

Introduction à la culture *in vitro* chez les végétaux

Introduction

Définition

La culture *in vitro* est basée sur la mise en culture d'explant en milieu artificiel contrôlé, à l'abri de toutes contaminations (en axénie). Le but de la culture *in vitro* est de permettre la régénération de la plante entière autonome et fertile à partir de la propriété des cellules végétales : la totipotence

La totipotence est l'habilité d'une cellule à se différencier puis après de se développer en un nouvel organisme à part. Les techniques de culture *in vitro* sont des outils qui permettent d'améliorer les plantes mais aussi d'assainir les variétés ou bien de réduire les coûts de productions. Cependant bien d'autres applications sont possibles.

Exemple d'applications

« Racines transformées de *Crepis capillaries* : un système sensible pour l'évaluation de la mutagenicité des agents abiotiques » par Jolanta JUDRIMINK et Jolanta MALUSZYNSKA. Université de Silésie, Pologne, janvier 2005. 565(2):129-38.

La présence d'un large nombre de polluant incluant les agents mutagéniques est un réel problème pour l'environnement. Cependant, grâce au développement des techniques de culture *in vitro* et des méthodes de transformations cellulaires ont permis d'utiliser des racines transformées de *Crepis capillaries* pour l'évaluation cytogénétique des effets mutagènes des agents abiotiques.

Dans cet exemple d'application, la culture *in vitro* permet de créer rapidement des lignées de racines transformées et standardisées. D'autant plus que les racines transformées sont isogéniques. La conclusion de l'article propose, du fait de la bonne sensibilité de ces racines transformées, que cet outil biologique soit employé spécialement pour des échantillons d'eau ou bien des mixtures chimiques.

Principe et bases biologiques de la culture in vitro.

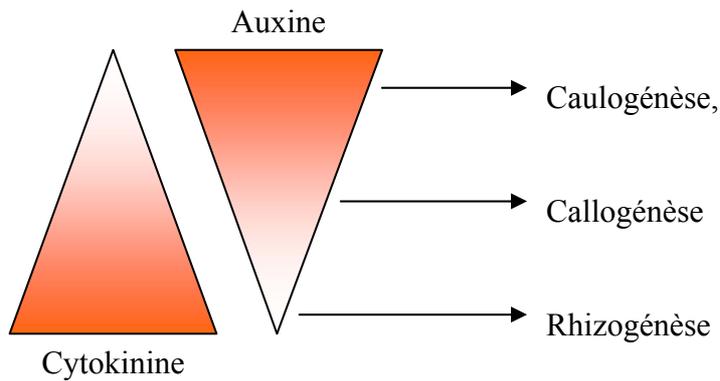


Figure 1: influence des équilibres hormonales sur l'organogénèse

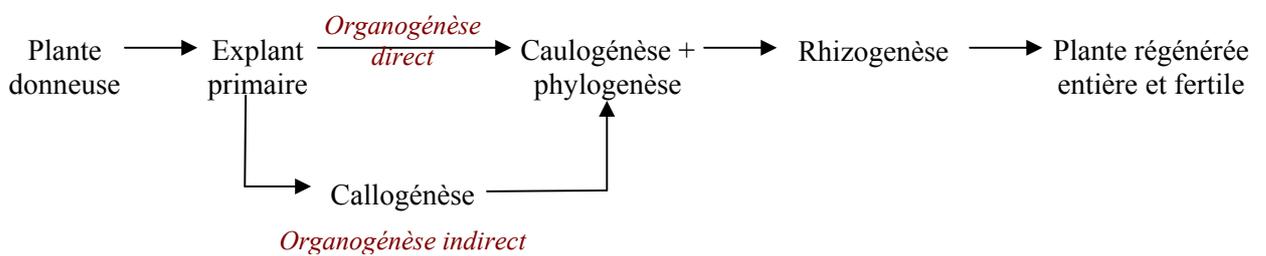


Figure 2 : Schéma de la régénération d'une plante

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Pour les expériences réalisées, les organismes végétaux suivants ont été utilisés :

- Le Saint-Paulia
- Le tabac
- Les pépins de pomme
- La carotte

Nom commun de la plante	Famille	Genre	Espèce
Saint-Paulia	Gesnéniacées	<i>Saintpaulia</i>	<i>ionantha</i>
Le tabac	Solanacées	<i>Nicotiana</i>	<i>tabacum</i>
Les pépins de pomme	Rosacées	<i>Pyrus</i>	<i>malus</i>
La carotte	Apiacées	<i>Daucus</i>	<i>carota spp sativus</i>

Matériel bactérien

Des souches d'*Agrobacterium* ont été utilisées pour l'expérience de « transgénése active par agrobactéries natives ». Différents types de souches ont été utilisées.

Espèce	Souche	Plasmide	Type
<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	C 58	pTi	Armée
<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	C 58 C1	Ø	Désarmée
<i>Agrobacterium Rhizogenes</i>	A4	pRi	Armée

Milieux de culture

Les cultures réalisées à partir des explants prélevés ont été effectuées sur 3 milieux différents :

- Le milieu « carotte » : Il s'agit d'un milieu pauvre puisqu'il est constitué d'eau du robinet et d'agar.

Le milieu Murashige et Skoog est le milieu de base des deux autres milieux utilisés. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines. Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative in vitro.

- Le milieu MS-H : Il s'agit du milieu Murashige et Skoog sans hormones.
- Le milieu MS/4 : Il s'agit du milieu Murashige et Skoog contenant 4 fois plus de cytokinines que d'auxines.

Tous les milieux doivent être stériles afin d'éviter toutes contaminations pouvant nuire aux manipulations.

Méthodes

Les différentes expériences réalisées sont consignées dans le tableau récapitulatif suivant.

Expériences	Matériel vivant	Milieux
Effet de la composition du milieu de culture	Saint-Paulia Tabac	Carotte MS-H MS/4
Mise en évidence du transfert hormonal	Saint-Paulia Tabac	MS-H
Transgénèse active par agrobactéries natives	Carotte	Carotte
Sauvetage d'embryon de pommes	Pépin de pomme	MS-H « mou »
Micropropagation par culture de méristèmes	Vitroplants de tabac	MS-H

Résultats et discussion

Toutes les observations ont été faites après 18 jours de mise en culture.

Expérience 1 : Effet de la composition du milieu de culture

Observation

Pour le Saint Paulia nous avons pu observer :

Milieu	Observations
Carotte	Pas de multiplication cellulaire
MS-H	Formation de boursouflures au niveau des sections préférentiellement et début de formation de poils absorbants.
MS/4	Développement plus important de l'amas cellulaire et formation de protofeuilles

Avec les limbes de Tabac, nous avons pu observer :

Milieu	Observations
Carotte	Cal neigeux au niveau des nervures
MS-H	Cal neigeux avec formation de protofeuilles
MS/4	Développement plus intense d'amas cellulaire avec un cal plus important et le début de formation du bourgeon axillaire

Interprétation sur l'effet du milieu

Le milieu carotte est constitué d'eau du robinet et d'agar les cellules survivent donc grâce à leurs propres réserves car le milieu n'apporte pas les nutriments, ce qui explique l'absence de multiplication cellulaire pour le Saint Paulia et un léger développement pour le tabac mais seulement au niveau des nervures qui contiennent des hormones.

Le possible développement d'un cal s'effectuera plus difficilement avec le milieu MS-H, car même si ce milieu apporte tous les nutriments nécessaires il n'est pas supplémenté en hormones (dont auxine et cytokinine). Les cellules réagissent en fonction du contenu hormonal de leurs tissus pour se développer L'apparition d'amas de cellules montre qu'il y a multiplication cellulaire avec début de formation de poils absorbants. Ce développement est dû à la présence d'auxine dans la feuille.

Pour le milieu MS/ 4 le développement plus intense et plus marqué est dû à la présence d'hormones dans le milieu, en l'occurrence la cytokinine qui permet d'induire la phyllogénèse et la caulogénèse. C'est pour cela que nous observons le développement de protofeuilles et de protobourgeons axillaires. Ce sont les éléments nutritifs qui ont permis l'impulsion du phénomène.

Influence quantitative de l'orientation

Les deux plantes étudiées sont hypostomatées (les stomates se situent principalement au niveau abaxial). Les échanges sont donc facilités au niveau abaxial, par l'intermédiaire des stomates mais aussi, car la cuticule est plus fine du côté abaxial que du côté adaxial.

Conclusion

Cette expérience nous a permis de mettre évidence le caractère totipotent des cellules végétales, l'effet des différentes hormones et donc l'intérêt des unes par rapport aux autres.

Expérience 2 : Mise en évidence du transfert hormonal

Observations

	Observations
Coté biseauté hors gélose	Développement d'une chevelure racinaire puis apparition de feuilles
Coté biseauté dans la gélose	Développement plus lent

Interprétation

La formation d'une chevelure racinaire est le témoin du phénomène de rhizogénèse provoqué par l'accumulation d'auxine. Puis la formation de feuille marque par la suite le phénomène de phyllogénèse due à l'induction de la cytokinine synthétisée dans les racines néoformées

Lorsque le côté biseauté se situe dans la gélose il y a un manque d'oxygène ce qui explique le développement plus lent.

Conclusion

Le flux d'auxine est donc polarisé de l'apex vers les racines et ce transport ne dépend pas de la gravité. A l'inverse la cytokinine est synthétisée au niveau des racines et va avoir un flux ascendant pour induire la phyllogénèse.

Expérience 3 : Transgénèse native par Agrobacterium

Observation

	Observations
Témoin	PI : verdissement du cambium et formation du cal au niveau de cambium
	PN : verdissement du cambium dans la gélose
C58 (armé)	PN : Formation d'un cal au niveau des points d'inoculation.
	PI : Formation d'un cal plus important que le témoin et que PN
C58 C1	Même observation que pour le témoin
A4	Même observation que pour le témoin

Interprétation

Au niveau du cambium (zone méristématique avec cellules indifférenciées) un cal est formé, ceci est dû au flux d'hormones. Les racines synthétisent et sont donc source de cytokinine, de plus il y a un flux d'auxine vers le pôle inversé. L'accumulation d'auxine et la présence de cytokinine à un équilibre entre les deux hormones, d'où le phénomène de caulogénèse

L'observation au niveau des points d'inoculation de phénomènes, de multiplication cellulaire important, est dû aux agrobactéries qui ont transféré aux noyaux de la cellule végétale la région T de leur plasmide pTi. Cette région T contient 2 groupes de gènes importants pour ce phénomène :

- Permet de synthétiser des opines (sources nutritives de la bactérie)
- Induit une surproduction hormonale conduisant à la formation d'une tumeur appelée galle.

Ceci confère une multiplication incontrôlée des cellules végétales, tout en favorisant la multiplication d'*agrobacterium*.

Pour C58C1 les agrobactéries sont désarmées, c'est à dire qu'elles ne possèdent pas de plasmide ainsi il n'y a pas de régions T transféré et donc pas de production d'opine et de surproduction d'auxine. C'est donc bien le plasmide TI qui induit le transport d'information génétique.

Pour A4, l'échec de la formation de racine montre qu'il y a eu un problème au niveau du transfert génétique car le plasmide de la bactérie qui aurait dû par le transfert de sa région T n'est pas exprimé. Il n'a donc pas impliqué la synthèse d'auxine et donc la formation anarchique de racine.

Conclusion

Les hypothèses suivantes peuvent être émises :

- Problème au niveau de l'agrobactérie qui aurait perdu son plasmide
- Les signaux émis par la plante (monosaccharides et polyphénols) ne sont pas reconnus par la bactérie.

Expérience 4 : Sauvetage d'embryon de pomme

	Observations
Graine intacte	pas de développement de plantule
Graine sans tégument	développement important de la plantule (feuille, tige et racine). Les cotylédons sont présents et ont verdint
Embryon seul	développement de la plantule moins rapide absence des cotylédons.

Interprétation

Le non développement de plantule de la graine entière est dû à la présence du tégument. En effet, il induit la dormance chimique des graines par la présence de polyphénol ce qui empêche la germination.

En revanche, l'association entre l'embryon et les cotylédons a permis le développement de la plantule d'une part en raison de l'absence d'induction de dormance et d'autre part la présence des cotylédons qui sont une source d'énergie.

La formation plus lente de l'embryon seul est due au fait que le milieu de culture se substitue aux cotylédons et nourrit l'embryon.

Conclusion

L'embryon est capable de germer en milieu artificiel donc le sauvetage d'embryon fonctionne.

Expérience 5 : Micropropagation par culture de méristèmes

Observation

Le nœud et l'apex ont formé des plantules (feuilles, racines, tiges) avec un développement plus important pour le nœud

Interprétation

En retirant la dominance apicale pour le nœud la dormance du bourgeon axillaire a été supprimée. Dans un premier temps, les bourgeons s'allongent accompagnés d'un phénomène de rhizogénèse. Il y a synthèse d'auxine de l'apex et des feuilles jeunes de l'apex vers la base

de la tige car le flux de l'auxine est polarisé. Ceci induit la formation de racine adventive formée à la base de la tige.

Remarque : Lors de la contamination du milieu par un microorganisme, comme par exemple un champignon, on observe alors une compétition entre le champignon et la plante avec un envahissement plus important des champignons qui possèdent un cycle cellulaire plus court.

Conclusion

La propriété de la propagation par culture de méristèmes permet la multiplication rapide du matériel végétal.

Conclusion

Ce TP nous a permis de nous familiariser avec les bases des techniques de culture *in vitro* chez les végétaux.

Nous avons pu observer en particulier l'importance des équilibres hormonaux dans les processus d'organogénèse. L'étude des différents milieux de culture nous a permis d'étudier la totipotence des cellules végétales notamment par l'observation de cals.

La transgénèse par les agrobactéries natives nous ont permis d'étudier et d'approcher les méthodes et les outils de biotechnologie offrant un large potentiel pour l'avenir.