

**UNIVERSITE BORDEAUX 1**

Thèse soutenue le 13 janvier 2011 pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1**

**MENTION : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Spécialité : Biologie Végétale**

Par

**Matthieu BOURDON**

**L'endoréduplication dans le développement du  
fruit de tomate : de la structure à la croissance  
cellulaire**

sous la direction de

**Jean-Pierre RENAUDIN**

**Membres du jury :**

DE ALMEIDA-ENGLER J.	Rapporteur
TRAAS J.	Rapporteur
BESSOULE J.-J.	Examineur
BROWN S.	Examineur
CHEVALIER C.	Président du Jury

# Résumé

## RESUME

Le développement du fruit de tomate s'accompagne d'un phénomène d'endopolyploïdisation (amplification de l'ADN en l'absence de mitose) associé à la croissance cellulaire. Au stade vert mature huit niveaux de ploïdie sont présents (2C à 256C) dans le péricarpe.

Une première partie du travail a porté sur l'étude de la distribution spatiale des niveaux de ploïdie dans ce tissu. Cet objectif a nécessité la mise au point d'une méthode originale de détermination de la ploïdie *in situ* reposant sur la technique de BAC-FISH. Nous avons montré que les cellules les plus polyploïdes se situent dans les assises internes du péricarpe, et qu'elles sont aussi les plus grandes. Ces cellules semblent déjà formées au moment de l'anthèse. Cette cartographie de la ploïdie associée à une analyse de la taille cellulaire a également montré que la taille finale des cellules ne dépend pas uniquement de leur niveau de ploïdie mais également de leur position dans le péricarpe. Enfin, nos résultats suggèrent que l'endopolyploïdisation précède la croissance cellulaire.

Dans une deuxième partie du travail, nous avons étudié la structure des noyaux en microscopie à fluorescence et électronique. L'endopolyploïdisation affecte profondément la taille et la forme des noyaux, qui acquièrent un volume important et une forme complexe avec de profondes invaginations. La taille du nucléole augmente avec celle du noyau, ce qui suggère une activité de transcription accrue. De plus, la présence de nombreuses mitochondries à proximité des noyaux polyploïdes suggère une forte activité métabolique en lien avec l'endopolyploïdisation. L'utilisation de la méthode BAC-FISH a permis également de montrer que la polyploïdie se faisait par endoreduplication avec la formation de chromosomes polytènes.

Dans une troisième partie nous avons cherché, en criblant une banque de mutants Micro-Tom, à identifier des lignées affectées dans l'endoreduplication afin d'étudier l'impact de ce phénomène sur la vitesse de croissance du fruit. Nous avons caractérisé plusieurs familles dont les niveaux moyens de ploïdie variaient par rapport à la lignée de référence. Une de ces familles présente un phénotype stable au cours de deux générations, avec une augmentation d'au moins 30 % de la ploïdie moyenne et une augmentation de la taille des cellules du péricarpe. Cependant cette famille présentant aussi un développement relativement parthénocarpique de ses fruits, sa caractérisation n'a pas pu être poursuivie dans le cadre de ce travail.

*Mots-clés : Tomate, endoreduplication, croissance cellulaire, structure du noyau*

## ABSTRACT

Tomato fruit development includes massive endopolyploidisation events (DNA duplication in the absence of mitoses) within pericarp cells, in which 8 DNA levels from 2 C to 256 C are detected at mature green stage.

The first part of this work dealt with the study of the spatial distribution of ploidy levels in pericarp. To achieve this purpose, a new method for *in situ* ploidy assessment was set up using a BAC-FISH protocol. The main results are 1/ the most polyploid cells are located in central mesocarp cell layers; 2/ the most polyploid cells are also the largest cells; 3/ these cells are likely to be already present in ovary at anthesis. Ploidy mapping has also shown that the final cell size does not depend only on ploidy level but also on cell location in pericarp, and that endopolyploidization is likely set up in tissues before cell expansion.

The structure of the polyploid nucleus was studied by using fluorescence microscopy and electron microscopy. Endopolyploidization profoundly modifies the size and shape of nuclei, which become much larger and acquire a complex shape with deep invaginations. Nucleolus size increases, which is likely related to transcriptional increase. Moreover, the presence of numerous mitochondria in the close vicinity of the nuclear membrane reinforces the hypothesis of increased nuclear and metabolic activity in polyploid cells. The BAC-FISH *in situ* method for ploidy assessment also revealed that endopolyploidization proceeded through polyteny.

In the last part of this work, we screened a tomato Micro-Tom tilling bank for mutants affected in endopolyploidization. The aim was to use tomato lines with distinct ploidy levels to check the influence of ploidy on fruit growth rate. Several mutant families were identified with moderately increased ploidy levels. One of these families exhibited transmissible phenotype through 2 generations, with ploidy increased by ca. 30 % and increased pericarp cell size. As these mutants had also a strongly pronounced parthenocarpic phenotype, their characterization could not be further advanced in the frame of this work.

*Keywords : Tomato, endoreduplication, cell growth, nuclei structure*

# Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut National de la recherche agronomique, dans l'équipe Organogenèse du fruit et Endoreduplication au sein de l'UMR 619 Biologie du fruit. A ce titre j'aimerais vivement remercier Christian Chevalier et Dominique Rolin, pour avoir permis mon intégration au sein de leur équipe et laboratoire, respectivement.

Je remercie aussi mon directeur de thèse, M. Jean-Pierre Renaudin, pour avoir encadré cette thèse.

Je tiens aussi à remercier Mme J. De Almeida Engler et M. J. Traas, qui me font l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que M. S. Brown, J.-J. Bessoule et C. Chevalier en tant qu'examinateurs.

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement Mlle N. Frangne et Mme C. Cheniclet, pour leur encadrement actif de cette thèse et pour les modèles scientifiques et humains qu'elles ont représentés pour moi durant cette thèse. Je les remercie aussi chaleureusement ainsi que M. C. Chevalier pour l'aide inestimable qu'ils ont pu m'apporter lors de la rédaction de ce manuscrit.

De même, je tiens à apporter mes plus grands remerciements à :

\* Olivier Coriton, pour son enseignement en cytogénétique, sa participation active dans nos nombreuses réflexions scientifiques et sa réactivité légendaire à toutes nos questions...

\* Spencer Brown, pour son aide inestimable en cytométrie/microscopie et son approche si unique de la science et de la vie. Il reste à ce jour trop peu de scientifiques aussi mordus que lui étant capables de vous transmettre et de vous faire vivre sa passion en moins de 2 phrases...

\* Ronan Piriou, ami, coloc, à qui revient l'immense mérite de m'avoir supporté, porté et aidé à tous niveaux dans cette entreprise qui a connu des hauts mais aussi bien des bas... Merci mille fois mon ami !

\*Mireia Noguera, quien me ha ayudado a sobrellevar la soledad en la etapa de redacción, consiguiendo siempre hacerme sonreír delante de mi ordenador... y aportándome más, mucho más...

\* El Tomate, el cual me ha permitido disminuir mi estrés durante la redacción y además ver este fruto desde un punto de vista más divertido, sobre todo en los peores momentos...

\* Audrey Abot, pour les longs entretiens téléphoniques de vidage de sac et de tête...

\* Yoan Jacquemin, ami de toujours, pour tous les moments passés depuis le premier jour sur les bancs de la Fac jusqu'au diplôme final.

\* Stève de Bossoreille de Ribou et son indescriptible calme olympien sans qui je n'aurais jamais connu Fela.

\* Isaias, pour sa compagnie inestimable lors de la rédaction en tant que 2<sup>e</sup> coloc' et son remplacement effectif pour quasiment toutes mes tâches ménagères durant cette période...

\* Mes parents (Martine et Jean-Michel Bourdon) et mon petit frère (Alexandre Bourdon) ; jamais je n'aurais pu réaliser ce travail sans leur soutien et leur confiance indéfectibles.

\* Mes collègues : Duyen Prodhomme et Lisa Boureau pour les interminables discussions entreprises ; Je n'oublierais pas non plus Nicolas Viron et son côté pince sans rire et pince tout court ; Antoine Monier, Calimero devant l'éternel ; Christian Kappel, pour ces dégustations vins et fromage inoubliables ; les Fred pour leurs insondables conneries ; Guillaume Ménard pour ces blagues douteuses à souhait et ses changements de fond d'écran inopinés ; Mehdi Nafati et Thomas Guiraud pour les moments les plus studieux entrecoupés de discussions tout aussi studieuses ; Michel Hernould pour son inimitable Humour (oui oui avec un grand « H » !), Yves Gibon pour son apport ineffable à la vie sociale du laboratoire via sa passion pour le baby-foot et enfin encore Nathalie Frangne pour son soutien tant scientifique que moral durant cette thèse et pour toutes nos digressions sans fin lors de nos « pseudo » réunions scientifiques.

\* Aux colocs successifs de l'inimitable « 46 rue Brémontier » : Julie, Bogdan, Jérémy, Pierrot, Orane, Alex, Camille, Fanny et Théo.

\* Enfin à tous mes amis de Bordeaux : Marine, Dimitri, Evelyne, Stéphane, Camille, David, Thibaut, Aurel', Cous', Thierry, Sarah, Mathieu, et tous les autres...

# **Sommaire**

**Abréviations**.....p1

**CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**.....p2

**PARTIE 1 : Influence des variations de ploïdie dans l'évolution**.....p3

1.1. Reproduction sexuée, ploïdie et cycle de vie .....p3

1.2. Reproduction sexuée, polyploïdisation et spéciation.....p6

1.3. Cycle cellulaire, endopolyploïdisation et croissance.....p9

**REFERENCES INTRODUCTION PARTIE 1**.....p15

**PARTIE 2 : Chapitre d'ouvrage : Endoreduplication and growth of fleshy fruits**.....p18

**PARTIE 3 : Endopolyploïdisation : conséquences structurales et implications**.....p51

**fonctionnelles**

3.1. Endopolyploïdisation, différenciation, croissance et modalités d'action.....p51

3.2. Influence de l'endopolyploïdisation sur l'expression génétique.....p53

3.2.1. Augmentation globale du niveau de transcription.....p53

via l'amplification fonctionnelle du génome.

3.2.2. Endopolyploïdie et régulation de l'expression génétique.....p54

3.2.3. Spatialisation du génome et expression génétique.....p56

3.3. Caractéristiques cellulaires de la cellule polyploïde.....p62

3.3.1. Organisation et différenciation de l'enveloppe .....p62

nucléaire lors de l'endopolyploïdisation

3.3.2. Organisation et évolution du cytoplasme en .....p64

relation avec l'endopolyploïdie

3.4. Objectifs du travail de thèse.....p66

**REFERENCES INTRODUCTION PARTIE 3**.....p68

<b><u>CHAPITRE 2 : RESULTATS</u></b> .....	p74
<b><u>PARTIE 1 : ARTICLE 1</u></b> :.....	p75
<i>In planta</i> quantification of endoreduplication using Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization (FISH)	
<b><u>PARTIE 2 : ARTICLE 2</u></b> .....	p109
Structural analysis of endopolyploid nuclei from tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) fruit cells	
<b><u>PARTIE 3 : CRIBLAGE DE LA BANQUE DE MUTANTS TILLING MICRO-TOM</u></b> .....	p140
Recherche de mutants affectés dans l'endoréduplication	
<b><u>CHAPITRE 3 : DISCUSSION – CONCLUSION</u></b> .....	p165
1. <u>Contexte et problématique</u> .....	p165
2. <u>Implication de l'endopolyploïdisation dans la croissance cellulaire</u> .....	p166
3. <u>Amplification fonctionnelle du génome et profils d'expression</u> .....	p171
<u>associés à l'endopolyploïdisation</u>	
4. <u>Supra-organisation et ergonomie de la cellule endopolyploïde</u> .....	p172
5. <u>CONCLUSION</u> .....	p178
<b><u>REFERENCES DISCUSSION – CONCLUSION</u></b> .....	p179
<b><u>ANNEXES : PRODUCTION SCIENTIFIQUE</u></b> .....	p181

# **Abréviations**

## **Acides nucléiques et nucléotides**

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adenosine 5' triphosphate
Kb, Mb	kilobase, mégabase
kDa, MDa	Kilodalton, Mégadalton
RNA Pol II	RNA polymérase II
TC	Territoire chromosomique

## **Unités**

°C	degré Celsius
g	accélération
rpm	round per minute
s, min, h	seconde, minute, heure
EI	Endoreduplication Index
MCV :	Mean C Value

## **Divers**

2-D , 3-D	deux dimensions; trois dimensions
GFP	Green Fluorescent Protein
BY-2	lignée cellulaire de Tabac ayant pour origine le cultivar BY-2 (Bright Yellow – 2)
RE	Réticulum Endoplasmique
EMS	Ethyl Methyl Sulfonate
BSA	Bovine Serum Albumin
cv	Cultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
FISH	Fluorescent in situ Hybridization
SSC	tampon "saline-sodium citrate"
TBS	tampon "tris buffer sakine"
NOR	Nucleolar Organizing Regions
DIOC6(3),	Dihexyloxacarbocyanine iodide
TEM	Transmission Electron Microscopy

# **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

Chez les eucaryotes, la réplication de l'information génétique est assurée au cours d'un cycle cellulaire aboutissant à 2 processus de division nucléaire: la mitose et la méiose. Quel que soit le processus, le maintien conservatif de cette information passe alors par l'alternance de phases de ploïdies distinctes  $n$  et  $2n$ . En conséquence, les eucaryotes ont développé au cours de l'évolution une tolérance envers les changements de ploïdie (Gerstein and Otto 2009). Cette tolérance a sans doute permis l'émergence d'autres évènements conduisant à des modifications de ploïdie, pérennisés soit au sein d'organes ou de lignées cellulaires (endopolyploïdisation), soit au sein d'organismes entiers (auto- et allo-polyploïdisation). Ce faisant, les variations de ploïdie ont une importance non négligeable dans l'histoire évolutive des eucaryotes, influençant la mise en place d'un cycle de reproduction particulier, d'un phénotype ou d'un organe, voire favorisant l'apparition de nouvelles espèces.

Nous développerons dans une première partie l'influence évolutive des variations de ploïdie les plus représentatives chez les eucaryotes. Dans une deuxième partie, nous insisterons sur une forme particulière de changement de ploïdie, l'endopolyploïdisation, et sur le rôle qu'elle pourrait jouer au sein d'un organe végétal particulier, à savoir le fruit. Nous ferons ensuite le point sur l'impact moléculaire et cellulaire de ce phénomène, et nous terminerons cette introduction en présentant les objectifs de ce travail, visant à mieux cerner le rôle de l'endopolyploïdisation au cours du développement du fruit de Tomate.



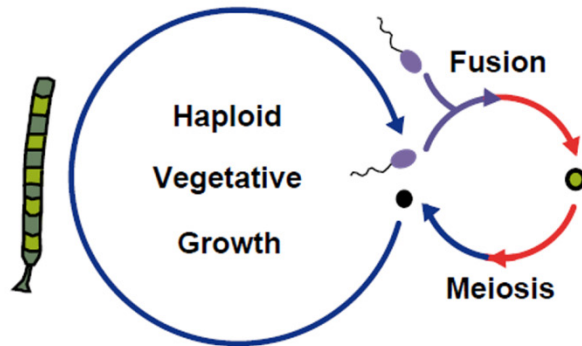
# **PARTIE 1 : Influence évolutive des variations de ploïdie dans l'évolution**

## **1.1. Reproduction sexuée, ploïdie et cycle de vie**

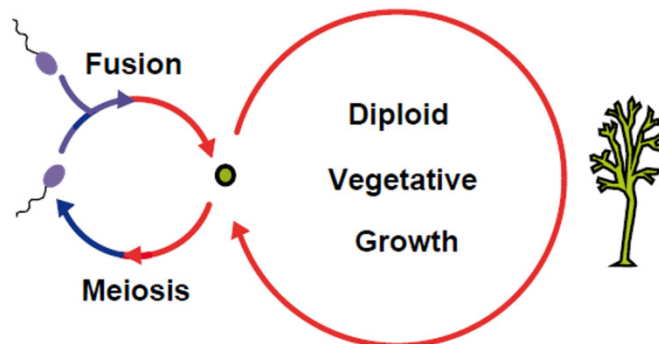
L'apparition de la méiose, et donc de la reproduction sexuée, outre la variabilité génétique qu'elle apporte par le jeu des recombinaisons entre chromosomes, a entraîné l'alternance de générations (cycles de vie) haploïdes et diploïdes (Mable and Otto 1998) (Figure 1).

Chez les Embryophytes l'évolution tend vers une réduction de la durée de la phase haploïde et une dominance de la phase diploïde (Figure 2). Une telle observation suggère donc un avantage sélectif de la diploïdie envers l'haploïdie. En effet, étant donné que la plupart des mutations affectant négativement la valeur adaptative (fitness) sont partiellement récessives, et que l'apparition d'allèles mutants dans une population est rare, alors il est improbable qu'un individu diploïde provenant d'un croisement aléatoire porte les deux copies mutantes du même allèle. A l'inverse, des individus haploïdes expriment chacune des mutations de leur génome. De cette manière, des individus à phase diploïde dominante auraient une meilleure valeur adaptative, et la génération diploïde serait sélectivement favorisée. Cependant, la contrepartie à une telle « stratégie » évolutive, bénéfique pour la survie de l'individu, est représentée par la fixation d'allèles mutants dans la descendance. Par conséquent, les populations haploïdes tendent à porter moins de mutations délétères dans leur génome et auraient alors une meilleure valeur adaptative à l'équilibre que les populations diploïdes.

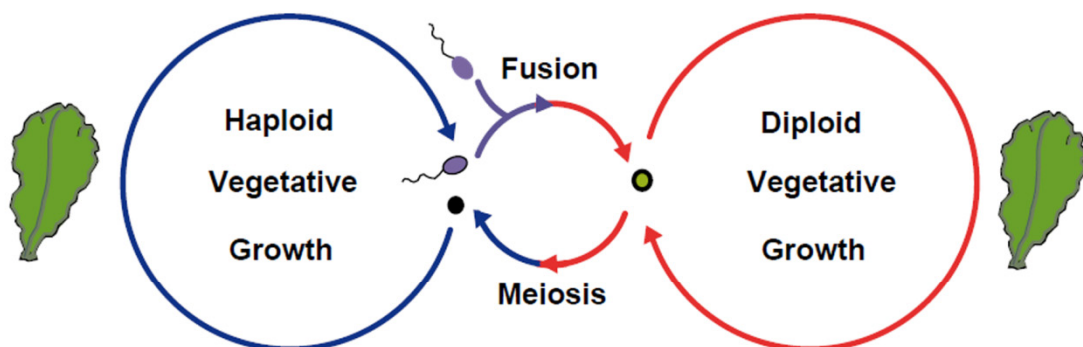
### a) Haplontic Life Cycle



### b) Diplontic Life Cycle



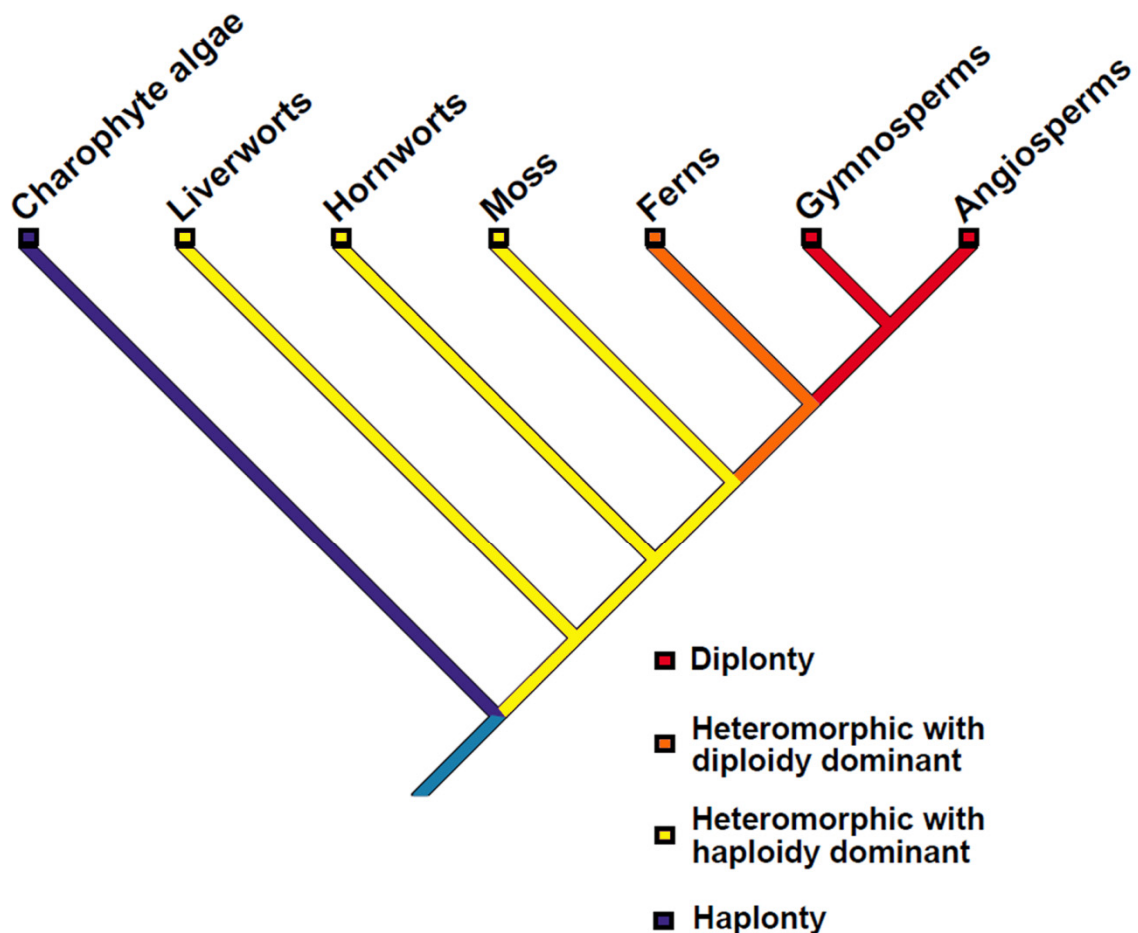
### c) Haploid-Diploid Life Cycle



**Figure 1 - Diversité des cycles de vie (adapté de Mable et Otto, 1998).**

Les phases végétatives des cycles sont représentées par les cercles les plus larges et les phases reproductives par les cercles les plus petits. **a** : cycle de vie haplophasique. Les divisions mitotiques ont lieu exclusivement pendant la phase haploïde. Les gamètes fusionnent pour former un zygote (cercle vert) dont la première division est méiotique, produisant des spores haploïdes (cercle noir). Exemple : *Ulothrix*, une algue verte. **b** : cycle de vie diplophasique. Les divisions mitotiques ont lieu exclusivement pendant la phase diploïde. la phase haploïde est réduite aux gamètes uni-cellulaires, qui fusionnent immédiatement pour recréer la phase diploïde. Exemple : *Fucus*, une algue brune. **c** : cycle de vie haplo-diplophasique. Le développement a lieu pendant les deux phases haploïdes et diploïdes. Exemple : *Ulva*, une algue verte, organisme haploïde-diploïde isomorphe, avec un gamétophyte haploïde et un sporophyte .. quasiment identique en morphologie. Alternativement, les deux phases peuvent différer dans leur morphologie (alternance de générations hétéromorphes).

Une autre hypothèse avancée pour expliquer l'avantage de la diploïdie concerne la vitesse d'évolution. Un individu diploïde possède deux copies du génome haploïde, donc si la probabilité de mutation est constante, alors un génome diploïde subira deux fois plus d'évènements de mutations que son pendant haploïde. Cependant, le bénéfice de ces mutations pourrait aussi être masqué par le jeu de dominance/récessivité imposé par la paire d'allèles présente chez les diploïdes. En ce sens, le gain apporté par la mutation ne pourrait accroître la vitesse d'évolution du diploïde contre celle de l'haploïde que si la mutation bénéfique s'avère dominante.



**Figure 2 - Evolution des cycles de vie chez les plantes (adapté de Mable et Otto, 1998).** La tendance évolutive est décrite ici : de l'haploïdie (bleu), vers la diploïdie (rouge), à travers l'hétéromorphie à phase haploïde dominante (jaune) et l'hétéromorphie à phase diploïde dominante (orange).

Malheureusement, peu de données expérimentales permettent d'expliquer de façon satisfaisante l'adoption d'un cycle de vie plutôt qu'un autre. La sauvegarde de

cycles de vie très variés au cours de l'évolution des eucaryotes suggère qu'il n'existe pas d'avantage évolutif définitif d'une phase chromosomique sur une autre. En revanche, le large degré des variations observées suggère que la stratégie de cycle de vie peut être vue comme un caractère variable encore soumis à des modifications évolutives. Ce faisant, il offre l'opportunité pour une espèce donnée d'évoluer vers une tendance plutôt qu'une autre en fonction de la pression sélective du milieu, la tendance retenue étant la forme la plus à même d'assurer la survie de l'espèce au sein de ce milieu.

## **1.2. Reproduction sexuée, polyploïdisation et spéciation**

Outre l'alternance de phases haploïde et diploïde au cours du cycle de vie d'un organisme, d'autres situations peuvent aboutir à l'apparition d'évènements de polyploïdisation produisant des individus avec une ou plusieurs copies du ou des génomes parentaux. Deux types de polyploïdisations sont distingués dans ce cadre : l'autopolyploïdisation et l'allopolyplôïdisation, selon qu'elles concernent le rassemblement de génomes diploïdes semblables ou différents (hybridation intra- ou inter-spécifique) (Otto 2007, Otto and Whitton 2000). Elles peuvent provenir d'une non-réduction gamétique (erreur de déroulement de la méiose), d'un doublement génomique (erreur de déroulement de la mitose) ou de polyspermie (plusieurs gamètes mâles fécondant un ovule) (Gerstein and Otto 2009). Le mode de polyploïdisation privilégié chez les plantes semble être la non-réduction gamétique, alors qu'au sein du règne animal, ce mécanisme semble aussi dû à la polyspermie. Cependant, chez les mammifères et les oiseaux, il semble moins toléré en raison de problèmes d'empreintes génétiques et de développement placental. Chez les plantes, la fréquence d'apparition de ce phénomène semble importante. Afin d'estimer le nombre d'évènements de polyploïdisation ancestraux, le nombre de chromosomes au sein de chaque espèce considérée a été mesuré et l'excès d'un

nombre pair de chromosomes par rapport aux nombres impairs est considéré comme un bon indicateur d'évènements de polyploïdisation passés (Otto, 2007). En effet, si l'on part du postulat que le nombre de chromosomes  $n$  d'un génome a autant de chances d'être un chiffre pair ou impair, alors l'observation d'un excès de nombres pairs dans un lot d'espèces donné reflète un nombre important d'évènements de polyploïdisations. Selon ce critère, 42 % des fougères, 32 % des monocotylédones et 18 % des dicotylédones auraient subi au moins un évènement de polyploïdisation au cours de leur évolution.

L'apport évolutif de ces mécanismes reste, comme les variations des cycles de vie évoquées plus haut, difficile à déterminer. On peut reprendre une partie des arguments cités dans la partie précédente comme le masquage des mutations délétères et l'augmentation de la vitesse d'évolution, cependant les contreparties évoquées restent les mêmes. Ainsi, la vitesse d'évolution des polyploïdes serait accrue seulement si les mutations bénéfiques y ayant lieu présentent un caractère dominant.

On peut alors se demander pourquoi l'évolution semble avoir conservé autant d'organismes présentant des évènements de polyploïdisation ? Tout d'abord par un apport de nouveaux gènes et de nouveaux allèles, favorisant la variabilité génétique et potentiellement le pouvoir adaptatif de l'individu néo-formé. Même si l'apport de variabilité semble plus important dans le cas de l'allopolyplôïdisation puisque rassemblant des génomes d'espèces différentes, l'autopolyploïdisation n'est pas en reste en termes de variabilité apportée en réalisant une combinaison complexe et inédite d'allèles provenant des deux parents et favorisant ainsi l'hétérozygotie (Osborn *et al.* 2003). Ensuite, le doublement du génome offre la potentialité de néofonctionnalisation de gènes tout en conservant les fonctions d'origine. L'apparition de

nouvelles fonctions pourrait donc permettre une meilleure adaptation à l'environnement *via* un spectre de réponses biologiques plus large.

Enfin, les polyploïdes nouvellement formés ont un génome plutôt instable et subissent beaucoup de réarrangements chromosomiques (Wendel, 2000). En effet, des recombinaisons non-homologues sont hautement probables entre chromosomes homéologues (cas des allopolyploïdes). En altérant ainsi le contexte génomique de certains gènes, ces réarrangements peuvent alors augmenter la variabilité génétique de la lignée polyploïde nouvellement formée. On observe aussi une forte variation dans l'expression génétique, souvent associée à la divergence des génomes parentaux (et donc à l'allopolyploïdie). Inversement, une plus faible variation de l'expression est attendue chez les autopolyploïdes (Galitski *et al.* 1999, Guo *et al.* 1996)

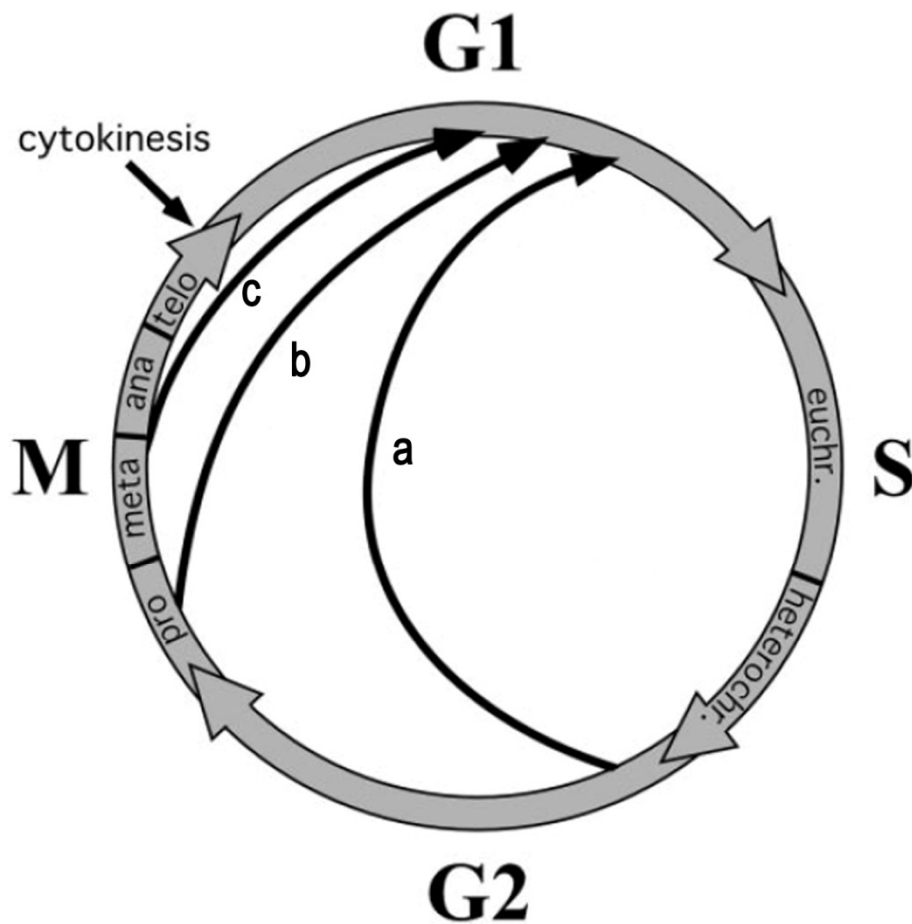
Ainsi, le rôle de la polyploïdisation dans l'évolution pourrait s'effectuer par la néo-fonctionnalisation de gènes par duplication du génome, et par la variabilité génétique apportée par l'allopolyploïdisation et l'autopolyploïdisation. Le potentiel évolutif offert par ce phénomène, engendrant des lignées génétiquement différentes de leurs géniteurs capables d'envahir de nouvelles niches écologiques serait alors à l'origine de la réussite évolutive des polyploïdes. En ce sens, les évènements de polyploïdisation sont considérés comme un mécanisme majeur dans la création de nouvelles espèces, et plus particulièrement les évènements d'allopolyploïdisation (Soltis and Soltis 2009).

Nous avons ainsi vu que le génome eucaryote recelait une certaine plasticité lui permettant de gérer des doublements génomiques. Nous terminerons cette première partie en abordant un mode de polyploïdisation dont l'impact adaptatif et/ou évolutif a été moins discuté : l'endopolyploïdisation.

### **1.3. Cycle cellulaire, endopolyploïdisation et croissance**

L'existence de l'endopolyploïdisation illustre la notion de flexibilité du cycle nucléaire eucaryote. Ce phénomène consiste en l'augmentation locale du nombre de copies d'un génome par cellule. Il résulte d'un arrêt programmé du cycle cellulaire postérieurement à la phase de synthèse de l'ADN et antérieurement à la phase de mitose, doublant ainsi la quantité d'ADN à chaque endocycle et conduisant donc à l'apparition de plusieurs niveaux de ploïdie au sein d'un même organisme (Barow 2006, Edgar and Orr-Weaver 2001, Joubès and Chevalier 2000) (Figure 3). Ce type de polyploïdie ayant lieu au sein de tissus somatiques, elle est aussi appelée polyploïdie terminale et serait fortement impliquée dans la croissance cellulaire et la différenciation (Edgar and Orr-Weaver 2001, Hulskamp 2004). On la retrouve dans de nombreux taxons pluricellulaires incluant les algues, les champignons, les plantes et les animaux (Figure 4).

Chez les animaux, (Gregory and Hebert 1999) mentionnent la présence de l'endopolyploïdisation dans chaque espèce animale testée avec une prévalence chez les arthropodes. En effet, les insectes paraissent les plus concernés par ce phénomène, avec les exemples bien connus des glandes salivaires et des cellules nourricières des larves de drosophile et de *Bombyx mori*. Chez les mammifères, les tissus et/ou cellules les plus étudiés ayant recours à ce mécanisme sont les mégakaryocytes (précurseurs des plaquettes sanguines, (Raslova *et al.* 2007)), les hépatocytes (cellules du foie (Lu *et al.* 2007)) et les cellules du trophoblaste (tissu nourricier de l'embryon, (Varmuza *et al.* 1988)). Les degrés d'endopolyploïdisation sont variables et dépendent de l'organisme et même du tissu considéré.

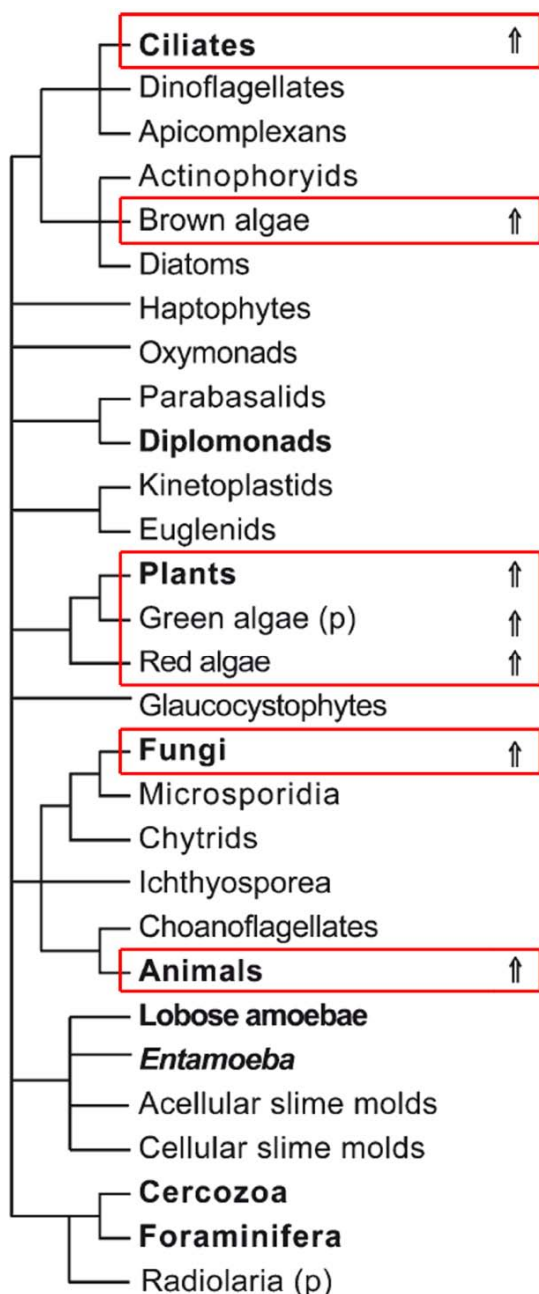


**Figure 3 - Dynamiques d'évitement de la mitose par endocycle (adapté de Edgar et Orr-Weaver, 2001).** a : cellules nourricières de l'ovaire de drosophile . b : cellules géantes du trophoblaste mammifère. c : endomitose chez les mégakaryocytes mammifères. Légende - euchr. : euchromatine ; hetero. : hétérochromatine ; pro : prophase ; meta : métaphase ; ana : anaphase ; telo : télophase.

En effet, alors que les mégakaryocytes et les hépatocytes atteignent des niveaux de ploïdie assez faibles (32C et 8C, (Raslova, *et al.* 2007, Vinogradov *et al.* 2001)), les cellules des glandes salivaires de larve de drosophile et du trophoblaste de mammifères peuvent atteindre des valeurs de 1024C (Smith and Orr-Weaver 1991, Zybina and Zybina 1996) et le cas le plus extrême est celui des cellules des glandes salivaires productrices de soie de *Bombyx mori* atteignant  $10^6$ C (D'Amato and Durante 2001, Gregory and Hebert 1999). En fonction de l'étape à laquelle le cycle cellulaire est stoppé, on peut distinguer plusieurs types d'endocycles : l'arrêt est antérieur à la métaphase, les chromatides filles restent attachées au même centromère et l'endocycle est appelé cycle endoréductif (Figure 3a et 3b,



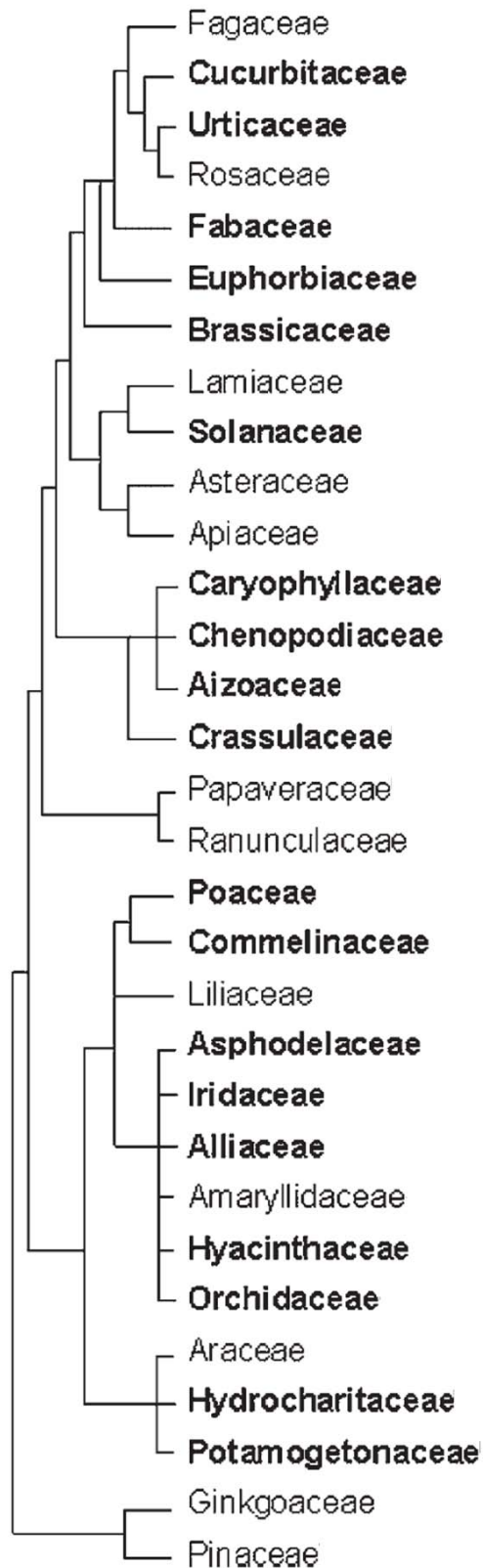
exemples des cellules nourricières de l'ovaire de drosophile et du trophoblaste mammifère); l'arrêt est postérieur à la métaphase, les chromatides filles sont séparées les unes des autres et l'endocycle est nommé alors cycle endomitotique (Figure 3c, exemple des mégakaryocytes mammifères) (Edgar and Orr-Weaver 2001).



**Figure 4 - Occurrence de l'endopolyploïdisation chez les principaux taxons eucaryotes (adapté de Parfrey et al. 2008).** La présence d'endopolyploïdisation est indiquée par une flèche (↑) et un encadré rouge.

Chez les plantes, l'endopolyploïdie semble aussi largement représentée, bien que quasiment absente chez les gymnospermes et les fougères ((Barow M. and A. 2003), (Jillian D. Bainard 2010). Cependant, la représentation de ce phénomène a

été récemment étudiée au sein des Bryophytes (Mousses, Hépatiques et Anthocérotes), groupe représentant les plantes les plus proches des premiers Embryophytes, dans le but de mieux comprendre l'évolution de l'endopolyploïdie (Jillian D. Bainard 2010). Les auteurs ont remarqué une forte présence de l'endopolyploïdisation chez les mousses, excepté pour la famille des sphaignes, et une quasi absence chez les Hépatiques. De cette étude, les auteurs ont alors conclu que l'endopolyploïdie aurait probablement évolué de manière indépendante dans les différents taxons végétaux, au vu des différences observées chez les Bryophytes ainsi que chez les angiospermes. En effet, les angiospermes recèlent un grande représentation de mécanisme, et ce à divers degrés (Figure 5, (Barow 2006)). Cependant, (Barow M. and A. 2003) n'ont pu mettre en évidence une filiation phylogénétique de l'endopolyploïdisation au-delà de cette échelle taxonomique. Chez les plantes, comme chez les animaux, les cellules et tissus s'endopolyploïdisant sont multiples et les niveaux de ploïdie retrouvés dans ces structures dépendent autant de l'organisme que de l'organe considéré. L'endopolyploïdie a ainsi été rapportée dans l'hypocotyle (*Arabidopsis thaliana*, 8-16C, (Gendreau *et al.* 1997)), le cortex racinaire (*Arisamea* et *Zea*, jusqu'à 32C, (List 1963) les tiges (*Bryona dioica*, 16C, (Barow 2006)), les feuilles (*Arabidopsis thaliana*, 8-16C, (Galbraith *et al.* 1991)) les trichomes (*Arabidopsis thaliana*, 64C, (Hulskamp 2004)), l'albumen (*Zea mays*, 96C, (Kowles and Phillips 1985)) et les cellules du sac embryonnaire (*Haustaria*, jusqu'à 24576C, (Nagl 1975)). Il a aussi été montré que le fruit pouvait atteindre des niveaux de ploïdie très élevés (*Solanum lycopersicum*, 512C, (Cheniclet *et al.* 2005)).



**Figure 5 - Occurrence de l'endopolyploïdisation chez les Angiospermes (tiré de Barow et Meister, 2006).** Les familles représentées en gras contiennent une majorité d'espèces s'endopolyploïdisant (cf Barow et Meister 2006 pour liste précise de références).

D'un point de vue évolutif, la mise en évidence d'une corrélation négative entre la taille du génome et la probabilité d'apparition de l'endopolyploïdie a conduit Nagl (1975) à considérer l'endopolyploïdisation comme une alternative évolutive à l'augmentation de la taille du génome. En effet, cet auteur émet l'hypothèse d'une

quantité minimale d'ADN nécessaire à certaines fonctions cellulaires. Cependant, cette hypothèse a été récemment remise en cause en démontrant la faiblesse de la corrélation citée plus haut sur un plus grand échantillonnage (Barow and Meister 2003). Ces auteurs mettent alors plutôt en avant une implication de l'endopolyploïdisation dans la vitesse de croissance de l'organe considéré ou dans l'accomplissement rapide d'un cycle de vie. Malgré tout, la corrélation négative observée entre endopolyploïdisation et durée du cycle de vie s'est elle aussi révélée assez faible (Barow and Meister 2003), indice que l'endopolyploïdisation aurait un rôle plus étendu que l'accomplissement rapide d'un cycle de vie.

Nous émettrons alors une hypothèse plus générale. En effet, la fréquente apparition de l'endopolyploïdie au sein des différents taxons eucaryotes suggère qu'elle apporte une amélioration de la valeur adaptative (fitness) *via* l'amélioration de la fonction de l'organe dans lequel elle a lieu. Contrairement aux variations de ploïdie impliquant une variation constitutive de la taille du génome (cf parties précédentes), l'impact de l'endopolyploïdie sur le phénotype sera plus localisé, étant restreinte à certains organes ou types cellulaires. Cependant, les caractères mis en jeu ont souvent un rôle important dans la valeur adaptative de l'individu (Gregory and Hebert 1999). Ces auteurs citent ainsi les exemples de la formation de cellules nourricières chez l'embryon de nombreux arthropodes ou même celui du changement de morphologie de la tête chez *Daphnia* – qui mime la tête d'un prédateur - faisant suite à l'endopolyploïdisation. Chez la tomate et plusieurs autres angiospermes, la mise en place de très hauts niveaux de ploïdie dans le fruit et son impact sur le développement de l'organe ont alors sans doute permis l'amélioration de la valeur adaptative de la plante *via* l'amélioration du rôle préexistant que jouait le fruit : la protection de l'embryon en développement et sa dispersion dans l'environnement (Bourdon, *et al.* 2010, Gillaspy, *et al.* 1993).

Cependant, l'implication de l'endopolyploïdie est restée moins étudiée dans le développement du fruit que chez l'hypocotyle, la feuille et le trichome d'*Arabidopsis thaliana*, ou l'albumen de certaines monocotylédones qui constituent les principaux modèles d'études de ce phénomène chez les plantes.

## **REFERENCES INTRODUCTION PARTIE 1**

- Barow, M.** (2006) Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, **28**, 271-281.
- Barow, M. and Meister, A.** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell and Environment*, **26**, 571-584.
- Barow M. and A., M.** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell & Environment*, **26**, 571-584.
- Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. In *Progress in Botany 71*, pp. 101-132.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.*, **139**, 1984-1994.
- D'Amato, F. and Durante, M.** (2001) *Polyploidy*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L.** (2001) Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell*, **105**, 297-306.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R. and Knapp, S.** (1991) Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Name: Plant Physiology; (United States); Journal Volume: 96:3, Medium: X; Size: Pages: 985-989.*
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R.** (1999) Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **114**, 295-305.
- Gerstein, A.C. and Otto, S.P.** (2009) Ploidy and the Causes of Genomic Evolution. *Journal of Heredity*.

- Gillaspy, G., Bendavid, H. and Gruissem, W.** (1993) FRUITS - A DEVELOPMENTAL PERSPECTIVE. *Plant Cell*, **5**, 1439-1451.
- Gregory, T.R. and Hebert, P.D.N.** (1999) The Modulation of DNA Content: Proximate Causes and Ultimate Consequences. *Genome Research*, **9**, 317-324.
- Guo, M., Davis, D. and Birchler, J.A.** (1996) Dosage Effects on Gene Expression in a Maize Ploidy Series. *Genetics*, **142**, 1349-1355.
- Hulskamp, M.** (2004) Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 471-480.
- Jillian D. Bainard, S.G.N.** (2010) Endopolyploidy in Bryophytes: Widespread in Mosses and Absent in Liverworts. *Journal of Botany*, **2010**.
- Joubès, J. and Chevalier, C.** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **43**, 735-745.
- Kowles, R.V. and Phillips, R.L.** (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 7010-7014.
- List, A., Jr.** (1963) Some Observations on DNA Content and Cell and Nuclear Volume Growth in the Developing Xylem Cells of Certain Higher Plants. *American Journal of Botany*, **50**, 320-329.
- Lu, P., Prost, S., Caldwell, H., Tugwood, J., Betton, G. and Harrison, D.** (2007) Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. *Mammalian Genome*, **18**, 617-626.
- Nagl, W.** (1975) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature, UK*, **261**, 614-615.
- Osborn, T.C., Chris Pires, J., Birchler, J.A., Auger, D.L., Jeffery Chen, Z., Lee, H.-S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V. and Martienssen, R.A.** (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, **19**, 141-147.
- Otto, S.P.** (2007) The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell*, **131**, 452-462.
- Otto, S.P. and Whitton, J.** (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, **34**, 401-437.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Le Roux, D.T., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., Lazar, V. and Vainchenker, W.** (2007) Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*, **109**, 3225-3234.

- Smith, A.V. and Orr-Weaver, T.L.** (1991) The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. *Development*, **112**, 997-1008.
- Soltis, P.S. and Soltis, D.E.** (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 561-588.
- Varmuza, S., Prideaux, V., Kothary, R. and Rossant, J.** (1988) Polytene chromosomes in mouse trophoblast giant cells. *Development*, **102**, 127-134.
- Vinogradov, A.E., Anatskaya, O.V. and Kudryavtsev, B.N.** (2001) Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals. *Genome*, **44**, 350-360.
- Zybina, E.V. and Zybina, T.G.** (1996) Polytene chromosomes in mammalian cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 165*, **165**, 53-119.

**PARTIE 2 : Chapitre d'ouvrage : Endoreduplication and growth of fleshy fruits**



# Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits

Matthieu Bourdon, Nathalie Frangne, Elodie Mathieu-Rivet, Mehdi Nafati,  
Catherine Cheniclet, Jean-Pierre Renaudin, and Christian Chevalier

## Contents

1	Introduction .....	102
2	Fruit Development and Growth .....	103
2.1	Carpel Morphogenesis and Fruit Set .....	103
2.2	Fruit Growth .....	104
2.3	Cell Division During Fruit Growth .....	106
2.4	Cell Expansion During Fruit Growth .....	108
3	Endopolyploidization .....	109
3.1	Definitions .....	109
3.2	Occurrence of Endopolyploidization in Fruit Species .....	110
3.3	Cellular Aspects of Endoreduplication .....	112
4	Proposed Physiological Roles for Endoreduplication .....	114
4.1	Endoreduplication and the Determination of Cell- and Organ Size .....	114
4.2	Endoreduplication and Cell Differentiation .....	116
4.3	Endoreduplication and Metabolism .....	116
4.4	Endoreduplication in Response to Environmental Factors .....	117
4.5	Endoreduplication and Growth Rate .....	117
5	Molecular Control of Endoreduplication .....	118
5.1	The Canonical Cell Cycle .....	118
5.2	The Endocycle .....	119
6	Concluding Remarks .....	125
	References .....	126

**Abstract** The fruit is a specialized organ, which results from the development of the ovary after successful flower pollination and fertilization, and provides a suitable environment for seed maturation and seed dispersal mechanisms. Due to

---

M. Bourdon, E. Mathieu-Rivet, M. Nafati, C. Cheniclet and C. Chevalier (✉)  
INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UMR619 Biologie du Fruit, F-33883,  
Villenave d'Ornon, France  
e-mail: chevalie@bordeaux.inra.fr

M. Bourdon, N. Frangne, E. Mathieu-Rivet, M. Nafati and J.-P. Renaudin  
Université de Bordeaux, UMR619 Biologie du Fruit, F-33883, Villenave d'Ornon, France

their importance in human nutrition and their economic inference, fleshy fruit species have been the subject of developmental studies, mostly devoted to ovary formation, fruit set, and fruit maturation. The growth phase of the fruit has been much less addressed, although the complex interplay between cell division and cell expansion during this period is a crucial determinant of the final size, weight and shape of fruits. This chapter aims at reviewing our current knowledge on fleshy fruit development and addresses the cellular and molecular mechanisms involved in their growth, with a special emphasis on the cell expansion associated process of endoreduplication, with tomato fruit as the model species for fleshy fruits.

## 1 Introduction

The fruit is a plant organ specific to Angiosperms, which typically contains the seeds. At the botanical level, most fruits develop from mature ovaries and, therefore, include carpel tissues in part or whole. Additionally, many species develop mature fruit tissues from extracarpellary floral components, e.g., strawberry, pineapple, mulberry, and pome fruits (apple, pear), in which the receptacle, bracts, calyx, and floral tube (the fused base of floral organs), respectively constitute the majority of mature fruit tissue (Coombe 1976; Gillaspay et al. 1993; Nitsch 1953). The fruit has evolved in Angiosperms to fulfill ovule and seed protection during embryo development, and seed dispersal after maturation. This important physiological function accounts for a significant part of the adaptive success of Angiosperms. As such, the fruit has been under strong selective pressure, which accounts for the very wide diversity of fruit size, form and composition, and of seed and fruit dispersion mechanisms. These mechanisms range from the small, nondehiscent akene dry fruit, dispersed by wind, to the large, fleshy, and juicy berry and drupe fruits, which have to be eaten by animals, such as mammals or birds for seed dispersion and germination. As an example, the Solanaceae family, which encompasses nearly 10,000 species, has very diverse types of fruits, with capsules, drupes, pyrenes, berries, and several sorts of dehiscent noncapsular fruits occurring in more than 90 genera (Knapp 2002).

According to common use, fruit refers to the fleshy, edible fruits, such as grape, banana, tomato, citrus, cucurbits, pomes, stone fruit, and mango. These species are subjected to major agricultural production, which rely on permanent selection and improvement in yield and quality. Their common feature is tissues that accumulate water and many organic compounds, such as sugars, organic acids, pigments, flavor and aromas, and vitamins, which bestow their juiciness and attractiveness. Most fundamental knowledge exists about the control of maturation of fleshy fruit (Giovannoni 2001, 2004), and their postharvest handling (Brecht et al. 2003; Soliva-Fortuny and Martin-Belloso 2003), and more recently, about the processes involved in carpel morphogenesis and fruit set by using the model dry fruit of

*Arabidopsis thaliana* (Ferrandiz 2002; Ferrandiz et al. 1999; Roeder and Yanofsky 2006). Surprisingly, in the past 50 years, only a few reviews have addressed the molecular, cellular, and physiological events that control growth and differentiation in fleshy fruits (Bollard 1970; Coombe 1976; Gillaspay et al. 1993; Nitsch 1953, 1965, 1970; Varga and Bruinsma 1986). However, this developmental phase represents by far most of the total duration of fruit development, and is obviously associated with many parameters determining fruit quality, such as fruit size, shape, and composition.

Most recent studies on fleshy fruit growth have focused on tomato, *Solanum lycopersicum* (Gillaspay et al. 1993; Giovannoni 2004; Srivastava and Handa 2005; Tanksley 2004), a crop of the Solanaceae, which produces a multicarpellar berry. This crop is of strong economical importance, and for which numerous genetic (<http://tgrc.ucdavis.edu/>) and molecular (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) resources have been developed. In tomato, high levels of endopolyploidy occur in the course of fruit growth (Bergervoet et al. 1996; Bertin et al. 2007; Cheniclet et al. 2005; Joubès et al. 1999). This review deals with the cellular and molecular mechanisms involved in the growth of fleshy fruit, with a special emphasis on endopolyploidy and tomato fruit development.

## 2 Fruit Development and Growth

### 2.1 Carpel Morphogenesis and Fruit Set

Fruits typically develop from pre-existing organs, such as carpels inside flowers. The first phase of fruit development represents the morphogenesis and growth of carpels and ovules, from flower initiation to the double fecundation occurring in ovules (Gillaspay et al. 1993; Tanksley 2004). The ontogenic relationship between carpel and leaf has been emphasized (Gillaspay et al. 1993) and the genetic network responsible for carpel and ovule development has been thoroughly analyzed in *A. thaliana* (Ferrandiz et al. 1999). In grape, tomato, and apple, carpels are formed by ca. 17–20 rounds of cell divisions during this prebloom period, with virtually no cell expansion (Coombe 1976; Ho 1992). These divisions occur in the L3 layer of the floral meristem in a coordinated developmental pattern.

The number of cells formed in the ovary before anthesis is an important determinant of the potential final size in many fruits. This explains why fruits from early opening flowers are larger at maturity than those from later blooms (Coombe 1976). In addition, in many species including tomato (Bohner and Bangerth 1988a, 1988b; Frary et al. 2000; Tanksley 2004) and kiwi fruit (Cruz-Castillo et al. 2002), ovary size at anthesis and mature fruit size are frequently correlated positively. More work is needed to unravel the effect of internal cues,

e.g., sink effects (Ho 1992), and external ones, e.g., temperature (Bertin 2005; Higashi et al. 1999) on this phenomenon.

## 2.2 *Fruit Growth*

Shortly before anthesis, growth usually stops in the ovary. The second phase of fruit development, i.e., fruit growth, resumes only after pollination by compatible pollen and then fertilization (i.e., at fruit set). A major issue for understanding fruit growth is to decipher the signals and their mode of action, which simultaneously induce corolla and stamen senescence and fruit set after pollination and fertilization. Recent results in tomato suggest a function of abscisic acid (ABA) and ethylene before fruit set, to keep the ovary in a temporally protected and dormant state (Balbi and Lomax 2003; Vriezen et al. 2008).

The involvement of plant hormones in fruit set has long been postulated from the efficiency of externally applied auxins or gibberellins to replace pollination and fertilization in inducing fruit set and growth (Crane 1964; Nitsch 1965; Nitsch 1970; Vivian-Smith and Koltunow 1999). When the auxin signaling pathway is altered, fruit set and development can occur without fertilization, i.e., parthenocarpy (Carmi et al. 2003; Goetz et al. 2006; Goetz et al. 2007; Pandolfini et al. 2007; Wang et al. 2005). Auxin action on fruit set may also be through gibberellic acid (GA) synthesis (Serrani et al. 2008) and GA action (Martí et al. 2007). Fruit set has also been related to the strong increase of sucrose import capacity in young tomato fruit (Ho 1996; D'Aoust et al. 1999).

Fruit growth is by far the longest phase of fruit development. It ranges from 1 week for *A. thaliana*, 3–5 weeks for strawberry, 5–8 weeks for tomato, to 60 weeks for many citrus fruits with an average of 15 weeks for most fleshy fruits (Coombe 1976) (Table 1). Two distinctive types of fruit growth curves have been reported on cumulative and/or rate bases according to fruit species (Coombe 1976). Single S-shaped (sigmoidal) growth curves occur in most species including tomato. In few-seeded-fruit, such as stone fruit (drupes) and some berries, such as grape, growth curves fit a double-sigmoid pattern, which involves two successive phases of growth with physiologically distinct sink activity and a transition in between (DeJong and Goudriaan 1989). The type of growth curve for several fruit species is indicated in Table 1.

In general, fruit growth starts by a period of intense cell divisions. Then, before the frequency of cell division declines, cells begin to enlarge rapidly; the final period of fruit growth relies uniquely on cell expansion. As already pointed out more than 50 years ago, “fruit growth curves do not indicate when the transition of cell multiplication to cell enlargement occurs, so that, from the point of view of the growth process, distinction between both is not considered to be important. The important entity seems to be the organ rather than its constituents” (Nitsch 1953). Thus, although they offer convenient data for phenological studies, most growth curves are inadequate for the analysis of the components of growth (Coombe 1976).

Table 1 Characteristics of fruit growth in 22 species undergoing or not endopolyploidization, and sorted according to fruit growth duration

Family	Species/english name	Species/botanical name	DNA content/pg/1C <sup>a</sup>	Dev. Curve <sup>b</sup>	Growth duration <sup>c</sup>	Max nb endo-cycles <sup>d</sup>	Cell diameter (m) <sup>e</sup>	References <sup>f</sup>
Brassicaceae	Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.16	S	1	3	25	Vivian-Smith and Koltunow (1999)
Rosaceae	Strawberry	<i>Fragaria sp.</i>	0.4*	S	3–5	5	50	Suutarinen et al. (1998)
Cucurbitaceae	Melon	<i>Cucumis melo</i>	1.05	S	5–6	6	450	Kano (2007)
Solanaceae	Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	0.88 or 2.10	n.d.	6	4	n.d.	-
Fabaceae	Common Bean	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1.43	n.d.	6	4–5	n.d.	-
Cucurbitaceae	Cucumber	<i>Cucumis sativus</i>	1.77	S	6	6	>200	Boonkorkaew et al. (2008)
Solanaceae	Tomato	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.0*	S	5–8	7–8	600–1,000	Cheniclet et al. (2005)
Solanaceae	Pepper	<i>Capsicum annuum</i>	4.00	S	8	6	800	Rygot and Lüttge (1983)
Rosaceae	Cherry	<i>Prunus avium</i>	0.35	D	9–11	4–5	65	Stern et al. (2007)
Rosaceae	Raspberry	<i>Rubus sp.</i>	0.3*	D	12	5	n.d.	-
Vitaceae	Grape	<i>Vitis vinifera</i>	0.43	D	14	0	350	Schlosser et al. (2008)
Rosaceae	Apricot	<i>Prunus armeniaca</i>	0.30	D	16	5	n.d.	Ognjanov et al. (1995)
Rosaceae	Peach	<i>Prunus persica</i>	0.28	D	16–26	5	120	-
Musaceae	Banana	<i>Musa sp.</i>	0.6*	Other	17–18	0	n.d.	Stern et al. (2007)
Rosaceae	Plum	<i>Prunus domestica</i>	0.93	D	19–22	4	100	-
Rosaceae	Pear	<i>Pyrus communis</i>	0.55	S	18–25	0	n.d.	-
Rosaceae	Apple	<i>Malus domestica</i> <i>M. communis</i>	4.50	S	21–22	0	n.d.	-
Ebenaceae	Perseimon	<i>Diospyros kaki</i>	1.2–1.7*	D	21–28	0	220	Hamada et al. (2008)
Actinidiaceae	Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	4.19	D	23–26	0	200	Hopping (1976)/Cruz-Castillo et al. (2002)
Moraceae	Fig tree	<i>Ficus carica</i>	0.70	D	25	0	n.d.	-
Lauraceae	Avocado	<i>Persea americana</i>	0.93	S	40	0	n.d.	-
Rutaceae	Orange	<i>Citrus x sinensis</i>	0.63	S	60	0	n.d.	-

<sup>a</sup>DNA content per haploid genome (major source: Plant DNA C-values database, Royal Botanical Gardens, Kew, <http://data.kew.org>).

<sup>b</sup>mean of different varieties or data

<sup>c</sup>Type of development growth curve (S = single sigmoid, D = double-sigmoid)

<sup>d</sup>Length of fruit development from anthesis to ripe stage (in weeks) (literature and our personal data)

<sup>e</sup>Personal data on maximum number of endocycles undergone during fruit development. n.d.: non determined

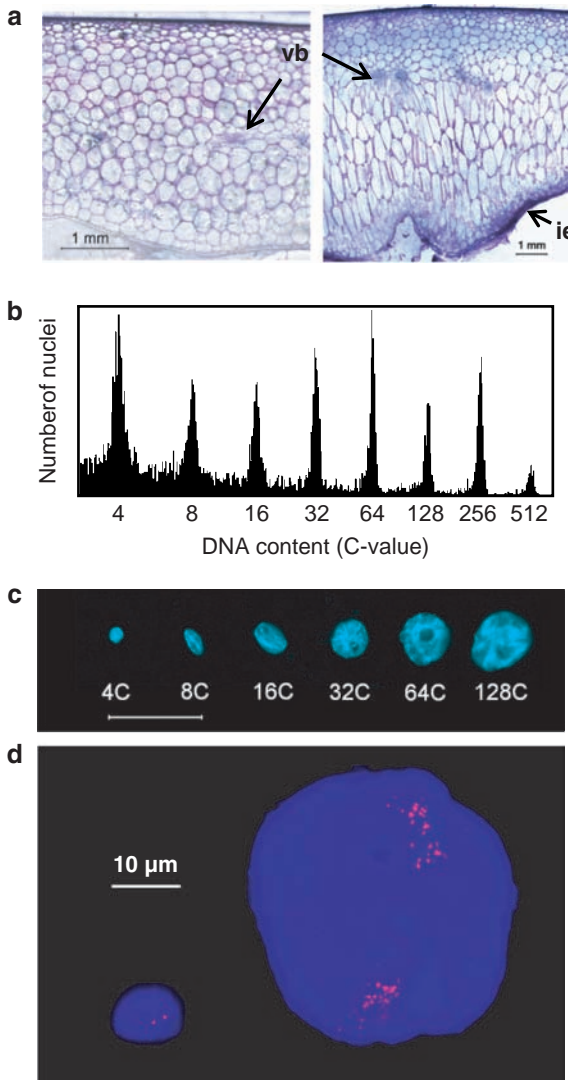
<sup>f</sup>Approximate cell diameter of the largest mesocarp cells in mature fruit

<sup>g</sup>Main source of cell diameter data (p.d.: our personal data)

Fruit growth relies on a spatially and temporally organized pattern of cell division and of cell expansion. Remarkably, fleshy fruit tissues may have very various ontogenic origins (Coombe 1976), although they all share similar characteristics, with large, highly vacuolated cells with thin walls. In tomato, the ovary wall has seemingly a simple organization at anthesis, with ca. 11 layers of small isodiametric cells including two epidermal cell layers, and vascular bundles in the central pericarp (Cheniclet et al. 2005). During fruit organogenesis and growth, the fertilized ovary acquires a complex pattern of cells with various sizes and shapes, and various metabolic differentiations (Cheniclet et al. 2005; Gillaspay et al. 1993; Mohr and Stein 1969; Smith 1935) (Fig. 1a). How this spatio-temporal pattern of development is related to gene expression, metabolic profiles and cellular characteristics, such as endopolyploidy has only just started to be described (Lemaire-Chamley et al. 2005). This apparent slow progress has been due to the difficulty in correlating various cellular and molecular data at the level of given cell types in three-dimensionally complex organs, such as fruits. How this complexity relates to hormonal and nutritional regulation during fruit growth also remains largely ignored. Many data have been reported on the kinetics of hormone content in various fruit materials (reviewed in Gillaspay et al. 1993; Srivastava and Handa 2005), but their use for a proper understanding of their action in relation to growth mechanisms remains rather elusive. Fruit growth requires the combined presence of several growth-promoting plant hormones, such as auxin, gibberellins, cytokinins and brassinosteroids (Cowan et al. 2005; Ozga et al. 2002; Srivastava and Handa 2005). Many of these hormones appear to originate from the developing seeds, with a particular role for the endosperm in the secretion of these compounds.

### ***2.3 Cell Division During Fruit Growth***

Active cell division within the flesh is usually restricted to an initial period of 1–2 weeks after pollination and fertilization (e.g., cucurbits, tomato), 3 weeks in apple, 4–7 weeks in Japanese pear, peach, and plum. Cell divisions do not occur in the pericarp of Corynth grape, Rubus, or some Ribes species. However, divisions continue in avocado and in strawberry throughout the life of the fruit (Coombe 1976; Crane 1964; Nitsch 1965). In tomato and as in many fleshy fruits, cell divisions occur in various cells and with various division planes to allow fruit growth, but they also occur in discrete cell layers with definite division planes for specific purposes. This is the case for tomato, where the two epidermal cell layers of the pericarp undergo anticlinal divisions, whereas the two subepidermal layers undergo several rounds of periclinal divisions leading to an increase in the number of pericarp cell layers to a varying extent according to the tomato line. These various types of cell divisions are differently regulated because cell-layer forming cell divisions occur only within 5–8 days post-anthesis in various tomato lines (Cheniclet et al. 2005; Cong et al. 2002; Mazzucato et al. 1998), whereas



**Fig. 1** Cellular aspects of endoreduplication in tomato fruit. **(a)** Pericarp histology in mature green fruits from two distinct tomato lines (*left: Gardener's delight; right: Montfayet*), showing the variability in pericarp tissue patterning resulting from differences in cell expansion. vb: vascular bundles; ie: inner epidermis. **(b)** Flow cytometry analysis of mature green fruit pericarp from a large-fruited line, showing the distribution of nuclei according to DNA content (C-value). **(c)** DAPI-stained nuclei isolated from mature green tomato pericarp (cherry line) and sorted according to their fluorescence intensity; *from left to right: 4C, 8C, 16C, 32C, 64C, 128C*; note the increase in size and the increasing complexity of condensed chromatin distribution revealed by DAPI fluorescence. **(d)** FISH on two nuclei isolated from mature green pericarp tomato and flow cytometry sorted according to their ploidy class (*left: 2C, right: 64C*); DAPI-stained DNA appear in blue, and hybridization spots of a BAC probe specific for chromosome 7 appear in red after Texas-red revelation

randomly-oriented cell divisions occur for longer periods up to 10–18 days post-anthesis (Gillaspy et al. 1993; Tanksley 2004). Moreover, two different modified genetic backgrounds affect cell divisions in tomato pericarp, excluding cell-layer forming divisions (Cong et al. 2002; Jones et al. 2002). Commonly, tissues closest to the ovules (e.g., placenta in tomato or fruit surface in strawberry) cease division earlier than other tissues (Coombe 1976). All these data indicate spatially and temporally complex regulation of cell divisions in growing fruit.

After anthesis, the locular cavities in fruit are usually filled as a result of intense cell division activity from one or more of the locule surface areas (e.g., placenta in tomato, septum in banana and grape, endodermis in banana and orange, and seed aril in lychee). Cell expansion then contributes to the filling of the locule, which behaves in concert with the neighboring flesh to form fruit pulp or, as in tomato, to form a jelly-like tissue with distinct properties from the pericarp (Coombe 1976).

In conclusion, the fruit as a whole is composed of cells, which were present at anthesis and of newly formed cells during fruit growth. The ratio between both kinds of cells is a function of the number of doublings at these two phases. After anthesis, 80–97% of fruit cells in apple, strawberry, peach, apricot and tomato are produced, whereas ca. 70% of fruit cells are formed before anthesis in cucumber and blueberry (Cano-Medrano and Darnell 1997). The modulation of cell division in fruit either pre- or post-anthesis has repeatedly been associated with strong variations in fruit size. As an illustration, strong differences in overall anticlinal, but not periclinal, cell division in the pericarp are associated with varying levels of *fw2.2* transcripts corresponding to the major quantitative trait locus (QTL) for tomato fruit size, which accounts for as much as a 30% difference in fruit fresh weight between small-fruited and large-fruited tomatoes (Cong et al. 2002; Liu et al. 2003).

## 2.4 Cell Expansion During Fruit Growth

In eukaryotic cells, cell enlargement results from two processes: cell growth by increase in cytoplasmic volume and cell expansion through vacuolation. Cell growth by cytoplasmic volume increase may occur in all types of cells and is responsible for moderate increases in cell volume, by less than tenfold (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003). Cell expansion through vacuolation is a specific property of plant cells because of their large vacuolar compartment, and it leads to an increase in cell volume by more than one hundredfold (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003). Cell expansion through vacuolation typically starts in young organs, once cells have stop dividing, exit the cell cycle, and differentiate.

Some of the largest cells found in plants occur in the flesh of ripe fruit, with cell length between 150 and 700  $\mu\text{m}$ , and in some cases more than 1 mm. The volume of cells in ovary wall is only ca.  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  nL at anthesis whereas it is in the range of 1–10 nL, up to 100 nL in mature fruit (Coombe 1976). Because cell volume may be increased by  $10^2$ – $10^4$  times during the growth of fleshy fruit, this phenomenon



makes by far the greatest contribution to the total expansion of the fruit. Cell size has been recognized as a critical component of fruit size in cucumber, blueberry, and grape (Cano-Medrano and Darnell 1997).

When expressed on an arithmetic scale, cell expansion, by several orders of magnitude, has often been considered to occur after the cell division phase in fleshy fruit (Gillaspy et al. 1993). In fact, cell expansion starts in the very few days after fruit set, concomitantly with cell division (Boonkorkaew et al. 2008; Cheniclet et al. 2005), and it lasts for the entire period of fruit growth. However, whether initial cell growth occurs through cytoplasmic growth while the cells are actively cycling in the mitotic cycle remains poorly understood. The most intense cell growth phase then occurs through dramatic increases in the vacuolar volume and vacuolation index of fruit cells.

Cell size is typically described by linear cell dimensions, e.g., diameter or perimeter in fruit sections, which gives only an approximation of cell volume, and thus, requires deeper sectional analyses to take cell shape into account. The absolute measurement of cell size and shape in the growing grape fruit revealed that cell shape was irregular and cell volumes in the inner mesocarp of a grape berry exhibited a 14-fold range variation, with polysigmoidal distribution and clusterings around specific cell size classes (Gray et al. 1999). Obviously, more measurements of this type are required to fully understand the patterning of fleshy parenchymatous fruit tissues.

In the course of fleshy fruit development, the extent of cell expansion is influenced by cell wall behavior, turgor, and constraints imposed upon the flesh by the extensibility of the skin. Auxin is generally considered responsible for cell expansion during fruit growth, although this effect may not be direct but mediated through ill-defined compounds mediating sink activity.

### **3 Endopolyploidization**

#### **3.1 Definitions**

Polyploidy can be defined as the addition of a complete set of chromosomes to one genome, which results from either sexual reproduction via  $2n$  gametes or somatic chromosome doubling. According to the mode of polyploidy formation, allopolyploidy and autopolyploidy can be distinguished as originating respectively from interspecific hybridization between divergent progenitor species, thus giving rise to the presence of distinct subgenomes, and from intraspecific hybridization (or self-fertilization) or somatic chromosome doubling, thus resulting in identical subgenomes (Otto 2007). Related to autopolyploidy, endopolyploidy corresponds to the occurrence of different ploidy levels within an organism.

Endopolyploidy can result from the generation of multinucleate cells originating from acytokinetic mitosis, from nuclear fusion, from endomitosis, or from endoreduplication. Multinucleate cells in plants are found during the formation of the

syncytial female gametophyte (Yadegari and Drews 2004), in anther tapetum (D'Amato 1984) and seed endosperm (Berger 2003), while nuclear fusion may also contribute to polyploidization of the chalazal domain of the endosperm in *Arabidopsis* (Baroux et al. 2004). Endomitosis corresponds to a doubling of the chromosome number in nucleus. Chromosomes double and condense, sister chromatids separate normally, but return to the interphase state within an intact nuclear envelope, thus generating nuclear endopolyploidy. Although endomitosis mainly occurs in animals, it is only rarely encountered in plants (D'Amato 1984).

Endoreduplication represents the most common mode of cell endopolyploidization in plants and is estimated to occur in over 90% of Angiosperms (Nagl 1976; D'Amato 1984). This process is an endonuclear chromosome duplication, which occurs in the absence of any obvious condensation and decondensation steps leading to the production of chromosomes with  $2n$  chromatids without any change in chromosome number (Joubès and Chevalier 2000; Edgar and Orr-Weaver 2001). As a consequence, hypertrophying nuclei arise from successive cycles of DNA replication without segregation of sister chromatids, and in extreme cases "giant" polytene chromosomes are generated as observed for embryo suspensor cells of *Phaseolus* species (D'Amato 1984) or giant hair cells of *Bryonia* anthers (Barlow 1975).

### ***3.2 Occurrence of Endopolyploidization in Fruit Species***

As stated by D'Amato (1984), endopolyploidy is "of such a widespread occurrence in plants, that it can be regarded as the rule rather than the exception." A recent survey performed on several vegetative organs of 54 seed plant species different in term of genome size and belonging to two Gymnosperm and 14 Angiosperm families by Barow and Meister (2003) indicated that endopolyploidy occurred in 33 species taken from ten different families. Though absent in Gymnosperms, the frequent occurrence of endopolyploidy within Angiosperms seems restricted, however, to certain phylogenetic groups (Barow 2006).

Though largely documented in vegetative organs (Barow and Meister 2003), the occurrence of endopolyploidy in reproductive organs, especially in fruit tissues, and its extent in different species has gained little attention so far. Endopolyploidization was found in ovular tissues (antipodal cells, synergids, endosperm and embryo suspensor cells) and in anther cells (anther hair, glandular hair and anther tapetal cells), where endoreduplication seems to be the preferential way of polyploidization (D'Amato 1984; Carvalheira 2000; Bauer and Birchler 2006).

More than 60 years ago, endopolyploidization was reported initially in cucumber and other fruit materials (cited in Coombe 1976 and Barow 2006) and then in the mesocarp parenchyma cells in apricot (Bradley and Crane 1955). However, in this latter report the natural and/or physiological occurrence of the phenomenon in this fruit could be questioned as these authors observed polysomaty (increase in chromosome number according to endomitosis), after an auxin treatment and subsequent

needle wounding of the fruit mesocarp. More recently, some reports described the occurrence of endopolyploidization in the pericarp of *Sorghum bicolor* (Kladnik et al. 2006), *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermal cells (Kwiatkowska et al. 2007), and sugar-beet pericarp (up to 32C in diploid and to 16C in triploid and tetraploid plants) (Lukaszewska and Sliwinska 2007). Most of the reports dealing with endopolyploidy in fruit so far concerned tomato (Bergervoet et al. 1996; Bertin et al. 2007; Cheniclet et al. 2005; Joubès et al. 1999) (Fig. 1b). On the contrary, endopolyploidy has been reported neither for grape (Ojeda et al. 1999) nor for apple (Harada et al. 2005).

To provide more data about the occurrence of endopolyploidization in fruits, we initiated a large scale analysis of ploidy levels in fruit of different species, focusing mainly on fleshy fruits. DNA content of nuclei isolated from whole ovaries at anthesis and from pericarp of fully developed fruits were analyzed by flow cytometry, and the maximum number of endocycles (corresponding to the number of DNA duplications, cf. Sect. 5.2) made during fruit development was determined. These data are presented in Table 1, together with additional parameters, such as the DNA content per haploid genome, the average cell diameter in fruit flesh (available data from the literature), and the type and duration of growth. The ordering of phylogenetic families and species within the table is based on the duration of growth accordingly.

From this table and additional data not shown, endopolyploidization in fruit appears to be dependent in part from the phylogenetic position of species, as observed for vegetative organs by Barow and Meister (2003). In some families (e.g., Rutaceae), no endopolyploidization was observed, while in others, such as in Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, and Solanaceae, most of the fruit species displayed a high degree of endopolyploidization. According to Barow and Meister (2003), a high frequency of endopolyploidization was also reported in vegetative organs of these families. Amongst Rosaceae, pome fruits (apple, pear) do not exhibit endopolyploidization, while stone fruits (*Prunus* sp.) as well as strawberry and raspberry undergo several rounds of DNA duplication.

Of the vegetative organs reported to display endopolyploidization, the number of endocycles that cells undergo is predominantly, 2–3, less frequently 4 and rarely 5 (corresponding respectively to ploidy levels of 8C, 16C, 32C and 64C for diploid species, where C is the DNA content of the unreplicated haploid genome of a gamete). Higher ploidy levels appear to occur more frequently in fleshy fruits for which 4–5 endocycles can often be observed (Table 1). In maize endosperm, fertilization gives rise to 3C cells, which undergo up to 5 endocycles in the course of development, resulting in a maximum ploidy level of 96C (Leiva-Neto et al. 2004). In fruits of Cucurbitaceae and Solanaceae, mesocarp cells commonly undergo 6 endocycles, the highest ploidy levels for these cells being reached in tomato where 8 endocycles (up to 512C) can be observed. This high level of endopolyploidy in tomato and the numerous data reported on this process in this species (Bergervoet et al. 1996; Joubès et al. 1999; Cheniclet et al. 2005) makes it an outstanding model for studying endopolyploidization and its physiological role during fruit development.

### 3.3 Cellular Aspects of Endoreduplication

#### 3.3.1 Cell Size

Endopolyploidization and cell expansion often occur simultaneously in developing organs, and high ploidy level have long been reported as associated with large cell size (Joubès and Chevalier 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003). An ultimate demonstration of a direct correlation between ploidy level and size in single cells requires simultaneous in situ determination of DNA ploidy level and size in individual cells. This has been achieved only in a limited number of vegetative tissues, such as leaf epidermis (Melaragno et al. 1993), hypocotyl (Gendreau et al. 1997), and symbiotic root nodules (Cebolla et al. 1999), and of floral tissues (Kudo and Kimura 2002; Lee et al. 2004). In tomato, Bünger-Kibler and Bangerth (1982) showed that the ploidy level in fruit pericarp cells increases from 4 to 10 days after anthesis. At this stage, small cells localized around vascular bundles and hypodermis display nuclei with a 4C level, while in the large parenchyma cells, the ploidy level was between 16 and 32C, thus arguing for cell enlargement that is correlated with DNA content. Subsequently, such an observation was also reported by Bergervoet et al. (1996) and Joubès et al. (1999), while Cheniclet et al. (2005) established clearly a direct correlation between mean cell size and mean C-level during the development of tomato fruit pericarp.

#### 3.3.2 Nuclear Size

*Obviously as the nuclear DNA content undergoes exponential amplification through endoreduplication, the nuclear volume is expected to increase accordingly.* In tomato fruit, an increase in nuclear size was observed in most pericarp cell-layers in the course of development (up to 6-fold in diameter) (Bergervoet et al. 1996; Joubès et al. 1999). Nuclei sorted by flow cytometry according to their DNA content show a strong positive correlation between nuclear size and ploidy level as far as the lower ploidy levels are concerned, but this correlation becomes weaker for higher ploidy levels, due to a larger variation of nuclear sizes (Bourdon et al. personal communication) (Fig. 1c). The heterogeneity in nuclear size of highly polyploid nuclei suggests that the nuclear volume depends not only on its DNA content, but also on other parameters, such as the amount and conformation of nuclear proteins, RNA molecules, and the degree of chromatin condensation. Therefore, one cannot deduce the precise ploidy level of a nucleus merely from its relative volume in a given tissue. It is noteworthy that a positive relationship between nuclear size and ploidy level has also been demonstrated in various endoreduplicating plant tissues, such as metaxylem in maize roots, *Aloë arborea* (Agavaceae) and *Zebrina pendula* (Commelinaceae) (List 1963), endosperm in *S. bicolor* (Kladnik et al. 2006), and in species encompassing a wide variation in endopolyploidy (Barow 2006).

### 3.3.3 Nuclear Morphology

In most studies dealing with histological aspects of endopolyploidy, the overall morphology of nuclei has been observed in whole tissue or epidermal layers, but quite often the fine structure of nuclei was not described.

In tomato fruit, observations were made on mature pericarp nuclei by confocal microscopy, bright field microscopy and transmission electron microscopy (Frangne et al. personal communication). A gradual increase in nuclear size is observed between the epidermal cell-layer and the central cell-layers of pericarp. Nuclei also present differences in term of shape. In the epidermal cell layer, the nuclei display a regular shape, whilst in the central cell layers they acquire a complex shape, with numerous deep grooves and digitations. When these nuclei are observed with conventional fluorescence microscopy after DAPI-staining, the grooves in their DNA are barely visible, but are suggested by the complex distribution of condensed chromatin (Fig. 1c). The gradient of nuclear size and shape observed in situ from the epidermis to the central layers of pericarp is similar to the gradient observed in ploidy-sorted nuclei, thus strongly suggesting that the most central nuclei are the most polyploid. Whether or not this particular morphology of nuclei observed in tomato fruit results from their high ploidy level has not yet been determined. Such a variation in the shape of the nucleus according to ploidy levels has also been reported in different cell types of *A. thaliana* (Barow 2006).

### 3.3.4 Chromatid Organization in Fruit Polyploid Nuclei

As pointed out in Table 1, endopolyploidization is a widespread phenomenon in various fruit species. However to our knowledge, not a single report focused so far on elucidating the chromosome organization in endopolyploid fruits' cells, except the study of Bradley and Crane (1955), who demonstrated the occurrence of endomitoses in the mesocarp of apricot. In an effort to identify chromosome organization in polyploidy tissues of tomato fruit, we performed a fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of tomato pericarp nuclei sorted by flow cytometry according to their DNA content. A biotin-labeled bacterial artificial chromosome (BAC) DNA sequence specific for tomato chromosome 7 (O. Coriton, personal communication) was used as a probe.

As illustrated in Fig. 1d, a 2C nucleus displayed two spots of hybridization as expected for the two copies of chromosome 7, while the hybridization on a 64C nucleus resulted in a uneven distribution of spots throughout the whole nuclear volume, but a clustering in two separated areas. The spatial proximity of the hybridization spots within these two areas suggests that the sister chromatids stay closely associated during endopolyploidization, thus accounting for a polytene structure of chromosomes and consequently for endoreduplication in tomato fruit. Such polytenic structures were also observed in maize endosperm (Bauer and Birchler 2006), Arabidopsis root tips and mature leaves (Lermontova et al. 2006), and cabbage root tips (Sesek et al. 2005).

Even if polyteny seems to be widespread in various plant organs, differences in chromatin organization can be observed between cell types during endoreduplication. These differences lie mainly in a more or less complete pairing of sister chromatids and in the state of chromatin condensation. Sister chromatid pairing can be observed along the entire length of chromosomes, such as for giant hair cells in *Bryonia* anthers (Barlow 1975) or just in part of them, such as the embryo suspensor cells in *Phaseolus coccineus* (Nenno et al. 1994). Recently, Schubert et al. (2006) provided evidence for a differential alignment of sister chromatids pairing along Arabidopsis chromosome 1, and thus, for polyteny in Arabidopsis vegetative tissues. In addition, the condensation state of centromeres in Arabidopsis endoreduplicated cells was shown to be variable and cell type-dependent (Fang and Spector 2005). Decondensation could also account for a greater range of chromatin movement in endoreduplicated cells (Kato and Lam 2003). Hence, further investigations are needed to determine the biological significance of chromosome and chromatin organization in endoreduplicated cells.

Since endoreduplication appears to be the preferred mode of endopolyploidization in most plant organs and notably in tomato fruit, we shall use this term from here onwards.

## 4 Proposed Physiological Roles for Endoreduplication

### 4.1 *Endoreduplication and the Determination of Cell- and Organ Size*

The frequent positive correlation between endoreduplication and cell size in many different plant species, organs, and cell types (Joubès and Chevalier 2000; Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003; Kondorosi and Kondorosi 2004) is commonly interpreted as endoreduplication as the driver for cell expansion. The successive rounds of DNA synthesis during endoreduplication induce a consequent hypertrophy of the nucleus. This can influence the final size of the cell, which, therefore, may adjust its cytoplasmic volume with respect to the DNA content of the nucleus (according to the “karyoplasmic ratio” theory; Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003). Cell expansion proceeds further through vacuolation, to adjust the size of the vacuolar compartment in accordance with the cytoplasmic volume, and even to increase the vacuolation index of the plant cell.

Cheniclet et al. (2005) provided evidence for such a positive correlation between cell size and ploidy level in pericarp tissue during fruit development. However insufficient comparison has been performed so far in other fruit species, and even in tomato, opposing results were reported in two tomato isogenic lines differing by fruit weight and sugar content QTLs (Bertin et al. 2003) and between large fruits of

lines cultivated at different temperatures (Bertin 2005). To gain further insight about the possible relationship between endoreduplication and cell size in fruit, we collected data from the literature and performed additional measurements of cell size in fully-grown fruit displaying or not displaying endopolyploidization (Table 1). This analysis indicated no clear-cut relationship between these two parameters. For example, nonendopolyploidizing fruits like kiwi, persimmon, and grape display cell diameters of ca. 200  $\mu\text{m}$ , 220  $\mu\text{m}$ , and 350  $\mu\text{m}$  respectively, while smaller cell diameters are observed in endopolyploidizing fruits, such as the *Arabidopsis* silique (25  $\mu\text{m}$ ), strawberry (50  $\mu\text{m}$ ), cherry (65  $\mu\text{m}$ ), and peach (120  $\mu\text{m}$ ). Therefore the ability to develop large cells as measured by their diameters, is not restricted to endopolyploidizing fruits. Nevertheless when endopolyploidizing fruits are compared, it also appears that the largest cells are present in fruits that undergo the highest number of endocycles (diameters of 600–1,000  $\mu\text{m}$  in tomato, 800  $\mu\text{m}$  in pepper, and 450  $\mu\text{m}$  in melon), which suggests that endopolyploidization might be necessary for plant cells to reach very large sizes.

However, various examples show that endoreduplication can occur in the absence of dramatic cell expansion. For instance, Gendreau et al. (1998) reported that a small cell size in some *Arabidopsis* mutants did not prevent the occurrence of the same number of endocycles as in larger cells present in wild-type. Endoreduplication is, thus, obviously not the only parameter either signifying or favoring cell expansion.

The mean level of endoreduplication of various plant organs has repeatedly been found correlated with organ size, as exemplified in *Arabidopsis* leaves (Cookson et al. 2006), pea cotyledons (Lemontey et al. 2000) and tomato fruit (Cheniclet et al. 2005). However, the function of endoreduplication in organ growth remains open to various hypotheses. Organ growth can be considered as the result either of a given balance of cell-based (autonomous) mechanisms relying on division, expansion, and endoreduplication or according to the opposite, of organismal level of regulation (Mizukami 2001; John and Qi 2008). In view of the organismal control, the synthesis of cytoplasm is the primary process and DNA endoreduplication would come second to maintain the karyoplasmic ratio (Cookson et al. 2006; John and Qi 2008). This latter parameter is difficult to estimate because of technical constraints, although it is a common observation that fruits with endopolyploidy such as tomato have larger protein contents linked to a larger cytoplasmic compartment, than fruits without endopolyploidy, such as apple (Harada et al. 2005).

Although the correlation between cell size and endoreduplication is obvious, which process triggers the other is still a matter of debate, as a kind of Chicken or the egg causality dilemma. Since endoreduplication corresponds to successive rounds of DNA duplication in the absence of mitosis as defined below (cf. Sect. 5), it is therefore likely that a minimal cell size must be required to commit to the following round of DNA replication, thus implying cell growth. However, once DNA synthesis is completed, the doubling of the DNA quantity can in turn promote cell growth, according to the “karyoplasmic ratio” theory (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003).

## 4.2 *Endoreduplication and Cell Differentiation*

In the model plant *Arabidopsis*, the influence of endoreduplication in forming large specialized cells was best characterized in epidermal cells of mature leaves (Melaragno et al. 1993), during hypocotyl development in which the ploidy levels vary according to light conditions (Gendreau et al. 1997), and in leaf single-celled trichomes (Larkin et al. 2007). The growth of trichomes was shown to be dependent on the succession of endocycles. The formation of a two-branched trichome cell requires three rounds of endocycle, leading to a 16C DNA ploidy level. A supplementary endocycle may eventually occur to give rise to the formation of a third branch and 32C DNA content. Moreover, cell growth and differentiation of trichomes is a genetically regulated process, since mutants affecting the nuclear ploidy level impacts positively or negatively on trichome cell size.

As illustrated for trichomes, endoreduplication often occurs during the differentiation of cells that are highly specialized in their morphology or metabolism. This is the case for cells from tomato fruit pericarp and jelly-like locular tissues (Cheniclet et al. 2005; Lemaire-Chamley et al. 2005; Chevalier 2007) as described above, for symbiotic host cells during the formation of nitrogen-fixing root nodules in legumes (Cebolla et al. 1999) and/or for the endosperm cells of maize kernels (Kowles and Phillips 1985; Kowles et al. 1990).

## 4.3 *Endoreduplication and Metabolism*

There are instances where endoreduplication is linked to endogenous metabolism. For example, nodule development on legume roots is initiated in response to interaction with the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. During their differentiation process, symbiotic nodule cells, programmed to fix nitrogen, develop into very large and highly endoreduplicated cells (Cebolla et al. 1999; Vinardell et al. 2003) and display an important transcriptional activity that is remarkably specific to the nodule (Mergaert et al. 2003). Also, in *Zea mays*, endosperm cells accumulate large amounts of starch and storage proteins, concomitantly with multiple and successive endocycles during seed development (Lopes and Larkins 1993).

Since a correlation exists between endoreduplication and cell differentiation-specific metabolism, it is tempting to speculate that one role of endoreduplication would be to modulate transcriptional activity by increasing the availability of DNA templates for gene expression as the gene copy number is obviously multiplied, and therefore, to modulate subsequent translational and metabolic activities. However, this hypothesis has neither been convincingly demonstrated nor negated in plant cells. For example, Leiva-Neto et al. (2004) showed that endoreduplication levels did not clearly impact on the expression level of some endosperm-specific genes, which led them to propose that endoreduplication in maize endosperm functions primarily to provide a store of nitrogen and nucleotides during embryogenesis and/or germination.



#### **4.4 *Endoreduplication in Response to Environmental Factors***

An important physiological role of endoreduplication might be in the adaptation to adverse environmental factors, especially maintenance of growth under stress conditions. For instance, amplification of DNA may provide a means to protect the genome from DNA damaging conditions, such as uneven chromosome segregation or UV damage. In *Arabidopsis*, the *UV-B-insensitive 4* mutation (*uvi4*) promotes the progression of endoreduplication in hypocotyl and leaf development, and confers an increased UV-B tolerance (Hase et al. 2006). Endoreduplication was also demonstrated to be an adaptation factor in plant responses to high salt concentration (Ceccarelli et al. 2006). Moreover, an increase in the extent of endoreduplication reduced the impact of water deficit on epidermal cell size, leaf expansion rate and final leaf size (Cookson et al. 2006), and facilitated growth at low temperatures (Barow 2006), thus suggesting that an increase in DNA content can be of advantage in a given environment.

#### **4.5 *Endoreduplication and Growth Rate***

As described above (cf. Sect. 4.1) endoreduplication does not seem to be necessary for cell expansion. However, it could participate in modulating the rate or organ growth and/or cell expansion. We previously demonstrated a clear correlation between mean ploidy level in fully developed pericarp and final fruit size and weight, when 20 tomato lines displaying a large range in fruit weight were compared (Cheniclet et al. 2005).

To investigate whether endoreduplication influences the fruit growth rate, we recorded the time of anthesis (full bloom in the case of trees) and fruit maturity (harvest time) for different fruit species and compared the determined length of development with the extent of endoreduplication (Table 1). From this analysis, it has been concluded that (1) in all species where fruit development lasts for a very long period of time (over 17 weeks), endoreduplication does not occur in fruit tissues; (2) in species displaying middle-length fruit development (10–16 weeks), some fruits do not display endoreduplication (e.g., grape), while others undergo 4–5 endocycles (e.g., fruits of many *Prunus* sp.); (3) in fruits, which develop rapidly (in less than 10 weeks) undergo several rounds of endocycle (3–8). Moreover, the formation of cells of similar size, and even larger ones, takes far less time in endopolyploidizing fruits than in nonendopolyploidizing fruits. Assuming that the ovary cells display roughly similar sizes at anthesis in the different species, these observations support the assertion that endoreduplication is likely to influence not only the rate of fruit development but also the rate of cell expansion in species exhibiting rapid fruit development. This would be consistent with the analysis of Barow (2006), who suggested that endoreduplication contributes to a greater extensive growth than in nonendopolyploid plants.

The rate of organ growth could be also under the influence of genome size. From the data presented in Table 1, no obvious relationship between genome size and length of fruit growth could be observed. For instance, pear and apple (nonendoreduplicating species) have respectively a small (C-value = 0.55 pg) and large (C-value = 4.50 pg) genome size and display similar fruit growth lengths of around 21 weeks. The same observation is also true for endoreduplicating species, such as tomato (C-value = 1 pg) and pepper (C-value = 4 pg), whose fruit both develops in 6–8 weeks. Thus, the positive correlation between genome size and life cycle shown by Bennett (1972) may not be applicable if confined to fruit development, at least in this range of genome size.

We also examined if the ability to exhibit endoreduplication was favored by a small genome size, owing to the fact that a higher nuclear DNA content as a result of autopolyploidy requires more time to replicate (Bennett 1972). From the 22 different fruit species analyzed in Table 1, it seems that the occurrence and extent of endoreduplication is not related to genome size, since endopolyploidizing fruits display genome sizes ranging from 0.16 to 4 pg and nonendopolyploidizing ones from 0.43 to 4.50 pg. This result is in accordance with the findings of Barow and Meister (2003) who observed only a low negative correlation between genome size and endopolyploidization, which was contrary to a previous claim based on fewer species (Nagl 1976).

## 5 Molecular Control of Endoreduplication

### 5.1 *The Canonical Cell Cycle*

The canonical eukaryotic cell cycle is composed of four distinct phases: an undifferentiated DNA presynthetic phase with a 2C nuclear DNA content, termed the G1 phase; the S-phase, during which DNA is synthesized, with a nuclear DNA content intermediate between 2C and 4C; a second undifferentiated phase (DNA postsynthetic phase) with a 4C nuclear DNA content, termed the G2 phase; and the ultimate M-phase or mitosis. Mitotic cell division is the ultimate step in the cell cycle, and leads to the transmission of the genetic information from one mother cell to two daughter cells. The classical cell cycle thus involves the accurate duplication of the chromosomal DNA stock in S-phase and its subsequent equal segregation in each nascent cell as a result of mitosis.

The progression within the four phases of the plant cell cycle is regulated by a class of conserved heterodimeric protein complexes consisting of a catalytic subunit referred to as cyclin-dependent kinase (CDK) and a regulatory cyclin (CYC) subunit whose association determines the activity of the complex, its stability, its localization and substrate specificity (Inzé and De Veylder 2006). The canonical A-type CDK (CDKA; Joubès et al. 2000) harboring the PSTAIRE hallmark in the cyclin-binding domain displays a pivotal role during the cell cycle as it participates

in different CDKA/CYC complexes to trigger the specific phosphorylation of numerous protein substrates at the boundaries between the G1 and the S phases, and between the G2 and M phases, thus allowing the commitment to DNA replication and mitosis respectively. The availability and binding of the regulatory cyclin subunit to a CDK partner is thus of prime importance for the regulation of the cell cycle. However, other levels of complexity in the regulation occur at the posttranslational level affecting the components of the CDK/CYC complexes. The kinase activity of the complexes is dependent on the phosphorylation/dephosphorylation status of the kinase itself, and also on the binding of CDK inhibitors and/or recruitment of additional regulatory factors (Inzé and De Veylder 2006).

## **5.2 *The Endocycle***

The endoreduplication cycle (endocycle) is made of the succession of S- and undifferentiated G-phase without mitosis, thus accounting for the cessation of cell division and the increase in ploidy level (Joubès and Chevalier 2000; Edgar and Orr-Weaver 2001; Vlieghe et al. 2007). As a result, part of the molecular control existing for the classical cell cycle regulation is conserved in the endocycle.

### **5.2.1 The Mitosis-to-Endoreduplication Transition**

The commitment to endocycle and the consequent lack of mitosis has been proposed to occur in the absence of a mitosis inducing factor (MIF) which normally governs the passage through the G2-M transition. In addition, down-regulation of M-phase-associated CDK activity is sufficient to drive cells into the endoreduplication cycle (Vlieghe et al. 2007). The M-phase CDKB1;1 activity is required to prevent a premature entry in the endocycle. Hence, CDKB1;1 is the likely candidate kinase to be part of the MIF. Though the cyclin partner of CDKB1;1 inside MIF still awaits a definite identification, convincing in planta functional analyses highlighted the A-type cyclin CYCA2;3 to be the most appropriate candidate (Yu et al. 2003; Imai et al. 2006).

### **5.2.2 Relicensing of Origins of Replication**

The control of MIF activity cannot account solely for the progression within the endocycle, since it requires the fluctuation in the activity of S-phase CDK between DNA synthesis and the undifferentiated G-phase as to allow relicensing of origins of replication. In eukaryotes, the initiation of DNA replication occurs only once during each cell cycle from multiple sites throughout each chromosome (Kelly and Brown 2000). These origins of replication trigger the assembly of prereplication complex (pre-RC) harboring several components, such as the ORC, CDC6, CDT1, and MCMs proteins (Bryant and Francis 2008). During the cell cycle, the control of the G1-to-S

transition in plant cells is exerted through the retinoblastoma-related protein (RBR) pathway (de Jager and Murray 1999; Gutierrez et al. 2002), where the hypophosphorylated form of RBR binds to the E2F-DP dimeric transcription factor, thereby repressing the E2F-responsive genes required for the commitment to the S-phase, such as those encoding the pre-RC components. Interestingly, the ectopic expressions of either *CDC6* (Castellano et al. 2001) or *CDT1* (Castellano et al. 2004), or E2Fa with its dimerization partner DPa (De Veylder et al. 2002) are sufficient to trigger extra endocycles, as well as the inhibition of RBR function, consistent with the inhibitory function of RBR on E2F (Park et al. 2005). It is noteworthy that the activation of DNA replication in all these transgenic plants results in extra endocycles and also causes prolonged cell proliferation activity. These data illustrate the conservation of molecular controls between the endocycle and the canonical cell cycle, but more importantly the importance of regulating the CDK activity, including the pivotal role of MIF at the onset of endoreduplication. It was thus proposed as a quantitative model that the amount of CDK activity controls the differentiation – and obviously the endoreduplication – status of a cell (De Veylder et al. 2007).

### 5.2.3 Regulation of CDK Activity in Endoreduplication During Fruit Development

Among the potential mechanisms regulating the CDK activities in endoreduplicating tissues, three distinct mechanisms are proposed to be affecting the components of the CDK/CYC complexes at the posttranslational level: (1) the *WEE1* kinase regulates negatively the CDK activity by phosphorylation of residue Tyr15 before the commitment to mitosis as to ensure that DNA replication and repair on damaged DNA have been completed; (2) the active CDKA/CYCD complexes may be inhibited by specific CDK inhibitors, termed ICK/KRPs (for Interactor of cyclin-dependent kinase/Kip-related protein); (3) loss of CDK activity occurs upon the proteolytic destruction of the cyclin subunits via the ubiquitin proteasome pathway, involving the activation of the anaphase-promoting complex (APC) through its association with the CCS52.

Since endoreduplication plays such an important part during fruit development (Chevalier 2007), the relative contribution of these different control mechanisms on CDK activity has been addressed in tomato.

#### Role of *WEE1*

Homologues to *WEE1* have been isolated from various plant species (Shimotohno and Umeda 2007). While functional analyses performed in *Schizosaccharomyces pombe* indicated that expression of the maize or Arabidopsis gene led to the inhibition of cell division and significant cell enlargement (Sun et al. 1999; Sorrell et al. 2002), Arabidopsis knock-out mutants for *WEE1* grow perfectly well under nonstress conditions (De Schutter et al. 2007). Neither cell division nor endoreduplication was affected in these mutants, thus indicating that *WEE1* is not rate-limiting for cell cycle

progression under normal growth conditions. However, *WEE1* was shown to be a critical target of the DNA replication and DNA damage checkpoints, which operates in the G<sub>2</sub> phase by arresting the cell cycle in response to DNA damage.

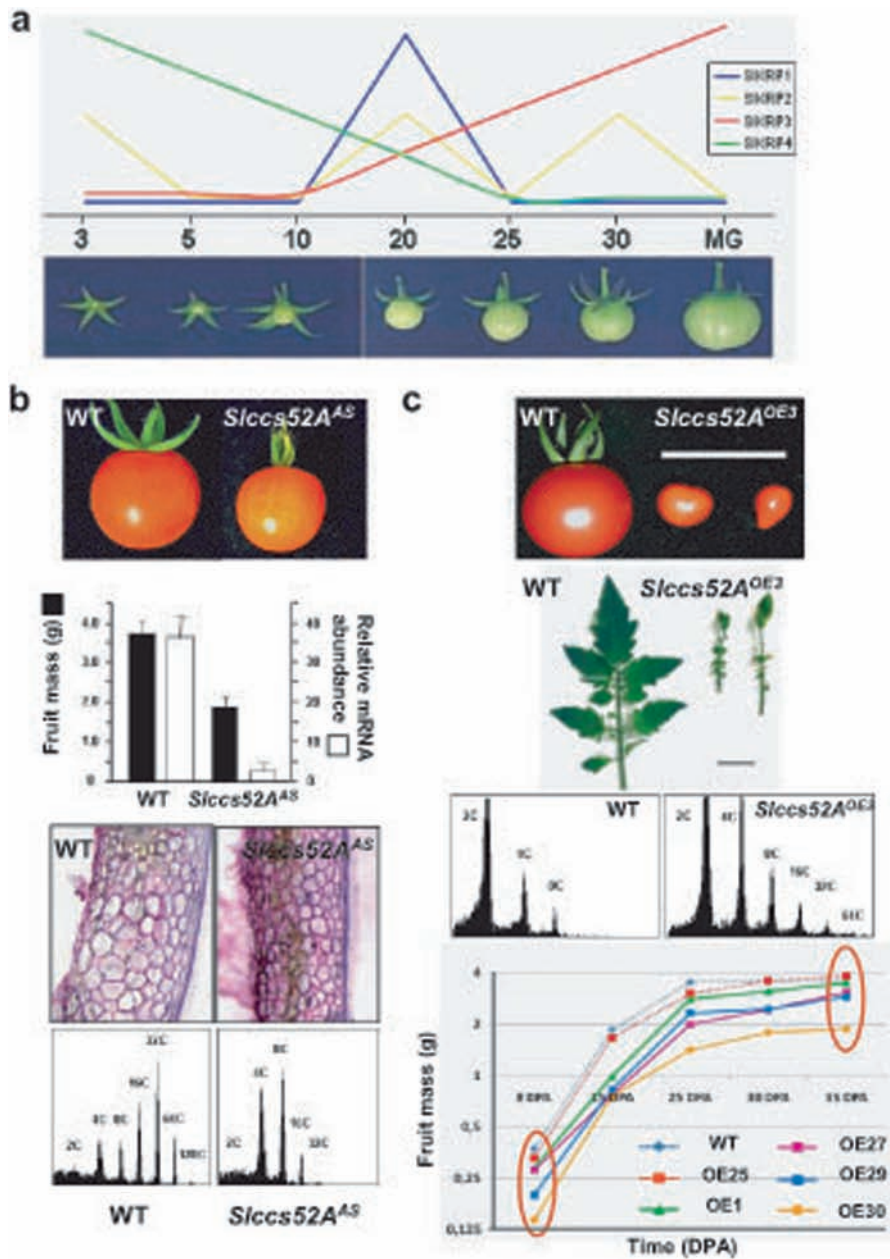
Since the *WEE1* gene is significantly expressed in endoreduplicating cells of maize endosperm (Sun et al. 1999) and tomato fruit tissues (Gonzalez et al. 2004), the function of the *WEE1* kinase in the onset of endoreduplication *in planta* appears to conflict with the work of De Schutter et al. (2007). During tomato fruit development, i.e., in a highly endoreduplicating cell context, we provided evidence that *WEE1* is involved in the determination of endoreduplication and thus, participates in the control of cell size during tomato fruit development through its expected negative regulation on CDK activity (Gonzalez et al. 2007).

In Arabidopsis, the *WEE1* Kinase controls the cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint, thus targeting the CDKA/Cyclin complex, resulting in a stop of the cell cycle in the G<sub>2</sub> phase until DNA is repaired or replication is completed (De Schutter et al. 2007). Unlike its Arabidopsis counterpart, the down-regulation of tomato *WEE1* induced a small-fruit phenotype originating from a reduction in cell size associated with a lowering of endoreduplication (Gonzalez et al. 2007), suggesting that *WEE1* acts on endoreduplication in a species-dependent manner, especially in the context of highly endoreduplicating tissues. Within the endocycles, a minimal cell size must be required to pass the checkpoint in the G-phase prior to the following round of DNA replication. Hence, *WEE1* activity could contribute to inhibit the CDK/cyclin complexes driving the G-to-S transition, preventing a premature entry into the S-phase of the following endocycle by regulating the length of the G-phase and thus allowing cell enlargement (Gonzalez et al. 2007).

### Role of ICK/KRP

Plant specific CDK inhibitors called ICK/KRPs bind and inhibit or sequester CDKs (Verkest et al. 2005b). In *A. thaliana*, when ICK/KRPs are constitutively expressed slightly above their endogenous level, only mitotic cell cycle specific CDKA;1 complexes are affected, thus blocking the G<sub>2</sub>/M transition, while the endoreduplication cycle specific CDKA;1 complexes are unaffected (Verkest et al. 2005a; Weint et al. 2005). The fine tuning of the ICK/KRP protein abundance was demonstrated as a key feature for cell cycle control, and especially to trigger the onset of the endoreduplication cycle (Verkest et al. 2005a). The activity of the G<sub>2</sub>-to-M specific CDKB1;1 in dividing cells triggers the phosphorylation of Arath; KRP2, thus mediating its degradation by the proteasome, and consequently controls the level of CDKA;1 activity. Therefore, when CDKB1;1 activity decreases, Arath; KRP2 protein level increases, leading cells to enter the endoreduplication cycle.

Four different KRP inhibitors have been identified so far in tomato, namely Solly;KRP1 to Solly;KRP4. The respective expression of Solly;*KRP1* and Solly;*KRP2* displayed distinct behaviors, since Solly;*KRP1* is preferentially expressed at 20 DPA (both at the transcription and translation levels), when the endoreduplication process is maximal in the pericarp and the gel tissues, while Solly;*KRP2*



**Fig. 2** Molecular and functional analysis of genes involved in the control of endoreduplication during tomato fruit development. **(a)** Schemed profile of mRNA expression for the four tomato KRP genes. The stages of fruit development are indicated in days post-anthesis. MG: Mature Green. **(b)** Phenotypic and molecular analysis of tomato *CCS52A* down-regulated *Pro35S:SiCCS52AAS* plants. Mature fruits (red ripe stage) were compared with untransformed control

expression peaks during fruit maturation (Bisbis et al. 2006). Using quantitative PCR following reverse transcription (RT-qPCR), we showed that the four tomato KRPs display unique expression profiles during tomato fruit development (Fig. 2a). Interestingly, *Solly;KRP4* is mostly expressed during the very early development of the fruit, i.e., when cell divisions predominantly drive fruit growth, while the expression of *Solly;KRP3* increases at the latest stages of fruit development, i.e., when cell expansion predominantly accounts for fruit growth. These data suggest that these KRPs may display distinct physiological and functional roles during the cell cycle and eventually, during the endoreduplication cycle.

During tomato fruit development, the large and hypervacuolarized cells constituting the jelly-like (gel) locular tissue undergo multiple rounds of endoreduplication. Within this particular tissue, mitosis is arrested after 20 DPA and only endoreduplication occurs until then concomitantly with a strong posttranslational inhibitory regulation of the CDKA activity (Joubès et al. 1999). The origin of this posttranslational regulatory mechanism resides in part in the accumulation of *Solly;KRP1*, which accounts for the inhibition of CDK/CYC kinase activity during the development of the gel tissue in tomato fruit (Bisbis et al. 2006).

## Role of CCS52

The ubiquitin-dependent proteolysis of mitotic cyclins requires the involvement of a specific E3-type ubiquitin ligase named the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C). In plants, the APC/C is activated by the CCS52A protein, homologous to the mammalian CDH1 and *Drosophila* FZR, which binds to cyclins to drive them towards the degradation process by the 26S proteasome (Capron et al. 2003). Like its eukaryotic counterparts, CCS52A was found to promote the onset and progression of endoreduplication (Cebolla et al. 1999; Vinardell et al. 2003). As far as the *Arabidopsis* CCS52A2 isoform is concerned, its transcriptional activity is under the control of the atypical E2Fe/DEL1 factor, which acts as a repressor of premature endocycle onset (Vlieghe et al. 2005; Lammens et al. 2008).

We have investigated the functional role of *CCS52* genes during tomato fruit development. Transgenic plants underexpressing *SICCS52A* or *SICCS52B* using the

←

**Fig. 2** (continued) (WT) of the same age. Fruit mass measurements of 25 DPA-fruits harvested from *Slccs52A<sup>AS</sup>* lines and WT. The corresponding transcript levels of 25 DPA-fruits were measured by real-time PCR, and the relative abundance of mRNA was normalized to *S1βtubulin* and *S1eiF4A*. Data are mean ± standard deviation ( $n = 3$ ). The comparison of 25 DPA-pericarps from WT and *Slccs52A<sup>AS</sup>* fruits reveals an alteration in cell size induced by the down-regulation of *SICCS52A*, together with a shift towards lower DNA ploidy levels. (c) Phenotypic and molecular analysis of *Pro35S:SICCS52A<sup>OE</sup>* plants overexpressing tomato *CCS52A*. Mature fruits (red ripe stage) and fully developed leaves from line *Pro35S:SICCS52A<sup>OE3</sup>* were compared with untransformed control (WT). In line *Pro35S:SICCS52A<sup>OE3</sup>* DNA ploidy levels in leaves were shifted towards greater levels as a result of *CCS52A* overexpression. The growth kinetics of fruits harvested from WT plants and *Pro35S:SICCS52A<sup>OE</sup>* plants (lines OE1, OE25, OE27, OE29 and OE30) was established by measuring fruit mass daily up to 35 DPA

CaMV 35S promoter as a primary approach were generated. While the Pro35S:*SICCS52B<sup>AS</sup>* plants showed no evident phenotype at all, the Pro35S:*SICCS52A<sup>AS</sup>* plants displayed smaller fruits than wild-type plants (Fig. 2b). The ploidy level of the Pro35S:*SICCS52A<sup>AS</sup>* fruits was reduced and correlated with a decrease in mean cell size and an increased cell number.

Gain-of-function transgenic tomato plants overexpressing *SICCS52A* were also generated. In the most extreme case, the phenotype of the Pro35S:*SICCS52A<sup>OE</sup>* line OE3 exhibited gross changes in leaf development and morphology (Fig. 2c). The plant phenotype was characterized by the appearance of under-developed (small and curly) leaves, resembling those of Arabidopsis plants overexpressing CDK inhibitors (Wang et al. 2000; De Veylder et al. 2001; Schnittger et al. 2003), thus suggesting that cell division was deeply impaired in these plants. Interestingly, the ploidy level in these plants was increased towards high DNA levels. Five more *SICCS52A* overexpressing plants were analyzed for which the overall phenotypes were less affected allowing subsequent analyses, especially fruit growth characteristics (Fig. 2c). In accordance with the level of *SICCS52A* expression, which was not significantly different from that of WT, fruits from line OE25 did behave like WT. On the contrary, the growth of fruits from the four other lines expressing greater levels of *SICCS52A* transcripts displayed a slower kinetics. However, fruits from these transgenic lines at 35 DPA tended to reach almost the same size as WT fruit.

To explain these data, the effects of a *SICSS52A* overexpression during very early fruit development are essentially, likely to affect the cell division process thus leading to very small fruits. Thereafter, and in accordance with the functional specificity of *SICSS52A* in the control of endoreduplication, fruit growth is then accelerated during the endoreduplication-driven cell expansion phase to recover an optimum final fruit size close to that of WT. A kinetic study of the appearance of highly polyploid nuclei during fruit growth in these Pro35S:*SICCS52A<sup>OE</sup>* lines does support strongly this hypothesis (Mathieu-Rivet et al. submitted).

The functional analysis of endoreduplication-promoting genes, such as *WEE1* and *CCS52A* thus demonstrates the physiological role of endoreduplication in fleshy fruit growth, since a reduction in cell size originating from a decrease in DNA ploidy levels impacts the whole fruit development and final fruit size. We cannot make short work of the above stated causality dilemma, and whether endoreduplication is as a driving regulator for cell expansion. Nonetheless *WEE1* is thought to control the endocycle G-phase length as to allow the sufficient cell growth prior to commitment to the next nuclear DNA amplification, and accordingly cell enlargement becomes determining for subsequent DNA reduplication. At the organ level, manipulating endoreduplication through *CCS52A* overexpression highlights the function of endoreduplication as an ultimate driving force for fruit growth, and even an enhancer of cell growth rate facilitating and/or accelerating fruit growth or bigger fruit size. As shown in our cytological analysis in Table 1, endoreduplication is strong when fruit development is short and, therefore, endoreduplication is a way to get big fruits rapidly as supported by our molecular data.



## 6 Concluding Remarks

Fleshy fruit organogenesis represents an interesting plant system to study at the molecular and functional level the regulation of cell division and cell expansion processes, and especially, the interplay between the classical cell cycle and the endoreduplication cycle. Among the different plant models, tomato is especially well suited to address this question. Indeed, the final size of the fruit depends upon both the cell number and cell size, which is strongly associated with endoreduplication. The originality of the tomato fruit model resides in the cellular and structural diversity of tissues that compose the fruit, and very importantly final cell size (cell diameter higher than 0.6 mm at the end of fruit development) and ploidy levels (up to 512C in some genotypes) (Cheniclet et al. 2005). Such levels of endopolyploidy represent values unmatched in other model plants, such as *Arabidopsis* or maize where the maximum physiological ploidy is limited respectively to 32C (epidermal cells of the hypocotyls) or 96C (seed endosperm). Why such high levels of endopolyploidy in tomato represents a crucial interrogation.

As reviewed in this chapter, several physiological traits have been attributed to endoreduplication in plants, and as far as fleshy fruits are concerned, the complete elucidation of the functional role of endoreduplication during their growth still awaits us. As discussed herein, we believe that endoreduplication facilitates the growth of fleshy fruits by driving an extended cell expansion process. Obviously, it is also tempting to speculate that endoreduplication is associated with cell differentiation and metabolic specialization cell in fruit cells in the course of fleshy fruit development. The biochemical composition of fruit is mainly determined during the growth period sustained by cell expansion: starch, organic acids, secondary metabolites and aroma precursors accumulate and thus contribute to the organoleptic and nutritional quality of fruit such as tomato. These metabolic modifications during fruit growth originate from a profound change in the cellular behavior and gene expression program of fruit cells and are concomitant with endoreduplication as recently analyzed (e.g., Lemaire-Chamley et al. 2005; Mounet et al. 2009). However, the direct link between endoreduplication and gene expression control still awaits a definitive demonstration.

**Acknowledgements** Part of the research described in this chapter was supported by the 6th Framework Program of the European Commission, within the European Solanaceae Integrated project, EU-SOL (grant no. FOOD-CT-2006-016214), and by fundings from the Region Aquitaine. M. B., E.M.-R. and M.N. were supported respectively by grants n°26855-2007, n°19061-2005 and n°24220-2006 from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). We express our deepest thanks to Dr Theresa Barreneche and Dr Hélène Christmann (Research Unit 419 on Fruit Species, INRA Bordeaux, France), for having provided fruit samples of 25 varieties from the *Prunus* species and the corresponding data for bloom and maturity time. The *Prunus* species are conserved in the *Prunus*, *Castanea*, *Juglans* Genetic Resources Centre of INRA Bordeaux.

Dr Spencer Brown and Olivier Catrice (Plant Science Institute, UPR 2355, CNRS, Gif-sur-Yvette, France) are acknowledged for flow cytometry sorting of tomato nuclei and helpful discussions, and Dr Olivier Coriton (Plant Cytogenetics Plateform, INRA Le Rheu, France) for his precious help in performing FISH analyses.

We acknowledge the excellent technical assistance from Valérie Rouyère. Part of the cytological work was done on the Imaging Cytology facility (Plateau Technique Imagerie Cytologie, IFR103) at INRA Bordeaux with the help of Martine Peypelut for confocal image acquisition of hybridized nuclei.

## References

- Balbi V, Lomax TL (2003) Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene. *Plant Physiol* 131:186–197
- Barlow PW (1975) The polytene nucleus of the giant cell of *Bryonia* anthers. *Protoplasma* 83:339–349
- Baroux C, Fransz P, Grossniklaus U (2004) Nuclear fusions contribute to polyploidization of the gigantic nuclei in the chalazal endosperm of Arabidopsis. *Planta* 220:38–46
- Barow M (2006) Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* 28:271–281
- Barow M, Meister A (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ* 26:571–584
- Bauer MJ, Birchler JA (2006) Organization of endoreduplicated chromosomes in the endosperm of *Zea mays* L. *Chromosoma* 115:383–394
- Bennett MD (1972) Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 181:109–135
- Berger F (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol* 6: 42–50
- Bergervoet JHW, Verhoeven HA, Gilissen LJW, Bino RJ (1996) High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Sci* 116:141–145
- Bertin N (2005) Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Ann Bot* 95:439–447
- Bertin N, Borel C, Brunel B, Cheniclet C, Causse M (2003) Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and endoreduplication? *Ann Bot* 92:415–424
- Bertin N, Lecomte A, Brunel B, Fishman S, Genard M (2007) A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *J Exp Bot* 58:1903–1913
- Bisbis B, Delmas F, Joubès J, Sicard A, Hernould M, Inzé D, Mouras A, Chevalier C (2006) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors are involved in endoreduplication during tomato fruit development. *J Biol Chem* 281:7374–7383
- Bohner J, Bangerth F (1988a) Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiol Plant* 72:316–320
- Bohner J, Bangerth F (1988b) Effect of fruit-set sequence and defoliation on cell number, cell size and hormone levels of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) within a truss. *Plant Growth Regul* 7:141–155
- Bollard EG (1970) The physiology and nutrition of developing fruits. In: Hulme AC (ed) *The biochemistry of fruit and their products*, vol 1. Academic, London, pp 387–425
- Boonkorkaew P, Hikosaka S, Sugiyama N (2008) Effect of pollination on cell division, cell enlargement, and endogenous hormones in fruit development in a gynoeious cucumber. *Sci Hortic* 116:1–7
- Bradley MV, Crane JC (1955) The effect of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on cell and nuclear size and endopolyploidy in parenchyma of apricot fruits. *Am J Bot* 42:273–281

- Brecht JK, Chau KV, Fonseca SC, Oliveira FAR, Silva FM, Nunes MCN, Bender RJ (2003) Maintaining optimal atmosphere conditions for fruits and vegetables throughout the postharvest handling chain. *Postharvest Biol Technol* 27:87–101
- Bryant JA, Francis D (2008) Initiation of DNA replication. In: Bryant JA, Francis D (eds) *The eukaryotic cell cycle*. Taylor and Francis, Abingdon, UK, pp 29–44
- Bünger-Kibler S, Bangerth F (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul* 1:143–154
- Cano-Medrano R, Darnell RL (1997) Cell number and cell size in parthenocarpic vs. pollinated Blueberry (*Vaccinium ashei*) fruits. *Ann Bot* 80:419–425
- Capron A, Okrészl L, Genschik P (2003) First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci* 8:83–89
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta* 217:726–735
- Carvalho GMG (2000) Plant polytene chromosomes. *Genet Mol Biol* 3:1043–1050
- Castellano MM, del Pozo JC, Ramirez-Parra E, Brown S, Gutierrez C (2001) Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreduplication. *Plant Cell* 13:2671–2686
- Castellano MM, Boniotti MB, Caro E, Schnittger A, Gutierrez C (2004) DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreduplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* 16:2380–2393
- Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Olah B, Roudier F, Kondorosi A, Kondorosi E (1999) The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J* 18:4476–4484
- Ceccarelli M, Sanantonio E, Marmottini F, Amzallag GN, Cionini PG (2006) Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 227:113–118
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Bolling L, Frangne N, Carde JP, Renaudin JP (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* 139:1984–1994
- Chevalier C (2007) Cell cycle control and fruit development. In: Inzé D (ed) *Cell cycle control and plant development*. Annual plant reviews, vol 32. Blackwell, Oxford, pp 269–293
- Cong B, Liu J, Tanksley SD (2002) Natural alleles of a tomato QTL modulate fruit size through heterochronic regulatory mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13606–13611
- Cookson SJ, Radziejewski A, Granier C (2006) Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? *Plant Cell Environ* 29:1273–1283
- Coombe B (1976) The development of fleshy fruits. *Annu Rev Plant Physiol* 27:507–528
- Cowan AK, Taylor NJ, van Staden J (2005) Hormone homeostasis and induction of the small-fruit phenotype in a “Hass” avocado. *Plant Growth Regul* 45:11–19
- Crane JC (1964) Growth substances in fruit setting and development. *Annu Rev Plant Physiol* 15:303–326
- Cruz-Castillo JG, Woolley DJ, Lawes GS (2002) Kiwifruit size and CPPU response are influenced by the time of anthesis. *Sci Hortic* 95:23–30
- D’Amato F (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. In: Johri BM (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer, New York, pp 519–566
- D’Aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* 11:2407–2418
- De Schutter K, Joubès J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inzé D, De Veylder L (2007) Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* 19:211–25
- De Veylder L, Beeckman T, Beeckman GTS, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van Der Schueren E, Maes S, Naudits M, Inzé D (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* 13:1–15

- De Veylder L, Beeckman T, Beeckman GTS, de Almeida Engler J, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Van Der Schueren E, Jaqmar A, Engler G, Inzé D (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21:1360–1368
- De Veylder L, Beeckman T, Inzé D (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:655–665
- DeJong T, Goudriaan J (1989) Modeling peach fruit growth and carbohydrate requirements: reevaluation of the double-sigmoid growth pattern. *J Am Soc Hortic Sci* 114:800–804
- Edgar BA, Orr-Weaver TL (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105:297–306
- Fang Y, Spector DL (2005) Centromere positioning and dynamics in living *Arabidopsis* plants. *Mol Biol Cell* 16:5710–5718
- Ferrandiz C (2002) Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 53:2031–2038
- Ferrandiz C, Pelaz S, Yanofsky MF (1999) Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* 68:321–354
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo D, van der Knapp E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85–88
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:295–305
- Gendreau E, Höfte H, Grandjean O, Brown S, Traas J (1998) Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant J* 13:221–230
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993) Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5:1439–1451
- Giovannoni J (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:725–749
- Giovannoni J (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170–S180
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM (2006) Auxin response factor8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1873–1886
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol* 145:351–366
- Gonzalez N, Hernould M, Delmas F, Gévaudant F, Duffe P, Causse M, Mouras A, Chevalier C (2004) Molecular characterization of a *WEE1* gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol Biol* 56:849–861
- Gonzalez N, Gévaudant F, Hernould CC, Mouras A (2007) The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant J* 51:642–655
- Gray JD, Kolesik P, Hoj PB, Coombe BG (1999) Confocal measurement of the three-dimensional size and shape of plant parenchyma cells in a developing fruit tissue. *Plant J* 19:229–236
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Mar Castellano M, del Pozo JC (2002) G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol* 5:480–486
- Hamada K, Hasegawa K, Ogata T (2008) Strapping and a synthetic cytokinin promote cell enlargement in ‘Hiratanenashi’ Japanese persimmon. *Plant Growth Regul* 54:225–230
- Harada T, Kurahashi W, Yanai M, Wakasa Y, Satoh T (2005) Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species. *Sci Hortic* 105:447–456
- Hase Y, Trung KH, Matsunaga T, Tanaka A (2006) A mutation in the *uvi4* gene promotes progression of endoreduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *Plant J* 46:317–326
- Higashi K, Hosoya K, Ezura H (1999) Histological analysis of fruit development between two melon (*Cucumis melo* L. *reticulatus*) genotypes setting a different size of fruit. *J Exp Bot* 50:1593–1597

- Ho L (1992) Fruit growth and sink strength. In Marshall C and Grace J (eds) Fruit and seed production. Aspect of development, environmental physiology and ecology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 101–124
- Ho LC (1996) The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J Exp Bot* 47:1239–1243
- Hopping ME (1976) Structure and development of fruit and seeds in chinese gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.). *N Z J Bot* 14:63–68
- Imai KK, Ohashi Y, Tsuge T, Yoshizumi T, Matsui M, Oka A, Aoyama T (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *Plant Cell* 18:382–396
- Inzé D, De Veylder L (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40:77–105
- John PCL, Qi R (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends Plant Sci* 13:121–127
- Jones B, Frasse P, Olmos E, Zegzouti H, Li ZG, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2002) Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *Plant J* 32:603–613
- Joubès J, Chevalier C (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* 43:737–747
- Joubès J, Phan T-H, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of Cyclin-dependent kinase CDKA during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* 121:857–869
- Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin J-P (2000) Cyclin-dependent kinases related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43:607–621
- Kano Y (2007) Comparison of Cell Size and Kind of Sugars Accumulated in Grape Berries vs Melon Fruits. *Environ Control Biol* 45:95–101
- Kato N, Lam E (2003) Chromatin of endoreduplicated pavement cells has greater range of movement than that of diploid guard cells in Arabidopsis thaliana. *J Cell Sci* 116:2195–2201
- Kelly TJ, Brown GW (2000) Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* 69:829–880
- Kladnik A, Chourey PS, Pring DR, Dermastia M (2006) Development of the endosperm of Sorghum bicolor during the endoreduplication-associated growth phase. *J Cereal Sci* 43:209–215
- Knapp S (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot* 53:2001–2022
- Kondorosi E, Kondorosi A (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett* 567:152–157
- Kowles RV, Phillips RL (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7010–7014
- Kowles RV, Srienc F, Phillips RL (1990) Endoreduplication of nuclear DNA in the developing maize endosperm. *Dev Genet* 11:125–132
- Kudo N, Kimura Y (2002) Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J Exp Bot* 53:1017–1023
- Kwiatkowska M, Popłonska K, Kazmierczak A, Stepinski D, Rogala K, Polewczyk K (2007) Role of DNA endoreduplication, lipotubuloids, and gibberellic acid in epidermal cell growth during fruit development of *Ornithogalum umbellatum*. *J Exp Bot* 58:2023–2031
- Lammens T, Boudolf V, Kheibarshekan L, Panagiotis Zalmas L, Gaamouche T, Maes S, Vanstraelen M, Kondorosi E, La Thangue NB, Govaerts W, Inze D, De Veylder L (2008) Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc Nat Acad Sci U S A* 105:14721–14726
- Larkin JC, Brown ML, Churchman ML (2007) Insights into the endocycle from trichome development. In: Inzé D (ed) Cell cycle control and plant development. Annual plant reviews, vol 32. Blackwell, Oxford, pp 249–268

- Lee HC, Chiou DW, Chen WH, Markhart AH, Chen YH, Lin TY (2004) Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Sci* 166:659–667
- Leiva-Neto JT, Grafi G, Sabelli PA, Dante RA, Woo YM, Maddock S, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (2004) A dominant negative mutant of Cyclin-Dependent Kinase A reduces endoreduplication but not cell size or gene expression in maize endosperm. *Plant Cell* 16:1854–1869
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol* 139:292–299
- Lemontey C, Mousset-Declas C, Munier-Jolain N, Boutin JP (2000) Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J Exp Bot* 51:167–175
- Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatt S, Macas J, Schubert I (2006) Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18:2443–2451
- List A (1963) Some observations on DNA content and cell and nuclear volume growth in the developing xylem cells of certain higher plants. *Am J Bot* 50:320–329
- Liu J, Cong B, Tanksley SD (2003) Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus *fw2.2* controls fruit size. *Plant Physiol* 132:292–299
- Lopes MA, Larkins BA (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5:1383–1399
- Lukaszewska E, Sliwinska E (2007) Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic. *Sexual Plant Reprod* 20:99–107
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A (2007) Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant J* 52:865–876
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP (1998) The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* 125:107–114
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5:1661–1668
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* 132:161–173
- Mizukami Y (2001) A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Curr Opin Plant Biol* 4:533–539
- Mohr WP, Stein M (1969) Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci* 49:549–553
- Mounet F, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C, Bernillon S, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, Giraudel JL, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M (2009) Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiol* 149:1505–1528
- Nagl W (1976) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature* 261:614–645
- Neeno M, Schumann K, Nagl W (1994) Detection of rRNA and phaseolin genes on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence in situ hybridization after pepsin pretreatment. *Genome* 37:1018–1021
- Nitsch JP (1953) The physiology of fruit growth. *Annu Rev Plant Physiol* 4:199
- Nitsch JP (1965) Physiology of flower and fruit development. In: Ruhland W (ed) *Encyclopedia of plant physiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1537–1647

- Nitsch JP (1970) Hormonal factors in growth and development. In: Hulme AC (ed) *The biochemistry of fruits and their products 2*. Academic, London, pp 427–472
- Ognjanov V, Vujanic-Varga D, Mistic PD, Veresbaranji I, Macet K, Tesovic Z, Krstic M, Petrovic N (1995) Anatomical and biochemical studies of fruit development in peach. *Sci Hort* 64:33–48
- Ojeda H, Deloira A, Carbonneau A, Ageorges A, Romieu C (1999) Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* 38:145–150
- Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131:452–462
- Ozga JA, van Huizen R, Reinecke DM (2002) Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiol* 128:1379–1389
- Pandolfini T, Molesini B, Spena A (2007) Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci* 12:327–329
- Park JA, Ahn JW, Kim YK, Kim SJ, Kim JK, Kim WT, Pai HS (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant J* 42:153–163
- Roeder AHK, Yanofsky MF (2006) Fruit development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 52:1–50
- Rygel J, Lüttge U (1983) Water-relation parameters of giant and normal cells of *Capsicum annuum* pericarp. *Plant Cell Environ* 6:545–553
- Schlosser J, Olsson N, Weis M, Reid K, Peng F, Lund S, Bowen P (2008) Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma* 232:255–265
- Schnittger A, Weigl C, Bouyer D, Schöbinger U, Hülskamp M (2003) Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor *ICK1/KRP1* in single-celled Arabidopsis trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* 15:303–315
- Schubert V, Klatte M, Pecinka A, Meister A, Jasencakova Z, Schubert I (2006) Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 172:467–475
- Serrani J, Ruiz-Rivero O, Fos M, Garcia-Martinez JM (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J* 56:922–934
- Sesek P, Kump B, Bohanec B (2005) Interphase structure of endoreduplicated nuclei in diploid and tetraploid *Brassica oleracea* L. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 47:93–99
- Shimotohno A, Umeda M (2007) CDK phosphorylation. In: Inzé D (ed) *Cell cycle control and plant development*, Annual Plant Reviews, vol 32. Blackwell, Oxford, pp 114–137
- Smith O (1935) Pollination and life-history studies of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cornell Univ Agric Exp Stn Mem* 184:3–16
- Soliva-Fortuny RC, Martin-Belloso O (2003) New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends Food Sci Technol* 14:341–353
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D (2002) A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215:518–522
- Srivastava A, Handa AK (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J Plant Growth Regul* 24:67–82
- Stern RA, Flaishman M, Applebaum S, Ben-Arie R (2007) Effect of synthetic auxins on fruit development of ‘Bing’ cherry (*Prunus avium* L.). *Sci Hortic* 114:275–280
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6:544–553
- Sun Y, Dilkes BP, Zhang C, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, JUNG R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc Nat Acad Sci U S A* 96:4180–4185
- Suutarinen J, Änäkäinen L, Autio K (1998) Comparison of Light Microscopy and Spatially Resolved Fourier Transform Infrared (FT-IR) Microscopy in the Examination of Cell Wall Components of Strawberries. *Lebensm Wiss Technol* 31:595–601
- Tanksley SD (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* 16:S181–S189

- Varga A, Bruinsma J (1986) Tomato. In: Monselise SP (ed) CRC Handbook of fruit set and development. CRC, Boca Raton, FL, pp 461–480
- Verkest A, Weini C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A (2005a) Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol* 139:1099–1106
- Verkest A, de Manes CLO, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L (2005a) The Cyclin-Dependent Kinase inhibitor KRP2 controls the onset of endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* 17:1723–1736
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P, Kondorosi A, Kondorosi E (2003) Endoreduplication mediated by the Anaphase-Promoting Complex Activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15:2093–2105
- Vivian-Smith A, Koltunow AM (1999) Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarp in Arabidopsis. *Plant Physiol* 121:437–451
- Vlieghe K, Boudolf V, Beemster GTS, Maes S, Magyar Z, Atanassova A, de Almeida Engler J, De Groodt R, Inzé D, De Veylder L (2005) The DP-E2F-like gene *DELI* controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 15:59–63
- Vlieghe K, Inzé D, De Veylder L (2007) Physiological relevance and molecular control of the endocycle in plants. In: Inzé D (ed) Cell cycle control and Plant development. Annual plant reviews, vol 32. Blackwell, Oxford, pp 227–248
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytol* 177:60–76
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC (2000) Expression of the cyclin-dependent protein kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* 24:613–623
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech J-C, Bouzayen M (2005) The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17:2676–2692
- Weini C, Marquardt S, Kuijt SJH, Nowack MK, Jakoby MJ, Hülskamp M, Schnittger A (2005) Novel functions of plant Cyclin-Dependent Kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* 17:1704–1722
- Yadegari R, Drews GN (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell* 16:S133–S141
- Yu Y, Steinmetz A, Meyer D, Brown S, Shen WH (2003) The tobacco A-type cyclin, Nicta; CycA2;3, at the nexus of cell division and differentiation. *Plant Cell* 15:2763–2777



## **PARTIE 3 : Endopolyploïdisation : conséquences structurales et implications fonctionnelles**

### **3.1. Endopolyploïdisation, différenciation, croissance et modalités d'action.**

Nous avons mentionné lors des parties précédentes de cette introduction que l'endopolyploïdisation se produit au cours de la croissance et de la différenciation d'organes ou de lignées cellulaires particulières. Par conséquent, ce phénomène peut être considéré comme partie intégrante du programme de développement.

Il n'est alors pas surprenant de constater que ce phénomène est régulé par les mêmes signaux permettant le développement et la différenciation. En effet, dans l'hypocotyle d'*Arabidopsis*, les gibbérellines régulent positivement l'endopolyploïdisation et l'élongation cellulaire, avec des concentrations optimales différentes (Gendreau *et al.* 1999). Chez les mégakaryocytes, précurseurs des plaquettes sanguines, l'endopolyploïdisation et la différenciation sont régulées positivement *via* l'action de la thrombopoïétine (Zimmet and Ravid 2000). De même, l'induction du développement du fruit de tomate est soumise à une régulation hormonale complexe faisant suite à la pollinisation (Vriezen *et al.* 2008) et certaines de ces hormones (gibbérellines) sont à mêmes d'influer sur la ploïdie moyenne du fruit (Serrani *et al.* 2007).

L'hypothèse évoquée dans (Bourdon *et al.* 2010) selon laquelle l'endopolyploïdisation joue un rôle dans la différenciation cellulaire provient majoritairement du constat de la mise en place de ce phénomène au sein de cellules ou d'organes spécialisés (trichome, feuille, fruit). Dans ce cadre, il a été récemment prouvé que l'endopolyploïdisation a un rôle actif dans le devenir cellulaire des

trichomes chez *Arabidopsis* (Bramsiepe *et al.* 2010). L'initiation et la différenciation des trichomes chez des doubles mutants *gl2-gl3* (codant des facteurs de transcription promouvant l'initiation du trichome) a été partiellement restaurée *via* la surexpression de *CCS52*, gène déterminant dans la régulation et la promotion de l'endopolyploïdisation (Larson-Rabin *et al.* 2009, Mathieu-Rivet *et al.* 2010).

Nous avons aussi évoqué le lien entre endopolyploïdisation et croissance cellulaire (Bourdon, *et al.* 2010), en mentionnant la théorie du rapport nucléocytoplasmique arguant pour un équilibre entre quantité d'ADN et volume du cytoplasme (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003). En augmentant la teneur en ADN, l'endopolyploïdisation favoriserait la croissance subséquente du cytoplasme et donc de la cellule. Les mécanismes sous-jacents à cette régulation nucléocytoplasmique sont inconnus, mais une explication pourrait être constituée par le contrôle de la biogenèse des ribosomes *via* l'endopolyploïdisation, et donc le nombre d'acteurs disponibles pour la production de cytoplasme (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003).

Une autre hypothèse intéressante pour expliquer le rôle de l'endopolyploïdisation dans le développement a été émise par (Anisimov 2005). La cellule polyploïde y est vue comme un « endoclone oligomérique ». Les fonctions de plusieurs cellules sont réunies au sein d'une seule à l'organisation unifiée *via* une centralisation structurelle et fonctionnelle. Anisimov propose alors l'endopolyploïdisation comme une simplification du fonctionnement de l'organe *via* la centralisation de fonctions cellulaires équivalentes au sein de cellules dont l'ergonomie et les relations avec son environnement cellulaire proche seraient de fait optimisées. Cette hypothèse d'ergonomie serait donc en accord avec l'augmentation de la vitesse de croissance suggérée plus haut, l'organe endopolyploïdisé contenant des cellules à la fonctionnalité accrue. En ce sens, les avantages conférés par

l'oligomérisation du système cellulaire pourraient alors être considérés comme une des caractéristiques de la stratégie de croissance liée à la polyplœidie.

Au vu des données évoquées dans les parties précédentes, nous assumons que les rôles principaux de l'endopolyplœidisation consistent en une implication dans les phénomènes de croissance et de différenciation cellulaire et que cette implication passe alors probablement par une action sur le profil d'expression génétique. Nous aborderons alors un peu plus en détail dans les prochaines parties l'implication de l'endopolyplœidisation dans l'expression génétique et son organisation structurale à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire en relation avec l'hypothèse d'ergonomie citée ci-dessus.

### **3.2. Influence de l'endopolyplœidisation sur l'expression génétique**

Le lien entre endopolyplœidie et expression génétique peut être abordé sous deux angles différents :

#### **3.2.1. Augmentation globale du niveau de transcription via l'amplification fonctionnelle du génome.**

Cet aspect est lié au maintien du rapport nucléo-cytoplasmique. En effet, nous avons mentionné dans la partie précédente (§ 3.1) que (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003) proposent le maintien de ce rapport *via* un contrôle de la biogenèse des ribosomes pour la production de cytoplasme. Or cette hypothèse ne semble avoir de sens que si la quantité de transcrits à traduire suit l'augmentation du nombre de ribosomes. Cette hypothèse d'augmentation du niveau global de la transcription en corrélation directe avec le niveau de plœidie a été émise depuis longtemps. Cependant, peu de travaux l'ont confirmée. (Raslova *et al.* 2003) ont montré l'expression de plusieurs loci dupliqués chez les mégakaryocytes. Cette observation,

par extrapolation, permet d'émettre l'hypothèse que si toutes les copies respectives de chaque gène sont fonctionnelles lors du processus d'endopolypléidisation, la quantité globale de transcrits doit varier de façon proportionnelle au niveau de pléidie. (Guo *et al.* 1996) ont quant à eux abordé la question par des approches quantitatives comparatives de lignées de Maïs haploïde, diploïde, triploïde et tétraploïde. Ils ont ainsi montré par northern blot une constance des ratios des quantité ARNr/ADNg, révélant l'amplification fonctionnelle des gènes codant les ARN ribosomiaux, en accord avec l'hypothèse précitée. Ensuite, ils ont aussi pu montrer que la plupart des niveaux d'expression de 18 gènes candidats présentaient un niveau de transcrits constant par unité de génome, correspondant donc à une augmentation proportionnelle de la quantité de transcrits relativement au niveau de pléidie.

### **3.2.2. Endopolypléidie et régulation de l'expression génétique.**

Certains auteurs ont relevé le cas de gènes régulés positivement ou négativement en fonction du niveau de pléidie, ouvrant l'hypothèse de la régulation spécifique de la transcription par la mise en place de la polypléidie. Cet aspect, quant à lui, semble plus relié à une implication de l'endopolypléidie dans les processus de différenciation, puisqu'influençant directement le profil d'expression génétique en cours. La publication la plus représentative de ce type de régulation a été publiée en 1999, chez la levure, par (Galitski *et al.* 1999) qui, utilisant une approche par microarrays, ont démontré que certains gènes présentaient une augmentation ou une diminution de leur niveau d'expression proportionnelle au niveau de pléidie. Dans ce cas, et contrairement aux exemples cités dans le paragraphe précédent, certains gènes ne présentent plus un rapport constant ARNm/ADN, mais une baisse ou une hausse de ce rapport proportionnelle à la quantité d'ADN par cellule. Ce travail a aussi suggéré que ces variations spécifiques

d'expression génétique pouvaient expliquer la variation du phénotype avec le niveau de ploïdie. Plus récemment, (Raslova *et al.* 2007), en utilisant le même type d'approche, ont montré que la thrombopoïétine induisait chez des cellules animales en cultures la mise en place de niveaux de ploïdie avec des profils d'expression génétique spécifiques associés. De plus, les gènes dont l'expression variait en fonction du niveau de ploïdie étaient pour la plupart impliqués dans la différenciation indiquant que le phénomène d'endomitose chez les mégakaryocytes prend directement part à leur différenciation terminale. En effet, dans ce cas, la polyploïdisation promeut l'expression coordonnée de gènes impliqués dans la production et le fonctionnement des plaquettes sanguines. En revanche, le même type d'approche menée chez des hépatocytes se polyploïdisant avec l'âge (Lu *et al.* 2007), n'a pas montré d'implication de ce phénomène dans la différenciation de ces cellules, les profils d'expression génétique semblant similaires quel que soit le niveau de ploïdie. La ploïdie semble dans ce cas contribuer à une protection contre les stress oxydatifs. La régulation du profil d'expression génétique *via* l'endopolyploïdisation peut donc être dépendante du modèle considéré. On peut alors émettre l'hypothèse que la mise en place de l'endopolyploïdisation dans un organe au cours de l'évolution a pu tisser des liens d'interdépendance plus ou moins forts avec le programme de développement et de différenciation au cours duquel elle a lieu. En ce sens, chaque cas d'endopolyploïdisation pourrait avoir une influence différente sur le profil d'expression génétique. Cependant, les mécanismes par lesquels l'endopolyploïdisation peut influencer sur le programme d'expression génétique sont encore largement méconnus mais nous donnerons quelques pistes d'investigation possibles dans le paragraphe suivant.

### **3.2.3. Spatialisation du génome et expression génétique.**

La duplication du génome lors de l'endopolyploïdisation peut revêtir différentes formes, résultant en différentes conformations chromosomiques, relevant principalement chez les Eucaryotes de l'endomitose et de l'endoréduplication (D'Amato 1984, Edgar and Orr-Weaver 2001). Dans le cas de l'endoréduplication, nous avons évoqué dans (Bourdon, *et al.* 2010) que la condensation des chromosomes pouvait être dépendante du type cellulaire. Chez la drosophile, l'état de condensation des chromosomes polytènes semble provenir d'un alignement plus ou moins important des chromatides filles conditionné par la phase de l'endocycle et le nombre d'endocycles, respectivement (Dej and Spradling 1999). Même si l'étude descriptive du mécanisme d'endopolyploïdisation a été réalisée chez plusieurs modèles (D'Amato 1984, Therman 1995), peu d'informations sont disponibles quant aux implications fonctionnelles des modes d'endopolyploïdisation et leurs niveaux de condensation chromosomique. Nous pouvons cependant émettre un certain nombre d'hypothèses grâce à certaines données concernant l'interaction entre chromatides homologues et la spatialisation du génome.

Chez la drosophile, il a été reporté un appariement fréquent des chromosomes homologues durant l'interphase. De plus ces interactions entre séquences homologues semblent avoir une influence non négligeable dans l'expression de certains loci, un processus nommé transvection (Duncan 2002, Tartof and Henikoff 1991). Lors de l'endoréduplication, les chromatides filles peuvent s'aligner sur toute leur longueur et atteindre un haut de niveau de condensation. Récemment, (Hartl *et al.* 2008) ont pu montrer que la surexpression de la condensine II promouvait le désappariement de ces chromatides chez les chromosomes polytènes de drosophile. Ces auteurs ont montré que ce désappariement régulait négativement le processus de transvection, et donc la modulation de l'expression de gènes par appariement

homologue. Chez les plantes, ce processus de transvection n'a, à notre connaissance, jamais été décrit. De plus, un état de condensation comparable aux formes les plus condensées des chromosomes polytènes de drosophile n'a pu être observé, malgré un alignement important des chromosomes polytènes de cellules géantes d'anthers (Barlow 1975) ou de cellules de suspenseurs embryonnaires (Carvalho 2000). Cependant, une étude récente rapporte un appariement différentiel des chromatides sœurs à différents loci le long du chromosome 1 d'*Arabidopsis* et le fait que cet appariement diminue avec le niveau de ploïdie (Schubert *et al.* 2006). De plus, (Kato and Lam 2003), en utilisant un marquage *in vivo* de la GFP à un locus donné, rapportent une plus grande dynamique des loci taggés au sein des cellules endoredupliquées. Au vu de ces observations, la compréhension des interactions entre chromatides homologues au sein de cellules endopolyploïdisées semble importer pour appréhender la régulation de l'expression génétique lors de la mise en place de ce mécanisme.

Certaines données récentes liées à la notion et à la signification biologique de territoires chromosomiques peuvent permettre certaines hypothèses quant à l'influence de la spatialisation du génome au sein de cellules polyploïdes. Les chromosomes s'organisent dans le volume nucléaire en territoires définis et non aléatoires (Cremer and Cremer 2006) (Cremer and Cremer 2010). Même si la notion de territoire chromosomique est aujourd'hui largement acceptée, des différences d'organisation fonctionnelle subsistent entre les auteurs, donnant lieu à plusieurs modèles quelque peu différents. Ceci est principalement dû aux résolutions limitées offertes par la microscopie optique et à la difficulté d'obtenir des données en trois dimensions à l'aide de la microscopie électronique (Cremer and Cremer 2010). Trois modèles ont émergé (Branco and Pombo 2007) :

**1) Le modèle CT-IC** (Chromosome Territories – Inter Chromosome domain ; Figure 6a et 6b) : il propose l'organisation en territoires chromosomiques où les gènes actifs sont localisés à la périphérie de ces territoires (le domaine interchromosomique, Figure 6a), devenant alors accessibles aux acteurs de la transcription et de l'épissage. Le domaine interchromosomique est alors considéré comme un canal où les gènes sont transcrits et épissés. Cependant, suite à la démonstration de sites de transcription actifs au cœur des territoires chromosomiques, ce modèle a évolué vers une variante territoire chromosomique – domaine interchromatinien (Figure 6b). L'explication théorique de ce modèle repose alors sur une organisation ultrastructurale de la chromatine à 2 échelles (domaines de 1Mb eux-mêmes composés de sous-domaines chromatiniens de 100 kb) (Figure 6b).

**2) Le modèle « treillis »** (lattice model ; Figure 6c) :

Ce modèle propose une organisation générale de la chromatine en un réseau enchevêtré de fibres de 10 et 30 nanomètres dans les territoires chromosomiques. Les canaux interchromatiniens évoqués dans le modèle CT-IC deviennent des zones d'interactions plus ou moins prononcées aux frontières des territoires chromosomiques. Il suggère que toutes les zones du maillage ainsi organisé restent accessibles aux macromolécules par diffusion et que la condensation de la chromatine en fibres de 30 nanomètres serait suffisante pour réguler l'activité de gènes en limitant l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'intérieur de la fibre. Ainsi, ce modèle se passe d'une super-organisation en sous-domaines de 100 kb évoqué plus haut.

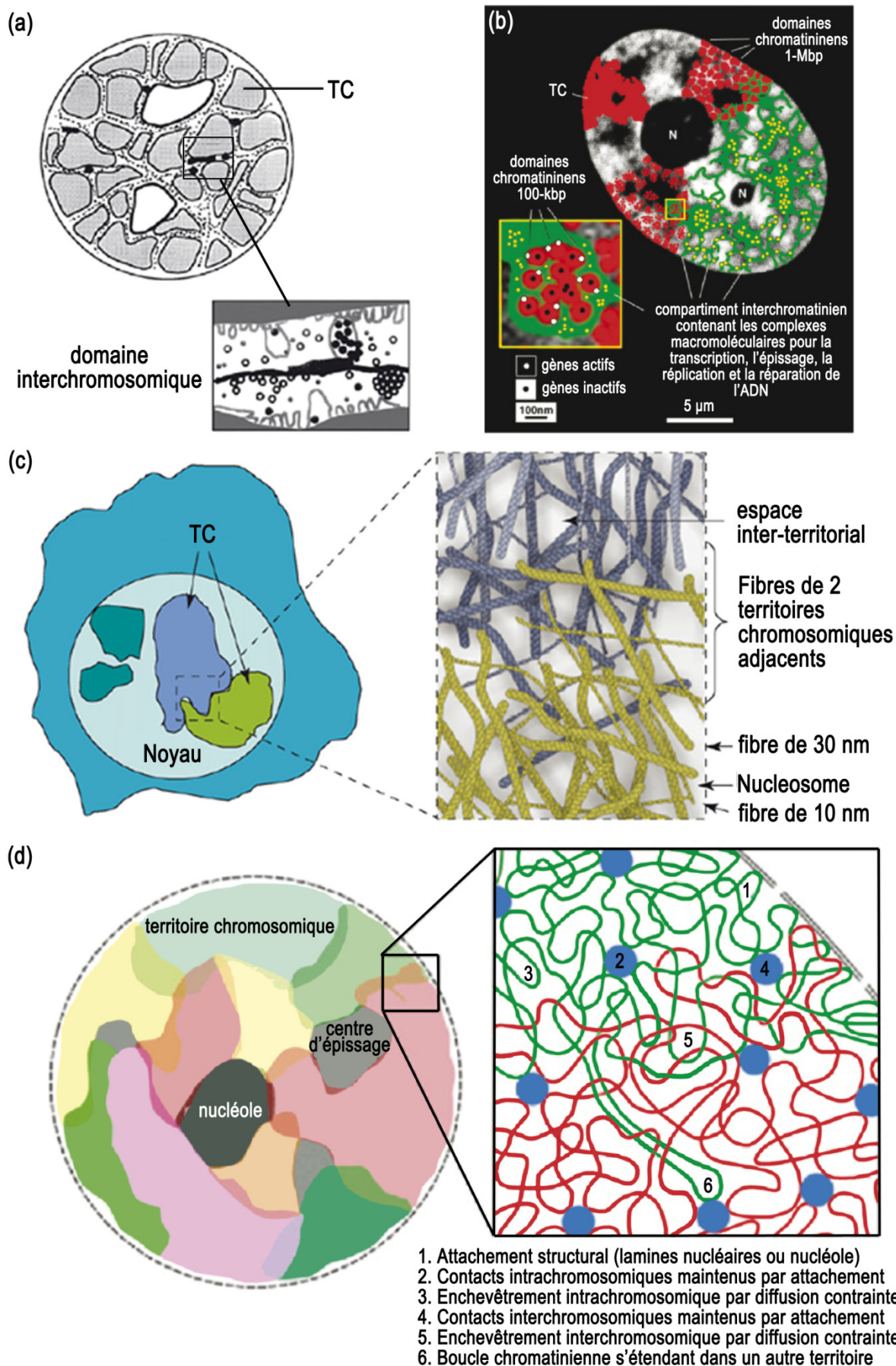
**3) Le modèle réseau interchromatinien** (ICN, Inter-Chromatin Network ; Figure 6c) :

Il laisse un peu de côté la notion de différences ultrastructurales entre chromatine active et inactive pour se concentrer sur l'influence des processus de transcription



sur l'organisation du génome. Ce modèle repose sur l'observation récente d'interactions longue distance intrachromosomiques et même interchromosomiques. Des « foci » de RNA Pol II actives ont pu être détectés au niveau des zones d'enchevêtrement entre les territoires, et l'inhibition de la transcription a pour conséquence un changement du profil d'enchevêtrement entre 2 chromosomes. Donc, si la présence d'usines de transcription stabilise l'interaction interchromatinienne, cela suggère qu'elle joue un rôle prépondérant dans l'organisation des chromosomes dans le noyau. (Schoenfelder *et al.* 2010), ont récemment montré de manière très élégante que sur 33 gènes exprimés dans les cellules érythroïdes et répartis sur 15 chromosomes différents, ceux étant co-régulés étaient préférentiellement recrutés au sein des mêmes usines de transcription. De plus, ils ont montré que Klf1, facteur de transcription exprimé dans les cellules érythroïdes, était capable de favoriser la localisation des gènes qu'il régulait au sein d'un nombre restreint d'usines de transcription. Ces auteurs concluent que la mise en place d'usines de transcription spécialisées augmenterait l'efficacité de transcription de gènes co-régulés *via* la centralisation de facteurs de transcription spécifiques requis pour l'augmentation et la coordination de leur transcription. Cette augmentation de la concentration locale de facteurs de transcription et de leurs sites de liaison pourrait ainsi augmenter la probabilité de ré-initiation de la transcription.

Toutes ces considérations pointent le fait que non seulement l'organisation et la structure de la chromatine joue un rôle dans la régulation de la transcription, mais que la transcription elle-même joue un rôle prépondérant dans l'organisation du génome dans le noyau. Ces découvertes récentes mettent en exergue l'extrême complexité de l'interrelation entre positionnement du génome et régulation de la transcription.



**Figure 6 - Modèles actuels des territoires chromosomiques.**

a) Modèle CT-IC (Chromosome Territories - Inter Chromosome domain). b) Modèle CT-IC «actuel» (Chromosome Territories - Inter Chromatinian domain). c) Modèle Treillis (Lattice model) d) Modèle Réseau Interchromatinien (ICN model, Inter-Chromatin Network). TC : Territoire Chromosomique.

Partant de ce constat, l'endopolyploïdisation pourrait donc ne pas seulement avoir un simple effet quantitatif sur la transcription, en relation directe avec le nombre d'endocycles. L'endomitose, avec l'augmentation du nombre de chromosomes à chaque endocycle, et l'endoréduplication, produisant des chromosomes polytènes, pourraient avoir des impacts différents sur l'organisation chromosomique dans le noyau et donc sur la régulation qualitative de la transcription. *A priori*, la structure polytène présenterait un avantage au vu de l'hypothèse de centralisation des fonctions émise par Anisimov (2005). En effet, si toutes les chromatides sœurs sont proches dans l'espace, le recrutement d'un gène au sein d'une usine de transcription semble plus facile à mettre en œuvre. Ainsi, récemment (Berr and Schubert 2007) ont pu montrer que l'organisation en territoires chromosomiques était maintenu durant le processus d'endoréduplication chez *Arabidopsis*. On peut alors se demander si les gènes dupliqués sont recrutés au sein de « super-usines » de transcription (*cf.* modèle ICN ci-dessus). L'existence de telles usines irait dans le sens d'une centralisation des mécanismes de transcription et de leurs mécanismes de régulation, pouvant ainsi améliorer l'ergonomie de fonctionnement du noyau.

Toutes ces observations pointent donc le fait que les interactions entre chromatides, la spatialisation du génome sont autant de données à prendre à compte pour appréhender les mécanismes d'endopolyploïdisation et leur rôle dans l'expression génétique.

### **3.3. Caractéristiques cellulaires de la cellule polyploïde**

#### **3.3.1. Organisation et différenciation de l'enveloppe nucléaire lors de l'endopolyploïdisation**

L'organisation et le fonctionnement dynamique du génome dépendent étroitement des échanges entre le cytoplasme et le noyau. A ce titre, il semble donc intéressant de considérer aussi l'impact possible de l'endopolyploïdie sur l'enveloppe nucléaire et l'organisation cytoplasmique.

L'enveloppe nucléaire est une double membrane constituée de la membrane nucléaire interne et de la membrane nucléaire externe. Un autre système membranaire spécifique, opérant la jonction entre ces deux membranes au niveau des pores nucléaires, a aussi pu être identifié (Evans *et al.* 2009). Elle crée un environnement biochimique distinct du cytoplasme, et offre une surface d'ancrage de la chromatine (Rose *et al.* 2004) et jouerait un rôle important dans la régulation de l'expression génétique (Akhtar and Gasser 2007). La membrane nucléaire régule aussi les échanges avec le cytoplasme grâce à une structure protéique complexe, le pore nucléaire, composé d'environ trente polypeptides différents pour un poids moléculaire total de 40 à 70 MDa et entouré de la membrane du pore. Celui-ci forme un canal aqueux de 40 nm de diamètre par lequel les petites molécules (masse < 20-40 kDa) diffusent librement, alors que les molécules plus grosses sont transportées *via* des processus actifs et signaux-dépendants (Brandizzi *et al.* 2004, Hetzer 2010). Les principaux mouvements du nucléoplasme vers le cytoplasme concernent des ARNm, des ARNt et des protéines, et ceux du cytoplasme vers le noyau consistent majoritairement en l'import de protéines nucléaires. Des motifs spécifiques d'acides aminés déterminent la capacité à l'importation ou à l'exportation nucléaire (Brandizzi, *et al.* 2004).

L'étude de l'enveloppe nucléaire végétale a moins progressé que celle de son pendant animal. Plusieurs caractéristiques différencient ces deux enveloppes. Tout d'abord, les lamines, famille de protéines nucléaires formant un réseau enchevêtré de fibres sur la face interne de l'enveloppe nucléaire des métazoaires et permettant l'accrochage de la chromatine, semblent absentes chez les végétaux et les levures. La microscopie électronique a révélé la présence de structures similaires chez les plantes supérieures (Rose, *et al.* 2004). De plus, les plantes ne possèdent pas de centrosomes clairement défini, le rôle de centre organisateur de microtubules (« MTOC », « microtubule organizing center »), présent chez les animaux, semblant assuré par l'enveloppe nucléaire (Meier 2007).

Durant la différenciation, il a été montré que la membrane nucléaire pouvait subir d'importantes modifications chez les animaux et chez les végétaux. Chez les animaux, (Fricker *et al.* 1997) ont montré la présence de nombreuses invaginations, ou canaux membranaires dérivés du réticulum endoplasmique, pouvant traverser tout le noyau. Chez les végétaux, (Collings *et al.* 2000) ont aussi révélé la présence de profonds sillons et d'invaginations chez les noyaux de cellules d'épiderme d'oignon et de la lignée cellulaire BY-2 de tabac. Le terme « invagination », désignait ici des structures semblables à celles décrites par Fricker, à savoir de profonds canaux tubulaires dérivés du RE. Ils ont aussi pu co-localiser ces invaginations avec des filaments d'actine. Cependant, l'apparition de ces sillons ne semble pas dépendante de la polymérisation des fibres d'actine, car elle se maintient en présence de cytochalasine D, drogue dépolymérisante des filaments d'actine. Dans cette étude (Collings, *et al.* 2000), ces structures se sont révélées stables dans le temps, contrairement aux observations de Fricker *et al.* (1997), et aux changements de forme des noyaux observés chez *Arabidopsis* (Chytilova *et al.* 2000). Expliquant la fonctionnalité de ces invaginations par une augmentation de la surface d'échange et par l'export putatif d'ARN *via* les fibres d'actine observées, Collings *et al.* (2000)

suggèrent la concomitance de ce phénomène avec l'endopolypléidisation, car la mise en place de ces invaginations, comme l'endopolypléidisation, semble réservée à certains types cellulaires. Cependant, cette suggestion n'a pas encore été vérifiée, et très peu de données existent quant à l'influence de l'endopolypléidie sur l'ultrastructure du noyau. Les seules observations notables sur la structure des noyaux durant l'endopolypléidisation proviennent du modèle des cellules du trophoblaste des mammifères, où le noyau endoredupliqué subit un phénomène particulier de dépolypléidisation en se subdivisant en plusieurs sous-structures (Zybina and Zybina 2008).

### **3.3.2. Organisation et évolution du cytoplasme en relation avec l'endopolypléidie**

Si beaucoup d'études font état de la régulation fine du rapport nucléocytoplasmique chez les animaux, peu de données existent quant à ce phénomène chez les plantes, du fait de la difficulté à mesurer le volume cytoplasmique, qui découle de l'importance et de la variabilité du compartiment vacuolaire chez les cellules végétales (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003).

Si le volume du cytoplasme suit la quantité d'ADN selon l'hypothèse du rapport nucléocytoplasmique, la question se pose de l'évolution des organelles lors de la croissance cytoplasmique. En effet, les mitochondries et les chloroplastes sont le siège de fonctions physiologiques majeures comme la respiration, la photosynthèse, ainsi que des programmes d'expression génétique coordonnés avec ceux du noyau. On peut donc s'attendre à ce que leur population, leur volume ou leur contenu en ADN s'adapte au niveau de ploïdie nucléaire au cours de la croissance cellulaire. Peu de données sont disponibles à ce sujet. (Raynaud *et al.*, 2005) ont montré la présence d'une régulation commune aux divisions cellulaire et plastidiale, en montrant que la diminution d'expression du gène AtCDT1 affectait ces 2 processus.

(Schwacke *et al.* 2007) ont révélé récemment la présence de facteurs de transcription à double localisation, nucléaire et plastidiale, ou nucléaire et mitochondriale, ce qui constitue un argument en faveur d'une coordination dans la régulation de l'expression génétique au sein de ces organelles.

Nous avons déjà évoqué l'hypothèse d'un apport de l'endopolyplôidie à la croissance cellulaire et tissulaire *via* une centralisation des fonctions au sein d'une seule cellule. Dans ce cas on peut se demander si le gain d'ergonomie potentiellement acquis dans la cellule polyploïde passe par une structuration cytoplasmique particulière. Il a été évoqué plus haut la présence de filaments d'actine au sein de replis membranaires du noyau chez l'oignon et une relation putative de ces structures avec l'endopolyplôidie (Collings, *et al.* 2000). Or, il a été que la myosine XI est fortement impliquée dans la motilité des organelles tel que le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, les peroxysomes, les mitochondries et le noyau lui-même (cité par (Thomas *et al.* 2009)). Dans ce cas, y-a-t-il des interactions privilégiées entre le noyau polyploïde et son cytoplasme environnant, interactions notamment opérées *via* le cytosquelette ? En effet, il a déjà été rapporté chez le tabac des rapprochements et même un regroupement des plastes autour de l'enveloppe nucléaire, rapprochement supposé améliorer les interactions fonctionnelles entre ces organelles. De plus, les plastes ont été co-localisés avec les repliements de l'enveloppe nucléaire (Kwok and Hanson 2004). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a mis en évidence un lien entre polyploïdie et la mise en place d'une organisation spécifique du cytoplasme de la cellule polyploïde et plus particulièrement à proximité du noyau.

### **3.4. Objectifs du travail de thèse**

Nous avons souligné la forte représentation de l'endopolyploïdisation chez les Eucaryotes au sein de nombreux tissus, et mis en avant l'importance que pourrait jouer ce mécanisme, en particulier durant le développement du fruit, *via* une probable implication dans la croissance et la différenciation cellulaire. Son implication dans la croissance cellulaire chez la tomate a entre autres été démontré en révélant une corrélation positive entre taille cellulaire moyenne et ploïdie moyenne au sein de 20 fonds génétiques différents (Cheniclet *et al.* 2005). De plus, cette étude a aussi mis en avant une corrélation positive entre le poids moyen du fruit et la taille cellulaire moyenne dans le péricarpe. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce mécanisme et de son implication dans le développement et la différenciation du fruit de tomate, nous avons réalisé une étude à différentes échelles en définissant 2 axes principaux de ce travail :

#### **I – Etude de l'endopolyploïdisation à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire : implication dans la croissance, la différenciation cellulaire et intégration dans le développement du péricarpe.**

Comme il a été mentionné au cours de cette introduction, les thématiques de croissance cellulaire et de différenciation ont souvent été mises en lien avec le phénomène d'endopolyploïdisation. Cependant, il existe peu d'études faisant cas de l'établissement de liens directs entre niveau de ploïdie et taille cellulaire (Cebolla *et al.* 1999, Gendreau *et al.* 1997, Kudo and Kimura 2002, Lee *et al.* 2004, Melaragno *et al.* 1993). De plus, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude mettant en lien endopolyploïdie et phénotype cellulaire, tant sur les aspects organisationnels que sur les aspects de différenciation interne de la cellule. C'est dans cet objectif qu'une mise au point d'un outil de détermination de la ploïdie *in situ* a été réalisée dans ce travail. Cet outil nous a permis d'étudier la ploïdie directement dans son contexte



cellulaire et ainsi d'étudier finement les caractères liés à l'endopolyploïdisation. Un intérêt particulier a été porté sur l'étude structurale et son environnement. De même, nous avons voulu améliorer grâce cette méthode nos connaissances concernant la mise en place de l'endopolyploïdisation à l'échelle tissulaire, et ainsi mieux appréhender son intégration dans le programme de développement du fruit.

**II) Impact des variations de ploïdie sur le développement du fruit : implication dans la croissance cellulaire et la cinétique de développement du fruit.**

Nous avons aussi mis en avant lors de cette introduction (Bourdon, *et al.* 2010) une hypothèse relativement récente concernant le rôle de l'endopolyploïdisation dans la vitesse de croissance (Barow 2006, Barow and Meister 2003). Afin de tester l'influence du niveau de ploïdie sur ce paramètre, nous avons alors cherché, au sein d'une population de lignées génétiquement proches, des plantes présentant des fruits affectées dans le niveau de ploïdie. Pour ce faire, nous avons entrepris le criblage d'une banque de mutants EMS de tomate (*cv* Micro-Tom) afin d'isoler des mutants présentant des profils de ploïdie altérés dans le but d'étudier leur cinétique de croissance cellulaire et organismique.

## **REFERENCES INTRODUCTION PARTIE 3**

- Akhtar, A. and Gasser, S.M.** (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet*, **8**, 507-517.
- Anisimov, A.P.** (2005) Endopolyploidy as a morphogenetic factor of development. *Cell Biology International*, **29**, 993-1004.
- Barlow, P.W.** (1975) The polytene nucleus of the giant hair cell of *Bryonia* anthers. *Protoplasma*, **83**, 339-349.
- Barow, M.** (2006) Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, **28**, 271-281.
- Barow, M. and Meister, A.** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell and Environment*, **26**, 571-584.
- Berr, A. and Schubert, I.** (2007) Interphase Chromosome Arrangement in *Arabidopsis thaliana* Is Similar in Differentiated and Meristematic Tissues and Shows a Transient Mirror Symmetry After Nuclear Division. *Genetics*, **176**, 853-863.
- Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. In *Progress in Botany 71*, pp. 101-132.
- Bramsiepe, J., Wester, K., Weinl, C., Roodbarkelari, F., Kasili, R., Larkin, J.C., Hülskamp, M. and Schnittger, A.** (2010) Endoreplication Controls Cell Fate Maintenance. *PLoS Genet*, **6**, e1000996.
- Branco, M.R. and Pombo, A.** (2007) Chromosome organization: new facts, new models. *Trends in Cell Biology*, **17**, 127-134.
- Brandizzi, F., Irons, S.L. and Evans, D.E.** (2004) The plant nuclear envelope: new prospects for a poorly understood structure. *New Phytologist*, **163**, 227-246.
- Carvalho, G.M.G.** (2000) Plant polytene chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, **23**, 1043-1050.
- Cebolla, A., Maria Vinardell, J., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E.** (1999) The mitotic inhibitor ccs52 is required for

- endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*, **18**, 4476-4484.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.*, **139**, 1984-1994.
- Chytilova, E., Macas, J., Sliwinska, E., Rafelski, S.M., Lambert, G.M. and Galbraith, D.W.** (2000) Nuclear Dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2733-2741.
- Collings, D.A., Carter, C.N., Rink, J.C., Scott, A.C., Wyatt, S.E. and Allen, N.S.** (2000) Plant Nuclei Can Contain Extensive Grooves and Invaginations. *Plant Cell*, **12**, 2425-2440.
- Cremer, T. and Cremer, C.** (2006) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950S to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *European Journal of Histochemistry*, **50**, 223-272.
- Cremer, T. and Cremer, M.** (2010) Chromosome Territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**.
- D'Amato** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. *Embryology of angiosperms*, 519-566.
- Dej, K.J. and Spradling, A.C.** (1999) The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development*, **126**, 293-303.
- Duncan, I.W.** (2002) Transvection effects in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, **36**, 521-556.
- Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L.** (2001) Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell*, **105**, 297-306.
- Evans, D., Graumann, S.L.I.K. and Runions, J.** (2009) The Plant Nuclear Envelope. In *Functional Organization of the Plant Nucleus*, pp. 9-28.

- Fricker, M., Hollinshead, M., White, N. and Vaux, D.** (1997) Interphase Nuclei of Many Mammalian Cell Types Contain Deep, Dynamic, Tubular Membrane-bound Invaginations of the Nuclear Envelope. *The Journal of Cell Biology*, **136**, 531-544.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R.** (1999) Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gendreau, E., Orbovic, V., Höfte, H. and Traas, J.** (1999) Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the <i>Arabidopsis thaliana</i> hypocotyl. *Planta*, **209**, 513-516.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **114**, 295-305.
- Guo, M., Davis, D. and Birchler, J.A.** (1996) Dosage Effects on Gene Expression in a Maize Ploidy Series. *Genetics*, **142**, 1349-1355.
- Hartl, T.A., Smith, H.F. and Bosco, G.** (2008) Chromosome Alignment and Transvection Are Antagonized by Condensin II. *Science*, **322**, 1384-1387.
- Hetzer, M.W.** (2010) The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, Article No.: a000539.
- Kato, N. and Lam, E.** (2003) Chromatin of endoreduplicated pavement cells has greater range of movement than that of diploid guard cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci*, **116**, 2195-2201.
- Kudo, N. and Kimura, Y.** (2002) Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J. Exp. Bot.*, **53**, 1017-1023.
- Kwok, E.Y. and Hanson, M.R.** (2004) Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Reports*, **23**, 188-195.
- Larson-Rabin, Z., Li, Z., Masson, P.H. and Day, C.D.** (2009) FZR2/CCS52A1 Expression Is a Determinant of Endoreduplication and Cell Expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **149**, 874-884.

- Lee, H.-C., Chiou, D.-W., Chen, W.-H., Markhart, A.H., Chen, Y.-H. and Lin, T.-Y.** (2004) Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Science*, **166**, 659-667.
- Lu, P., Prost, S., Caldwell, H., Tugwood, J., Betton, G. and Harrison, D.** (2007) Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. *Mammalian Genome*, **18**, 617-626.
- Mathieu-Rivet, E., Gevaudant, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P.T., Mouras, A., Fernie, A.R., Gibon, Y., Rothan, C., Chevalier, C. and Hernould, M.** (2010) Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant Journal*, **62**, 727-741.
- Meier, I.** (2007) Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 27-34.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B. and Coleman, A.W.** (1993) Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *Plant Cell*, **5**, 1661-1668.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Le Roux, D.T., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., Lazar, V. and Vainchenker, W.** (2007) Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*, **109**, 3225-3234.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N. and Vainchenker, W.** (2003) Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, **101**, 541-544.
- Raynaud, C., Perennes, C., Reuzeau, C., Catrice, O., Brown, S. and Bergounioux, C.** (2005) Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8216-8221.
- Rose, A., Patel, S. and Meier, I.** (2004) The plant nuclear envelope. *Planta*, **218**, 327-336.

- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., Eskiw, C.H., Luo, Y., Wei, C.-L., Ruan, Y., Bieker, J.J. and Fraser, P.** (2010) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, **42**, 53-61.
- Schubert, V., Klatt, M., Pecinka, A., Meister, A., Jasencakova, Z. and Schubert, I.** (2006) Sister Chromatids Are Often Incompletely Aligned in Meristematic and Endopolyploid Interphase Nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **172**, 467-475.
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K. and Krause, K.** (2007) Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Molecular Genetics and Genomics*, **277**, 631-646.
- Serrani, J., Fos, M., Atarés, A. and García-Martínez, J.** (2007) Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 211-221.
- Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 544-553.
- Tartof, K.D. and Henikoff, S.** (1991) Trans-sensing effects from *Drosophila* to humans. *Cell*, **65**, 201-203.
- Therman, E.** (1995) Chromosome behavior in cell differentiation: a field ripe for exploration? *Genetics*, **141**, 799-804.
- Thomas, C., Tholl, S., Moes, D., Dieterle, M., Papuga, J., Moreau, F. and Steinmetz, A.** (2009) Actin bundling in plants. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **66**, 940-957.
- Vriezen, W.H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J. and Mariani, C.** (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, **177**, 60-76.
- Zimmet, J. and Ravid, K.** (2000) Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Experimental hematology*, **28**, 3-16.

**Zybina, E.V. and Zybina, T.G.** (2008) Modifications of nuclear envelope during differentiation and depolyploidization of rat trophoblast cells. *Micron*, **39**, 593-606.

## **CHAPITRE 2 : RESULTATS**



## PARTIE 1 : ARTICLE 1

# ***In planta* quantification of endoreduplication using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)**

Matthieu Bourdon<sup>1,2</sup>, Olivier Coriton<sup>3</sup>, Catherine Cheniclet<sup>1,2</sup>, Spencer Brown<sup>4</sup>,  
Christel Poujol<sup>5</sup>, Christian Chevalier<sup>1,\*</sup>, Jean-Pierre Renaudin<sup>2</sup> and Nathalie Frangne<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche  
619 sur la Biologie du Fruit, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex, France;

<sup>2</sup> Université Bordeaux 1, Unité Mixte de Recherche 619 sur la Biologie du Fruit, BP  
81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex, France;

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche  
118 d'Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, BP 35327, F-35653 Le  
Rheu cedex, France.

<sup>4</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut des Sciences du  
Végétal, UPR 2355, bâtiment 23/24; F-91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>5</sup> Université V. Segalen Bordeaux 2, Photonic Imaging Platform of BIC (Bordeaux  
Imaging Center), Institut des neurosciences François Magendie, Université V  
Segalen Bordeaux2, 33077 Bordeaux edex, France

\* Author for correspondence: Christian Chevalier

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université de Bordeaux,  
Unité Mixte de Recherche 619 sur la Biologie du Fruit, BP 81, F-33883 Villenave  
d'Ornon Cedex, France

Tel: +33 557122693; Fax: +33 557122541; e-mail: [chevalie@bordeaux.inra.fr](mailto:chevalie@bordeaux.inra.fr)

*Running title: In situ* endoreduplication assessment for plant nuclei

**Key words:** Endoreduplication, polyteny, pericarp, nuclei, FISH, Tomato

## **ABSTRACT**

Endopolyploidy, i.e. amplification of the genome in absence of mitosis, occurs in many plant species and goes along with organ and cell differentiation. Deciphering the functional roles of endopolyploidy is hampered by the fact that polyploid tissues generally comprise cells with various ploidy levels. In some fleshy fruits (amongst them tomato fruit) the ploidy levels present at the end of development range from 2C to 256C in the same tissue.

For investigating the temporal and spatial distribution of endopolyploidy it is necessary to address the DNA content of individual nuclei *in situ*. Conventional methods such as fluorometry or densitometry can be used for some tissues displaying favorable characteristics: small cells, small nuclei, organization in monolayer. But high levels of varying polyploidy are usually associated with large sizes of nuclei and cells, in a complex 3D-organization of the tissues. The conventional methods are inadequate for such tissue, becoming semi-quantitative and imprecise.

We have developed a new method based on BAC-FISH that allows the *in situ* determination of DNA ploidy level of individual nuclei. This method relies on the counting of hybridization signals and not on intensity measurements and is expected to provide an alternative method to map endopolyploidy patterns in mature, 3-D organized plant tissues as illustrated by the analysis of ploidy level and cell size in pericarp from tomato mature green fruit.

## **INTRODUCTION**

Endopolyploidy is a widespread process which corresponds to the amplification of the genome in absence of mitosis. It can be restricted to certain cell types or tissues but most of the differentiated cells in numerous higher plant species undergo several rounds of DNA synthesis leading to endopolyploidy (Nagl, 1975). Endopolyploidy has been described to be associated with increased gene expression (Galitski *et al.*, 1999; Raslova *et al.*, 2003) and increased cell growth (Lee *et al.*, 2009). In plants, a strong correlation between cell size and endoreduplication has been reported in a broad range of species (Melaragno *et al.*, 1993; Gendreau *et al.*, 1998; Vilhar *et al.*, 2002; Cheniclet *et al.*, 2005; Jovtchev *et al.*, 2006; Bourdon *et al.*, 2010).

Deciphering the functional roles of endopolyploidy is hampered by the fact that polyploid tissues are often made of cells with various degrees of endopolyploidy (e.g. in tomato fruit; Cheniclet *et al.*, 2005). The extent of this mechanism is often assessed by global methods such as flow cytometry, which describes the frequency distribution of the different ploidy classes of nuclei present in a tissue, but does not provide any information on the tissue-specific localization of these nuclei. Therefore linking the ploidy level of each individual nucleus to its cellular and tissular environment is hardly possible.

Since endopolyploidy is involved in organ and cell differentiation and in many developmental and physiological processes (Lee *et al.*, 2009), investigating the temporal and spatial distribution of this phenomenon in a tissue is an important step towards understanding its role. It is therefore necessary to address the DNA content of individual nuclei *in situ*.

Two kinds of methods are available to measure the DNA content of individual nuclei *in vivo*: densitometry and fluorometry. Both methods are based on DNA staining, the former one using Schiff's reagent according to the Feulgen reaction (Greilhuber, 2008) and the latter using a fluorochrome such as 4',6-diamino-2-

phenylindole (DAPI) or propidium iodide (Dolezel *and* Bartos, 2005; Johnston *et al.*, 1999). In both cases the signal can be quantified either by a photometer equipped with diaphragms suited to the nuclear size (photometric cytometry) or by analysis of images generally acquired with a CCD camera (image cytometry).

In the Feulgen method the DNA content is proportional to the nuclear absorbance (or optical density) calculated from measurement of the transmitted light intensity. The use of the Feulgen method requires a strict standardization of sample preparation and staining procedure and a precise calibration of the instrument in order to guarantee reliable measurements of DNA amounts (Vilhar and Desmastia, 2002). The Feulgen method is widely used in medical sciences for diagnostic purposes (Haroske *et al.*, 1998). In plant sciences it has been used mainly for the determination of plant genome size (Bennett and Leitch, 1995) and now tends to be replaced by flow cytometry. The determination of genome size was usually performed on isolated nuclei or on meristematic tissues suitable for squash preparations, allowing the obtention of a monolayer of cells on a microscope glass slide. This method cannot be applied if the maintenance of tissue integrity is required for a spatial localization of the observed nuclei. Few studies report simultaneous measurement of ploidy level by Feulgen densitometry and spatial localization of the observed nuclei in “intact” tissues, such as maize caryopsis (Vilhar *et al.*, 2002; Dermastia *et al.*, 2009) or sorghum caryopsis (Kladnik *et al.*, 2006). In the latter case the measurements were made using 20  $\mu\text{m}$  paraffin sections, *i.e.* thick enough to contain whole nuclei (5-20  $\mu\text{m}$  in diameter).

In the fluorometric method, the DNA content is estimated from the intensity of fluorescence emitted by the stained nuclei. The *in situ* measurement of ploidy levels was achieved in Arabidopsis leaf and hypocotyls-epidermis, using a microspectrofluorometer (Melaragno *et al.*, 1993). The fluorometric method was also used in combination with image analysis, to measure directly the relative nuclear

DNA content of individual cells from DAPI-stained *Arabidopsis* hypocotyls *in situ* (Gendreau *et al.*, 1998) or in *Arabidopsis* meristematic cells treated with different drugs (Grandjean *et al.*, 2004). So far the *in situ* measurement of ploidy levels by densitometric or fluorometric methods has been applied only to young tissues with small cells and nuclei, either in monolayers or in paraffin sections.

In fleshy fruits of many species, very high ploidy levels (256C) are reached at the end of fruit development, concomitant with very large cell sizes (Bourdon *et al.*, 2010). As a consequence the above-mentioned methods may not be appropriate to perform *in situ* measurements of ploidy levels in fully developed fruit tissues in which cell and nuclear size can range over two orders due to endopolyploidy.

In order to investigate endopolyploidy in tomato fruit at the cellular level, we have developed a new method based on fluorescent *in situ* hybridization (FISH) that allows a direct determination of *in situ* DNA ploidy level of individual nuclei. This method is based on the counting of hybridization signals, and it is therefore free from constraints related to measurement of staining intensities. It is thus expected to provide an alternative way to densitometric and fluorometric methods to analyze endopolyploidy patterns in mature differentiated, 3-D organized plant tissues. We applied this method to map ploidy level in pericarp from mature green fruit. Our results indicate that ploidy level is not only dependent on cell size but also relies on cell position within the pericarp.

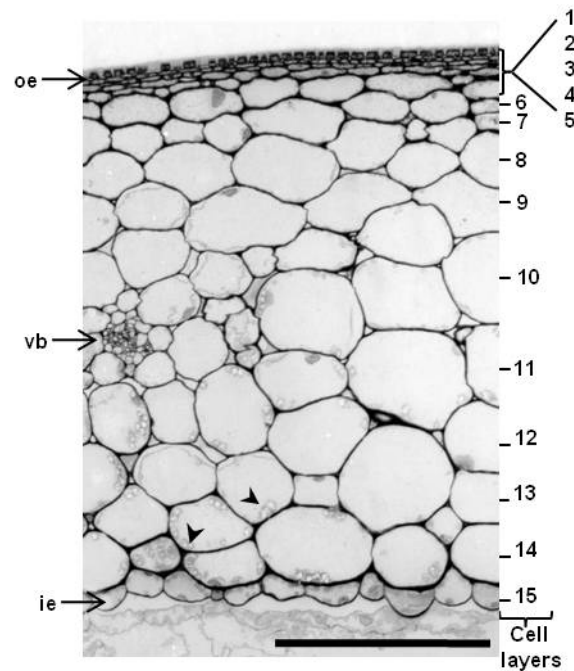
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Current methods for *in situ* ploidy assessment are not suited to tomato pericarp**

Tomato fruit pericarp displays an ordered pattern of parenchymatic cell layers (mesocarp) surrounded by the first outer and inner epidermal cell layers and crossed by vascular bundles in the central zone (Figure 1) (Cheniclet *et al.*, 2005). In tomato, fruit growth proceeds according to cell divisions and to cell expansion. From anthesis to mature green stage the number of cell layers is roughly doubled by means of periclinal divisions which occur mainly in outer and inner subepidermis layers. In the cherry tomato (Wva106 variety) (Figure 1), 12 to 15 cell layers are present at the end of the growth period (mature green stage) and a dramatic difference in cell size is observed between these layers. Small cells (20-50  $\mu\text{m}$  in diameter) are encountered in the outer epidermis and in the first 2-4 cell layers of exocarp, as well as in the vascular bundles, while much larger cells (100-300  $\mu\text{m}$  in diameter) are present in the central part of mesocarp (Figure 1). Concomitantly to cell expansion, pericarp cells undergo multiple cycles of endopolyploidization (Bergervoet *et al.*, 1996; Joubès and Chevalier, 2000; Cheniclet *et al.*, 2005) and display a broad range of C values from 2C to 128C and even 256C at mature green stage (Figure 2a).

Our initial attempts to analyze the *in situ* polyploidization pattern in tomato pericarp relied on DAPI fluorescence intensity measurement on digital images, using a method similar to that of Gendreau *et al.* (1998). However, we were rapidly confronted with difficulties related to the structural characteristics of tomato pericarp. Because of the large sizes of cell and nuclei within mesocarp (see below), we had to use tissue sections thicker than 150  $\mu\text{m}$  to be able to visualize a sufficient number of whole nuclei (Figure S1). However for deep-located nuclei, part of the fluorescence was lost or diffused by intercalary cell components with different refractive indexes, especially cell walls or amyloplasts which are abundant in the inner mesocarp (Figure

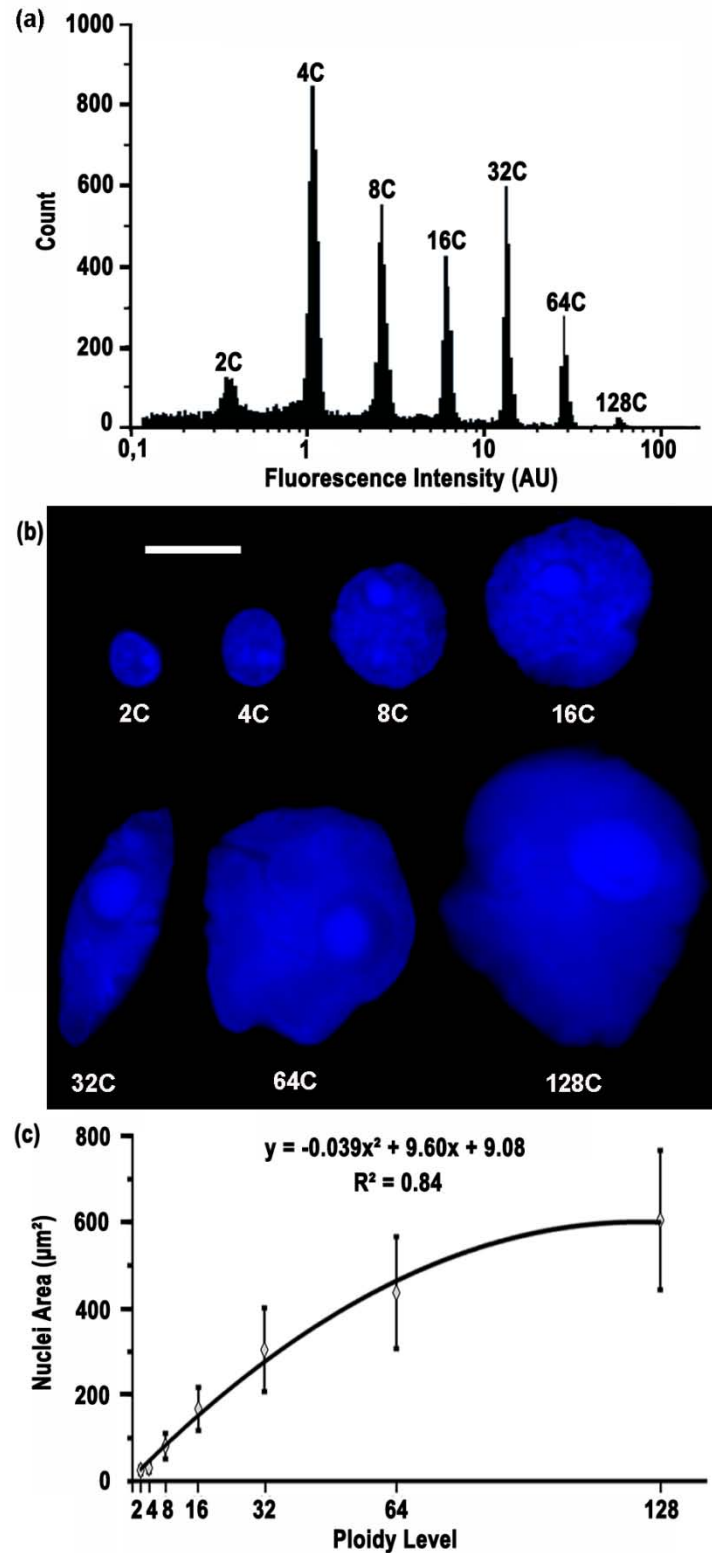
1, Figure S1). It was therefore not possible to normalize fluorescence values between nuclei dispersed throughout this heterogeneous tissue volume.



**Figure 1. Cellular organization of tomato pericarp at mature green stage.** Semi-thin section (1.5 μm thick) of tomato pericarp stained by toluidine blue. Oe: outer epidermis, vb: vascular bundle, ie: inner epidermis; 1-15 represents the cell layers; black arrowheads point to amyloplasts. Scale bar: 500 μm

Thus, the quantification of DAPI fluorescence intensity could not be retained as a reliable method to analyze tomato pericarp ploidy patterns *in situ*.

The size of nuclei has often been reported to increase according to ploidy level (D'Amato, 1984; Joubès *et al.*, 1999; Grandjean *et al.*, 2004; Bourdon *et al.*, 2010). This parameter was thus investigated as a quantitative marker of endopolyploidy in tomato pericarp. Pericarp nuclei from 2C to 128C DNA content were sorted by flow cytometry according to ploidy levels and collected on microscope slides. For each nucleus an image was acquired at the focal point corresponding to its maximal section and its area was measured. The nuclear area significantly increased according to ploidy levels (Figure 2b) and a positive correlation ( $R^2 = 0.84$ ) was observed between the two parameters (Figure 2c), with the mean equatorial area of 128C nuclei being 24-fold that of 2C nuclei.



**Figure 2. Ploidy levels in tomato pericarp at mature green stage and nuclear surface measurements.** (a) Flow cytometry histogram of tomato pericarp at mature green stage. Y-axis represents object count and X-axis DAPI fluorescence intensity in arbitrary units. Ploidy levels from 2C to 128C are encountered at this development stage. (b) Epifluorescence images of DAPI-stained interphase nuclei sorted according to their ploidy level. Fluorescence was recovered with a band pass filter 435-485 nm under excitation wavelength from 340 to 380 nm. Scale bar: 10µm. (c) Area of the equatorial plane (µm<sup>2</sup>, Y-axis) of interphase nuclei sorted according to their ploidy level.



Since the shape of the nuclei is very variable in pericarp we could not extrapolate the nuclear volume from the measurement of their sectional area and therefore were not able to assess the expected proportionality between nuclear volume and ploidy level. Despite the correlation displayed between nuclear area and ploidy level, the large standard deviations led to partial overlapping of surface values corresponding to adjacent ploidy levels. Thus the area measurements of nuclei allowed only to discriminate low, medium or high ploidy classes, but did not allow the determination of the precise ploidy level of a nucleus. Additionally, these results from isolated nuclei could not be simply extrapolated to nuclei observed *in situ*. First, a variation in the volume and shape of nuclei could occur during nuclei extraction and sorting. Second, the measured area of the nuclei depends on their orientation: isolated nuclei tend to lie on their largest side on microscope slides, while *in situ* nuclei are immobilized in a fixed orientation, most often flattened between a rigid cell wall and a turgescient vacuole (Figure S1). The *in situ* determination of nuclear sizes from 2-D images is therefore not robust. The estimation of ploidy levels from *in situ* nuclear size measurements was thus not retained as the parameter was too imprecise.

### ***In situ* determination of ploidy using FISH on purified and sorted nuclei**

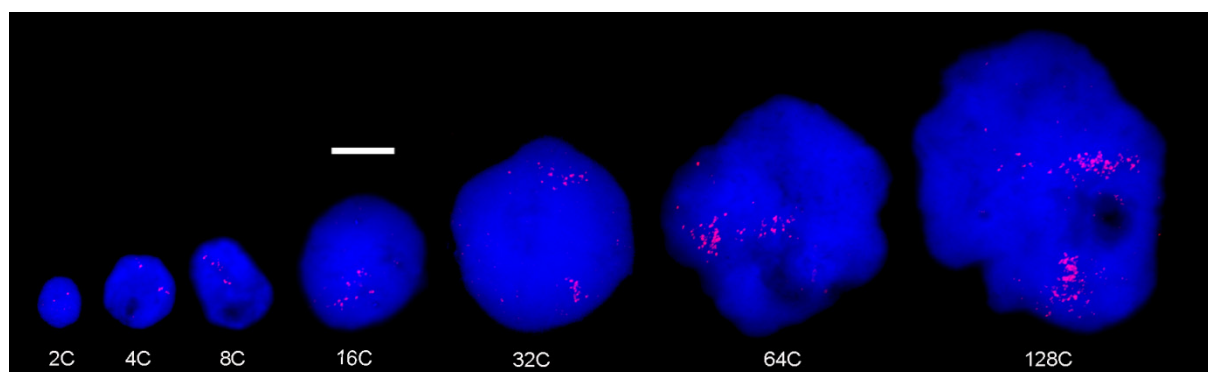
Hence we aimed at developing a reliable method less sensitive towards heterogeneity of cell size, form and content as well as location and orientation of the nucleus. To achieve this, the measured parameters have to be highly correlated to ploidy levels. The number of a given DNA locus in endopolyploid cells is directly connected to the ploidy level. Thus, we developed a method for ploidy determination based on the detection of a given locus by Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). Each copy of the locus is visualized by a fluorescent signal in the nuclear volume and the number of signals is determined. This method offers the advantage to rely on object counting rather than on integrating fluorescence intensities.

Thus, two BACs clones, LE\_HBa0048M11 (118kb) and LE\_HBa0037G17 (111kb) located on chromosome 7 and 12 respectively (SGN; <http://solgenomics.net> and O. Coriton, personal communication), have been selected as *in situ* BAC hybridizations (BAC-FISH) showing a unique and chromosome-specific labeling (Figure S2, S3).

For both probes, each of the two homologous chromosomes displayed two close hybridization signals, located at a sub-telomeric region of the two duplicated chromatids present during metaphase. This result confirmed not only the mapping of these two probes, but more importantly the relationship between the number of chromatids and the number of loci detected, even if they were spatially close to each other. The two probes were then used on diploid and polyploid interphase nuclei, where the number of loci corresponds to the ploidy level ( $x$  loci corresponding to  $xC$ ). LE\_HBa0048M11 was used to set up the method, and LE\_HBa0037G17 was used for further confirmation.

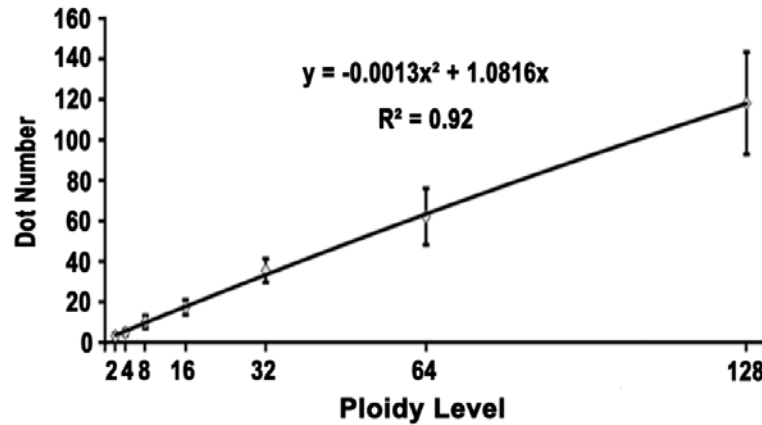
The method was first assessed on nuclei sorted by flow cytometry according to defined ploidy levels from 2C to 128C (Figure 3). As the method does not require any uniform fluorescence quantification, microscopic parameters could be set for each nucleus for optimal fluorescence recovery. Image acquisition was performed on hybridized slides with confocal laser scanning microscopy as Z-series to retrieve all fluorescent signals in the nuclear volume. FISH patterns showed one or two clusters of hybridization dots for each nucleus whatever the ploidy level (Figure 3). The overall number of hybridization dots increased in each nucleus according to its ploidy level (Figure 3). Similar results were obtained with the two BAC probes (Figure 3; Figure S4). As previously stated with FISH on metaphase spreads (Figure S2, Figure S3), such a distribution strongly suggests that each hybridization dot corresponds to a single chromatid, and that sister chromatids remain attached during endoreduplication which leads to the generation of polytenic chromosomes

(D'Amato, 1984; Bourdon *et al.*, 2010, Edgar and Orr Weaver, 2001; Joubès and Chevalier, 2000).



**Figure 3. FISH on sorted interphase nuclei.** FISH was done on mature green tomato pericarp interphase nuclei sorted according to their ploidy level. The probe was BAC LE\_HBa0048M11 and the hybridization signal is visualized as red spots (Texas Red). The blue color corresponds to DNA staining with DAPI. The images are maximal projections of confocal z-series. Scale bar: 10  $\mu$ m.

The number of hybridization dots was then counted on these sorted nuclei using the method described in experimental procedures and the results are shown in Figure 4. A strong, nearly linear correlation ( $R^2 = 0.92$ ) was found between ploidy levels and dot numbers. The slope of the regression curve was nearly constant for ploidy levels ranging from 2C to 128C. Contrary to the 2D nuclear area measurements, the standard deviation for dot number counts was low enough to allow assignment of the ploidy level of individual isolated nuclei by this FISH method. This result also shows that our dot counting method is reliable and robust, even for highly endoreplicated nuclei where the dots are very numerous.



**Figure 4. Correlation between ploidy levels and LE\_HBa0048M11 FISH locus counts.** Results of LE\_HBa0048M11 FISH dot counts on tomato mature green pericarp interphase nuclei sorted according to their ploidy level. Thirty nuclei were acquired per ploidy level.

The relationship between the ploidy level and the number of loci detected by BAC-FISH having been validated on sorted nuclei, we then applied the method to analyze endopolyploidy patterns in tomato mature green pericarp.

#### **Application of the FISH method to sectioned and fixed pericarp tissues**

The application of this BAC-FISH method to pericarp tissue has necessitated the development of a new protocol adapted from that of Prieto *et al.* (2007). We had to optimize several parameters: tissue preservation, section thickness, method for handling the sections and permeabilization steps.

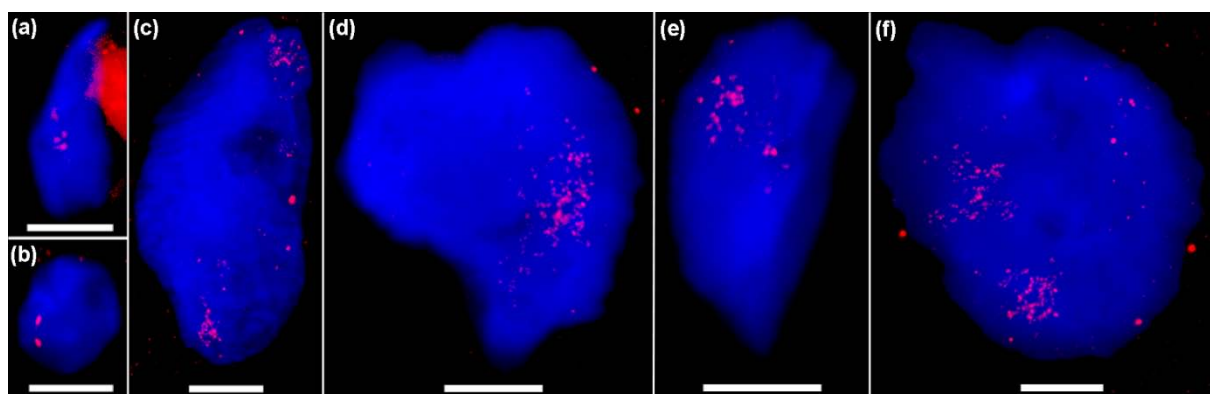
The efficiency of the fixation depends on the depth within the pericarp fragment and the fixation duration. After 1 h of fixation in the presence of 4% paraformaldehyde, serial sections through the pericarp fragment were observed under the microscope in order to check for tissue integrity and for the presence of nuclei after DAPI staining. The effective penetration of the fixative was deduced from the presence of nuclei. Indeed, a progressive loss of nuclei may occur as the strength of the fixation decreases with tissue depth. Yet efficient retention of nuclei *in situ* also depends on the section thickness so this parameter was tested. Finally, for tomato pericarp, a series of six 150  $\mu\text{m}$ -thick sections, over a total of  $\sim 900 \mu\text{m}$ ,

appeared to be the best compromise between an efficient recovery of whole nuclei and a clear visualization of the different cell layers.

Two slightly different protocols were set up for processing tissue sections. Indeed, we had major difficulties to maintain the 150  $\mu\text{m}$ -thick tissue sections on the surface of glass slides. A large panel of in-house or commercially coated slides was tested in order to avoid the loss of tissue sections during hybridization and washing steps, but none of them improved significantly the adhesion of tissue sections. A first successful FISH protocol (Protocol 1) (see Experimental procedures) included a thin layer of bi-compounded epoxy Araldite® glue to achieve strong adhesion of the sections onto the slide. Although providing consistent results (Figure 5a,c,e), the reproducibility of Protocol 1 was somewhat hampered by the difficulty to obtain a homogeneous spread of the glue. Moreover, the use of the glue could increase the natural autofluorescence of tomato tissue which complicated visual assessment of the FISH signals.

To circumvent these constraints, a second FISH protocol (Protocol 2) was performed, using immersed tissue sections in microtubes. But the cell wall permeabilization step of Protocol 1 (0.1% cellulase-pectolyase, see Experimental procedures), when performed in microtubes, was very deleterious to tissue integrity and led to difficulties in retrieving whole sections or to deposit them flat on microscope slides for observation (data not shown). After testing several enzyme concentrations we found that despite omitting this step, probe access to the genomic DNA was efficient. Probably, the proteinase treatment (pepsin), which came later in the protocol, was sufficient to give the probe access to the nuclei. This simplified Protocol 2 conserved tissue structures well, gave highly reproducible hybridizations and offered convenient tissue handling (Figure 5b,d,f). When we compared the protocols 1 and 2, similar results were obtained (Figure 5). Moreover, FISH patterns

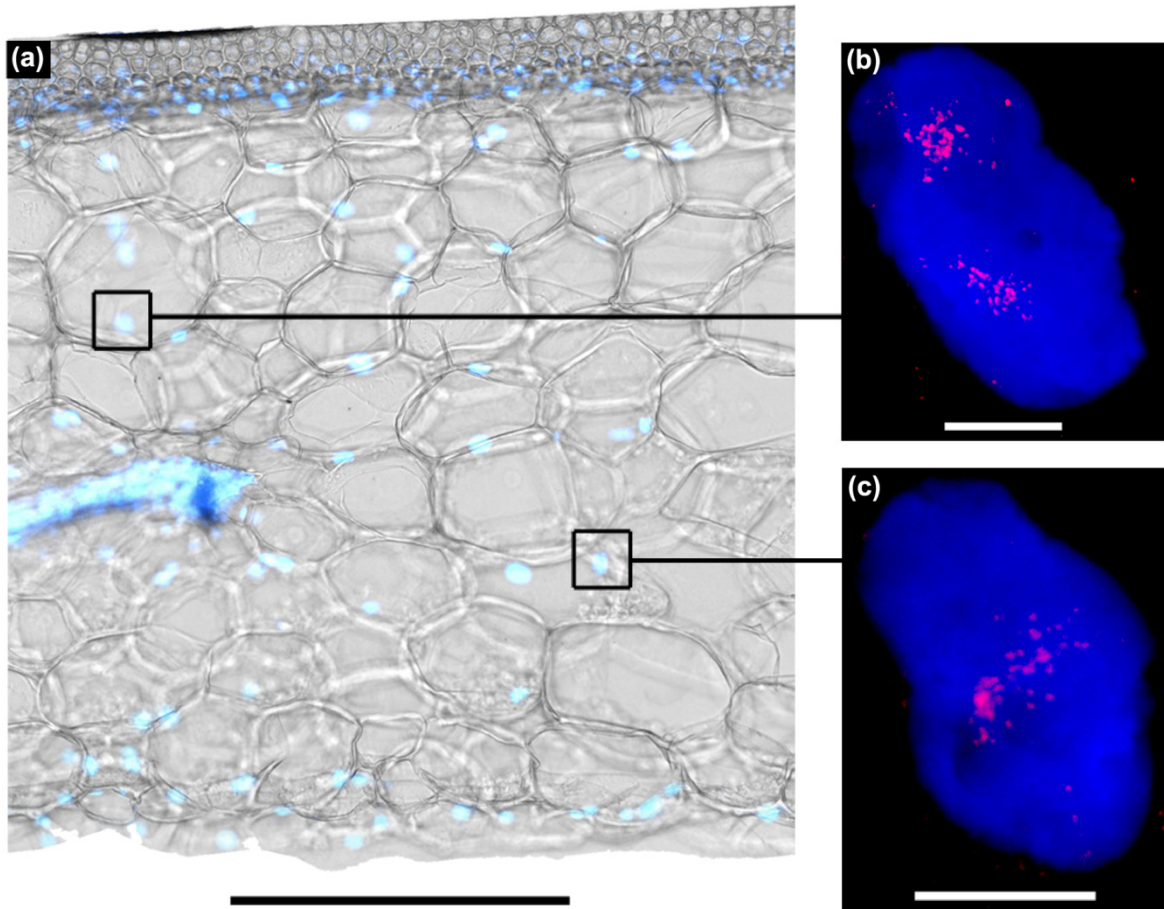
(dots distributed in one or two clusters) were also similar to those obtained on sorted nuclei, which clearly validates the reliability of these *in situ* FISH protocols.



**Figure 5. Setting up the method *in situ*.** FISH on tomato mature green pericarps with LE\_HBa0048M11 probe, using two protocols. **(a,c,e)** Protocol 1: pericarps glued on microscope slides. The nuclei are located in layers 1, 9 and 13 respectively. **(b,d,f)** Protocol 2: pericarp hybridized in microtubes. The nuclei are located in layers 1, 10 and 13 respectively. The images are maximal projections of confocal z-series. Blue: DAPI, red: Texas Red. Scale bars: a, 5  $\mu\text{m}$ ; b-f, 10  $\mu\text{m}$ .

The attribution of ploidy levels to *in situ* analyzed nuclei is illustrated in Figure 6, which shows an application of the whole method for two nuclei in a pericarp section, located in the central mesocarp. Following FISH acquisition, image analyses resulted in the determination of 76 and 36 hybridization dots in these two nuclei, respectively (Figure 6b and 6c). In order to convert the dot number measured on pericarp sections into ploidy level, we first had to determine the dot number thresholds corresponding to the limits of each ploidy class. We used the ordinates of the arithmetical means of two successive ploidy levels (*i.e.* 3; 6; 12; 24; 48; 96; 192) according to the experimental curve obtained on sorted nuclei (Figure 4) (*i.e.* 3.2; 6.5; 12.8; 25.3; 49.0; 92.1; 160.2). We chose to use the experimental curve rather than the theoretical relation of dot number to ploidy (equation  $y=x$ ) to better taking into account experimental variations inherent to our system. With this method we attributed ploidy levels of 64C and 32C respectively to the above mentioned nuclei (Figure 6b-c). It is underlined that the nucleus in Figure 6c was classified

unambiguously despite its localization in the inner mesocarp, where cells contain many amyloplasts.



**Figure 6. Method application *in situ*.** The *in situ* FISH protocol 2 with LE\_HBa0048M11 probe on tomato mature green pericarps. Two hybridized nuclei (**b**, **c**; scale bars: 10 µm) and their location in pericarp (**a**, scale bar: 500 µm). Maximal projections of confocal z-series. Blue: DAPI, red: Texas Red.

By this means, ploidy levels were attributed to all nuclei displayed in Figure 5. In Figure 5a a nucleus located in cell layer #1 showed 4 hybridization dots and was attributed a 4C ploidy level. In Figure 5b another nucleus also in layer #1 had two dots by visual examination but by image analysis, taking into account the unit area of a standard object, 4 dots were counted. The nucleus was thus also attributed a 4C ploidy level. In Figure 5c and 5d the nuclei located in cell layers #9 and #10 (mid-mesocarp) contained 61 and 116 dots, corresponding to 64C and 128C respectively. Finally, in Figure 5e and 5f the nuclei, both located in cell layer #13 close to the inner epidermis (endocarp), were classified 32C (40 dots) and 128C (147 dots),

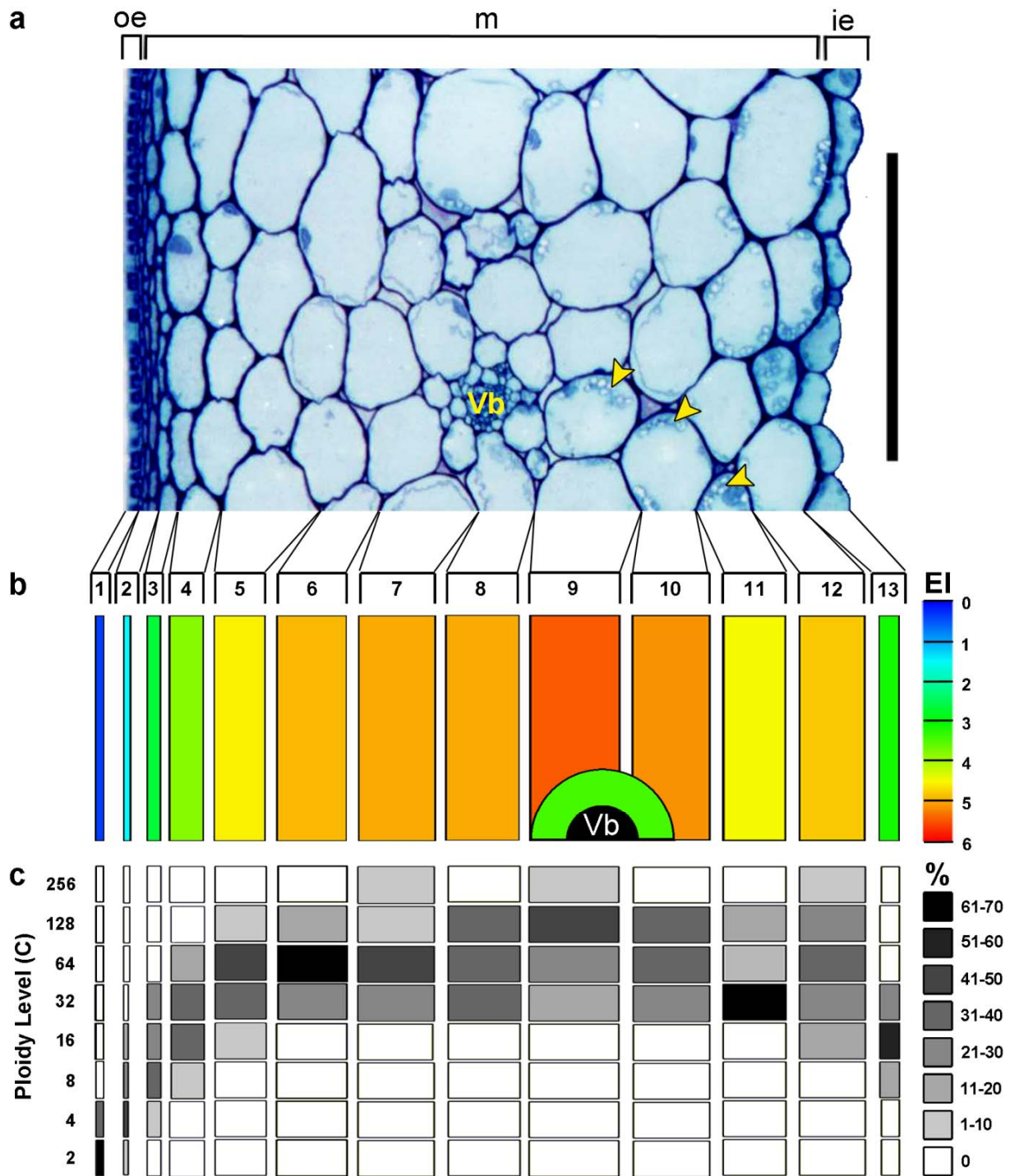
respectively. These examples show that ploidy levels can be assigned unambiguously to nuclei located in different pericarp areas, whatever the occurrence of autofluorescence, presence of amyloplasts or nuclear orientation.

To investigate the contribution of endopolyploidy in pericarp development, we performed this FISH-based method for determining the ploidy levels reached at mature green stage in the different cells layers and establishing a ploidy map of the tomato pericarp.

### **The ploidy distribution in tomato pericarp follows a specific but heterogeneous pattern**

In order to summarize the results obtained on different pericarp fragments we have drawn a scheme representing a theoretical pericarp (Figure 7). On this scheme only 13 cell layers figure, even if the pericarp can contain up to 16 cell layers. In fact, it is difficult to distinguish the tiny outer subepidermal cell layers within such thick pericarp sections. In order to built this ploidy map, fifteen to twenty-one nuclei were analyzed for each cell layer excepted for the #2 (11 nuclei), #8 (12 nuclei) and the cells close to vascular bundles (9 nuclei). The two protocols described above were equally used in terms of sampling.





**Figure 7. Ploidy mapping on tomato mature green pericarp.** (a) Representative Technovit semi-thin section of mature green pericarp. Cell layers are indicated above the section. Yellow arrows point to amyloplasts in the inner mesocarp. oe: outer epidermis; ie: inner epidermis; m: mesocarp; vb: vascular bundle. Scale bar: 500  $\mu$ m. (b) Distribution of mean Endoreduplication Index (EI) in the cell layers. (EI, see colour scale on the right.). (c) Ploidy level occurrence and representation for each cell layer. Ploidy levels are defined on the left. Proportion of each ploidy level in each cell layer is indicated as percentage values (%) coded in gray scale (on the right).

For each nucleus, the ploidy level was measured using our FISH dot counting method. Then the Endoreduplication Index (EI: mean number of endoreduplication

cycles per nucleus) was calculated for each cell layer. As shown in Figure 7b the EI was found to increase gradually from the outer epidermis (EI near 0) to the sixth cell layer (EI around 5). Throughout the middle mesocarp the EI is high (5-6), except for a slight decrease in the 11<sup>th</sup> cell layer displaying an EI value between 4 and 5. In the last cell layer (#13) forming the inner epidermis, the EI is lower (around 3). The cells close to vascular bundles display intermediate EI values, comprised between 2 and 4.

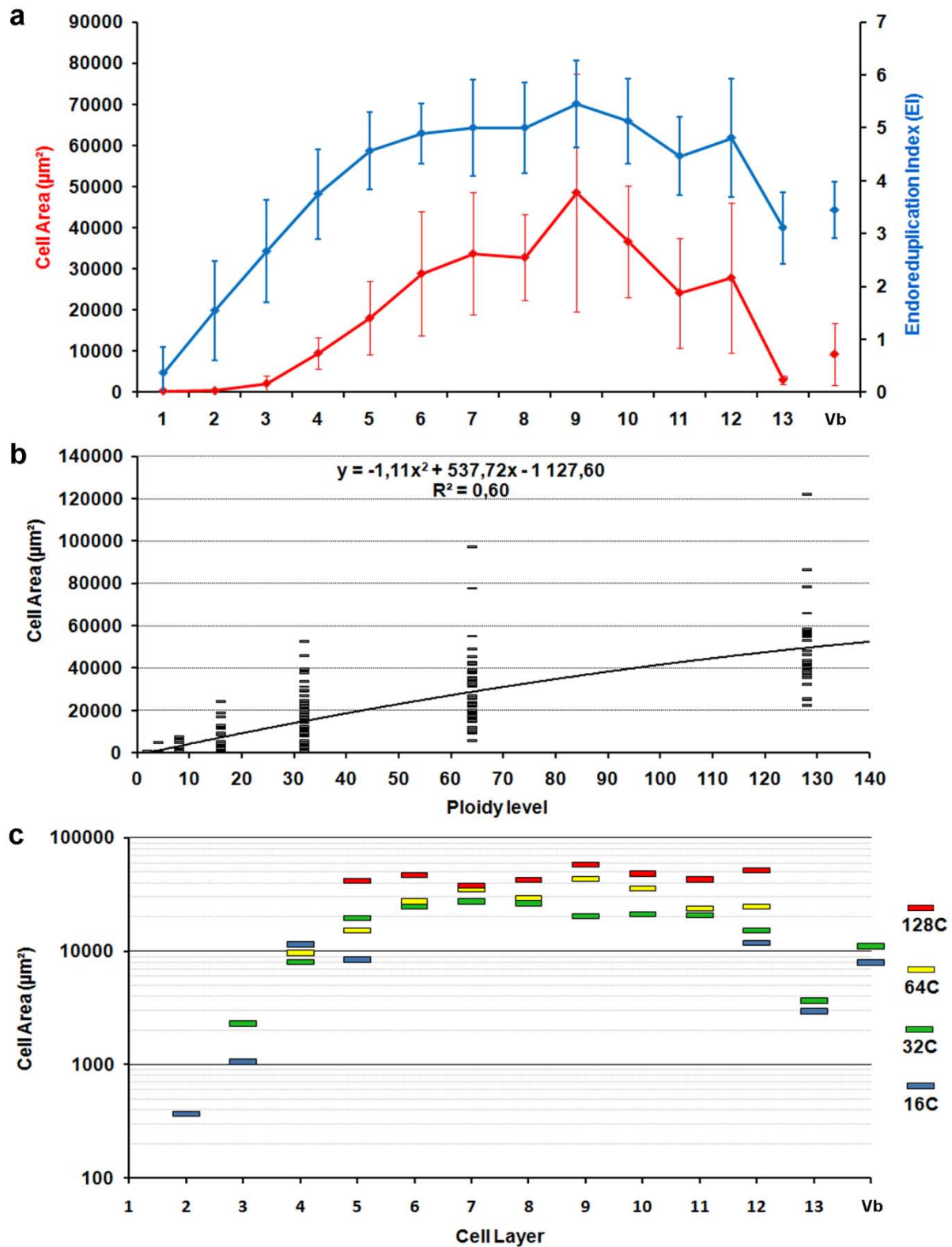
Figure 7c shows the frequency distribution of the ploidy levels in each cell layer. The lower ploidy level (2C) is restricted to the outer epidermis and the subepidermal layer (#1 and #2 respectively), while the highest one (256C) is reached only in some layers between the 7<sup>th</sup> to the 13<sup>th</sup> position. Figure 7 also shows that most cell layers contain cells with 3 or 4 different ploidy levels, the most heterogeneous one being the inner subepidermis (#12), with 5 ploidy levels ranging from 16C to 256C.

All the ploidy levels, ranging from 2C to 256C, which are present at the mature green stage (Cheniclet *et al.*, 2005) could be allocated to this model pericarp. Our method allowed us to detect ploidy levels as high as 256C, although this class is sometimes missed by flow cytometry (Figure 2a) because of the low frequency of such nuclei.

The possibility of measuring for each cell both ploidy level and cell size allowed us to determine at the level of cell layer the relationship existing between ploidy level and cell size which, in tomato pericarp, had been investigated so far only on the basis of mean cell ploidy and size (Cheniclet *et al.*, 2005). The area of each cell was measured on the Z-section corresponding to its maximum. Figure 8a compares for each cell layer the mean cell area and the endoreduplication index. The cell size increases from ~350  $\mu\text{m}^2$  in layers #1 and #2 (outer epidermis and subepidermis) to reach a maximum of ~48000  $\mu\text{m}^2$  in layer #9 (toward the middle of mesocarp) and decreases to ~3000  $\mu\text{m}^2$  in layer #13 (inner epidermis). This curve reflects the fact

that the cell layers located in the middle of pericarp (#8, #9, #10) were already present at anthesis and were the first to enter the growth phase while the intermediate layers (#3 to #7 and #11, #12) which were formed successively in the course of fruit development entered the growth phase later. The global distribution of Endoreduplication Index according to cell layer is similar to that of cell area, confirming, at the cell layer scale, the link between endoreduplication and cell growth which has been reported in several plant organs (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003, Kondorosi and Kondorosi, 2004). However a high Endoreduplication Index is observed in the small cells of the external layers #2 and #3, suggesting that endoreduplication can take place in the absence of cell growth or before the onset of cell growth phase.

At the cellular level (Figure 8b), a positive correlation ( $R^2=0.60$ ) between ploidy level and cell size was observed despite the latter's high heterogeneity at each ploidy level. Part of this variation can be attributed to a cell layer effect (Figure 8c). For example, 32C ploidy levels were found in all pericarp layers (excepted #1 and #2) and the size of these cells was very heterogeneous. Similarly, 16C ploidy levels are found in small cells (layer #2 and 3), intermediate cells (#4, #5, #13 and close to vascular bundles) and large cells (#12). This indicates that cell size is not only dependent on ploidy levels but also upon cell position within the pericarp.



**Figure 8 Correlation between cell area and ploidy levels in tomato mature green pericarp.** (a) Endoreduplication Index (blue, right y-axis) and mean cell area (red, left y-axis) according to cell layer (x-axis). The layer 1 corresponds to outer epidermis and 13 to inner epidermis. Vb corresponds to cells close to the vascular bundles. (b) Individual cell areas (y-axis) according to their ploidy level (x-axis). (c) For each cell layer the rectangles represent the mean area of the cells displaying the same ploidy level (colour coded).

## **CONCLUSION**

Despite the widespread occurrence of endopolyploidy in plants, the available methods to investigate its spatial distribution (“mapping”) in a tissue context are clearly limited, notably in complex, 3-D organized plant tissues with disparate cells, such as fruit tissues. Our study demonstrates an innovative method to determine ploidy levels directly in plant tissue samples, making use of the BAC-FISH technique. The FISH Protocol 2 described herein is efficient, reliable, and easily reproducible. It requires the use of a BAC clone specific marker as probe to attribute a single locus as a single chromosome. The locus should be preferably distant enough from the centromere to allow discrimination of the dots in polyploid nuclei. This method has allowed discriminating a broad range of ploidy levels (2C to 256C) and circumvents non-uniform tissue features that interfere with quantitative imaging. Compared to conventional fluorometry already used with plant tissues (Melaragno *et al*, 1993), the BAC-FISH dot counting is a method devoid of the constraints of assessing and integrating total nuclear fluorescence intensity. It appears more robust for endopolyploidy studies in tissues containing large cells; an important point since endopolyploidy has been described as being correlated with cell size (Cheniclet *et al*, 2005; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003). This method is also compatible with the study of endopolyploidy in tissues containing compounds emitting autofluorescence. Ploidy determination by local dot count rather than by relative integral nuclear fluorescence is an important progress. It should allow consideration of endopolyploidy which occurs in many plant species (Barrow, 2006), even in highly diffusive tissues such as seeds, cotyledons and nodules.

This method has allowed us to draw the ploidy map of pericarp from mature green tomato fruits. Moreover these results are in agreement with the observations made by Nafati *et al*. (2011). Indeed, by overexpressing SIKRP1 during the expansion

phase of tomato fruit, the authors hypothesized that endoreduplication would rather support a range of cell size than a defined one and that it would precede cell expansion. Our present observations from normal fruit concur these two assumptions, underlining the partial independence of the two cellular processes. The method will now be used for analyzing the evolution of endoreduplication pattern in tomato pericarp in the course of fruit development, and its connection with cell division, expansion and differentiation processes.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Plant material and growth conditions**

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Wva106,  $2n=2x=24$ ) were grown in a greenhouse during the autumn season with a 15 h light (approximately  $270 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) / 9 h dark photoperiod. On average, the temperature was  $25^{\circ}\text{C}$  during the day and  $16^{\circ}\text{C}$  during the night. Individual flowers were tagged on the day of anthesis (flower opening). Fruits were harvested at mature green stage (29-31 dpa).

For chromosomal preparation, tomato seeds (cv. MicroTom) were germinated in a Petri dish containing a wet Whatman paper at room temperature and in darkness. Forty-eight hours later, the dishes were transferred to  $4^{\circ}\text{C}$  (for 12 to 24 h) in order to synchronize mitoses and subsequently transferred to room temperature (for another 12 to 24 h).

### **Cytological analysis**

For cytological analysis pericarp from 30 dpa fruits was prepared by a resin-embedding method. Thin fragments from equatorial zone were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 100 mM pH 7.2 phosphate buffer for 4 h at  $20^{\circ}\text{C}$ , dehydrated through an ethanol series and embedded in Technovit 7100 (Kulzer). Sections (1-3

µm thick) were made on a Reichert 2040 microtome Leica Microsystems ([www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)) and stained with 0.04% toluidine blue. Images were acquired with an Axiophot microscope (Carl Zeiss SAS, [www.zeiss.fr](http://www.zeiss.fr)) and a SPOT digital camera (Diagnostic Instruments Inc, [www.diaginc.com](http://www.diaginc.com)).

### **Chromosome Preparation**

Slide preparations were performed as described in Nicolas *et al.* (2007) on meiotic chromosome preparations. Briefly tomato root tips of 0.5 - 1.5 cm in length were treated with 0.04% 8-hydroxyquinoline to accumulate metaphase events, fixed in 3:1 ethanol-glacial acetic acid, washed in 0.01 M citric acid-sodium citrate pH 4.5 and then permeabilized with a solution of 5% cellulase RS Onozuka (Yakult Hansha Tokyo, Japan) and 1% Y23 pectolyase (Duchefa Biochemie, The Netherlands). One root tip was transferred to a slide and was squashed in a drop of 3:1 ethanol: acetic acid. After air-drying, slides were stored at -20°C until FISH was performed.

### **Isolation of tomato nuclei and flow cytometry**

Nuclei were prepared from about 2 mm thick sections of tomato pericarp (without septa) at mature green stage by chopping with a razor blade in 2 ml of Galbraith's extraction buffer (Galbraith *et al.*, 1983) complemented with 5 mM sodium metabisulfite and 1% (w/v) polyethylene glycol 10000. The suspension was filtered twice through a 48 µm nylon mesh and nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) at a final concentration of 5 µg.ml<sup>-1</sup>. Nuclei were sorted with a MoFlo XDP cytometer (Beckman Coulter, Roissy, France; [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)) using standard isotonic sheath at 30 psi, 3 drop sorting and coincidence abort. DAPI was excited with a 405 nm laser, using light-scatter to gate on nuclei, height/area discrimination against doublets and signal area of the 455 nm emission, When sorting for subsequent imaging of nuclear size, three

fruits were used and 500 nuclei of each ploidy level (2C to 128C) were sorted directly onto 3-well microscope glass slides (Superfrost® CML France, [www.cml.fr](http://www.cml.fr)) prepared with 20  $\mu$ l of a cushion made of 500 mM sucrose, 50% Galbraith's buffer, 2% paraformaldehyde and 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> chromomycin A3. (Chromomycin A3 was used for heterochromatin staining experiments whose data are not presented here.) For FISH experiments, nine fruits were used for preparing slides containing 200 to 2000 nuclei of a given ploidy level (2C to 128C). Nuclei were sorted on slides covered with 10  $\mu$ l of a 2 M sucrose cushion, allowed to dry at room temperature and stored at -20°C up to several months. To maintain nuclear morphology when sorting onto slides, a slower flow was used with sheath at 15 psi. DAPI and chromomycin A3 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

### **Image acquisition**

Images of sorted nuclei were acquired with an epifluorescence microscope Nikon® Eclipse 800 ([www.nikon.fr](http://www.nikon.fr)) equipped with a Spot RTKE digital camera (Diagnostic Instruments Inc, [www.diaginc.com](http://www.diaginc.com)). For image acquisition of DAPI/chromomycin A3 stained interphasic nuclei sorted according to their ploidy level, the fluorescence was recovered with a band pass filter from 435 to 485 nm under excitation wavelength from 340 to 380 nm. FISH images were recorded as Z-series (Z step: 0.2  $\mu$ m) at the maximal resolution (pixel size X, Y, Z: 80, 80, 198 nm) of a confocal laser-scanning microscope (Scanhead TCS-SP2 on a DMRXA2, Leica Microsystems, <http://www.leica-microsystems.com/>) with a 63x/NA1.4 HCX PL APO objective, using for Texas Red a Helium/Neon 543 nm laser for excitation and 570-675 nm as emission range and for DAPI the 405 nm diode for excitation and 430-490 nm as emission range.



## **Image analysis**

The surface of the sorted nuclei was measured with Image ProPlus software (*Media Cybernetics Inc.*, [www.mediacy.com](http://www.mediacy.com)) on 2D epifluorescence images. In order to count the hybridization dots on confocal Z-series, we used the Metamorph software (Molecular Devices, <http://www.moleculardevices.com>) and particularly the Multidimensional Image Analysis (MIA) module developed by Racine *et al.* (2006, 2007). The method is based on locally-adaptive noise filtering and 2D segmentation by wavelet transformation (Starck *et al.*, 1998) followed by maximal projection of the segmented images. The number of dots was estimated on this projection by measuring the surface of the segmented objects and taking into account the area of a standard object previously defined from multiple 2D images. In order to minimize noise, for each Z-series of a nucleus two regions of interest corresponding to the two clusters of signals were drawn, and the analysis was restricted to these regions and to the range of Z-planes containing specific signal. The relation between nuclear endoploidy (from sorted nuclei) and dot number was determined (cf. Figure 4), and class thresholds were established (see section *Application of the FISH method to sectioned and fixed pericarp tissues*). The Endoreduplication Index (EI) is defined as the number of endoreduplication cycles per nucleus and is calculated from the ploidy level (P) by the formula:  $EI = \log_2(P) - 1$ . The EI is 0 for 2C nuclei, 1 for 4C nuclei, 2 for 8C nuclei, and so forth.

## **FISH procedure on isolated interphase nuclei**

Two BAC clones LE\_HBa0048M11 (118 kb) and LE\_HBa0037G17 (111 kb) obtained from tomato Heinz 1706 *Hind*III BAC Library (Budiman *et al.*, 2000) were labeled by random priming with biotin-14-dUTP according to manufacturer's recommendations (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK).

FISH was performed as follows:

**Step 1 - RNase treatment:** Nuclei-coated slides obtained as described above were briefly washed with 2X SSC at 42°C and then incubated in 100 µg.ml<sup>-1</sup> RNase A (Sigma Aldrich, St Louis, USA) (in 2X SSC) for 1 h at 37°C and washed twice in 2X SSC at 42°C for 3 min. **Step 2 - Pepsin digestion:** Slides were incubated with 0.05% pepsin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 10 mM HCl for 20 min at 37°C, and washed twice in 2X SSC at 42°C for 3 min. **Step 3 - Post-fixation:** Slides were fixed 10 min with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7) at room temperature and washed twice in 2X SSC at room temperature for 3 min. **Step 4 – Denaturation:** Slides were denatured 2 min at 70°C in 70% formamide in 2X SSC. **Step 5 – Dehydration:** Immediately after denaturation, slides were dehydrated in ethanol series (70, 90, and 100%) for 3 min each at -20°C and finally air-dried. **Step 6 – Hybridization:** The hybridization mixture consisted of 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSC, 0.25% SDS, 0.2 µg.ml<sup>-1</sup> of sonicated salmon sperm DNA and 100 ng per slide of labeled probes previously denatured at 92°C for 6 min and cooled in ice bath for 15 min. *In situ* hybridization was done overnight at 37°C. **Step 7 - Detection and amplification of the FISH signal:** Post-hybridization washes were in 2X SSC for 5 min at 42°C, 5 min in 50% formamide in 2X-SSC at 42°C, 5 min in 2X SSC at 42°C, 5 min in 4X SSC-0.2% Tween 20 at 42°C, 5 min in 4X SSC-0.2% at room temperature. Slides were then saturated with 200 µl of 5% BSA in 4X SSC-0.2% Tween 20 solution for 5 min at room temperature. Biotinylated probes were detected by avidin-Texas Red, and fluorescence was subsequently amplified with biotinylated anti-avidin D and avidin-Texas Red (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Each detection/amplification step was followed by a double wash in 4X SSC-0.2% Tween 20 at 42°C for 3 min and a second blocking step with 5%BSA was performed before fluorescence amplification. Nuclei were finally mounted and counterstained in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA), containing 1.5 µg.ml<sup>-1</sup> DAPI. Each 37°C incubation

step was realized in a moist chamber and each 42°C wash step was done under gentle agitation.

### **FISH procedure on vibratome sections**

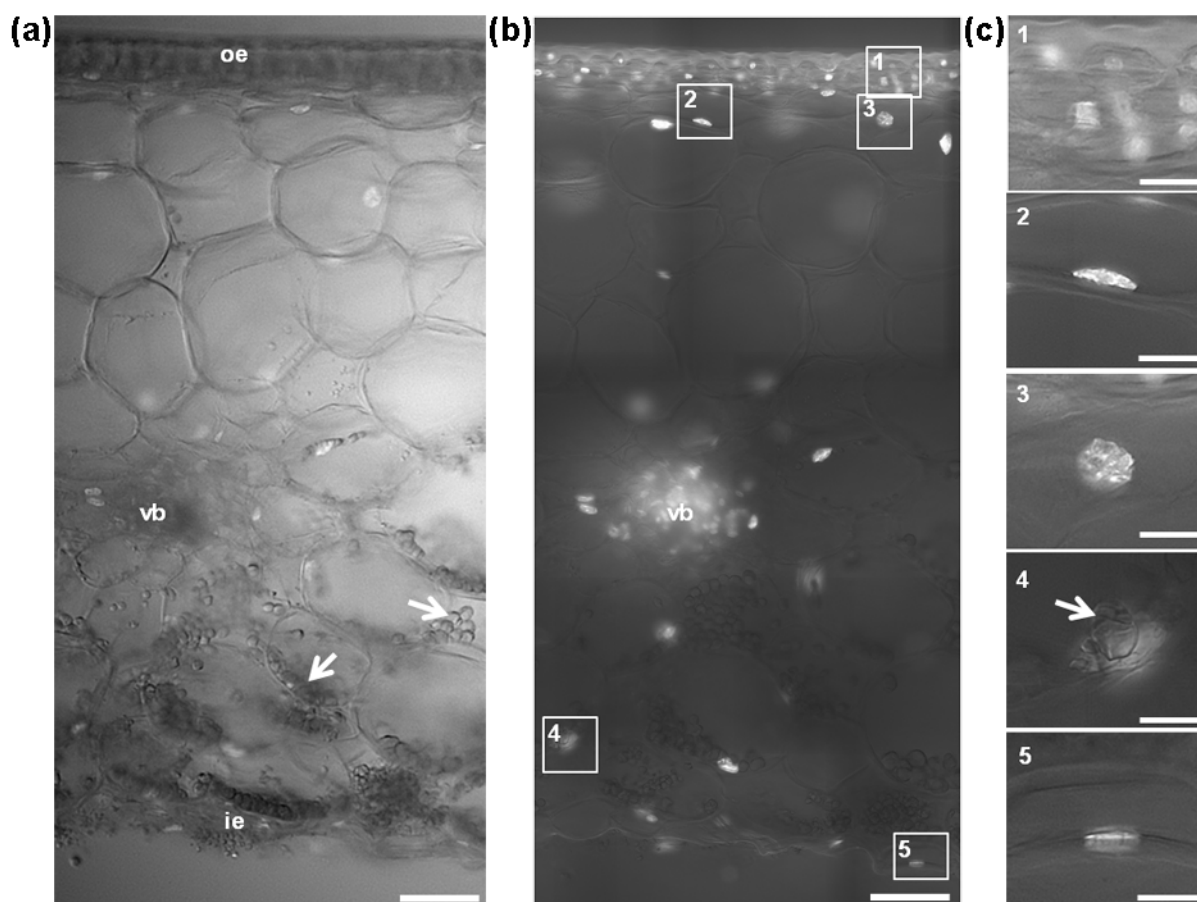
Pericarp pieces from fruit equatorial region were fixed 1 h in 4% paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer under vacuum infiltration at 20 kPa. Fixed tissues were then washed for 10 min in 50 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7) (TBS) and 150 µm sections were obtained using a vibrating blade microtome Microm HM 650V (Microm MicroTech France, <http://mm-france.fr/>). Very slow and large amplitude sectioning was performed as recommended by Prieto *et al.* (2007). The pericarp sections were treated according to two slightly different protocols:

For Protocol 1, sections were deposited on a thin layer of bi-compounded epoxy Araldite® rapid glue (Hunstman Advanced Materials, Düsseldorf, Germany) and allowed to dry a minimum of 2 h at room temperature. Tissues prepared in this way can be stored for months at -20°C. Sections were then dehydrated through a series of methanol (30, 50, 70, and 100%) baths for 3 min each at room temperature and allowed to dry at room temperature. The permeabilization step with 0.1% cellulase RS Onozuka (Yakult Hansha Tokyo, Japan) and 0.1% pectolyase Y23 (Duchefa Biochemie, The Netherlands) was done for 30 min in TBS at 37°C. Slides were subsequently washed for 10 min in TBS at room temperature and dehydrated through another methanol bath series (30, 50, 70, and 100%).

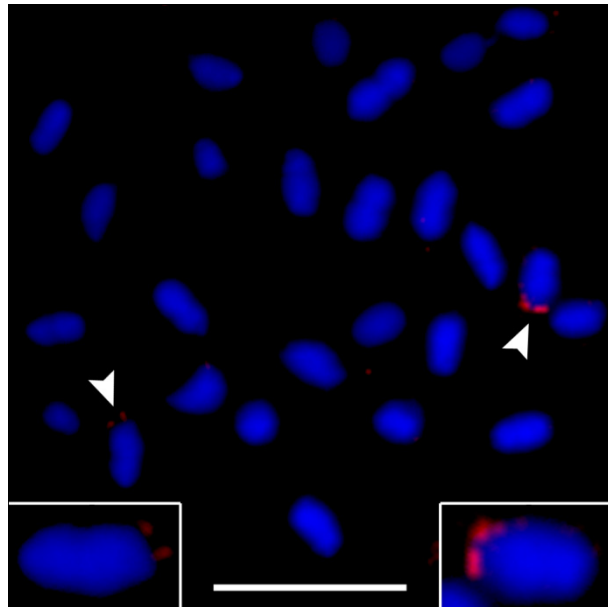
For Protocol 2, freshly obtained sections were deposited in 2 ml microcentrifuge tubes. Sections were then dehydrated through methanol bath series (30, 50, 70, and 100%) for 3 min each at room temperature and allowed to dry at room temperature under vacuum at 20 kPa to ensure drying. The permeabilization step with enzymes was omitted.

The next steps of these two protocols refer to the FISH procedure on isolated nuclei (above), but performed in this order: step 1, 2, 3, 5, 4, 6 and 7. Indeed, dehydration (step 5) was performed before denaturation (step 4) which was realized with the following modifications: after dehydration, denaturation of samples and probes was achieved simultaneously at 78°C during 8 min (according to Prieto *et al.*, 2007). This longer denaturation step appeared to be much more effective than the 70% formamide treatment for 2 min at 70°C used for isolated nuclei.

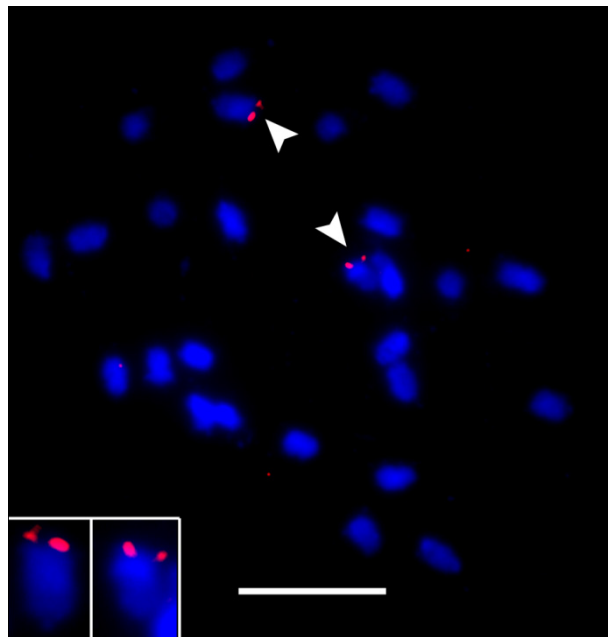
## **SUPPORTING INFORMATION**



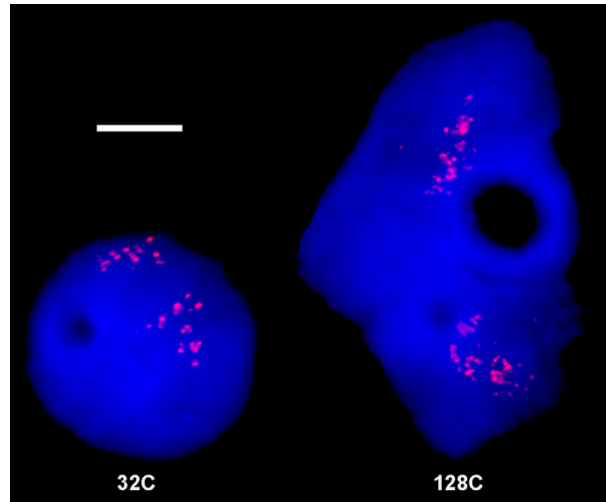
**Figure S1. DAPI-stained nuclei in tomato mature green pericarp section. (a)** Tomato pericarp from mature green fruit was fixed with ethanol/acid acetic (3:1), rinsed rapidly in 70% ethanol, rehydrated, hand sectioned in the equatorial plane, stained with 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DAPI in 0.5 M EDTA and observed in both epifluorescence and transmitted light. Note the presence on numerous amyloplasts in inner mesocarp (arrows). Oe: outer epidermis, vb: vascular bundle, ie: inner epidermis Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **(b)** The same pericarp section observed by epifluorescence only (excitation 340-380 nm; emission 435-485 nm). The white boxes 1-5 correspond to the nuclei presented at higher magnification in c. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . **(c)** Three-fold higher magnification of pericarp nuclei. **(c1)** Exocarp nuclei with close cuticle autofluorescence. **(c2, c3)** External mesocarp nuclei located close to the surface of the section, which would be suitable for fluorescence intensity measurement. These two nuclei are located in the same layer and probably have a similar size and lens shape, but their measured area would differ due to their different orientation. **(c4)** Mesocarp nucleus surrounded by amyloplasts (arrow). **(c5)** Mesocarp nucleus flattened against cell wall. Cell walls and amyloplasts induce artifactual images of the nuclei. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure S2. FISH on metaphase chromosomes with LE\_HBa0048M11 probe.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) with BAC LE\_HBa0048M11 (red) on root tip metaphase chromosomes of tomato *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom. Specific locus staining is indicated by arrowheads and chromosomes carrying FISH dots are twice magnified below in the left and right corners. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Figure S3. FISH on metaphase chromosomes with LE\_HBa0037G17 probe.** FISH with BAC LE\_HBa0037G17 (red) on root tip metaphase chromosomes of tomato *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom. Specific locus staining is indicated by arrowheads and chromosomes carrying FISH dots are twice magnified in the left corner. Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Figure S4. FISH on interphase nuclei with LE\_HBa0037G17 probe.** FISH was done on mature green pericarp interphase nuclei sorted according to their ploidy level. The probe was BAC LE\_HBa0037G17 (red). The images are maximal projections of z-series for 32C and 128C ploidy levels. Red: hybridization signal, blue: DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The image acquisition and morphometric analysis were performed on the Plant Imaging Pole of the Bordeaux Imaging Center (BIC) (<http://www.bic.u-bordeaux2.fr>) with the participation of M. Peypelut. The FISH dot counting was performed on the Photonic Imaging Pole of the BIC. Flow cytometry sorting was performed on the Imagif Platform, Gif-sur-Yvette, for which the authors thank O. Catrice, N. Maunoury and M. Bourge (IFR87). Part of the FISH method was developed on the Molecular Cytogenetic Platform of Rennes with the technical assistance of V. Huteau. The authors thank V. Rouyère for growing tomato plants, helping for sample preparation and flow cytometry analysis.

## **REFERENCES**

- Bennett, M.D. and Leitch, I.J.** (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, **76**, 113-176.
- Budiman, M.A., Mao, L., Wood, T.C. and Wing, R.A.** (2000) A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*, **10**, 129-136.
- Bergervoet, J., Verhoeven, H., Gilissen, L.J.W. and Bino, R.** (1996) High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Science*, **116**, 141-145.
- Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. *Prog. Bot.* **71**, 101-132.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.* **139**, 1984-1994.
- D'Amato, F.** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. In *Embryology of Angiosperms* (BM, J., ed.) New York: Springer, pp. 519–566.
- Dermastia, M., Kladnik, A., Koce, J.D. and Chourey, P.S.** (2009) A cellular study of teosinte *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae) caryopsis development showing several processes conserved in maize. *Am. J. Bot.*, **96**, 1798-1807.
- Dolezel, J. and Bartos, J.** (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Ann Bot*, **95**, 99-110.
- Edgar, B.A. and Orr-Weaver, T.L.** (2001) Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell*, **105**, 297-306.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and Firoozabady, E.** (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science*, **220**, 1049-1051.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R.** (1999) Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gendreau, E., Hofte, H., Grandjean, O., Brown, S. and Traas, J.** (1998) Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant J*, **13**, 221-230.



- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y. and Traas, J.** (2004) In Vivo Analysis of Cell Division, Cell Growth, and Differentiation at the Shoot Apical Meristem in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 74-87.
- Greilhuber, J.** (2008) Cytochemistry and C-values: The Less-well-known World of Nuclear DNA Amounts. *Ann. Bot.* **101**, 791-804.
- Haroske, G., Giroud, F., Reith, A. and Böcking, A.** (1998) 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Analytical Cellular Pathology*, **17**, 189-200.
- Johnston, J.S., Bennett, M.D., Rayburn, A.L., Galbraith, D.W. and Price, H.J.** (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.*, **86**, 609-613.
- Joubés J., Phan T-H., Just D., Rothan C., Bergounioux C., Raymond P., Chevalier C** (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of Cyclin-dependent kinase CDKA during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* **121**, 857–869
- Joubès, J. and Chevalier, C.** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 735-745.
- Jovtchev, G., Schubert, V., Meister, A. and Schubert, I.** (2006) Nuclear DNA content and nuclear and cell volume are positively correlated in angiosperms. *Cytogenetic and Genome Research*, **114**, 77-82.
- Kladnik, A., Chourey, P.S., Pring, D.R. and Dermastia, M.** (2006) Development of the endosperm of Sorghum bicolor during the endoreduplication-associated growth phase. *J. Cereal Sci.* **43**, 209-215.
- Kondorosi, E. and Kondorosi, A.** (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* **567**, 152-157.
- Lee, H.O., Davidson, J.M. and Duronio, R.J.** (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development*, **23**, 2461-2477.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B. and Coleman, A.W.** (1993) Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *Plant Cell*, **5**, 1661-1668.
- Nafati, M., Cheniclet, C., Hernould, M., Do, P.T., Fernie, A., Chevalier, C., Gévaudant, F.** (2011) The specific overexpression of a Cyclin Dependent Kinase

Inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant J.*, in press.

- Nicolas, S.D, Le Mignon, G., Eber. F., Coriton. O., Monod. H., Clouet. V., Huteau. V., Lostanlen. A., Delourme. R., Chalhoub. B., Ryder. C.D., Chèvre. A.M. and Jenczewski. E. (2007)** Homeologous recombination plays a major role in chromosome rearrangements that occur during meiosis of *Brassica napus* haploids. *Genetics*. Feb;175(2):487-503
- Prieto, P., Moore, G. and Shaw, P. (2007)** Fluorescence in situ hybridization on vibratome sections of plant tissues. *Nature. Prot.* **2**, 1831-1838.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C. and Sibarita, J.-B. (2006)** Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 1020-1023.
- Racine, V., Sachse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A. and Sibarita, J.B. (2007)** Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J.Microscopy*, **225**, 214-228.
- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N. and Vainchenker, W. (2003)** Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, **101**, 541-544.
- Starck, J.L., Murtagh, F. and Bijaoui, A. (1998)** *Image processing and dataanalysis: The multiscale approach*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K. (2003)** "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 544-553.
- Vilhar, B. and Dermastia, M. (2002)** Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Bot. Croat.*, **61**, 11-26.
- Vilhar, B., Kladnik, A., Blejec, A., Chourey, P.S. and Dermastia, M. (2002a)** Cytometrical Evidence That the Loss of Seed Weight in the miniature<sup>1</sup> Seed Mutant of Maize Is Associated with Reduced Mitotic Activity in the Developing Endosperm. *Plant Physiol.*, **129**, 23-30.

## **PARTIE 2 : ARTICLE 2**

# **Structural analysis of endopolyploid nuclei from tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cells**

Matthieu Bourdon<sup>2</sup>, Catherine Cheniclet<sup>1,2</sup>, Mehdi Nafati<sup>1,2</sup>, Olivier Coriton<sup>3</sup>, Spencer Brown<sup>5</sup>, Martine Peypelut<sup>4</sup>, Valérie Rouyère<sup>2</sup>, Adeline Moïse<sup>1</sup>, Jean-Pierre Renaudin<sup>2</sup>, Christian Chevalier<sup>1,\*</sup>, Nathalie Frangne<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 619 sur la Biologie du Fruit, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France ;

<sup>2</sup> Université Bordeaux 1, Unité Mixte de Recherche 619 sur la Biologie du Fruit, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France ;

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 118 d'Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France ;

<sup>4</sup> Bordeaux Imaging Center, Pôle Imagerie du Végétal, 71 av. E. Bourlaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France;

<sup>5</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, bâtiment 23/24 ; F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

\* Author for correspondence: Christian Chevalier

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université de Bordeaux, Unité Mixte de Recherche 619 sur la Biologie du Fruit, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

Tel: +33 557122693; Fax: +33 557122541; e-mail: [chevalie@bordeaux.inra.fr](mailto:chevalie@bordeaux.inra.fr)

***Running title:***

**Key words:** nucleus, endopolyploidy, polyteny, tomato, FISH

## **ABSTRACT**

Endopolyploidy is a widespread process which corresponds to the amplification of the genome in the absence of mitosis. In tomato fruits, very high ploidy levels (up to 256C) are reached at the end of fruit development, concomitant with very large cell sizes (Bourdon *et al.*, 2010). By using cellular approaches (Fluorescence and electron microscopy) we provide a structural analysis of endoreduplicated nuclei at the level of chromatin and nucleolus organization, nuclear shape and relation with other cellular organelles such as mitochondria. We demonstrate that endopolyploidization affects deeply the nuclear structure in tomato. In mesocarp cells, displaying high ploidy levels, nuclei possess a highly complex shape with numerous deep grooves, allowing them to maintain a constant area to perimeter ratio despite of their increase in volume. Numerous mitochondria are observed in the close vicinity of polyploid nuclei. FISH method demonstrates that endopolyploidy leads to the formation of polytene chromosomes and to increased rDNA transcription. Our results enlighten the role of endoreduplication in the establishment of a highly structured supra-cellular system required for the promotion of cell growth during tomato fruit development.

## **INTRODUCTION**

Endopolyploidy is a widespread phenomenon in higher plants. It can result from the generation of multinucleate cells originating from acytokinetic mitosis, such as in the formation of the syncytial female gametophyte (Yadegari and Drews, 2004), in anther tapetum (D'Amato 1984) or in seed endosperm (Berger, 2003) or from nuclear fusion, such as in the chalazal domain of the endosperm in *Arabidopsis* (Baroux *et al.*, 2004). Endopolyploidy can also originate from endomitosis or from endoreduplication. During endomitosis, the chromosome number within the nucleus is doubled as chromosomes double and condense, sister chromatids separate normally, but return to the interphase state within an intact nuclear envelope, thus generating nuclear endopolyploidy. However this process is rather unusual in plants (D'Amato, 1984). Endoreduplication is the major source of endopolyploidy in higher plants, particularly in Angiosperms where it arises in most tissues (Nagl, 1976; D'Amato, 1984). During endoreduplication, endonuclear DNA duplication occurs in the absence of any obvious condensation and decondensation steps leading to the production of chromosomes with 2n chromatids without any change in chromosome number (Joubès and Chevalier, 2000).

So far the physiological role of endoreduplication during plant development is not fully understood. Related to the nuclear DNA amplification and the consequent multiplication of the gene copy number, endoreduplication has been proposed to support an increase in transcriptional and metabolic activities (Galitski *et al.*, 1999; Kondorosi and Kondorosi, 2004) or to provide a means to protect the genome against DNA damage caused by adverse environmental factors (Hase *et al.*, 2006). However none of these theories has been undisputedly demonstrated in plants.

The most obvious role for endoreduplication is associated with the determination of cell size, as positive correlations between endoreduplication and cell size are

classically observed in many different plant species, organs and cell types (Chevalier *et al.*, 2011, in press). During endoreduplication, hypertrophying nuclei arise from successive cycles of DNA replication. According to the “karyoplasmic ratio” theory, this hypertrophy then influences the final size of the cell that tends to adjust its cytoplasmic volume with respect to the nuclear DNA content (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003).

In tomato, evidence for such a positive correlation between mean cell size and mean ploidy level has indeed been provided during fruit development (Cheniclet *et al.*, 2005), and investigated at the molecular level in the course of tomato fruit development (Chevalier *et al.*, 2011, in press). The balance between mitosis and commitment to endoreduplication is exerted at the level of Cyclin Dependent Kinase (CDK) activity control (De Veylder *et al.*, 2007). Altering the expression of cell cycle genes that affect the components of the CDK/CYC complexes at the post-translational level resulted in tomato fruit in a decrease in DNA ploidy levels and consequent reduction in both cell size and fruit size (Gonzalez *et al.*, 2007; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Unexpectedly, the fruit-specific overexpression of a CDK inhibitor during the cell expansion period of growth in tomato induced the uncoupling of endoreduplication from cell size, as the decrease in ploidy levels occurred without affecting cell size (Nafati *et al.*, 2011 in press). Hence endoreduplication does not exert a direct control on cell growth, but would rather support a range of cell size rather than a defined one, modulating the rate of cell expansion and/or organ growth, such as in fruit development.

Investigating endoreduplication in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) is of considerable significance, not only because high levels of endopolyploidy occur in the course of fruit development, but also because it does contribute to fruit growth in a developmentally and genetically regulated manner. However our knowledge of the

cellular and nuclear modifications induced by endoreduplication in a particular tissular context (such as in fruit pericarp) remains scarce.

Due to the difficulty to determine ploidy level at the cellular level in the tissue context, we have recently developed a FISH method which allowed us to establish a ploidy map of tomato pericarp at mature green stage (Bourdon *et al.*, submitted). Here we provide a structural analysis of endoreduplicated nuclei, at the level of chromatin and nucleolus organization, nuclear shape and relation with other cellular organelles such as mitochondria. Our data will be discussed relative to the hypothesized functional roles of endoreduplication in plant development.

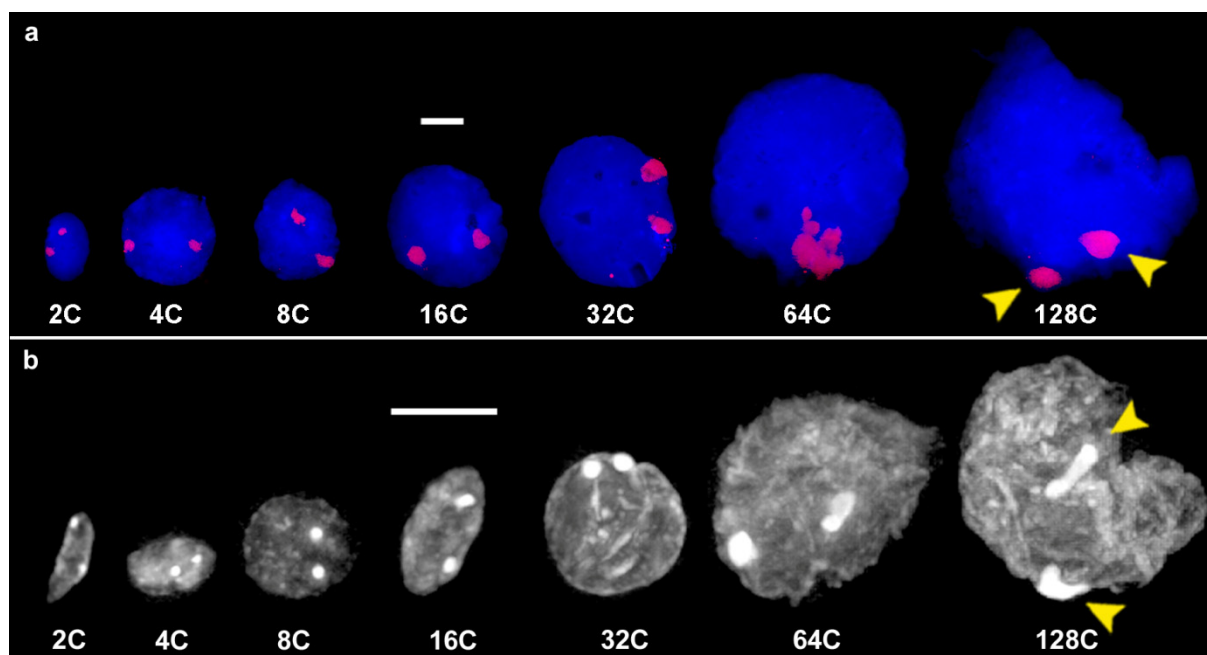
## **RESULTS**

### **Endopolyploidization in tomato leads to polytene chromosomes**

As a first step, we investigated the chromosomal organization within polyploid nuclei, applying a Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) technique, as recently described (Bourdon *et al.*, submitted). Using flow cytometry-sorted nuclei at different ploidy levels, we used a wheat genomic DNA clone specific for the 45S rDNA locus which is located on chromosome 2 in tomato (Jo *et al.*, 2009). Whatever the ploidy level, only two clustering hybridization signals were obtained (Figure 1a), thus demonstrating that endopolyploidization in tomato occurs according to the endoreduplication process, *i.e.* the production of chromosomes with  $2^n$  chromatids without change in the chromosome number, and not according to endomitosis which leads to an increase in the chromosome number. Similar results were observed when using a specific probe for the 5S rDNA gene cluster which is located on chromosome 1 (Lapitan *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 2008) (Supplemental Figure 1).

These results were confirmed by using Chromomycin A3, a DNA-specific dye (Arumuganathan *et al.* 1994) which preferentially stains GC-rich regions such as the Nucleolar Organizing Regions (NOR) located on chromosome 2 (Chang *et al.*, 2008).

In accordance with the 45S rDNA hybridization and the endoreduplicated nature of chromosomes in tomato, Chromomycin A3 stained two clusters corresponding to the NOR region (Nucleolar Organizer Region) in the vicinity of the nucleolus (Figure 1b).



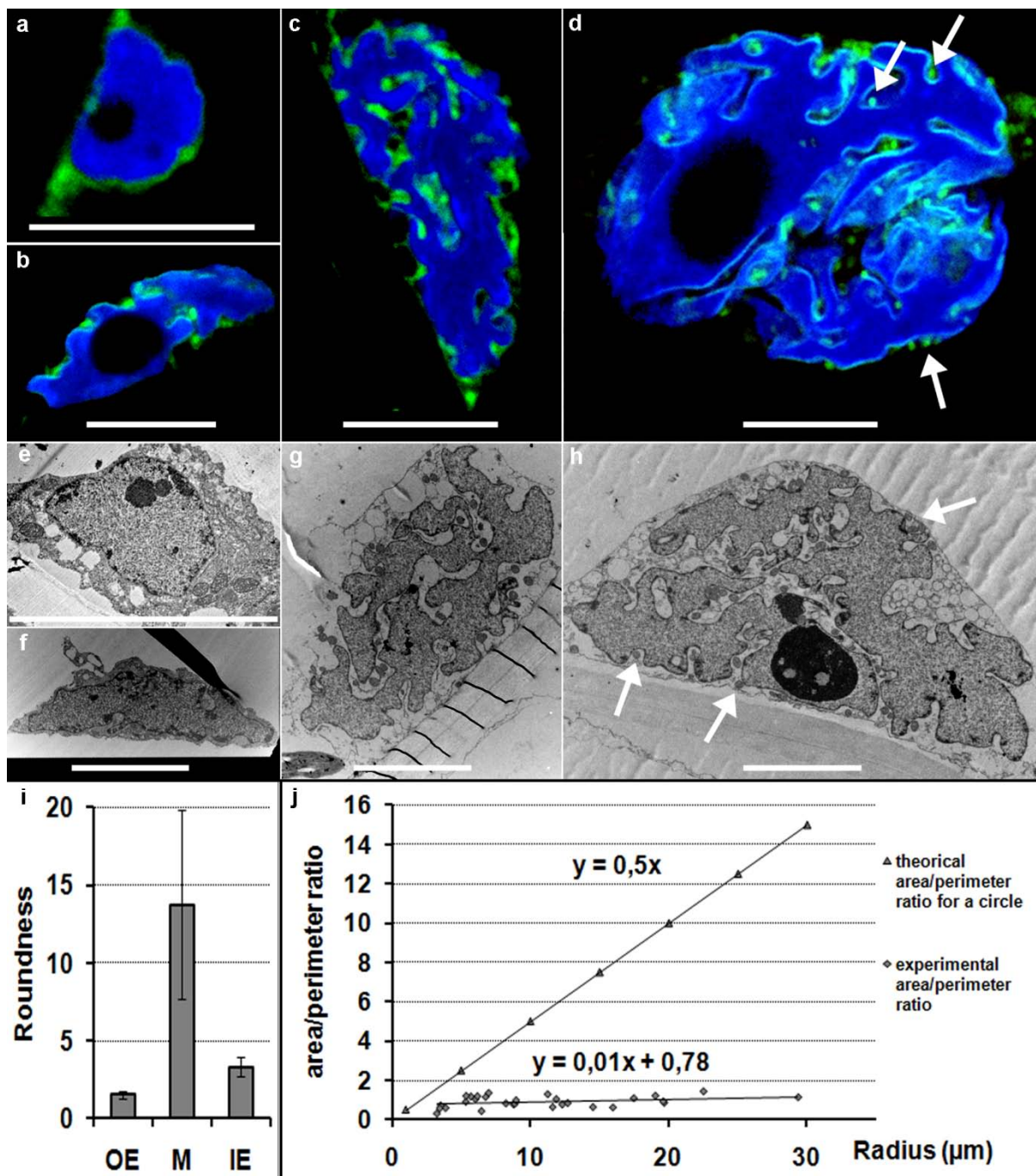
**Figure 1.** Structural analysis of chromosomes organization in endoreduplicated nuclei from tomato fruit pericarp. **(a)** FISH analysis on flow cytometry-sorted nuclei according to their ploidy level, using a 45S rDNA probe from wheat. DNA was counterstained with DAPI (blue) Arrows point out the specific FISH DNA hybridization spots (red) revealing chromosome 2. Scale bar: 10µm. **(b)** Staining of flow cytometry-sorted nuclei according to their ploidy level using Chromomycin A3. Arrows point out the specifically stained Nucleolar Organizing Region on chromosome 2. Scale bar: 10 µm.

### Endopolyploidy affects deeply the nuclear structure

Taking advantage of the determination of ploidy levels at the cellular level recently established in tomato pericarp (Bourdon *et al.*, submitted), we then analysed the nuclear structure in relation to ploidy levels inside the three most contrasted pericarp areas in term of ploidy level, *i.e.* the outer epidermis with very low ploidy levels of 2C and 4C, the inner epidermis with mid-ploidy levels of 8C to 32C and the mid- to inner mesocarp with high ploidy levels of 32C to 128C. The nuclear structure was analysed using two different methods of observation. First we used fluorescence microscopy on tissues stained with DIOC<sub>6</sub>(3), a lipophilic fluorescent dye labelling intracellular membranes (Terasaki and Reese, 1992) and with DAPI, a DNA-specific dye (Figure



2a-d). Second we used transmission electron microscopy (TEM) on Epon embedded tissues (Figure 2e-h).



**Figure 2.** Structural analysis of tomato fruit pericarp nuclei.

Nuclei located in various positions across the tomato fruit pericarp were observed using confocal and transmission electronic microscopy (TEM). **(a and e)** Nucleus from the outer epidermis (OE); **(b and f)** Nucleus from the inner epidermis (IE); **(c,d,g and h)** Nucleus from the mesocarp (M). **(a-d)** Structural analysis using confocal microscopy. Dioc<sub>6</sub>(3) was used to stain the nuclear envelope in green and DAPI to counterstain the DNA in blue. Dioc<sub>6</sub>(3) also reveals endoplasmic reticulum and mitochondria. **(e-h)** Ultrastructural analysis using TEM. **(i)** Analysis of nuclear shape according to the position across tomato fruit pericarp, expressed as the roundness parameter from the ImagePro Plus software. Roundness of tomato pericarp nuclei acquired from TEM pictures was expressed as the result of  $L^2 \cdot (4\pi S)^{-1}$ , where

L represents the nucleus perimeter and S the nucleus area. Roundness values close to one correspond to a perfectly round nucleus. **(j)** Evolution of the nuclear exchange surface of pericarp nuclei (expressed as the nuclear area to perimeter ratio related to nucleus radius), compared to the evolution of this parameter for a circle (theoretical area/perimeter ratio). The significance of the constant mitochondria distributions was confirmed by a Mann & Whitney test ( $\alpha = 2.5\%$ ). White arrows point to mitochondria. Scale bar: 10 $\mu$ m.

Round shaped nuclei were found in the outer epidermis (Figures 2a and 2e), elongated and slightly grooved nuclei were observed in the inner epidermis, (Figures 2b and 2f), and nuclei with a very complex shape and numerous deep grooves were found in mid- to inner mesocarp (Figure 2c, 2d, 2g and 2h). These observations show a clear relationship between the complexity of the nucleus shape and the ploidy level.

In order to assess more precisely the nucleus shape complexity, we measured on TEM pictures the nuclear area (A) and perimeter (P) corresponding to length of nuclear envelope and we calculated the roundness factor according to the formula  $P^2 \times (4\pi A)^{-1}$  (Figure 2i). This value is equal to 1 for a circle and increases for objects diverging from this shape. High values for roundness were found in pericarp zones of high ploidy levels (mesocarp (M)) while low values were measured in outer epidermis (OE) (low ploidy level) and intermediate ones in inner epidermis (IE) where ploidy levels are intermediate (Figure 2i), showing that the extent of grooves seems to rely on that of ploidy. We also observed an increase in nuclear size; small nuclei are observed in outer epidermis, intermediate ones in inner epidermis and large nuclei in mesocarp (Figure 2 a-h).

As a consequence of increase in DNA content the nucleus size increases with ploidy level (Bourdon *et al.*, 2010, submitted ). In order to evaluate the consequence of this increase in size on the exchange ability between nucleus content and cytoplasm, we then plotted the nuclear A to P ratio against the nuclear radius (Figure 2j). If the nuclei increased in size while keeping their original round shape, their A/P ratio would increase linearly with their radius, as is illustrated in the theoretical area/perimeter ratio graph calculated for a circle. This would result in a lower

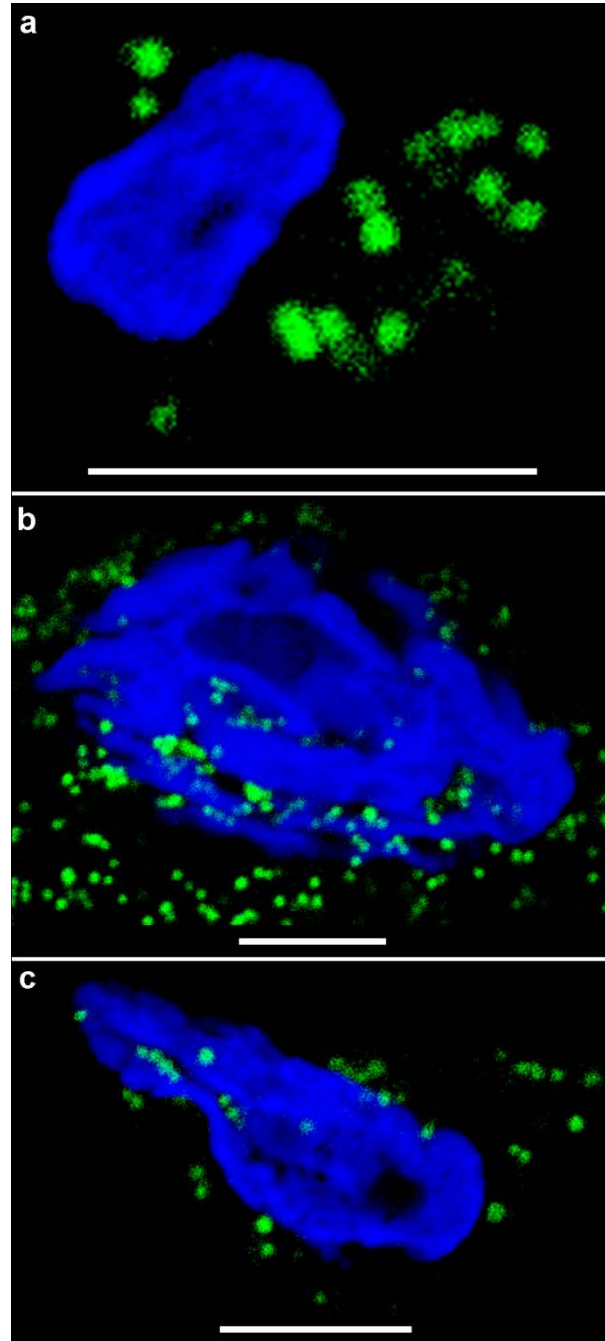
exchange ability. On the contrary, the determined ratios for pericarp nuclei appeared to be relatively constant, indicating that the nuclei could maintain the extent of their exchange ability during endopolyploidization (Figure 2j).

### **Mitochondria surround polyploid nuclei within nuclear grooves**

It is commonly inferred that endopolyploidy is associated to metabolically active cells (Kudo and Kimura, 2002; Larkins *et al.*, 2001; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003), even though no clear evidence at the cellular level could be provided. When investigating the nuclear structure using DioC<sub>6</sub>(3) as a dye, we were able to reveal the presence of numerous mitochondria in the close vicinity of polyploid nuclei (Figure 2d).

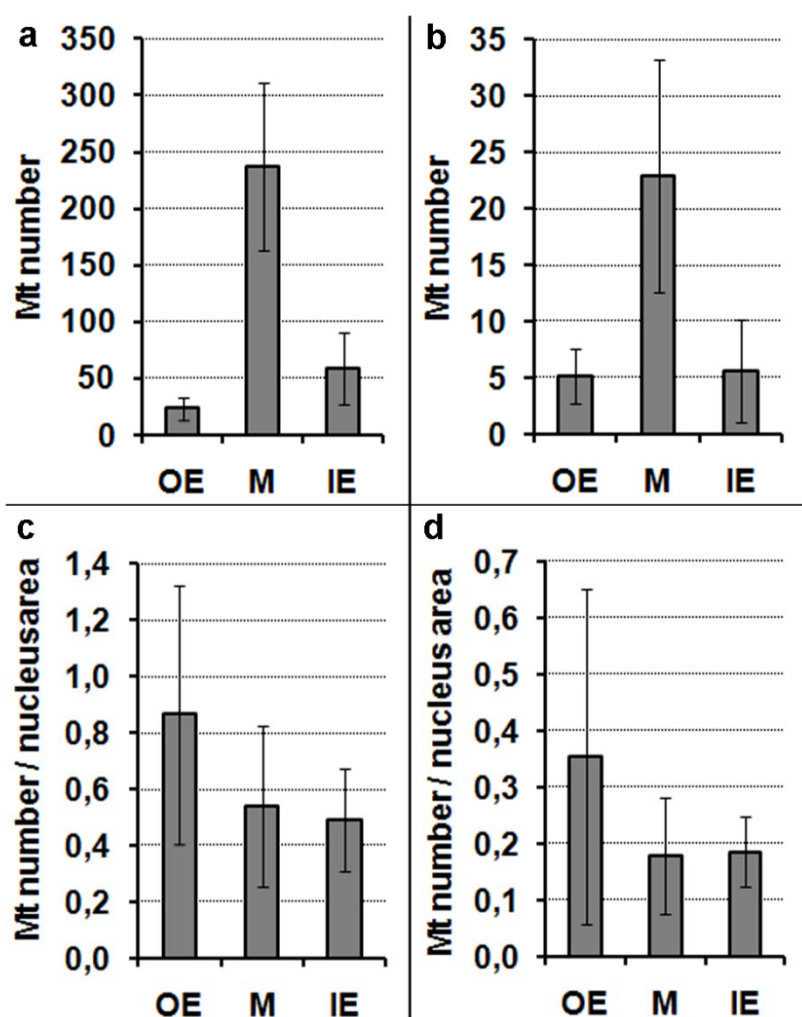
We investigated whether this close relationship between nucleus and mitochondria was related to the extent of endopolyploidy, using fluorescence microscopy on fresh handmade tissue sections stained with Rhodamine 123, a fluorescent cationic dye used to label mitochondria in living cells (Emaus *et al.*, 1986). Numerous mitochondria were detected in the vicinity of polyploid nuclei from the mesocarp (Figure 3b) or in inner epidermis (Figure 3c), while only few mitochondria were seen close to the nuclei in the outer epidermis (Figure 3a). Moreover, a significant amount of mitochondria co-localized with nuclear grooves as described above. Such an observation could also be made on TEM pictures (Figure 2h). We then quantitatively assessed the number of mitochondria in relation to ploidy levels, by counting the organelles in the three pericarp areas defined according to the ploidy model map established by Bourdon *et al.* (2010 submitted). From the z-series of confocal acquired images the mean total number of mitochondria surrounding a nucleus was found to be around 23 in the outer epidermis, 237 in the central mesocarp and 58 in the inner epidermis (Figure 4a). Mitochondria were also counted in the vicinity of

TEM observed nuclei (Figure 4b). These values, which correspond to a single plane section of the nucleus, are lower but display the same pattern in relation to pericarp zones. Both methods show that the number of mitochondria associated to the nuclei increased according to the extent of ploidy.



**Figure 3.** Mitochondria presence in the vicinity of pericarp nuclei. Mitochondria were stained with rhodamine 123 (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). Images correspond to confocal single plane. **(a)** nucleus in outer epidermis. **(b)** nucleus in mesocarp. **(c)** nucleus in inner epidermis. Scale bar: 10 $\mu$ m.

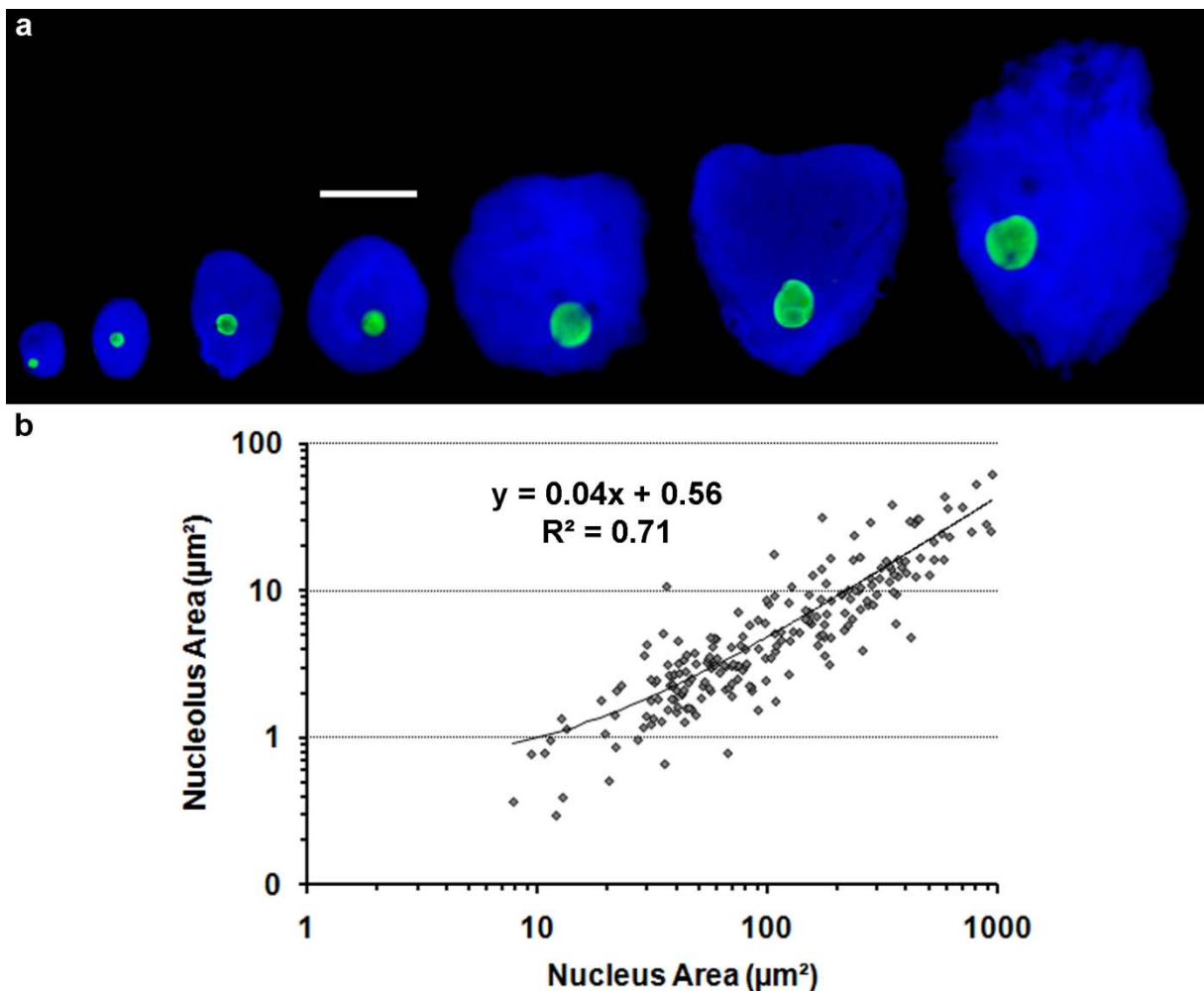
We next calculated the ratio of mitochondria per nuclear area to assess the relative distribution of mitochondria around the nucleus (Figure 4c and d). In contrast to the above described measurements, no significant differences could be observed within the different pericarp areas (Mann & Whitney test,  $\alpha = 2.5\%$ ), whatever the mode of observation (confocal microscopy or TEM). This result thus suggested that the number of mitochondria reported to a nuclear area unit remains constant whatever the ploidy level.



**Figure 4.** Number of mitochondria surrounding nuclei in tomato fruit pericarp. Mitochondria (Mt) counting on confocal microscope images (**a,c**) and electron microscope TEM images (**b,d**) of nuclei in 3 pericarp zones (OE: outer epidermis, M: mesocarp, IE: inner epidermis). The DAPI-stained maximal projection of each nucleus for confocal images. **(a)** Mean mitochondria number per nucleus (integration of all the confocal z-planes); **(b)** Mean mitochondria number per nucleus section (TEM 2D images); **(c)** Ratio between the total mitochondria number and the nucleus area measured on the maximal projection of the confocal z-series. **(d)** Ratio between the mitochondria number and the nucleus area in the TEM section. No significant differences could be observed between the different pericarp zones when comparing relative area classes values of c, and d, respectively (Mann & Whitney test,  $\alpha = 2,5\%$ ).

## Endopolyploidization leads to increased rDNA transcription

The developmental process of cell growth obviously needs a sustained protein synthesis which itself requires a sustained ribosome genesis. Consequently, the control of cell growth somehow depends upon the control of ribosome synthesis (Rudra and Warner, 2004). Ribosomal RNAs are transcribed and assembled into ribosomal subunits at the nucleolus within the nucleus (Hernandez-Verdun, 2006). To investigate part of this process, we intended to assess the transcriptional activity associated to the nucleolus in the course of endopolyploidization by performing a RNA FISH experiment using the 5.8S rRNA as a probe (Figure 5).



**Figure 5.** RNA FISH analysis on tomato pericarp isolated nuclei using a 5.8S RNA probe. **(a)** Hybridization pattern of the 5.8S RNA probe in green. DAPI-stained DNA appears in blue. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . **(b)** Measurement of the nucleolar surface relative to the nuclear surface. A total number of 209 nuclei were used for counting.



As shown in Figure 5a, the 5.8S rRNA hybridization signal was intimately associated to the nucleolus. The increase in the nucleolus area was found positively correlated to that of the nucleus area (Figure 5b), which itself is correlated to ploidy level (Bourdon *et al.* submitted), thus indicating an enhanced transcriptional activity for 5.8S of the nucleolus in the course of endopolyploidization.

## **DISCUSSION**

During tomato fruit development, we established clear positive correlations between the mean cell size within the fruit pericarp and the mean ploidy level, as well as between the mean ploidy level and final fruit size (Cheniclet *et al.*, 2005; Bourdon *et al.*, 2010 submitted). Therefore endopolyploidization is a major determinant for the final size of the cell, which can explain the observed gradation in cell size in tomato fruit but contributes also in part to the variation in fruit size.

### **Endopolyploidization in tomato produces polytene chromosomes**

Various mechanisms can account for the occurrence of endopolyploidy in plants: it may originate from the generation of multinucleate cells originating from acytokinetic mitosis, from nuclear fusion, from endomitosis or from endoreduplication (Joubès and Chevalier, 2000). We provided the evidence that endoreduplication *per se* is the main mode of cell endopolyploidization in tomato. Using a Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) approach on pericarp nuclei sorted by flow cytometry according to their DNA content and rDNA-specific probes (Figure 1a; Supplemental Figure 1) or a dye specifically detecting the chromosome 2-located NOR (Figure 1b), we showed that endopolyploidization in tomato fruit tissues does not lead to any increase in the chromosome number as expected for endoreduplication, contrary to what would result from endomitosis. The probes that were used in FISH assays encode the 45S and 5S rDNA, two highly tandem repeated DNA sequences (2300 and 1000 copies,

respectively; Chang *et al.*, 2008). The use of non-repeated DNA sequences encoded by BAC probes specifically hybridizing to chromosome 7 and 11 allowed us to confirm that endopolyploidization in tomato produces chromosomes with  $2n$  chromatids (Bourdon *et al.*, 2010; submitted). Indeed, we could obtain in this study FISH signals that were organized in two clusters displaying a number of hybridizing dots (thus corresponding to the detected chromatids) that were nicely correlated to the various ploidy levels. Altogether these results demonstrate the polytene organization of tomato chromosomes in endopolyploid cells.

Polytene chromosomes are thus characterized by the pairing of sister chromatids that stay attached to the same centromere. However, such a chromatid pairing is not always evident (Carvalheira, 2000), and classic vs. nonclassic polyteny was even described (Zybina and Zybina, 1996). In tomato fruit nuclei, chromosomes are not even visible and indirect techniques such as FISH or Chromomycin A3 staining could reveal restricted areas of chromosomes that demonstrated the occurrence of polyteny (Figure 1). The biological significance of such a chromosomal organisation is largely unknown. In *Arabidopsis*, it has been shown that GFP-tagged loci have a greater range of movement in endoreduplicated cells compared to their diploid counterparts (Kato and Lam, 2003), while the centromeres of endoreduplicated chromosomes are intimately linked to the nuclear envelope, thus constraining movement (Fang and Spector, 2005). Even if these observed chromosomal organisation and potential movement are not well understood, it may be interpreted in light of specific chromosomal territories. Indeed such a positioning of the genome in the nuclear volume is thought to be of great importance in the regulation of gene expression (Schoenfelder *et al.*, 2010). Hence, polyteny, by restraining chromosome to specific nuclear areas (Figure 1) could maintain chromosomal territories during endoreduplication, and thus offer a better efficiency for gene transcription by grouping co-regulated genes to restricted “transcription factories”.



## **Endoreduplication triggers the formation of a highly structured supra-cellular system during fruit development.**

The tomato fruit pericarp is composed of a broad variety of cell types from the inner epidermis to outer epidermis according to a complex differentiation pattern during fruit development (Bourdon *et al.*, 2010, submitted). Endoreduplication has often been associated with the cell differentiation process, because it is associated with the final differentiation of cells or organs, such as in leaf trichomes, suspensor cells or hypocotyls (D'Amato, 1984; Gendreau *et al.*, 1997; Hulskamp *et al.*, 1999). However, the direct implication of endoreduplication in driving cell differentiation is still a matter of debate. So far the best established model for cell differentiation related to endoreduplication is the Arabidopsis leaf trichome, where the number of endoreduplication cycles determines the branching shape of the cell (Ishida *et al.*, 2008). Moreover, Bramsiepe *et al.* (2010) showed recently that endoreduplication is directly implicated in trichome cell fate maintenance as the promotion of endoreduplication in glabrous patterning mutants restores trichome initiation.

In tomato, our previous analysis of the ploidy level distribution and cell fate across the pericarp tissue showed no evidence for any positive correlation between endoreduplication and cell fate, since a definite ploidy level or a definite ploidy extent cannot be assigned to a precise cell fate or cell size (Bourdon *et al.*, 2010, submitted). Although cell size has been classically described as being positively correlated to endoreduplication in wild type tomato fruits (Cheniclet *et al.*, 2005; Nafati *et al.*, 2011, in press), we have shown that there is a great discrepancy of cell sizes in the pericarp with partially overlapping ploidy levels (Bourdon *et al.*, 2010, submitted). These data were in full agreement with the proposed hypothesis from Nafati *et al.* (2011, in press) stating that endoreduplication would rather support a range of cell size than a precise definite one, thus supporting the idea that it would serve as a trigger for cell growth (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010) .

The nuclear structure of endoreduplicated cells in tomato pericarp is deeply affected by endopolyploidization. Nuclei appear as complex organelles, with highly invaginated and groovy nuclear envelopes (Figure 2). Such nuclear grooves were already reported for plant and animal nuclei (Fricker *et al.*, 1997; Collings *et al.*, 2000). Even if this structural feature was suggested to be associated with polyploidy (Collings *et al.*, 2000), it has been neither reported elsewhere, to our knowledge, nor directly linked to the extent of DNA ploidy. We were able to show that endoreduplicated nuclei within the fruit pericarp maintain a constant area to perimeter ratio (Figure 2j), suggesting that the profound invaginations characterizing the endoreduplicated nuclei operate to ensure the maintenance of efficient nucleus to cytoplasm communications, despite the increase in cell volume. Interestingly, numerous mitochondria were found to be localized in the grooves of the endoreduplicated nuclear envelope (Figure 3), *i.e.* at the level of the cytoplasm-to-nucleus exchange surface. Therefore the presence of a large population of mitochondria close to the endoreduplicated nuclear envelope could be explained by an absolute need of ATP synthesis, required as an energy supply for nuclear biochemical processes such as DNA replication, and even transcription and translation activities during endoreduplication.

### **Endoreduplication impacts the nucleolus activity**

The functional role of endoreduplication on the differentiation of metabolically-specialized cells has been commonly stated (but still not demonstrated at the cellular level) (Chevalier *et al.*, 2011, in press). The highly polyploid endosperm cells of maize kernels which accumulate large amounts of starch and storage proteins (Sabelli and Larkins, 2009), and the nitrogen-fixing symbiotic root nodule cells in legumes (Cebolla *et al.*, 1999) are quoted as metabolically specialized and highly endoreduplicated cells. Interestingly an important transcriptional activity is tightly

linked to the endoreduplication-associated nitrogen-fixing nodules (Mergaert *et al.*, 2003). As far as tomato fruit is concerned, only descriptive analyses for transcriptional and metabolic profiling in endoreduplicated tissues were provided (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Mounet *et al.*, 2009; Schauer *et al.*, 2006; Steinhauser *et al.*, 2010), without any direct link with the extent of endoreduplication.

Using a 5.8S rDNA probe in RNA FISH experiment, we here provide evidence that not only the size of the nucleolus was positively correlated with the nucleus size and consequently with ploidy levels (Figure 5), but more importantly that the transcription of 5.8S rDNA was enhanced during endoreduplication. These data are consistent with our observation of the enlargement of the Nucleolar Organizing Region revealed by chromomycin A3 staining (Figure 1b). Such a nucleolus enlargement has been reported in rodent trophoblasts (Zybina and Zybina, 1996) and drosophila (Pierce *et al.*, 2004), in light of increased transcriptional and translational activities in the context of endopolyploidization. Interestingly, this feature was also associated with the rate of proliferating activity in cancer cells (Derenzini *et al.*, 2000). It is therefore tempting to draw a parallel with a putative increased rate of growth induced by endoreduplication. The adjustment of a nuclear-to-cytoplasmic ratio to drive cell growth (according to the karyoplasmic theory; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003) would thus require to control the ribosomal RNA and protein synthesis as to enhance the ribosome biogenesis, in order to control the number of “cytoplasmic factories” essential for a sustained cell growth.

By manipulating the expression of a gene that is specifically associated with endoreduplication, Mathieu-Rivet *et al.* (2010) demonstrated the biological significance of endoreduplication as a determinant for cell and fruit growth in tomato. In addition, the manipulation of endoreduplication and consequent induction of fruit growth also impacted greatly nitrogen metabolism in developing fruits, establishing a link between endoreduplication-induced growth and primary metabolism.

Interestingly, it was recently reported in yeast that polyploidy-associated differential gene regulation is regulated by the increase in cell size (Wu *et al.*, 2010): a causal relationship between cell size and transcription was indeed demonstrated, suggesting that cells adjust their transcriptional capacities to their geometric properties including cell size.

## **CONCLUSION**

According to Anisimov (2005), endopolyploidization can be seen as a mean to provide a highly functional supra-cellular oligomerized system, centralizing physiological functions aimed at improving the ergonomomy of the cell and simplifying intracellular regulations. Alongside with previous studies (Cheniclet *et al.*, 2005; Bourdon *et al.*, 2010 submitted; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010; Nafati *et al.*, in press), the present report has contributed to enlighten the functional role of endoreduplication in the establishment of a highly structured supra-cellular system required for the promotion of cell growth during tomato fruit development. In cooperation with the adjustment of the nuclear-to-cytoplasmic volume ratio, different levels of specific structural (chromosomal, nuclear) organization in endoreduplicated cells were observed which could account for the involvement of endoreduplication in the determination of cell growth.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Plant material and growth conditions**

Cherry tomato (*Solanum lycopersicum* Mill. cv Wva106) plants were grown in a greenhouse under a thermoperiod of 25°C/20°C and a photoperiod of 14/10 h (day/night). Tomato fruits were harvested at mature green stage (29-32 dpa (days post anthesis)).

### **Flow cytometry**

Nuclei were prepared from about 2 mm thick sections of tomato pericarp (without septa) from equatorial region by gentle chopping with a razor blade in 2 ml of Galbraith's extraction buffer (Galbraith *et al.*, 1983). The suspension was filtered twice through a 48 µm nylon mesh and nuclei were stained with DAPI at a final concentration of 5 µg.ml<sup>-1</sup>. With a 405 nm laser, light-scatter to gate on nuclei, height/area discrimination against doublets and signal area of the 455 nm emission, nuclei were sorted with a MoFlo XDP cytometer (Beckman Coulter, Roissy, France; [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)) using standard isotonic sheath, 3 drop sorting and coincidence abort. For chromomycin A3 labelling experiments three fruits were used to prepare slides containing 500 nuclei of each ploidy level (2C to 128C) sorted directly onto 3-well microscope glass slides (Superfrost®; CML France, [www.cml.fr](http://www.cml.fr)) prepared with 20 µl of a cushion made of 500 mM sucrose, in 50% Galbraith's buffer, (Galbraith *et al.*, 1983) 2% paraformaldehyde and 50 µg.ml<sup>-1</sup> chromomycin A3. Image acquisition was performed in a short delay after nucleus sorting. For FISH experiments, 3 fruits were used for preparing slides containing up to 2000 nuclei of a given ploidy level (2C to 128C). Nuclei were sorted on slides covered with 10 µl of a 500 mM sucrose cushion, allowed to dry at room temperature and stored at -20°C. To maintain nuclear morphology when sorting onto slides, a slower flow was used,

with sheath at 15 psi. DAPI and chromomycin A3 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

### **Probes for Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)**

A 45S rDNA ribosomal probe was used for DNA FISH experiments. The pTa71 plasmid contains a 9 kbp-long *EcoRI* fragment encoding the 45S rDNA repeat unit (18S-5.8S-26S genes and spacers) isolated from *Triticum aestivum* (Gerlach and Bedbrook, 1979). The 5S rDNA ribosomal probe from *tomato* was as described in Xu and Earle (1996). Probes were labeled by random priming with biotin-14-dUTP according to manufacturer's recommendations (In Vitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). For RNA FISH, the 5.8S sequence of the 45S (5.8S, 18S and 25S) rDNA transcription unit was amplified by PCR. The sense probe used as a negative control was amplified using the following set of 5' and 3' primers respectively: TAATACGACTCACTATAGGGACAAACGACTCTCGGCAAC and CGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCAAATGGCTTC. The antisense probe was amplified using the following set of 5' and 3' primers respectively: ACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCAT and TAATACGACTCACTATAGGGAGGCAGACGTGCCCTCG. For both combinations of primers, the sequence of the T7 promoter (indicated as underlined) was included in the 5' primer (synthesis of the sense probe) and in the 3' primer (synthesis of the antisense probe) to allow the specific transcription by the T7 RNA polymerase. PCR were performed using tomato (cv Microtom) genomic DNA. Amplicons were then purified on agarose gel with Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Then RNA Digoxigenin labeled probes were synthesized by in vitro transcription assays with the SP6/T7 DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Meylan France) according to manufacturer's instructions. The

DIG labeling efficiency was then checked by dot blot using Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Diagnostics, Meylan France ).

### **DNA FISH procedures**

DNA FISH was performed as described in Bourdon *et al.* (2010, submitted) using flow-cytometry sorted nuclei according to their ploidy levels

### **Preparation of isolated nuclei for RNA FISH**

Nuclei were prepared on ice from about 2 mm thick sections of 30 dpa tomato pericarp (without septa) by gentle chopping with a razor blade in 1 mL of CyStain UV ploidy buffer (Partec). The suspension was filtered through a 30 µm nylon mesh directly on 400 µl of 2M sucrose cushion in the same buffer and centrifuged at 1200 g for 10 min at 4°C in order to pellet the amyloplasts. 150µL of the centrifuged suspension were then recovered just over the cushion interface, taked and were gently homogenized by pipetting up and down. Finally, 10µL of this homogenate were deposited and spread out on pasteurized microscope glass slides and allowed to dry.

### **RNA FISH**

RNA FISH was performed directly after nuclei isolation as described in Jolly *et al.*(1997), using a protocol adapted from Popp *et al.*(1990). Nuclei prepared as described above were prefixed in 4% paraformaldehyde/PBS during 10 min, then washed twice in Tris-HCl 0.1M during 5 min, permeabilized in HCl 0.1M for 10 min, then in 0.5% saponin/triton X100 in PBS three times for 5 min, protected in 20% glycerol in PBS, once again permeabilized in liquid nitrogen 3 times for 3 s, and finally dehydrated in ascending ethanol baths of 5 min each (70%, 90%, 100% at -20°C) and allowed to dry for 15 min. The hybridization mixture consisted of 50%

deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSC, 0.25% SDS, 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of sonicated salmon sperm DNA and 100 ng per slide of labeled probes previously denatured at 92°C for 6 min and cooled in ice bath for 15 min. *In situ* hybridization was carried out overnight at 37°C. Post-hybridization washes were in 2X SSC for 5 min at 42°C, 5 min in 50% formamide in 2X-SSC at 42°C, 5 min in 2X SSC at 42°C, 5 min in 4X SSC-0.2% Tween 20 at 42°C, 5 min in 4X SSC-0.2% at room temperature. Slides were then saturated with 200  $\mu\text{l}$  of 5% BSA in 4X SSC-0.2% Tween 20 solution for 5 min at room temperature. Digoxigenin labeled probes were detected by Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Roche Diagnostics, Meylan France). The Nuclei were finally mounted and counterstained in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA), containing 1.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DAPI. Three negative controls were performed to confirm the specificity of this protocol: 1) hybridization with the T7 transcribed 5.8S sense probe described above; 2) include a 1 h treatment with RNase right after the nuclei isolation step; 3) hybridization with a mock treatment (DEPC treated water instead of the DIG-labeled probe).

### **Dioc<sub>6</sub>(3) labelling**

Equatorial hand made slices of 30 dpa fruit pericarp were cut into small pieces and fixed under vacuum infiltration at 20 kPa for 1 hour at 20°C in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer pH7.2. Fixed tissues were left in the fixative solution overnight, finally washed for 10 min in 0.1M phosphate buffer. 150  $\mu\text{m}$  sections were then obtained using a vibrating blade microtome (Microm HM 650V; MicroTech France, <http://mm-france.fr/>), under very slow and large amplitude sectioning. Staining of the nuclear envelope was then performed for 10 min in a 1.7 nM 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DioC<sub>6</sub>(3)) solution in 0.1M phosphate buffer pH7.2. Finally, the sections were briefly washed in 0.1M phosphate buffer pH7.2 and mounted on microscope glass slides in the same buffer.



## **Mitochondria staining**

All steps were performed in a medium consisting in 0.1 M phosphate buffer pH7.2 with 0.3 M sorbitol. Fresh 30 dpa pericarp hand-made sections from fruit equatorial region were stained for 1 min with 0.5  $\mu$ M Rhodamine 123 (Emaus *et al.*, 1986). Sections were then briefly washed for 1 min, stained 1 min with 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), washed again for 1min and finally mounted in 0.1M phosphate buffer pH7.2 with 0.3M sorbitol and immediatly observed with confocal microscope.

## **Fluorescence microscopy**

Fluorescent images of the nuclei were recorded as z-series on a confocal laser-scanning microscope (Leica, Scanhead TCS-SP2 on a DMRXA2, Leica Microsystems, <http://www.leica-microsystems.com/>) with a 63x/NA1.4 HCX PL APO objective. The excitation (Ex) and emission (Em) wavelengths were as follow: for Dioc<sub>6</sub>(3) Ex 488 nm (argon laser) Em 505-555, for Rhodamine 123 Ex 496 nm (argon laser) Em 500-560 nm, for DAPI Ex 405 nm (diode) Em 430-490 nm, for 45S and 5S rDNA FISH, (Texas red labeled probes) Ex 543nm (helium/neon laser) Em 570-675, for 5.8S RNA FISH (Fluorescein labeled probes) Ex 488nm (argon laser) Ex 500-550 nm. Images of nuclei stained with chromomycin A3 were acquired on a Leica DMI6000 microscope with a 20x objective and with Ex 450-490 Em long pass 515 nm.

## **Electron microscopy**

Pericarp fragments excised from fruit equatorial plane were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 150 mM phosphate buffer pH 7.2 for 4-6 hr at 4°C. During the first 30-40 min after immersion in the fixative the samples were submitted to a partial vacuum (20 kPa) to extract intercellular gas. After 3 washes in phosphate buffer

(successively 200 mM, 150 mM and 100 mM), the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 100 mM phosphate buffer for 3 hr at 4°C, rinsed again with phosphate buffer (100 mM then 50 mM) and water. An additional fixation step was performed in 1% tannic acid (BDH) in water for 30 min at room temperature. Tissues were dehydrated at 4°C through an ethanol series, infiltrated successively with propylene oxide (2 x 10min), propylene oxide/Epon (1:1, v/v) (2 hr in capped vials then 2 hr in open vials under ventilated hood) and finally in Epon overnight. The samples were embedded in Epon in gelatine capsules and polymerization achieved for 3 days at 60°C.

Semi-thin sections (1 µm) were made with glass knives on a Reichert 2040 microtome, stained with toluidine blue and photographed on a Zeiss Axiophot microscope with a Spot camera (Diagnostics Instruments). The most interesting nuclei were located and their position in pericarp recorded on printed images. Ultrathin sections (50 nm) of the selected areas (containing interesting nuclei) were then made with a diamond knife on a Reichert Ultracut S ultramicrotome collected on naked 600 mesh hexagonal grids or parlodion-coated 100 or 200 mesh grids, and stained with 7% uranyl acetate (ethanol 50%) and optionally with lead citrate. Digital images were acquired on a CM10 (FEI) transmission electron microscope with an AMT camera (Elexience).

### **Image analysis**

All measurements and counting were made with Image ProPlus 6.2 software (Media Cybernetics Inc., [www.mediacy.com](http://www.mediacy.com)).

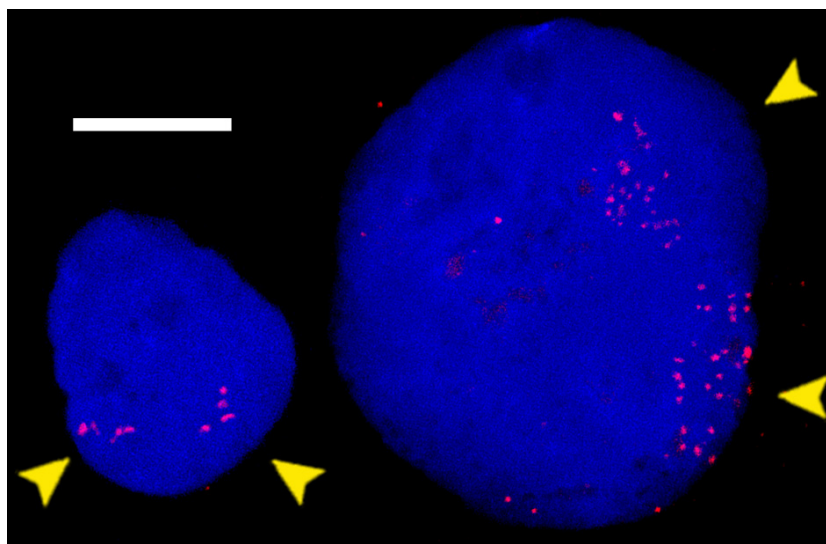
For measurements of nuclear grooves on TEM images, the nuclear radius was calculated as the mean value of Feret min and Feret max, being respectively the width and length of the smallest rectangle enclosing the nucleus. The nuclear perimeter was measured as the length of nuclear envelope, including that of

enclosed invaginations. Counting of mitochondria on TEM images was performed by tagging the mitochondria close to the nucleus, *i.e.* at a maximal distance of ca. 2  $\mu\text{m}$  from the nuclear envelope (the mean size of mitochondria in this tissue being 1  $\mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ ).

For mitochondria (stained with Rhodamine) counting the z-series were treated by blind deconvolution using the AutoQuant X software (Roper Scientific). The outline of the nucleus was determined by image segmentation on the maximal projection of the DAPI series. This outline was applied onto the Rhodamine series and the mitochondria located within this outline or in the ca. 1  $\mu\text{m}$  width surrounding area were manually tagged on each z-plane with Image Pro Plus. This method ensures that mitochondria which are visible on two successive planes due to the poor resolution in z-axis are not counted twice.

Since a small sampling was used for image analyses, significantly different distributions between pericarp areas (*i.e.* inner- and outer epidermis, mesocarp) were tested with a non-parametric Mann & Whitney test ( $\alpha = 2.5\%$ ).

## **SUPPORTING INFORMATION**



**Supplemental figure S1.** DNA FISH (red) on isolated nuclei using 5S rDNA tomato probe. Two nuclei of different size are represented. The hybridization signal is distributed in two groups of red dots (indicated by yellow arrows) and the difference in dot number indicates contrasted ploidy levels for the two nuclei. Scale bar: 10  $\mu$ m.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The image acquisition and image analysis were performed on the Plant Imaging Pole the Bordeaux Imaging Center (<http://www.bic.u-bordeaux2.fr>). Flow cytometry sorting was performed on the Imagif Platform (IFR87, CNRS, Gif-sur-Yvette, France), with the unvaluable help from Mickaël Bourge. Julien Pirello (UMR 619 Biologie du Fruit, INRA Bordeaux, France) is thanked for 5S rDNA FISH experiments and Philippe Gallusci (UMR 619 Biologie du Fruit, INRA Bordeaux, France) for providing us the 5S rDNA probe.

## **REFERENCES**

- Anisimov, A.P.** (2005) Endopolyploidy as a morphogenetic factor of development. *Cell Biology International*, **29**, 993-1004.
- Arumuganathan, K., Martin, G.B., Telenius, H., Tanksley, S.D. and Earle, E.D.** (1994) Chromosome 2-specific DNA clones from flow-sorted chromosomes of tomato. *Molecular and General Genetics MGG*, **242**, 551-558.
- Baroux, C., Franz, P. and Grossniklaus, U.** (2004) Nuclear fusions contribute to polyploidization of the gigantic nuclei in the chalazal endosperm of *Arabidopsis*. *Planta*, **220**, 38-46.
- Berger, F.** (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 42-50.
- Bourdon, M., Coriton, O., Cheniclet, C., Brown, S., Poujol, C., Chevalier, C., Renaudin, J.-P., Frangne, N.** (2010) *In planta* quantification of endopolyploidy using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). Submitted
- Bramsiepe, J., Wester, K., Weinl, C., Roodbarkelari, F., Kasili, R., Larkin, J.C., Hülskamp, M. and Schnittger, A.** (2010) Endoreplication Controls Cell Fate Maintenance. *PLoS Genet*, **6**, e1000996.
- Carvalho, G.M.G.** (2000) Plant polytene chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, **23**, 1043-1050.
- Cebolla, A., Maria Vinardell, J., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E.** (1999) The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*, **18**, 4476-4484.
- Chang, S.-B., Yang, T.-J., Datema, E., van Vugt, J., Vosman, B., Kuipers, A., Meznikova, M., Szinay, D., Lankhorst, R., Jacobsen, E. and de Jong, H.** (2008) FISH mapping and molecular organization of the major repetitive sequences of tomato. *Chromosome Research*, **16**, 919-933.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.*, **139**, 1984-1994.
- Chevalier, C., Nafati, M., Mathieu-Rivet, E., Bourdon M., Frangne, N., Cheniclet, C., Renaudin J.-P. Gévaudant, F., Hernould, M.** (2011) Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann. Bot.*, in press.

- Collings, D.A., Carter, C.N., Rink, J.C., Scott, A.C., Wyatt, S.E. and Allen, N.S.** (2000) Plant Nuclei Can Contain Extensive Grooves and Invaginations. *Plant Cell*, **12**, 2425-2440.
- D'Amato, F.** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. *Johri, BM (ed) . Embryology of angiosperms . Springer, New York*, 519-566.
- De Veylder, L., Beeckman, T. and Inze, D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 655-665.
- Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V. and Chieco, P.** (2000) Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *Journal of Pathology*, **191**, 181-186.
- Emaus, R.K., Grunwald, R. and Lemasters, J.J.** (1986) RHODAMINE-123 AS A PROBE OF TRANSMEMBRANE POTENTIAL IN ISOLATED RAT-LIVER MITOCHONDRIA - SPECTRAL AND METABOLIC PROPERTIES. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **850**, 436-448.
- Fang, Y. and Spector, D.L.** (2005) Centromere Positioning and Dynamics in Living Arabidopsis Plants. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5710-5718.
- Fricker, M., Hollinshead, M., White, N. and Vaux, D.** (1997) Interphase Nuclei of Many Mammalian Cell Types Contain Deep, Dynamic, Tubular Membrane-bound Invaginations of the Nuclear Envelope. *The Journal of Cell Biology*, **136**, 531-544.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and Firoozabady, E.** (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science*, **220**, 1049-1051.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R.** (1999) Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*, **114**, 295-305.
- Gerlach, W.L. and Bedbrook, J.R.** (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1869-1885.
- Gonzalez, N., Gevaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C. and Mouras, A.** (2007) The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant Journal*, **51**, 642-655.
- Hase, Y., Trung, K.H., Matsunaga, T. and Tanaka, A.** (2006) A mutation in the uvi4 gene promotes progression of endo-reduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *The Plant Journal*, **46**, 317-326.

- Hernandez-Verdun, D.** (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology*, **125**, 127-137.
- Hulskamp, M., Schnittger, A. and Folkers, U.** (1999) Pattern formation and cell differentiation: Trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 186*, **186**, 147-178.
- Ishida, T., Kurata, T., Okada, K., Wada, T.** (2008) A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annual Review in Plant Biology*, **59**, 365-386.
- Jo, S.-H., Koo, D.-H., Kim, J., Hur, C.-G., Lee, S., Yang, T.-j., Kwon, S.-Y. and Choi, D.** (2009) Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. *BMC Plant Biology*, **9**, 42.
- Jolly, C., Mongelard, F., Robert-Nicoud, M. and Vourc'h, C.** (1997) Optimization of Nuclear Transcript Detection by FISH and Combination with Fluorescence Immunocytochemical Detection of Transcription Factors. *J. Histochem. Cytochem.*, **45**, 1585-1592.
- Joubès, J. and Chevalier, C.** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **43**, 735-745.
- Kato, N. and Lam, E.** (2003) Chromatin of endoreduplicated pavement cells has greater range of movement than that of diploid guard cells in Arabidopsis thaliana. *J Cell Sci*, **116**, 2195-2201.
- Kondorosi, E. and Kondorosi, A.** (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters*, **567**, 152-157.
- Kudo, N. and Kimura, Y.** (2002) Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J. Exp. Bot.*, **53**, 1017-1023.
- Lapitan, N.L.V., Ganal, M.W. and Tanksley, S.D.** (1991) ORGANIZATION OF THE 5S-RIBOSOMAL RNA GENES IN THE GENOME OF TOMATO. *Genome*, **34**, 509-514.
- Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C.M., Woo, Y.m. and Liu, Y.** (2001) Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 183-192.
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C. and Rothan, C.** (2005) Changes in

Transcriptional Profiles Are Associated with Early Fruit Tissue Specialization in Tomato. *Plant Physiol.*, **139**, 750-769.

**Mathieu-Rivet, E., Gevaudant, F., Sicard, A., Salar, S., Do, P.T., Mouras, A., Fernie, A.R., Gibon, Y., Rothan, C., Chevalier, C. and Hernould, M.** (2010) Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant Journal*, **62**, 727-741.

**Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A. and Kondorosi, E.** (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology*, **132**, 161-173.

**Mounet, F., Moing, A., Garcia, V., Petit, J., Maucourt, M., Deborde, C., Bernillon, S., Le Gall, G., Colquhoun, I., Defernez, M., Giraudel, J.-L., Rolin, D., Rothan, C. and Lemaire-Chamley, M.** (2009) Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. *Plant Physiol.*, **149**, 1505-1528.

**Nafati, M., Cheniclet, C., Hernould, M., Do, P.T., Fernie, A., Chevalier, C., Gévaudant, F.** (2011) The specific overexpression of a Cyclin Dependent Kinase Inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant J.*, in press.

**Nagl, W.** (1975) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature, UK*, **261**, 614-615.

**Pierce, S.B., Yost, C., Britton, J.S., Loo, L.W.M., Flynn, E.M., Edgar, B.A. and Eisenman, R.N.** (2004) dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*. *Development*, **131**, 2317-2327.

**Popp, S., Scholl, H.P., Loos, P., Jauch, A., Stelzer, E., Cremer, C. and Cremer, T.** (1990) Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Experimental Cell Research*, **189**, 1-12.

**Rudra, D. and Warner, J.R.** (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes & Development*, **18**, 2431-2436.

**Sabelli, P.A. and Larkins, B.A.** (2009) The contribution of cell cycle regulation to endosperm development. *Sexual Plant Reproduction*, **22**, 207-219.



- Schauer, N., Semel, Y., Roessner, U., Gur, A., Balbo, I., Carrari, F., Pleban, T., Perez-Melis, A., Bruedigam, C., Kopka, J., Willmitzer, L., Zamir, D. and Fernie, A.R.** (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, **24**, 447-454.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., Eskiw, C.H., Luo, Y., Wei, C.-L., Ruan, Y., Bieker, J.J. and Fraser, P.** (2010) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, **42**, 53-61.
- Steinhauser, M.C., Steinhauser, D., Koehl, K., Carrari, F., Gibon, Y., Fernie, A.R. and Stitt, M.** (2010) Enzyme Activity Profiles during Fruit Development in Tomato Cultivars and *Solanum pennellii*. *Plant Physiology*, **153**, 80-98.
- Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 544-553.
- Terasaki, M. and Reese, T.S.** (1992) Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J Cell Sci*, **101**, 315-322.
- Xu, J. and Earle, E.D.** (1996) High resolution physical mapping of 45S (5.8S, 18S and 25S) rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes. *Chromosoma*, **104**, 545-550.
- Yadegari, R. and Drews, G.N.** (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell*, **16**, S133-S141.
- Zybina, E.V. and Zybina, T.G.** (1996) Polytene chromosomes in mammalian cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 165*, **165**, 53-119.

## **PARTIE 3 :**

# **RECHERCHE DE MUTANTS AFFECTES DANS** **L'ENDOREDUPPLICATION : CRIBLAGE DE LA BANQUE DE** **MUTANTS TILLING MICRO-TOM**

## **INTRODUCTION**

L'endopolyploïdisation, augmentation du nombre de copies d'un génome dans une cellule, est un phénomène extrêmement répandu chez les eucaryotes, qui concernerait plus de 90 % des Angiospermes (D'Amato 1984). Ce processus se caractérise par l'apparition au sein d'organes spécifiques de cellules avec des gammes de ploïdie variées (Barow 2006). Il est souvent associé à la croissance cellulaire ou de l'organe et au métabolisme *via* une amplification fonctionnelle du génome dans les cellules où il a lieu. Chez les plantes, il atteint des proportions moyennes (jusqu'à 32 C environ) dans les parties végétatives telles que les feuilles (Galbraith *et al.* 1991), l'hypocotyle (Gendreau *et al.* 1997), alors que les niveaux atteints dans les organes reproducteurs peuvent être beaucoup plus élevés (jusqu'à 24576 C, (Nagl 1975)). Chez la tomate, on remarque la mise en place de forts niveaux de ploïdie (256 C à 512 C) au cours du développement du fruit (Bergervoet *et al.* 1996, Cheniclet *et al.* 2005). Une corrélation positive a été démontrée entre la ploïdie moyenne de fruit, la taille cellulaire moyenne et le poids moyen du fruit au sein de lignées génétiquement différentes de tomate (Cheniclet, *et al.* 2005). Il a aussi été récemment suggéré (Barow and Meister 2003, Bourdon *et al.* 2010) une implication de l'endopolyploïdisation dans la vitesse de croissance de l'organe ou l'espèce considérée. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons cherché à

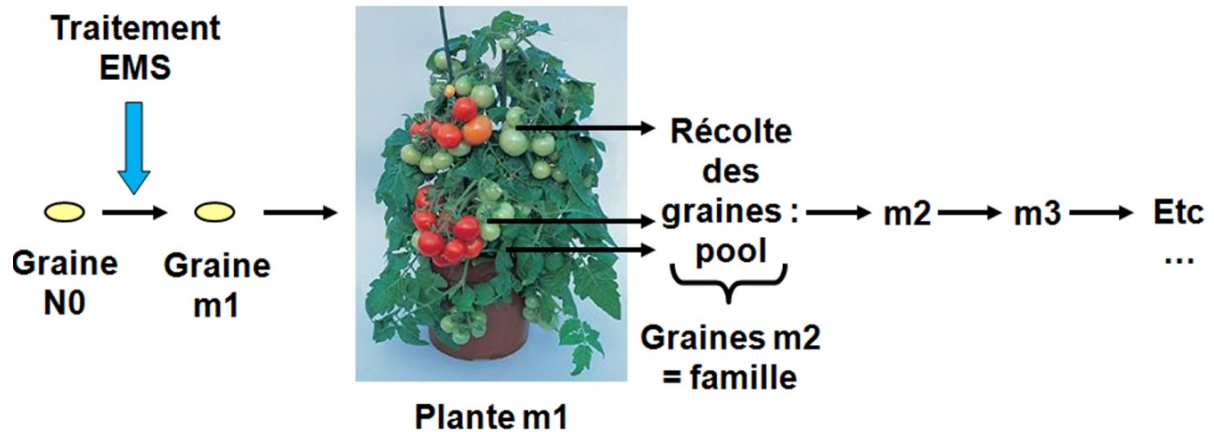
comparer des lignées de tomate significativement affectées dans l'endoreduplication et génétiquement proches. Du fait de l'absence, au début de ce travail, de lignées disponibles (mutants ou plantes transgéniques), nous avons engagé le criblage d'une banque de mutants de tomate, variété Micro-Tom, pour rechercher des mutants potentiellement affectés dans l'endoreduplication.

## **RESULTATS**

La banque de mutants TILLING de la variété de tomate Micro-Tom de l'UMR 619 Biologie du Fruit a été utilisée pour la recherche de mutants affectés dans le phénomène d'endoreduplication. Elle contient approximativement 3000 familles de mutants m2 conservées sous formes de graines issues de l'autofécondation de plantes m1 qui correspondent aux graines ayant subi le traitement mutagène (EMS) (Figure 1). Les plantes ont été annotées lors de leur croissance pour plusieurs aspects de leur phénotype, notamment les caractéristiques morphologiques des fruits, dont la taille et l'épaisseur du péricarpe, et ce parfois sur plusieurs générations (Just D., communication personnelle).

### **Choix des familles à étudier**

La première étape a consisté à choisir parmi toutes les familles de la banque celles présentant la plus grande probabilité d'être affectées dans l'endoreduplication. La liste et la description des familles de toute la banque est présente à l'adresse suivante : <http://bordeaux.inra.fr/umr619/live/MMDB/>

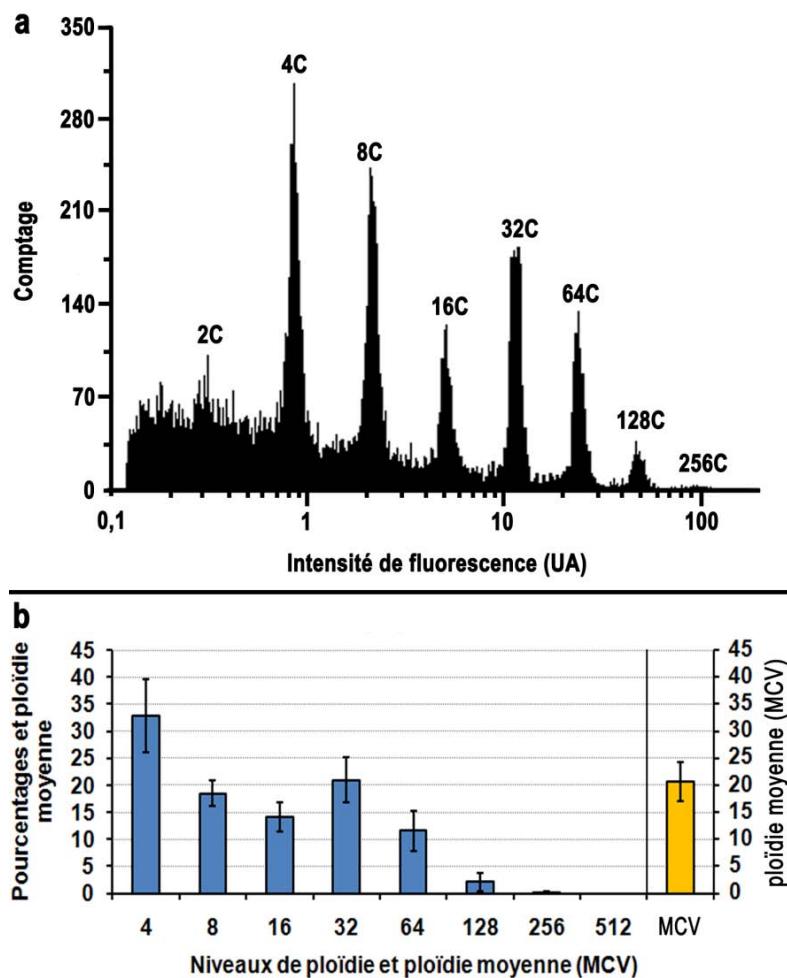


**Figure 1.** Mode d'obtention des familles de la banque de mutants microtom. Les graines N0 subissent le traitement EMS afin de générer des mutations et prennent alors l'appellation « m1 ». Les graines « m1 » mises à germer donneront des plantes donnant des fruits dont les graines, une fois poolés, constitueront une famille de génération « m2 ». Chaque nouvelle génération incrémentera de un la valeur de l'indice de « m ».

Chez la tomate deux paramètres ont été montrés comme ayant un lien avec le degré d'endoréduplication : la taille du fruit et l'épaisseur du péricarpe (Bourdon, *et al.* 2010, Cheniclet, *et al.* 2005). Nous avons donc sélectionné des familles annotées comme présentant des gros fruits, des petits fruits et/ou un péricarpe épais. Afin de limiter le nombre de gènes impliqués dans le phénotype de la plante et du fruit, nous avons cherché à éviter les familles présentant des phénotype développementaux délétères au niveau des parties végétatives et florales, et nous avons aussi privilégié les familles dont le phénotype du fruit avait été confirmé sur plusieurs générations successives (jusqu'à m4 pour certaines familles). De plus, nous avons essayé de réduire au minimum le nombre de familles contenant des fruits à carpelles surnuméraires ou sous-numéraires, étant donné l'influence de ce paramètre sur la taille finale du fruit (Cheniclet, *et al.* 2005). De cette manière, 62 familles ont été sélectionnées:

- gros fruits : 35 familles.
- petits fruits : 13 familles.
- péricarpe épais : 13 familles.
- gros fruit et péricarpe épais : 1 famille.

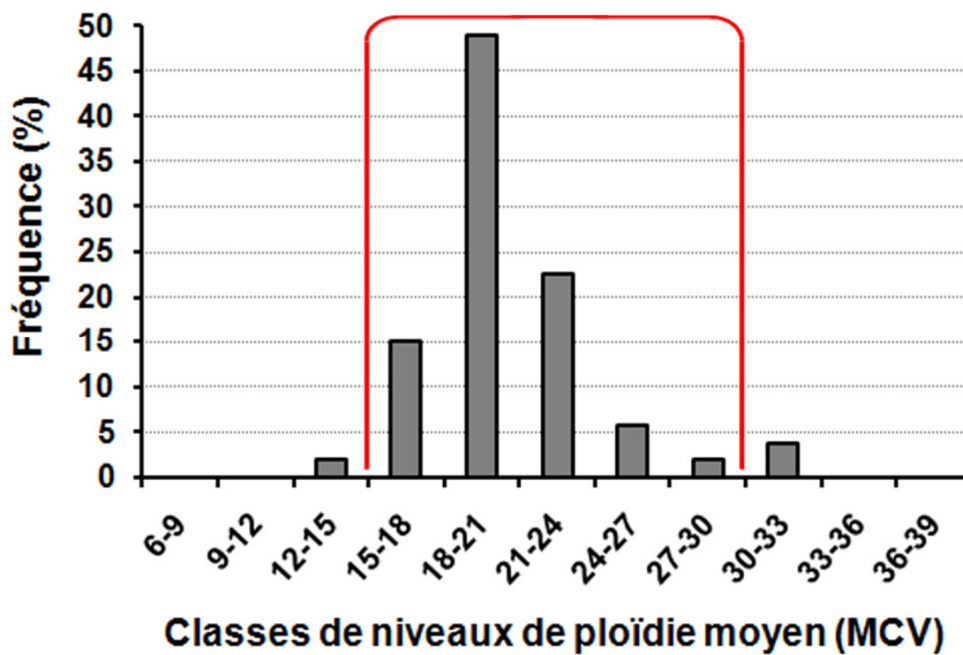
Nous avons réalisé un premier cycle de culture (appelé « génération A ») à partir de 18 graines de chacune de ces familles.



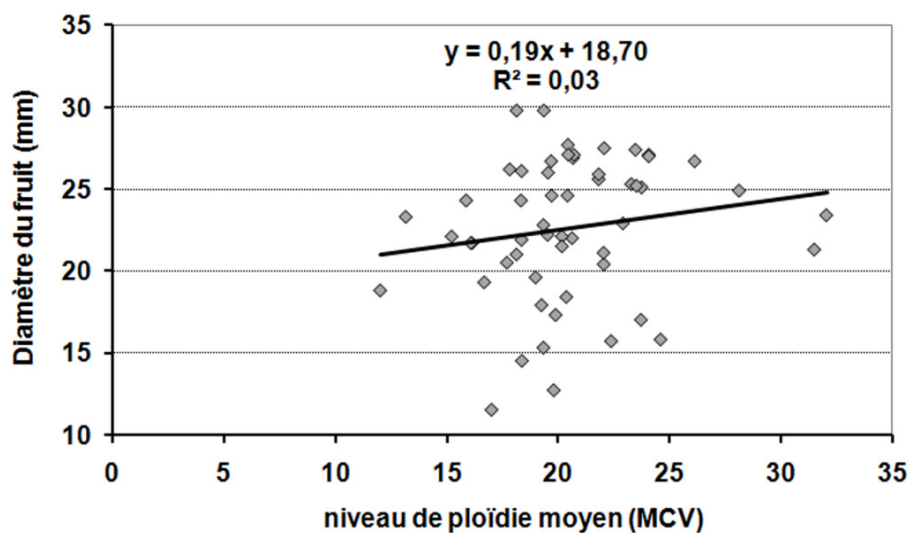
**Figure 2.** Répartition des niveaux de ploïdie au sein de la population témoin Micro-Tom, génération A. **(a)**, Cytogramme représentatif de la population témoin, variété Micro-tom, au stade breaker. En ordonnées sont mentionnés le nombre d'objets comptés et en abscisses l'intensité de fluorescence en unités arbitraires (UA). Les niveaux de ploïdie sont indiqués au dessus de chaque pic. **(b)**, Répartition moyenne des niveaux de ploïdie au sein de la population témoin (génération A). Les proportions de chaque classe de ploïdie sont indiquées en ordonnées (en %). En abscisses sont indiqués les différents niveaux de ploïdie. A partir de ces valeurs la ploïdie moyenne (MCV) a été calculée. (56) fruits ont été analysés.

## **Etude de la variabilité de la population sauvage**

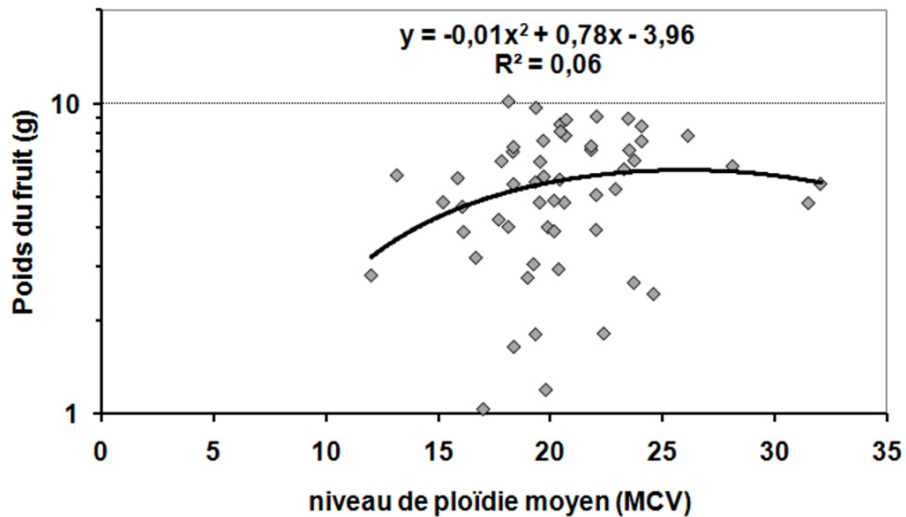
Nous avons tout d'abord cherché à apprécier la variabilité de l'endoréduplication au sein de la variété Micro-Tom « sauvage », afin de pouvoir par la suite juger de différences significatives chez les lignées mutantes. Nous avons choisi de récolter et d'analyser le premier fruit de chaque plante pour nous affranchir des effets de la compétition entre les fruits (Baldet *et al.* 2006, Serrani *et al.* 2007). Ensuite, dans un souci de facilitation de la récolte d'un grand nombre d'individus à un stade comparable, les fruits ont été prélevés au stade breaker, stade observé pendant un à deux jours à la fin de la croissance, juste avant la maturation, et facilement reconnaissable grâce au changement de couleur du fruit (la couleur verte s'éclaircit par disparition de la chlorophylle et tend vers le jaune pâle). Un histogramme de cytométrie représentatif des fruits de la population témoin est représenté en Figure 2a, et la répartition moyenne des niveaux de ploïdie des fruits de cette population est indiqué en Figure 2b. Le pic du niveau 2 C étant faible et plus ou moins masqué par le bruit de fond, nous avons fait le choix de ne pas le quantifier afin de ne pas biaiser l'estimation de la ploïdie moyenne, qui avoisine 20 C au sein de la population témoin. Cependant, les valeurs de ploïdie moyenne des 55 fruits témoins analysés montrent une forte variabilité, puisqu'elles varient entre 12 et 32 C (Figure 3). Nous avons ensuite comparé la taille du fruit (diamètre ou poids) avec son niveau de ploïdie moyen. Aucune corrélation significative n'a été observée (Figures 4 et 5).



**Figure 3.** Distribution des valeurs de ploïdie moyenne de la population témoin, variété Micro-Tom, génération A. La fréquence d'apparition de chaque classe de ploïdie moyenne est indiquée en ordonnées (en %). Les classes de ploïdie moyenne (MCV) sont indiquées en abscisses. L'intervalle de confiance à environ 95% (94,3%) de la distribution des valeurs de ploïdie moyenne est représenté par l'accolade en rouge.



**Figure 4.** Diamètre du fruit en fonction du niveau de ploïdie moyen au sein de la population témoin, variété Micro-Tom, génération A. Le diamètre (en mm) est indiqué en ordonnée contre le niveau de ploïdie moyen (MCV) en abscisses.



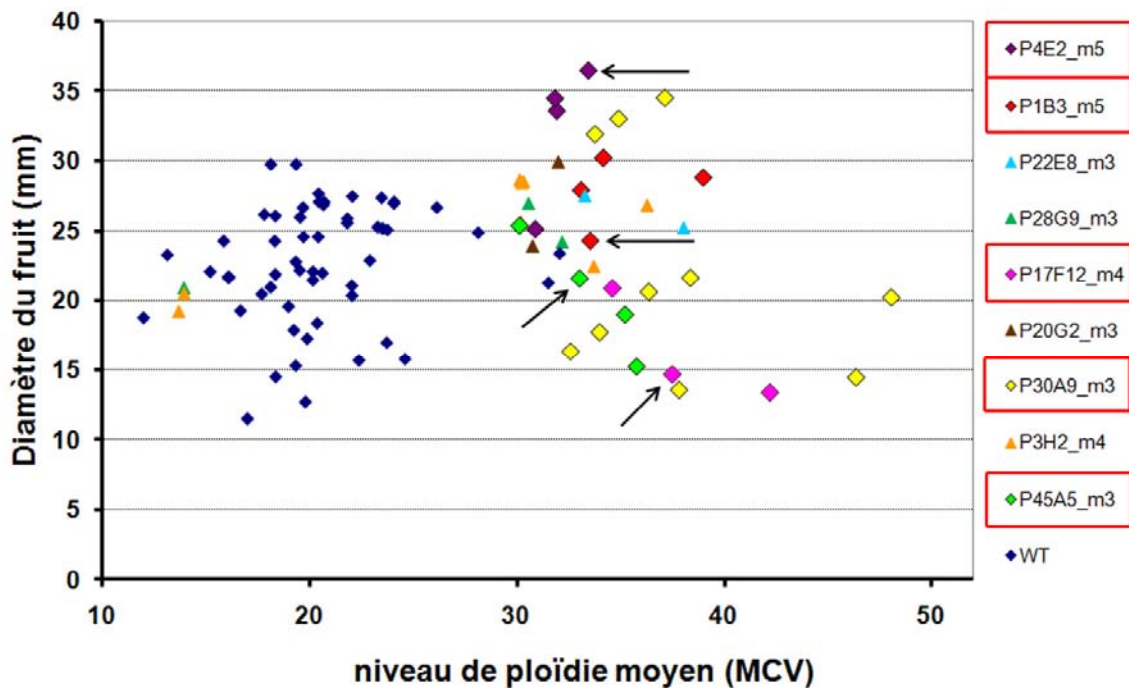
**Figure 5.** Poids du fruit en fonction du niveau de ploïdie moyen au sein de la population témoin, variété Micro-Tom, génération A. Le poids (en g) est indiqué en ordonnée contre le niveau de ploïdie moyen (MCV) en abscisses.

### Identification des familles affectées dans l'endoréduplication

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les familles de mutants présentant un niveau de ploïdie moyen du fruit significativement différent de celui des fruits de la lignée sauvage. Nous avons pris en compte le pourcentage d'apparition par famille de valeurs significativement différentes de la population témoin. Comme les génotypes et la répartition des phénotypes ne sont pas homogènes au sein de chaque famille de mutants, nous avons aussi pris en compte les valeurs individuelles différant significativement de la répartition des ploïdies moyennes de la population témoin. Pour ce faire, nous avons mis en place un filtre simple basé sur la distribution de la population témoin (Figure 3). L'intervalle de confiance à 95 % de la population témoin est délimité approximativement par les bornes de ploïdie moyenne 15 C et 30 C. Une valeur est alors jugée significativement différente de la population témoin si elle se situe hors de ces bornes. Nous avons choisi de ne retenir que les familles ayant au moins 25 % de leur effectif présentant des valeurs en dehors de ces



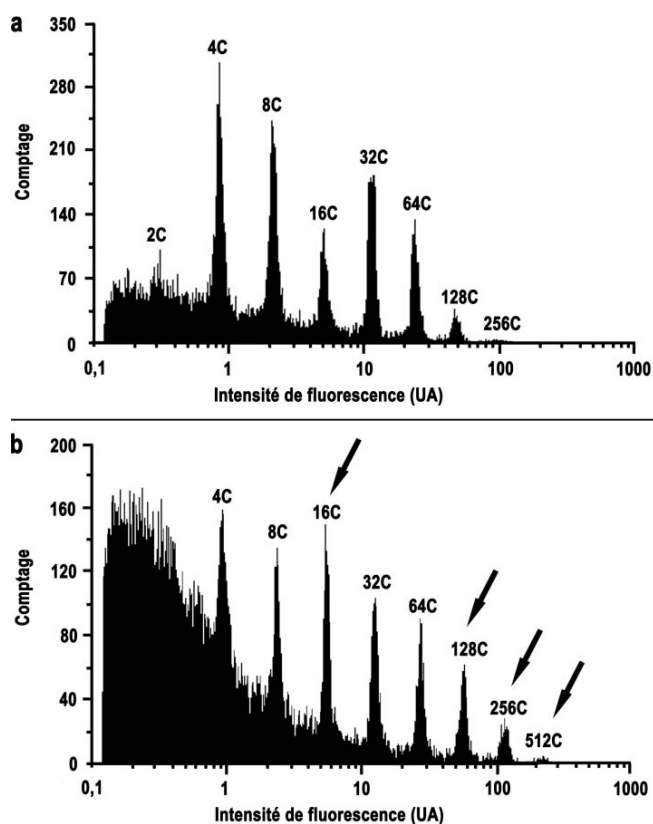
bornes. Sur les 62 familles analysées, 9 correspondaient à ces critères (Figure 6). Parmi celles-ci, la famille P30A9 est de loin la plus représentée puisqu'elle comporte 10 plantes avec des fruits de ploïdie moyenne plus élevée que la population sauvage, dont deux plantes donnant chacune un fruit de ploïdie moyenne très élevée, d'environ 50 C. (Figure 6). Le cytogramme d'un de ces deux fruits est représenté en Figure 7b en comparaison d'un témoin (Figure 7a). On remarque ici une forte proportion des noyaux 16 C par rapport au témoin, mais aussi une forte proportion de 128 C, ainsi que l'apparition des niveaux 256 C (quasi inexistant chez le sauvage) et 512 C.



**Figure 6.** Choix des familles présentant des valeurs de ploïdies moyennes significativement altérées. Le diamètre du fruit (en mm) est représenté en ordonnées. Le niveau de ploïdie moyen (MCV) est représenté en abscisses. Sont représentés sur le graphe les 9 familles ayant montré plus de 25% de leur effectif en dehors des bornes de ploïdie moyenne ( $MCV < 15$  ou  $MCV > 30$ ), hormis pour la population témoin (sauvage). Les 5 familles semées pour confirmation en génération B sont encadrées en rouge dans la légende. Les plantes utilisées pour le semis de génération B sont indiquées par des flèches, hormis pour la famille P30A9 ou les graines issues de plusieurs plantes ont été semées en génération B.

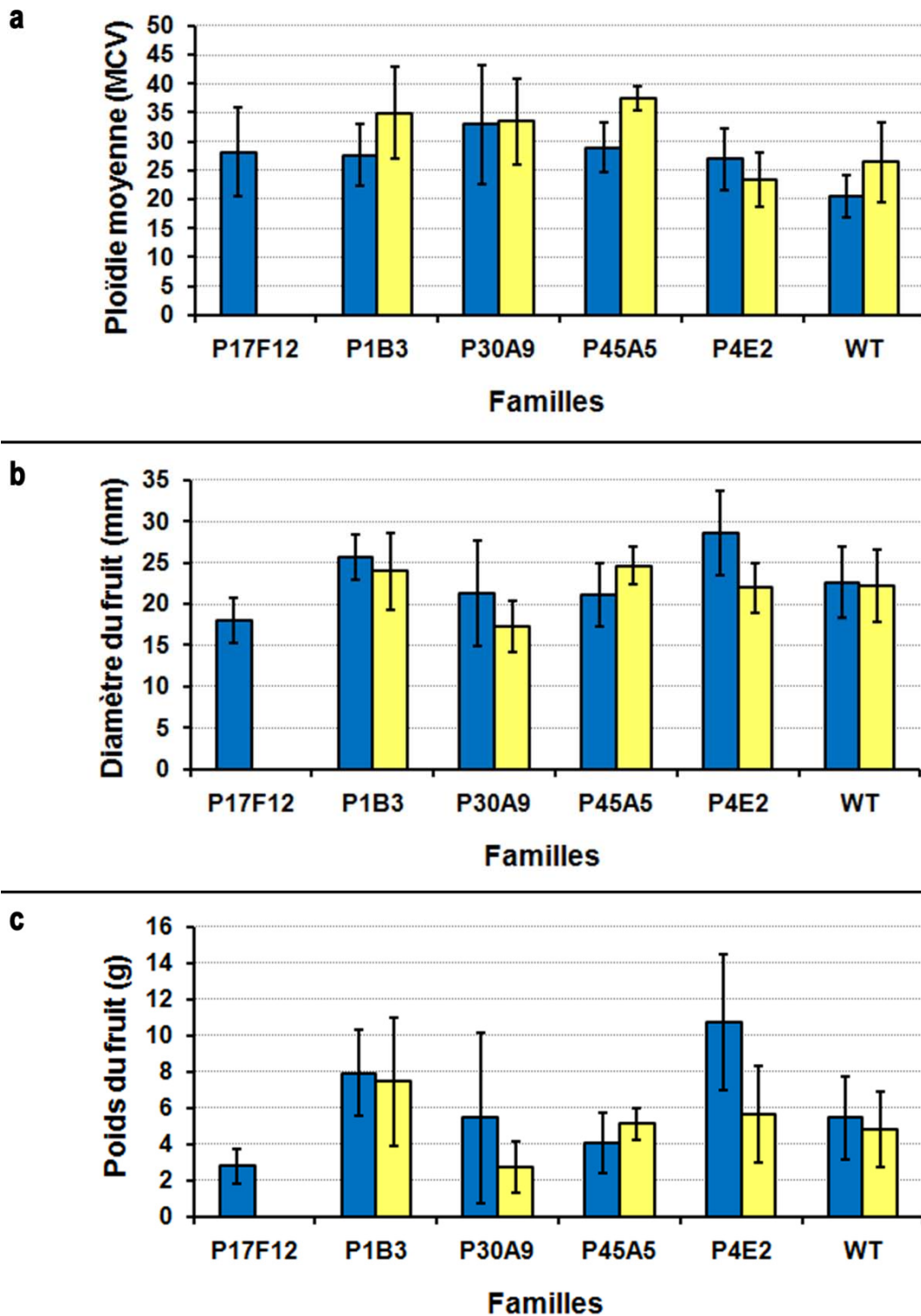
Nous avons voulu confirmer lors d'une nouvelle génération (génération B) le phénotype des familles jugées les plus intéressantes. Pour ce faire, nous avons

semé les graines des plantes ayant présenté les phénotypes de ploïdie les plus marqués. Malheureusement en ce qui concerne la famille P30A9 les fruits des plantes présentant les plus forts niveaux de ploïdie possédaient très peu de graines, voire aucune et nous n'avons pu générer la descendance que d'une partie des plantes, ayant présenté en génération A des niveaux de ploïdie remarquables. Outre P30A9, 4 autres familles parmi les 9 retenues en génération A ont été utilisées pour confirmation en génération B : P1B3, P45A5, P17F12 et P4E2 (encadrées en rouge dans la légende de la Figure 6). Le choix de ces 4 familles a été fondé sur l'existence dans la génération A d'un nombre relativement élevé de fruits présentant un fort niveau de ploïdie (P1B3, P45A5 et P17F12) et/ou une taille plus élevée (P4E2). Pour ces familles, seules ont été semées les graines de la plante jugée la plus intéressante, tel qu'indiqué par des flèches sur la Figure 6.

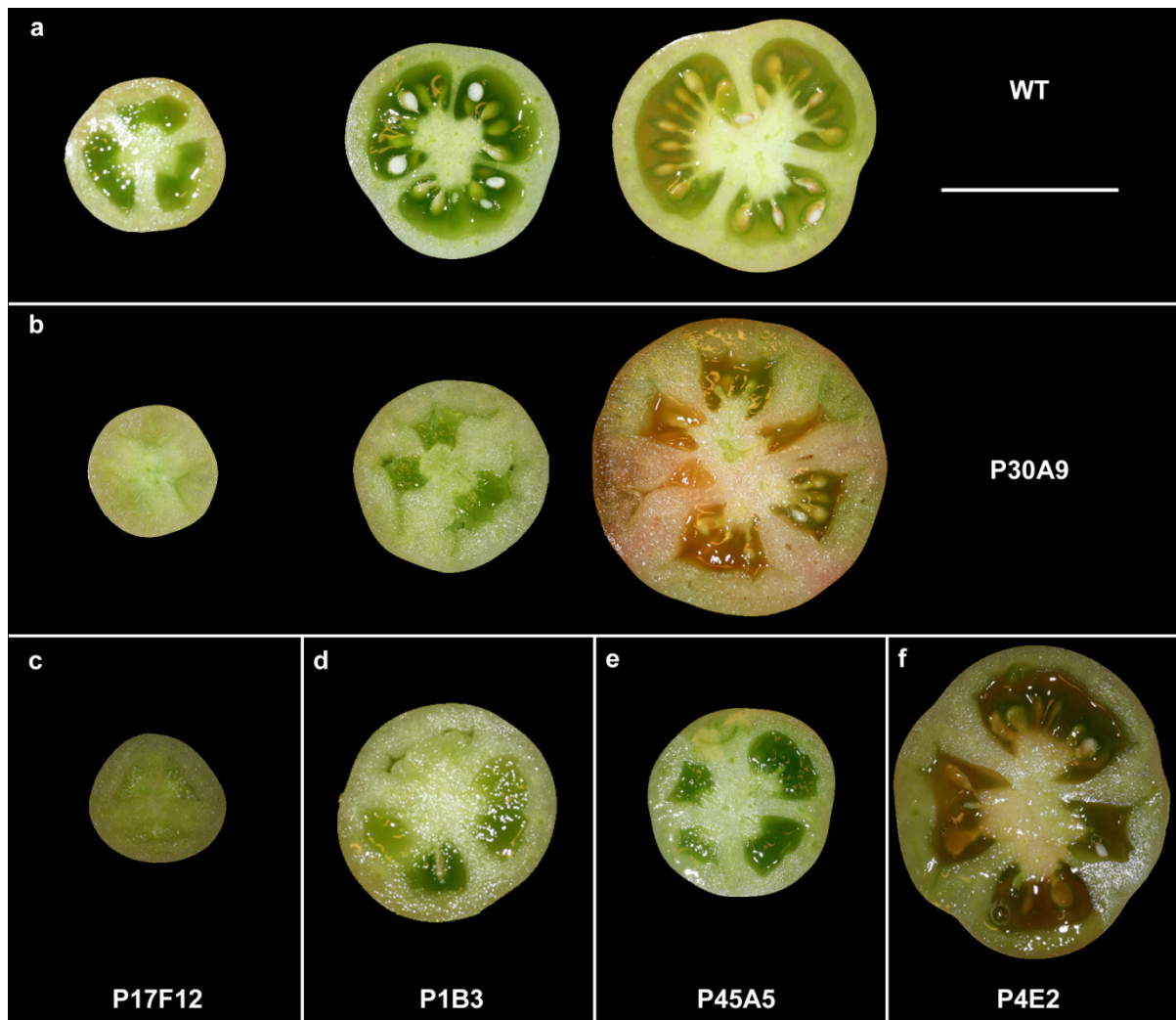


**Figure 7.** Exemple de cytochrome d'un péricarpe de fruit (P30A9) présentant une ploïdie moyenne significativement altérée en comparaison d'un péricarpe de fruit témoin. En ordonnées sont mentionnés le nombre d'objets (noyaux) comptés et en abscisses l'intensité de fluorescence en unités arbitraires (UA). Les niveaux de ploïdie sont indiqués au dessus de chaque pic. **(a)**, Cytogramme représentatif de la population témoin, variété Microtom, au stade breaker. **(b)**, Cytogramme présentant des niveaux de ploïdie très élevés, provenant de la famille P30A9 au stade breaker. Les pics remarquables sont indiqués par des flèches.

Chaque donnée de la génération B a été comparée à son équivalent au sein de la génération précédente et vis-à-vis d'un témoin (var. Micro-Tom « sauvage ») de la même culture (Figure 8). Aucune donnée n'a pu être recueillie en génération B pour la famille P17F12 en raison d'un problème de germination. La famille P4E2 ne confirme pas en génération B sa taille plus importante du fruit. Les 3 familles P30A9, P1B3 et P45A5 confirment par contre en génération B un phénotype de ploïdie moyenne élevée, supérieure à 30 C, le résultat le plus robuste en termes statistiques étant celui de la famille P30A9 du fait du nombre important de plantes semées (89). On notera aussi la hausse significative de la ploïdie moyenne de la lignée sauvage lors de la culture B, passant de 20 C à 26 C, avec une distribution plus étalée sans doute due à un effectif moindre (18 plantes contre 56 en génération A) (Figure 8a). En ce qui concerne le diamètre et le poids du fruit, la lignée sauvage apparaît homogène entre les deux générations. La famille P1B3 confirme un phénotype de gros fruit, avec un diamètre moyen avoisinant les 25 mm pour les deux générations et un poids moyen approchant les 8 g. Pour la famille P30A9, le phénotype gros fruit parfois retrouvé en première génération (Figure 8b) a disparu et les diamètre et poids moyens des fruits sont significativement inférieurs à ceux du témoin. La famille P45A5 montre un phénotype de ploïdie élevé et un diamètre supérieur à celui du témoin mais ces observations sont à pondérer compte tenu de la faiblesse de l'échantillonnage en génération B (n = 2).



**Figure 8.** Taille du fruit et ploïdie moyenne chez 5 familles de mutants. Ploïdie moyenne (MCV), diamètre et poids moyens pour les 5 familles sélectionnées pour confirmation. La génération A est représentée en bleu, la B en jaune. Ploïdie moyenne (MCV, **a**), Diamètre (en mm, **b**) et Poids (en g, **c**) sont représentés en ordonnées. Les familles sont représentées en abscisses.



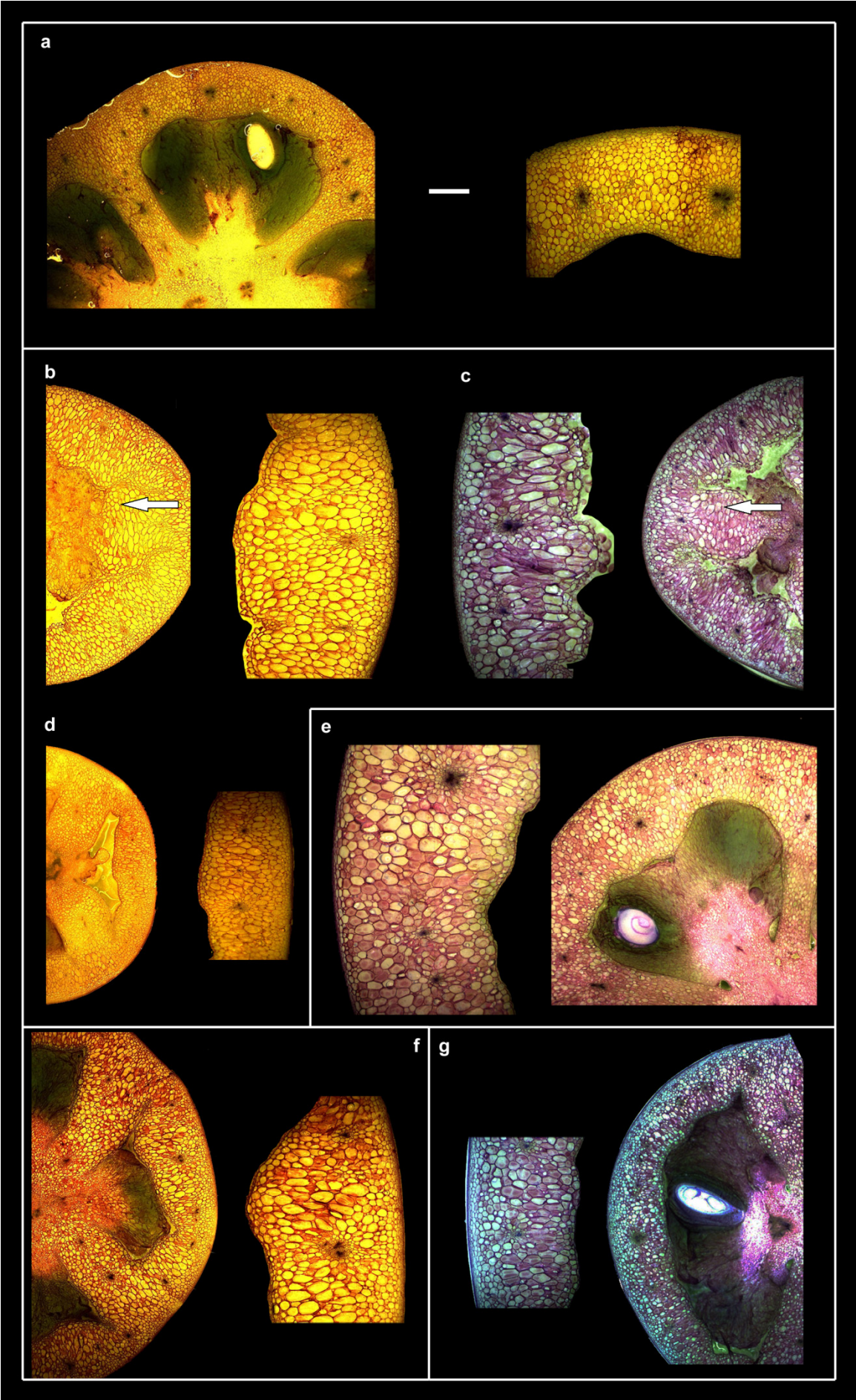
**Figure 9.** Structure des demi-fruits de génération A. **(a)**, demi- fruits de plantes sauvages (WT) ; 3 exemples sont représentés pour illustrer la variabilité de taille des fruits du témoin. **(b)**, demi- fruits de plantes de la famille P30A9 ; 3 exemples de fruits fortement polyploïdes sont représentées. **(c),(d),(e)** et **(f)** demi- fruits de plantes des familles :respectivement P17F12, P1B3, P45A5, P4E2. Echelle : 20 mm.

### Morphologie des fruits des lignées affectées dans l'endoréduplication

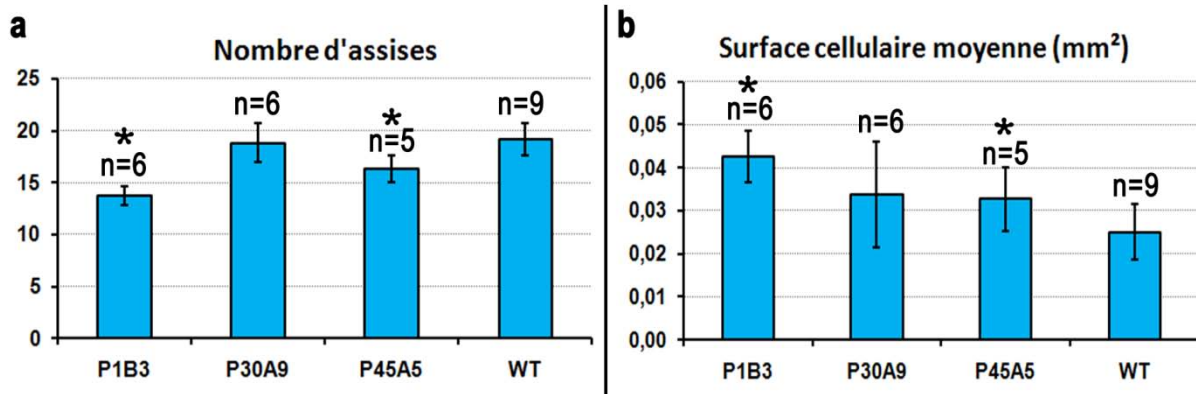
Nous avons comparé la morphologie des fruits des lignées remarquables avec celle des fruits témoins (Figure 9). Sur un petit nombre de fruits des images du péricarpe coloré au bleu de toluidine ont été acquises afin d'analyser la morphologie du péricarpe au niveau cellulaire (Figures 9 et 10). Bien que l'ensemble des images n'ait pu être analysé de façon quantitative, certaines observations peuvent être

dégagées de ces deux types d'images. Les fruits de la famille P30A9 (Figure 9b et 10b, c, d) présentent un phénotype fréquent de parthénocarpie (absence de graines), associé à une absence de gel loculaire, une taille réduite du fruit mais une hypertrophie relative du péricarpe et particulièrement des septa (cloisons entre les loges carpellaires). Les cellules du péricarpe sont plus allongées, en particulier dans le mésocarpe interne, que celles des fruits témoins. Cette observation concerne aussi les cellules des septa, qui ont un plan d'élongation différent de celui du témoin (Figure 10, flèches). Les mesures effectuées sur les images de quelques demi-fruits révèlent un nombre d'assises équivalent à celui du témoin mais une taille cellulaire sensiblement plus élevée (Figure 11a et 11b). Cependant, compte tenu du faible échantillonnage, la différence ne s'est pas révélée significative (Mann & Whitney,  $\alpha = 2,5\%$ ). On notera tout de même que la surface cellulaire moyenne d'un des fruits les plus affectés ( $mCV \approx 50$ ) représente le double de la moyenne du témoin (environ  $0,05 \text{ mm}^2$  contre  $0,025 \text{ mm}^2$ , donnée non montrée). La famille P1B3 (Figures 9d et 10e) semble quant à elle présenter un phénotype de fruit plus normal et se distingue du témoin essentiellement par l'épaisseur plus grande de son péricarpe (septa compris). Les mesures réalisées montrent un nombre d'assises plus faible que dans les témoins et une taille cellulaire moyenne plus élevée (Figure 11a et 11b)). Dans les familles P45A5 et P4E2 les fruits se distinguent peu en moyenne des fruits témoins. La présence parfois observée de cellules allongées dans le mésocarpe interne semble associée à une réduction du nombre de graines dans la loge concernée. Ce phénomène peut également être observé chez le témoin. On notera cependant un nombre d'assises cellulaires plus faibles et une taille cellulaire moyenne plus élevée chez les 2 fruits mesurés.





**Figure 10. (page précédente)** Phénotype cellulaire des fruits des familles sélectionnées pour confirmation après marquage au bleu de toluidine. Pour chaque demi-fruit, un agrandissement d'un morceau de péricarpe est représenté. **(a)**, Sauvage (WT). **(b)**, **(c)**, **(d)**, P30A9, générations A, B, A, respectivement. Les flèches pointent le plan d'allongement cellulaire altéré au niveau des septa. **(e)**, P1B3 génération B. **(f)**, P45A5 génération A. **(g)**, P4E2 génération A. Echelle : 2 mm pour les demi-fruits et 1mm pour les agrandissements de péricarpe.



**Figure 11.** Caractérisation cellulaire des fruits des familles P1B3, P30A9 et P45A5. Analyse du nombre d'assises cellulaires et surfaces cellulaires moyennes des péricarpes des différentes familles en comparaison du témoin. Le nombre d'assises **(a)** et la surface cellulaire moyenne (mm<sup>2</sup>, **b**) sont indiqués en ordonnées. Les familles sont représentées en abscisses. Les étoiles représentent une distribution significativement différente du témoin (Mann & Whitney,  $\alpha = 2,5\%$ ).

## DISCUSSION

### Variabilité de la population sauvage

Nous avons été confronté dans cette étude à une forte variabilité de la population témoin en terme de taille de fruit et de niveau de ploïdie (du simple au double pour chacun de ces deux paramètres chez le sauvage), et ce malgré un prélèvement systématique du premier fruit de chaque plante et à stade physiologique équivalent (breaker). Cette observation impose alors d'effectuer des cribles assez stringents pour isoler des familles présentant des critères significativement affectés. Il apparaît que la question des conditions de culture à adopter dans de telles études, compte tenu de la variabilité observée, doit être considérée avec le plus grand soin. En effet,



nous pensons qu'une partie de la variabilité observée pourrait être due à certaines conditions culturales. Tout d'abord, les plants étaient cultivés dans des pots relativement petits, pour permettre une forte densité de plantes. Cette contrainte retentit sur la croissance et est susceptible d'induire de la variabilité. De plus, la densité des plantes n'a pas été la même à chaque endroit de la table de culture durant la génération A, le taux de germination n'étant pas homogène partout. En effet, ce taux va dépendre principalement des familles mises en culture et de leur capacité à germer en fonction des mutations qu'elles portent, potentiellement létales ou délétères pour une bonne germination en terre. Par conséquent, certaines plantes se sont retrouvées en environnement plus confiné que d'autres, environnement qui a pu favoriser la survenue de plusieurs attaques d'oïdium en augmentant localement le taux d'humidité. Ensuite, on sait que le bon développement du fruit dépend du taux de fécondation des ovules. Or, pour cela, les fleurs doivent être « vibrées » efficacement à la date optimale, point difficile à réaliser à l'échelle d'une telle culture. Enfin, nous ajouterons à cela, que Micro-Tom, contrairement à d'autres variétés de tomate (ex : WVA106, utilisée dans les autres parties de la thèse), ne forme pas de grappes bien déterminées de fleurs. Conséquemment, le nombre de fleurs varie d'une plante à l'autre (et ce au sein d'une même famille), conduisant à l'établissement d'une charge en fruits différentes d'une plante à l'autre et donc potentiellement à de grosses variations quant à la taille finale du premier fruit. En ce sens, il aurait été préférable de limiter le nombre de fleurs par fruits, comme suggéré par (Serrani, *et al.* 2007).

## **Etude corrélative des paramètres mesurés pour l'ensemble de la génération A**

Contrairement aux résultats obtenus au sein de plusieurs lignées de tomate (Cheniclet, *et al.* 2005), présentant une diversité génétique notable, nous n'avons pas observé de corrélation positive significative entre les paramètres mesurés (ploïdie, diamètre, poids du fruit) ni à l'échelle de la population sauvage ni à celle des populations mutantes sélectionnées. Ceci pointe le fait que l'endoréduplication n'est qu'un des multiples paramètres biologiques pouvant influencer sur la croissance et la taille finale du fruit. En conséquence, son effet strict peut être, à l'échelle d'une population mutante, difficilement discernable compte tenu du nombre de gènes potentiellement affectés au sein de la banque et des variations environnementales évoquées plus haut. En revanche, le fait de n'avoir identifié aucune lignée mutante significativement et négativement affectée dans ses niveaux d'endopolyploïdisation serait en faveur d'un caractère obligatoire de ce mécanisme lors du développement du fruit. Il faut aussi relativiser cette hypothèse du fait que notre échantillonnage ne comportait que 13 familles annotées pour le caractère « petits fruits », susceptible d'être associé à une faible endoréduplication.

### **Identification de lignées faiblement affectées dans le phénomène d'endoréduplication**

Notre objectif initial était de détecter des lignées drastiquement affectées dans la mise en place de l'endopolyploïdisation, c'est-à-dire présentant au moins une ou deux classes de ploïdie de plus ou de moins par rapport à celles existant chez le sauvage. Cet objectif n'a pas été entièrement rempli dans la mesure où les lignées les plus affectées comportaient au maximum un niveau de ploïdie supplémentaire (256 C), à l'exception de rares fruits montrant également un faible pourcentage de

noyaux à 512 C (Figure 7). Le fait que nous n'ayons pas trouvé de lignée très affectée pour l'endoreduplication dans notre échantillonnage de 62 familles ne prouve pas que de telles lignées n'existent pas parmi les 3000 familles de la collection. Les critères retenus pour le choix des familles à tester (taille du fruit et du péricarpe) n'ayant pas permis de détecter de fortes variations de ploïdie, on peut envisager que de telles variations existent en l'absence de phénotype morphologique notable au niveau du fruit. En effet, nous avons choisi comme familles à semer celles présentant un phénotype liée à une croissance modifiée (gros fruits, petits fruits, péricarpe épais), nous basant donc sur l'a priori que les familles présentant une croissance modifiée auraient plus de chances de montrer une variation de ploïdie moyenne. Or, s'il est vrai que la mise en place de l'endopolyploïdisation est très souvent associée aux phénomènes de croissance dans la littérature (John and Qi 2008, Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003), des découplages entre ces deux phénomènes ont déjà été observé (Leiva-Neto *et al.*, 2004 ; Nafati, 2011 *et al.*, sous presse). En ce sens, effectuer un criblage de familles non associées à la croissance du fruit aurait peut-être été plus fructueux pour isoler une lignée affectée de manière importante dans niveau moyen d'endopolyploïdisation. Cependant, les moyens humains et la place en serre étant limités, effectuer un choix de familles parmi la banque de mutants était nécessaire. Il convient aussi de redéfinir ce qui pourrait être un niveau de ploïdie moyen significativement altéré. En effet, les variations de ploïdie dont il est fait état dans la littérature dépassent, à notre connaissance, rarement le doublement ou la division par deux de la valeur de la ploïdie moyenne (Leiva-Neto *et al.* 2004). En fait, nous sommes confrontés ici à un mécanisme dépendant de multiples facteurs, à la croisée des chemins entre division, croissance et différenciation. En ce sens, il apparaît presque illusoire de pouvoir isoler des lignées

complètement inhibées dans la mise en place de l'endopolyploïdisation ou présentant au moins deux niveaux de ploïdie supplémentaires.

### **P30A9 : une ploïdie élevée associée à un phénotype partiellement parthénocarpique**

La famille la plus affectée que nous ayons pu identifier (P30A9) présente un phénotype marqué de parthénocarpie. Ceci rend donc difficile d'éventuelles analyses futures dans le cadre de cinétiques de croissance nécessitant un développement d'apparence normal du fruit. En ce sens, la famille qui correspond le plus à ces critères serait P1B3, associant un fruit significativement plus gros, contenant des graines viables et ayant une ploïdie modérément plus élevée, qui semble associée à une réduction du nombre d'assises et une augmentation de la taille cellulaire dans le péricarpe. Nous pouvons cependant émettre quelques hypothèses concernant l'origine du phénotype du fruit P30A9. Il est fait état dans la littérature de plusieurs études dans lesquelles le développement du fruit peut être induit *via* un apport d'hormones exogènes, donnant lieu à la formation de fruits parthénocarpiques (Bünger-Kibler and Bangerth 1982, Serrani, *et al.* 2007). Le phénotype de développement cellulaire observé chez P30A9 ressemble étrangement au phénotype pouvant être observé sur des lignées dont le développement du fruit a été déclenché par un apport exogène de gibbérellines (Bünger-Kibler and Bangerth 1982, Serrani, *et al.* 2007). En effet, le développement des cellules du mésocarpe interne semble affecté de la même manière, présentant une surface plus grande et un allongement cellulaire fortement privilégié dans un seul axe (perpendiculaire à la surface du fruit). En ce sens on pourrait émettre l'hypothèse que la mutation responsable du phénotype observé chez la famille P30A9 provienne d'un métabolisme ou d'une voie de signalisation altérée des gibbérellines. Le phénotype de ploïdie plus marqué

observé ans cette famille serait alors compatible avec l'observation de l'implication des gibbérellines dans le contrôle de l'endopolyploïdie chez *Arabidopsis thaliana* (Gendreau *et al.* 1999).

### **Confirmation de l'augmentation de la taille cellulaire moyenne chez les plantes significativement altérée dans leur niveau de ploïdie moyen**

Malgré le fait que les familles isolées lors de cette étude n'ont pas totalement satisfait nos attentes en termes de variations de ploïdie, nous avons pu lors de cette étude confirmer la relation ploïdie moyenne et taille cellulaire moyenne précédemment relevé dans (Cheniclet, *et al.* 2005) chez trois familles mutantes de la banque tilling Micro-Tom. Ce résultat va donc dans le sens d'une croissance cellulaire favorisée par la mise en place de la ploïdie.

Nous avons pu lors de ce travail isoler plusieurs familles de mutants affectées dans leur niveau de ploïdie moyen. Cependant, les phénotypes les plus marqués relevés chez une famille (P30A9) ont été associés à la présence de parthénocarpie. Cette observation, couplée à la présence de phénotypes moins marqués au sein des autres familles isolées, a donc constitué un frein à la poursuite de cette étude.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Conditions de culture**

#### **Génération A:**

Dix-huit graines de chacune des 62 familles sélectionnées ont été semées et cultivées en petites alvéoles (environ 6 cm de diamètre) dans du terreau Agrofino® (Peltracom) avec un arrosage en sub-irrigation 2 fois par semaine avec une solution nutritive à pH 5,8 (KNO<sub>3</sub> 3,5 mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6 mM,

MgSO<sub>4</sub> 2 mM) jusqu'à la mise à fruit. Par la suite, la fréquence d'arrosage reste identique mais la solution nutritive est composée de KNO<sub>3</sub> 4 mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM. Nous avons ajouté 4 lignes de 18 graines de plantes sauvages réparties uniformément au sein de la culture afin d'éprouver d'éventuels effets positions sur la table de culture. Les semis ont été réalisés le 07 février 2008 et les fruits récoltés au stade breaker entre le 14 avril et le 23 mai. Le taux moyen de germination de toute la table de culture a été de 64%.

### Génération B:

La famille P30A9 ayant révélé les phénotypes les plus contrastés en terme de ploïdie moyenne, jusqu'à 18 graines produites par chaque plante intéressante de la génération A (en fonction du nombre de graines disponibles) ont été semées. Pour les 4 autres familles sélectionnées (cf résultats), jusqu'à 12 graines produites par la plante la plus intéressante ont été semées. 21 plantes sauvages ont été réparties à trois endroits différents dans la table de culture. Les conditions de culture pour la génération B ont été volontairement choisies plus favorables afin que chaque plante puisse avoir une croissance moins contrainte. Pour ce faire des pots carrés de 9x9 cm de côté ont été utilisés avec un espacement entre les plantes plus important (environ 4 cm). Le terreau, les conditions d'éclairage et les solutions nutritives ont été les mêmes que pour la génération A. Le taux moyen de germination de toute la table de culture a été de 70%.

### **Confirmation du phénotype morphologique**

Compte tenu du grand nombre de plantes (760 germées), nous avons choisi d'analyser la ploïdie uniquement des fruits correspondant au phénotype de taille attendu selon nos critères de présélection des familles (480 plantes). Le diamètre

moyen des fruits sauvages de Micro-Tom varie de 20 à 24 mm environ (D. Just, communication personnelle). Nous avons donc sélectionné les fruits à analyser par cytométrie comme suit :

- petit fruit : diamètre inférieur à 20 mm.

- gros fruit : diamètre supérieur à 24 mm.

- péricarpe épais : tous les fruits ont été analysés puisque nous ne pouvions avoir a priori de l'épaisseur du péricarpe avant ouverture du fruit. De plus le caractère épaisseur du péricarpe constitue une valeur relative (surface du péricarpe sur surface du fruit) qu'il aurait été difficile de mesurer avant chaque analyse cytométrique.

### **Récolte et photographie des fruits**

Les fruits ont été récoltés au stade breaker. Chaque fruit à analyser a été mesuré selon son grand diamètre, pesé, et photographié à l'aide d'un appareil Canon EOS 400D, entier puis coupé en deux.

### **Cytométrie en flux.**

Un morceau de péricarpe de chaque loge carpellaire au niveau équatorial du fruit a été prélevé afin que l'analyse cytométrique reflète au mieux les différentes parties du péricarpe du fruit. Ces fragments ont été hachés à l'aide d'une lame de rasoir dans 1 mL de tampon CyStain® UV ploidy (Partec, Münster, Allemagne). Le produit du hachage est ensuite filtré sur une maille en nylon de 100 µm et analysé à l'aide d'un cytomètre en flux PAS-II flow (Partec, Münster, Allemagne). Les analyses quantitatives des histogrammes de ploïdie ont été réalisées grâce au logiciel DPAC (Partec, Münster, Allemagne) et grâce à une macro développée sur le logiciel

d'analyse d'images ImagePro Plus 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, EU). La ploïdie moyenne de chaque histogramme de ploïdie a été calculée selon la somme de toutes les « C-value » pondérées par leur fréquence respective.

### **Analyse phénotypique des fruits à la loupe binoculaire**

L'analyse des demi-fruits a été réalisé après 1 minute de marquage dans une solution de 0,04% de bleu de toluidine dans 0,1 M de tampon phosphate. Les demi-fruits ont alors été rapidement rincés à l'eau et observés sous un stéréomicroscope MZLeica FLIII. Les images ont été acquises avec une caméra couleur Leica DC300F. Le nombre d'assises par fruit est déterminé visuellement dans 3 loges carpellaires différentes. Les analyses de taille cellulaire moyenne ont été réalisé grâce au logiciel d'analyse d'images ImagePro Plus 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, EU) sur 3 loges carpellaires différentes pour chaque fruit analysé.

### **REFERENCES**

- Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C. and Rothan, C.** (2006) The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 961-970.
- Barow, M.** (2006) Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, **28**, 271-281.
- Barow, M. and Meister, A.** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell and Environment*, **26**, 571-584.
- Bergervoet, J.H.W., Berhoeven, H.A., Gilissen, L.J.W. and Bino, R.J.** (1996) High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Science*, **116**, 141-145.
- Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. In *Progress in Botany 71*, pp. 101-132.



- Bünger-Kibler, S. and Bangerth, F.** (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, **1**, 143-154.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.*, **139**, 1984-1994.
- D'Amato, F.** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. *Johri, BM (ed) . Embryology of angiosperms . Springer, New York*, 519-566.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R. and Knapp, S.** (1991) Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Name: Plant Physiology; (United States); Journal Volume: 96:3, Medium: X; Size: Pages: 985-989.*
- Gendreau, E., Orbovic, V., Höfte, H. and Traas, J.** (1999) Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Planta*, **209**, 513-516.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M. and Hofte, H.** (1997) Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **114**, 295-305.
- John, P.C.L. and Qi, R.** (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends in Plant Science*, **13**, 121-127.
- Leiva-Neto, J.T., Grafi, G., Sabelli, P.A., Dante, R.A., Woo, Y.-m., Maddock, S., Gordon-Kamm, W.J. and Larkins, B.A.** (2004) A Dominant Negative Mutant of Cyclin-Dependent Kinase A Reduces Endoreduplication but Not Cell Size or Gene Expression in Maize Endosperm. *Plant Cell*, **16**, 1854-1869.
- Nafati, M., Cheniclet, C., Hernould, M., Do, P.T., Fernie, A., Chevalier, C., Gévaudant, F.** (2011) The specific overexpression of a Cyclin Dependent Kinase Inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant J.*, in press.
- Nagl, W.** (1975) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature, UK*, **261**, 614-615.

**Serrani, J., Fos, M., Atarés, A. and García-Martínez, J.** (2007) Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 211-221.

**Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 544-553.

# **CHAPITRE 3 : DISCUSSION - CONCLUSION**

## **1. Contexte et problématique**

Nous avons souligné dans ce travail la grande représentation du phénomène d'endopolyploïdisation chez les eucaryotes. Chez les plantes, ce phénomène semble tellement répandu (D'Amato 1984, Joubès and Chevalier 2000, Nagl 1975) que cette observation légitime à elle seule l'intérêt que nous pouvons porter à son implication lors du développement. Dans la littérature, ce phénomène est majoritairement associé à la croissance cellulaire (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003) et à la différenciation (Bramsiepe *et al.* 2010, Hulskamp 2004). Il est aussi mis en relation avec le métabolisme :

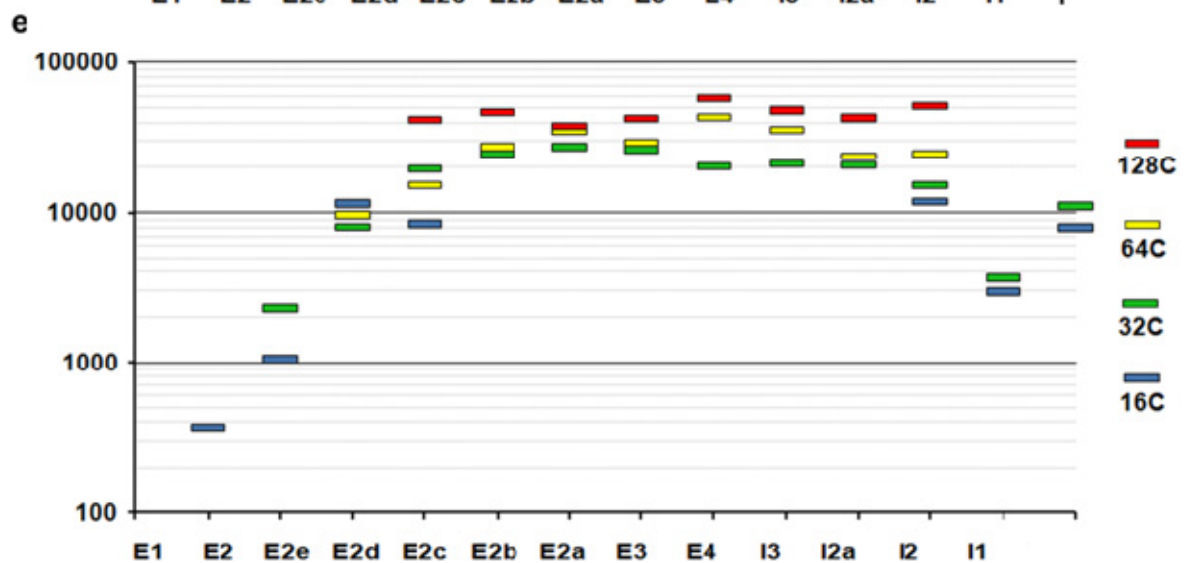
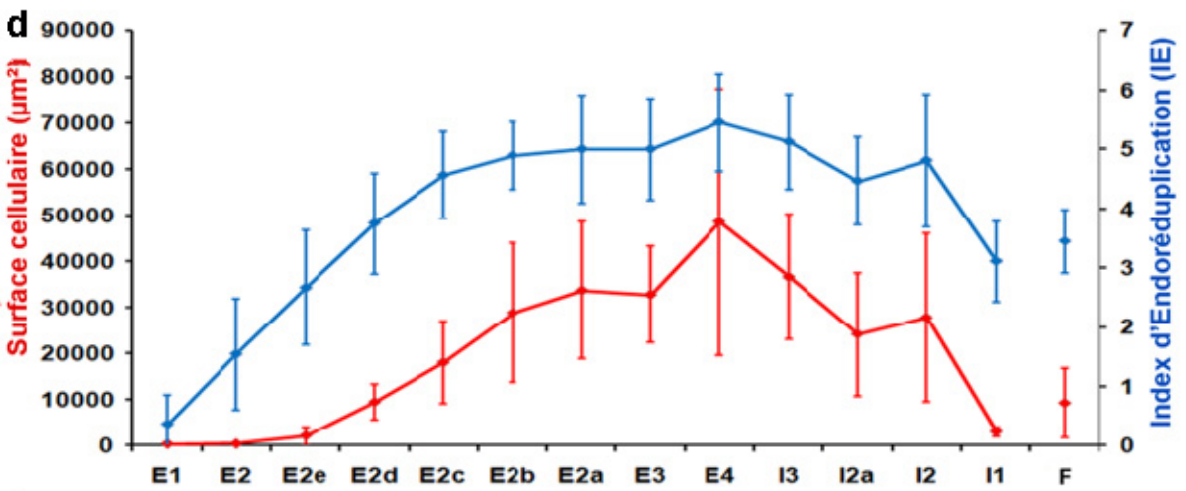
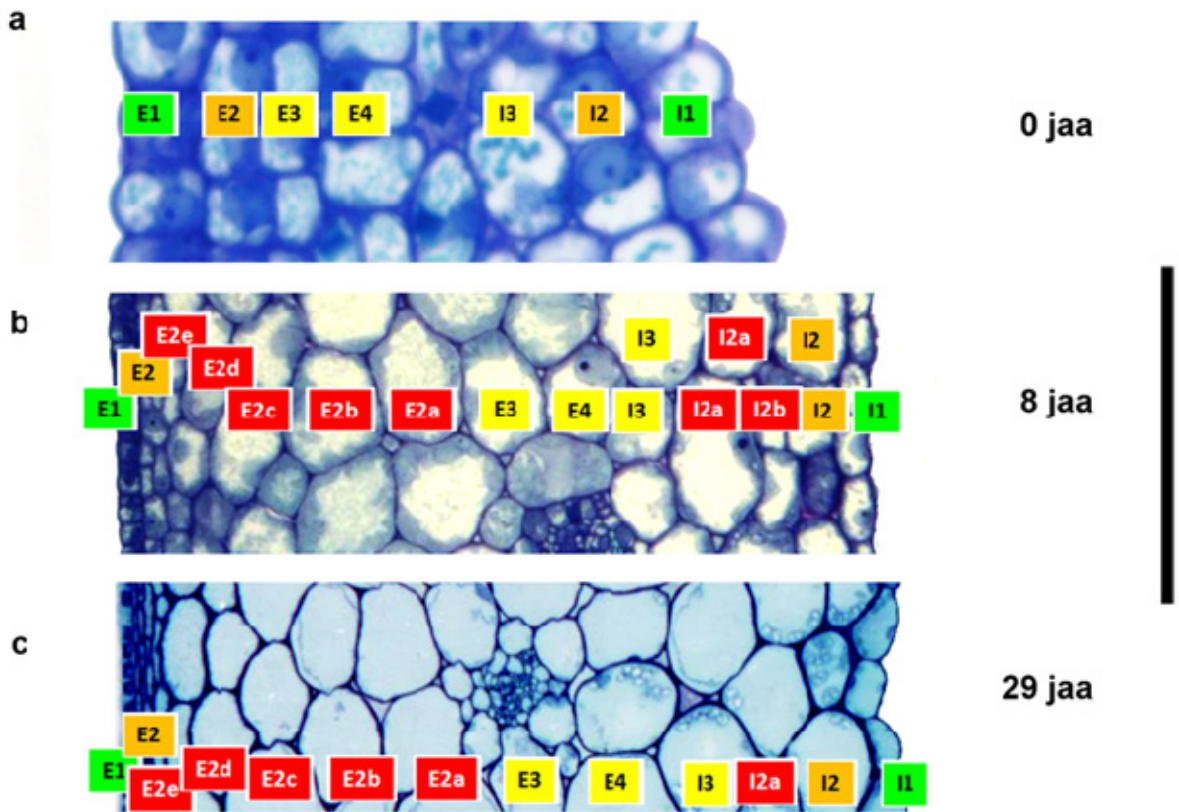
- premièrement de par l'observation de son existence dans un grand nombre de cellules productrices spécialisées ou de soutien à la croissance (cellules des glandes productrices de soie chez *Bombyx mori* (D'Amato and Durante 2001), cellules du trophoblastes chez les mammifères (Zybina and Zybina 1996), cellules du suspenseur de l'embryon des Spermaphytes (Carvalho 2000, D'Amato 1984)).
- deuxièmement par l'hypothèse d'une amplification fonctionnelle du génome (Bourdon *et al.* 2010).

Nous avons aussi mis en avant l'hypothèse de l'influence de l'endopolyploïdie sur la vitesse de croissance dans le fruit (Bourdon, *et al.* 2010), et ce à partir de données chiffrées de durée de croissance de différentes espèces de fruits. Nous avons voulu aller plus loin dans l'étude de l'endopolyploïdie au sein du fruit de tomate, par la description de sa mise en place à l'échelle chromosomique, cellulaire ainsi que sa

distribution tissulaire. Nous avons ainsi apporté une série d'informations nouvelles sur ce phénomène, informations qui devraient permettre de mieux comprendre son incidence sur le fonctionnement cellulaire et, à une échelle plus intégrée, sur la croissance et la différenciation des organes polyploïdes.

## **2. Implication de l'endopolyploïdisation dans la croissance cellulaire**

Dans un premier temps nous avons étudié la relation existant entre ploïdie et taille cellulaire directement à l'échelle de la cellule au sein du péricarpe. Cette analyse a été rendue possible grâce à la mise au point d'un outil de détermination de la ploïdie *in situ* basé sur des méthodes de FISH (Bourdon, article 2, soumis). Cet outil nous a permis de confirmer directement à l'échelle cellulaire la corrélation positive entre niveau de ploïdie et taille cellulaire précédemment observée à l'échelle tissulaire (Cheniclet *et al.* 2005). De plus, ce résultat a pu être confirmé lors du criblage de la banque de mutants Micro-Tom. En effet, 3 des familles de mutants isolées lors du criblage et arborant une ploïdie moyenne plus élevée ont montré une augmentation de leur taille cellulaire moyenne. Cependant, nous avons aussi pu montrer que le niveau de ploïdie ne déterminait pas précisément la taille cellulaire, et que d'autres paramètres tels que l'âge de la cellule et sa position dans le péricarpe semblaient influencer sur l'acquisition d'une taille cellulaire donnée. Malgré tout, le paramètre ploïdie semble affecter le potentiel global de croissance cellulaire, les cellules les plus grandes ayant invariablement les plus hauts niveaux de ploïdie. La méthode de mesure *in situ* de la ploïdie a aussi permis l'établissement d'une cartographie relativement précise des niveaux de ploïdie au sein du péricarpe de tomate.



**Figure 1 (cf page précédente).** Dynamique des divisions périclines au cours du développement du péricarpe de tomate et association avec les phénomènes d'endopolyploïdisation et de croissance cellulaire. **(a)** : péricarpe au stade anthèse (0 jour après anthèse, jaa) ; **(b)** : péricarpe au stade 8 jaa ; **(c)** : péricarpe au stade 29 jaa (vert mature). **(d)** : niveau d'endoréduplication moyen et surface cellulaire moyenne en fonction de l'assise cellulaire ; la surface cellulaire est donnée en  $\mu\text{m}^2$  (axe des ordonnées, en rouge) ; le niveau d'endoréduplication moyen par assise est donné par l'index d'endoréduplication (axe des ordonnées (en bleu)) ; les assises cellulaires sont indiquées en abscisses. **(e)** : Surface cellulaire moyenne en fonction de du niveau de ploïdie (16C à 128C) et de l'assise cellulaire ; la surface cellulaire est donnée en  $\mu\text{m}^2$  (axe des ordonnées) ; les assises cellulaires sont indiquées en abscisses ; les niveaux de ploïdie sont indiqués dans la légende à droite du graphique. F : faisceau vasculaire. Les coupes de péricarpe représentées sont des coupes semi fines incluses en technovit et observées en microscopie optique. Echelle : 0 jaa = 50  $\mu\text{m}$  ; 8 jaa = 200  $\mu\text{m}$  ; 29 jaa = 500  $\mu\text{m}$ .

Cette cartographie, bien que statique puisqu'établie à un unique stade de développement (vert mature, environ 30 jours après anthèse), permet malgré tout d'avancer ci-dessous des hypothèses quant à la mise en place dynamique de l'endopolyploïdisation en relation étroite avec le profil spatio-temporel des divisions cellulaires. Dans la paroi de l'ovaire, environ 7 assises cellulaires sont présentes à l'anthèse (Figure 1a). La fécondation, une fois réalisée, induit le développement du fruit (Gillaspy *et al.* 1993) et le péricarpe subit une première période de croissance à travers de nombreuses divisions cellulaires. Ces divisions ont lieu aussi bien selon les axes anticlinaux (selon le rayon du fruit) que périclinaux (parallèles à la surface du fruit). Lors de cette phase de division, se déroulant principalement durant les 8 premiers jours suivant l'anthèse, le nombre d'assises cellulaires du péricarpe augmente jusqu'à atteindre un nombre compris entre 13 et 16 assises (Figure 1b) via des divisions périclinales, dites histogéniques. Ensuite ces divisions sont presque stoppées durant le reste du développement du fruit, le nombre d'assises restant quasiment constant entre 8 et 29 jours après anthèse (Figure 1c). Il semble que la grande majorité de ces nouvelles assises cellulaires proviennent de divisions au sein des assises sous-épidermiques (E2 et I2, Figure 1a et 1b) et particulièrement du sous-épiderme externe (E2) (Cheniclet, *et al.* 2005). En observant les plans de

division à différents stades de développement, nous avons nommé les nouvelles assises formées après l'anthèse en fonction de l'assise dont elles semblent issues et de leur ordre d'apparition chronologique (Figure 1b et 1c). Ainsi, les assises provenant des divisions de la couche sous-épidermique externe (E2) portent les noms E2a, E2b, et ainsi de suite (l'assise E2a étant la première formée), et les assises provenant des divisions de la couche sous-épidermique interne (I2) sont nommées I2a, I2b, etc. Au fur et à mesure de la formation de nouvelles assises, les premières formées sont repoussées vers la partie centrale du mésocarpe. La dynamique de division cellulaire pourrait ainsi expliquer une partie de la répartition des niveaux de ploïdie que nous avons mise en évidence dans ce travail. En effet l'augmentation graduelle du niveau de ploïdie de l'épiderme externe vers le milieu du mésocarpe (E1 à E3/E4, Figure 1d) pourrait s'expliquer par le gradient d'âge des cellules. De plus les cellules sont le siège d'un nombre variable de cycles de divisions avant d'entrer en endocycle (Cheniclet, communication personnelle ; (Bertin *et al.* 2007)), ce qui pourrait expliquer l'hétérogénéité des niveaux de ploïdie observée au sein d'une même assise. Comparons maintenant l'évolution des niveaux de ploïdie en fonction de la taille cellulaire (Figure 1e). Si l'on considère les niveaux de ploïdie 32C entre les assises E2e (néo-formée) et E3 (présente à l'anthèse), la taille cellulaire est beaucoup plus grande en E3 qu'en E2e. Ceci laisserait suggérer que, contrairement aux hypothèses avancées par (John and Qi 2008), la mise en place de l'endoréduplication précéderait la croissance cellulaire, puisqu'à niveau de ploïdie égal, la surface cellulaire est plus grande au sein de l'assise la plus âgée (E3). Le même type de remarque peut être faite en comparant le niveau 16C entre les assises E2e et E2c.

Lorsque l'on considère l'évolution de la ploïdie à partir de l'assise génératrice interne (I2), on s'aperçoit que cette assise présente un niveau de ploïdie moyen beaucoup plus élevé que E2 et avec une hétérogénéité des valeurs. Ceci est en accord avec l'observation que dans I2 les divisions cellulaires sont moins fréquentes et ne concerneraient sans doute pas toutes les cellules de cette assise (C. Cheniclet, communication personnelle).

Par conséquent, plusieurs cellules de cette assise entreraient dès l'anthèse dans l'endocycle (aboutissant à des niveaux élevés de ploïdie au stade vert mature) alors que d'autres se diviseraient une ou deux fois avant d'entrer en endocycle donnant des niveaux moins élevés. Par conséquent, le fait que certaines cellules n'atteignent pas les niveaux de ploïdie les plus élevés durant le développement du péricarpe pourrait être expliqué en grande partie par un délai de transition entre le cycle cellulaire et l'endopolyploïdisation. De plus, (Bünger-Kibler and Bangerth 1982) décrivent les faisceaux vasculaires comme des « centres de division cellulaire ». En accord avec cette observation et notre hypothèse, la zone entourant les faisceaux vasculaires présente des niveaux de ploïdie plus faibles que les cellules adjacentes des mêmes assises (cf. E3, E4, I3 et F, Figure 1d). Il a été aussi montré que certaines cellules de la partie centrale du mésocarpe entrent en division cellulaire lors des premiers stades de développement (lors des 15 premiers jaa), selon des plans de division plus ou moins aléatoires (Cheniclet, *et al.* 2005), ce qui pourrait expliquer l'hétérogénéité des niveaux de ploïdie retrouvés au sein de ces assises.

Cependant, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires, et ce à plusieurs stades de développement, afin de comprendre la dynamique précise de mise en place de l'endopolyploïdisation dans le péricarpe de tomate et la transition du cycle cellulaire vers l'endopolyploïdisation. En effet, Nafati *et al.* (2011, sous



presse) ont montré que l'intégration des phénomènes de division et d'endoréduplication pouvait être modélisée à l'échelle du tissu et du fruit au cours du développement. Il sera alors intéressant d'implémenter ces informations avec des données de dynamique de division cellulaire et d'endoréduplication à l'échelle des différentes assises cellulaires du péricarpe. Pour ce faire, il pourrait être envisagé une cartographie dynamique des cellules en division aux premiers stades de développement du fruit, couplé à une cartographie de cellules endopolyploïdisées. Un blocage des cellules en métaphase pourrait être réalisé comme pour les plaques métaphasiques obtenues à partir de racines (Bourdon *et al.*, 2010, soumis), et les échantillons ainsi obtenus seraient utilisés pour étudier la répartition des niveaux de ploïdie comme détaillé dans (Bourdon *et al.*, 2010, soumis). De cette façon une cartographie des cellules en cours de division cellulaire ainsi qu'une cartographie des cellules endopolyploïdisées pourrait être obtenue en même temps.

### **3. Amplification fonctionnelle du génome et profils d'expression associés à l'endopolyploïdisation**

Lors de cette étude nous nous sommes aussi intéressé à l'amplification fonctionnelle du génome durant l'endoréduplication. En effet, c'est une des hypothèses majeures pour expliquer la stratégie de croissance liée à la mise en place de l'endoréduplication. La duplication du génome entraînerait une augmentation proportionnelle du nombre global de transcrits et ainsi du métabolisme général de la cellule polyploïde. Nous avons ainsi obtenu des données allant dans le sens d'une augmentation de la transcription des gènes codant certains ARN ribosomiaux, molécules à l'interface des phénomènes de transcription et de traduction, par leur intégration au sein des ribosomes. Nous avons aussi entrepris

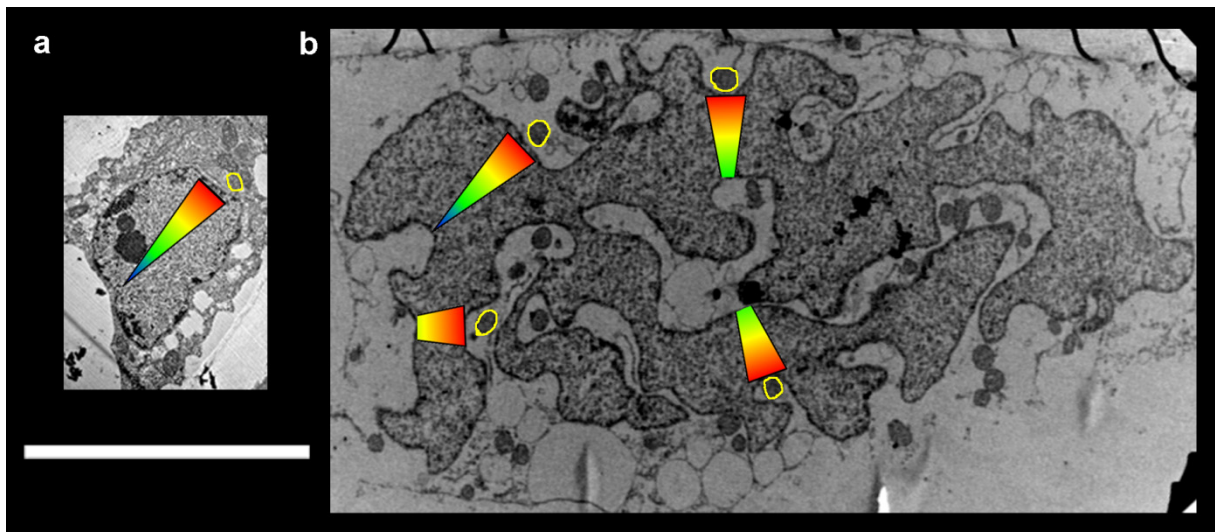
une analyse plus ciblée afin de montrer une amplification fonctionnelle à l'échelle de gènes candidats dupliqués en couplant des méthodes de RNA FISH et de DNA FISH. Brièvement, ce type d'expérimentation consiste à montrer que toutes les copies d'un gène sont dupliquées en co-localisant dans le noyau la position de ses loci (DNA FISH) et des ARNm naissants produits à partir de ces loci (RNA FISH). Cependant, nous avons rencontré des difficultés méthodologiques liées à la réalisation du FISH à l'échelle du gène, que ce soit pour les méthodes de DNA FISH ou de RNA FISH. En effet, les différents essais n'ont pas permis de détecter de signaux fluorescents. Il est à noter qu'à notre connaissance peu de travaux font état de la faisabilité de cette méthode chez les plantes (Wegel and Shaw 2005). Nous envisageons aussi de coupler ces approches qualitatives à des méthodes de quantification des ARNm des candidats choisis en relation avec le niveau de ploïdie. Des études de RT-PCR seront réalisées prochainement à partir de populations de noyaux triés en fonction du niveau de ploïdie. Enfin une étude globale de l'expression des gènes, toujours sur noyaux triés par cytométrie en flux sera aussi réalisée par l'utilisation de la méthode de RNA-Seq (Wang *et al.* 2009). Nous espérons ainsi améliorer notre compréhension de l'amplification fonctionnelle du génome et des profils d'expression mis en place durant l'endoréduplication.

#### **4. Supra-organisation et ergonomie de la cellule endopolyploïde**

En parallèle des hypothèses de la stratégie de croissance *via* une amplification fonctionnelle du génome sont aussi avancées les hypothèses d'économie d'énergie *via* l'endoréduplication. En effet, la cellule endorédupliquée n'ayant plus à effectuer de réorganisations structurales importantes liées à la division cellulaire (répartition du cytoplasme en deux cellules filles, mise en place d'un fuseau mitotique et d'une paroi

intermédiaire), le gain d'énergie résultant serait un des avantages majeurs de l'endoréduplication sur la division cellulaire lors de la croissance de l'organe. En effet, un organe en développement, à taille finale égale, dépenserait à priori moins d'énergie en assurant la croissance d'un nombre limité de grandes cellules polyploïdes qu'en assurant la division et la croissance d'un nombre important de cellules diploïdes (Nagl, 1976). Cependant, on peut aller plus loin dans l'interprétation de l'économie d'énergie *via* l'endoréduplication. En effet, selon l'hypothèse formulé par (Anisimov, 2005), la centralisation des fonctions cellulaires au sein d'une cellule polyploïde et la structuration particulière de ces différentes fonctions conduirait à un meilleure ergonomie de la cellule polyploïde, ce qui pourrait entraîner par la même occasion une économie d'énergie considérable lors du développement cellulaire et tissulaire. Cette hypothèse est donc en accord avec les implications déjà citées de l'endopolyploïdisation dans la croissance et la vitesse de croissance. Cependant aucune donnée à notre connaissance ne fait mention d'une économie d'énergie substantielle *via* une organisation structurale particulière. Or nous avons ici obtenu des indices pouvant aller dans ce sens. Tout d'abord, nous avons montré par l'utilisation de plusieurs sondes utilisées en FISH et du marquage à la chromomycine A3 que l'endopolyploïdisation procédait chez la tomate par endoréduplication, créant ainsi une forme de polyténie. Ce phénomène a pour conséquence principale le regroupement dans l'espace nucléaire de chromatides filles par rattachement au même centromère et pourrait ainsi opérer un maintien des territoires chromosomiques lors de l'endoréduplication. L'influence d'une telle conformation spatiale est inconnue mais nous émettons l'hypothèse que cette proximité des chromatides filles entre elles pourrait améliorer l'efficacité des processus de transcription en cours. En effet, il a récemment été montré que des

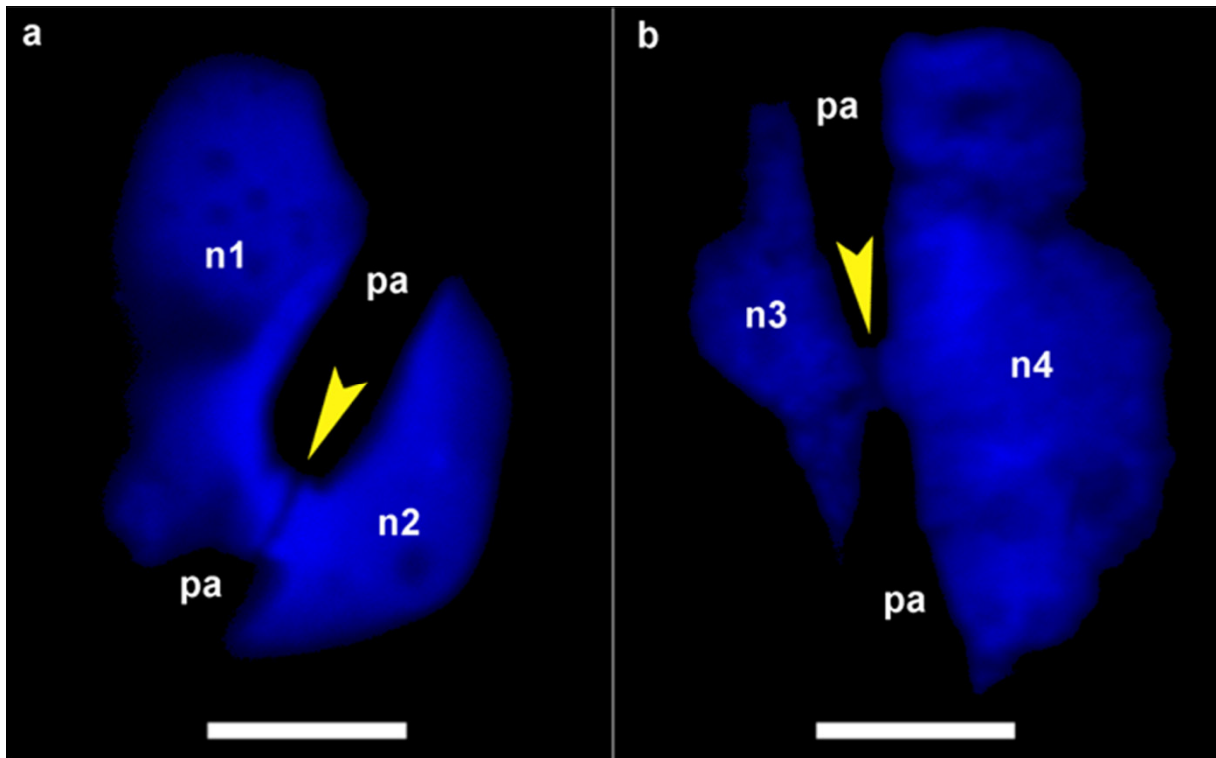
gènes co-régulés pouvaient être préférentiellement acheminés et transcrits au sein d'usines de transcription spécialisées contenant des facteurs de transcription spécifiques (Schoenfelder *et al.* 2010). Dans ce cas, si l'endoréduplication promeut le maintien de territoires chromosomiques, elle pourrait aussi par la même occasion restreindre la localisation de ces usines de transcription spécialisées à certaines zones du noyau, améliorant ainsi l'efficacité de transcription d'un nombre important de gènes dupliqués. Cette hypothèse reste cependant à démontrer.



**Figure 2.** Gradients d'ATP putatifs au sein de noyaux de péricarpe de tomate. a : noyau de l'épiderme (2C, 4C) externe. b : noyau polyploïde (>32C) du mésocarpe. L'évolution de gradients putatifs d'ATP à partir de mitochondries identifiées (entourées en jaune) est représentée en fonction de la distance entre 2 parties de l'enveloppe nucléaire. Echelle : 10µm.

Ensuite, nous avons montré que la présence d'invaginations était liée à la mise en place de l'endoréduplication. Nous avons aussi pu révéler la présence de mitochondries au sein de ces invaginations, argument en faveur d'une forte activité métabolique en lien avec l'endoréduplication. Même si les mesures ne semblent pas montrer une augmentation du nombre de mitochondries par unité de surface

nucléaire, un avantage non négligeable pourrait provenir d'une telle structuration *via* l'augmentation locale de la concentration en ATP au sein des noyaux. En effet, à l'observation des images de microscopie électronique (Figure 2), Il semble que, malgré l'augmentation (considérable) de volume du noyau en fonction de la ploïdie, la distance maximale entre les point situés « au cœur » du noyau et l'enveloppe nucléaire n'augmente pas, voire diminue, avec la ploïdie. On peut alors émettre l'hypothèse que l'ATP produit par les mitochondries pourrait, à coefficient de diffusion égal, se retrouver à des concentrations locales plus élevées, comme illustré dans la Figure 2. En effet, si l'on considère une mitochondrie donnée (entourées en jaune sur la figure), celle-ci va créer un gradient local d'ATP dans son environnement proche. Si la distance entre deux enveloppes diminue, alors la « longueur » du gradient diminue et la valeur minimum du gradient de concentration sera plus élevée. Ce faisant, l'activité biologique du noyau pourrait alors être améliorée, l'efficacité des mécanismes dépendant de l'ATP au sein du noyau étant favorisée. Dans le même ordre d'idée, on peut penser que la formation d'invaginations permet de faciliter l'export des ARNs messagers vers le cytoplasme et d'une manière générale de favoriser tous les échanges entre le noyau et le cytoplasme. De même, on peut alors se demander si le reste du cytoplasme subit une organisation particulière ayant pour conséquence un fonctionnement « facilité » de la cellule.



**Figure 3.** Noyaux du mésocarpe de tomate à proximité d'amincissements de la paroi. **(a)** : deux noyaux distincts (n1 et n2) proches dans l'espace *via* un amincissement de la paroi, vraisemblablement lieu de plasmodesmes. **(b)** : deux noyaux distincts (n3 et n4) proches dans l'espace *via* un amincissement de la paroi, vraisemblablement lieu de plasmodesmes. Les flèches jaunes pointent la jonction entre noyaux. pa : paroi. Echelles : 10 $\mu$ m. Stade : vert mature (30 jaa).

Anisimov (2005) émet aussi l'hypothèse d'une simplification des systèmes récepteurs des cellules et d'échanges entre les cellules. Nous avons pu obtenir quelques indices préliminaires à de telles simplifications. En effet, un petit nombre d'images acquises lors de la cartographie de la ploïdie obtenue par les méthodes de FISH ont révélé une proximité entre certains noyaux polyploïdes et des amincissements de la paroi cellulaire, vraisemblablement lieu de regroupement de plasmodesmes (Figure 3). Une étude systématique de cette proximité doit cependant être entreprise en relation avec le niveau de ploïdie afin de montrer un éventuel lien avec la mise en place de l'endoréduplication chez la tomate. On peut alors se demander pourquoi des cellules mettraient en place un rapprochement de leur noyau

dans l'espace *via* ces zones d'amincissements pariétaux. Malgré tout, cette observation serait en accord avec une communication intercellulaire facilitée *via* une amélioration des échanges symplastiques. Toutes ces observations tendent vers la mise en place d'une cellule à l'organisation et au fonctionnement optimisés. En effet, même si nos observations vont plutôt dans le sens d'un maintien du nombre d'organites par unité de génome ou d'un maintien de la capacité globale d'échange du noyau, on ne peut écarter l'hypothèse que les structurations observées, que ce soit à l'échelle chromosomique, nucléaire ou cellulaire, servent une meilleure ergonomie de la cellule polyploïde. Ce faisant, la mise en place de l'endopolyploïdisation soutiendrait l'hypothèse de l'établissement d'une cellule au rendement, plus élevés. Cependant, la problématique énergétique de la cellule polyploïde reste très peu discutée dans la littérature, et, à notre connaissance, aucune approche expérimentale n'a été tentée en vue d'étudier cette question spécifique. Or, on pourrait imaginer comparer la production d'ATP des mitochondries de cellules polyploïdes de cellules diploïdes en utilisant un compétiteur de l'oxygène en tant qu'accepteur final d'électron produisant une réaction colorée et mesurable par spectrophotométrie (ex : TTC, (Triphényl 2.3.5 tétrazolium chlorure) (Ruf and Brunner 2003)). A ces données pourraient être couplées des analyses cytométriques et des dosages protéiques permettant d'effectuer des corrélations entre énergie produite (et donc potentiellement consommée) par unité de temps, quantité d'ADN (et donc niveau de ploïdie moyen) et quantité totale de protéines produites (par unité de temps). Ainsi, l'on pourrait mieux appréhender les notions de consommation et d'économie d'énergie chez les cellules endopolyploïdisées, notions qui peuvent être mises en relation directe avec les problématiques de croissance et de vitesse de croissance.

## **5. CONCLUSION**

Nous avons lors de cette étude mis au point une méthode de détermination de la ploïdie *in situ*. Celle-ci nous a permis d'étudier les caractéristiques structurales de la cellule en lien direct avec l'endopolyploïdisation et d'émettre l'hypothèse que la mise en place de l'endopolyploïdisation pouvait être reliée à des problématiques d'ergonomie cellulaire et d'économie d'énergie. De plus, nous avons pu confirmer que l'endopolyploïdisation était étroitement liée à la croissance cellulaire et ce *via* deux approches : le criblage de la banque de mutants Micro-Tom et la ploïdie *in situ*. La première a révélé que la plupart des phénotypes d'augmentation de ploïdie montraient une augmentation de leur taille cellulaire moyenne. De plus, aucun fruit mutant dépourvu d'endopolyploïdisation n'a pu être identifié, ce qui peut nous permettre de penser que le bon déroulement du développement du fruit de tomate passe obligatoirement par la mise en place de l'endopolyploïdisation. La seconde a révélé cette même corrélation mais directement à l'échelle cellulaire. Elle nous a aussi indiqué que l'endopolyploïdisation, plutôt que de déterminer la taille cellulaire finale, permettait plutôt une potentialisation de la croissance cellulaire. Enfin, nous avons aussi pu obtenir, en corrélant les résultats de la répartition de la ploïdie *in situ* et la dynamique de division cellulaire durant le développement du péricarpe de tomate, des indices en faveur d'une mise en place de l'endopolyploïdisation précédant la croissance cellulaire.



## **REFERENCES DISCUSSION - CONCLUSION**

- Anisimov, A.P.** (2005) Endopolyploidy as a morphogenetic factor of development. *Cell Biology International*, **29**, 993-1004.
- Bertin, N., Lecomte, A., Brunel, B., Fishman, S. and Genard, M.** (2007) A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1903-1913.
- Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. In *Progress in Botany* 71, pp. 101-132.
- Bourdon, M., Coriton, O., Cheniclet, C., Brown, S., Poujol, C., Chevalier, C., Renaudin, J.-P., Frangne, N.** (2010) *In planta* quantification of endopolyploidy using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). Submitted
- Bramsiepe, J., Wester, K., Weinl, C., Roodbarkelari, F., Kasili, R., Larkin, J.C., Hülkamp, M. and Schnittger, A.** (2010) Endoreplication Controls Cell Fate Maintenance. *PLoS Genet*, **6**, e1000996.
- Bünger-Kibler, S. and Bangerth, F.** (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, **1**, 143-154.
- Carvalho, G.M.G.** (2000) Plant polytene chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, **23**, 1043-1050.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.-P. and Renaudin, J.-P.** (2005) Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiol.*, **139**, 1984-1994.
- D'Amato, F.** (1984) Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. *Johri, BM (ed) . Embryology of angiosperms . Springer, New York*, 519-566.
- D'Amato, F. and Durante, M.** (2001) *Polyploidy*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gillaspy, G., Bendavid, H. and Gruissem, W.** (1993) FRUITS - A DEVELOPMENTAL PERSPECTIVE. *Plant Cell*, **5**, 1439-1451.
- Hülkamp, M.** (2004) Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 471-480.

- John, P.C.L. and Qi, R.** (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends in Plant Science*, **13**, 121-127.
- Joubès, J. and Chevalier, C.** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology*, **43**, 735-745.
- Nafati, M., Cheniclet, C., Hernould, M., Do, P.T., Fernie, A., Chevalier, C., Gévaudant, F.** (2011) The specific overexpression of a Cyclin Dependent Kinase Inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant J.*, in press.
- Nagl, W.** (1975) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature, UK*, **261**, 614-615.
- Nagl, W.** (1976) NUCLEAR ORGANIZATION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **27**, 39-69.
- Ruf, M. and Brunner, I.** (2003) Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test. *Tree Physiology*, **23**, 257-263.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., Eskiw, C.H., Luo, Y., Wei, C.-L., Ruan, Y., Bieker, J.J. and Fraser, P.** (2010) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*, **42**, 53-61.
- Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 544-553.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M.** (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**, 57-63.
- Wegel, E. and Shaw, P.** (2005) Gene activation and deactivation related changes in the three-dimensional structure of chromatin. *Chromosoma*, **114**, 331-337.
- Zybina, E.V. and Zybina, T.G.** (1996) Polytene chromosomes in mammalian cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 165*, **165**, 53-119.

# ANNEXES

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

### Revue à comité de lecture

**Bourdon, M., Coriton, O., Cheniclet, C., Brown, S., Poujol, C., Chevalier, C., Renaudin, J.-P., Frangne, N.** (2011) *In planta* quantification of endoreduplication using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH). *Plant Journal*, 66 : 1089-1099.

**Chevalier, C., Nafati, M., Mathieu-Rivet, E., Bourdon M., Frangne, N., Cheniclet, C., Renaudin J.-P. Gévaudant, F., Hernould, M.** (2011) Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann. Bot.*

**Domergue F., Vishwanath S.J., Joubès J., Ono J., Lee J., Bourdon M., Alhattab R., Lowe C., Pascal S., Lessire R., and Rowland O.** (2010) Three Arabidopsis fatty acyl-CoA reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol*, 153: 1539-1554.

### Chapitres d'ouvrage

**Bourdon, M., Frangne, N., Mathieu-Rivet, E., Nafati, M., Cheniclet, C., Renaudin, J.-P. and Chevalier, C.** (2010) Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. In *Progress in Botany* 71, pp. 101-132.

### Communications à des congrès

**2010 - Bourdon M., Coriton O., Cheniclet C., Brown S., Peypelut M., Rouyère V., Renaudin J.P., Chevalier C., Frangne N.** Toward a

comprehensive model for setting up endopolyploidization during tomato fruit development. XVII Congress of the FESPB, 4-9 July 2010, Valencia, Spain (Best Poster Price)

- 2010 - Bourdon M., Coriton O., Cheniclet C., Brown S., Peypelut M., Chevalier C., Renaudin J.P., Frangne N.** Endopolyploïdisation et fruit de tomate. Journées de l'école doctorale, 28 avril 2010, Arcachon, France (communication orale).
- 2009 - Bourdon M., Coriton O., Cheniclet C., Brown S., Peypelut M., Chevalier C., Renaudin J.P., Frangne N.** Cytogenetics for understanding endopolyploidization in tomato. 8<sup>th</sup> National Meeting of the Société Française de Biologie Végétale (SFBV), 8-10 July 2009, Strasbourg, France (Poster).
- 2009 - Bourdon M., Coriton O., Cheniclet C., Brown S., Peypelut M., Rouyère V., Chevalier C., Renaudin J.P., Frangne N.** A Cytogenetics approach to understand endopolyploidization in tomato. Journées de l'école doctorale, avril 2009, Arcachon, France (Poster).
- 2008 - Bourdon M., Coriton O., Cheniclet C., Brown S., Peypelut M., Chevalier C., Renaudin J.P., Frangne N.** Endopolyploidy in tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) : Endomitosis vs Endoreduplication? Réunion du groupe Cytogénétique & Polyploïdie, 2-4 avril 2008, Angers, France (communication orale).