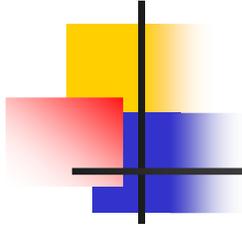
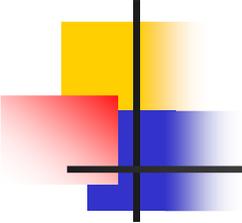


L3 Génétique
Module: Culture in vitro
Enseignant : BENMAHIOUL B.



Milieux de Culture



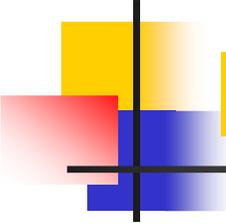
Introduction

La réussite de la culture des tissus végétaux dépend de la composition chimique des milieux de culture utilisés ainsi que d'autres facteurs ambiants.

Pour une bonne croissance, les plantes ont besoin d'importantes quantités de macroéléments comme, l'azote, le potassium, le calcium, le phosphore, le magnésium, le soufre et aussi d'oligo-éléments comme les sels de fer, manganèse, zinc, bore, cuivre, molybdène et cobalt.

Le milieu de culture doit contenir tous ces éléments ainsi que des hydrates de carbone (généralement du saccharose) qui viennent de remplacer le carbone que la plante absorbe de l'atmosphère lorsqu'elle réalise la photosynthèse.

Pour obtenir de meilleurs résultats, il faut ajouter au milieu de petites quantités de composés organiques dont des vitamines, des acides aminés et des régulateurs de croissances.



Les milieux de culture

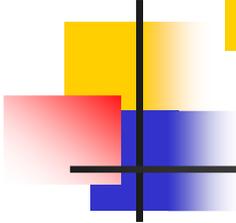
En règle générale les milieux de culture sont composés des constituants suivants:

I. Sels inorganiques = sels minéraux

a)- Macroéléments

Les tissus végétaux ont besoin d'une source constante de composés inorganiques. Les éléments essentiels en plus du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène sont: **N**, **P**, **K**, **Ca**, **Mg** et **S**

Macroéléments
N (azote)
S (soufre)
P (phosphore)
K (potassium)
Ca (calcium)
Mg (magnésium)



Les milieux de culture

a)- Macroéléments

l'azote doit être présent en grande quantité et il se trouve dans le milieu de culture sous forme de nitrate ou d'ion d'ammonium, ou comme combinaison des deux ions.

Le sulfate de magnésium (**MgSO₄. 7H₂O**) répond à la demande en magnésium et en soufre

Le phosphore peut s'ajouter sous forme de **NaH₂PO₄.H₂O** ou **KH₂PO₄**.

Le potassium qui se trouve en grande quantité dans la nature; c'est un cation que l'on additionne sous forme **KCl**, **KNO₃** ou **KH₂PO₄**

Le calcium s'ajoute avec **CaCl₂.2H₂O**, **Ca(NO₃)₂.4H₂O** ou sous forme de n'importe quel sel

Le Chlore est présent sous forme de **KCl** ou **CaCl₂**



Les milieux de culture

b)- Oligoéléments

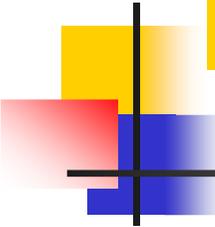
Pour une activité métabolique appropriée, les cellules végétales ont besoin d'oligoéléments. Les plus essentiels sont : **Fe**, **Mn**, **Zn**, **Bo**, **Cu**, **Co** et **Mo**. Les cinq derniers sont fondamentaux pour la synthèse de la chlorophylle et le fonctionnement des chloroplastes.

Le **Fe** est nécessaire pour la formation des précurseurs de la chlorophylle.

Le **Mn** permet d'entretenir l'ultra structure et le processus de photosynthèse

Cu et **Zn** sont utiles pour l'oxydation et l'hydrogénation des composés phénoliques.

<i>Micro-éléments</i>
Fe (fer)
Mn (manganèse)
Zn (zinc)
B (bore)
Cu (cuivre)
Co (cobalt)
Ni (nickel)
Al (aluminium)
Mo (molybdène)
I (iode)



Les milieux de culture

b)- Oligoéléments

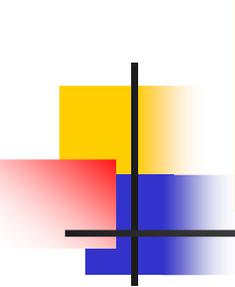
Mo et **Fe** sont des constituants des enzymes nitratoréductase et nitrogénase.

Bo est nécessaire pour entretenir l'activité des méristèmes, il participe à la synthèse des bases azotés et en particulier de l'uracile (*base pyrimidique présente dans l'acide ribonucléique cellulaire*).

Divers oligoéléments sont liés à l'activité des régulateurs de croissance, par exemple: Zn-auxines: **Zn** est lié à la synthèse du tryptophane, précurseur de l'**AIA**.

Bo: une déficience du bore inhibe la synthèse des cytokinines mais augmentent les niveaux d'auxines

Les chélate, par exemple **EDTA** (acide éthylène dinitrotétra-acétique), des petites concentrations de EDTA incitent la croissance et permettent que le fer soit disponible en petites quantités.



Les milieux de culture
I. Sels inorganiques
II. Vitamines

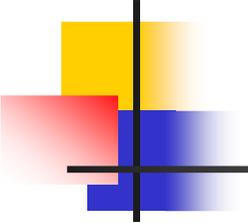
II. Vitamines

Elles sont nécessaire en petites quantités pour produire une série de réactions catalytiques dans le métabolisme. Les vitamines les plus employées sont:

La **Thiamine (Vitamine B1)** : On l'ajoute sous forme de thiamine HCl en quantité comprise entre 0,1 mg/l et 30 mg/l. C'est la seule vitamine essentielle à la croissance des cellules végétales.

L'**acide nicotinique** (niacine)

La **pyridoxine (Vitamine B6)**: on l'ajoute sous forme de pyridoxine HCl



II. Vitamines

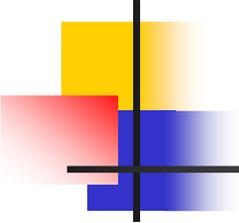
Le **méso-inositol**: il produit un effet stimulant sur la morphogenèse car il participe probablement à la synthèse de l'acide galacturonique.

L'**acide panthoténique** : il aide à la croissance de certains tissus

L'**acide folique** : il diminue la prolifération des tissus dans l'obscurité, tandis qu'il l'augmente à la lumière car il est hydrolysé en acide P-amino -benzoïque en présence de lumière.

La **Riboflavine** : c'est un inhibiteur de la croissance de racines.

La **vitamine E** : elle aide à la formation des cals provenant d'embryons et elle contribue à la viabilité des cellules dans les cultures en suspension.



**Composition de quelques solutions
vitaminiques (exprimée en mg/l).**

<i>Vitamines</i>	<i>DF</i>	<i>MR</i>	<i>MS</i>
<i>Thiamine HCL</i>	13,50	1	1
<i>Biotine</i>	0,25	0,01	-
<i>Riboflavine</i>	3,80	-	-
<i>Pyridoxine HCL</i>	1,20	1	0,5
<i>Pantothénate de calcium</i>	2,40	1	-
<i>Acide ascorbique</i>	1,80	-	-
<i>Acide folique</i>	0,90	-	-
<i>Chloride choline</i>	1,40	-	-
<i>Myo-inositol</i>	108,10	100	100
<i>Acide nicotinique</i>	5,00	1	0,5



Les milieux de culture

I. Sels inorganiques

II. Vitamines

III. Régulateurs de croissance

III. Régulateurs de croissance

En générale, 3 groupes hormonaux sont utilisés en culture de tissus végétaux :

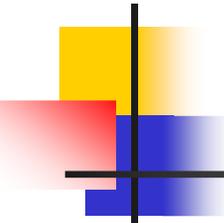
Les **auxines** : elles favorisent l'élongation des cellules.

1. AIB (acide indol butyrique) : dosé de 0,1 à 10 mg/l

AIA (acide indol acétique) : = = = =

2. ANA (acide naphtalène acétique) : dosé de 0,001 à 10 mg/l

2,4 D (acide 2,4 Dichloro-phénoxy-acétique) : = = = =



III. Régulateurs de croissance

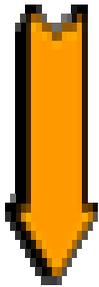
Les **cytokinines** : elles favorisent la division cellulaire et l'organisation des cals. Les plus utilisées sont la BA (Benzyladenine), la Kinétine et la Zéatine en concentration de 0,03 à 30 mg/l. La BA est cependant la plus employée.

L'**acide gibbérellique** : il favorise l'élongation tissulaire.

Type d'organogenèse contrôlé par la balance hormonale

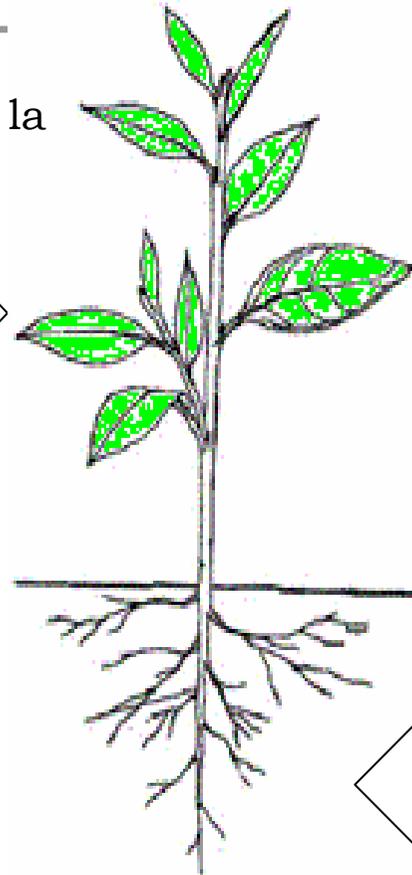
Les auxines sont produites dans la partie terminale de la plante

Auxines



Favorisent la rhizogenèse

S'opposent au développement des bourgeons



S'opposent au développement des racines

Favorisent la caulogenèse

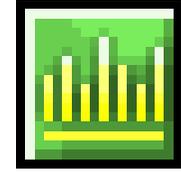


Cytokinines

Les cytokinines sont produites au niveau des racines.

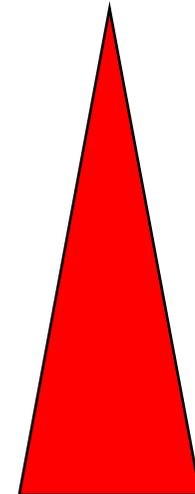
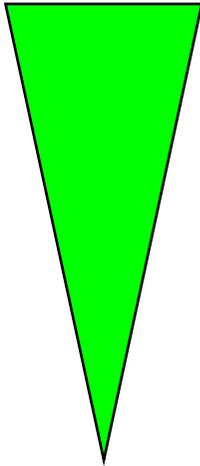


Le rapport cytokinine/auxine est déterminant pour la morphogenèse :



Auxine

Cytokinine



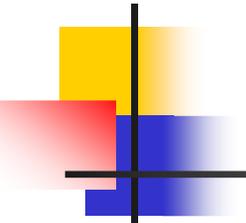
_____ **Rhizogenèse** _____

_____ **Embryogenèse Somatique** _____

_____ **Rhizogenèse sur cal** _____

_____ **Bourgeonnement Adventif** _____

_____ **Bourgeonnement Axillaire** _____



Les milieux de culture

I. Sels inorganiques

II. Vitamines

III. Régulateurs de croissance

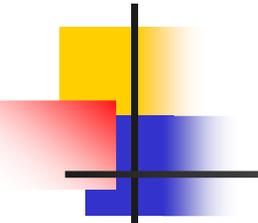
IV. Acides aminés

IV. Acides aminés

Les acides aminés procurent aux tissus une source immédiate d'azote à assimilation plus rapide qu'avec l'azote inorganique fourni par le milieu.

Les principaux AA dans les systèmes *in vitro* ont les fonctions suivantes :

la glutamine et l'asparagine transportent l'azote; la L-arginine stimule les racines; la L-sérine est employée dans la culture de microspores et la L-cystéine est un agent réducteur.



Les milieux de culture

I. Sels inorganiques

II. Vitamines

III. Régulateurs de croissance

IV. Acides aminés

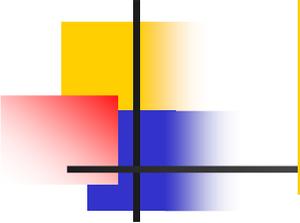
V. Hydrates de carbone

V. Hydrates de carbone

Ils sont utilisés comme source d'énergie et comme régulateurs osmotiques. La saccharose est le sucre employé universellement . Viennent ensuite par ordre d'importance le glucose, le maltose, le raffinose, le fructose, le galactose, le mannose et le lactose. La concentration employée pour le saccharose est de 20 à 45 g/l.

VI. Eau

Il convient d'utiliser pour la préparation des solutions, de l'eau distillée, bi distillée, ou déminéraliser et que dans tous les cas la distillation finale doit être faite avec un distillateur en verre.



Les milieux de culture

I. Sels inorganiques

II. Vitamines

III. Régulateurs de croissance

IV. Acides aminés

V. Hydrates de carbone

VI. Eau

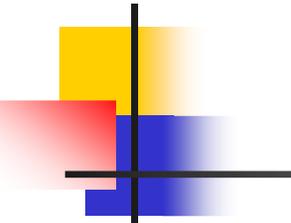
VII. Agent solidifiant

VII. Agent solidifiant

C'est l'agar qu'on utilise communément comme support gélosé pour la préparation des milieux solides et semi solides. Les avantages de l'agar sont :

- l'agar forme avec l'eau un gel qui fond à 100°C et se solidifie à 45°C. ceci veut dire que ce gel est stable quelque soit les températures d'incubation
- l'agar ne réagit pas avec les constituants du milieu
- l'agar n'interfère pas avec la mobilisation des constituants du milieu

D'autres composants ont été testés pour remplacer l'agar, mais sans réel succès. Le plus connu est peut être la « Gelrite ».



Les milieux de culture

I. Sels inorganiques

II. Vitamines

III. Régulateurs de croissance

IV. Acides aminés

V. Hydrates de carbone

VI. Eau

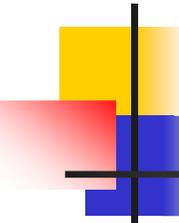
VII. Agent solidifiant

VIII. Autres additifs

VIII. Autres additifs

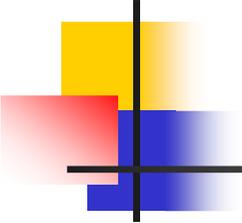
On utilise aussi d'autres additifs tels que :

- Le jus et les extraits de divers fruits (ex: lait de coco, etc.)
- La caséine hydrolysée (protéine)
- Les anti-oxydants comme l'acide ascorbique
- Les absorbants comme le charbon activé



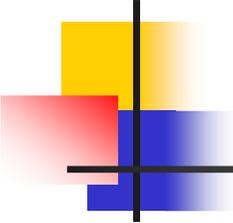
Composition des différents milieux de culture

Comme signalé précédemment, la composition des milieux de culture fait l'objet dans la littérature de nombreuses formulations qui parfois se distinguent l'une de l'autre par un seul de leurs constituants. Cette situation complique la prise de décision.



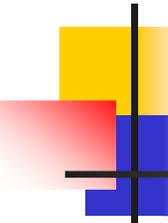
Composition de quelques solutions macrominérales
(exprimée en mg/l).

Macroéléments	DKW	MS	WT	KN
NH_4NO_3	1418,8	1650	-	-
KNO_3	-	1900	80	250
K_2SO_4	1560	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1963,7	-	300	1000
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,6	440	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	740	370	720	250
KH_2PO_4	258,4	170	-	250
KCl	-	-	65	-
Na $H_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	16,5	-
Na_2SO_4	-	-	200	-



Composition de quelques solutions microminérales
(exprimée en mg/l).

<i>Micro-éléments</i>	<i>MS</i>	<i>NT</i>	<i>QL</i>
<i>KI</i>	0,83	-	0,080
<i>H₃BO₃</i>	6,2	10	6,2
<i>MnSO₄ 4H₂O</i>	22,3	25	1
<i>ZnSO₄ 7H₂O</i>	8,6	10	8,6
<i>Na₂MoO₄ 2H₂O</i>	0,25	0,25	0,25
<i>CuSO₄ 5H₂O</i>	0,025	0,025	0,025
<i>CoCl₂ 6H₂O</i>	0,025	-	0,025



Comment choisir le milieu de culture adéquat

Dans la littérature il est fait référence à de nombreux milieux de culture et il est toujours conseillé d'en faire une revue exhaustive avant d'entreprendre une expérimentation avec la culture de tissus.

Le succès d'une expérimentation dépend de la bonne compréhension des besoins nutritifs des tissus. De fait, les facteurs les plus importants pour la réussite de la culture sont d'origine de l'explant, les composés nutritifs et les régulateurs de croissance employés.

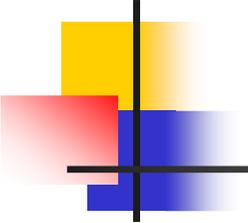
Donc, le choix de la composition nutritive se fait en fonction de plusieurs paramètres, notamment la nature des tissus cultivés (bourgeons, embryons, méristèmes, cellules,...etc.) et de la phase de la culture (étape d'initiation, de multiplication, d'élongation ou de rhizogenèse).

Comment choisir le milieu de culture adéquat

Les paramètres nutritionnels pour choisir un milieu:

- *- Richesse en Azote, en potassium et calcium de la solution minérale adoptée.
- *- Équilibre en l'azote nitrique et l'azote ammoniacal : $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$.
- *- Pression osmotique de la solution minérale qu'on appelle aussi concentration ionique totale.

<i>Chercheurs</i>	<i>Concentration ionique totale (mM)</i>	<i>Ions dominants</i>	<i>Forme d'apport de l'azote</i>
Gamborg	60,2	NO_3^- , K^+	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+=12,50$
Murashige et Skoog	93,3	NO_3^- , NH_4^+ , K^+	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+=1,91$
Gautheret	9,6	NO_3^- , Ca^{++} , K^+	Seulement le NO_3^-
Heller	39,8	K^+ , Na^+ , Cl^-	Seulement le NO_3^-
Knop	23,3	NO_3^- , Ca^{++}	Seulement le NO_3^-
White	17,5	SO_4^{--} , Mg^{++} , NO_3^-	Seulement le NO_3^-
monnier	92,4	NO_3^- , K^+ , Cl^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+=2,8$



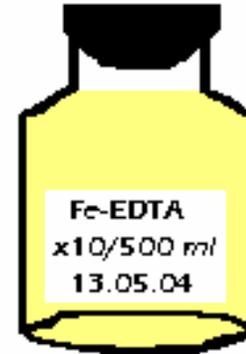
Préparation des milieux de culture

Un milieu synthétique est composé de éléments suivants :

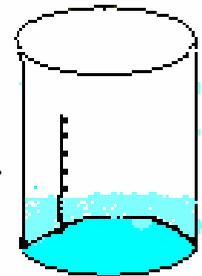
- macroéléments (N, K, P, Mg, Ca)
- micro-éléments (Fe, Cu, Bo, Mn,Zn,..)
- vitamines
- sucres (glucose ou saccharose)
- substances de croissance
- gélose (= agar-agar)

On note :

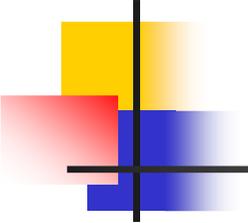
- *- la nature de la solution :
Exemple macroéléments de MS.
- *- la concentration de la solution :
Exemple concentrée 10 fois : (X10).
- *- date de préparation :
Exemple le 13.05.2004



On prépare la solution d'Inositol lors de la préparation du milieu



20 ml d'inositol



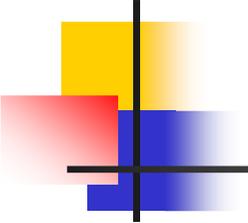
Préparation des milieux de culture

La préparation des milieux de culture s'effectue suivant les étapes ci-dessous :

1- dilution des sels minéraux : macro, micro-éléments et fer.

2- ajouter le sucre puis ajuster le volume à l'aide d'une éprouvette. Il ne faut pas dépasser le volume du milieu qu'on veut le préparer.

« C'est-à-dire : **il faut prendre en considération les volumes à ajouter des autres solutions mères, notamment la solution vitaminique et hormonale ainsi le méso inositol.** »



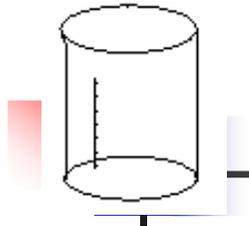
Préparation des milieux de culture

3- on mesure le pH de notre solution. La correction se fait avec le KOH ou le NaOH. Le plus souvent le pH est ajusté à une valeur variant entre 5,5 à 6,0.

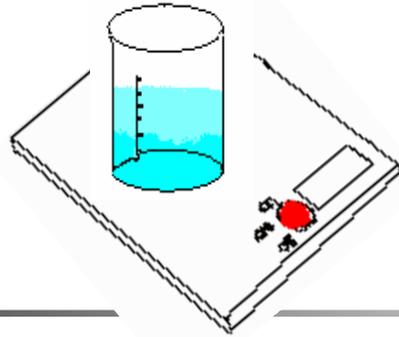
4- Chauffer bien le milieu jusqu'à l'ébullition pour dissoudre le solidifiant « la gélose ».

5- lorsque la gélose est complètement dissoute, on ajoute les vitamines (sans oublier l'inositol) et les substances de croissance (mesurer avec précision les volumes).

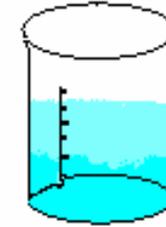
6- Répartir le milieu préparé dans des récipients en verre stériles (tubes, bocaux, flacons,...).



On prend un Becher de 1L

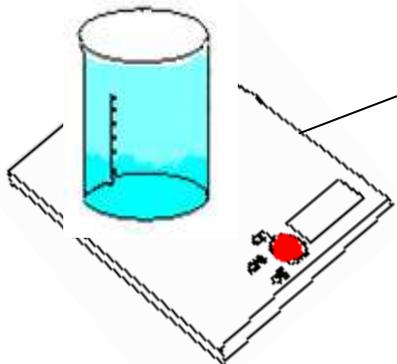


On prend à l'aide d'une pipette ou seringue les sels minéraux : macro, micro et le chélate de fer.
Agitation



On ajoute par la suite le saccharose et on ajuste jusqu'à 972,5 ml (il ne faut pas oublier les volumes des vitamines et hormones qu'on doit les ajoutés après correction du pH).

Agitation



Plaque chauffante-agitateur.

Chauffer bien le milieu jusqu'à l'ébullition pour dissoudre la gélose.

Corriger le pH avec le KOH ou le NaOH 0,1 N. Le pH est ajusté à une valeur variant entre 5,5 à 6,0.

Lorsque la gélose est complètement dissoute, on ajoute les vitamines, Inositol et les hormones

Répartir le milieu préparé dans des récipients en verre stériles (tubes, bocaux, flacons, ..).

Modèle de fiche pour préparation des milieux de culture

Date	Fiche de milieu (x)						
Constituants	Quantités réelles						
Caractéristiques							
Codes							
<u>Sels minéraux :</u> Macroéléments : Micro-éléments : Fer :							
pH							
Sucre (s) :							
Vitamines :							
Régulateurs de croissance :							
Agar-agar :							
Divers :							
Eau :							
Observations :							