



Apport des cryotechniques appliquées aux structures du grain de blé en microscopie électronique à transmission

Contexte Scientifique & Objectifs

Les techniques de congélation haute pression suivie de cryo-substitution ont été à l'origine de progrès notables dans la connaissance des ultrastructures biologiques.

Les cryotechniques ont donc ouvert la voie vers « l'immunocytochimie à haute résolution », alliant préservation de l'ultrastructure et maintien de la réactivité antigénique.

Le blé est une céréale majeure de l'alimentation humaine. Les parois du grain de blé qui représentent seulement 3-4% du grain, jouent un rôle important dans les processus technologiques. Elles sont constituées de polysaccharides, majoritairement d'**arabinoxylanes (AX)**. La synthèse de ces constituants requiert l'intervention d'enzymes appartenant pour la plupart à la famille des glycosyltransférases (GT) et se déroule dans l'appareil de Golgi. Un anticorps dirigé contre l'une de ces GT disponible commercialement a été testé : **RGP**.

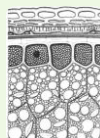
L'objectif est de développer un protocole de cryo-fixation permettant de localiser des antigènes non accessibles par des techniques conventionnelles.

Camille **ALVARADO**, Brigitte **BOUCHET**

INRA - UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages
rue de la Géraudière, 44316 Nantes

Matériels & Méthodes

Coupe transversale du grain 150 µm



Congélation haute pression 2000 bars



Cryo-substitution



Echantillon en résine



Coupe ultra-fine 70 nm

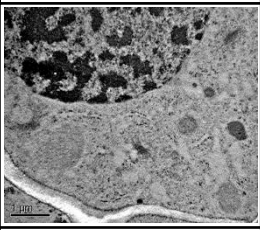
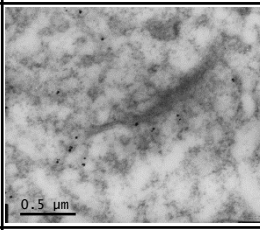
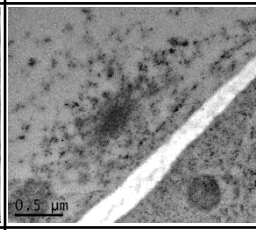
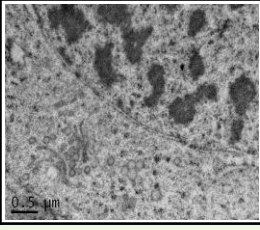
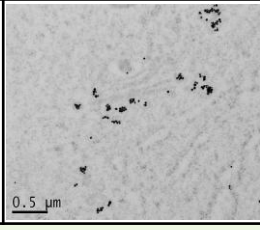
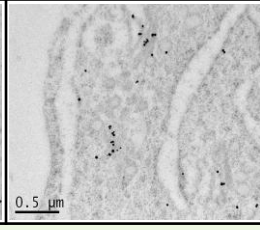


Immuno-cytochimie

Résultats

Fixation Chimique

1% de glutaraldéhyde
3% de paraformaldéhyde
inclusion à 55°C en LRW

	Ultrastructure	Marquage des AX	Marquage RGP
Fixation Chimique			
Cryo-substitution			

Cryo-substitution

0,2% de glutaraldéhyde
0,2% d'acétate d'uranyle
en acétone anhydre
inclusion à -50°C en HM20

Avantages & Inconvénients

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Bon compromis entre préservation morphologique et immunocytochimie ✓ Bonne préservation du matériel intra/extra cellulaire ✓ Utilisation très réduite de fixateurs | <ul style="list-style-type: none"> ○ Possibilité d'apparition de microcristaux de glace ○ Congélation hétérogène ○ Durée de manipulation plus longue (≈ le double) ○ Technique coûteuse |
|--|---|

Conclusions & Perspectives

Validation des conditions de cryogénie:

- Bonne préservation des organites cellulaires (Golgi, double membrane nucléaire ...)
- Marquage plus abondant des AX et RGP suite à une meilleure accessibilité des sites antigéniques

Suivre la mise en place des constituants pariétaux au cours du développement du grain en se focalisant sur le trafic vésiculaire intra-cellulaire.