

Chapitre 2 : Phénomènes physiologiques liés à la réalisation de culture *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 organe entier, tissus, pièces florales, graines ou embryons, bourgeons ou apex ou méristèmes, cellules somatiques ou sexuelles, protoplastes.

2. Stérilisation

2.1. 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 défi 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 trouver et long à préparer)
- ✓ Chlorure mercurique HgCl_2 0.01 % (poison violent !) (doit être utilisé sous une hotte chimique, très difficile à éliminer de la surface des végétaux) À déconseiller,

2.2. 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 70% tous le matériel et les instruments nécessaires

2.3. 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.

2.4. 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.

2.5. 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.

3. Environnement

3.1. Lumière

Besoin de lumière Chez les plantes cultivées in vitro, la photosynthèse n'est pas une activité nécessaire puisque l'énergie est fournie par les glucides du milieu. Cependant, même réduite la photosynthèse persiste dans les tissus. De plus la lumière est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques : nécessité de jours longs pour obtenir des boutons floraux par ex. La puissance lumineuse à fournir dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture. On exprime l'intensité lumineuse en $W.m^{-2}$, intensité mesurée au niveau de la culture. On obtient généralement 100 à 150 $W.m^{-2}$ pour des tubes fluorescents placés à 20cm au-dessus des récipients de culture.

3.2. Température

La température est généralement régulée à 20/25°C en continu. Il ne faut pas négliger que la température dans les flacons de cultures peut être supérieure de 2 à 4°C à la température de la pièce à cause de l'éclairage.

3.3. Hygrométrie

Elle doit atteindre les 100% d'humidité relative dans les flacons. Cependant, il faut veiller à ne pas noyer les explants par un excès de condensation à la surface du milieu.