

Morphogenèse Racinaire & Stress Mécanique Méthodes et Protocoles

Introduction :

Définition des pistes de recherche :

Nous nous sommes intéressés à la problématique de la réaction des racines à des sols de compacités différentes.

En effet, la croissance des végétaux semble souvent relever du tour de force dans divers sols, et il se peut que la croissance racinaire ait des conséquences surprenantes face aux canalisations et infrastructures souterraines. D'autre part, les systèmes racinaires sont essentiels au développement des végétaux et sont affectés par la qualité des sols. Ainsi, la connaissance des phénomènes d'adaptation et de morphogenèses, permettrait d'optimiser la culture des sols.

Il a été observé dans des études antérieures un épaississement local de la racine lorsqu'elle rencontrait une certaine compacité du sol suivi d'une déviation de l'axe principal. Nous avons donc voulu savoir s'il s'agissait d'une réponse mécanique, ou si la différence de compacité enclenchait des mécanismes « intelligents » de la racine à l'instar de ceux qui lui permettent de s'orienter vers les sols riches en eaux et substances nutritives.

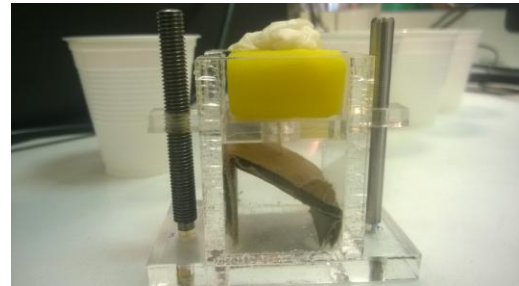
Nous avons donc naturellement voulu essayer de corréler la force exercée à une déviation de la racine.

Nous présenterons donc dans un premier temps le protocole utilisés afin d'observer la déviation macroscopique de la racine face à une butée donnée, puis le protocole où les arabidopsis sont sujets de l'expérience.

I. Dispositif Expérimental Pois Chiche.

I.1 Matériel :

1. graines (achetées chez l'épicier)
2. cotons démaquillants
3. mousse florale
4. butée (carton ou PDMS : voir annexe)
5. support de la graine (cf. plans en annexe)
6. support de germination
7. cache



I.2 Germination

1. immerger le coton démaquillant dans l'eau. Envelopper la graine de pois chiche dans le coton en refermant les deux pans (idem pour 30 graines)
2. facultatif : utiliser un fongicide
3. la germination dure 2 à 3 jours (les pousses font alors 5 mm environ)
4. déposer la graine germinée dans la mousse florale sur le support (cf. schéma en annexe) et imbiber la mousse régulièrement afin de maintenir un taux d'humidité élevée : la plante perdure 5 jours et peut aller jusqu'à 10 cm en puisant dans les réserves des cotylédons. Attention à la cuvette en plexi : les propriétés en sont altérées avec l'humidité.
5. réfrigérer toutes les graines pendant 2 à 3 jours permet de synchroniser leurs

germinations.

Contact : Evelyn Kolb (PMMH)

Bibliographie : (cf. Annexe)

I.3. butée et Gels

Nous sommes partis sur une idée de Butée en carton. L'humidité dans le support ramollissait cet obstacle. Nous avons donc pensé à du PDMS, qui nous permettrait d'obtenir des modules d'Young différents pour diverses compositions.

Quelques ordres de Grandeurs.

E_{racine} : ordre de quelques MPa

Gel Sylgard : Sylgard 527 : ordre de 5 KPa ; Sylgard 184 ordre de 1,72MPa

En proportions (527/184) : 10:1=50 KPa

5:1 =130 KPa

1:1 =830 KPa

1:5= 1,34 MPa

Contact : SIMM

La méthode d'observation des cellules de la racine de Pois chiche nécessite un protocole de Fixation inadapté au cadre des PSE.

Nous sommes donc tournés vers la culture d'Arabidopsis, plus fines, en particulier d'espèce mutée Botero (cataline sectionnant les microtubules) et d'espèces FLUO dont les microtubules sont marqués à la GFP (cf. annexe)

II. Dispositif Expérimental ARABIDOPSIS

Pour éviter toutes contaminations, les Manipulations devront être effectuées **sous hotte à flux laminaire**. Pour stockage, prévoir un Frigo.

II.1. Stérilisation

Matériel

1. cuve à stérilisation
2. Eau de javel domestique
3. Ethanol à 95%
4. Eau millipore
5. Cuve de rinçage
6. Eppendorf (pour la stérilisation des graines)

Protocole

1. Les contenants sont placés dans l'eau de Javel pendant 5 min.
2. Ils sont ensuite re plongés dans de l'éthanol pendant 5 à 10 min
3. Rinçage à l'eau distillée sous la hotte

II.2.Préparation Milieu de Culture (cf. Annexe)

1. Préparation Murashige et Skoog (cf. annexe)
2. plaque chauffante et agitateur magnétique
3. Sonde à PH, pastilles KOH
4. contenant de capacité d'au moins 2 litre stérile
5. parafilm

6. Autoclave (Cf. annexe pour contact)
7. Agar (pour différentes compacités)
8. pipettes et cônes de 1 à 2 ml
9. cuves à spectrophotométrie (cf. Annexe)
10. parafilm
11. support a cuvettes

Protocole

1. Cf. annexe pour la dissolution du milieu en poudre.

ATTENTION : TOUJOURS AUTOCLAVER JUSTE APRES LA PREPARATION DE LA SOLUTION.

L'autoclave du labo de Bio étant disponible jusqu'à 16h30, il est nécessaire de prendre rdv avec la responsable (cf. Annexe) et de prévoir une séance de PSE à cet effet. Cela implique la préparation du milieu sur une journée entière, la préparation de la solution nécessitant au moins une à deux heures.

2. laisser refroidir et stocker au Frigo. Lors d'une prochaine réutilisation, toujours prélever un petit volume sous la Hotte a flux laminaire. Bien parafilmer le bouchon du Contenant.

3. Stériliser les cuves a Spectrophotométries (cf. sterilisation)

4. pour augmenter la compacité, ajouter la masse d'Agar nécessaire pour atteindre les rapports de concentration voulue. Nous avons travaille avec respectivement 4g/l et 16g/l. Cette étape est effectuée dans des volumes prélevés et réchauffés sur plaque chauffante.

5. sous la hotte, prélever à l'aide d'une pipette 2 ml de la solution la plus concentrée en agar et la déposer au fond de la cuve.

6. déposer une couche de 2 a 3 ml de la solution la moins concentrée

7. laisser refroidir : une fine ligne apparait à l'interface entre les deux gels, et montre la différence de compacité. Marquer cette limite.

8. parafilmer

9. mettre au Frigo

II.3.Mise en culture des graines

Manip à effectuer sous hotte a flux Laminaire

1. pipette de 20 µl
2. Tips de précision (cf. Annexes)
3. parafilm
4. cache opaque

Protocole

1. stériliser les graines selon le protocole suivant :

-laisser les graines en suspension dans une solution 25% eau- 75 % éthanol en volume pendant 2min.

-laisser les graines en suspension dans une solution d'eau de javel pendant 2min.

-rincer 4 fois les graines avec de l'eau distillée.

2. réserver dans un eppendorf avec eau distillée
 3. A l'aide des Tips fin et de la pipette, pipeter dans l'éppendorf et aspirer une graine. Ne pas relâcher brusquement le pouce de la pipette, la graine est aspirée vers le filtre et est perdue.
 4. placer la pointe de la pipette à la surface de la cuvette, et l'introduire dans le gel. En appuyant, la graine est projetée dans le gel. Attention à la formation de bulles d'air.
 5. parafilmer et placer au réfrigérateur pendant 3 jours pour synchroniser la germination.
 6. Sortir les racines et les placer sous le cache.
 7. par souci de nombre de cuve, nous plantons 4 graines par cuves.
 8. ne pas oublier de noter le type de graines sur la cuve.
- Une vidéo dont nous nous sommes inspirés est disponible en annexe.

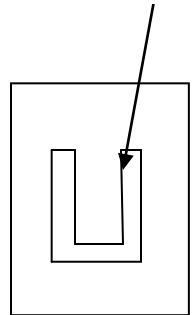
II-4. Autre dispositif : lames parallèles :

1. 2 lames de microscope optique (stérilisées selon le protocole II.1)
2. scotch double face (essayer d'obtenir une épaisseur de 1 mm)

Protocole :

- 1- Placer le scotch en forme de U sur une première lame.
- 2- Placer la seconde lame sur le scotch.
- 3- Utiliser le dispositif à la place de la cuvette dans le protocole précédent.

Scotch double face



II-5. Chauffage du gel.

1. Système de chauffage à reflux stérilisé
2. Gels conservés au frigo

Protocole :

- 1- Placer le gel dans le ballon puis mettre à reflux à 373K jusqu' à obtention d'un liquide translucide.
- 2- Couler le gel dans les cuves à spectroscopie (laisser refroidir pour ne pas faire fondre le plastique).