

## Mon pollen est-il vivant ?

**Mesurer la qualité du pollen est essentiel dans les processus de création variétale et de production de semences. Cependant, déterminer la viabilité ou le stade de développement de grains de pollen n'est pas aisé. Jusqu'à présent, les méthodes utilisées (comptage en microscopie avec des colorations) sont longues et fastidieuses. Développée par [Amphasys](#), une nouvelle technique permettant des analyses automatisées et basée sur l'analyse de cellules isolées par impédance en cytométrie de flux a été développée. Faisons le point sur cette avancée !**

### Pourquoi mesurer la qualité du pollen ?

**La qualité du pollen est un des facteurs clés des processus de sélection et production de semences.**

Le stockage dans le temps des grains de pollen matures permet notamment la réalisation d'[hybridations](#) entre des génotypes ne fleurissant pas au même moment. En production de semences, la qualité du pollen et l'impact des conditions environnementales à la floraison sont des paramètres primordiaux. La [stérilité mâle](#) est recherchée pour simplifier la réalisation des semences hybrides F1.

Au laboratoire, le recours à l'androgenèse nécessite de prélever le pollen immature (microspores) à certains stades précis pour produire des lignées d'[haploïdes doublés](#).

L'estimation des paramètres de qualité du pollen comme le **stade de développement**, la **viabilité** et la **capacité de germination** est donc cruciale pour le succès de tous ces processus.

### Des méthodes fastidieuses et pas toujours fiables

Le pollen est un type de cellule au développement très spécifique dans la plante. Au cours de sa maturation, il va changer de taille ; la composition de son cytoplasme va évoluer ; il va subir des divisions cellulaires. Une paroi cellulaire très résistante qui va le protéger de la déshydratation et des agressions du milieu externe va se développer. Chaque espèce de plante a un pollen unique,

et les méthodes d'analyse étaient jusqu'à présent différentes à chaque fois.

### **Diverses méthodes sont utilisées couramment pour déterminer la qualité du pollen :**

- Comptage en microscopie avec des colorations pour déterminer le stade de développement ou la viabilité,
- Germination *in vitro* ou *in situ* du pollen.

**Ces méthodes présentent plusieurs contraintes. Les colorations de viabilité du pollen diffèrent selon les espèces** (Jahier *et al.*, 1992) et sont parfois difficiles à interpréter.

De plus, la microscopie ne permet pas de compter de grandes quantités de cellules. **Le travail de comptage est long et fastidieux.**

Les **tests de germination de pollen *in vitro***, quant à eux, mettent en œuvre des milieux de culture complexes et variés en fonction des espèces. Ils **ne fonctionnent pas toujours très bien**. Pour certaines espèces, aucun protocole n'a pu être mis au point (céréales).

Des méthodes d'observation de la germination *in situ* ont été développées et fonctionnent généralement bien, mais sont très lourdes à mettre en œuvre : quelques heures après la pollinisation, les pièces fertiles des fleurs sont prélevées sur la plante et fixées. Puis les échantillons sont colorés et observés au microscope individuellement (Jahier *et al.*, 1992).

### **Une méthode d'analyse innovante : l'analyse de cellules isolées par impédance en cytométrie de flux**

Récemment **une méthode permettant de réaliser ces différents types d'analyses en une seule mesure a été mise au point par [Amphasys](#). Elle repose sur l'analyse par [impédance](#) en cytométrie de flux de cellules isolées**. Lors de l'application d'un courant électrique alternatif, l'impédance de chaque cellule est mesurée dans une puce microfluidique. L'impédance d'une cellule varie en fonction :

- de la fréquence du courant alternatif,
- de la capacité de la membrane,
- du volume de la cellule,
- de la conductivité du cytoplasme.

Cette technique permet d'**automatiser le comptage des grains de pollen et de mesurer leur viabilité** qui varie en fonction, par exemple, des conditions d'élevage, des génotypes, de l'impact de la température ou des traitements insecticides. **Non-destructive**, elle ne nécessite pas d'avoir recours à des outils optiques ni de marquer les cellules par fluorescence.

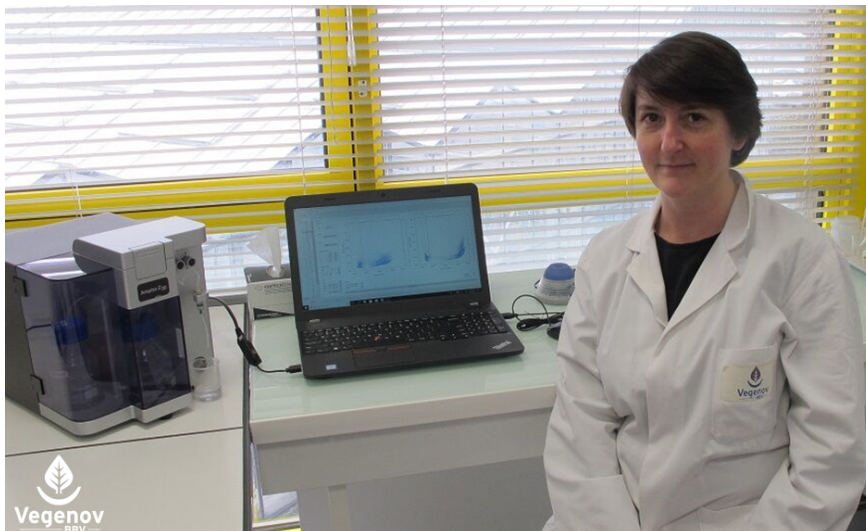
L'automatisation du comptage et de la mesure de viabilité du pollen rend cette phase nettement moins lourde et **plusieurs milliers de cellules peuvent être analysées contre quelques centaines par microscopie**.

La **machine**, baptisée AmphaZ32, a l'avantage d'être **facile à déplacer** et permet d'aller faire des **mesures sur le terrain** si besoin.

En fonction de l'espèce végétale, et suite à des mises au point préalables il est possible de réaliser des analyses encore plus pointues. Cette technique permet le **suivi des stades de développement du pollen** (détection du stade d'avortement des variétés stériles), peut **mesurer le potentiel de germination du pollen** et même différencier les cellules en fonction de leur ploïdie ([Heidman et al., 2016](#)). La calibration des mesures se fait toujours par utilisation des outils classiques de microscopie.

[Vegenov](#) utilise cette technologie depuis plus d'un an pour réaliser différents types d'analyses pour ses clients obtenteurs, semenciers ou producteurs de semences.

Murielle Philippot, ingénieur R&D spécialiste des haplométhodes dans l'équipe de biologie cellulaire témoigne des avantages de l'utilisation de cette nouvelle technique :



*Grâce à l'outil Amphasys, nous avons pu rapidement mettre au point et étudier le développement du pollen chez de nombreuses espèces végétales.*

*En mesurant l'impédance, nous pouvons suivre les différents stades de développement et la viabilité de populations importantes de cellules, de manière **rapide** et très **reproductible**. Auparavant nous faisons ces analyses par comptage suite à coloration et observations microscopiques.*

*L'acquisition de cette technologie nous a permis de **multiplier les analyses, ce qui augmente la fiabilité de nos résultats**.*

*Nous avons également commencé la mise au point de l'analyse des populations de microspores en culture, pour caractériser et suivre de manière fine leur développement durant l'androgenèse.*

Dans un prochain billet, nous vous présenterons plus précisément une étude menée sur cellules isolées en culture.

Références :

[Heidmann I., Schade-Kampmann G., Lambalk J., Ottiger M., Di Berardino M. \(2016\) Impedance Flow Cytometry: A Novel Technique in Pollen Analysis. PLOS ONE 11\(11\): e0165531](#)

Jahier, J. (1992). Techniques de cytogénétique végétale. Editions Quae 183 pages  
<http://www.amphasys.com/>

Cet article a été rédigé conjointement par :

- Manuelle Bodin, Responsable R&D en Biologie Cellulaire
- Juliette Clément, Responsable veille et Recherche Documentaire
- Murielle Philippon, Ingénieur R&D en Biologie Cellulaire