En conditions stériles, on prélève à l'aide d'un embout coupé, quelques millilitres de culture en suspension de cellules, quatre jours après repiquage, afin d'obtenir un poids frais de cellules d'environ 1,5 g (le surnageant est éliminé après centrifugation). On ajoute 10 ml de la solution enzymatique suivante:

Composition de la solution enzymatique:

- 1,5% Cellulase Onozuka R10
- 0,5% Macérozyme R10

Le tout dilué dans du MS/PS et filtré sur membrane stérilisante millipore 0,2  $\mu\text{m}$ .

Composition du milieu MS/PS:

Pour un litre:

- 4,708 g MS salt
- 1,470 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 30,0 g sucrose
- 100,0 g mannitol
- 1,0 mg 2,4D
- 0,1 mg BAP

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 5,7.

On place le mélange enzymatique et les cellules dans un tube Stérilin à fond conique de 30 ml, sur agitateur à mouvement circulaire de 6t/min dans une chambre de culture thermostatée à 25°C, sous éclairage continu de  $\pm 1700$  lux pendant six heures.

On peut suivre la digestion enzymatique en prélevant, aux temps désirés, une centaine de microlitres de mélange enzymatique et en dénombrant les protoplastes et les cellules à l'aide d'une cellule de Fush-Rosenthal sur microscope Axioplan à contraste de phase en épifluorescence (grossissement 100x). On discrimine facilement les protoplastes des cellules grâce à deux critères: (1) la forme: ronde pour le protoplaste et allongée pour la cellule et (2) la présence ou l'absence de marquage par le calcofluor white. Ce fluorochrome spécifique de la cellulose, de la chitine et d'autres polysaccharides comprenant des liaisons  $\beta$ -1,4 révèle la présence d'une paroi.

On peut aussi évaluer le nombre de noyaux par protoplaste. Ceci requiert des protoplastes fixés afin de permettre la pénétration d'un colorant de l'ADN (l'iodure de propidium). Après avoir fixé les protoplastes pendant 30 minutes dans du formaldéhyde 4%, on ajoute l'iodure de propidium en une concentration finale de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et on observe au microscope en épifluorescence. Discriminer les noyaux en contraste de phase sans coloration est peu fiable dans le cas de protoplastes de *Daucus carota*.

Préparation du calcofluor white:

- Dissoudre 0,1% de calcofluor white dans du milieu CPW13.
- Chauffer 5 minutes à 50°C pour faciliter la dissolution.
- Centrifuger 5 minutes à 1600 g et utiliser le surnageant pour la coloration.

Composition du milieu CPW13:

Pour un litre:

- 27,2 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 101,0 mg  $\text{KNO}_3$
- 1480,0 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 240,0 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,16 mg KI
- 0,25 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 130,0 g mannitol

Dilutions dans l'eau désionisée et pH porté à 5,6.

Ce milieu peut ensuite être autoclavé et conservé à 4°C.

### 3. Purification des protoplastes

Après avoir isolé les protoplastes, il faut les sortir du mélange enzymatique, les laver et les remettre en culture à température ambiante et à l'obscurité, afin de leur permettre de régénérer une paroi.

Nous avons essayé deux méthodes de purification:

#### a) Purification selon la taille

Les suspensions cellulaires végétales consistent non pas en des cellules isolées, mais en microcolonies et chaînes de cellules. Ils occupent de la sorte un volume plus important que les protoplastes isolés. Une digestion trop courte laisse subsister de tels amas cellulaires. Une purification selon la taille visera donc à éliminer toute cellule possédant encore une paroi.

- Sous hotte à flux laminaire, ouvrir deux boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et y déposer dans l'une, un tamis à mailles de 80  $\mu\text{m}$  et dans l'autre, un tamis de 40  $\mu\text{m}$ .

- Transvaser le mélange enzymatique au travers du premier tamis (80  $\mu\text{m}$ ), ensuite au travers du second (40  $\mu\text{m}$ ). Rincer avec quelques millilitres de MP/PS.

- Transférer enfin la suspension filtrée dans un tube à centrifuger Stérilin.
- Centrifuger 8 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.
- Rincer deux fois par resuspension douce du culot de protoplastes dans 10 ml de MS/PS.
- Répartir les protoplastes dans un volume adéquat de MS/PS pour leur régénération, de façon à obtenir une concentration finale en protoplastes de 100.000/ml. Cette concentration serait optimale pour la division cellulaire (Shimizu, 1985).

Cette technique ne permet donc qu'une séparation sur la taille, débris et cellules inférieurs à 40  $\mu\text{m}$  (ou passant à travers les mailles du tamis selon leur grand axe) n'étant pas éliminés.

#### b) Purification selon la densité

Une cellule et un protoplaste se distinguent aussi par leur densité. La technique suivante consiste à placer les protoplastes et les cellules dans un milieu de densité plus faible que les cellules mais plus élevé que les protoplastes. Ce milieu, dit de flottaison, est de composition identique au milieu MS/PS, si ce n'est que le sucre non-métabolisable, le mannitol, est remplacé par une quantité de sucrose équivalente en terme de particules osmotiquement actives (propriété colligative). Les deux milieux ont ainsi une pression osmotique identique, mais différent en densité. Les protoplastes moins denses que le milieu de flottaison nagent en surface de celui-ci. Quant aux débris et cellules, plus denses, ils forment un culot.

- Transvaser le mélange enzymatique dans un tube à centrifuger Stérilin.
- Centrifuger 8 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de milieu de flottaison.
- Centrifuger 8 minutes à 50 g.

- Récupérer les protoplastes à la surface du milieu à l'aide d'une pipette Pasteur et les retransvaser dans un autre tube Stérilin.
- Rincer deux fois par resuspension douce du culot de protoplastes dans 10 ml de MS/PS.
- Répartir les protoplastes dans un volume adéquat de MS/PS, de façon à obtenir une concentration finale en protoplastes de 100.000/ml.

#### Composition du milieu de flottaison

Pour un litre:

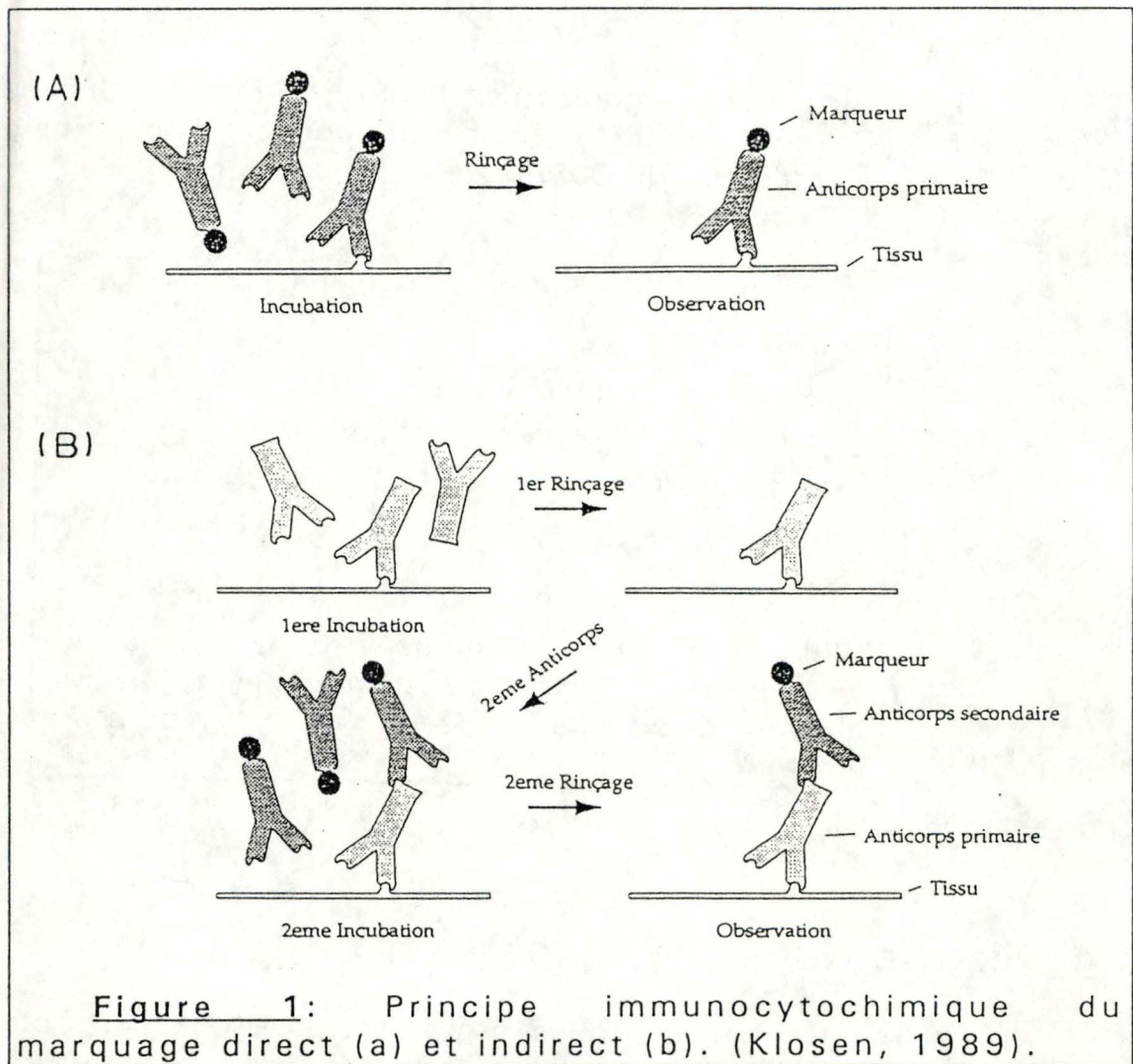
- 4,708 g MS salt
- 1,470 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 201,2 g sucrose
- 1,0 mg 2,4D
- 0,1 mg BAP

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 5,7. Filtration ensuite sur membrane stérilisante millipore 0,2  $\mu\text{m}$  et conservation à température ambiante.

## 4. Fixation des protoplastes

Il est important de fixer les protoplastes. D'une part, c'est le moyen le plus simple pour connaître l'état du protoplaste, en l'occurrence ici sa paroi, à un moment précis. La durée du protocole de marquage ne nous permet pas, en effet, une analyse immédiate. D'autre part, le fluorochrome spécifique de l'ADN que nous utilisons, requiert une perméabilisation préalable du plasmalemme pour sa pénétration.

Nous avons essayé trois fixateurs: le glutaraldéhyde à 2%, le formaldéhyde à 4% et le mélange éthanol-acétone (1-1). Le choix du fixateur tient compte de l'autofluorescence et de la préservation de l'antigénicité des protoplastes.



#### Préparation du formaldéhyde:

On prépare une solution stock à 8% réalisée à partir de para-formaldéhyde solide.

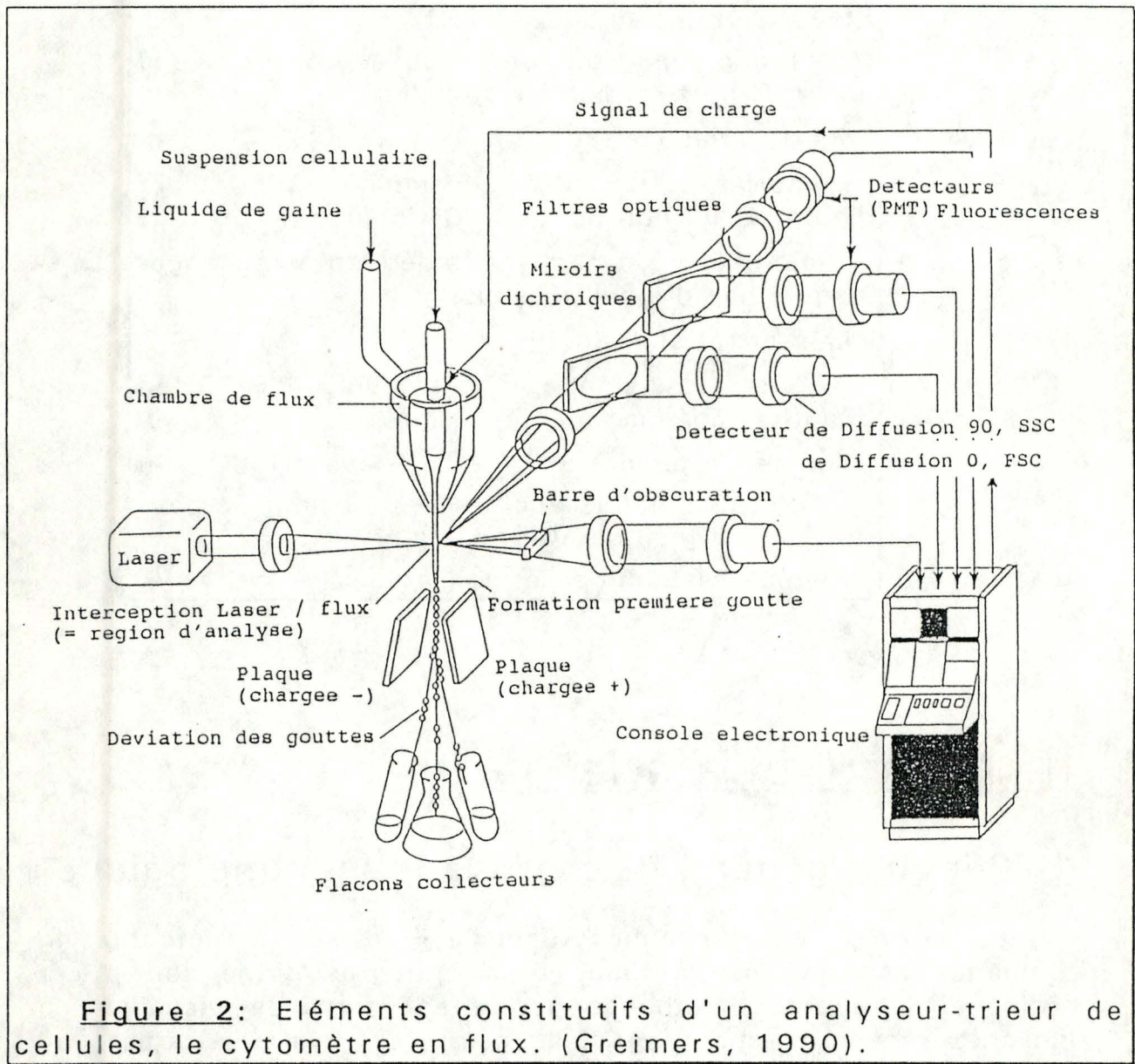
Pour 100 ml:

- Chauffer 60 ml d'eau désionisée à 60°C et ajouter 2 à 4 gouttes de NaOH concentré (10N).
- Ajouter 8 gr de para-formaldéhyde et mélanger jusqu'à ce qu'il soit dissout.
- Laisser refroidir.
- Ajouter les composés du milieu MS/PS en quantités adéquates pour 100 ml.
- Ajuster le pH entre 6,4 et 6,9 avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH et compléter avec de l'eau désionisée pour un volume final de 100 ml.
- Aliquoter la solution et conserver à -20°C.

## II. Marquage de la paroi

### 1. Principe général du marquage immunologique

Le principe de l'immunocytochimie consiste à détecter un antigène dans un tissu à l'aide d'un anticorps dirigé contre cet antigène. Différentes méthodes permettent alors de visualiser la liaison antigène-anticorps. Anciennement, un système direct, où l'anticorps lui-même était marqué, permettait cette détection. De par sa faible sensibilité et les risques d'inactivation de l'anticorps, cette méthode a fait place aux systèmes indirects. (Fig.1). Ceux-ci mettent en oeuvre une étape d'incubation supplémentaire avec un anticorps secondaire, porteur cette fois du marqueur, qui décèle l'anticorps primaire. Ce procédé a l'avantage d'éviter les étapes complexes du couplage de l'anticorps primaire, mais surtout, il permet une amplification du signal. En effet, plusieurs anticorps secondaires peuvent se lier à un seul anticorps primaire. Quant aux marqueurs, on distingue les marqueurs directs, tels les fluorochromes, les marqueurs denses aux électrons, et les marqueurs nécessitant une révélation, tels les enzymes et les isotopes radioactifs (Klosen, 1989).



**Figure 2:** Eléments constitutifs d'un analyseur-trieur de cellules, le cytomètre en flux. (Greimers, 1990).

Au laboratoire, nous détenons un anticorps monoclonal de souris, appelé 2F4, dirigé spécifiquement contre une molécule constitutive de la paroi végétale: une région homopolygalacturonique capable de s'associer en dimères d'"egg-box" (Liners, 1989). C'est cet anticorps qui nous a permis de suivre la régénération de la paroi des protoplastes. Il est à son tour détecté par des immunoglobulines de chèvre anti-souris couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce fluorochrome est excité en lumière bleue (488 nm) et sa fluorescence est mesurable au-delà de 520 nm, dans le vert.

## 2. Cytométrie en flux

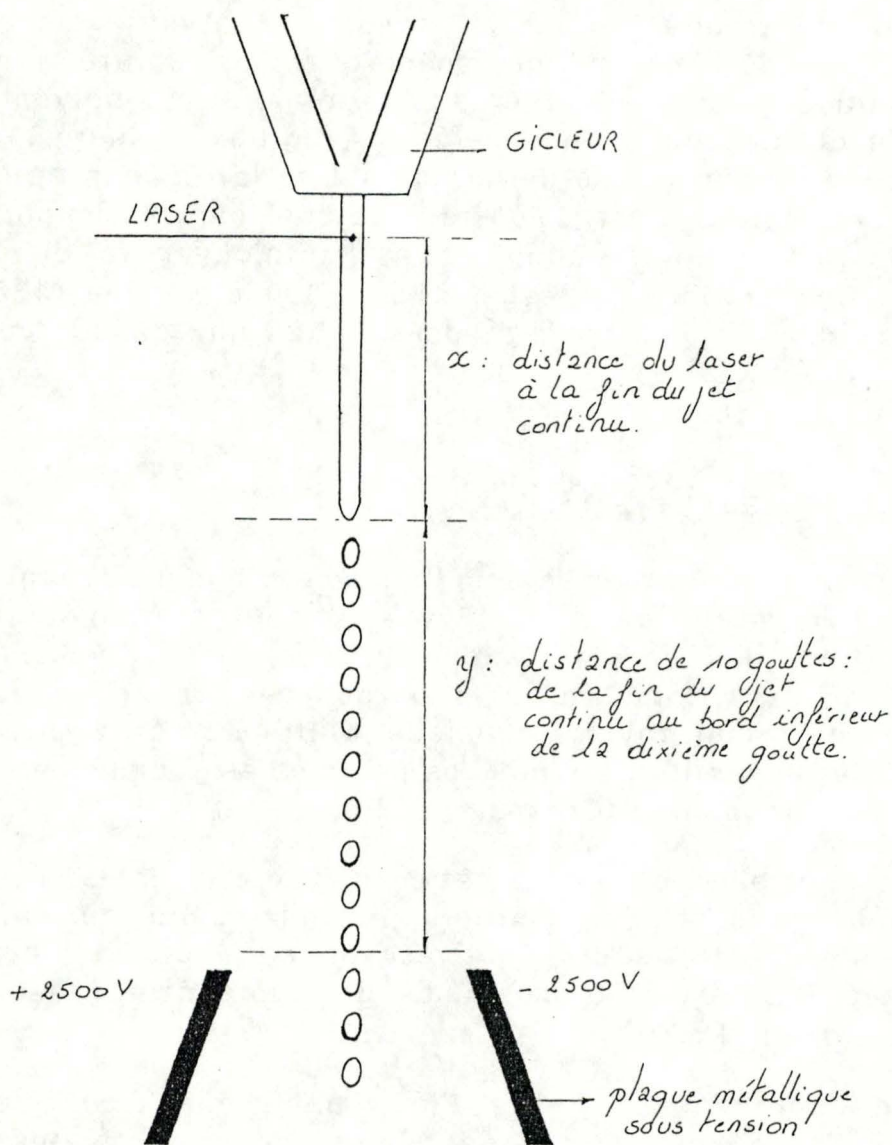
La cytométrie, que ce soit l'analyse d'images (image cytometry) ou la cytométrie en flux (flow cytometry) permet une analyse quantitative des cellules selon plusieurs paramètres. Notre étude relève de la cytométrie en flux qui permet de caractériser des cellules de façon physico-chimique. Outre des critères apparentés à la taille et la texture, les cellules peuvent être analysées grâce à des sondes fluorescentes (Greimers, 1990).

La sensibilité d'un cytomètre en flux à laser est élevée. Il peut discriminer des cellules identiques en microscopie à épifluorescence en cellules positives et négatives. Un cytomètre en flux peut déjà détecter 2000 à 5000 molécules de fluorescéine associées à une cellule (Kruth, 1982).

Le cytomètre à flux (ou analyseur-trieur de cellules), commercialisé sous le nom de Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) par la firme Becton Dickinson, allie optique, laser, dynamique des fluides et électronique pour créer un processus dans lequel des mesures similaires sont effectuées sur des cellules isolées circulant dans une veine liquide et passant l'une après l'autre devant les instruments de mesures (Greimers, 1990). (Fig.2)

### a) Fonction analyseur du FACS

La fonction analytique consiste en une injection à faible pression de cellules entraînées une à une dans une veine liquide au travers d'un gicleur. Le jet liquide émerge alors à l'air libre et amène chaque cellule dans un faisceau laser, ce qui donne lieu à divers signaux lumineux, qui vont être captés au travers d'une optique appropriée par des photomultiplicateurs et des photodiodes. On



**Figure 3:** Calculs à effectuer pour informer le cytomètre en flux du délai de charge: 1) DROP DELAY =  $(x/(y/10)) - 0.75$  et 2) DEF DROPS =  $y/10$ .

distingue les phénomènes de diffusion lumineuse (scatter) et les émissions de fluorescence. Les premiers se subdivisent en deux types: (1) la diffraction, phénomène dominant aux petits angles et dont l'intensité est fonction de l'aire de section de l'objet qui traverse le laser. Par abus, pour autant que l'objet soit sphérique, on admet une corrélation entre son volume et le scatter mesuré, qui s'appelle le "forward scatter" (FSC) (Greimers, 1990). Or, de nombreux facteurs affectent ce scatter: l'asymétrie cellulaire (Kruth, 1982), la différence entre l'index de réfraction du cytoplasme et celui du milieu extérieur, les propriétés de la membrane plasmique, la structure interne de la cellule.... Les dommages cellulaires par divers agents peuvent réduire l'intensité du FSC, ce qui donne un signal différent, indépendant du volume cellulaire (McGann, 1988); (2) la réfraction, phénomène dominant dans la direction orthogonale à l'axe de propagation du rayon laser et dont l'intensité est fonction de la structure cellulaire (telle la granulosité des membranes). Ce scatter porte le nom "side scatter" (SSC) (Greimers, 1990).

L'émission d'une lumière de fluorescence est due, elle, à l'absorption de la lumière d'excitation incidente du laser et à la réémission d'une lumière de longueur d'onde supérieure à celle-ci. Le laser utilisé est un laser à argon à raie de couleur cyan (bleu-vert à dominance bleue) qui est une lumière monochromatique de 488 nm. Il permet l'excitation de nombreux fluorochromes tels l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dont la fluorescence est mesurable au delà de 520 nm, dans le vert (FL1) et l'iodure de propidium (PI) de lumière fluorescente rouge (FL2). L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle au nombre de molécules de fluorochrome fixées par la cellule, avec toutefois un bruit de fond engendré par la fluorescence naturelle (l'autofluorescence) (Greimers, 1990).

### b) Fonction trieur du FACS

Cette fonction consiste en une fragmentation du jet de liquide en gouttes, grâce à des vibrations du gicleur engendrées par un quartz oscillant par effet piézoélectrique à une fréquence de 20.000 à 40.000 Herz. Chaque cellule, une fois analysée, est incluse dans une goutte dans un délai connu de la machine. La connaissance de ce délai de charge (temps d'attente entre l'analyse, c'est-à-dire la prise de décision de tri et le tri effectif, c'est-à-dire l'envoi de l'impulsion de charge) nécessite un calcul de la part de l'utilisateur, il est repris à la figure 3.

On peut trier deux populations de cellules simultanément (tri gauche et tri droit). Lorsqu'une goutte contient une cellule dont les caractéristiques de scatter et/ou de fluorescence sont celles requises par la fenêtre de tri choisie, elle va être chargée (avec les deux gouttes qui l'entourent) positivement ou négativement (selon la fenêtre à laquelle elle appartient) et ainsi être défectée dans un flacon selon une trajectoire imposée par un champ électrique constant. Ce champ est créé par deux plaques métalliques mises sous haute tension. Les gouttes indésirables (ne contenant rien ou contenant une cellule non sélectionnée) ne sont pas chargées, donc non défectées et ainsi évacuées (Greimers, 1990; Kruth, 1982).

La taille du gicleur est déterminante pour la qualité du tri. Un gicleur de diamètre de 50  $\mu\text{m}$  est particulièrement dommageable pour les protoplastes puisqu'il approche leur taille. Un diamètre de 70  $\mu\text{m}$  est optimal à la fois pour la qualité du tri et pour la conservation de l'intégrité cellulaire. Les gicleurs de diamètre supérieur sont déconseillés pour le tri à cause des problèmes techniques qu'ils entraînent (Redenbaugh, 1982).

### 3. Protocole de marquage pour le FACS

Le protocole que nous avons mis au point pour passer des protoplastes fixés et marqués immunologiquement au FACS est le suivant:

#### Composition du tampon

Le tampon utilisé ci-dessous est celui qui permet une reconnaissance optimale de l'antigène par l'anticorps:

- Tris 20 mM
- NaCl 150 mN
- $\text{CaCl}_2$  1 mN

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 8,2.

### 1. Fixation dans du formaldéhyde 4%

- Mettre dans un tube à centrifuger:
  - 1 ml de suspension de protoplastes à concentration de  $\pm 2$  à 300.000/ml.
  - 1 ml de formaldéhyde à 8%.
- Laisser incuber 30 minutes.

### 2. Lavage

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.
- Rincer dans 2 ml de tampon et y laisser les protoplastes jusqu'à l'étape de saturation (conserver à 4°C).

De la sorte, chaque échantillon, prélevé à des temps différents au cours de la régénération, est stocké à 4°C jusqu'au dernier prélèvement. A ce moment, tous les échantillons vont subir le reste du protocole simultanément (du point 3 au point 8). Cela permet surtout l'analyse simultanée des échantillons au FACS avec des réglages identiques de l'appareil, ce qui autorise par la suite une comparaison entre eux. La réponse du FACS varie d'un jour à l'autre.

### 3. Saturation

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.
- Ajouter 2 ml d'une solution de poudre de lait à 5 % préparée dans le tampon et centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.
- Laisser incuber pendant 1h30 à température ambiante.
- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.

### 4. Marquage aux anticorps primaires (2F4)

- Ajouter 100  $\mu$ l d'anticorps primaires dilués 10 fois dans une solution de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon et centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.

### 5. Lavage

- Bain pendant 10 minutes dans 5 ml d'une solution de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon et centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.

### 6. Marquage aux anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-souris couplés au FITC)

- Ajouter 100  $\mu$ l d'anticorps secondaires dilués 40 fois dans une solution de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon et centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.
- Laisser incuber 1 heure à température ambiante et à l'obscurité.

### 7. Lavage

Idem 5.

### 8. Filtration

- Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon.
- Transvaser le contenu du tube à centrifuger dans le tube d'analyse prévu pour le FACS en passant par un tamis à mailles de 80  $\mu$ m (celui-ci permet d'éviter les problèmes d'obstruction du gicleur d'un diamètre de 70  $\mu$ m à la sortie).

### Remarque:

Afin de mettre en évidence la pectine méthylestérifiée qui n'est pas reconnue par notre anticorps 2F4, nous avons tenté de la déestérifier par un traitement chimique. Cette étape s'intercale dans le protocole général précédent entre les étapes 2 et 3:

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 4 ml de NaOH 0,05 M pendant 30 minutes. (Les témoins, c'est-à-dire pectine normale non déestérifiée, sont incubés pendant 30 minutes dans 4 ml d'eau désionisée).
- Effectuer deux lavages dans 5 ml de tampon pendant 10 minutes chacun.

## 4. Test Elisa

Nous l'avons vu, la littérature mentionne la libération de polysaccharides extracellulaires, dont de la pectine, dans le milieu de régénération des protoplastes. Un test Elisa permet de détecter la présence de pectine par le 2F4 (Liners, 1989). Il était intéressant de voir si, à l'aide de ce système, nous pouvions détecter la présence de pectine extracellulaire libérée par nos protoplastes régénérants. Nous avons utilisé le protocole suivant:

### Prélèvement de l'antigène:

- Laisser les protoplastes régénérer dans le MS/PS à une densité de 100.000/ml.
- Aux temps souhaités, centrifuger 3 ml de suspension de protoplastes à 50 g pendant 5 minutes.
- Prélever 1 ml de surnageant que l'on recentrifuge à 11.000 g pendant 15 minutes.
- Le surnageant sert alors d'antigène pour le test Elisa.

### Test Elisa:

Le test se réalise sur plaque de microtitration en polystyrène à haute capacité d'adsorption (Microwell Module F-8 immunoquality 160 PCS, Nunc). Toutes les quantités sont rapportées pour un micropuits.

#### 1. Dépôt de l'antigène

- Déposer 50  $\mu$ l de poly-L-lysine (0,05 mg/ml).
- Laisser incuber 1 heure à température ambiante.
- Evacuer la PLL.
- Déposer 50  $\mu$ l de la solution de pectine.
- Recouvrir d'un parafilm et placer à 4°C pendant une nuit.

## 2. Saturation

- Evacuer la solution de pectine.
- Ajouter 250  $\mu$ l de poudre de lait 5% préparée dans du tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>.
- Laisser incuber 2 heures à 37°C.
- Evacuer ensuite la poudre de lait.

## 3. Dépôt de l'anticorps primaire (2F4)

- Déposer 50  $\mu$ l d'anticorps primaire dilué 10 fois dans une solution de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon et centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.
- Laisser incuber 1 heure à 37 °C.

## 4. Lavage

Six lavages sont réalisés dans la solution tampon.  
Tampon: Tris 20 mM-NaCl 150 mM-CaCl<sub>2</sub> 1 mM.

## 5. Dépôt de l'anticorps secondaire (anticorps de cheval anti-souris couplé à la peroxydase de raifort)

- Déposer 50  $\mu$ l d'anticorps secondaires dilués 500 fois dans une solution de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon Tris et centrifugée à 10.000 g.
- Laisser incuber 1 heure à 37°C.

## 6. Lavage

Idem 4.

## 7. Révélation

- Ajouter 100  $\mu$ l d'ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Laisser incuber 15 minutes à 37°C.

#### Préparation de la solution d'ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Cette solution se prépare juste avant emploi:

- Dissoudre 5 mg d'ABTS dans 6 ml de tampon citrate.
- Ajouter 20  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ce mélange.

#### Composition du tampon citrate

Pour un litre:

- 20,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O
- 8,9 g acide citrique

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 5,6.

#### 8. Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à 405 nm, sur lecteur Elisa Titertek.

### III. Synchronisation des cellules

Une culture de cellules en suspension, qui vient d'être repiquée, passe successivement par trois phases: (1) une phase de latence, (2) une phase de croissance d'abord exponentielle et ensuite linéaire et (3) une phase stationnaire. Au cours de la phase de croissance, les cellules sont distribuées de manière asynchrone dans les quatre étapes du cycle cellulaire (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M). Si l'on veut étudier la régénération de la paroi au cours du cycle cellulaire, il est indispensable de posséder des cellules synchronisées. En théorie, il serait possible d'arrêter la progression d'une cellule dans le cycle cellulaire à chacune des étapes. Toutefois, en pratique, les étapes de blocage sont le plus souvent G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> et M. Il est très délicat de bloquer le cycle en G<sub>2</sub>, voire même létal en phase S (Ashihara, 1979).

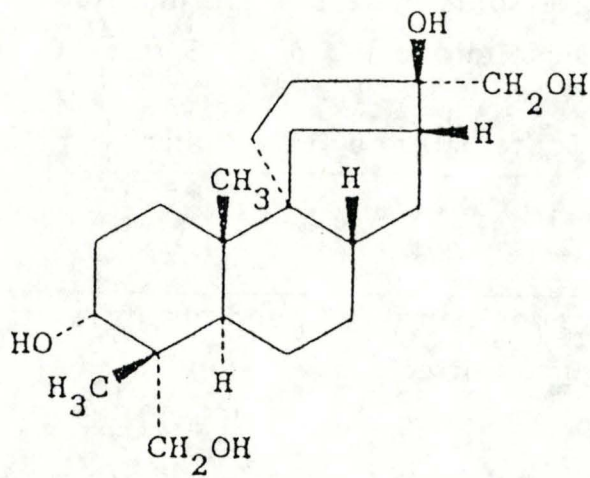


Figure 4: Structure de l'aphidicoline.

Une panoplie de traitements sont à notre disposition pour synchroniser les cellules: (1) des méthodes physiques: séparation par gradient basée sur une différence de volume cellulaire, traitement par le froid (Okamura, 1973), abaissement de l'osmolarité du milieu de culture des protoplastes (Weber, 1985)... (2) des méthodes chimiques: privation d'isoleucine, de calcium, de phosphate (Amino, 1983) ou de tout autre nutriment; adjonction d'un inhibiteur de la synthèse d'ADN tels l'hydroxyurée, l'éthylène, le fluorodeoxyuridine, l'azote, l'aphidicoline... .

Nous avons essayé deux méthodes de synchronisation des cellules:

### 1. Par traitement à basse température

- La synchronisation à basse température s'effectue sur des cultures de cellules en phase stationnaire depuis environ deux jours, au départ d'une suspension cellulaire de carotte âgée d'environ treize jours.
- Placer cette culture à 4°C pendant trois jours.
- Diluer dix fois la suspension dans un milieu de culture frais et placer la culture sur agitateur circulaire dans les conditions habituelles pendant 24 heures.
- Remettre à nouveau la suspension cellulaire pour trois jours à 4°C, les cellules sont alors synchronisées.

Les cellules atteignent la phase stationnaire car elles ont épuisé le phosphate du milieu. Laisser les cellules pendant deux jours dans cette phase engendre de surcroît l'épuisement de la source de carbone et des substances de réserve intracellulaires, ce qui bloque les cellules en phase G<sub>1</sub>. Cette phase, expérimentalement, s'est révélée être sensible à un abaissement de la température. De cette manière, le froid affecterait le cycle cellulaire et permettrait ainsi la synchronisation cellulaire (Okamura, 1973).

### 2. Par l'aphidicoline

L'aphidicoline est un antibiotique diterpénoïde tétracyclique obtenu de *Cephalosporium aphidicola* (Fig.4). Elle inhibe de façon spécifique l' $\alpha$ -like DNA polymérase, l'enzyme responsable de la réplication de l'ADN (Sala, 1982). On dénomma celle-ci de la sorte,

tout comme la  $\gamma$ -like polymérase, par leurs propriétés analogues aux  $\alpha$  et  $\gamma$ -polymérases des cellules animales (Sala, 1980). La  $\gamma$ -like DNA polymérase présente dans le chloroplaste et la DNA polymérase des mitochondries ne sont pas sensibles à cet antibiotique (Sala, 1981). L'aphidicoline s'oppose uniquement à l'incorporation de thymidine dans l'ADN nucléaire en reconnaissant une portion spécifique du site actif de l' $\alpha$ -like DNA polymérase unique à cette protéine. Ce qui n'occasionne aucune répercussion sur la synthèse de l'ARN ou des protéines (Sala, 1980).

L'aphidicoline est, à ce jour, l'inhibiteur sans doute le moins toxique et le plus efficace; la synthèse d'ADN reprend d'ailleurs immédiatement après son retrait du milieu, contrairement aux autres molécules qui entraînent souvent une synchronisation partielle et de surcroît des altérations physiologiques. Elle engendre l'accumulation des cellules à la frontière des phases G1/S du cycle cellulaire et permet un taux élevé de synchronisation (95% des cellules de *Daucus carota* entrent en phase S dès son retrait, 80% pour *Nicotiana tabacum* et *Haplopappus gracilis*) (Sala, 1986).

### 1. Matériel de base

Cette synchronisation s'effectue sur des cultures de cellules en début de phase exponentielle. A cette fin, on effectue:

- deux repiquages successifs des cellules à trois jours d'intervalle;
- on porte ensuite la concentration en cellules à environ 4 à 500.000/ml.

### 2. Traitement à l'aphidicoline

Au terme de la deuxième série des trois jours, on ajoute deux fois, à douze heures d'intervalle, 10  $\mu$ g d'aphidicoline/ml, et on laisse incuber pendant 12 heures.

Un seul traitement à l'aphidicoline permettrait uniquement la synchronisation des cellules qui ne sont pas en phase S lors de son inoculation. Le deuxième traitement force les cellules bloquées dans leur synthèse d'ADN à devenir synchrones également (Sala, 1986) mais surtout, il évite les problèmes d'inactivation intracellulaire de l'aphidicoline à trop haute concentration par les cellules de carotte. L'inhibiteur doit donc être maintenu pendant une période correspondant au minimum à la durée de la phase S. Ce temps a été estimé à 24 heures pour *Daucus carota* (Sala, 1982).

### 3. Lavages et retour aux conditions standards

Laver quatre fois avec du milieu de culture frais. On peut dès lors commencer une digestion enzymatique.

#### Préparation de l'aphidicoline

- Solution stock à 1% dans du DMSO (faible solubilité dans l'eau): 5 mg aphidicoline/ 500  $\mu$ l DMSO.
- Solution stock dans du milieu de culture (afin d'avoir un volume suffisant pour pouvoir stériliser sur filtre 0,2  $\mu$ m): 100  $\mu$ l solution stock dans DMSO dans 3900  $\mu$ l de milieu de culture.
- Volume de solution précédente à prélever pour 10 ml de suspension cellulaire à synchroniser: 400  $\mu$ l pour 9,6 ml de suspension cellulaire (Ce qui constitue une concentration finale en aphidicoline de 10  $\mu$ g/ml).

## IV. Marquage de l'ADN

### 1. L'iodure de propidium

L'iodure de propidium (P.I.), tout comme le bromure d'éthidium ou l'acridine orange, est un colorant qui s'intercale dans les doubles brins d'acides nucléiques, aussi bien ADN que ARN. Contrairement aux colorants spécifiques de l'ADN qui ont une spécificité propre pour les brins d'ADN, en se liant à certaines paires de base (tels le 4'-6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), la mithramycine, l'Hoechst 33258), les colorants intercalants nécessitent, eux, un pré-traitement visant à dégrader l'ARN. On distingue deux types de pré-traitement: les dégradations chimiques (à l'acide chlorhydrique) et enzymatiques (à la ribonucléase) de l'ARN.

L'ADN fixe un fluorochrome proportionnellement à sa quantité (Brown, 1986). Il est dès lors possible, en cytométrie en flux, d'examiner le contenu en ADN et de connaître la position de la cellule dans le cycle cellulaire. Ainsi, une cellule diploïde en G1 contiendra un niveau 2C d'ADN. En G2, ce niveau sera de 4C. Pour la phase S, le niveau sera intermédiaire entre 2C et 4C (Galbraith, 1984). Toutefois, une coloration à l'iodure de propidium ne permettra pas de distinguer la phase G2 de la mitose ou le stade G1 de G0 (Kruth, 1982).

## 2. Protocole de marquage pour le FACS

Nous avons essayé ces deux traitements de dégradation de l'ARN sur protoplastes fixés. Quel que soit le traitement, il faut d'abord fixer et laver les protoplastes:

### 1. Fixation dans du formaldéhyde 4%

- Mettre dans un tube à centrifuger:
  - 1 ml de suspension de protoplastes à concentration de  $\pm 2$  à 300.000/ml.
  - 1 ml de formaldéhyde 8 %.
- Laisser incuber pendant 30 minutes.

### 2. Lavage

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes et évacuer le surnageant.
- Rincer dans 5 ml de tampon et y laisser les protoplastes jusqu'à l'étape de dégradation (conserver à 4°C).

Ensuite, selon le traitement:

### a) Dégradation à l'HCl

L'acide chlorhydrique permet l'hydrolyse des doubles brins d'ARN mais aussi le déplacement des histones de l'ADN, ce qui accroît le nombre de sites de liaison disponibles pour l'iodure de propidium. Malencontreusement, l'HCl engendre, et ce d'autant plus que l'incubation est longue, une dénaturation partielle de l'ADN, ce qui diminue les sites de liaison potentiels pour l'iodure de propidium (Dolbeare, 1983).

### 3. Dégradation de l'ARN

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes la suspension de protoplastes laissée à 4°C dans le tampon Tris-CaCl<sub>2</sub>-NaCl et évacuer le surnageant.
- Ajouter 2 ml de tampon Tris-CaCl<sub>2</sub>-NaCl.
- Ajouter 2 ml de HCl (Merck) 4N, goutte à goutte en mélangeant.
- Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 5 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.

### 4. Neutralisation de l'acide

- Resuspendre le culot dans 5 ml de tétraborate de sodium Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (Merck) 0,1 N (pH 8,5).
- Laisser incuber 15 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 5 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot de protoplastes dans 1 ml de tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> et transvaser l'échantillon dans le tube d'analyse prévu pour le FACS en passant par un tamis à mailles de 80 µm.

### 5. Coloration au P.I.

- Une minute avant l'acquisition des résultats au FACS, ajouter l'iodure de propidium pour obtenir une concentration finale de 10 µg/ml.

## b). Dégradation à la ribonucléase

### 3. Dégradation de l'ARN

- Centrifuger à 50 g pendant 5 minutes la suspension de protoplastes laissée à 4°C dans le tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 2 ml de solution de ribonucléase A 0,1% (Sigma n° R-5503) préparée dans un tampon phosphate 0,2 M et pH7.
- Laisser incubé pendant 40 minutes à 37°C.
- Centrifuger 3 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> et transvaser ensuite l'échantillon dans un tube d'analyse prévu pour le FACS en passant au travers d'un tamis de 80  $\mu$ m.

### 4. Coloration au P.I.

- Une minute avant l'acquisition des résultats au FACS, ajouter l'iodure de propidium pour atteindre une concentration finale de 10  $\mu$ g/ml.

## c) Analyse de l'ADN sur noyaux

L'analyse du cycle cellulaire directement sur noyaux évite les perturbations dues à l'opacité des parois, aux inclusions telle que l'amidon et à la présence de chromophores naturels. Le coefficient de variation pour FL2 s'en voit alors diminué (Brown, 1986).

Cependant, en travaillant sur noyaux, nous ne pouvons plus distinguer les sous-populations 2A, 2B et 2C. Mais, afin d'obtenir un contrôle de phase G1 ou G2 de la cellule mononucléée, nous sommes obligés de recourir à des noyaux isolés, car les protoplastes, par leur fusion spontanée dans le milieu enzymatique ou par leur division, ne permettent pas de distinguer: un noyau en G2 de deux noyaux en G1, deux noyaux en G2 de quatre noyaux en G1... .

### 1. Isolement de noyaux

On extrait les noyaux à partir de protoplastes isolés et purifiés (par densité) selon les méthodes décrites précédemment. Avant de lyser les protoplastes, on les place au minimum une heure à 4°C. Il faut ensuite:

- Centrifuger 5 minutes à 50 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre les protoplastes dans 5 ml de tampon de lyse pendant 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 7 minutes à 1000 g et évacuer le surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub>.
- Ajouter 1 ml de formaldéhyde 8% et laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 4 minutes à 1000 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre dans 5 ml de tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> et conserver à 4°C jusqu'à l'étape de dégradation

#### Tampon de lyse:

- Hepes 5 mM
- KCl 50 mM
- MgSO<sub>4</sub> 10 mM

Dilutions dans l'eau désionisée; le pH est porté à 8 avec du KOH.

On ajoute alors du triton X-100 pour obtenir une concentration finale de 0,25% (w/v).

(Conia, 1990)

### 2. Dégradation de l'ARN à la ribonucléase

- Centrifuger 7 minutes à 1000 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 2 ml de solution de ribonucléase A 0,1% (Sigma n° R-5503) préparée dans un tampon phosphate 0,2 M et pH 7.

- Laisser incuber pendant 40 minutes à 37°C.
- Centrifuger 4 minutes à 1000 g et évacuer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de tampon Tris-NaCl-CaCl<sub>2</sub> et transvaser ensuite l'échantillon dans un tube d'analyse prévu pour le FACS en passant au travers d'un tamis de 25  $\mu\text{m}$ .

### 3. Coloration au P.I.

- Une minute avant l'acquisition des résultats au FACS, ajouter l'iodure de propidium pour obtenir une concentration finale de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

RESULTS

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec les figures 1, 2 et 3:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 45

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	200	600	----
AMP	2	Log	Log	----

- Fenêtre d'acquisition: OFF

# I. Mise au point des protocoles expérimentaux

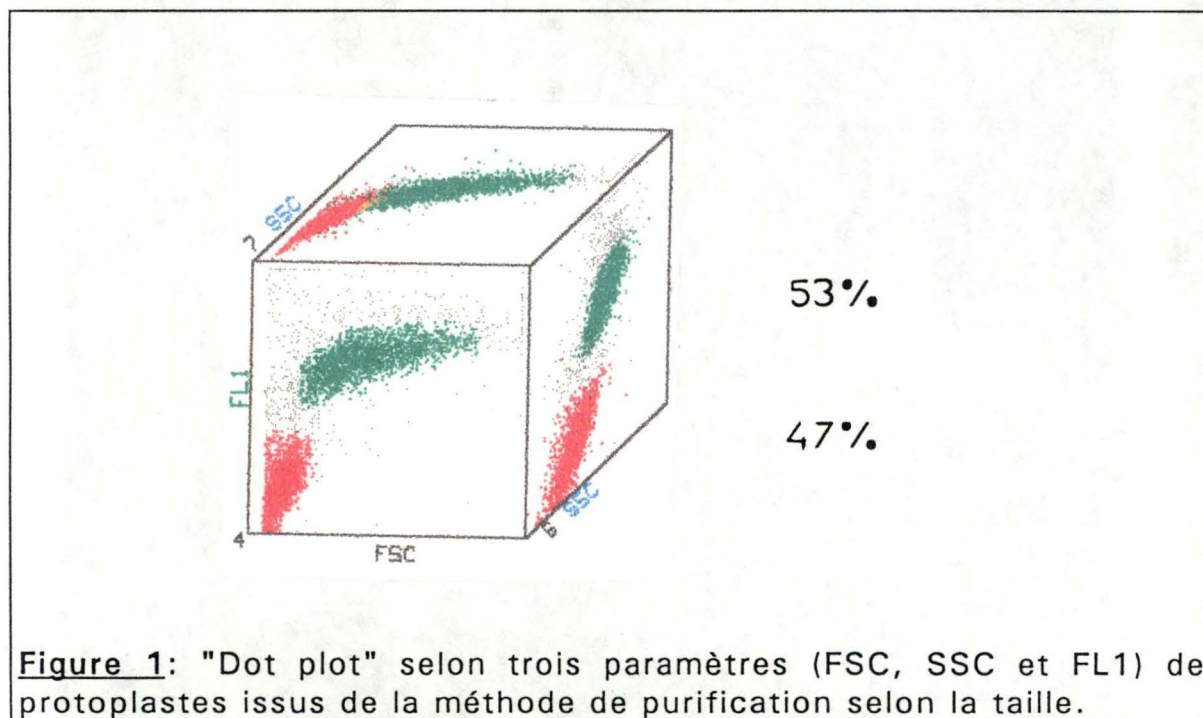
## 1. Détermination d'une méthode de purification

### 1. Présentation "dot plot"

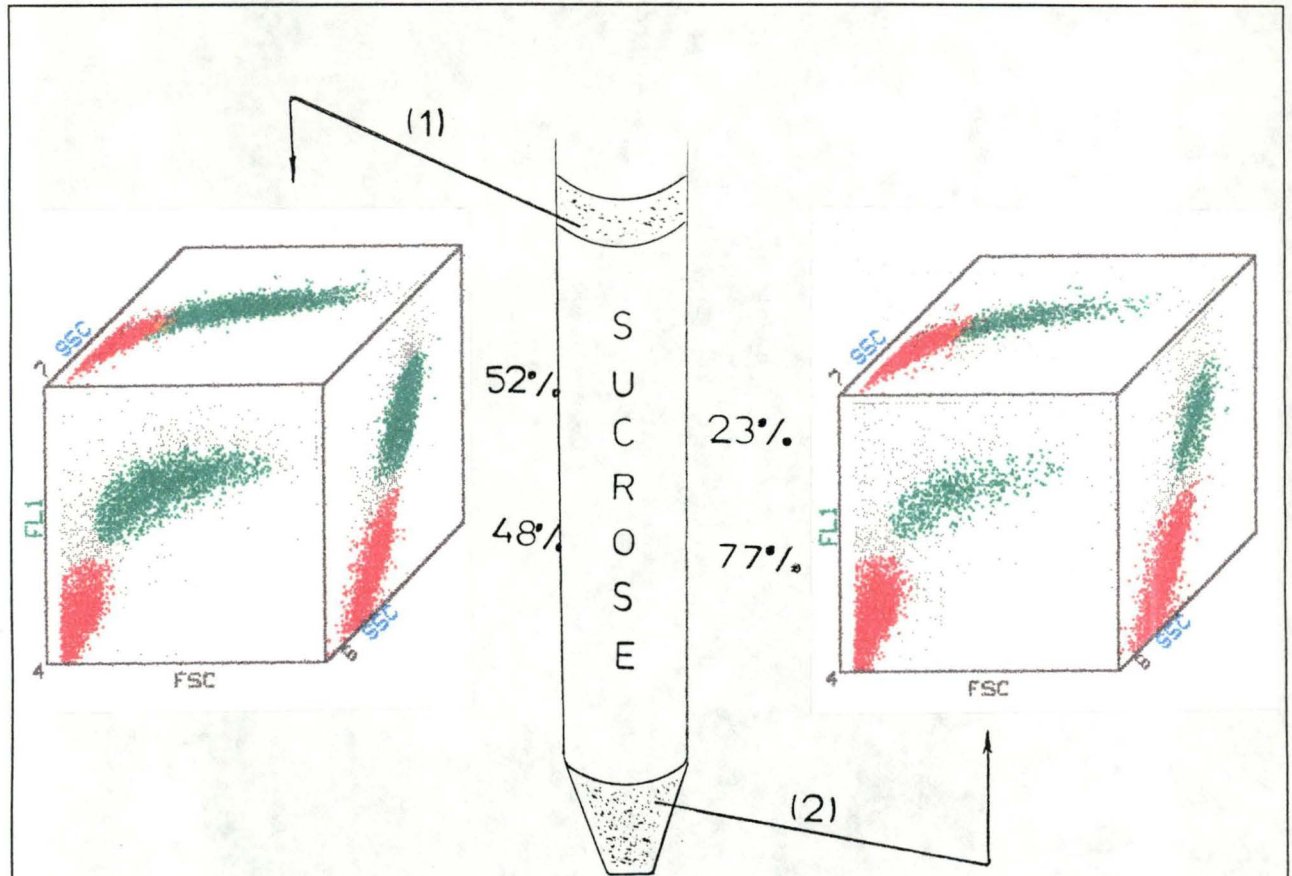
Sur base de trois critères: la taille, la granulosité et l'autofluorescence verte, nous pouvons discriminer clairement deux populations en cytométrie en flux, que ce soit selon la méthode de séparation par la taille ou par la densité (figure 1 et 2). Après purification, ces populations ont été fixées 30 minutes dans le formaldéhyde 4%, rincées dans le tampon Tris-CaCl<sub>2</sub>-NaCl et directement analysées au FACS.

Les caractéristiques de ces populations sont:

- population 1: il s'agit d'une population de taille, de granulosité et d'autofluorescence verte faibles (symbolisée en rouge sur le schéma).
- population 2: inversément, cette population a une taille, une granulosité et une autofluorescence verte élevées (symbolisée en noir et vert sur le schéma).



**Figure 1:** "Dot plot" selon trois paramètres (FSC, SSC et FL1) de protoplastes issus de la méthode de purification selon la taille.



**Figure 2:** (1) "Dot plot" de protoplastes issus de la méthode de purification selon la densité (c'est-à-dire récupérés dans le surnageant du milieu de sucrose).

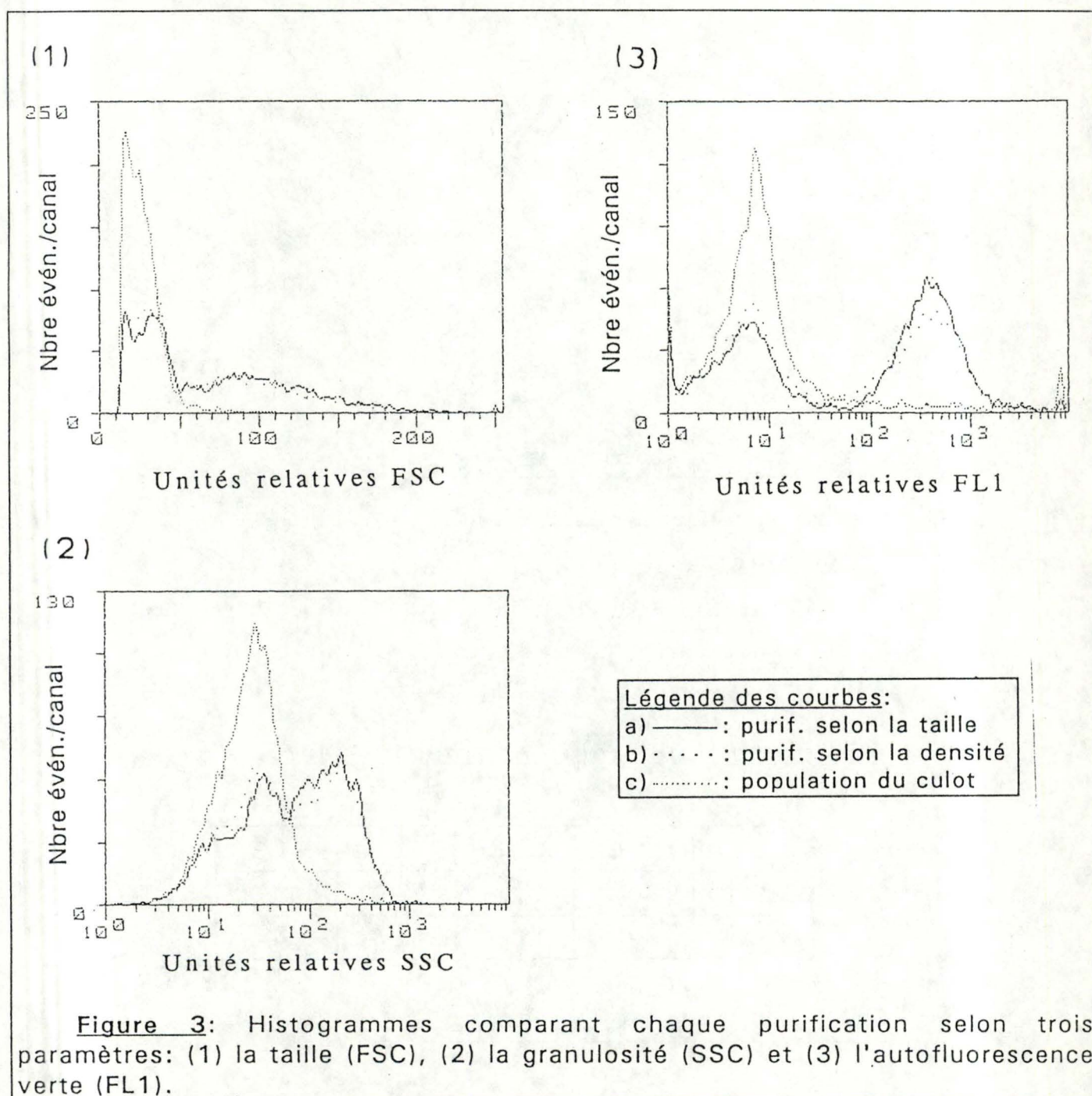
(2) "Dot plot" de ce que l'on retrouve dans le culot du milieu de sucrose.

Nous constatons que le culot obtenu par la méthode de purification par densité contient beaucoup moins de sujets de la population 2 ( $\pm$  le quart contre  $\pm$  la moitié pour les deux méthodes de purification).

## 2. Présentation "histogramme"

Ces observations apparaissent plus nettement encore sous une présentation en forme d'histogramme:

(voir page suivante)



Si on compare les courbes a et b des trois histogrammes repris à la figure 3 ci-dessus, on n'observe pas d'enrichissement en protoplastes de la population 2 pour le prélèvement du surnageant par la méthode de densité, alors que paradoxalement une grande partie de la population 1 se retrouve dans le culot (77% du culot est constitué de la population 1).

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec les figures 4, et 5:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 50

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	220	380	----
AMP	2	Log	Log	----

- Fenêtre d'acquisition: OFF

### 3. Marquage des deux populations au 2F4

Afin de tester l'efficacité de notre marquage, nous avons procédé à deux contrôles: (1) le premier consistait à ne mettre ni anticorps primaire ni anticorps secondaire (ces étapes sont donc remplacées par une incubation dans 100  $\mu$ l de poudre de lait à 1% préparée dans le tampon Tris-CaCl<sub>2</sub>-NaCl) et (2) de façon analogue nous avons omis, dans le deuxième contrôle, l'incubation dans l'anticorps primaire.

L'histogramme de fluorescence est présenté à la figure 4. Des résultats semblables sont obtenus que ce soit pour les populations issues de la méthode de purification selon la taille ou selon la densité. C'est pourquoi nous n'avons repris qu'un histogramme, celui des protoplastes obtenus par la seconde méthode.

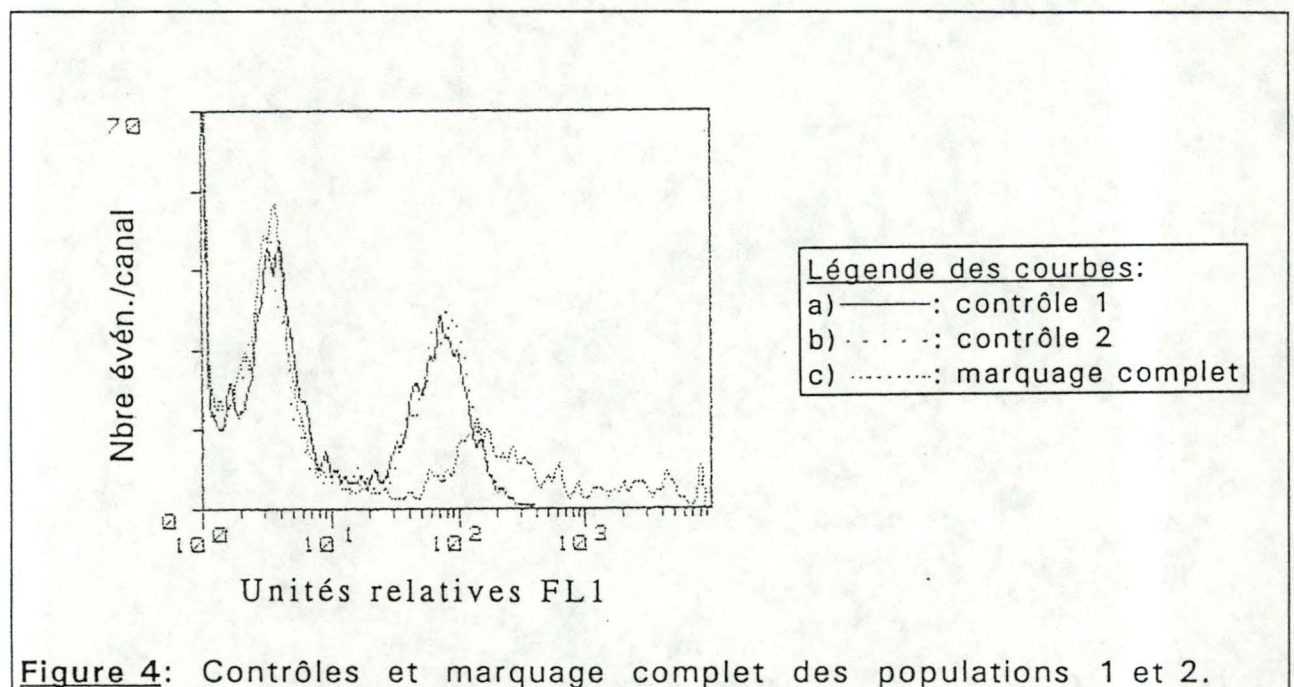


Figure 4: Contrôles et marquage complet des populations 1 et 2.

Ce graphe nous apporte les renseignements suivants:

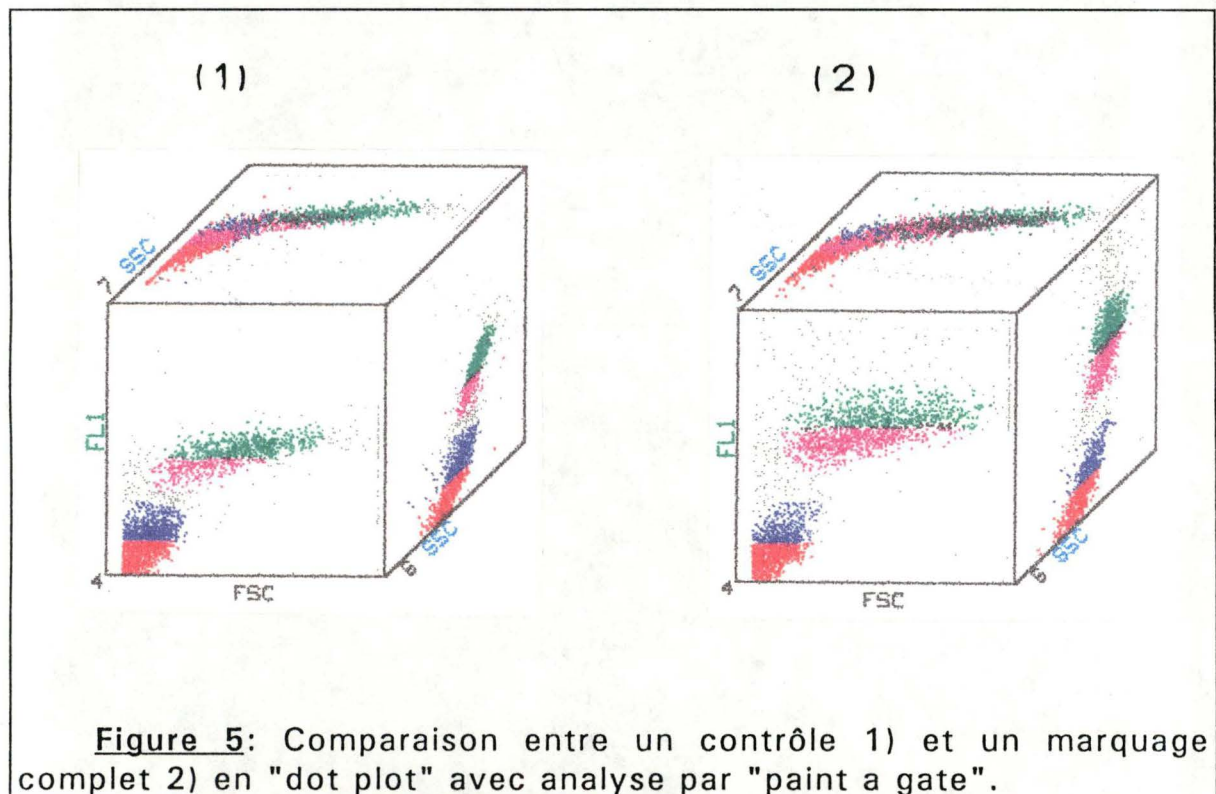
(1) Nous pouvons affirmer que notre marquage est efficace, entendons par là qu'il n'y a pas ou peu de marquage non spécifique. En effet, les courbes a) et b) se superposent à peu de choses près.

(2) La population que nous avons appelée 1 ne semble pas être reconnue par l'anticorps anti-pectine. Il pourrait s'agir de débris, de protoplastes non-régénérants. Cette constatation s'observe quel que soit l'âge de la culture des protoplastes.

(3) Si nous comparons l'histogramme C de la figure 3 à celui de la figure 4, plus précisément les deux courbes a (en trait continu), nous constatons dans le premier cas que la population 1 est plus faible alors que ces rapports sont inversés dans l'autre cas. Ceci amène à penser que la population 1 pourrait être une population de débris et qu'ils augmenteraient suite aux traitements que doivent subir les protoplastes au cours du marquage. (Dans le premier cas, les protoplastes n'ayant pas subi ce protocole ont été soumis à moins de centrifugations.)

(4) La population 2, quant à elle, est bien marquée par l'anticorps et présente apparemment une distribution d'autant plus hétérogène que le paramètre est acquis en logarithme.

Une comparaison en "dot plot" avec analyse par "paint a gate" d'un contrôle et d'un marquage complet (figure 5) permet d'ajouter qu'il existe une corrélation positive entre les différents paramètres: taille, granulosité et fluorescence verte.



Paramètres de réglage du FACS en rapport avec la figure 6:

- Treshold:

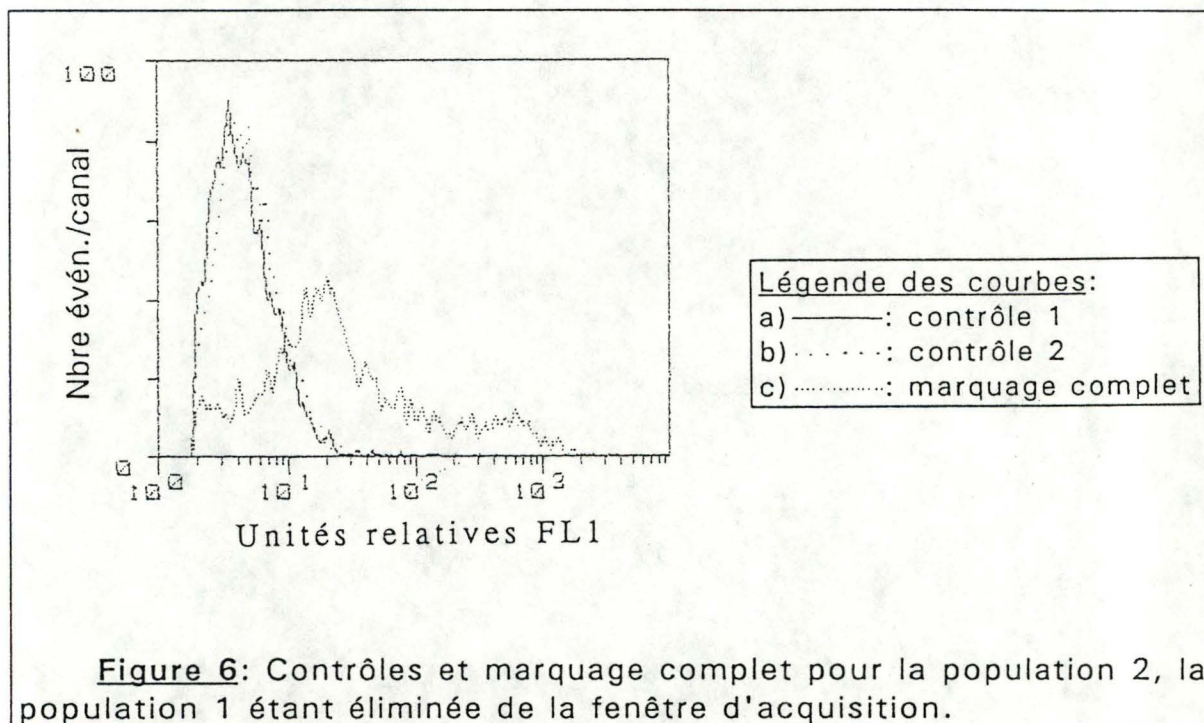
- Trigger: FSC
- Level: 50

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	220	380	----
AMP	1	Log	Log	----

- Fenêtre d'acquisition: ON

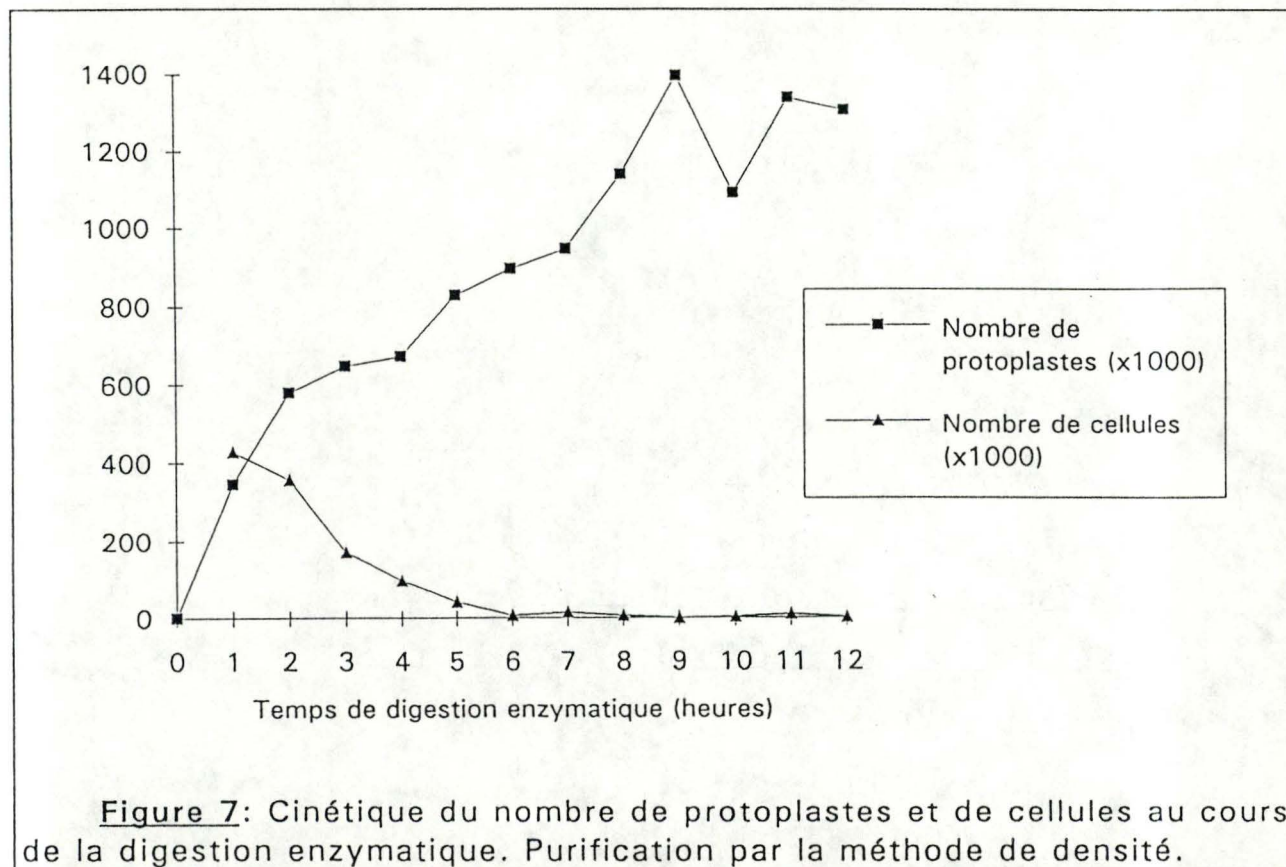
Suite à ces analyses, nous avons décidé désormais de faire abstraction de la population 1. Pour ce faire, nous placerons une fenêtre lors de l'acquisition. Le type de graphe que nous avons alors obtenu était le suivant:



Quant au choix de la méthode de purification, rien jusqu'ici ne permet de trancher favorablement pour l'une ou l'autre, si ce n'est que la méthode par densité est plus simple à mettre en oeuvre. La cinétique suivante nous apportera un critère décisif.

## 2. Cinétique enzymatique

Afin de déterminer le temps de digestion enzymatique, nous avons procédé à une cinétique du nombre de protoplastes et de cellules retrouvés dans le surnageant lors de la méthode de purification selon la densité. Les résultats sont présentés à la figure 7 (voir page suivante).



Malgré la différence de densité qui distingue une cellule d'un protoplaste, la méthode de purification utilisée ne permet pas une séparation complète surtout au cours des premières heures de la digestion. Les cellules contaminantes doivent certainement être des cellules proches du stade protoplaste, encore appelé sphéroplaste, et donc de densité voisine aux protoplastes. La méthode de purification n'est pas à mettre en doute car on constate au-delà de cinq heures, une progression relativement constante du nombre de protoplastes alors que les cellules contaminantes ont disparu. Dans le cas inverse, si la méthode avait été inefficace, nous aurions dû obtenir une progression symétrique des deux courbes et une stabilisation du nombre de protoplastes au moment où l'on ne retrouve plus de cellules dans le surnageant.

Suite à cette cinétique, nous avons établi le temps de digestion enzymatique à six heures. Ce temps est un compromis qui réduit à un minimum les effets toxiques de l'incubation dans le mélange enzymatique et qui minimise la présence des cellules non digérées.

Nous avons également porté notre choix sur la méthode de purification par densité, la méthode de séparation selon la taille étant tout à fait inopérante dans la discrimination de protoplastes et de cellules de tailles égales.

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec la figure 8:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 60

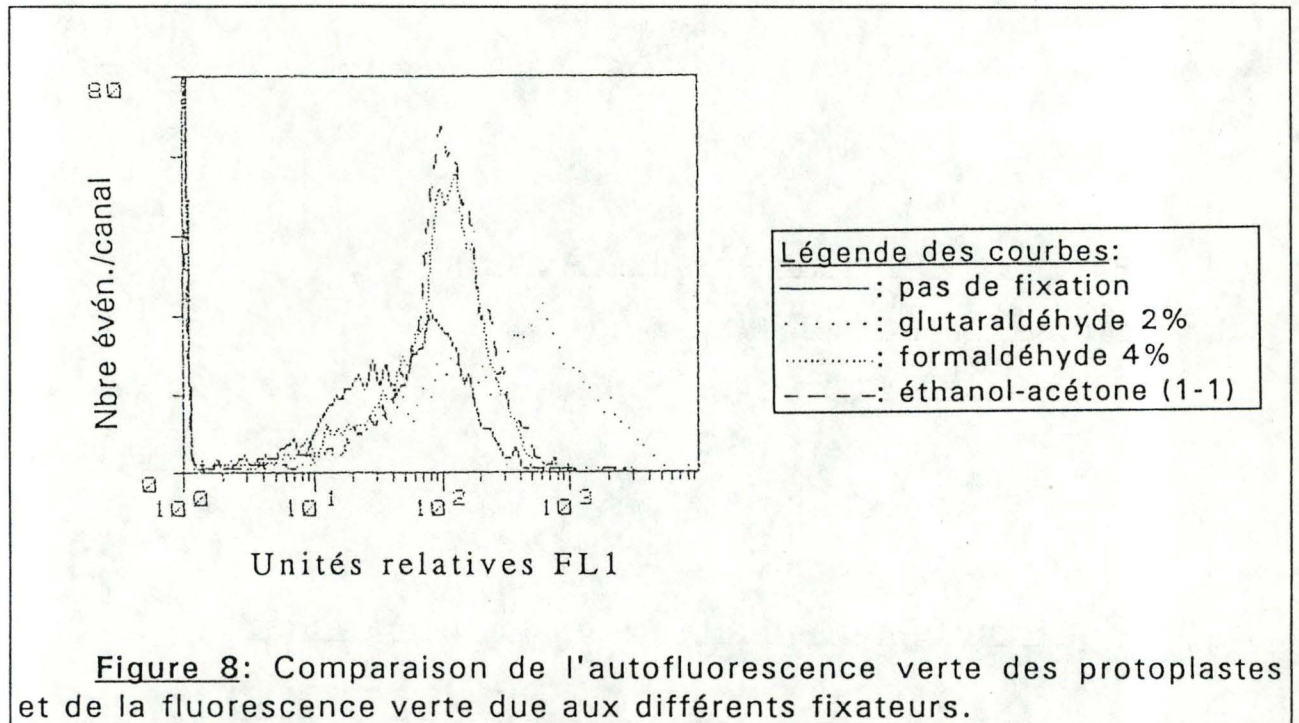
- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	150	500	----
AMP	1	Log	Log	----

- Fenêtre d'acquisition: OFF

### 3. Choix du fixateur

Sur le graphe suivant, nous avons superposé trois courbes résultant de traitements de fixation différents et une courbe représentant des protoplastes vivants.



**Figure 8:** Comparaison de l'autofluorescence verte des protoplastes et de la fluorescence verte due aux différents fixateurs.

L'allure de la courbe de fixation au glutaraldéhyde est similaire à celle des protoplastes non fixés, mais ce fixateur a pour inconvénient d'accroître la fluorescence verte de près de six fois. Quant aux deux autres fixateurs, l'allure de la courbe est un peu différente, mais l'autofluorescence n'est accrue que d'un facteur 1,2. Nous choisirons donc l'un de ces derniers. L'éthanol engendrant une plus grande perte de cellules et la formation d'amas (Taylor, 1980), nous avons retenu le formaldéhyde, conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La fluorescence naturelle est due à la présence de signaux intrinsèques aux protoplastes tels de la chlorophylle (pas dans notre cas puisqu'il s'agit de cellules issues de racines), des caroténoïdes, des nucléotides, des alcaloïdes, des composés phénoliques et d'autres produits secondaires (Brown, 1984).

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec la figure 9:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 60

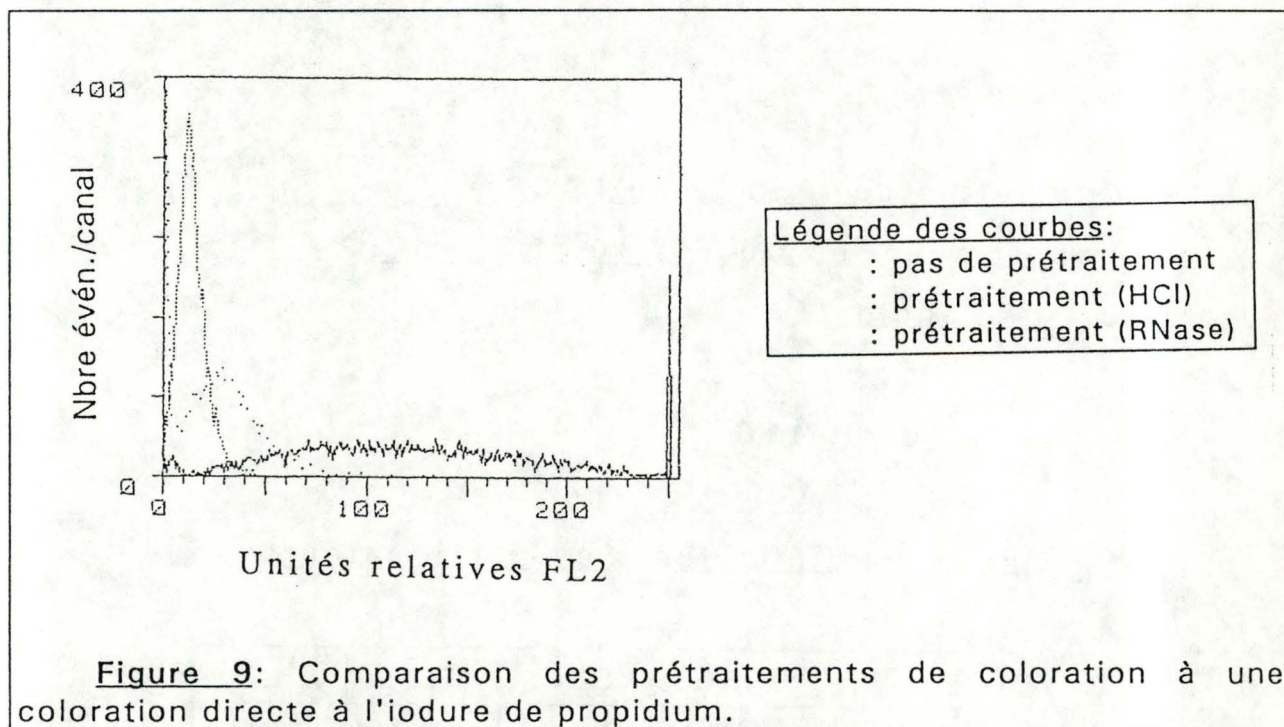
- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	180	----	460
AMP	1	Log	----	1

- Fenêtre d'acquisition: ON

## 4. Dégradation de l'ARN

L'iodure de propidium est un colorant de l'ADN dit intercalant, ce qui nécessite un prétraitement visant à dégrader l'ARN qui peut aussi fixer la coloration. Nous avons comparé (Fig.9) deux colorations avec prétraitements, l'HCl et la ribonucléase, et une coloration directe.



Les différences sont flagrantes. Nous avons une distribution gaussienne quel que soit le cas, mais les variances sont significativement distinctes: élevée s'il n'y a pas de prétraitement bien plus faible après traitement à l'HCl et plus faible encore par prétraitement à la ribonucléase. Nous avons donc retenu la digestion à la ribonucléase.

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec les figures 10, 11 et 13:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 116

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	217	515	775
AMP	4	Log	Log	1

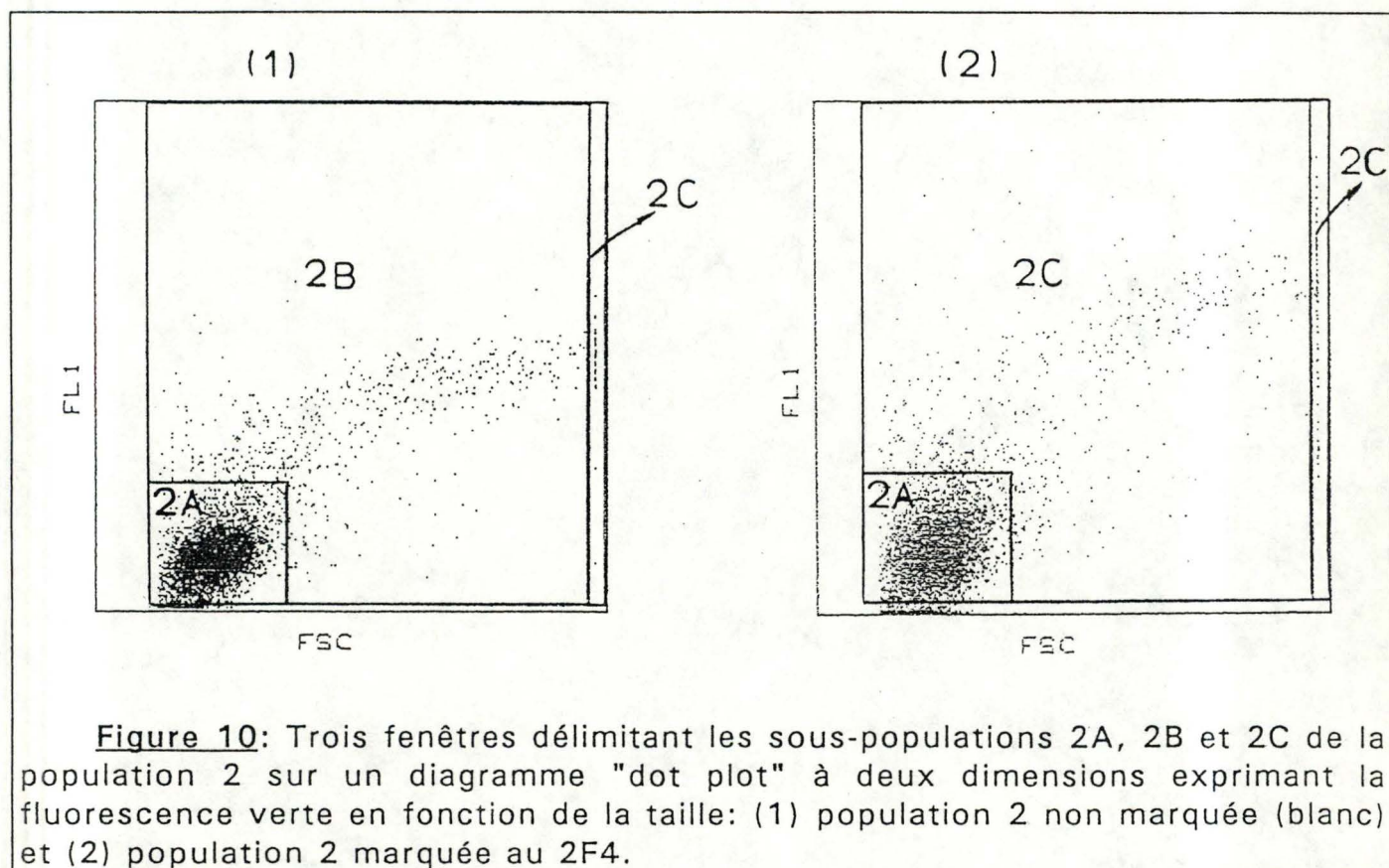
- Fenêtre d'acquisition: ON

## II. Régénération de la paroi

### 1. Définitions de trois sous-populations de la population 2

Il est rapidement apparu que la population 2 était formée de protoplastes dont une fraction non négligeable, quoique minoritaire, présentait des caractéristiques significativement différentes de la majorité des individus.

Sur base de la distribution, du pourcentage et de l'intensité du marquage, nous avons choisi de subdiviser cette population 2 en trois sous-populations: 2A, 2B et 2C. Voici les fenêtres d'analyse qui les délimitent:

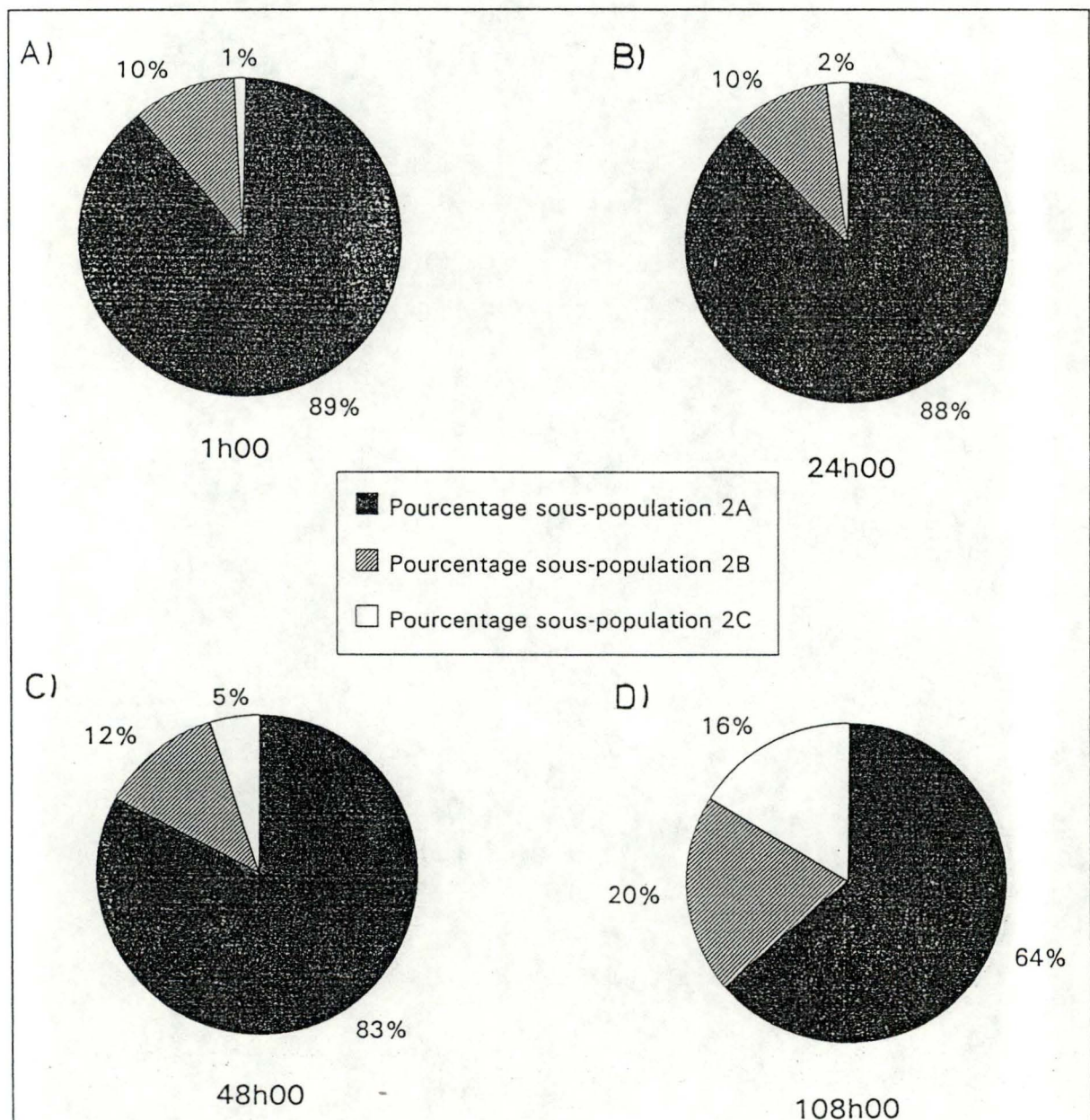


**Figure 10:** Trois fenêtres délimitant les sous-populations 2A, 2B et 2C de la population 2 sur un diagramme "dot plot" à deux dimensions exprimant la fluorescence verte en fonction de la taille: (1) population 2 non marquée (blanc) et (2) population 2 marquée au 2F4.

Nous observons une plus grande dispersion des sous-populations 2B et 2C suite au marquage par l'anticorps anti-pectine, ce qui confirme l'hétérogénéité des protoplastes étudiés.

### a) Evolution du pourcentage des sous-populations

Comme on peut le voir à la figure 10, ces trois sous-populations sont d'importance numérique très différentes. De plus, le pourcentage de chacune d'entre elles va évoluer au cours de la régénération. La sous-population 2A, qui est une population de protoplastes de taille et de fluorescence verte faibles, représente 89% des effectifs de la population 2 en début de régénération et passe à un effectif de 64% à quatre jours et demi. Quant aux populations 2B et 2C, elles voient, elles, leurs effectifs s'accroître: multipliés par un facteur 2 pour 2B (qui passe de 10% à 20%) et multipliés par 16 pour 2C (qui passe de 1% à 16%).



**Figure 11:** Evolution au cours de la régénération du pourcentage de chaque sous-population: a) une heure, b) un jour, c) deux jours et d) 4,5 jours de régénération. Pourcentages donnés par l'analyse cytométrique.

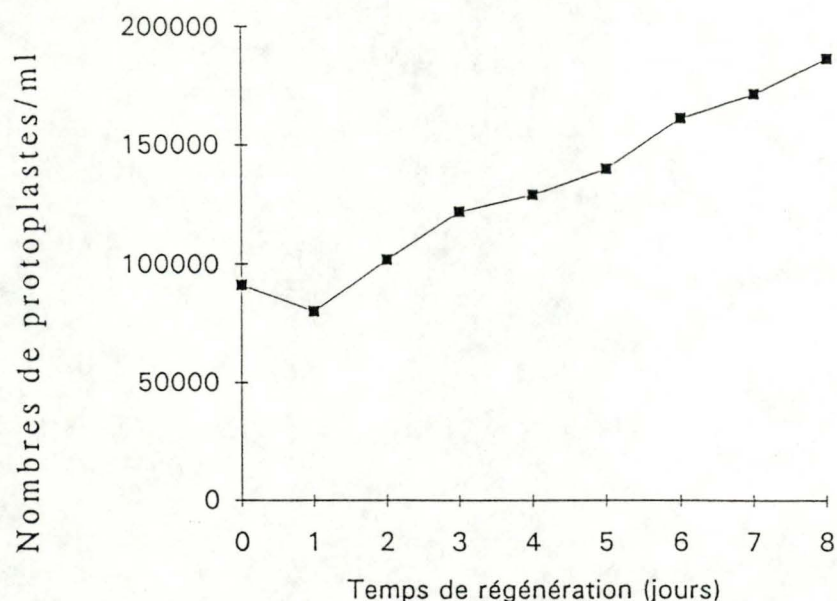
La distinction entre les sous-populations 2B et 2C est partiellement arbitraire et est limitée par la gamme de réponse du FACS à la diffraction aux petits angles. En effet, le système informatique adapté à l'analyse des objets traversant le laser globalise dans le dernier canal tout ce qui se situe dans ou au-delà de ce canal. L'emplacement exact de la barrière d'analyse qui délimite la sous-population 2C est donc partiellement arbitraire, et dépend des réglages des systèmes photomultiplicateur et amplificateur. La sous-population 2C a une distribution hétérogène du paramètre FSC qu'on vérifie en modifiant les paramètres d'acquisition.

Les protoplastes de la sous-population 2C qui voient leurs effectifs passer de 1 à 16% au cours du temps proviennent de la sous-population 2B qui, elle-même, du moins en partie, provient de 2A. Une telle augmentation numérique de la sous-population 2C ne peut provenir d'un simple phénomène de division mitotique des individus présents en début de régénération, car cela nécessiterait au minimum quatre divisions successives de tous les protoplastes en une centaine d'heures! Ce qui est nettement supérieur aux données de la littérature.

Nous rejetons aussi l'hypothèse qu'un accroissement apparent de 2B et de 2C serait la conséquence d'une mortalité nettement supérieure des protoplastes de 2A. Dans ce cas, l'augmentation de 2B et 2C serait un artéfact dû au fait que le FACS accumule les données à concurrence du nombre d'événements qu'on lui a imposé. Les arguments suivants plaident en faveur de notre interprétation:

(1):Le nombre de protoplastes augmente réellement au cours de la régénération (figure 12). Compte tenu de la mortalité de départ, la population de protoplastes double en  $\pm 6$  jours.

(2) La figure 12 met en évidence une certaine mortalité au cours des 24 premières heures: une perte de environ 10% de protoplastes de la population 2 globale. Si l'on se réfère à la figure 11 précédente, on constate que les proportions relatives de chacune des sous-populations sont, pour ainsi dire, maintenues entre le temps 1 heure et le temps 24 heures, intervalle de temps pendant lequel se manifeste justement une létalité importante. Si le taux de mortalité avait été supérieur dans l'une de ces sous-populations, ses effectifs auraient été proportionnellement plus faibles à 24 heures.



**Figure 12:** Evolution au cours de la régénération du nombre de protoplastes dans le milieu MS/PS. Les protoplastes ont été isolés à partir d'une culture de cellules synchronisée à l'aphidicoline. (Convention: sont comptabilisés comme unités distinctes des protoplastes en division).

A la figure 12, après quatre jours et demi, on a un effectif d'environ 130.000 protoplastes par millilitre alors qu'au départ la population 2 globale présentait un effectif de 90.000. Ce qui signifie un gain de 40.000 protoplastes. Comme nous le verrons plus tard, les cellules ont accompli, pendant cette période, seulement un cycle cellulaire complet. Autrement dit, 44% des protoplastes de la population 2 sont capables de régénération et de division.

Nous vérifierons ultérieurement que la sous-population 2A est composée, après quatre jours et demi de régénération, d'individus toujours isolés et sphériques, c'est-à-dire ne manifestant aucun signe de régénération et/ou de division. Or, si on regarde le pourcentage de la sous-population 2A, au temps 108 heures à la figure 11, il est de 64%, ce qui signifie 36% d'individus régénérants. Toutefois, ces 36% ne représentent pas la fraction de protoplastes régénérants, car les sous-populations 2B et 2C comprennent des sujets qui sont un ensemble de deux cellules-filles. Or, chacun de ces ensembles est comptabilisé comme une seule unité en cytométrie en flux. La contribution de tels sujets est donc sous-estimée par rapport à la population 2 globale. Ainsi, il faut considérer que les effectifs de la sous-population 2C, sous-population de protoplastes en division, tout comme 20% de la sous-population 2B (maximum de la courbe "% protoplastes en G2", voir figure 24 page 67) peuvent être doublés,

ce qui fait respectivement:  $2 \times 16\% = 32\%$  et  $20\% \times 20 \times 2 = 8\%$ . Le calcul du pourcentage d'individus régénérants (R) est donc le suivant:  $R = Y / (Y + 64)$  avec  $Y = (2 \times 16) + (20\% \times 20 \times 2) + (80\% \times 20)$ . De cette manière, R, le pourcentage de protoplastes régénérants est de 47%, ce qui coïncide relativement bien avec les 44% estimés ci-dessus au départ du comptage présenté à la figure 12.

### b) Intensité du marquage

L'anticorps anti-pectine se fixe en quantité plus ou moins grande selon que le protoplaste appartienne à la sous-population 2A, 2B ou 2C. Etant donné que celles-ci se distinguent notamment par le critère de taille, nous nous référons pour chaque sous-population à l'autofluorescence (le blanc) pour évaluer l'intensité du marquage.

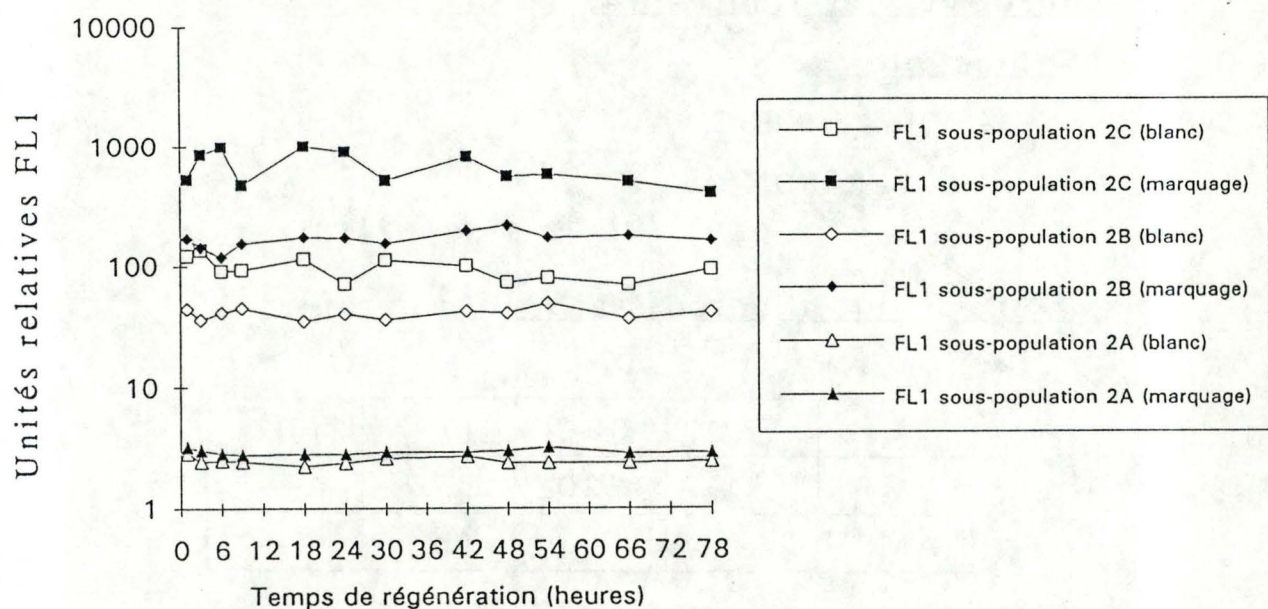


Figure 13: Evolution au cours de la régénération de la fluorescence verte pour chaque sous-population (comparaison à chaque fois du marquage au 2F4 et du blanc).

En établissant une moyenne globale des FL1 pour chaque courbe des sous-populations marquées et en la rapportant à la moyenne globale des FL1 non-marquées, on obtient une mesure de l'intensité du marquage au 2F4. Ainsi les sous-populations 2A, 2B et 2C sont respectivement 1.2, 4 et 6.5 fois plus fluorescentes que leurs contrôles lors du marquage au 2F4, ce qui met en évidence une aptitude distincte à sécréter la pectine selon la sous-population.

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec les figures 14, 15 et 16:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 50

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	220	520	----
AMP	2	Log	Log	----

- Fenêtre d'acquisition: ON

Meadows (1982/83) en observant la régénération de la paroi de protoplastes de *Zea mays* à l'aide de calcofluor white distingue également différentes sous-populations de protoplastes sur base de leur "quantité de paroi". Il en conclut qu'il existe une hétérogénéité des taux de synthèse de la paroi (Meadows, 1982/83). On peut suspecter, dans notre cas et au vu de la littérature, que cette hétérogénéité se manifeste aussi bien pour la cellulose et la chitine que pour la pectine.

## 2. Régénération sur cellules non-synchronisées

### a) Evolution des différents paramètres

Nous envisagerons l'évolution des différents paramètres (FSC, SSC et FL1), au cours de la régénération, sous-population par sous-population. Nous allons suivre cette évolution en deux temps, tout d'abord sur une période de 24 heures, ensuite pour les temps ultérieurs qui sont repris sur les mêmes graphes, mais avec une échelle d'abscisse différente.

#### a.1. Evolution de FL1

L'observation de FL1 concerne bien évidemment les sous-populations marquées au 2F4:

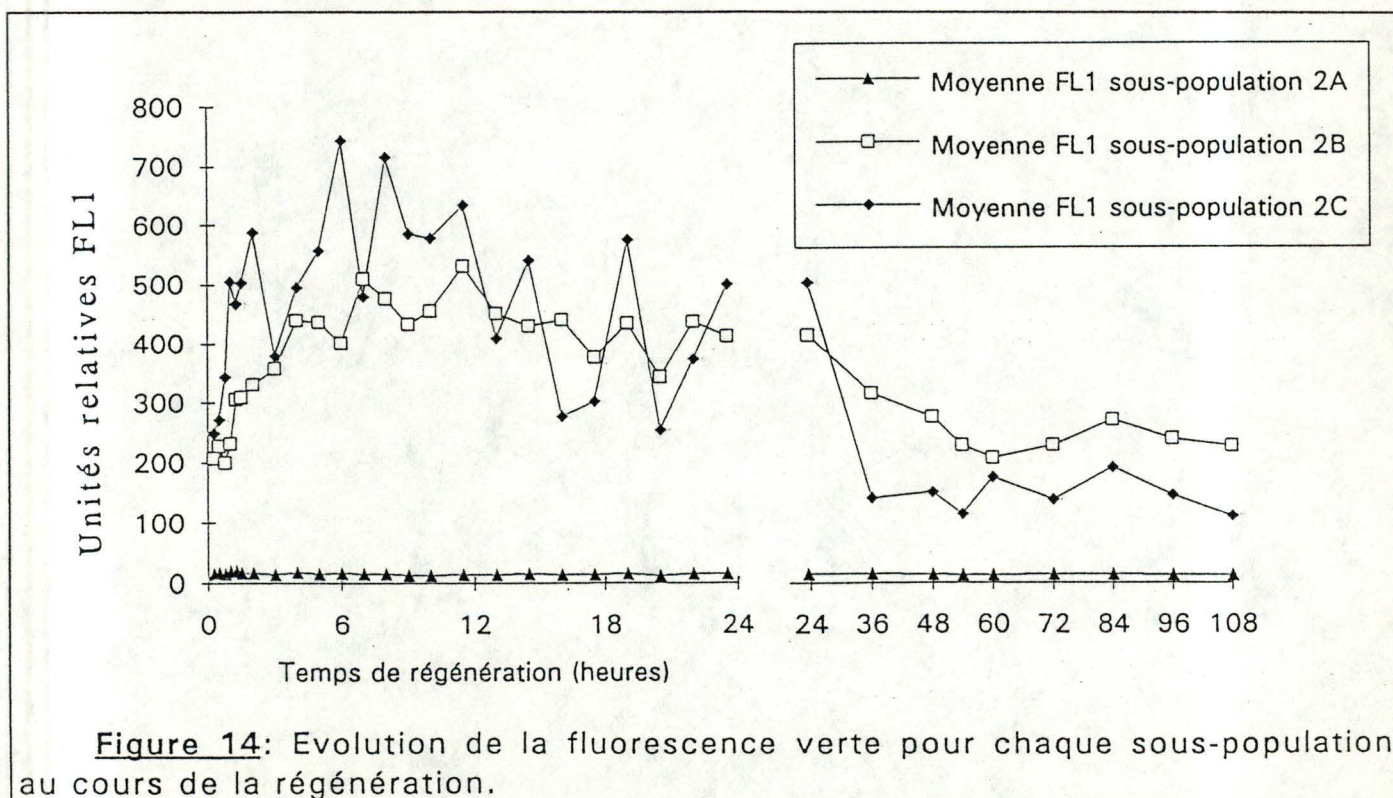


Figure 14: Evolution de la fluorescence verte pour chaque sous-population au cours de la régénération.

Nous ne constatons aucune évolution marquante de la fluorescence verte pour la sous-population 2A, alors que les deux autres sous-populations, 2B et 2C, suivent une progression similaire quoiqu'hétérogène, où l'on peut distinguer trois phases successives:

- (1) une phase d'accroissement durant les quelques premières heures (environ 5 à 6 heures).
- (2) une phase de stabilisation pendant quelques heures encore.
- (3) une diminution de la fluorescence verte à partir de  $\pm 24$  heures.

Comment expliquer pareille évolution? L'accumulation de pectine (pectine acide) autour de la paroi s'effectue dès la mise en culture des protoplastes dans le milieu MS/PS, puisque, les deux premiers points de chaque courbe sont les temps 15 et 30 minutes. L'accroissement du marquage au cours des quelques premières heures peut signifier soit réellement une accumulation continue de pectine, soit la participation des enzymes qui déestérifient la pectine estérifiée (pectine méthylestérases). Il est possible que ce deuxième mécanisme entre en jeu simultanément, pour autant que de la pectine méthylestérifiée soit déposée dans la paroi.

La période de stabilisation ne reflète pas nécessairement un arrêt de la synthèse de pectine ou de la régénération de la paroi, car les anticorps, autorisant uniquement un marquage en surface (la paroi n'a pas été perméabilisée par un traitement enzymatique), ne permet pas la reconnaissance de la pectine qui serait éventuellement déposée dans les couches internes.

Quant à la décroissance de la fluorescence verte ensuite, nous pouvons émettre deux hypothèses: soit un masquage de la pectine par d'autres composants pariétaux (ce processus pourrait déjà être entamé lors de la deuxième phase et expliquer de la sorte aussi la stabilisation), soit un relargage de pectine dans le milieu extracellulaire. Cet affaiblissement de la fluorescence est considérable puisqu'il rejoint le niveau FL1 du début de régénération.

#### a.2. Evolution de FSC

Nous ne reprenons pas ici la sous-population 2C, puisque nous avons sélectionné uniquement les quelques derniers canaux FSC sur le "dot-plot" pour délimiter la fenêtre 2C, ce qui nous empêche de suivre une évolution éventuelle de la taille.

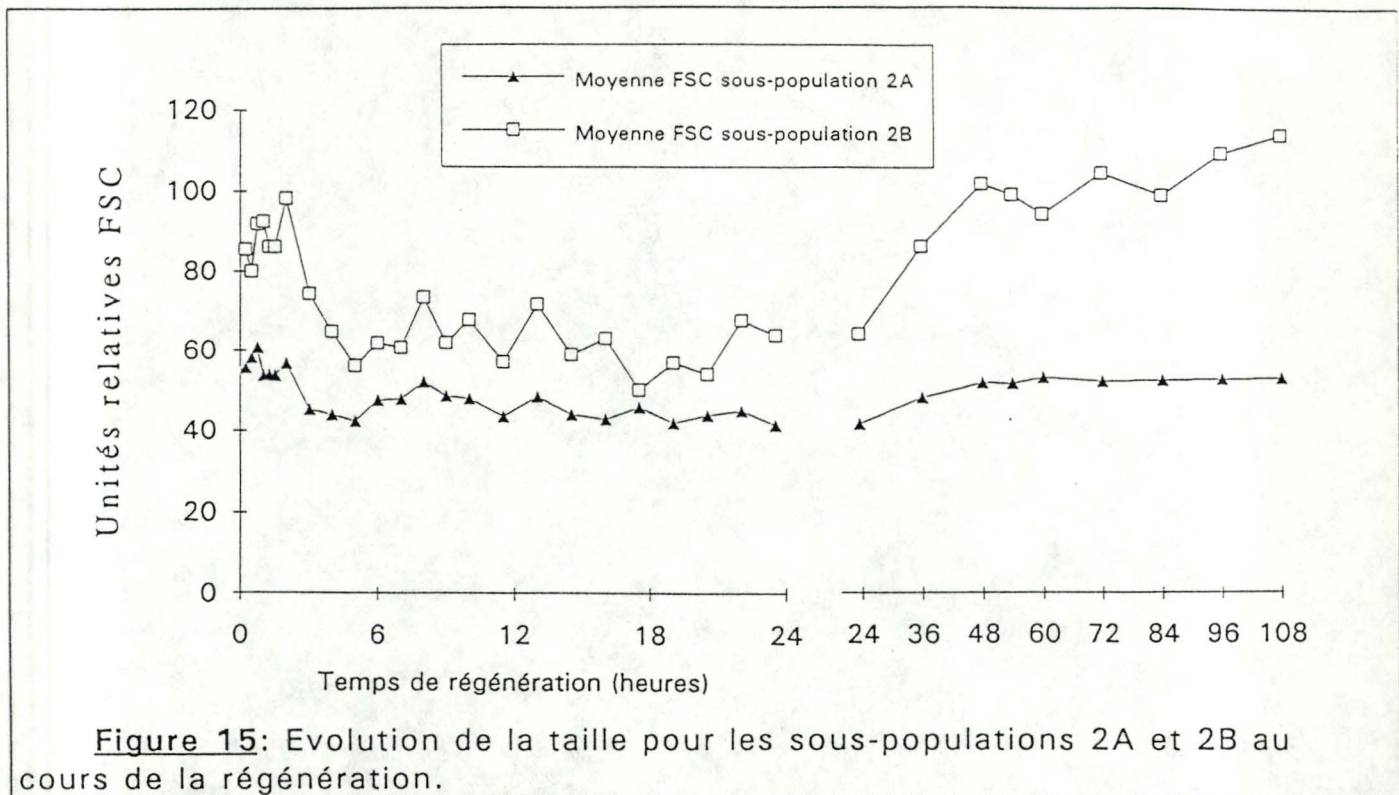


Figure 15: Evolution de la taille pour les sous-populations 2A et 2B au cours de la régénération.

Nous pouvons distinguer les trois mêmes intervalles de temps que pour l'analyse de la fluorescence verte. De 2 heures à 6 heures, nous assistons à une diminution du FSC. Il n'y a à priori, aucune raison pour que la taille d'un protoplaste diminue, c'est pourquoi il faut envisager une autre interprétation, d'autant plus que le FSC n'est pas, à proprement parler, une mesure de la taille. Rappelons qu'il n'y a corrélation entre ces deux paramètres que pour des objets sphériques. Cette période pourrait correspondre à l'apparition d'une asymétrie cellulaire, peut-être à une élongation du protoplaste. Toutefois, des modifications de la membrane plasmique, de la paroi ou de la structure interne de la cellule peuvent également affecter la mesure du forward scatter.

La période suivante, tout comme pour le paramètre FL1, est une période de stabilisation. A cette période succède une étape d'augmentation du paramètre FSC. Par manque d'information sur le cycle cellulaire et les protoplastes analysés étant asynchrones, nous ne pouvons guère interpréter cette observation autrement qu'en postulant un accroissement du volume cellulaire dû à des protoplastes (cellules) en division, voire déjà à des cellules filles accolées résultant de la division.

## a.3. Evolution de SSC

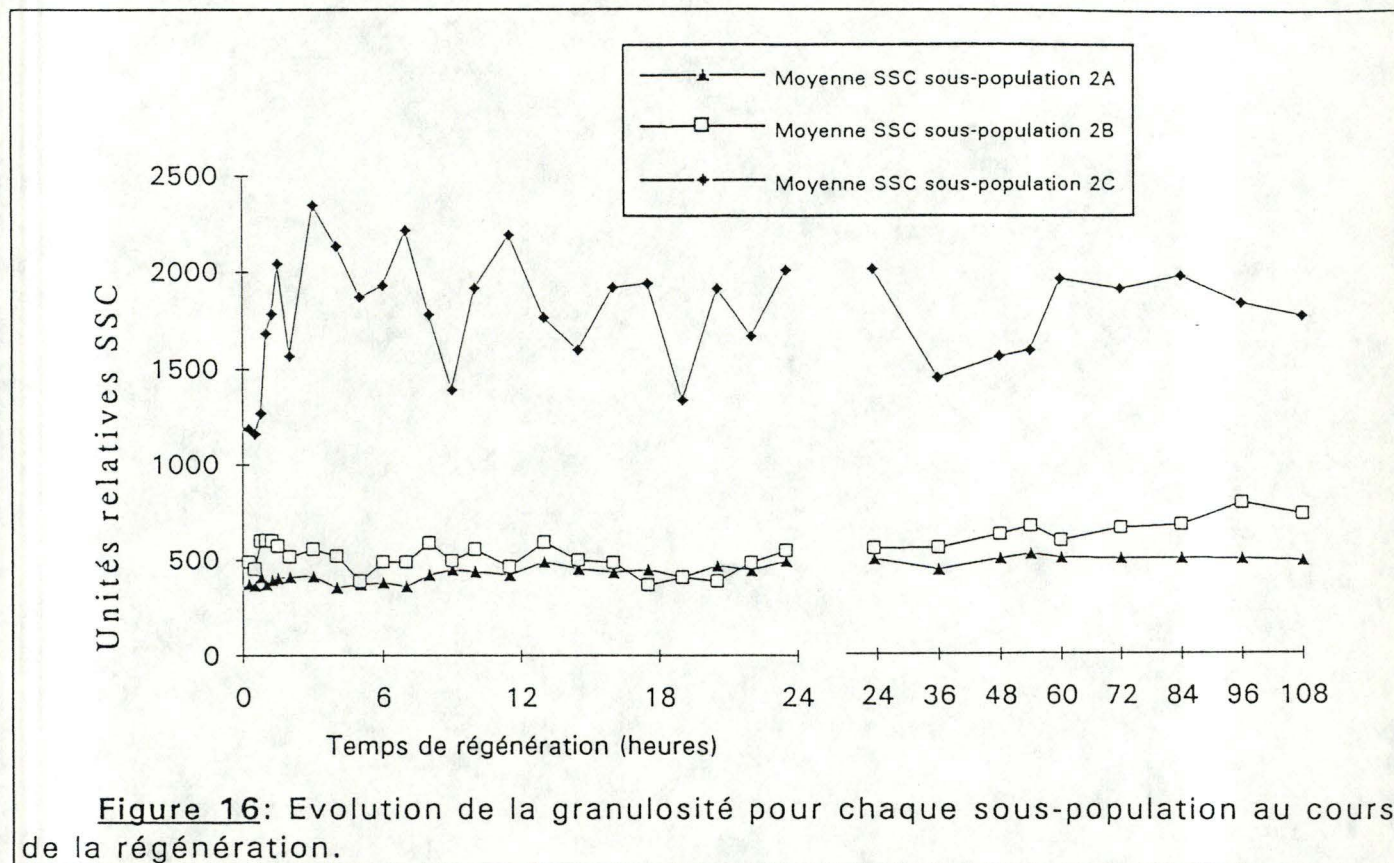


Figure 16: Evolution de la granulosité pour chaque sous-population au cours de la régénération.

Contrairement aux deux paramètres précédents, nous ne distinguons plus, ici, pour le side scatter, une évolution en trois phases. Le SSC semble évoluer selon une tendance générale à la hausse. Cela s'admet aisément puisque le SSC est une mesure de la granulosité; on entend par là, par exemple, l'aspect lisse ou rugueux des membranes et parois, la teneur en organites... Un protoplaste qui régénère, autrement dit, qui est en activité de synthèse intensive, devrait accroître cette granulosité: développement du système d'endomembrane, dépôt d'une paroi... Il y a également doublement de la teneur en organites s'il est en division ou s'il s'agit de deux cellules-filles analysées simultanément.

La sous-population 2C semble cependant faire exception à ce type de progression: après avoir subi une augmentation pendant les deux premières heures, elle se stabilise définitivement. Rappelons que cette sous-population est constituée presque exclusivement de protoplastes régénérants et donc susceptibles de se diviser. La stabilisation en SSC d'une telle population se conçoit: les protoplastes que nous y mesurons ont "transité" au préalable dans la fenêtre 2B et ont par conséquent déjà subi les modifications de taille et de granulosité en rapport à cette dernière.

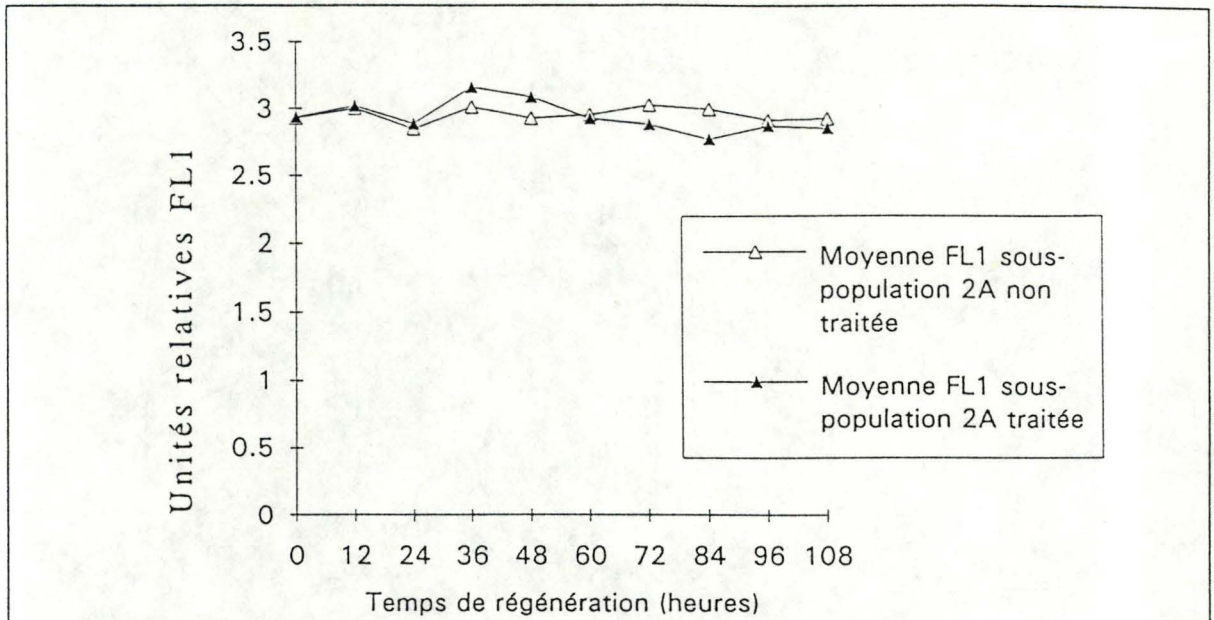
La sous-population 2C est probablement, dès le début de la régénération (les deux premières heures), constituée de protoplastes qui sont aptes à se diviser. La permanence des paramètres peut s'expliquer par le fait que des protoplastes en division et deux cellules filles rattachées par leur paroi mitoyenne engendrent des réponses très similaires à l'analyse. Les divisions ultérieures de ces dernières conduisant à des unités de quatre cellules et davantage sont probablement éliminées par filtration (80  $\mu\text{m}$ ) juste avant l'analyse et n'ont pas ainsi la possibilité de se manifester dans la fenêtre 2C, auquel cas nous assisterions également à un accroissement du side scatter.

En définitive, on observe une évolution des différents paramètres au cours de la régénération. Pendant les quelques premières heures, le protoplaste, tout en excréant de la pectine, s'allongerait. Une période de stabilité relative de chacun des paramètres se maintient quelques heures encore, à laquelle succède une période de réelle évolution, s'échelonnant sur plusieurs jours. Cette période présente des signes de division des protoplastes: accroissement de la granulosité et de la taille.

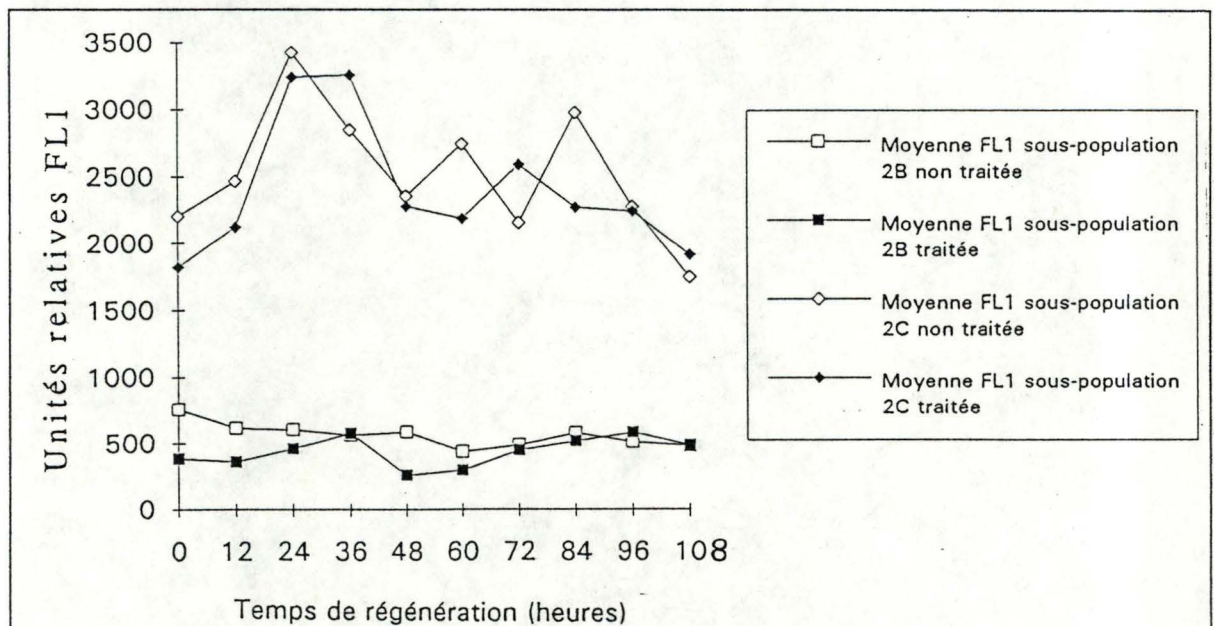
#### b) Pectine déestérifiée

La littérature signale que la pectine nouvellement synthétisée est essentiellement estérifiée (Varner, 1989). Etant donné que le 2F4 ne reconnaît qu'une conformation de la pectine acide, nous avons dédoublé chaque échantillon afin de les déestérifier au NaOH et ainsi permettre une reconnaissance par l'anticorps de toutes les séquences homopolylacturoniques potentielles. Le marquage des protoplastes déestérifiés devrait être supérieur ou égal au marquage des échantillons non traités.

Les figures 17 et 18 établissent une comparaison entre les échantillons traités au NaOH et non traités pour chacune des sous-populations.



**Figure 17:** Evolution au cours de la régénération de la fluorescence verte de la sous-population A: comparaison de la pectine non traitée et de pectine déestérifiée au NaOH.



**Figure 18:** Evolution au cours de la régénération de la fluorescence verte pour les sous-populations B et C: comparaison de la pectine non-traitée et de la pectine déestérifiée au NaOH.

Compte tenu de la variance des mesures, il n'est pas possible d'observer un effet notable de la déestérification, il serait toutefois intéressant de contrôler ces résultats par un traitement enzymatique à la pectine méthyl-estérase, plus spécifique et moins drastique que la soude caustique.

Vraisemblablement les protoplastes ne possèdent pas ou du moins pas beaucoup de pectine estérifiée: ils constitueraient ainsi un modèle totalement différent des cellules méristématiques. En effet, des études de la biosynthèse de la paroi en microscopie électronique (Liners, résultats non publiés) ont montré qu'il est impossible de marquer au 2F4 les parois de cellules méristématiques sans traitement de déestérification préalable. Les protoplastes ne sont donc pas des modèles de cellules végétales méristématiques en voie de différenciation.

### c) Test Elisa

Nous croyions, dans un premier temps, pouvoir révéler de la pectine extracellulaire libérée par les protoplastes en régénération, grâce au test Elisa. Les marquages du milieu de régénération des protoplastes étant en effet plus importants que les blancs (marquages en absence d'anticorps primaire). Quantitativement, cependant, aucune modification n'a pu être observée selon le temps de régénération.

Le test s'est révélé insatisfaisant lorsqu'un autre contrôle fut effectué. Il consistait à remplacer le mélange antigénique, le milieu de régénération des protoplastes, par du M.S./P.S. seul, ce qui donnait alors un marquage d'intensité similaire aux échantillons testés.

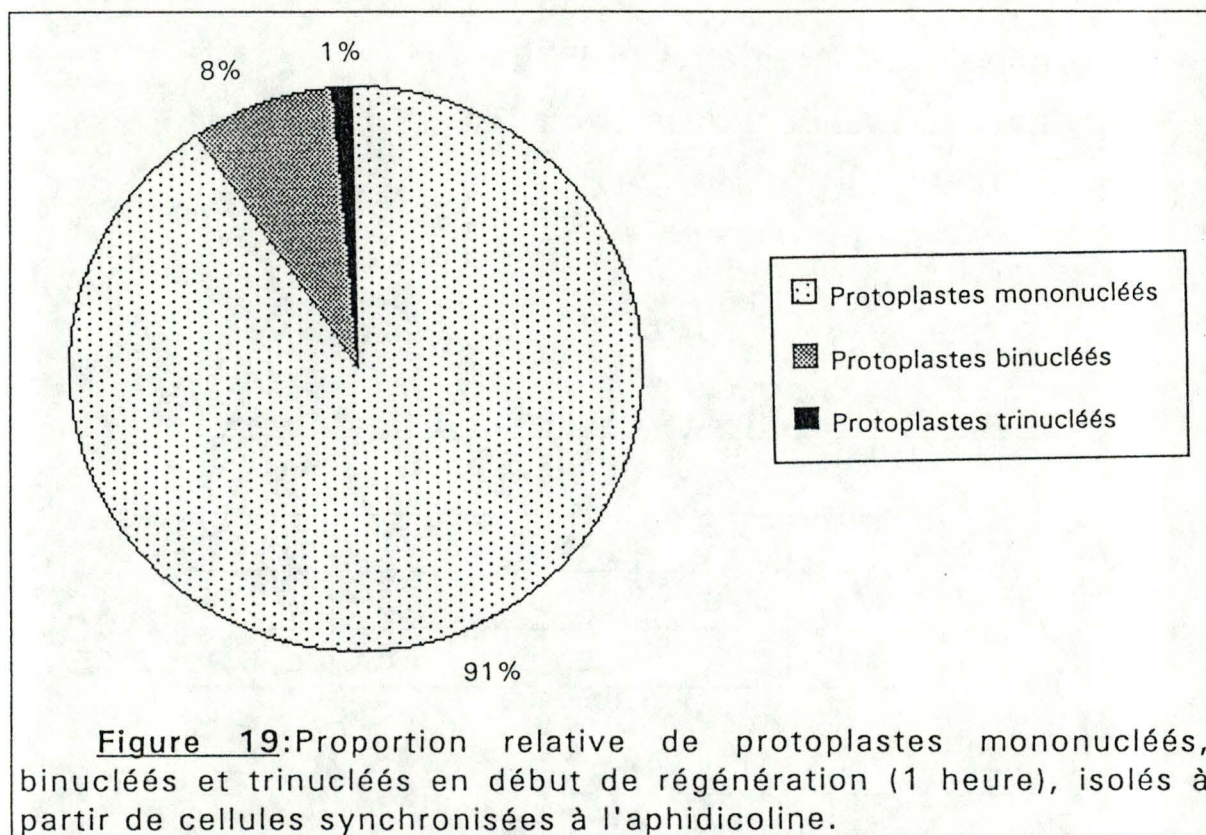
Nous déduisons de ces résultats une défaillance au niveau du prélèvement de l'antigène. Celui-ci ne subit aucune purification, l'analyse se faisant directement dans le MS/PS. Le milieu de régénération ne se trouve en effet pas dans les conditions ioniques optimales pour la reconnaissance antigène-anticorps qui rappelons-le sont: Tris 20 mM-  $\text{CaCl}_2$  1 mM- NaCl 150 mM.

### 3. Régénération sur cellules synchronisées

L'objectif visé en utilisant des cellules synchronisées est de mettre, éventuellement, une phase d'évolution des paramètres FSC, SSC et FL1 en corrélation avec une phase du cycle cellulaire.

#### a) Nombre de noyaux par protoplaste

Etant donné l'existence de fusions spontanées, dans le mélange enzymatique, nous avons mesuré, après digestion, le nombre de noyaux par protoplaste.



Nous constatons une contamination de 8% des protoplastes par des binucléés. Nous pouvons parler de contamination car ceux-ci vont donner un signal de fluorescence rouge équivalent à des protoplastes mononucléés en G<sub>2</sub> si les deux noyaux sont en G<sub>1</sub>. La culture étant synchronisée, nous éliminons de facto les signaux que donneraient deux noyaux asynchrones d'un protoplaste binucléé. L'analyse de la fluorescence rouge (FL2) sera ainsi le reflet des protoplastes mononucléés puisqu'ils représentent 91% des événements.

Paramètres de réglage du FACS en rapport avec les figures 20 à 25:

- Treshold:

- Trigger: FSC
- Level: 116

- Photomultiplicateurs et amplificateurs:

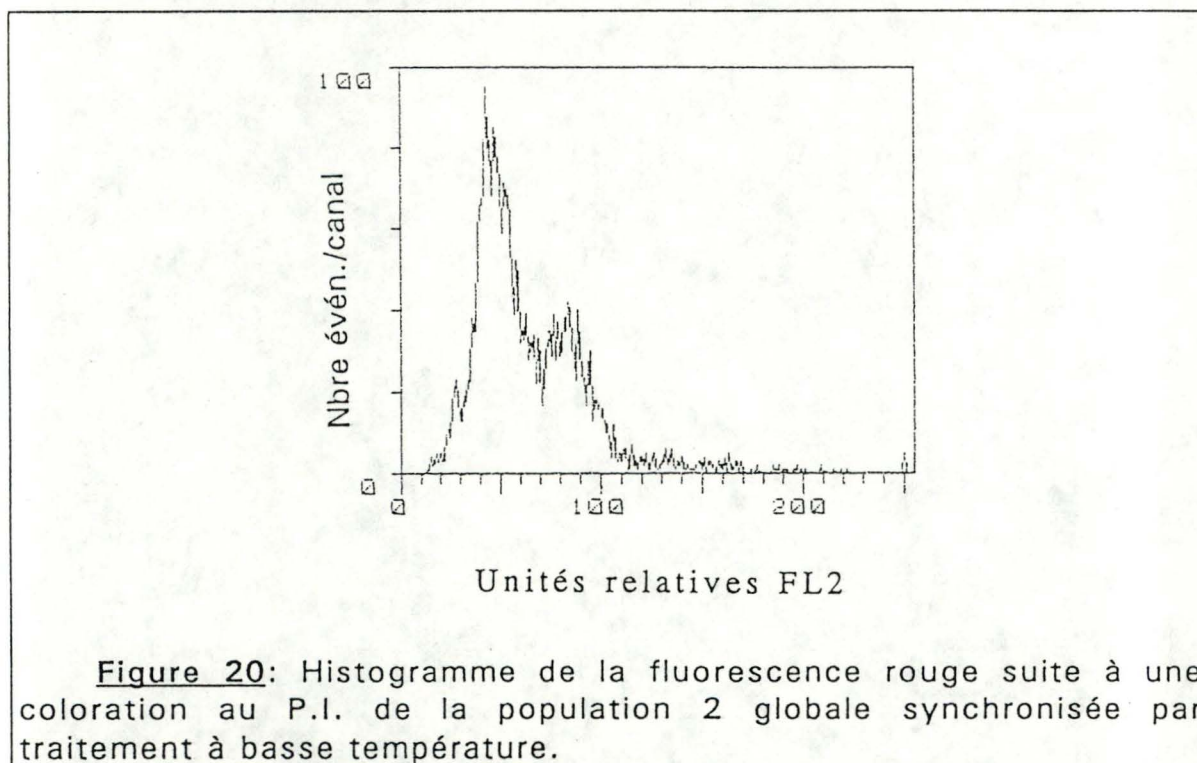
	FSC	SSC	FL1	FL2
PMT	0	217	515	775
AMP	4	Log	Log	1

- Fenêtre d'acquisition: ON

## b) Traitement de synchronisation

Nous observerons ici, l'efficacité des deux traitements de synchronisation sur la population 2 globale à sa sortie du mélange enzymatique, ce qui fait environ 7 heures après traitement de synchronisation (c'est-à-dire après retrait du frigo ou de l'aphidicoline).

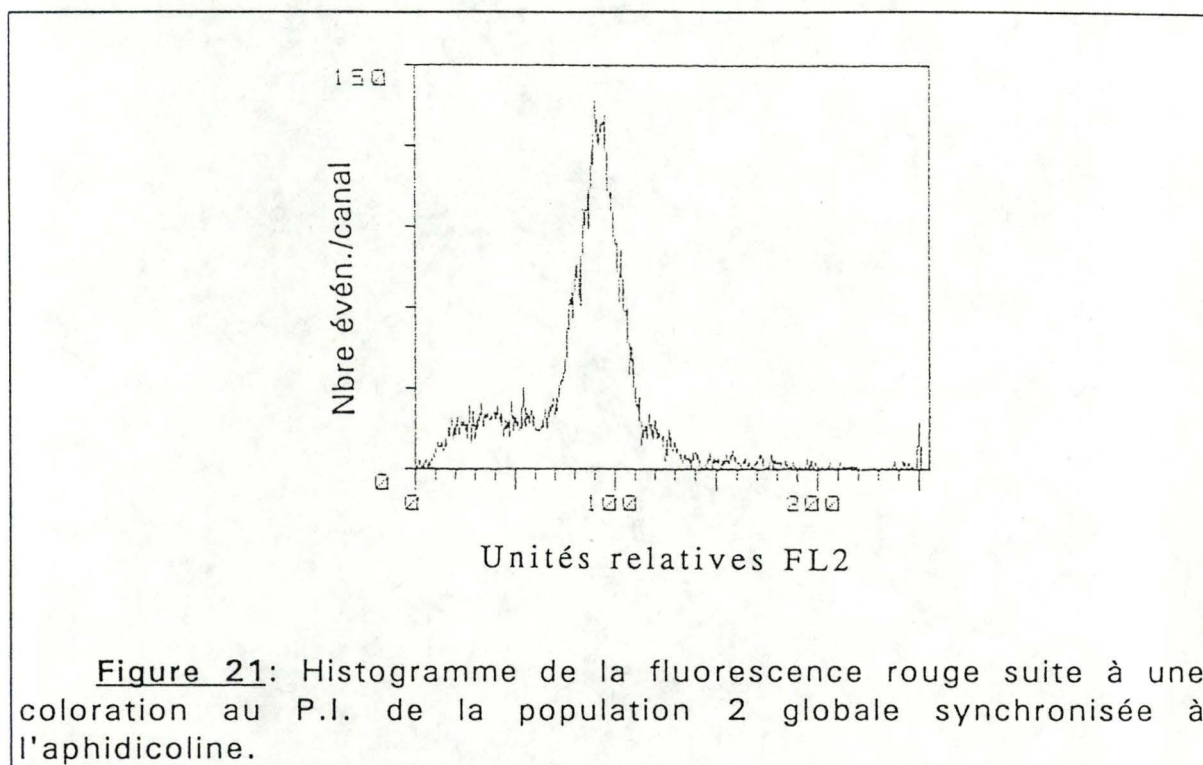
### b.1. Synchronisation par traitement à basse température



**Figure 20:** Histogramme de la fluorescence rouge suite à une coloration au P.I. de la population 2 globale synchronisée par traitement à basse température.

Nous distinguons clairement deux pics dont l'un se situe environ au double de l'autre sur l'échelle linéaire FL2. Le premier pic correspond à des protoplastes mononucléés en G<sub>1</sub>, et le second à des protoplastes mononucléés en G<sub>2</sub> (hormis une contamination éventuelle par des binucléés). Si l'on place des marqueurs à mi-hauteur de chacun des pics, nous pouvons estimer approximativement le pourcentage de protoplastes représentant ces pics. De cette manière, on estime qu'environ 47% des protoplastes sont en G<sub>1</sub> contre 22% en G<sub>2</sub>. Les quelques 30% restants se partagent entre la phase S et les signaux FL2 émis suite à la présence de protoplastes polynucléés. Cette démarche sous-estime partiellement l'importance numérique des phases G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>, mais évite de comptabiliser des protoplastes qui sont en phase S.

## b.2. Synchronisation par l'aphidicoline



**Figure 21:** Histogramme de la fluorescence rouge suite à une coloration au P.I. de la population 2 globale synchronisée à l'aphidicoline.

De manière analogue, on estime, ici, qu'environ 16% des protoplastes de la population 2 sont en G<sub>1</sub> contre minimum 57% en G<sub>2</sub>, sept heures après retrait de l'aphidicoline.

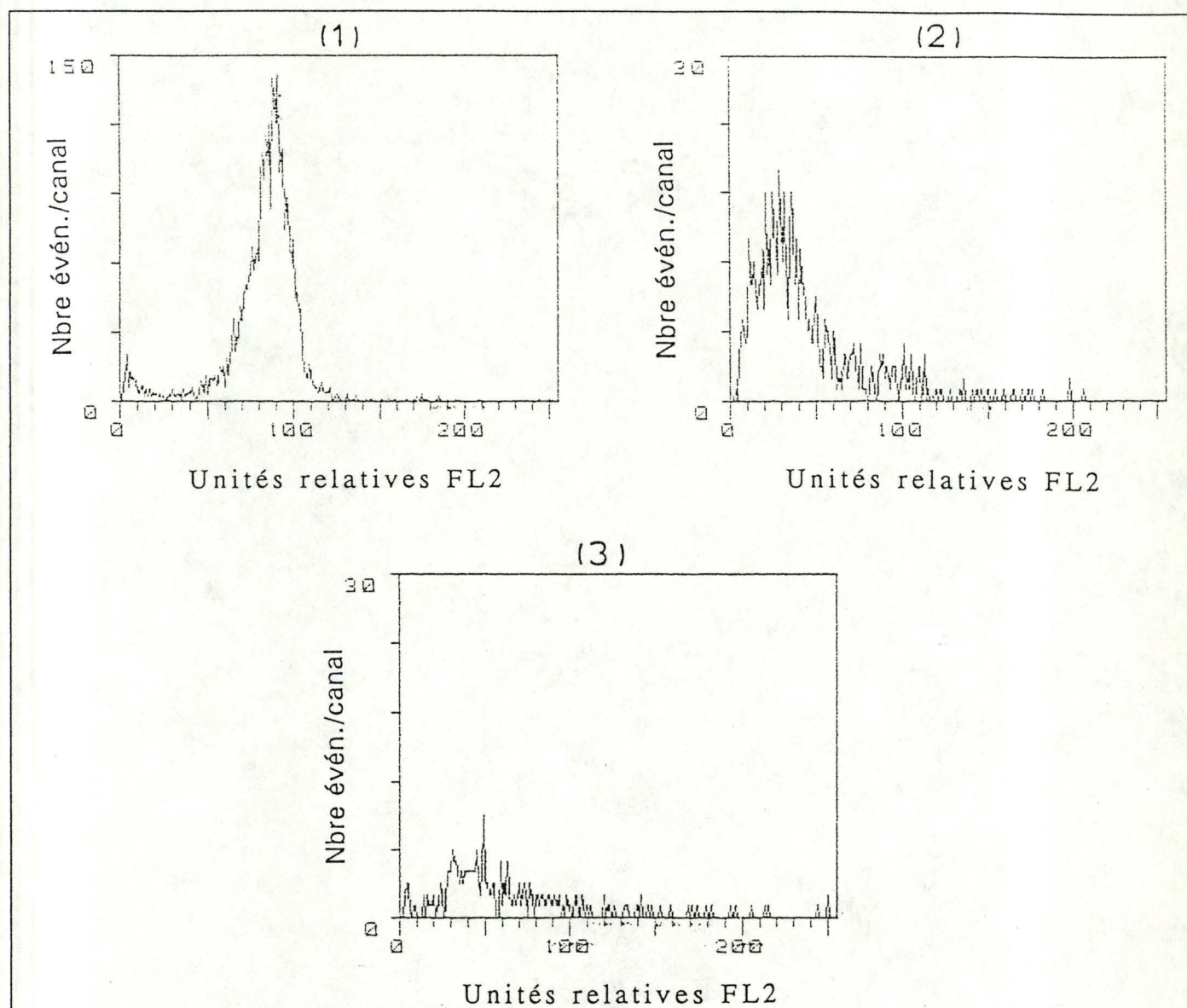
Nous déduisons, de ces deux histogrammes, une meilleure synchronisation suite au traitement à l'aphidicoline. Vu les avantages de cette molécule, nous retenons ce moyen de synchronisation.

Ni dans un cas ni dans l'autre, nous n'obtenons de pics de fluorescence étroits. Ce comportement est inhérent au matériel (les protoplastes) sur lequel nous analysons le cycle cellulaire. Outre les perturbations dues à l'opacité des parois, aux inclusions et chromophores naturels, l'iodure de propidium se fixe, de manière non spécifique, sur les polysaccharides pariétaux.

## c) Cycle cellulaire et sous-populations

Nous allons apprécier, une fois de plus, pour ce genre d'analyse, l'importance d'avoir subdivisé la population 2 en trois sous-populations. Une analyse globale de la fluorescence rouge de la population 2 amenuise le nombre de renseignements concernant le cycle cellulaire.

Les sous-populations 2A, 2B et 2C se situent, en fait, dans des phases du cycle différentes, comme on peut le voir à la figure suivante:



**Figure 22:** Histogramme de la fluorescence rouge suite à une coloration au P.I., sept heures après retrait de l'aphidicoline: (1) pour la sous-population 2A, (2) pour la sous-population 2B et (3) pour la sous-population 2C.

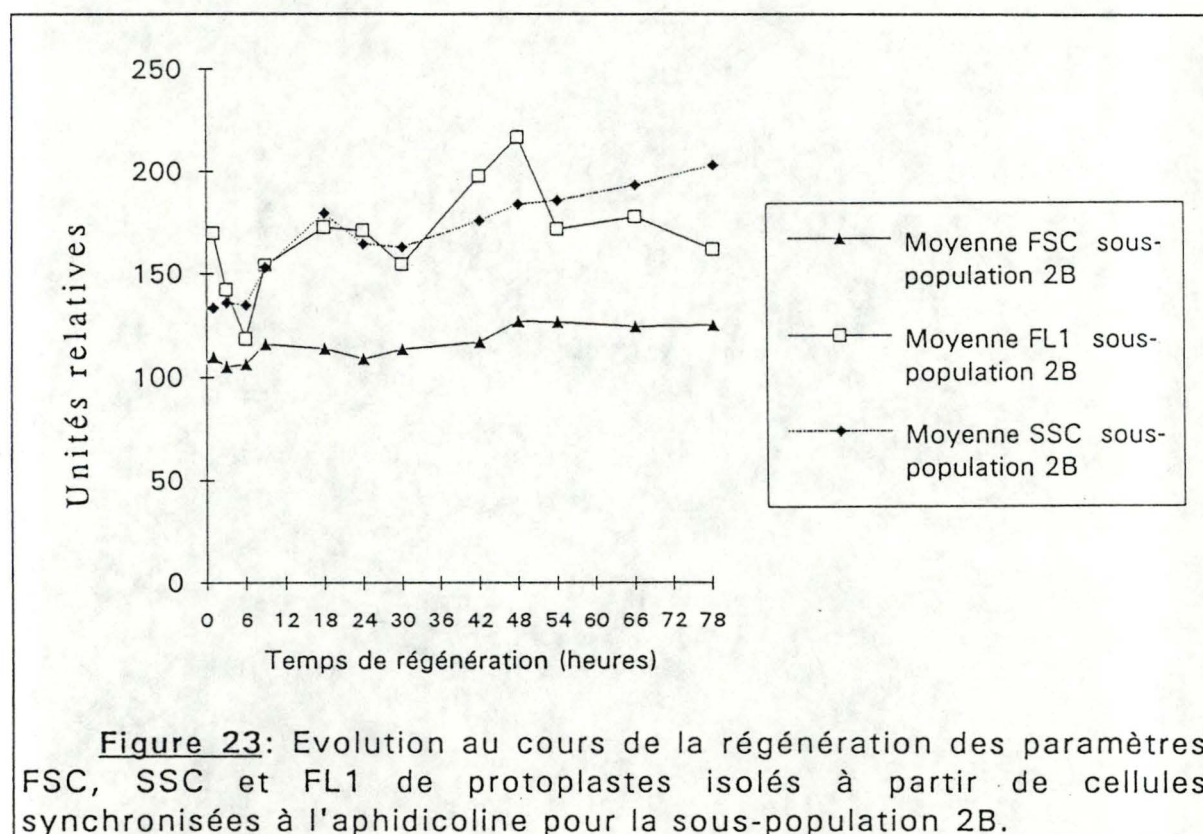
La quasi totalité de la sous-population 2A semble être en G2, alors que la majorité de 2B se situe en G1. Quant à la sous-population 2C, compte tenu du faible nombre d'évènements (rappelons que cette sous-population présente un effectif de 0,9% en début de régénération), nous ne pouvons distinguer rien de bien significatif. On voit seulement que cette sous-population semble distribuée de manière beaucoup plus hétérogène en ce qui concerne le cycle cellulaire.

#### d) Evolution des paramètres et cycle cellulaire

Nous l'avons vu, que ce soit pour les protoplastes issus de culture de cellules synchronisées ou non, la sous-population 2B est une sous-population de protoplastes qui régénèrent. C'est pourquoi, nous prendrons cette dernière pour modèle afin d'établir une corrélation entre la régénération et le cycle cellulaire.

##### d.1. Evolution des paramètres

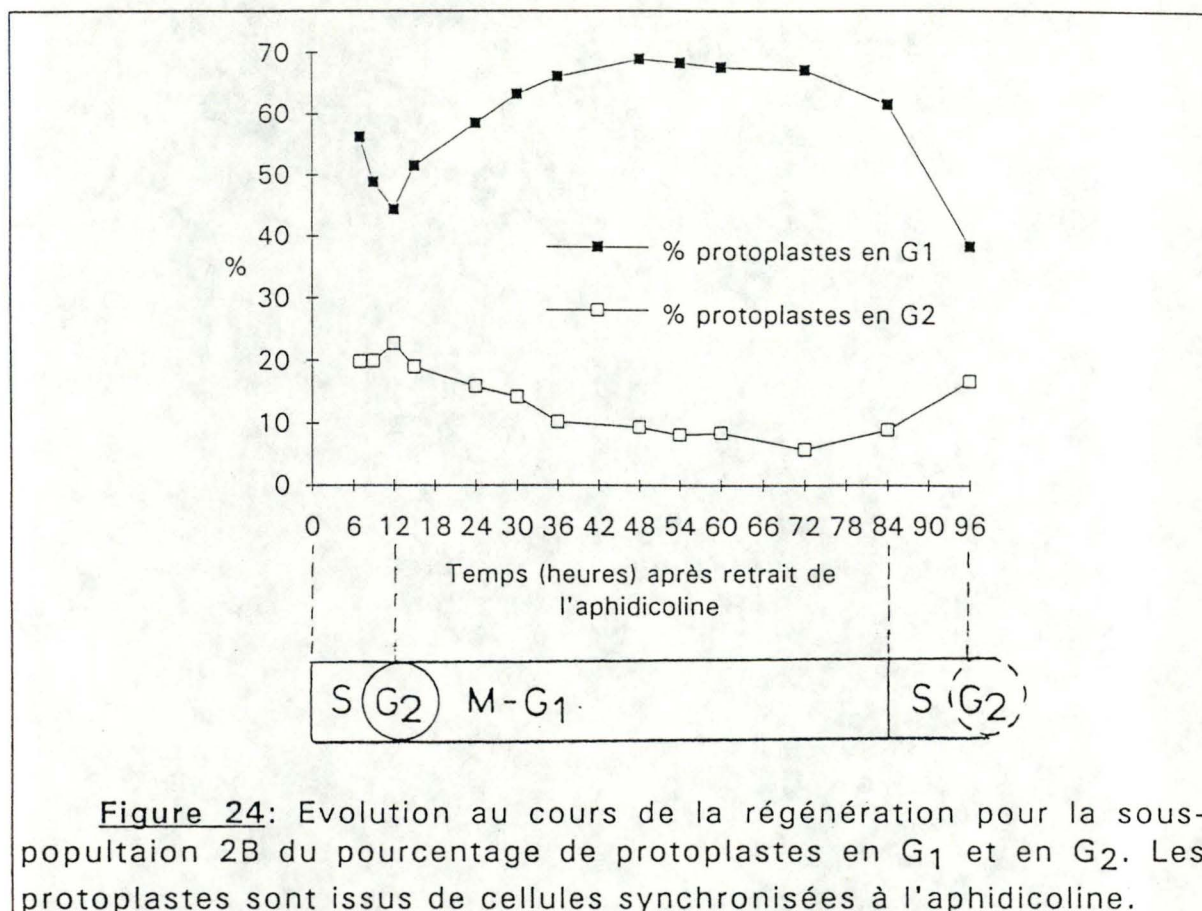
Les observations concernant l'évolution des différents paramètres (FSC, SSC et FL1) sont comparables à celles que nous avons pour les protoplastes issus d'une culture non-synchronisée.



**Figure 23:** Evolution au cours de la régénération des paramètres FSC, SSC et FL1 de protoplastes isolés à partir de cellules synchronisées à l'aphidicoline pour la sous-population 2B.

##### d.2. Evolution du cycle cellulaire

Afin d'estimer le nombre de protoplastes en G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> pour la sous-population 2B, nous adoptons la même stratégie que précédemment, à savoir: des marqueurs placés à mi-hauteur de chacun des deux pics. Etant donné que les coefficients de variation des pics sont élevés:  $\pm 30$  pour le premier et  $\pm 15$  pour le second, nous pouvons difficilement situer la phase S intermédiaire. Nous nous contenterons donc de suivre l'évolution du cycle cellulaire au travers de l'augmentation ou de la diminution du nombre de protoplastes en phase G<sub>1</sub> ou en phase G<sub>2</sub>.



**Figure 24:** Evolution au cours de la régénération pour la sous-population 2B du pourcentage de protoplastes en G<sub>1</sub> et en G<sub>2</sub>. Les protoplastes sont issus de cellules synchronisées à l'aphidicoline.

On observe une bonne symétrie des deux courbes. Le nombre de protoplastes en G<sub>1</sub> augmente quand celui de G<sub>2</sub> diminue et vice-versa. Ceci reflète l'évolution d'une population synchronisée.

Six heures après le retrait des enzymes, c'est-à-dire douze heures après le retrait de l'aphidicoline, nous atteignons un minimum dans le cas de la courbe de pourcentage de G<sub>1</sub> et un maximum pour l'autre courbe. Nous en déduisons que le phénomène se déroulant en-deçà de 6 heures de régénération (c'est-à-dire 12 heures après retrait de l'aphidicoline) est la phase S. Ceci coïncide avec le modèle théorique. L'aphidicoline a bloqué les cellules à la frontière des phases G<sub>1</sub>/S et dès son retrait, les cellules sont entrées, de manière synchrone, en phase S. D'après notre graphe, la durée de cette phase est estimée à environ 12 heures.

Bayliss (1975) mesure une durée d'environ 4 heures pour la phase S sur cellules diploïdes de racine de carotte en suspension et de environ 2 heures pour les tétraploïdes. Notre estimation, beaucoup plus élevée, serait à attribuer aux traitements supplémentaires de synchronisation et de digestion enzymatique que subissent nos cellules: contrairement à Bayliss, nous travaillons sur protoplastes.

Au terme de ces douze heures de phase S, qui se traduisent par une diminution du pourcentage de protoplastes en G<sub>1</sub>, plus de 20% des protoplastes de la sous-population 2B sont en phase G<sub>2</sub>/M. Nous assistons ensuite à une recrudescence du pourcentage de protoplastes en G<sub>1</sub> et à une diminution du pourcentage de protoplastes en G<sub>2</sub>, pour atteindre un plateau s'échelonnant environ du temps 48 heures au temps 84 heures après retrait de l'aphidicoline. Après ce plateau, nous observons le même phénomène qui s'était produit au cours des 12 premières heures. Ce qui signifierait que nos protoplastes de *Daucus carota* accomplissent un cycle cellulaire en 84 heures, soit trois jours et demi.

La durée du cycle cellulaire de nos protoplastes peut paraître élevée par rapport à celle des cellules de carottes ou bien à celle des cellules animales. Toutefois, Asamizu (1977), sur des protoplastes de racines de carotte remis en culture, n'observe aucune division au cours des trois premiers jours. Période pendant laquelle les protoplastes augmentent de volume et passent de la forme ronde à ovale.

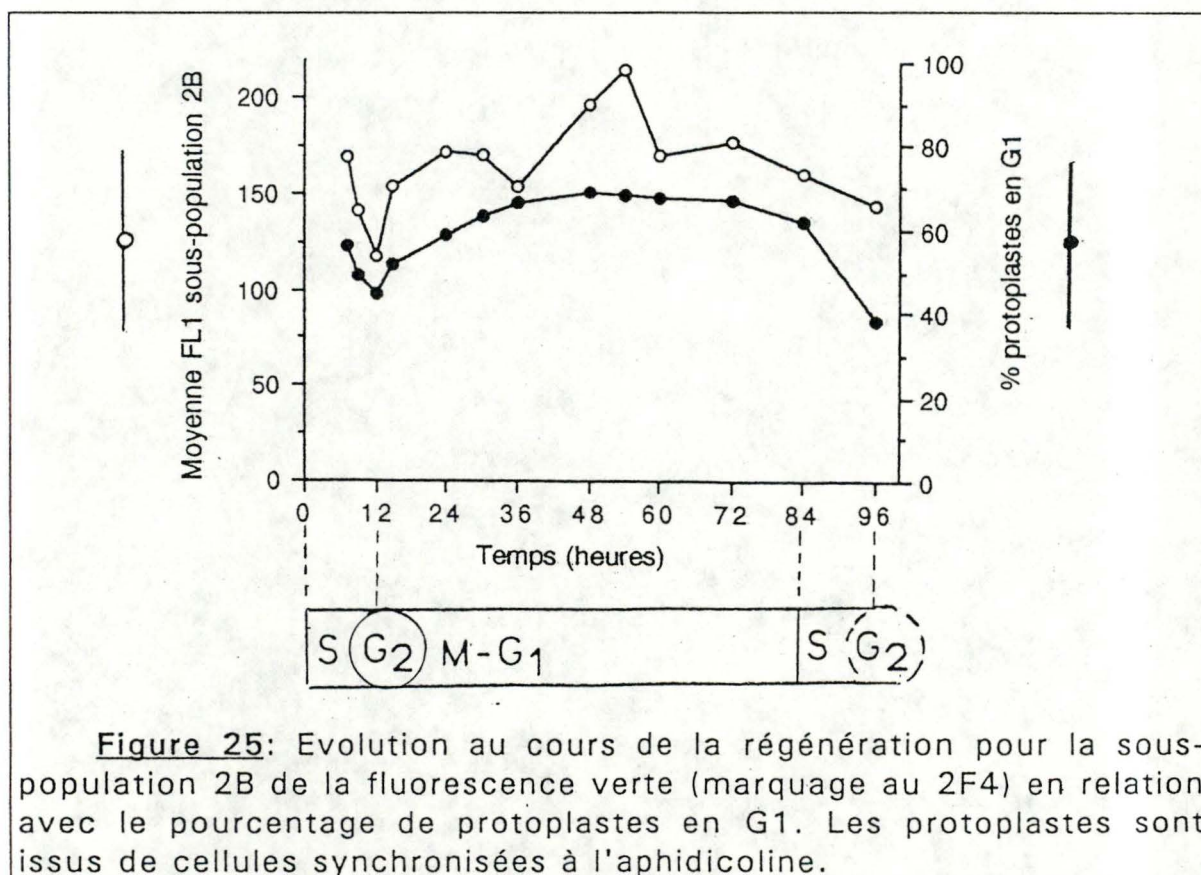
La particularité de notre analyse est que nous ne suivons pas les mêmes individus tout au long du cycle cellulaire. En effet, les protoplastes de 2B en G<sub>2</sub> qui se divisent, engendrent des cellules-filles qui restent accolées (pas de séparation physique). Le tri cellulaire montrera que la sous-population 2C est constituée de cellules-filles accolées dont la paramètre FSC est important. Nous en concluons que les protoplastes de 2B, une fois la mitose accomplie, ont transité, pour la majorité d'entre eux, de la fenêtre 2B vers la fenêtre 2C, ce qui explique l'augmentation du nombre de cellules dans la fenêtre 2C: de 1% à 16% en 108 heures.

Toutefois, nous observons, simultanément à cette diminution du pourcentage de protoplastes en G<sub>2</sub>, une augmentation du pourcentage de protoplastes en G<sub>1</sub>. Ceux-ci ne correspondent pas à l'évolution des protoplastes qui se trouvaient déjà en 2B, comme nous l'avons expliqué, mais ils doivent provenir de 2A. Or si l'on observe l'histogramme FL2 de cette sous-population 2A (voir figure 22), on constate que la majorité des protoplastes sont en G<sub>2</sub> quel que soit le temps de régénération. Ceci signifie que si les protoplastes en G<sub>2</sub> de la sous-population 2A sont les futurs

protoplastes en G1 de la sous-population 2B, il s'est déroulé entre les deux phases une division avec séparation physique des deux cellules-filles. Ceci n'est pas en contradiction avec la non séparation des cellules-filles lors du "passage" 2B vers 2C. En effet, nous avons montré que les protoplastes de la sous-population 2A sont très peu marqués par l'anti-corps anti-pectine: leur marquage n'est qu' 1,2 fois plus important que l'autofluorescence contrairement à la sous-population 2B dont le marquage à l'anticorps anti-pectine est quatre fois plus intense que le contrôle. En conséquence, ils subissent une division avec une paroi de nature différente. C'est pourquoi nous supposons que les protocoles de marquage et/ou le passage dans le cytomètre en flux provoquent la séparation physique des cellules-filles issues de protoplastes de 2A mais pas de 2B.

### d.3. Corrélation régénération et cycle cellulaire

Le graphe suivant va nous permettre d'établir une corrélation entre l'évolution de la fluorescence verte, un paramètre de la régénération, et le cycle cellulaire tel que nous l'avons décrit dans le point précédent.



**Figure 25:** Evolution au cours de la régénération pour la sous-population 2B de la fluorescence verte (marquage au 2F4) en relation avec le pourcentage de protoplastes en G1. Les protoplastes sont issus de cellules synchronisées à l'aphidicoline.

On constate que les phases S correspondent à des périodes de diminution de la fluorescence verte. Au cours de cette période, le métabolisme cellulaire serait essentiellement orienté vers la réplication de l'ADN, ralentissant ainsi la synthèse de matériel pariétal. Par exemple, le donneur universel de groupements méthyls, le S-adénosyl-méthionine (SAM), serait, momentanément aussi, détourné de son rôle dans la synthèse des pectines. Une diminution de la fluorescence verte s'expliquerait par la perte de pectine dans le milieu extracellulaire, non compensée, pendant cette période, par la sécrétion de pectine dans la paroi. Cette perte de polysaccharides pariétaux est un phénomène banal dans toute culture de cellules en suspension.

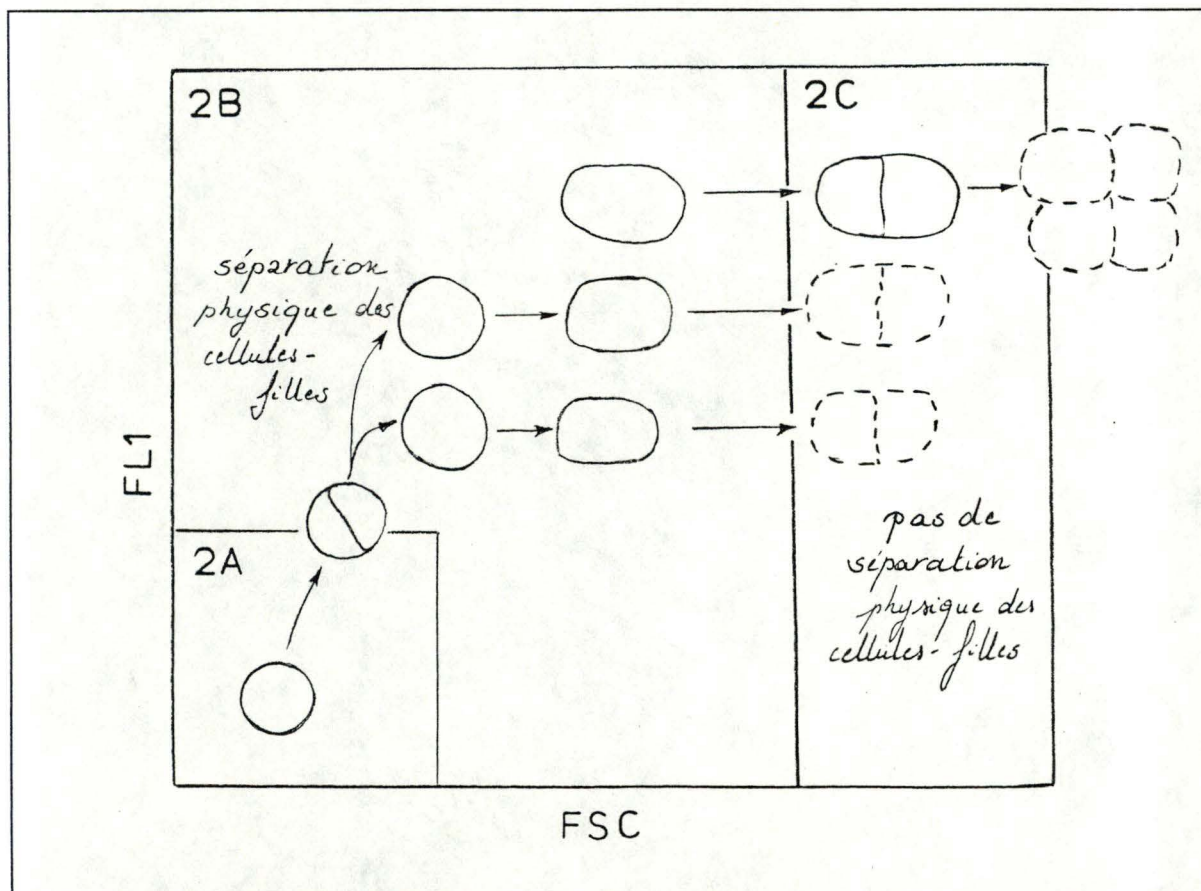
Par contre, une fois que le protoplaste se divise ou qu'il se trouve en phase G<sub>1</sub>, il synthétise de la pectine. Pendant cette période également, il croît en taille et sa granulosité augmente (voir figure 23).

Nos résultats concernant la régénération de protoplastes sur une longue période (quatre jours) après synchronisation à l'aphidicoline, sont compatibles avec ceux de Amino et de ses collaborateurs (1984, 1985). Leur matériel de travail était une culture de cellules en suspension de *Catharanthus roseus* synchronisée par une double privation de phosphate. Ils concluent sur base d'une analyse globale des polysaccharides, que la synthèse de la paroi a lieu de façon prépondérante au cours de la phase G<sub>1</sub>, après la division cellulaire. Ils notent une augmentation importante de pectine pariétale pendant la cytokinèse, qu'ils tentent d'expliquer par la formation de la plaque cellulaire (pectine de la lamelle mitoyenne), ou plus simplement par dépôt dans toute la paroi (Amino, 1984). Nos résultats conforteraient plutôt leur seconde hypothèse puisque, dès la fin de la phase S, nous mettons en évidence une synthèse accrue de pectine qui, dans notre cas, ne peut être détectée par le marquage immunologique qu'en surface du protoplaste.

En outre, l'UDP-glucose déshydrogénase, supposée être l'enzyme clé dans le métabolisme des substrats de la paroi, présente une faible activité tout au long du cycle cellulaire, hormis un pic d'activité spécifique pendant la phase G<sub>1</sub> lorsque l'activité de synthèse de la paroi est maximale (Amino, 1985).

d.4. Schéma récapitulatif

Nos résultats nous permettent de schématiser le "cheminement" d'un protoplaste remis en culture après synchronisation à l'aphidicoline et digestion enzymatique. (NB: La surface des fenêtres n'est pas respectée)



Dès le début de la régénération, un protoplaste peut se trouver dans la fenêtre 2B (10%) et évoluer vers 2C; il peut aussi provenir de la sous-population 2A et évoluer de telle façon qu'il se trouve, à 108 heures, dans la fenêtre 2B du cytomètre. Il n'est pas exclu que certains protoplastes aient un cycle cellulaire plus rapide, et entament une seconde division pendant l'intervalle de temps étudié.

#### 4. Tri cellulaire en cytométrie en flux

Au terme de ce travail, nous avons pu conforter certaines hypothèses grâce à l'utilisation de la fonction trieur du FACS. Les fenêtres de tri des populations et sous-populations présentées ci-dessous correspondent aux fenêtres d'analyse décrites en début de ce chapitre. Une fois le tri effectué, nous avons observé l'échantillon récolté au microscope optique à contraste de phase (grossissement 400X: photos 1 à 3, 1000X: photos 4 et 5), (tous les tris ont été effectués sur des échantillons non synchronisés, âgés de quatre jours).

##### a) Tri de la population 1

Par la fonction analyseur du FACS, nous avons montré que la population 1, de taille, de granulosité et d'autofluorescence verte faibles, n'était pas reconnue par l'anticorps anti-pectine et qu'elle prenait d'autant plus d'importance que le traitement préalable à l'analyse était lourd. Nous en avons déduit que cette population 1 était une population de débris et/ou de protoplastes non-régénérants.

Grâce au tri et à l'observation microscopique de cette population, nous confirmons l'analyse cytométrique et précisons qu'il s'agit de débris (parois, grains d'amidon, cristaux...).

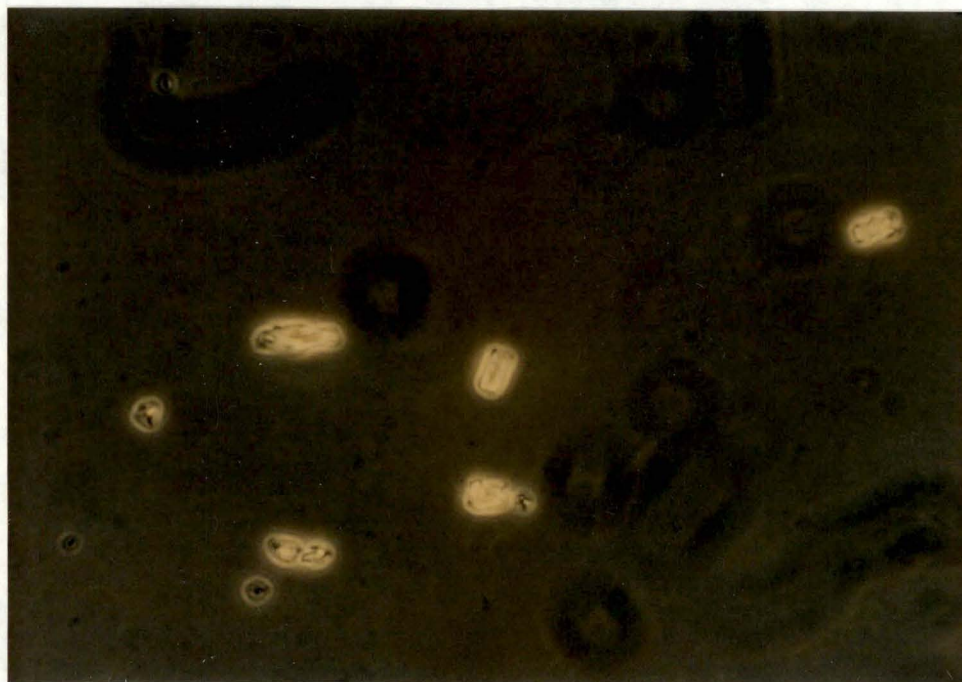


Photo 1: Observation microscopique de la population 1.

#### 4. Tri cellulaire en cytométrie en flux

Au terme de ce travail, nous avons pu conforter certaines hypothèses grâce à l'utilisation de la fonction trieur du FACS. Les fenêtres de tri des populations et sous-populations présentées ci-dessous correspondent aux fenêtres d'analyse décrites en début de ce chapitre. Une fois le tri effectué, nous avons observé l'échantillon récolté au microscope optique à contraste de phase (grossissement 400X: photos 1 à 3, 1000X: photos 4 et 5), (tous les tris ont été effectués sur des échantillons non synchronisés, âgés de quatre jours).

##### a) Tri de la population 1

Par la fonction analyseur du FACS, nous avons montré que la population 1, de taille, de granulosité et d'autofluorescence verte faibles, n'était pas reconnue par l'anticorps anti-pectine et qu'elle prenait d'autant plus d'importance que le traitement préalable à l'analyse était lourd. Nous en avons déduit que cette population 1 était une population de débris et/ou de protoplastes non-régénérants.

Grâce au tri et à l'observation microscopique de cette population, nous confirmons l'analyse cytométrique et précisons qu'il s'agit de débris (parois, grains d'amidon, cristaux...).

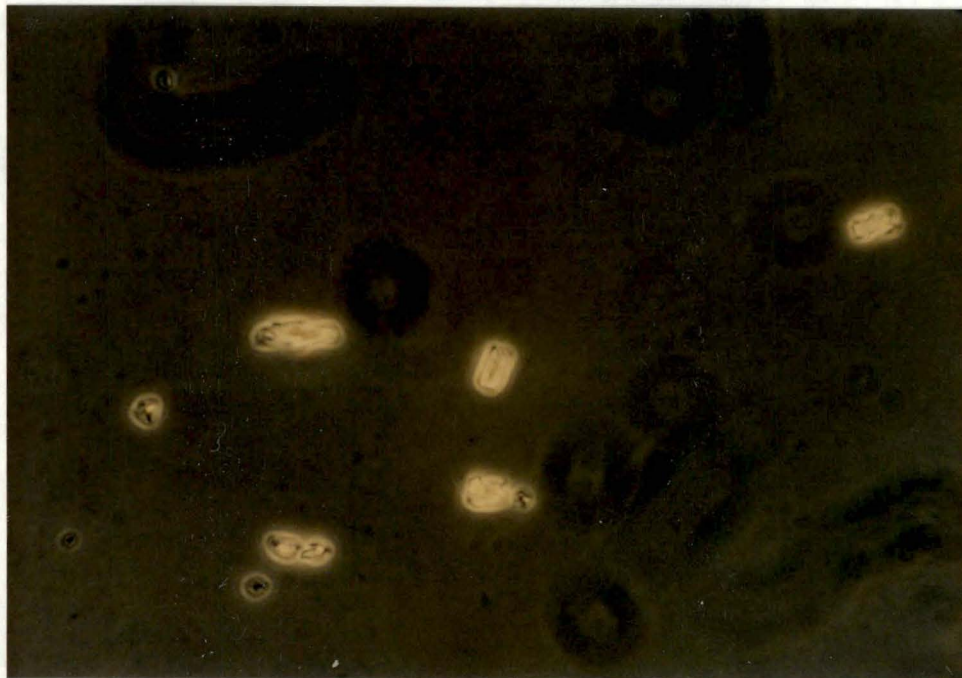


Photo 1: Observation microscopique de la population 1.

### b) Tri de la sous-population 2A

Le tri, ici aussi, confirme l'analyse: nous supposons effectivement que la sous-population 2A rassemblait des protoplastes sphériques isolés de petite taille. La photo 2 montre un sujet représentatif de cette sous-population.

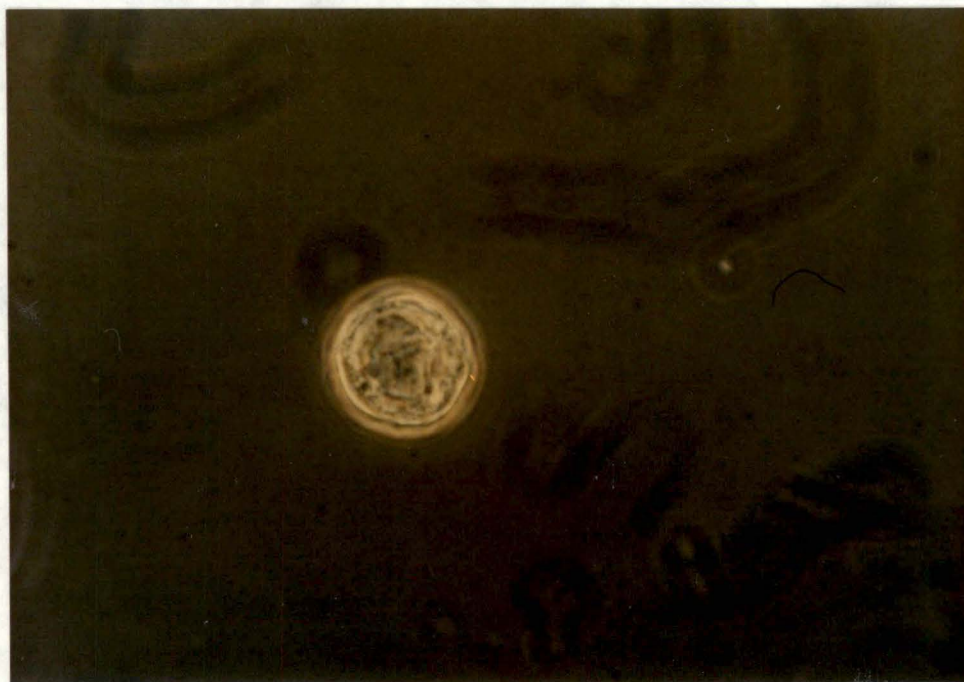


Photo 2: Observation microscopique de la sous-population 2A.

### c) Tri de la sous-population 2B

L'analyse décrit la sous-population 2B comme régénérante. Les protoplastes, au cours de la régénération, s'allongeraient et augmenteraient de volume.

Le tri a montré que cette sous-population présente à la fois des sujets morphologiquement semblables à 2A et à 2C, mais surtout des protoplastes de forme allongée.



Photo 3: Observation microscopique de la sous-population 2B.

d) Tri de la sous-population 2C

Les photos suivantes montrent des protoplastes en division, donc de tailles importantes, ce qui confirme nos interprétations.

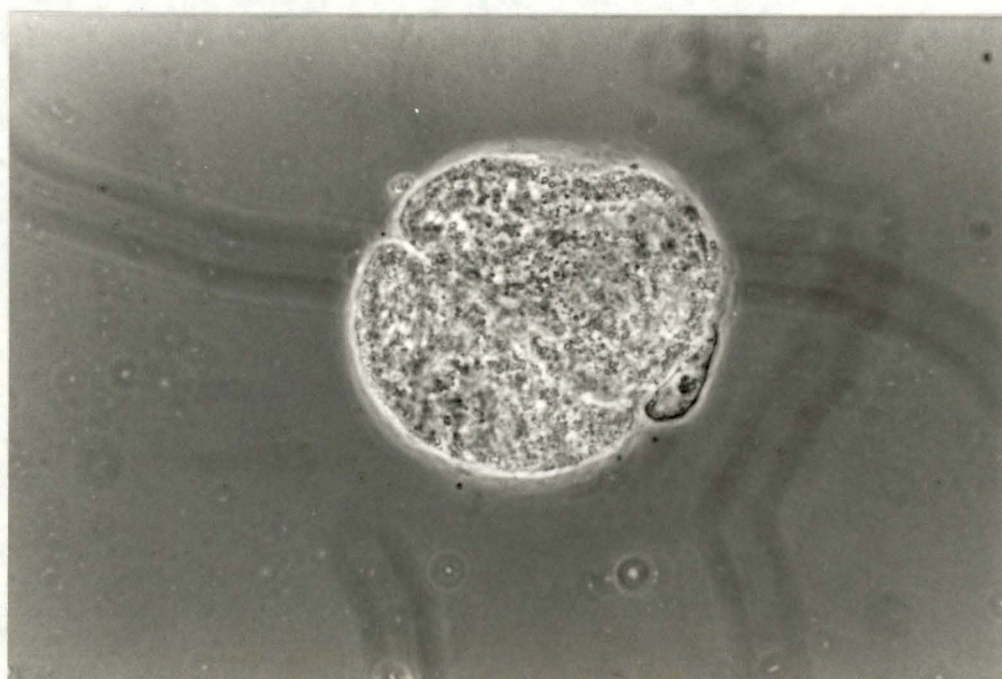


Photo 4: Observation microscopique de la sous-population 2C.



Photo 5: Observation microscopique de la sous-population 2C.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons mis au point deux types de marquages de protoplastes de carotte pour la cytométrie en flux. Le premier, immunologique, est un marquage anti-pectine acide, l'anticorps utilisé, le 2F4, reconnaissant une région homopolygalacturonique en dimères d'"egg-box". Le second est un marquage spécifique de l'ADN à l'iodure de propidium sur protoplastes synchronisés, afin de suivre le déroulement du cycle cellulaire.

Pour une analyse optimale du cycle cellulaire sur protoplastes, au moyen de l'iodure de propidium, une digestion à la ribonucléase s'est révélée nécessaire. Nous avons obtenu une meilleure synchronisation des cellules par l'aphidicoline ( $\pm 1/5$  en G1 contre  $\pm 4/5$  en G2) que par le traitement à basse température ( $\pm 2/3$  en G1 contre  $\pm 1/3$  en G2).

Nous avons montré qu'il est possible de détecter de la pectine acide chez les protoplastes de *Daucus carota* dès leur sortie du milieu enzymatique et ce sans traitement de déestérification. Ces résultats constituent un élément neuf, car jamais il n'a été possible, sur cellules méristématiques, d'obtenir un marquage (en microscopie électronique) d'acide homopolygalacturonique sans déestérification préalable. Ceci confirme que le contexte de régénération de la paroi sur protoplastes constitue un modèle unique, différent de la biosynthèse de la paroi des cellules méristématiques dans la plante elle-même.

Toutefois, la présence éventuelle d'estérases dans le milieu enzymatique ne permet pas de réfuter toute possibilité de synthèse de pectine méthylestérifiée dès le début de la régénération. Il serait en effet possible qu'une fraction de la pectine soit déposée sous forme estérifiée dans la paroi et que les méthylestérases pectiques, responsables de la déestérification, entrent rapidement en jeu. Pour être tout à fait rigoureux, il faudrait donc vérifier la présence d'estérases dans le mélange enzymatique, mais aussi réaliser un marquage anti-pectine estérifiée dont une université anglaise détient un anticorps monoclonal correspondant.

L'analyse au cytomètre en flux de la suspension de protoplastes a révélé la présence de deux populations majoritaires de particules. Le tri cellulaire a permis de montrer que la population 1 est une population de débris et la population 2, une population de protoplastes. Les protoplastes isolés et synchronisés se répartissent eux-même en deux, voire trois sous-populations dont la principale, la sous-population 2A, est constituée d'individus dont les noyaux sont

en phase G<sub>2</sub> exclusivement. Certains de ces protoplastes entament alors une mitose, ce qui se traduit par leur transition vers les deux autres sous-populations 2B et 2C. Les protoplastes de cette sous-population 2A, qui ne subissent pas la mitose, demeurent apparemment bloqués en G<sub>2</sub> et aucun de leurs paramètres mesurés au FACS n'évolue pendant les 108 premières heures de la mise en culture après isolement enzymatique. La sous-population 2B présentent des sujets morphologiquement semblables à 2A (sphériques) et à 2C (cellules-filles accolées), mais surtout des protoplastes allongés. Quant à 2C, il s'agit essentiellement de cellules-filles accolées. Donc, seule une partie ( $\pm 45\%$ ) de la population 2 régénère une paroi et se divise.

La durée du cycle cellulaire pour les protoplastes de racines de carotte a été estimée à environ trois jours et demi, dont près de douze heures de phase S. Cette phase serait synonyme de stabilité pour la taille et pour la granulosité et de diminution de la quantité de pectine acide présente en surface du protoplaste, le métabolisme étant réorienté vers la réplication de l'ADN. Une activité de synthèse intense (augmentation de la granulosité), un dépôt pariétal de pectine acide et une augmentation de volume se réaliseraient au cours des phases M et G<sub>1</sub>.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes différents de la pectine et contre la fraction hémicellulosique de la paroi afin d'approcher globalement la cinétique de reconstitution de la paroi cellulaire autour d'un protoplaste végétal.

Par ailleurs, on pourrait aborder la régénération de la paroi par des approches complémentaires de la cytométrie en flux: (1) le marquage en microscopie électronique de protoplastes en régénération, permettrait de localiser la pectine acide dans toute l'épaisseur de la paroi et non pas seulement en surface, (2) l'analyse d'image en microscopie visible de ces mêmes protoplastes, en conservant notre protocole de marquage au 2F4, renseignerait sur la localisation en surface de la pectine régénérée: en amas ou diffuse? (3) L'utilisation de sondes fluorescentes, tant en microscopie optique qu'en cytométrie en flux, pour mesurer sur protoplastes vivants, l'activité en calcium et le pH cytoplasmiques ainsi que le potentiel membranaire, permettrait de vérifier la distinction établie entre les sous-populations de protoplastes et d'obtenir des informations sur leur état physiologique.

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

Albersheim P., Darvill A. (1985).

Les oligosaccharines,  
Pour la science 11: 18-26.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.  
(1989).

Biologie moléculaire de la cellule. 2<sup>ème</sup> édition. Médecine Science.  
Flammarion.

Amino S.-I., Fujimura T., Komamine A. (1983).

Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension  
culture of *Catharanthus roseus*,  
Physiol. Plant. 59 : 393-396.

Amino S.-I., Takeuchi Y, Komamine A. (1984).

Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a  
synchronous culture of *Catharanthus roseus*,  
Physiol. Plant. 60 : 326-332.

Amino S.-I., Takeuchi Y, Komamine A. (1985).

Changes in enzyme activities involved in formation and  
interconversion of UDP-sugars during the cell cycle in a synchronous  
culture of *Catharanthus roseus*,  
Physiol. Plant. 64 : 111-117.

Asamizu T. Nishi A; (1980).

Regenerated cell wall of carrot protoplasts isolated from suspension-  
cultured cells,  
Physiol. Plant. 48 : 207-212.

Asamizu T., Tanaka K., Tabeke I., Nishi A. (1977).

Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall  
on carrot protoplasts,  
Physiol. Plant. 40 : 215-218.

Ashihara T., Baserga R.(1979).

Cell synchronization,  
Methods in Enzymology 58 : 248-262.

Bayliss M.W. (1975).

The duration of the cell cycle of *Daucus carota* L. in vivo and in  
vitro,  
Experimental Cell Research 92 : 31-38.

- Blaschek W., Haass D., Koehler H., Franz G. (1981).  
Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* protoplasts: chemical and biochemical aspects,  
Plant Science Letters 22 : 47-57.
- Bolwell G.P. (1988).  
Synthesis of cell wall components : aspects of control,  
Phytochemistry 27 : 1235-1253.
- Brown S. (1984).  
Analysis and sorting of plant material by flow cytometry,  
Physiol. Vég. 22 (3) : 341-349.
- Brown S.C., Jullien M., Coutos-Thevenot P., Muller P., Renaudin J.-P. (1986).  
Present developments of flow cytometry in plant biology,  
Biology of the Cell 58 : 173-178.
- Browse J., Somerville C.R., Slack C.R. (1988).  
Changes in lipid composition during protoplast isolation,  
Plant Science 56 : 15-20.
- Bryant J.A. (1982)  
DNA Replication and the cell cycle,  
Encyclopedia of plant physiology. Nucleic acids and protein in plants:pp75-105. Edited by D. Boulter and B. Parthier.
- Burgess J. (1983).  
Wall regeneration around isolated protoplasts,  
International Review of cytology 16 : 55-77.
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. (1988).  
Biosynthesis and secretion of plant cell wall polysaccharides,  
Current Topics in Plant Biochemistry and physiology 7 : 112-133.
- Coleman J., Evans D., Hawes C. (1988).  
Plant coated vesicles,  
Plant, Cell and Environment 11 : 669-684.
- Conia J., Alexander R.G., Wilder M.E., Richards K.R., Rice M.E., Jackson P.J. (1990).  
Reversible accumulation of plant suspension cell cultures in G<sub>1</sub> phase and subsequent synchronous traverse of the cell cycle,  
Plant Physiol. 94 : 1568-1574.

- Darvill A., Mc Neil M., Albersheim P., Delmer D.P. (1980).  
The primary cell walls of flowering plants,  
N.E. Tolbert .The biochemistry of plants, a comprehensive treatise 1  
: 91-162.
- Dolbeare F., Gratzner H., Pallavicini M.G., Gray J.W. (1983).  
Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated  
bromodeoxyuridine,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 5573-5577.
- Duffus C.M., Duffus J.H. (1984).  
Polysaccharides synthesis,  
Carbohydrate metabolism in plants. Loryman New-York: 89-113.
- Epstein L., Lamport D.T.A. (1984).  
An intramolecular linkage involving isodityrosine in extensin,  
Phytochemistry 23 : 1241-1246.
- Everdeen D.S., Kiefer S., Willard J.J., Muldoon E.P., Dey P.M., LI  
X.B., Lamport D.T.A. (1988).  
Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*,  
Plant Physiol. 87 : 616-621.
- Fowke L.C., Constabel F. (1985).  
Plant protoplasts.  
CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Fry S.C. (1985).  
Primary cell wall metabolism,  
Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 2 : 1-42.
- Fry S.C. (1988).  
The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis,  
Wilkins M., Ed., Longman scientific and technical, Harlow.
- Gidley M.J., Morris E.R., Murray E.J., Powell D.A., Rees D.A.  
(1980).  
Evidence for two mechanisms of interchain association in calcium  
pectate gels,  
Int. J. Biol. Macromol. 2 : 332-334.
- Greimers R. (1990)  
Cytométrie en flux: analyses multiparamétriques et tri cellulaire,  
Université de Liège.

- Hahne G., Herth W., Hoffmann F. (1983).  
Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts,  
*Protoplasma* **115** : 217-221.
- Hasezawa S., Hogetsu T., Syono K. (1989).  
Changes of actin filaments and cellulose fibrils in elongating cells derived from tobacco protoplasts,  
*J. Plant Physiol.* **134** : 115-119.
- Hayashi T., Polonenko D.R., Camirand A., Maclachlan G. (1986).  
Pea xyloglucan and cellulose,  
*Plant Physiol.* **82** : 301-306.
- Ishii S. (1988).  
Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process,  
*Plant Physiol.* **88** : 26-29.
- Kruth H.S. (1982).  
Flow cytometry : rapid biochemical analysis of single cells,  
*Analytical Biochemistry* **125** : 225-242.
- Larkin P.J. (1976).  
Purification and viability determinations of plant protoplasts,  
*Planta* **128** : 213-216.
- Lee M.G., Nurse P. (1987).  
Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*,  
*Nature* **327** : 31-35.
- Lee M.G., Nurse P. (1988).  
Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells,  
*TIG* **4(10)** : 287-290.
- Liners F., Letesson J.-J., Didembourg C, Van Cutsem P (1989).  
Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation by calcium,  
*Plant Physiol.* **91** : 1419-1424.
- Mc Gann L.E., Walterson M.L., Hogg L.M. (1988).  
Light scattering and cell volumes in osmotically stressed and frozen-thawed cells,  
*Cytometry* **9** : 33-38.

Mc Neil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. (1984).  
Structure and function of primary cell walls of plants,  
*Ann. Rev. Biochem.* **53** : 625-663.

Meadows M.G. (1982/83).  
Characterisation of cells and protoplasts of the maize cell line,  
*Plant Science Letters* **28** : 337-348.

Mineyuki Y., Takagi M., Furuya M. (1984).  
Changes in organelle movement in the nuclear region during the cell  
cycle of *Adiantum* protonema,  
*Plant and Cell Physiol.* **25(2)** : 297-308.

Mock H.P., Emmerling M., Seitz H.U. (1990).  
Cell wall synthesis in carrot cells : comparison of suspension-  
cultured cells and regenerating protoplasts,  
*Physiologia Plantarum* **79** : 347-353.

Moore P.J., Staehelin L.A. (1988).  
Immunogolc localization of the cell-wall-matrix polysaccharides  
rhamnogalacturonane I and xyloglucan during cell expansion and  
cytokinesis in *Trifolium pratense* L.; implication for secretory  
pathways,  
*Planta* **174** : 433-445.

Morris E.R., Powell D.A., Gidley M.J., Rees D.A. (1982).  
Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between  
gel and solid states of calcium polygalacturonate,  
*J. Mol. Biol.* **155** : 507-516.

Morris E.R., Rees D.A., Robinson G., Young G.A. (1980).  
Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide  
systems,  
*J. Mol. Biol.* **138** : 363-374.

Murray A.W. (1989).  
The cell cycle as a *cdc2* cycle,  
*Nature* **342** : 14-15.

Northcote D.H. (1982).  
Macromolecular aspects of cell wall differentiation,  
*Encyclopedia of plant physiology. Nucleic acids and protein in plants*  
pp637-651. Edited by D. Boulter and B. Parthier.

Pilet P.E. (1985).

Introduction : the use of plant protoplasts in physiological research,  
In : P.E. Pilet, ed, The physiological properties of plant protoplasts,  
Springer-Verlag, New-York : 1-5.

Potrykus I., Shillito R.D. (1986).

Protoplasts : isolation, culture, plant régénération,  
Methods in Enzymology **118** : 549-578.

Preston R.D. (1988).

Cellulose-microfibril-orienting mechanisms in plant cells walls,  
Planta **174** : 67-74.

Rasmussen O., Baggerud C., Iversen T.-H. (1989).

Preparatory studies for the use of plant protoplasts in space  
research,  
Physiol. Plant. **76** : 431-437.

Redenbaugh K., Ruzin S., Bartholomew J., Bassham J.A. (1982).

Characterization and separation of plant protoplast via flow  
cytometry and cell sorting,  
Z. Pflanzenphysiol. **107** : 65-80.

Rees D.A., Welsh E.J. (1977).

Secondary and tertiary structure of polysaccharides in solutions and  
gels,  
Angew. Chem. Int. Ed. Engl **16** : 214-224.

Rine J. (1986).

Regulation of cell division by peptide hormones of *saccharomyces  
cerevisiae*,  
TIG novembre 1986 : 276-277.

Sala F., Galli M.G., Levi M., Burrioni D., Parisi B., Pedrali-Noy G.,  
Spadari S. (1981).

Functional roles of the plant -like DNA polymerases,  
FEBS Lett. **124** : 112-118.

Sala F., Grazia Galli M., Pedrali-Noy G., Spadari S. (1986).

Synchronyzation of plant cells in culture and meristems by  
aphidicolin,  
Methods in Enzymology, **118** : 87-96.

Sala F., Magnien E., Galli M.G., Dalschaert X., Pedrali-Noy G., Spadari S. (1982).

DNA repair synthesis in plant protoplasts is aphidicolin-resistant, *FEBS Letters* **138** : 213-217.

Sala F., Parisi B., Burroni D., Amileni A.R., Pedrali-Noy G., Spadari S. (1980).

Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the  $\alpha$ -like DNA polymerase of plant cells, *FEBS Letters* **117** : 93-98.

Shea E.M., Gibeaut D.M., Carpita N.C. (1989).

Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts, *Planta* **179** : 293-308.

Shimizu J.I. (1985).

Cell regeneration and division of grape mesophyll protoplasts, *J. Plant Physiol.* **119** : 419-424.

Taiz L., (1984).

Plant cell expansion : regulation of cell wall mechanical properties, *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **35** : 585-657.

Taylor A.J. (1982).

Intramolecular distribution of carboxyl groups in low methoxyl pectins- a review, *Carbohydr. Polymers* **2** : 9-17.

Taylor I.W., Milthorpe B.K. (1980).

An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry, I. Unperturbed cell populations, *J. Histochem. Cytochem.* **28** : 1224-1232.

Thibault J.F., Rinaudo M. (1986).

Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation, *Biopolymers* **25** : 455-468.

Tierney M.L., Varner J.E. (1987).

The extensins, *Plant Physiol.* **84** : 1-2.

Varner J.E., Liang-Shiou L. (1989).

Plant cell wall architecture, *Cell* **56** : 231-239.

Waldron K.W., Brett C.T. (1985).

Interaction of enzymes involved in cell-wall heteropolysaccharide biosynthesis,

Edited by C.T. Brett and J.R. Hillman, in : Society for Experimental Biology. Seminar Series 28.

Weber G., Schweiger H.G. (1985).

Synchronization of cells from higher plants,  
Naturwissenschaften 72 : 438-439.

Wilkie K.C.B. (1985).

New perspectives on non-cellulosic cell-wall polysaccharides (hemicellulose and pectic substances) of land plants,

Edited by C.T. Brett and J.R. Hillman, in : Society for Experimental Biology, Seminar Series 28 : 1-37.