**«Biotechnologie végétale »**

**I- Définitions de la biotechnologie**

· Utilisation des techniques de fermentation et dérivées Production industrielle de biens et de services par des procédés faisant appel à des organismes biologiques, et fondée sur des expertises dans les domaines de la microbiologie, la biochimie et l’ingénierie chimique

C’est l’utilisation des techniques de l’ADN recombinant pour la production de protéines recombinantes ou l’amélioration de certains caractères chez des organismes génétiquement modifiés dans une optique de production. La biotechnologie est une technologie basée sur la biologie, plus particulièrement dans le contexte de l’agriculture, de la science des aliments et de la médecine.

**II- Aspects historiques du développement des cultures *in vitro***

1934 : Identification de l’acide indole acétique (IAA) par Kogl

1934 : Gautheret échoue dans la culture de cambium de ligneux

1935 : White réussit la culture de racines de tomates

1939 : Gautheret cultive du cambium de carotte et de tabac (utilisation d’auxine)

1941 : le lait de coco dans la composition du milieu de culture *in vitro* de Datura

1943-1950 : Travaux sur l’agent bactérien de la galle du collet

1949 : Culture *in vitro* de fruits (Nitsch)

1951 : Culture d’ovaires (Nitsch)

1951 : Contrôle chimique de la croissance et de la formation d’organes (Skoog)

1952 : Microbouturage

1952 : Culture d’embryons de Dahlia 1953: Cal haploïde à partir de pollen

1954 : Cal à partir d’une cellule unique (Muir)

1955 : Identification de la kinétine (une cytokinine)

1956 : brevet sur la production de substances à partir de cultures de tissus végétaux (Phaseolus) par Routien JB et Nickell LG

1956 : premières cultures de suspensions cellulaires

1957: Skoog et Miller établissent le cadre théorique de l’influence de la balance hormonale auxine/cytokinine sur l’organogenèse

1957: culture d’anthères excisées

1958: cultures d’ovules de pavot

1958 : embryogenèse somatique

1960 : préparation de protoplastes par digestion enzymatique

1964 : génération artificielle d’individus haploïdes de Datura

1965 : Vasil et Hildebrandt régénèrent un plant de tabac à partir d’une cellule isolée

1970 : Fusion de protoplastes

1977 : Réacteur de 20 000 L pour la culture de tabac

1978 : production à l’échelle industrielle de shikonine rendue possible par la sélection de lignées cellulaires fortement productrices (Tabata M)

1979 : Utilisation le l’inclusion de cellules dans des billes d’alginates pour la biotransformation

1982 : transformation de protoplastes par de l’ADN nu

1983 : Mitsui Petrochemicals produit de la shikonine avec des réacteurs de cellules Lithospermum

1984 : Transformation de protoplastes de tabac et régénération d’un plant transformé (Paszowsky)

1984 : Agrotransformation de disques folliaires (Horsch)

1984 : Electroporation

1987 : Canon à particules

1991 : cryopreservation de lignées cellulaires de Catharantus

1994 : Premier OGM végétal commercialisé : La variété de tomates Flavr Savr inventée et commercialisée par la société CALGENE (échec commercial)

1996 : Premier maïs transgénique commercialisé aux USA

**III Les différents domaines d’application de la biotechnologie**

· Biotechnologie jaune

Protection de l’environnement

Traitement et élimination de pollution.

· Biotechnologie verte

Utilisation des plantes et des cellules pour la production et la transformation des produits alimentaires, des biomatériaux et de l’énergie (jatropha)

· Biotechnologie bleue

Développent des produits en liaison avec la biodiversité marine : santé, cosmétique, aquaculture, agro-alimentaire.

· Biotechnologie blanche

**IV- Totipotence**

**1-Définition**

Chez les plantes, la totipotence peut se définir comme la propriété qu’ont certaines cellules de pouvoir régénérer un individu lorsqu’elles sont placées dans des conditions appropriées, en passant éventuellement par une étape de dédifférenciation.

**2- Pourquoi les cellules végétales sont totipotentes ?**

Arguments classiques :

Petit nombre de types cellulaires

Seulement 3 ou 4 types d’organes fondamentaux (racine, tige, feuilles) dont les fleurs, épines, fruits et tubercules sont des dérivés

Grande plasticité génomique : la croissance peut rester presque normale malgré de profonds remaniements chromosomiques

**3- Etapes liées à la totipotence**

Etape 1 :

Cellules différentiées : dédifférenciation nécessaire →Cellules souches méristématiques



Etape 2 : mise en route de l’activité mitotique utilisation de substances de croissance

Etape 3 : autonomie de la croissance tissulaire vis-à-vis des substances de croissance exogènes

**4- Limites de la totipotence : impossibilité technique**

Différentiation irréversible

En fonction de la méthode de préparation des protoplastes, récalcitrance à la régénération

Pour beaucoup d’espèces d’intérêt agronomique, les protoplastes ne sont pas totipotents (récalcitrants) ex : *Vitis vinifera*

Variation somaclonale: Les plantes régénérées présentent souvent des problèmes (Aneuploïdies, délétions chromosomiques)

Modification du caractère juvénile (Impact sur la fertilité)

**5- Quels sont les mécanismes sous-jacents à la totipotence ?**

Arguments classiques rendant compte de la totipotence des cellules végétales.

Développements récents

· Le fonctionnement des méristèmes : un domaine de recherche très actif

· Notion de cellule souche

· Notion de niche de cellule souche

**V. Réalisation des cultures *in vitro***

**1. L'explant**

Un « explant » est le matériel végétal de base qui servira à produire des clones végétaux à partir d'une « plante-mère » ou éventuellement secondairement des greffons.

Ce sont des parties d'organes ou un organes entiers, tissus, pièces florales, graines ou embryons, bourgeons ou apex ou méristèmes, cellules somatiques ou sexuelles, protoplastes.

**2- Les constituants des milieux nutritifs**

Un milieu de culture est constitué principalement d’eau, de sels minéraux (macroéléments, micro-éléments, fer), d’éléments organiques (vitamines, sucre, parfois des acides aminés, etc.) de «phytohormones » ou de régulateurs de croissance. Cette solution aqueuse est souvent solidifiée au moyen d’agar (substance extraite des algues marines que l’on appelle *agar-agar* ou *gélose*). La gélose est facilement dissoute à 100oC, on doit donc atteindre le point d’ébullition afin de l’incorporer au milieu de manière uniforme, c’est pourquoi l’on parle de la « cuisson» des milieux.

Certains composés comme les micro-éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), certaines vitamines et régulateurs de croissance sont requis en si petite quantité qu’il est impossible de les peser. On doit donc les concentrer préalablement sous forme de solutions-mères. Par la suite, on pourra puiser à même ces solutions-mères la quantité requise d’agent actif pour chacune des formulations de milieu recommandé.

Comme il peut être long et fastidieux de peser les produits nécessaires à chaque fois que l’on fait un milieu, on utilise couramment des solutions où tous les ingrédients sont incorporés.

**a. Les sels minéraux** Les besoins des plantes en éléments nutritifs :

A- Les éléments indispensables à la vie des plantes :

L'analyse des plantes montre qu'elles contiennent, à des proportions différentes, onze éléments en grandes quantités (N , Ca , C , Cl , H , Mg , O , P , K , Na , S) et 18 éléments en quantités réduites (Aluminium , Arsenic , Bore , Brome , Cobalt , Cuivre , Etaint , Fer , Fluor , Iode , Mangnèse , Molybdène , Nickel , Plomb , Silicium , Titane , Vanadium et Zinc). Parmi ces 29 éléments seulement 13 sont indispensables, à savoir:

\* 3 éléments organiques : C , H et O . En moyenne, le carbone représente 44 %, l'oxygène 44 % et l'hydrogène 6 %, soit au total 94 % de la matière sèche d'un végétal, avec une variabilité de 90 à 95 %. Malgré l'importance quantitative et qualitative de ces éléments majeurs organiques, on ne les apporte pas dans une fumure. Les plantes les incorporent dans leurs tissus végétatifs par l'intermédiaire des processus de photosynthèse.

\* 6 éléments minéraux majeurs : N, Ca, Mg, P, K et S. Il y a une grande variabilité dans les teneurs de ces éléments dans les tissus foliaires selon les espèces, variétés et conditions du milieu de culture. Il y a dominance surtout de N et de K. A titre indicatif , les feuilles de la pomme de terre contiennent 2 à 2,5 % de N ; 1 à 3 % de K ; 1,5 à 2,5 % de Ca ; 0,5 % de Mg; 0,2 % de P et moins de 0,1 % de S.

\* et 7 éléments minéraux mineurs : Fe, B, Mn, Zn, Cu, Cl et Mo. Les valeurs habituellement relevées dans les analyses de végétaux sont les suivantes: Fer : 40-250 ppm (MS). Bore: 10-500 ppm. Manganèse: 15-400 ppm. Zinc : 5-200 ppm. Cuivre : 5-30 ppm. Chlore : 5-20 ppm et Molybdène : moins de 1 ppm .

Les 13 éléments minéraux N , K , Ca , Mg , P , S , Fe , B , Mn , Zn , Cu , Cl et Mo sont appelés éléments nécessaires. Les plantes peuvent contenir d'autres éléments (Na , Co...) qui jouent des rôles bénéfiques dans leur croissance et dans la qualité de leurs produits sans qu'ils soient indispensables; on les appelle éléments accessoirs . La plante puise C sous-forme de CO2 dans l'air , H et O à partir de l'eau du sol et les autres éléments minéraux sous-forme d'ions qui se trouvent dans la solution de sol . Cette solution de sol (appelée facteur d'intensité) est alimentée par solubilisation , par les réserves de la phase solide du sol (appelées facteur de capacité).

B- Rôles des éléments minéraux :

1- L'azote :

L'azote joue un rôle primordial dans le métabolisme de*s vitro* plantes . En effet , c'est le constituant numéro un des protéines qui sont les composés fondamentaux de la matière vivante .

2- Le potassium :

Cet élément est très mobile dans la plante et est rapidement distribué dans les différents organes du végétal . Le potassium joue un rôle fondamental dans l'absorption des cations , dans l'accumulation des hydrates des protéines , l'organisation de la cellule , le maintien de la turgescence de la cellule et la régulation de l'économie de l'eau des plantes (régulation des stomates) .

3- Le phosphore :

Cet élément joue les rôles suivants : transferet d'énergie (ATP) , transmission des caractères héréditaires (acides nucléiques) , photosynthèse et dégradation des glucides .

4- Le calcium :

C'est un constituant de près de 50 % des cendres de la plante entière et essentiellement des parois cellulaires . Il joue un rôle dans la neutralisation des acides organiques .

5- Le magnésium :

C'est un constituant de la chlorophylle et , par conséquent , il joue un rôle important sur la photosynthèse . Le magnésium active près de 300 processus enzymatiques et en particulier celui lié au métabolisme des hydrates de carbone .. Il agit sur la stabilité de la membrane cellulaire , sur la régulation du transport ionique interne , favorise la synthèse des protéines , des sucres et des lipides , régularise la réduction des nitrates et influence l'absorption et la translocation des phosphates .

6- Le soufre :

C'est un constituant des acides aminés . Il joue un rôle fondamental dans le métabolisme des vitamines .

7- Les éléments mineurs :

Ces éléments jouent un rôle déterminant dans le métabolisme de la plante , essentiellement dans les réactions enzymatiques . Leurs rôles spécifiques se présentent comme suit :

\* Le bore : + Il intervient au niveau du métabolisme et du transport des glucides.

+ Il participe à la synthèse des protéines .

+ Il a un rôle fondamental dans la résistance des parois cellulaires .

\* Le cuivre : + Stimulation de la croissance .

+ Renforcement des parois cellulaires .

+ Catalyseur de la formation d'hormones de croissance .

+ Rôle essentiel dans la nitrification .

\* Le fer : + Elément essentiel dans la formation de la chlorophylle .

+ Rôle dans le transport d'oxygène (respiration) .

+ Catalyseur de plusieurs enzymes .

\* Le manganèse :

+ Synthèse de la chlorophylle ..

+ Activateur de la nitrate réductase .

\* Le molybdène :

+ Action essentielle dans l'asimilation de l'azote .

Les besoins nutritifs des plantes en culture *in vitro* concernent d’abord les sels minéraux. Le praticien doit avant toute chose recréer pour la plante un milieu de vie comparable au sol dont elle sera maintenant dépourvue. Tous les éléments essentiels à sa croissance doivent donc être incorporés au milieu sans quoi une carence minérale peut survenir. De plus, le choix des différents sels devra respecter un équilibre ionique afin de favoriser une croissance harmonieuse sans créer d’inhibition. Les besoins des cultures de tissus en éléments minéraux ont été étudiés par différents auteurs et le fruit de leurs recherches a donné lieu à différentes compositions minérales toujours utilisées aujourd’hui. Ces formulations portent souvent le nom de leurs auteurs tels que GAMBORG (Canada), GAUTHERET (France), HELLER (France), MURASHIGE et SKOOG (Etats-Unis), WHITE (Etats-Unis), MOREL (France ), etc. La composition du milieu de culture Murashige et Skoog est sans doute la plus utilisée car elle convient à un très grand nombre de plantes de familles botaniques différentes. Ce milieu est très riche en sels minéraux et il convient souvent de le diluer de moitié ou plus afin d’éviter des effets osmotiques inhibiteurs, particulièrement chez les espèces à croissance très lente.

 **b. Les vitamines**

Les vitamines sont des substances organiques reconnues pour stimuler la croissance.

Elles sont particulièrement utiles en micropropagation lorsqu’un fragment seulement de la plante est utilisé pour générer la culture de plantes entières. On comprendra que dans ces circonstances, la synthèse endogène (par le tissu végétal lui-même) de vitamines risque d’être insuffisante et que le milieu devra y suppléer en conséquence.

Les vitamines les plus fréquemment utilisées sont la thiamine HCL, la pyridoxine, la biotine, le pantothénate de calcium et le myo-inositol (le myo-inositol est parfois considéré comme un sucre). Les concentrations sont souvent faibles et il sera alors nécessaire de fabriquer des solutions-mères. La conservation de ces solutions-mères pourra se faire au congélateur en contenants de plastique ou distribuées dans des cubes à glaçon par petits volumes (exemple 10 ml), puis démoulés une fois gelés et rangés dans des sacs à congélation. Une fois la solution sortie et décongelée, elle devra être utilisée dans les 2 à 4 semaines qui suivent.

**c. Les régulateurs de croissance** On les appelle aussi « phytohormones » ou « hormones végétales », mais considérant qu’il s’agit variablement de produits de synthèse ou de produits synthétiques, il est préférable d’utiliser le terme "régulateurs de croissance". Ces substances sont utilisées à des doses très faibles (0.01mg/l à 10 mg/l) et nécessitent le plus souvent d’être pesées sur une balance de précision à 0.0001g. Il est toutefois possible de fabriquer des solutions-mères à partir de masses s’élevant à 100 mg et d’opérer par la suite une série de dilutions. Les trois principaux groupes de régulateurs de croissance d’usage fréquent sont les AUXINES, les CYTOKININES et les GIBBERELLINES. Le choix du ou des régulateurs utilisés ainsi que leur quantité est généralement guidé par la littérature. Si l’espèce végétale convoitée ne figure pas parmi vos lectures et qu’aucun milieu de culture ne semble disponible à titre de référence, une première expérience pourrait être tentée en utilisant un milieu de culture réputé convenable pour une espèce voisine ou pour une plante d’un même genre ou même d’une même famille botanique. **c.1. Les auxines .**
L'auxine est la première hormone à être découverte dans les plantes et un des premiers agents, sur une longue liste, de signalisation chimique qui réglemente le développement des plantes.
La forme d'auxine la plus courante survenant naturellement est – l’indole 3 -acétique (IAA).

Rôles *in vitro* :

· Favorise la croissance de cals (amas de cellules indifférenciées)

· Favorise le développement de bourgeons adventifs

· Favorise l’enracinement.

**Acide indole-3-acétique (A.I.A.) :**

· Substance naturelle pouvant être obtenue par synthèse chimique;

· Auxine relativement faible;

· Se dégrade rapidement à la lumière (oxydation);

· Conservée préférablement dans un contenant ambré (obscurité) au réfrigérateur (4-5°C). Se conserve 7 jours dans ces conditions;

· Soluble dans l’éthanol ou le méthanol (96o).

**Acide naphtalène acétique (ANA) :**

· Substance de synthèse stable en solution et à la chaleur (autoclave);

· Auxine forte et très stable;

· Souvent utilisée pour favoriser la rhizogénèse (initiation des racines);

· Conservée au réfrigérateur ou au congélateur; · Soluble dans l’éthanol ou le méthanol (96o).

**Acide indole-butyrique (A.I.B.) :**

· Substance de synthèse relativement stable;

· Auxine relativement faible;

· Soluble dans l’éthanol ou le méthanol (96o).

**Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) :**

· Substance de synthèse stable à la chaleur (autoclave);

· Largement utilisée comme herbicide;

· Auxine très forte et dont le niveau toxique est atteint très rapidement;

· Utilisée pour la production de cals surtout;

· Peu soluble dans l’eau. Dissoudre dans l’éthanol. Chauffer légèrement. Diluer progressivement avec de l’eau;

· Conservée à l’obscurité au réfrigérateur ou au congélateur.

**c.2. Les cytokinines**

Les cytokinines ont été découvertes lors de la recherche de facteurs qui stimulent la division des cellules végétales. Depuis leur découverte, les cytokinines ont montré qu’elles pouvaient avoir des effets sur beaucoup d'autres processus physiologiques et de développement, y compris la sénescence des feuilles, la mobilisation de la nutrition, la dominance apicale, la formation et l'activité de méristème apical, le développement floral, la rupture de la dormance des bourgeons, et la germination des graines.
Bien que les cytokinines régulent de nombreux processus cellulaires, le contrôle de la division
cellulaire est central dans la croissance des plantes et leur développement et est considéré comme diagnostique pour cette classe de régulateurs de croissance des plantes

Rôles *in vitro :*

· Stimule les divisions cellulaires;

· Régularise la morphogénèse (acquisition de la forme);

· Stimule la croissance des bourgeons axillaires;

· Contribue au renouvellement de la chlorophylle.

Toutes les cytokinines sont peu solubles dans l’eau et doivent être préalablement dissoutes dans quelques gouttes de NaOH 1N ou de HCl 1N. Elles sont dégradées par la lumière et doivent être conservées au réfrigérateur à l’obscurité. Elles sont stables en solutions aqueuses et à la chaleur (autoclave).

**Zéatine :**

· Substance naturelle.

**Isopenthényladédine (2-i-P) :**

· Substance naturelle;

· Cytokinine relativement faible.

**Kinétine :**

· Substance de synthèse.

**6-benzylaminopurine (BAP) et benzyladénine (BA) :**

· Substance de synthèse;

· Largement utilisé en raison de sa grande activité et de son faible coût.

**c.3. Les gibbérellines**

Elles appartiennent à la famille des terpènes (hydrocarbures aromatiques naturels qui interviennent dans la composition des essences), elles possèdent 20 atomes de carbone. Actuellement, on en connaît plus de 70 représentées par les abréviations suivantes : GA1, GA2, GA3, etc....La plus utilisée et la plus commercialisée est l’acide gibbérellique GA3 produite par le genre Fusarium.

Rôles *in vitro :*

· Favorise le grandissement cellulaire;

· Favorise l’allongement des entre-noeuds;

· Lève la dormance des graines.

Seul **l’acide gibbérellique A3** (Ga3) est utilisé.

· Vérifier sa concentration sur l’étiquette;

· Substance de synthèse peu stable en solution aqueuse;

· Devrait être préparée juste au moment de l’utilisation;

· Pourrait être conservée dans l’alcool (éthanol ou méthanol 96o) au réfrigérateur.

**c.4. Balance hormonale et réponse physiologique**

Le schéma ci-dessous représente les niveaux relatifs d’une auxine et d’une cytokinine nécessaire afin d’obtenir différentes réponses morphogéniques



**d. Les sucres**

Les tissus végétaux en culture *in vitro* sont très peu performants au niveau photosynthétique. Ils produisent de la chlorophylle comme des tissus normaux, mais leur faible capacité à produire des sucres par photosynthèse est sans doute due à la faible concentration en gaz carbonique (CO2) des contenants. Ainsi doit-on ajouter au milieu de culture des glucides sous forme de saccharose (sucrose) afin que la plante les utilise comme source d’énergie à défaut d’en produire elle-même. En général, la concentration prescrite est de 30 g au litre. Le passage à l’autoclave provoque une altération des sucres par hydrolyse (glucose-fructose) mais cette modification ne semble pas nuire à la croissance.

**e. Les géloses** La gélose (ou agar) ajoutée au milieu nutritif permet l’obtention d’un milieu semi-solide ou solide dans lequel les explants peuvent être repiqués et supportés. En l’absence de gélose, les milieux liquides doivent être agités (sur de plaque rotative à raison d’une ou deux tours minute) afin de permettre l’incorporation de l’oxygène nécessaire à leur survie, on évite ainsi leur asphyxie. La gélose a l’avantage de retenir très peu les ions mais en contrepartie il fournit un milieu de vie pauvre en oxygène lorsqu’elle est utilisée à forte concentration. Une variation de la concentration en gélose (entre 6 et 10 g/litre), a aussi pour effet de modifier l’équilibre osmotique du milieu créant parfois des problèmes de vitrification. La qualité d’un milieu gélosé est donc dépendante d’une part de sa fermeté, indispensable au support des plantes, et d’autre part de sa souplesse, qui facilite la diffusion des éléments nutritifs. La concentration utilisée varie selon le niveau de pureté de la gélose et l’obje**ct**if de la culture .

  **e.1. Agar-agar**

Il s’agit d’une substance naturelle extraite de différentes espèces d’algues marines. On la classe parmi les sucres parce qu’elle est identifiée comme un polyoside (donc un glucide).

Elle se dissout dans l’eau entre 90 et 100oC. En refroidissant, elle demeure à l’état liquide jusque vers 55oC et elle se solidifie en un gel relativement clair au environ de 40oC. Le milieu gélosé ne peut être porté à ébullition une seconde fois car cette sur-cuisson entraînerait une dégradation de l’agar qui perdrait alors ses propriétés. De plus, la solidification du milieu gélosé peut être compromise si le pH de la solution a été ajusté sous les 4.8. En effet, il semble qu’à des pH aussi bas (plantes acidophiles), l’agar perd de ses propriétés au moment de l’autoclavage.

À la sortie de l’autoclave, la gélification se fait normalement en 2 à 3 heures, selon le volume de milieu par contenant. L’agar vendu commercialement contient malgré tout des impuretés (des ions sulfates, calcium, magnésium, fer, etc.). C’est pourquoi son prix varie en fonction de la purification du produit. La mention « purifié » est d’une qualité suffisante à l’exercice de cette technique.

**e.2. Gels synthétiques (Substituts d’agar)**

Il existe présentement sur le marché, de nouveaux produits permettant de solidifier les milieux de culture. Par exemple, le Gelrite ou Phytagel dont plusieurs auteurs font mention est dérivé d’une bactérie (*Pseudomonas sp*). Il s’agit d’un sucre complexe hautement raffiné. Leur utilisation est intéressante. Elle permet de réaliser un milieu d’une clarté cristalline, et des quantités avoisinant 2 g/litre permettent d’obtenir une gélification équivalente à l’agar traditionnel à 7 g/litre. Son prix de revient est le double de celui de l’agar mais compte tenu qu’on en utilise seulement le tiers de la quantité de l’agar conventionnel, son utilisation demeure intéressante.

**f. Charbon activé** Le charbon activé est fréquemment utilisé au stade de l’enracinement (stade III). Plusieurs praticiens utilisent ce produit tout au cours des stades I, II et III. Le charbon activé est une substance adsorbante qui permet la neutralisation de produits toxiques exsudés dans le milieu par la plante. Il peut s’agir plus couramment de substances phénoliques naturellement produites lors de la taille ou la découpe de certaines plantes, comme les ligneuses par exemple. En contexte normal, ces substances sont lentement lessivées des plaies par les pluies ou autrement. Ces substances phénoliques apparaissent après oxydation de précurseurs présents au site de la plaie et joue le rôle d’antiseptique (toxique pour les micro-organismes). Il s’agit en quelque sorte d’une défense naturelle des plantes.

Cependant, en culture *in vitro* ces plantes émettent ces substances toxiques dans un milieu fermé. On remarque la présence de ces phénols à la base des plantules où elles s’accumulent dans la gélose formant une zone nébuleuse noirâtre. Selon certaines expériences, le charbon activé a été tout désigné pour neutraliser l’effet inhibiteur et toxique de ces substances phénoliques dans le milieu en cours de culture. Entre autre application, le charbon activé serait bénéfique lors de l’enracinement. À cette étape, la réalisation d’un milieu opaque et sombre grâce à l’ajout du charbon activé aurait pour effet d’imiter ces conditions présentes dans le sol où évoluent normalement les racines.

**g. Les composés organiques divers**

Les **acides aminés** (constituants des protéines) et les **extraits de protéines** (exemple l’hydrolysat de caséine) sont occasionnellement ajoutés au milieu de culture dans le but de favoriser l’organogénèse, c’est-à-dire la formation de nouveaux organes (bourgeons, racines…). L’acide aminé le plus couramment utilisé est la Glycine (C2H5O2) notamment retrouvée dans les composants organiques du milieu MS. Les **acides organiques** comme le citrate et le malate sont parfois ajoutés au milieu de culture.

**h. Les produits antibiotiques ou antiseptiques**

Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre des bactéries endogènes des plantes. Il arrive occasionnellement que certaines plantes (les plantes ligneuses plus spécialement) contiennent des bactéries qui s’échappent dans le milieu nutritif, et se développent en colonies suffisamment importantes pour compromettre la culture. Les produits antibiotiques ajoutés au milieu comme la tétracycline, streptomycine, polymyxine-B, etc. sont souvent utilisés en combinaison afin de lutter contre ces bactéries endogènes des plantes (à l’intérieur de la plante). Mais ces produits antibiotiques sont coûteux et sont souvent contournés par les bactéries qui leur deviennent résistantes.

**Stérilisation**

**1. Solutions stérilisantes** Afin d’obtenir une culture aseptique, les tissus végétaux à mettre en culture doivent être « stérilisés » en surface, c’est-à-dire débarrassés des bactéries ou spores de champignon (moisissures) qui adhèrent à leur surface. Il s’agit de la partie la plus difficile de l’établissement d’une culture *in vitro*. Le défit est de désinfecter le végétal sans compromettre sa survie.

Il faut d’abord savoir que :

· Le degré d’infection des tissus en surface est très variable;

· Les parties aériennes sont généralement les moins infectées;

· Il est préférable d’utiliser les nouvelles pousses car elles sont relativement plus propres que les plus âgées;

Les plantes provenant de la serre sont souvent plus propres que celles qui viennent du champ;

· Plus l’explant est petit, plus les chances de contamination sont faibles; mais plus l’explant est gros, plus les chances de reprise sont grandes;

· La concentration la plus faible de solution de javel qui assure l’asepsie, devrait être celle qu’on utilise, puisque le matériel végétal peut être brûlé si la concentration est trop forte.

Les explants sont le plus souvent désinfectés par immersion dans une solution de javel commerciale (hypochlorite de sodium NaCl) dont la teneur varie selon la marque de commerce entre 4 et 6 %. La concentration finale de la solution de javel se situe généralement à 0.5%.

D’autres produits peuvent être utilisés :

· Alcool éthylique ou isopropylique 70 % ( trempage 20 secondes, utilisé comme agent mouillant)

· Hypochlorite de calcium 0.8 % ( produit très intéressant car il pénètre très peu les tissus mais difficile à trouve r et long à préparer)

· Chlorure mercurique HgCl2 0.01 % ( poison violent ! ) (doit être utilisé sous une hotte chimique, très difficile à éliminer de la surface des végétaux) À déconseiller,

**2. Stérilisation de la hotte**

La hotte à flux laminaire doit être préparée de préférence 30 minutes avant son utilisation· Vaporisation à l’alcool 70% de l’intérieur des parois verticales (à l’exclusion du filtre) et la surface de travail;

· Vaporiser à l’alcool 70o tous le matériel et les instruments nécessaires

**3. Stérilisation des végétaux**

S’il s’agit d’une espèce pubescente : tremper les explants dans l’éthanol 70 % pendant 20 secondes (l’alcool agira ici comme agent mouillant); de l’alcool, transférer directement les explants dans une solution d’hypochlorite de sodium à 0.5% à laquelle on a ajouté quelques gouttes de Tween-20 ou de savon.

Les explants devront rester dans cette solution (en agitation ou en rotation) pendant 5, 10, 12 ou 15 minutes selon les recommandations.

On stérilise tous les instruments par trempage dans l’alcool 96% puis passage à la flamme. Les instruments ainsi stérilisés reposent sur une scopule (support métallique) qui a préalablement été flambée à ses deux extrémités. Les instruments sont toujours doublés pour permettre le refroidissement de l’un tandis que l’autre est en usage. Un instrument chaud peut endommager les tissus vivants.

Le récipient contenant les explants est ensuite amené sous la hotte après avoir été vaporisé à l’alcool 70%.

· En évitant toute contamination, les explants sont transférés dans un premier pot d’eau stérile pour une durée de 5 minutes; puis dans un deuxième et un troisième pot d’eau stérile pour une durée de 5 minutes chacun.

· Après le troisième et dernier rinçage en eau stérile, les explants sont transférés un à la fois sur une surface de travail stérile (pétri ou autre), découpé de la façon décrite (apex de tige, noeud,…)

· Transfert de l’explant sur la gélose :

· À l’aide de la pince, on dépose l’explant sur le milieu en prenant le minimum de temps; la rapidité est une des conditions de la réussite des cultures

· On veillera à changer la surface de travail stérile (pétri ou autre) tous les 3 ou 4 explants environ et à stériliser les instruments encore plus fréquemment. **4. Conditions et difficultés de l’asepsie** La technique de culture *in vitro* exige beaucoup de soin pour le maintien de la culture en condition d’asepsie. Pour quiconque entreprend ses premières expérimentations, plusieurs gestes et précautions semblent superflus. Mais il faut toujours se rappeler que les microorganismes sont partout (spores de champignon, bactéries). Il ne suffit pas d’instruments ou d’une surface de travail propres, mais bien stériles sans quoi un seul micro-organisme en contact avec la gélose finira par envahir le milieu entraînant la mort du plant. Ainsi, il vaut mieux au début respecter le maximum de règles, quitte à les simplifier par la suite selon son expérience personnelle.

**5. Les infections et quelques unes de leurs causes:**

Lorsque l’on a des cultures infectées, cela peut provenir de différentes causes. Dès l’apparition des symptômes, on regarde d’abord s’il s’agit d’un champignon (moisissure) ou d’une bactérie. S’il s’agit d’un champignon, on voit un développement mycélien qui a une texture feutrée, souvent blanche ou grisâtre. Si le feutrage est vert, il s’agit sans doute du *Penicillium*. Si le feutrage présente des petits grains noirs (fructifications), il peut s’agir du *Rhizopus nigricans* qui se multiplie très vite et qu’il faut détruire à l’autoclave sans tarder. S’il s’agit d’une bactérie, on voit alors un voile d’aspect laiteux, développé à l’intérieur du milieu et à la surface. Ce voile est quelquefois coloré (rose, jaune, orangé …). On regardera ensuite si l’infection part de la zone de contact entre les tissus et le milieu, et si oui, ce sont les tissus eux-mêmes qui sont la source de l’infection. Si l’infection part d’un point quelconque du milieu, la source de l’infection peut être soit l’air, soit une mauvaise stérilisation du milieu, soit une infection de l’air ambiant par l’intermédiaire de l’eau de condensation au niveau du couvercle. Dans certains cas, rares heureusement, des spores de certaines bactéries peuvent résister à l’autoclave; il faudra alors stériliser la verrerie à l’eau de Javel. Lorsque l’on voit un développement de mycélium de *Penicillium*, cela provient de l’air et indique une mauvaise manipulation. Les exemples de mauvaises manipulations sont nombreux : bavardage pendant le travail sous la hotte à flux laminaire, contact des tissus végétaux avec des doigts, mauvaise stérilisation des instruments qui portent alors les micro-organismes de l’explant infecté sur les autres.

En cours de culture, on peut ne voir apparaître aucune trace de voile bactérien, alors que les bactéries sont présentes dans les tissus. Dans ce cas, le milieu de culture utilisé ne permet pas le développement de la bactérie; toutefois, on peut permettre son expression en ajoutant de la peptone à 2 g/L dans le milieu (la peptone est un constituant classique des milieux de culture des bactéries). On fera ensuite le tri en éliminant les tubes infectés, et on obtiendra ainsi une collection de tissus indemnes de bactéries