

# Debout les plantes ! Imagerie en microscopie horizontale ou imagerie verticale

Hugo CHAUVET, Nicole BRUNEL-MICHAC, Bruno MOULIA, Valérie LEGUE  
UMR PIAF (INRA - Université Blaise Pascal)

Hugo CHAUVET, Yoël FORTERRE, Olivier POULIQUEN  
Institut Universitaire des Systèmes Thermiques et Industriels (IUSTI),  
UMR CNRS/Université Aix-Marseille

**ANR GRAP2**  
**Gravity Perception in Plants:**  
**From cell sensing to the biomechanical response**

Hugo CHAUVET, Nicole BRUNEL-MICHAC, Bruno MOULIA, Valérie LEGUE  
UMR PIAF (INRA - Université Blaise Pascal)

Hugo CHAUVET, Yoël FORTERRE, Olivier POULIQUEN  
Institut Universitaire des Systèmes Thermiques et Industriels (IUSTI),  
UMR CNRS/Université Aix-Marseille

# Contexte scientifique

## *Perception de la gravité par les plantes = gravitropisme*

Sensibilité des plantes à la gravité joue un rôle essentiel dans le développement et l'adaptation des végétaux à des changements environnementaux.



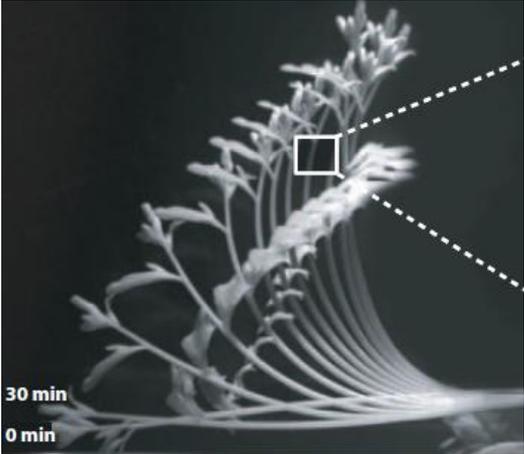
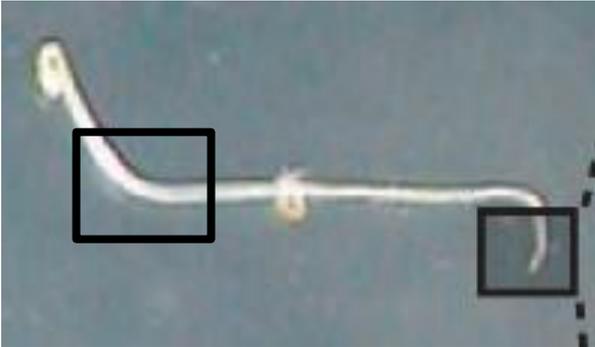
"Crooked Forest" (Pologne)

Contrôle de la direction de la germination  
Pénétration racines dans le sol

Contrôle postural

Les plantes sont sensibles à l'inclinaison de leur axe par rapport à la **gravité** :

Plantule d'*Arabidopsis* placée en position horizontale :



## Site de perception de la gravité :

**Tige** : dans l'endoderme, dans les **statocytes** contenant de volumineux amyloplastes les **statolithes**.

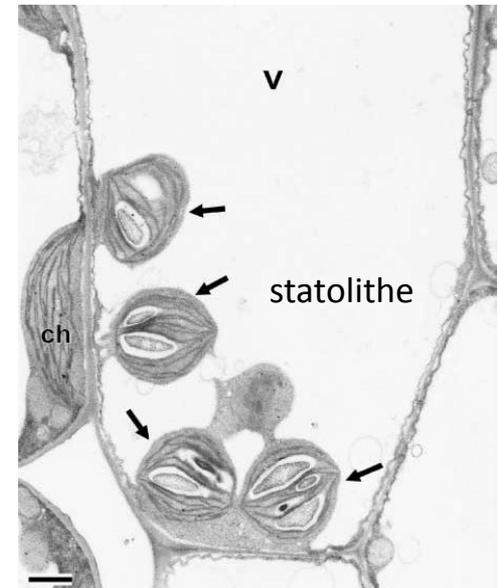
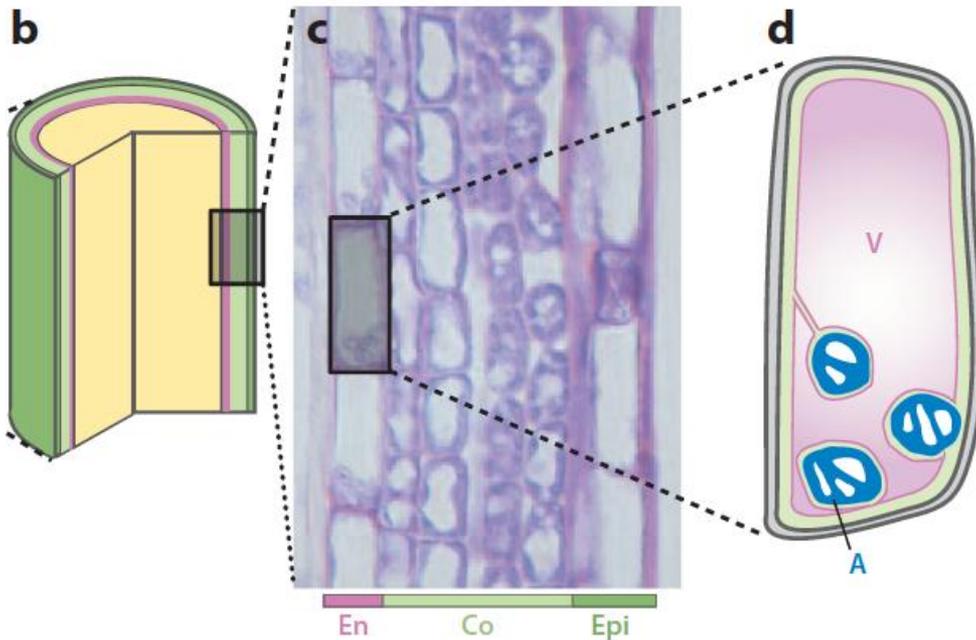
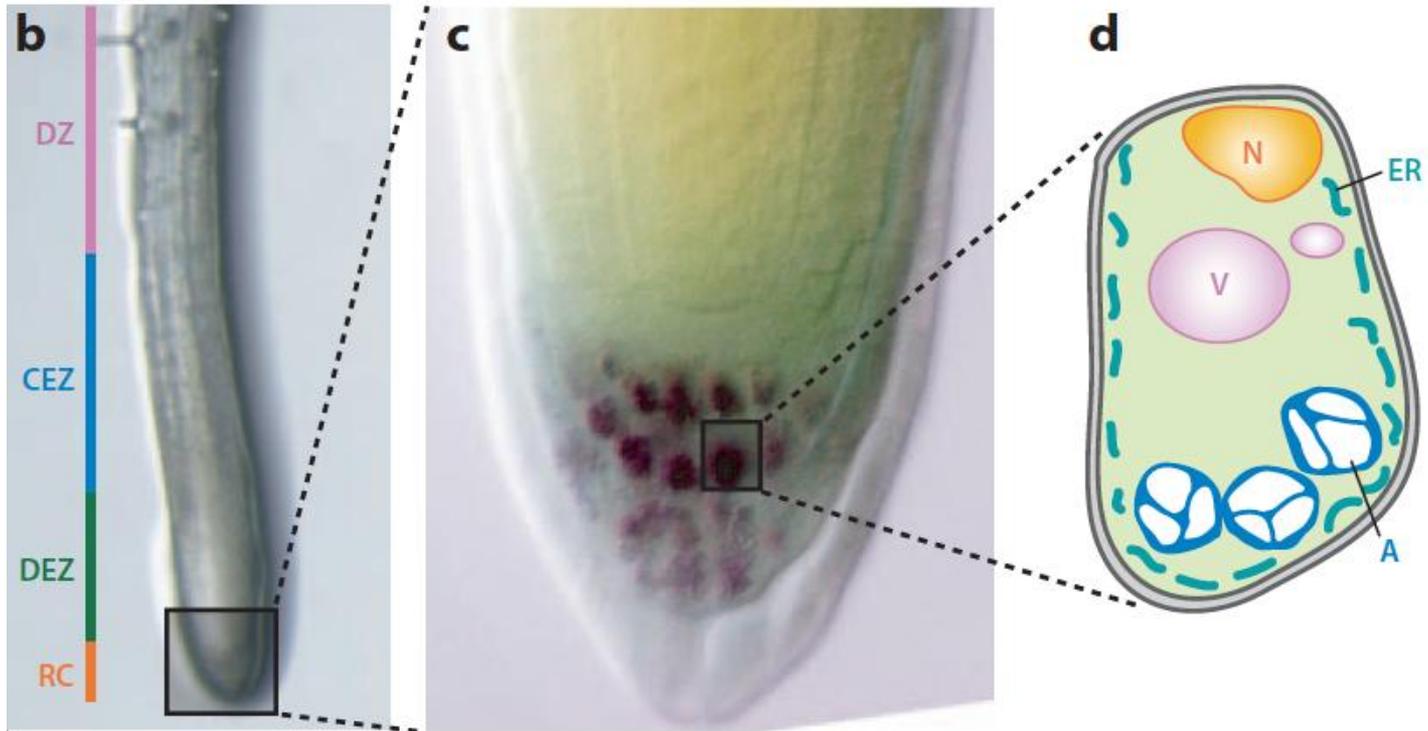


Image obtenue en MET d'une cellule d'endoderme (statocyte) d'*Arabidopsis*

Les statolithes plus denses que le milieu intracellulaire, ils sédimentent → direction de la gravité

Site de perception de la gravité :

Racine : dans la **coiffe**, dans les cellules de la **columelle**



Plantule placée en position horizontale



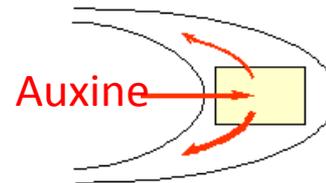
**Perception :** Sédimentation des statolithes



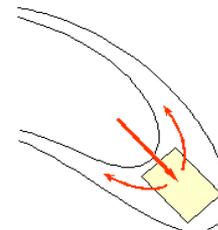
**Transduction :** Alcalinisation cellules de la columelle  
Redistribution des transporteurs d'auxine



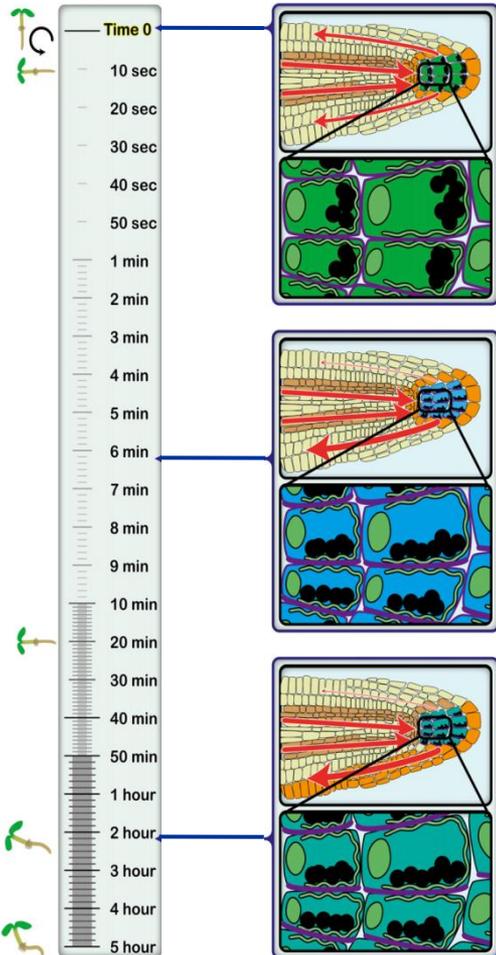
**Transmission :** Flux d'auxine modifié



**Réponse :** Croissance différentielle des 2 faces de la racine



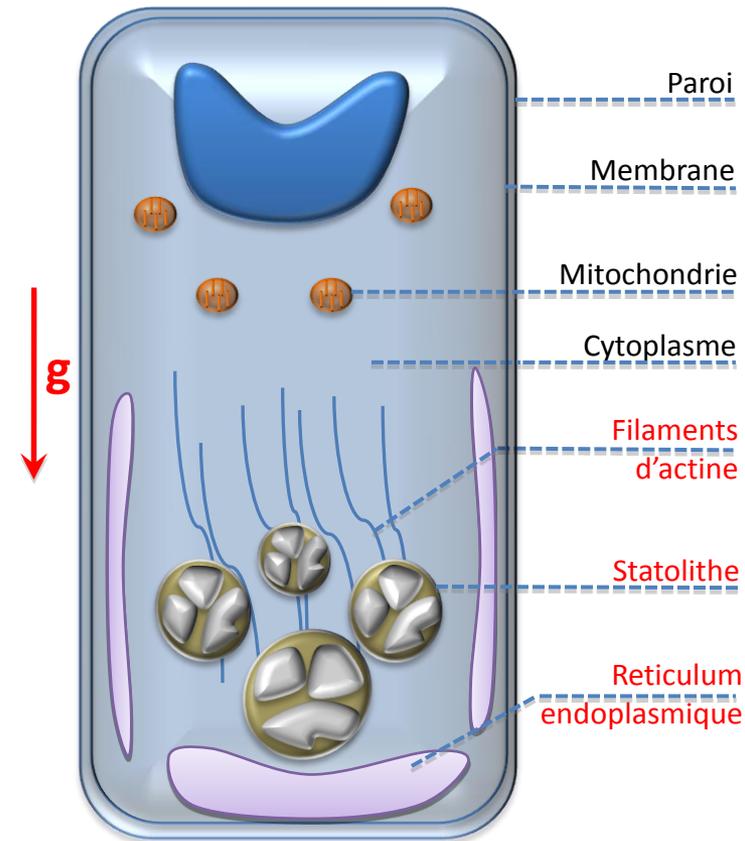
→ Courbure



## Statolithe (amyloplastes) : gravi-senseurs

Mouvements des **statolithes** n'est pas une simple **sédimentation**...

- En plus d'une sédimentation on observe un **mouvement erratique ou brownien** : rôle ?
  - Statolithes étroitement associés à un **réseau de filaments d'actine** : rôle du cytosquelette ?
  - Mouvements des statolithes induiraient une **déformation du réseau d'actine**
  - La sédimentation des statolithes pourrait activer par contact direct des **mécanosenseurs membranaires** et/ou déformer le **réticulum endoplasmique**
- ⇒ Statolithes = capteur de pression ou de position ?



# Objectif

Suivre le déplacement des amyloplastes sous l'effet de stimulations gravitropiques  
et  
Tester des inhibiteurs de la polymérisation du cytosquelette et/ou des mutants



Les observations devront donc se faire :

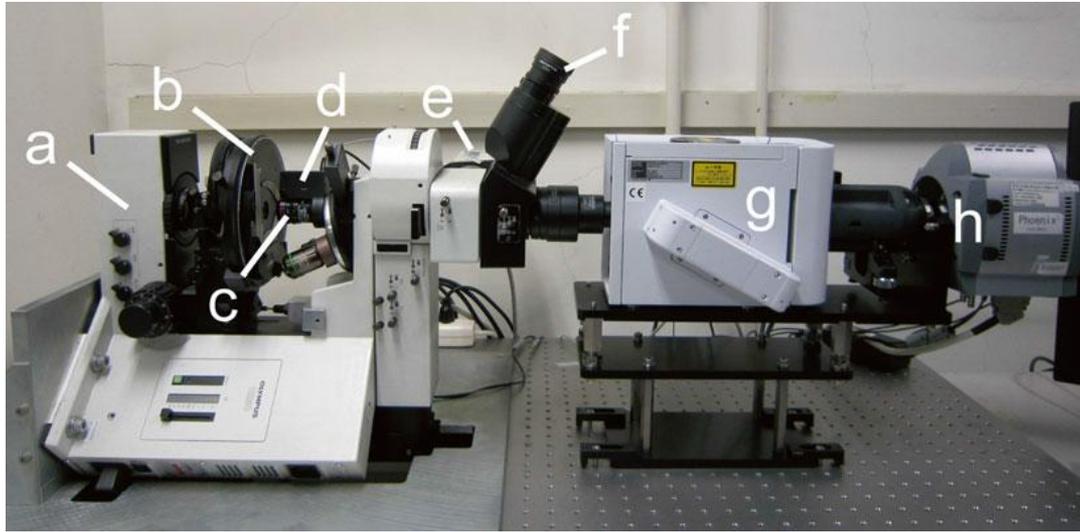
- \* Sur du matériel **in vivo** (non fixé)
- \* Sur un microscope avec une **platine placée verticalement et rotative**
- \* Un système permettant une bonne observation des amyloplastes : **DIC ?**
- \* Réaliser du « **time lapse** »
- \* Imagerie en **fluorescence**
- \* Pouvoir observer du matériel placé dans des **mini-chambres de culture** (utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation du cytosquelette...)



Or un tel microscope à platine verticale, dit « **microscope horizontal** »  
n'est actuellement pas commercialisé...



\* Equipe japonaise Morita *et al.* :



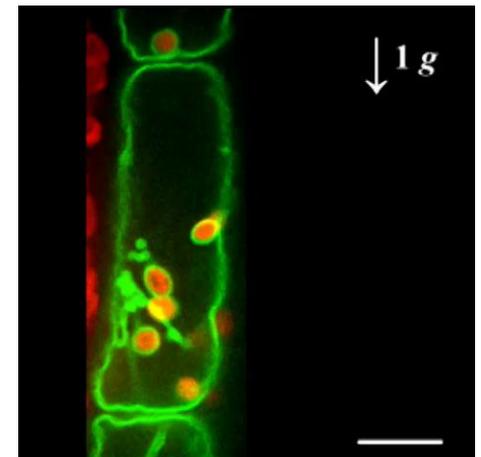
Microscope Olympus placé en position horizontale (model BX50; Olympus) équipé d'une unité confocale avec spinning disk.

Autofluorescence des amyloplastes

Excitation: 488 nm

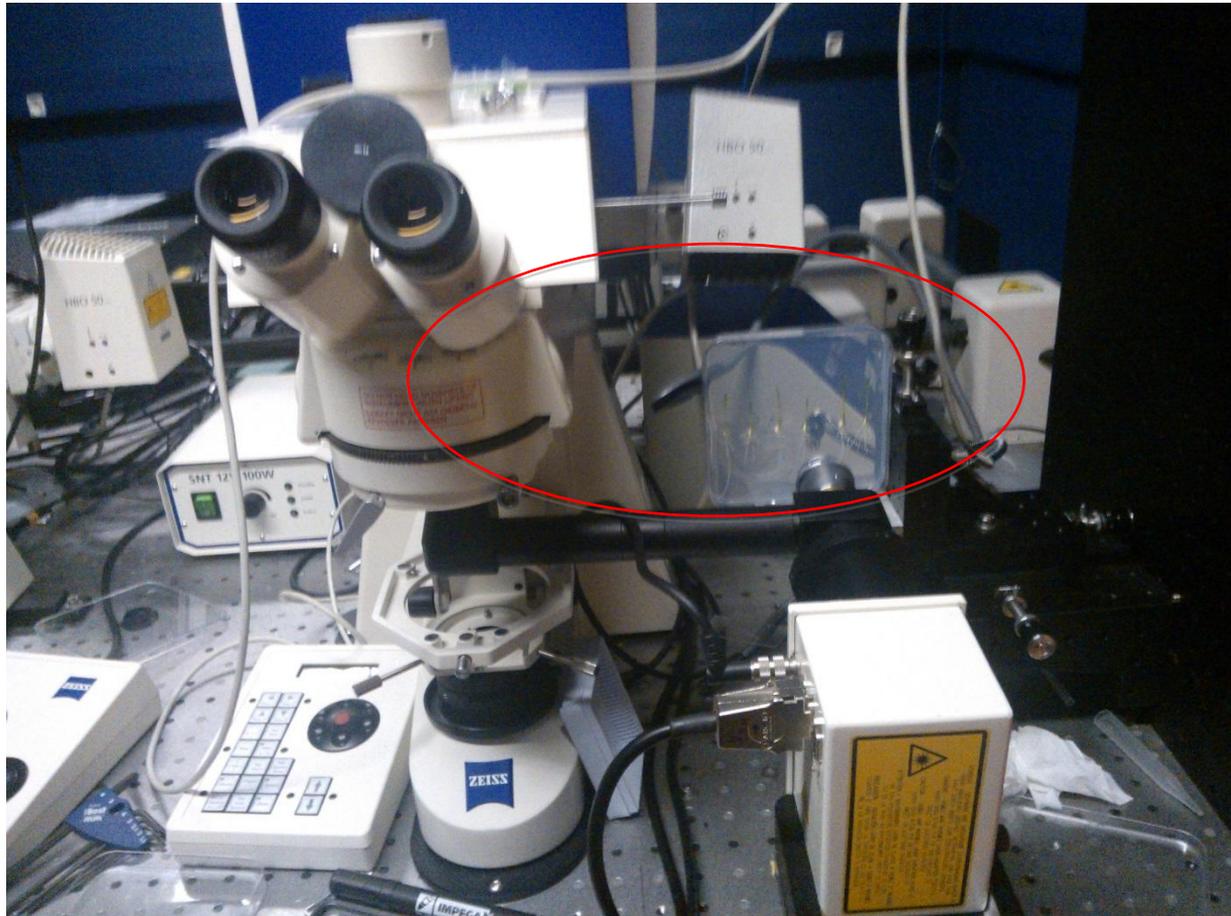
Fluorescence: 665 to 705 nm

Amyloplastes des racines non autofluorescents...



Tige d'*Arabidopsis*

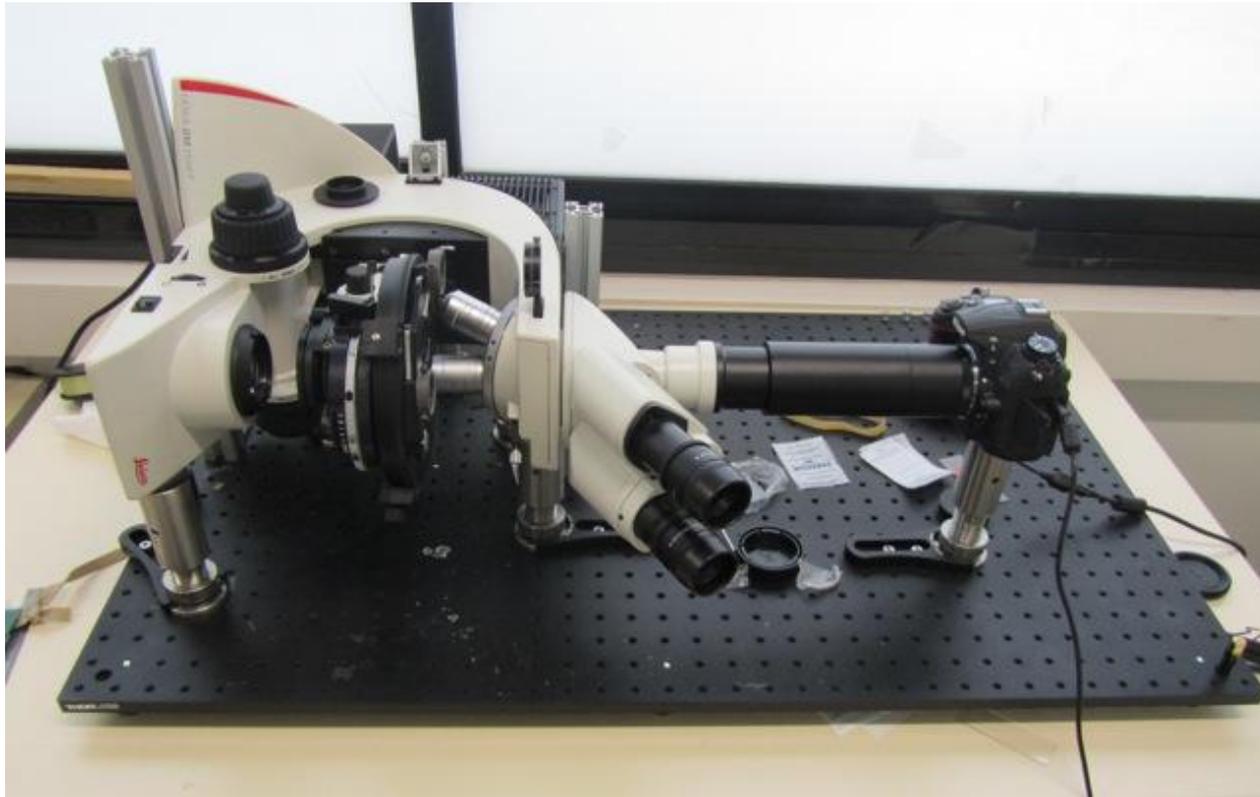
\* A Montpellier (UMR AGAP) :  
objectif déporté, platine verticale



+ originalité : possibilité d'observer des objets placés dans mini chambre de culture (conditions contrôlées...)

\* Hugo CHAUVET, Yoël FORTERRE, Olivier POULIQUEN

Institut Universitaire des Systèmes Thermiques et Industriels (IUSTI),  
UMR CNRS/Université Aix-Marseille



## Développement d'un microscope horizontal par la société **LORDIL** en collaboration avec **Zeiss** :

- adaptation d'un microscope destiné au départ à l'électrophysiologie : **Axio Examiner D1**
- mise en place d'un portique permettant de passer facilement de la position verticale à la position horizontale (**rotation du microscope** sur son axe de gravité)
- adaptation d'une **platine circulaire rotative** (utilisée sur les microscopes de géologie)
- objectifs : x10, x20, x40, x63 à immersion à eau (eau remplacée par du gel utilisé pour les échographies)
- éclairage en **transmission LED**
- équipement **épifluorescence** : source de fluorescence fibrée avec intensité réglable, filtres DAPI, GFP, RFP.

+ Station d'imagerie :

- **Caméra Hamamatsu** ORCA-flasch 4.0LT refroidie, N/B
- Logiciel ZEN

**Lordil**  
Vos besoins ... Nos solutions



Démonstration ! :



**Lordil**  
Vos besoins ... Nos solutions



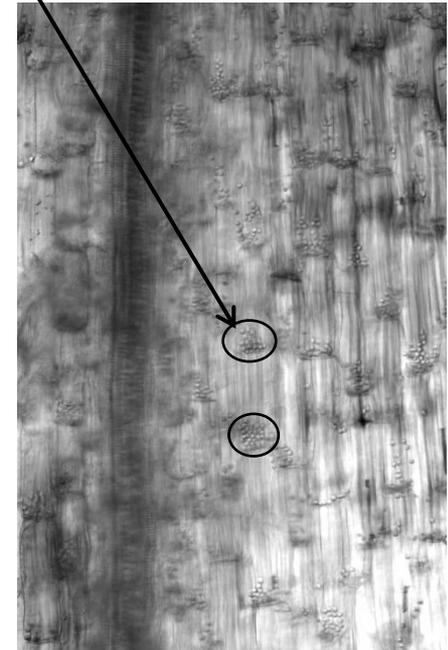
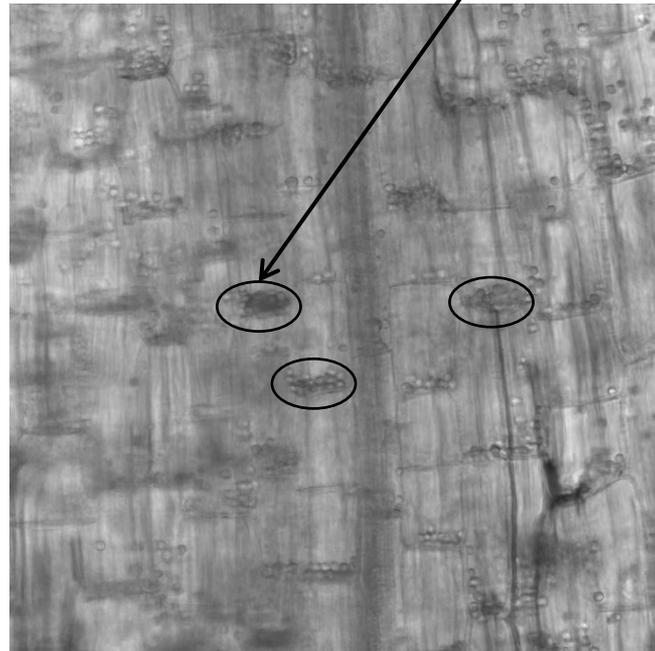
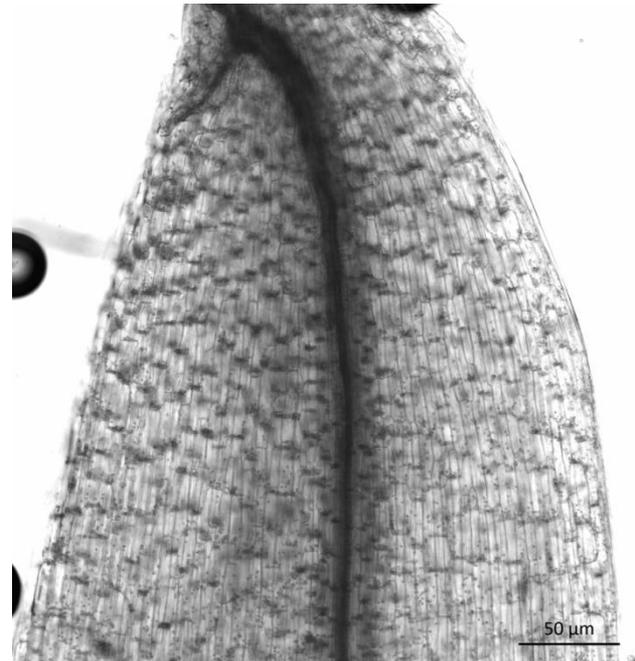
# Matériel végétal utilisé : le coléoptile de blé (gaine qui protège la première feuille)



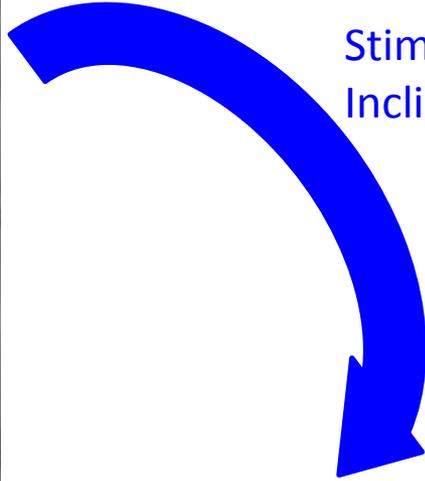
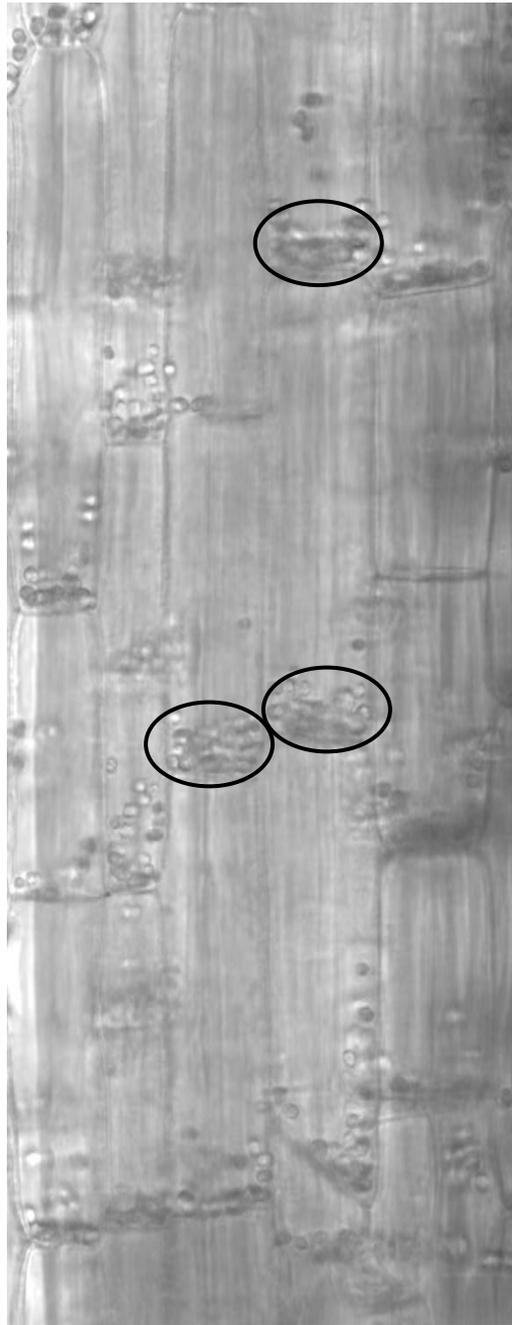
Avantage :

- croissance rapide (2-3 jours),
- coléoptile peu épais directement observable sous microscope

Statolithes en tas au bas de la cellule (statocyte)



Coléoptile en position verticale  
→ amyloplastes sédimentés dans la partie basale de la cellule



Stimulation gravitropique :  
Inclinaison d'un angle de 90°

Objectif utilisé : x40

## Déplacement des amyloplastes : comportement en avalanche



Time lapse :

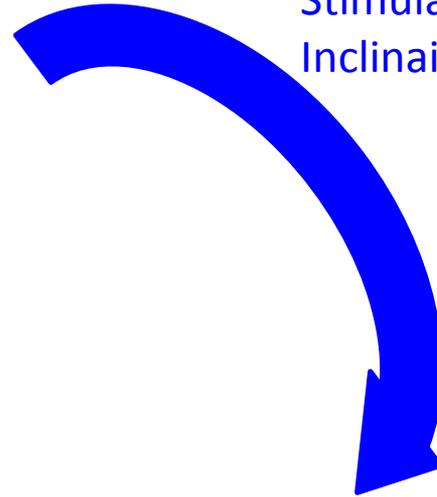
Durée : 30 min

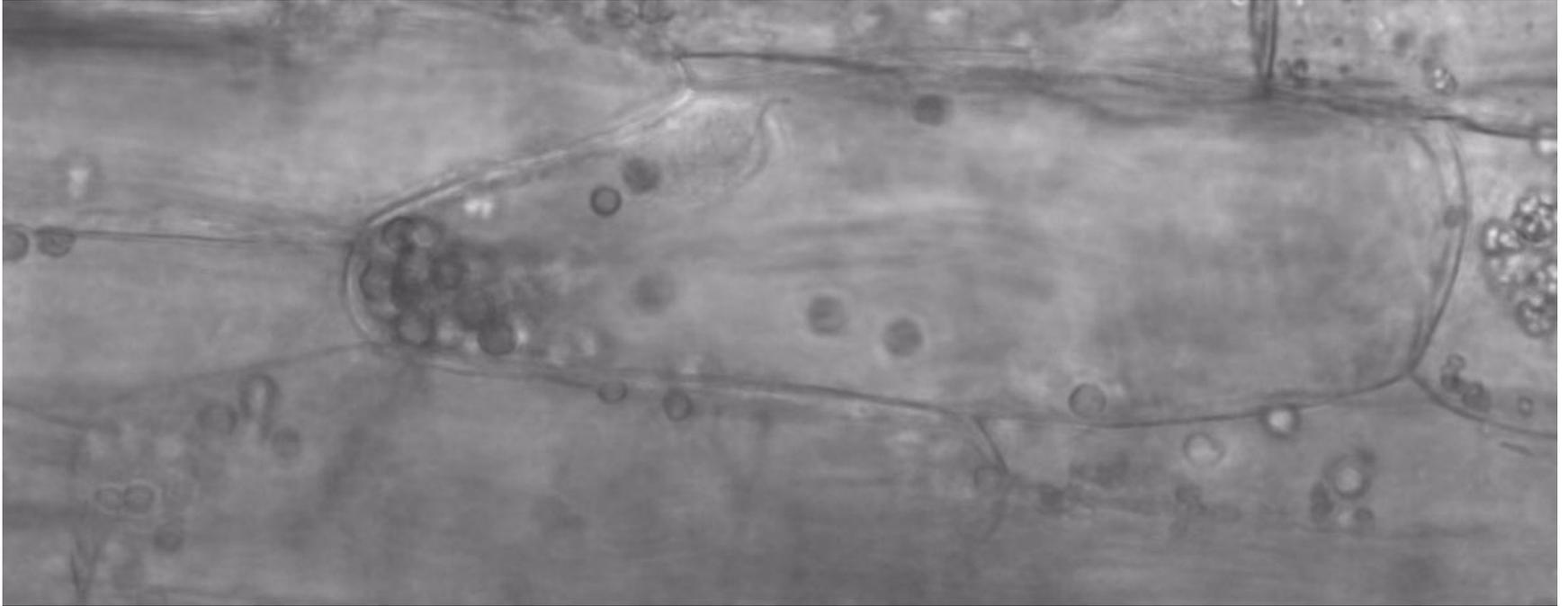
Intervalle : 10 sec

Coléoptile en position verticale  
→ amyloplastes sédimentés dans la partie basale de la cellule



Stimulation gravitropique :  
Inclinaison d'un angle de 90°





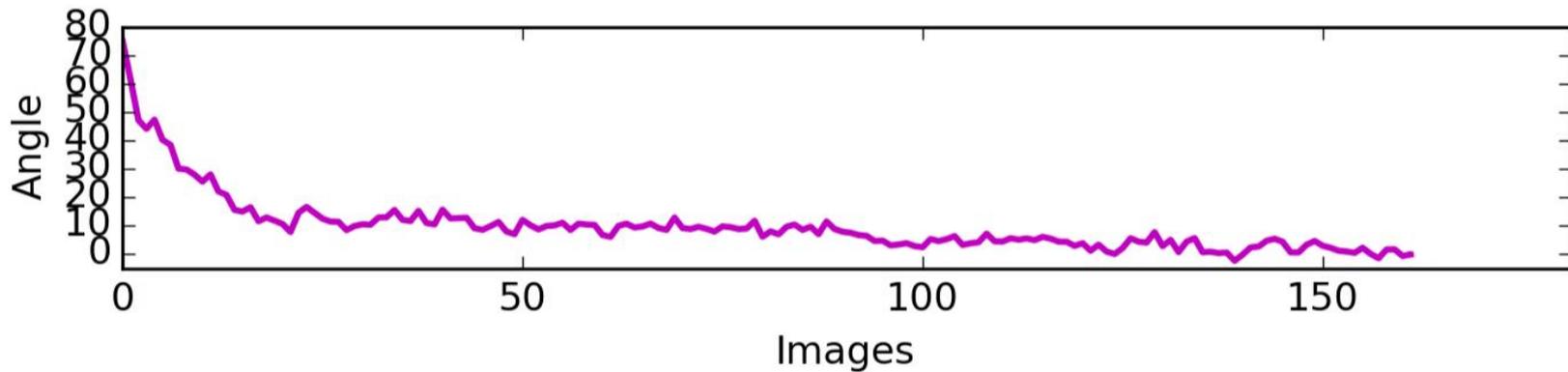
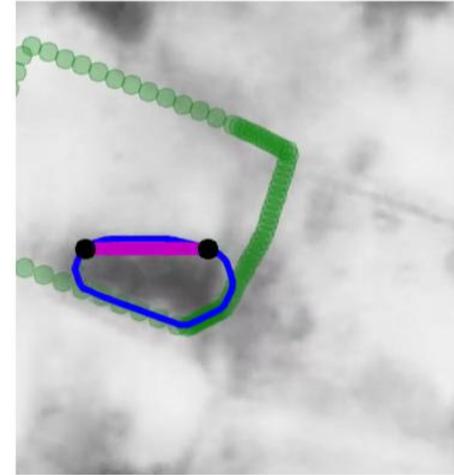
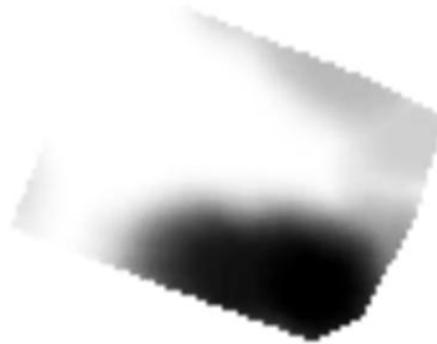
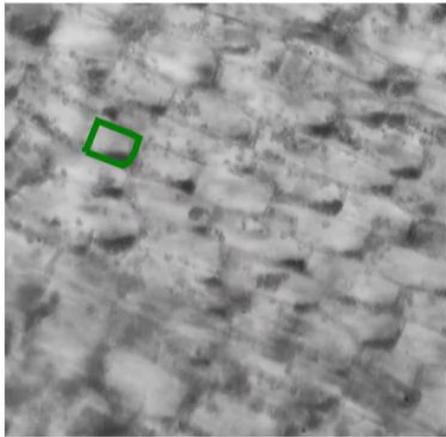
Time lapse :

Durée : 15 min

Intervalle : 10 sec

Analyse d'images (sur chacune des images obtenues durant le time lapse) :

- délimiter le contour des cellules
- seuillage de l'image
- délimiter les "tas" de statolithes
- suivi de l'angle de la surface des "tas"



Durée : 30 min / 5 images toutes les min

## Bilan premiers essais et perspectives...

- Nous avons réussi à visualiser le déplacement des amyloplastes (statolithes)
- Le matériel végétal dans ces conditions d'observation reste vivant !
  - Un problème toutefois : pas d'image live durant le time lapse or les statolithes ne sédimentent pas toujours dans le même plan...on ne peut pas refocaliser...
- Analyse plus précise du comportement individuel des amyloplastes (au x 63)  
+ en relation avec modélisation du comportement des amyloplastes (utilisation de billes artificielles)
- Visualisation du cytosquelette et utilisation de drogues inhibant la polymérisation du cytosquelette : observation de la dynamique des amyloplastes dans ces conditions.

# Remerciements



Olivier Pouliquen

Coordinateur du projet GRAP2



Yoël Forterre



Bruno Moulia



Valérie Legué

IUSTI, UMR CNRS/Université Aix-Marseille

UMR PIAF (INRA - Université Blaise Pascal)



Hugo Chauvet

Post-Doc



Brigitte Girard



Stéphane Ploquin



Dominique Marcon

Photographe