

Méthodologie cytotaxonomique : critiques et propositions

Autor(en): **Burdet, Hervé M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Candollea : journal international de botanique systématique = international journal of systematic botany**

Band (Jahr): **23 (1968)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-880336>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Méthodologie cytotaxonomique : critiques et propositions

HERVÉ M. BURDET

Institut de botanique systématique
et de taxonomie expérimentale
Université de Genève

RÉSUMÉ

L'auteur de cet article tente une évaluation critique des méthodes et des résultats cytologiques employés en taxonomie. Il propose d'ajouter aux techniques en usage jusqu'ici des dosages de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et suggère les méthodes les plus appropriées permettant d'y parvenir.

SUMMARY

The author of this paper attempts to make a critical assessment of the cytological methods and the results obtained therefrom in the taxonomic field. He proposes to add, to the techniques used up till now, the quantitative analysis of desoxyribonucleic acid (DNA) and suggests the most appropriate methods to achieve this aim.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser dieses Artikels sucht die in der Taxonomie gebräuchlichen zytologischen Methoden und Ergebnisse zu bewerten. Er schlägt vor, den bisher angewandten Verfahren die Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) hinzuzufügen, und bespricht die dafür geeignetsten Methoden.

Les premiers travaux cytotaxonomiques effectués sur des végétaux remontent au début de ce siècle. Depuis, l'importance accordée en taxonomie aux examens cytologiques n'a fait que croître, et parallèlement la littérature scientifique qui paraît à ce sujet s'amoncèle au point de rendre difficile l'évaluation exacte des tendances actuelles dans ce domaine. Il semble que l'extension des résultats cytotaxonomiques se fasse plus de manière horizontale par l'examen d'un nombre toujours plus vaste de taxons qu'en profondeur par une amplification de l'effort analytique. On connaît

certaines données sur de plus en plus de plantes, mais on ajoute peu à ce qu'on sait de chacune. Les chercheurs qui s'occupent de cytotaxonomie aujourd'hui portent l'essentiel de leurs efforts sur le support matériel de l'information génétique: ils étudient les noyaux au repos, les méioses et mitoses ainsi que les chromosomes, leur nombre et leurs particularités morphologiques. Ils étudient donc le mode de transmission cytomécanique du patrimoine héréditaire. Les informations recueillies de la sorte sont évaluées selon un procédé classique en taxonomie: on les compare d'un organisme à l'autre, mettant ainsi en évidence les nombres de base, la polyploïdie ou la dysploïdie typiques d'un groupe de végétaux donné. D'une manière tout aussi classique on met ces valeurs en rapport avec les aires de répartition, les caractéristiques morphologiques et biologiques de ces plantes pour en tirer une appréciation taxonomique.

On peut légitimement se demander pour quelle raison une telle importance est accordée à la cytologie, soit à des caractères morphologiques si peu apparents. En fait, pourquoi des structures minimes, qui ne sont visibles qu'à de rares moments et non sans peine, sont-elles considérées comme des critères taxonomiques capitaux? D'un point de vue taxonomique, ces caractères sont certes très nets, mais guère plus sûrs que bien d'autres. La vraie réponse à la question qui précède est à rechercher dans la conviction qui anime tout cytotaxonomiste que le caryome, c'est-à-dire l'ensemble des chromosomes, est le support matériel de l'information génétique. Cette conviction subjective, qui tend à faire de la cytologie un instrument taxonomique privilégié, trouve sa justification dans le fait que l'étude du génome d'un organisme en est l'étude totale, puisque l'objet étudié est à la fois la cause et le reflet de toutes les caractéristiques morphologiques, biologiques, coenologiques et évolutives qui représentent cet organisme. Pour quiconque partage cette conviction, la clé de tout problème taxonomique est en génétique, la taxonomie est une étude comparée des génomes et le but visé est la perception, puis l'analyse des caractères génétiques des organismes.

Or, la génétique a de nos jours des implications moléculaires: elle enseigne que l'acide désoxyribonucléique (ADN) est la substance même du code génétique. Nous proposons, logiquement nous semble-t-il, de suivre ces développements modernes en prolongeant notre effort de compréhension des génomes jusqu'à l'échelle moléculaire. La cytotaxonomie qui débouche déjà sur la génétique classique, par exemple quand elle s'occupe des hybrides et des barrières de stérilité, doit désormais rejoindre la génétique moléculaire. Au reste, les biochimistes de l'ADN abordent déjà des problèmes d'intérêt taxonomique comme les mutations (Zamenhof 1967) et les facteurs d'hérédité maternelle (Borst et al. 1967; Granick & Gibor 1967).

Faisons abstraction des critères taxonomiques que les examens cytologiques tels qu'ils sont pratiqués aujourd'hui fournissent déjà et tentons une évaluation critique de nos connaissances cytologiques en ce qui concerne l'ADN porteur de l'information génétique. L'examen des noyaux au repos, des mitoses et des méioses devient l'étude des phases successives de stockage et de transmission de l'information génétique. Tout écart de la norme lors de ces phases peut avoir des conséquences phénotypiques sans qu'on puisse en prévoir la nature ou l'étendue. Le dénombrement des chromosomes et leur étude morphologique renseignent sur la façon selon laquelle

le caryome est fractionné mais ne donnent guère d'indication sur la quantité ou la nature de l'information qu'ils portent. Les nombres de base, la dysploïdie et la polyploïdie sont des entités abstraites, fonctions du fractionnement du génome. On voit donc que ces valeurs renseignent bien peu sur la portée génétique des structures examinées. L'information génétique est-elle plus ample dans une cellule à $2n = 18$ que dans une cellule à $2n = 16$ chromosomes ?

Nous ne voulons pas minimiser l'immense masse de renseignements que fournissent les dénombrements chromosomiques et les études morphologiques de chromosomes. Il faut cependant compléter ces résultats par une évaluation quantitative de l'information génétique qu'ils représentent (Ris 1947). Une telle évaluation peut être faite par la mesure de la masse d'ADN que recèle le noyau cellulaire. Même si, à ce jour, le code génétique à l'échelle moléculaire n'est déchiffré qu'en partie, on peut assumer qu'une quantité donnée d'ADN représente un nombre de codons déterminé. (Un codon est l'unité quantique d'information génétique à l'échelle moléculaire.) Une détermination de la quantité d'ADN présent dans une cellule est donc une appréciation de l'information génétique que renferme cette cellule. On sait déjà que la masse d'ADN nucléaire est constante pour une espèce, abstraction faite du rythme de synthèse désoxyribonucléique et de l'endomitose éventuelle (Swift 1950; Patau & Swift 1953; Mirsky & Ris 1951; Mazia 1952). Cette masse représente la quantité maximale d'information génétique théoriquement prévisible et ne tient pas compte de la présence éventuelle de segments homologues où l'information est simplement répétée. Ainsi chez un homozygote parfait, l'information génétique n'est que la moitié de ce que laisserait prévoir la détermination de l'ADN, puisque dans un tel cas les codons doivent être considérés comme des paires d'homologues.

Nous ne voulons donc pas dire que le taux de l'ADN cellulaire est une mesure parfaite du patrimoine héréditaire d'un organisme mais bien que c'est une façon d'établir une limite supérieure à son potentiel génétique qui, associée à d'autres paramètres caryologiques comme les caractéristiques numériques et morphologiques des chromosomes et le déroulement cytomécanique des divisions cellulaires accroît de manière non négligeable nos connaissances cytogénétiques. En plus de la mesure brute du taux de l'ADN nucléaire, au moins aussi typique d'un taxon que son nombre chromosomique, on pourra faire l'appréciation du taux d'ADN cellulaire en étendant les mesures à l'ensemble de la cellule pour cerner l'ampleur relative de l'hérédité plasmatique. On pourra aussi calculer des « degrés de ploïdie » et des « paliers de dysploïdie » moléculaires. Ces mesures recouvriront ou non les observations de chromosomes et de la comparaison pourra découler une compréhension plus complète des problèmes que posent les groupes taxonomiques complexes où ces phénomènes interviennent (voir par exemple les familles *Malvaceae* et *Bombacaceae*, Miège et Burdet 1968).

La détermination de l'ADN in situ est aujourd'hui possible grâce à des méthodes à la fois chimiques et physiques. Le principe général consiste à fixer sur l'ADN des colorants dont les propriétés sont connues et que l'on retrouve à l'examen microscopique. La quantité de colorant, et donc d'ADN, présente dans un secteur déterminé de la préparation est mesurée par photométrie, à l'aide d'un équipement électrique.

Pour que les résultats ainsi obtenus aient un sens, certaines précautions sont nécessaires. Il faut que les mesures soient faites à des phases comparables de la synthèse désoxyribonucléique: phases G1 ou G2, début ou fin de l'interphase (Patau & Swift 1953). Il est nécessaire de perfectionner les techniques de coloration au point que leur précision permette des évaluations quantitatives; c'est-à-dire que la stœchiométrie des réactions colorant-ADN doit être connue et que les caractéristiques de l'absorption lumineuse par chaque colorant doivent être établies. Le rapport le plus complet et le plus récent sur ces questions est celui de Karsten (1967). Une attention particulière doit être accordée au fait que la fixation de certaines molécules sur l'ADN peut entraîner sa dénaturation plus ou moins complète (Fuller 1967). Ces précautions prises, l'avantage principal des méthodes optiques sur celles d'analyse chimique est de permettre des mesures sur des cellules isolées. De plus la répétition des mesures sur des cellules à des phases contrôlables permet une approche statistique de la quantité d'ADN dosé qui accroît la précision et l'assortit d'un intervalle de signification qui sera précieux lors des comparaisons d'un organisme à l'autre.

Les techniques optiques convenables pour déterminer quantitativement l'ADN sont de plusieurs sortes. Les noms qu'elles portent sont généralement précédés des préfixes cyto- ou micro- que nous laisserons tomber puisqu'il est entendu qu'il s'agit ici de mesures cellulaires à l'échelle microscopique. Ce sont l'interférométrie, la photométrie et la fluorométrie.

L'interférométrie est une technique faisant appel à un microscope à interférence pour déterminer l'indice de réfraction, l'épaisseur, la concentration ou le poids sec des structures observées (Beneke 1966; Goldstein 1964; Hale 1958). La connaissance d'au moins un de ces paramètres est nécessaire au calcul des autres. L'interférométrie est une méthode de stricte physique où les propriétés chimiques des objets observés n'interviennent pas, ce qui n'en fait pas une méthode bien appropriée à l'analyse quantitative des acides nucléiques.

La pratique de la photométrie consiste à mesurer à l'aide d'une tête photosensible la lumière qui sort d'un tube microscopique. On mesure par différence l'absorption lumineuse dont est responsable telle ou telle structure colorée. Pour apprécier la quantité d'ADN présente dans une cellule, la technique est donc de colorer cet ADN en fonction du taux d'absorption de la lumière. Plusieurs colorations se prêtent à ce genre de mesures car la stœchiométrie de leurs réactions avec l'ADN est calculable. Ce sont par exemple les colorations de Feulgen (Karsten 1956; Duijn & Struyk 1964) de Schiff à l'acide periodique = PAS (Gahrton 1964), les colorations au vert de méthyle (Kurnick 1950), au bleu de méthylène (Deitch 1964) et au chromalum de gallocyanine (Sandritter et al. 1963). La précision de ces mesures photométriques peut être accrue si l'on choisit pour éclairage une source de lumière monochromatique dont la longueur d'onde correspond à celle où l'absorption est la plus aisément mesurable. Le principe de la mesure photométrique par absorption peut être poussé plus loin encore: on peut mesurer l'absorption propre à l'ADN à une longueur d'onde de 260 $m\mu$ mais cette technique, la plus simple théoriquement, nécessite un appareillage très complexe et coûteux (Sandritter 1964).

La fluorométrie passe pour plus sensible et plus simple que la photométrie par absorption (Ruch 1965). Cette technique consiste en la mesure de la lumière

à la sortie du tube d'un microscope à fluorescence. La lumière de fluorescence ainsi mesurée provient de l'excitation en rayonnement UV de substances liées à l'ADN. Ces mesures ont l'avantage d'être directes. Les conditions chimiques à remplir pour la fixation des molécules fluorescentes sur l'ADN sont voisines de celles qui règlent la coloration de l'ADN. Le rayonnement lumineux émis est spécialement intéressant car la fluorescence se caractérise par un spectre discontinu à raies sur lequel on peut mesurer soit des intensités à longueur d'onde donnée (fluorométrie) soit la nature du spectre émis (spectrofluorométrie).

Les trois groupes de méthodes que nous venons d'évoquer sommairement sont assorties d'une grande variété d'artifices techniques et mathématiques destinés à assurer la reproductibilité des résultats et une précision satisfaisante. On a étudié les limites de sensibilité (Bartels 1966) les causes d'erreur (Garcia & Iorio 1966). L'appareillage est abondamment décrit (Thaer 1966) et les résultats d'études comparées par plusieurs méthodes sont publiés (Karsten 1964, Sandritter 1964, Schwarzacher 1964).

Toutes ces méthodes sont d'usage courant en cytologie théorique, médicale et animale, certaines ont servi à des débuts d'examen taxonomiques en zoologie (Vendrely & Vendrely 1948, Sandritter et al. 1960), mais à notre connaissance on n'a jamais essayé encore de les appliquer à des végétaux dans l'idée d'en tirer des critères taxonomiques.

A une époque où la cytotaxonomie dispose déjà de résultats nombreux, où les catalogues de nombres chromosomiques sont de volumineux ouvrages qui s'accroissent d'une centaine de pages par an, ne serait-il pas heureux de joindre à ces investigations si étendues, un effort d'approfondissement et de perfectionnement méthodologique et technique ?

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- Bartels, P. H. (1966) Sensitivity and evaluation of microspectrophotometric and microinterferometric measurements. In G. L. Wied (1966) : 93.
- Beneke, G. (1966) Application of interference microscopy to biological material. In G. L. Wied (1966) : 63.
- Borst, P., A. M. Kroon & G. J. C. M. Ruttenberg (1967) In D. Shugar (ed.) *Genetic elements, properties and function*: 81. Academic Press. London & New York.
- Deitch, A. D. (1964) A method for the cytophotometric estimation of nucleic acids using methylene blue. *Journ. Histochem. Cytochem.* 12 : 451.
- Duijn, P. van & C. G. Struyk (1964) The applications of a model system in combination with two-wavelength cytophotometry of Feulgen-stained nuclei for cytochemical determination of ADN in absolute units. In Schiebler et al. (1964) : 232.
- Fuller, W. (1967) The molecular structures of the nucleic acids and their biological significance. In D. Shugar (ed.) *Genetic elements, properties and function*: 17. Academic Press. London & New York.
- Gahrton, G. (1964) Quantitation of the periodic acid-Schiff (PAS) reaction by means of combined microinterferometry and microspectrophotometry. In Schiebler et al. (1964) : 187.
- Garcia, M. & R. Iorio (1966) Potential sources of error in two-wavelength cytophotometry. In G. L. Wied (1966) : 216.

- Goldstein, D. J. (1964) Interference microscopy of histological sections. In Schiebler et al. (1964) : 188.
- Granick, S. & A. Gibor (1967) The DNA of chloroplasts, mitochondria, and centrioles. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 6 : 143.
- Hale, A. J. (1958) *The interference microscope in biological research*. Livingstone. Edinburgh & London.
- Karsten, F. H. (1956) Stability of the Feulgen-desoxyribonucleic acid absorption curve in situ with variation in nuclear protein content and other factors. *Journ. Histochem. Cytochem.* 4 : 462.
- (1964) Comparison of measuring results: UV photometry-Feulgenphotometry-staining with basic dyes. In Schiebler et al. (1964) : 90.
- (1967) Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Internat. Rev. Cytol.* 21 : 141.
- Kurnick, N. B. (1950) The quantitative estimation of desoxyribosenucleic acid based on methyl green staining. *Exper. Cell. Res.* 1 : 151.
- Lison, L. & Valeri (1956) L'erreur dans la détermination histophotométrique de l'acide désoxyribonucléique et la variation individuelle des noyaux en acide désoxyribonucléique. *Chromosoma* 7 : 497.
- Mazia, D. (1952) Physiology of the cell nucleus. In E. G. Barrow (ed.): *Modern trends in physiology and biochemistry*: 77. Academic Press, New York.
- Miège, J. & H. M. Burdet (1968) Etude du genre *Adansonia* L. I: Caryologie. *Candollea* 23 : 59.
- Mirsky, A. E. & H. Ris (1951) The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *Journ. Genet. Physiol.* 34 : 451.
- Patau, K. & H. Swift (1953) The DNA content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. *Chromosoma* 6 : 149.
- Ris, H. (1947) The composition of chromosome during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12 : 158.
- Ruch, F. (1965) Fluoreszenzphotometrie. *Acta Histochem.* suppl. 6 : 117.
- Sandritter, W. (1964) Vergleiche der Messergebnisse: UV-Photometrie mit biochemischen Bestimmungen. In Schiebler et al. (1964) : 90.
- D. Müller & O. Gensecke (1960) Ultraviolett-mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von haploiden und diploiden Zellen. *Acta Histochem.* 10: 139.
- G. Kiefer & W. Rick (1963) Über die Stöchiometrie von Galloxyaninchromalaun mit Desoxyribonukleinsäure. *Histochemie* 3 : 315.
- Schiebler, T. H., A. G. E. Pearse & H. H. Wolff (ed.) (1964) *Deuxième Congrès international d'histochemie et de cytochimie. Frankfurt/Main 16-21.8.1964*. Springer. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Schwarzacher, H. G. (1964) Comparison of quantitative results: Feulgen photometry and chromosome counts. In Schiebler et al. (1964) : 90.
- Thaer, A. A. (1966) Instrumentation for microfluorometry. In G. L. Wied (1966) : 409.
- Swift, H. (1950) The constancy of desoxyribosenucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 36 : 643.
- Vendrely, R. & C. Vendrely (1948) La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales. *Experientia* 4 : 434.
- Wied, G. L. (ed.) (1966) *Quantitative cytochemistry*. Academic Press. New York & London.
- Zamenhof, S. (1967) Nucleic acids and mutability. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 6 : 1.