culture de protoplastes

publié le 15.01.00 |par yvan kraepiel, roger prat, luc richard, jean-pierre rubinstein

protocole d'obtention de protoplastes à partir de chou rouge et de poireau. réalisation de fusion entre protoplastes.

document réalisé par « biologie et multimédia » à partir de données obtenues en travaux pratiques à la préparation à l'agrégation de paris 6. depuis la rédaction de cet article, certains fournisseurs proposent des kits prêts à l'emploi.

1. introduction

définition : les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi, obtenues expérimentalement par digestion de la paroi pectocellulosique. pour obtenir ces protoplastes et les maintenir en vie, il faut les préparer et les conserver dans un milieu hypertonique qui plasmolyse les cellules et leur permet de ne pas éclater par entrée d'eau en l'absence de paroi.

intérêt : comme elles n'ont plus de paroi, ces cellules se prêtent à divers types d'expérimentation (introduction de matériel génétique étranger, fusion interspécifique, étude électrophysiologique de la membrane plasmique, etc.)

les photographies sont présentées sous forme de vignettes. cliquer dessus pour obtenir les photographies en plus grand format (640 × 400 pixels).

2. matériel biologique



figure 1 - chou rouge
un chou rouge entier en coupe longitudinale : il est constitué par un énorme bourgeon. seules les assises externes des feuilles sont colorées.

auteur(s)/autrice(s) : coyau licence : cc-by-sa source : wikimedia

le chou rouge et le poireau ont été choisis pour leur grande résistance. ils possèdent une cuticule épaisse qui les protège de la déshydratation même si on les oublie un peu longtemps sur la paillasse. pour les fusions, les protoplastes sont facilement reconnaissables. les protoplastes de poireau sont verts grâce aux chloroplastes bien visibles. les protoplastes de chou rouge ne sont pas chlorophylliens ; ils sont rouges grâce aux anthocyanes contenues dans leurs vacuoles.

comme le montre la coupe longitudinale du chou-rouge, le mésophylle des feuilles n'est pas coloré. les vacuoles à anthocyanes ne se trouvent que dans l'épiderme et quelques assises sous-jacentes.

3. protocole d'obtention

3.1. solution enzymatique d'incubation

nombreux sont ceux qui veulent réaliser cette manipulation. il manquait jusqu'à présent des références précises sur les produits. dans ce document nous vous proposons deux types de tampons.

3.1.1. tampon phosphate

produits pour 100 ml de tampon phosphate 10 mm à ph 5,8 :

- 0,1 g de macérozyme onozuka r10
- 0,1 g de cellulase onozuka r10
- 10 g de mannitol (soit une concentration finale de 0,6 m)

préparation :

- réaliser une solution de nah_2po_4 à 0,2 m (solution a) et une solution de na_2hpo_4 à 0,2 m (solution b).
- mélanger 4,6 ml de solution a, 0,4 ml de solution b, 95 ml d'eau.

références :

- cellulase onozuka r10 réf : 16419.02
- macérozyme onozuka r10 réf : 28302.02
- serva, distribué par coger, 79 rue des morillons 75015 paris tél : 01 45 33 67 17

3.1.2. tampon mes

produits pour 100 ml de tampon mes 5 mm à ph 5,6 sigma : référence m-8250

- 0,2 g de pectinase
- 1 g de cellulase
- 13 g de mannitol
- $cacl_2$ 1 mm

préparation :

- préparer une solution mère à 100 mm
- ajuster le ph à 5,6 avec koh 0,1 m
- préparer la solution finale à 5 mm

- ajouter $cacl_2$ 1 mm
- ajouter le mannitol à 13 %
- ajouter les enzymes cellulase et pectinase

références :

- cellulase : caylase 345
- pectinase : m2
- société cayla, zi montaudran, 5 rue jean rodier 31400 toulouse tél : 05 62 71 69 39 - fax : 05 62 71 69 30
- tampon mes : réf m-8250 (par 10 g) sigma

les enzymes sont interchangeables.

3.1.3. remarques

- $cacl_2$: permet une meilleure stabilisation des membranes
- tampon : nécessité absolue d'un tampon acide (ph 5,5 à 5,8) peu concentré. le tampon phosphate est le plus facile à se procurer, mais ce n'est pas le meilleur pour les protoplastes. d'autre part le calcium précipite dans du tampon phosphate (!). il vaut mieux utiliser le mes.
- temps d'incubation : 4 heures à 28 °c, soit une nuit à la température du labo.
- pour obtenir de grandes quantités de protoplastes permettant des manipulations, utiliser des solutions plus concentrées (1 g de macérozyme et 1 g de cellulase en conservant la même concentration en mannitol et le même ph). attention, les enzymes coûtent cher. préparer seulement la quantité nécessaire. s'il en reste, on peut congeler la solution. au moment de la décongélation, agiter la solution au bain marie (30 °c maximum) pour remettre le mannitol en solution. à l'inverse, les concentrations indiquées pour les enzymes cayla peuvent être divisées par 2.

3.2. préparation du matériel biologique

- faire des lamelles tangentielles fines dans une feuille de chou rouge et placer les lamelles immédiatement dans la solution enzymatique, la face sectionnée contre la solution.
- enlever l'épiderme d'une feuille de poireau sur une petite surface (1 cm^2). découper le morceau dénudé et le poser sur la solution enzymatique, la face dénudée vers le bas. répéter l'opération jusqu'à recouvrir la surface de la boîte avec les morceaux de feuilles.

figure 2 : préparation de l'épiderme

		
découpage de la feuille de chou-rouge en lamelles tangentielles.	***ablation de l'épiderme d'une portion de feuille de poireau.***	***fragment de feuille de poireau dont une partie de l'épiderme a été enlevée.***

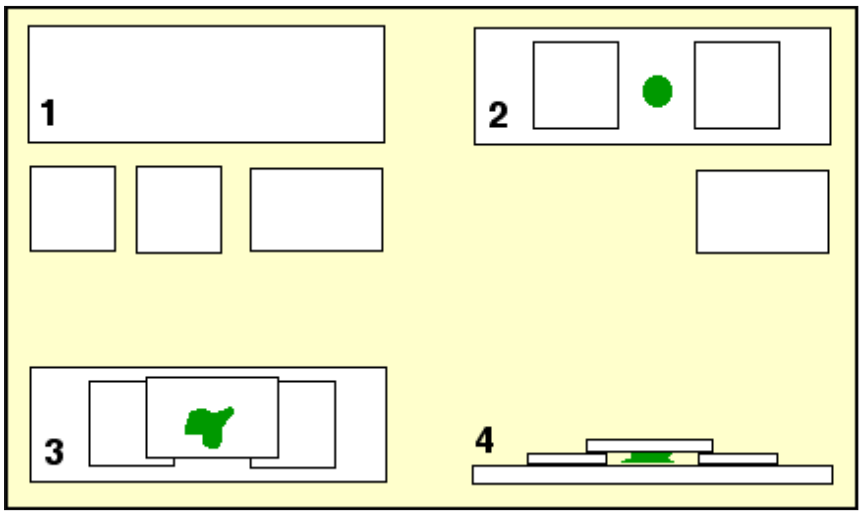
3.3. incubation

- **fermer les boîtes de pétri avec leur couvercle et placez-les à l'étuve à 25 °c.**
- **durée de l'incubation : au minimum 3 h, donc préparer le matin pour un tp du soir. pour obtenir beaucoup de protoplastes, préparer la veille mais attention, les protoplastes sont fragiles et les milieux peuvent s'infecter (bactéries)**

3.4. préparation de chambres humides

- **sur une lame d'histologie, placer 2 lamelles séparées de 1 cm.**
- **poser à la pipette une goutte de suspension cellulaire à étudier entre les deux lamelles.**
- **placer une troisième lamelle à cheval sur les deux premières pour observer la préparation.**

figure 3 : différentes étapes de la confection d'une chambre humide

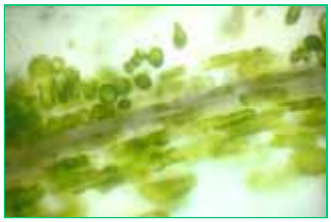
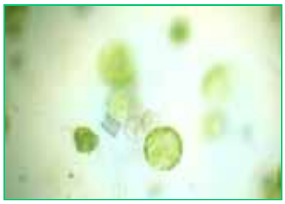


l'épaisseur des lamelles est exagérée dans le schéma n°4.

4. observation des protoplastes

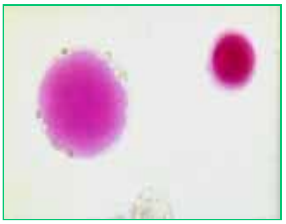
4.1. étapes de la formation de protoplastes chlorophylliens à partir de mésophylle de feuilles de poireau

figure 4 : formation de protoplastes chlorophylliens à partir de mésophylle de feuilles de poireau

		
digestion des parois. les protoplastes viables se libèrent progressivement des parois cellulaires digérées par les enzymes.	***détail : les protoplastes, cellules sans paroi prennent progressivement une forme sphérique.***	***les protoplastes viables formés voisinent avec des débris cellulaires et des protoplastes morts. noter au centre un petit morceau de trachéide spiralée.***

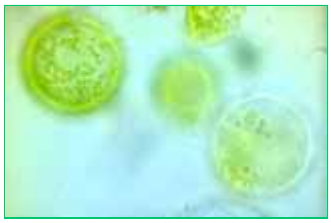
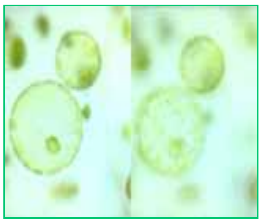
4.2. observation de protoplastes de chou rouge

figure 5 : obtention de protoplastes à partir de feuilles de chou-rouge

		
deux protoplastes de chou rouge. celui du haut montre nettement le cytoplasme qui entoure la vacuole. celui du bas montre son noyau derrière la vacuole colorée.	***même observation. les vacuoles présentent des couleurs variables dues aux anthocyanes et aux interactions avec le ph local.***	***détail : on observe nettement la membrane plasmique, le cytoplasme comprenant de nombreux organites (mitochondrie,s plastes peu différenciés, etc).***

4.3. observation de protoplastes de poireau

figure 6 : observation de protoplastes de feuilles de poireau

		
sur le protoplaste du centre, la mise au point optique montre les chloroplastes dans le cytoplasme périphérique.	***sur le protoplaste de gauche, les chloroplastes situés sur le pourtour sont peu nets mais on distingue bien ceux qui se situent sur le dessus du protoplaste.***	***deux protoplastes vus avec des mises au point différentes.***

5. réalisation de fusions

5.1. préparation de la solution fusionnante

pour 100 ml de tampon ph 7 :

- **40 g de peg (poly ethylène glycol réf. : p3640 chez sigma)**
- **glucose 2 g**

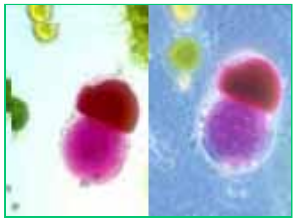
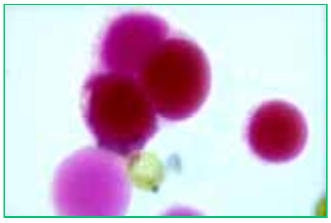
- **nitrate de calcium 1,5 g**
- **il n’est pas nécessaire d’ajouter du mannitol. malgré son fort poids moléculaire, le peg et les autres ingrédients maintiennent une pression osmotique suffisante.**

5.2. protocole

- **dans une chambre humide, déposer une goutte de suspension de protoplastes de chou rouge et une goutte de suspension de protoplastes de poireau.**
- **mélanger délicatement avec la pointe de la pipette ou une spatule fine.**
- **ajouter une goutte de la solution de peg et mélanger délicatement.**
- **recouvrir d’une lamelle et observer immédiatement.**
- **lorsque vous observez un accolement particulièrement intéressant, restez sur cette observation en attendant la fusion complète des cytoplasmes.**

5.3. observation d’accolements ou de fusions

figure 7 : fusions de protoplastes

		
accolement entre deux protoplastes de chou rouge. la fusion des cytoplasmes n'a pas encore eu lieu. sur la photographie de droite, prise au contraste de phase, on observe le début d'une prolifération bactérienne.	***un accolement généralisé entre plusieurs protoplastes de chou rouge. un petit protoplaste de poireau est sur les rangs. pour les deux protoplastes supérieurs, les cytoplasmes sont fusionnés. les vacuoles restent indépendantes.***	***un accolement entre un gros protoplaste de poireau, un petit protoplaste de poireau et un protoplaste de chou rouge. les deux protoplastes de poireau sont très bien accolés mais pas encore fusionnés. le protoplaste de chou rouge et le gros de poireau sont peut-être fusionnés mais leur position ne permet pas d'être affirmatif.***

CRÉDITS

AUTEUR(S)/AUTRICE(S)

yvan kraepiel

maître de conférences à l'université pierre et marie curie.

roger prat

professeur de physiologie végétale à l'université pierre et marie curie.

luc richard

maître de conférences à l'université pierre et marie curie.

jean-pierre rubinstein

botaniste à l'université pierre et marie curie.

LICENCE DU TEXTE DE L'ARTICLE

