HAL
open science

Optimisation de la technique de préparation de graines d'Arabidopsis thaliana en vue d'études en microscopie électronique à transmission

Christine Longin, Christine Péchoux, Olivier Coen, Enrico Magnani

To cite this version:

Christine Longin, Christine Péchoux, Olivier Coen, Enrico Magnani. Optimisation de la technique de préparation de graines d'Arabidopsis thaliana en vue d'études en microscopie électronique à transmission. 8. Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes de l'INRA, Nov 2018, Theix, France. , 2018. hal-02791094

HAL Id: hal-02791094

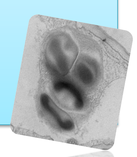
https://hal.inrae.fr/hal-02791094v1

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Optimisation de la technique de préparation de graines d'*Arabidopsis thaliana* en vue d'études en microscopie électronique à transmission



Christine Péchoux*, Olivier Coen°, Enrico Magnani°

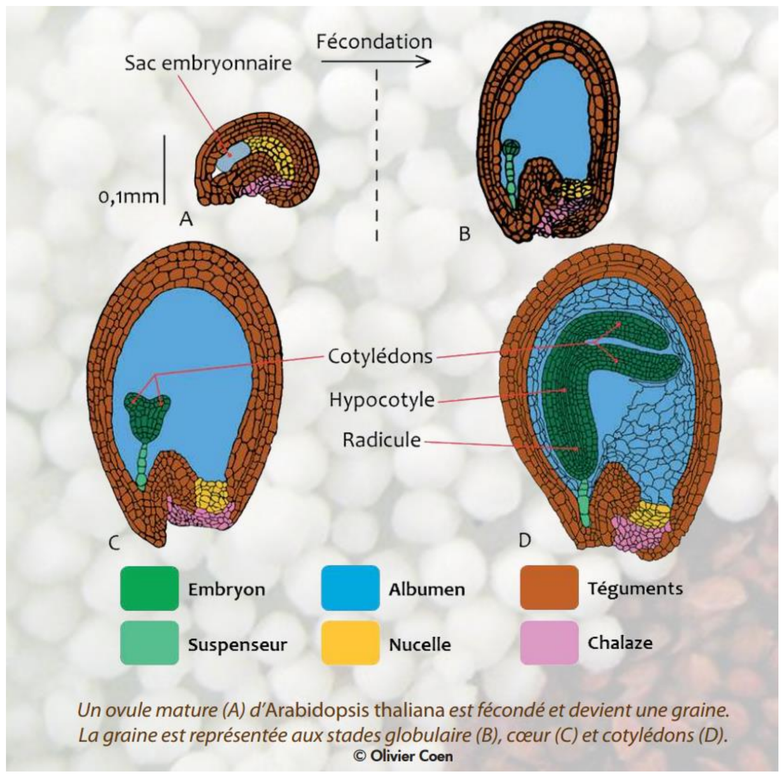
*MIMA2 MET –GABI, INRA, Agroparistech, Equipe Plateformes, Jouy-en-Josas, France ; °Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Versailles, France

Introduction

Dans la graine d'Arabidopsis, les cellules de l'enveloppe se différencient au cours de leur développement. En particulier, la couche cellulaire la plus interne de l'enveloppe, appelée endothélium produit des tannins condensés, polyphénols ayant des forts intérêts agronomique, écologique et de santé humaine.

Nous cherchons à déterminer les mécanismes génétiques qui contrôlent le développement des cellules de l'endothélium. On sait qu'un certain nombre de gènes *TRANSPARENT TESTA (TT)* codant des facteurs de transcription sont impliqués dans ce processus développemental. L'étude fine de la structure cellulaire de l'endothélium dans les mutants de ces gènes nous permettra d'en savoir davantage sur leur rôle précis. En outre, nous cherchons à savoir si certains de ces mutants sont affectés dans la déposition d'une cuticule (couche de cire dense aux électrons) séparant enveloppe et produits de la fécondation (embryon et albumen). Enfin, nous étudions la communication cellulaire dans les tissus maternels des ovules et jeunes graines d'Arabidopsis. A ce titre, nous voulons observer les plasmodesmes (canaux reliant deux cellules) et savoir si nos mutants *tt* sont affectés dans leur répartition au sein du nucelle.

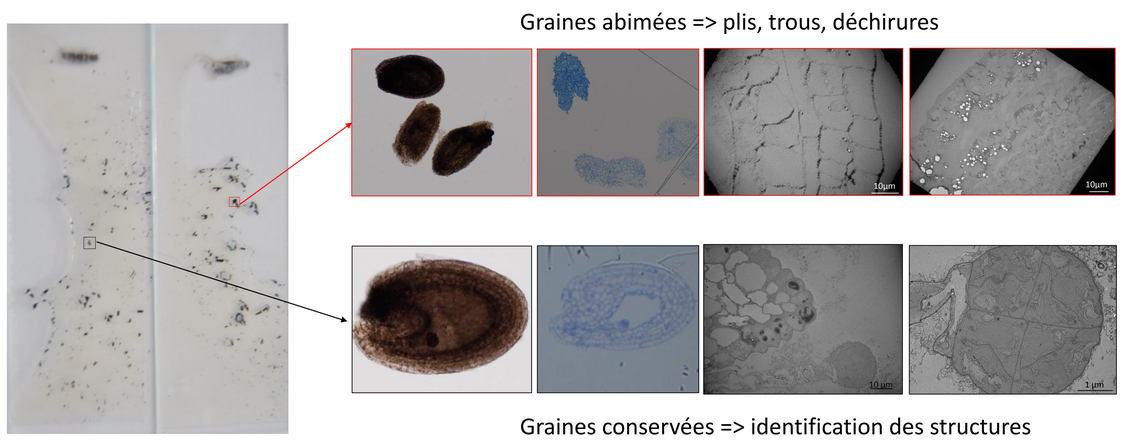
La structure complexe des graines rend leur préparation en MET difficile. Pour étudier les différentes couches cellulaires, nous avons optimisé les conditions de préparation afin de conserver et d'observer l'ensemble des constituants.



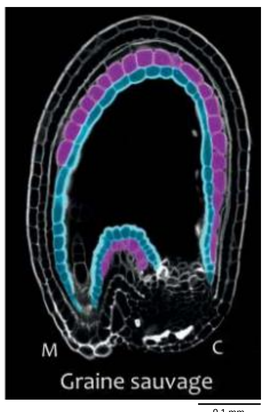
Un ovule mature (A) d'Arabidopsis thaliana est fécondé et devient une graine. La graine est représentée aux stades globulaire (B), cœur (C) et cotylédons (D).
© Olivier Coen

Méthode

Fixation : Glutaraldéhyde 2,5% - PFA 2% pH 7,2 : 1h à TA+1 semaine à +4°C
Contraste : OTE 0,5%
Post-Fixation : OsO4 1% - FerroCyanure K 1,5% : 2h à TA à l'obscurité
Déshydratation : Ethanol 10% à 90% : 1h/chaque
Ethanol 100% : 2x1h
Substitution : Ethanol 100% - Epon : 2/1 - 2h
Ethanol 100% - Epon : 1/1 - 2h
Ethanol 100% - Epon : 1/2 - 2h
Epon pur : 1 nuit sous vide
Inclusion : entre 2 lames silanisées
Polymérisation : 48h à 56°C



Observation des différentes structures d'intérêt sur le même échantillon



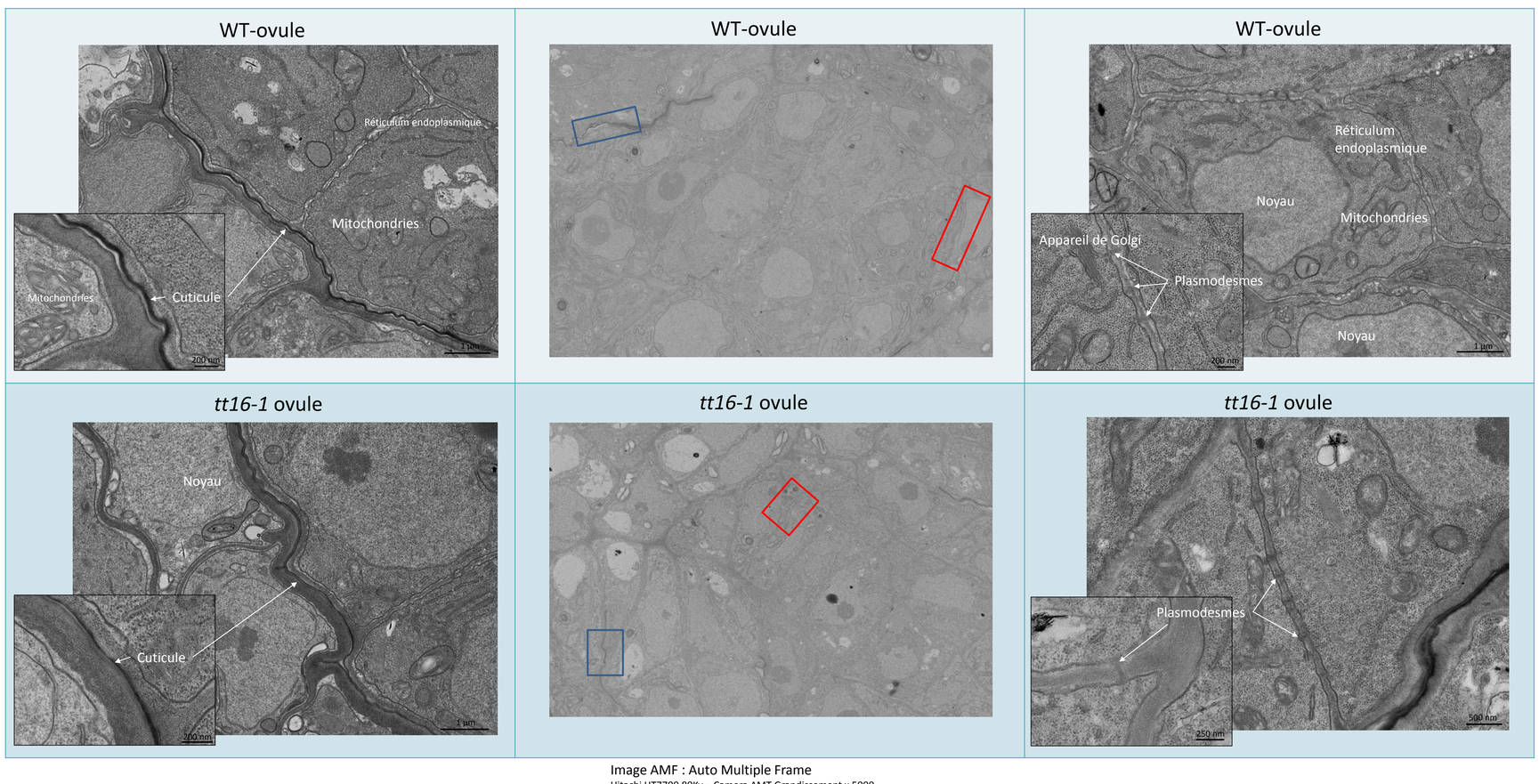


Image AMF : Auto Multiple Frame
Hitachi HT7700 80Kv – Camera AMT Grandissement x 5000

Coupes longitudinales de graines montrant les parois des cellules de graines sauvages et mutantes

Endothélium ; Couche cellulaire ii1' ; M : micropyle ; C : chalaze

Conclusion

Cette méthode nous a permis d'identifier des changements d'identité cellulaire dans les cellules de l'endothélium ainsi que l'absence de déposition de la cuticule chez certains de nos mutants, et enfin, des différences de répartition des plasmodesmes dans le nucelle des ovules, tout ceci sur les mêmes échantillons.

Coen, O., Fiume, E., Xu, W., De Vos, D., Lu, J., Pechoux, C., Lepiniec, L., and Magnani, E. (2017). Developmental patterning of the sub-epidermal integument cell layer in Arabidopsis seeds. Dev Suppl **144,** 1490-1497 ; **Endress, P.K.** (2011). Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Ann Bot **107,** 1465-1489.
Fiume, E., Coen, O., Xu, W., Lepiniec, L., and Magnani, E. (2017). Developmental patterning of sub-epidermal cells in the outer integument of Arabidopsis seeds. PLoS One **12,** e0188148 ; **Gardarin A., Durr C., Mannino M.R., Busset H., and N., C.** (2010). Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. Seed Science Research **20,** 243-256 ; **Haughn, G., and Chaudhury, A.** (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. Trends Plant Sci **10,** 472-477. ; **Ingram, G.C.** (2010). Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. Protoplasma **247,** 195-214. ; **Ingram, G.C.** (2016). Dying to live: cell elimination as a developmental strategy in angiosperm seeds. J Exp Bot. ; **Johri, B.M., Ambegaokar, K.B., and Srivastava, P.S.** (2013). Comparative Embryology of Angiosperms. (Springer). ; **Kelly, K.M., Van Staden, J., and Bell, W.E.** (1992). Seed coat structure and dormancy Plant Growth Regulation **11,** 201-209. ; **Linkies, A., ; Graeber, K., Knight, C., and Leubner-Metzger, G.** (2010). The evolution of seeds. New Phytol **186,** 817-831 ; **Nooden, L.D., Blakley, K.A., and Grzybowski, J.M.** (1985). Control of seed coat thickness and permeability in soybean : a possible adaptation to stress. Plant Physiol **79,** 543-545. ; **Pettitt, J.** (1970). Heterospory and the origin of the seed habit. Biol. Rev. **45,** 401-415 ; **Schneitz, K., Hulskamp, M., and Pruitt, R.E.** (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. The Plant Journal **7,** 731-749.