

Chapitre 3. Besoins nutritifs des tissus et cellule cultivés en conditions aseptiques

1.- 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 100 °C, 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.

1.1. 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 , Etain , Fer , Fluor , Iode , Manganèse , 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 accessoires . 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).

1.2. Rôles des éléments minéraux

A- L'azote

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

B- 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) .

C- Le phosphore

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

D- 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.

E- 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 .

F- Le soufre

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

G- 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**

- + Élément 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'assimilation 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.

2. 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 pantothenate 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.

3. 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.

3.1. 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 régleme 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 préférentiellement dans un contenant ambré (obscurité) au réfrigérateur (4-5°C). Se conserve 7 jours dans ces conditions;
- Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96°).

Acide naphthalène 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 (96°).

Acide indole-butyrique (A.I.B.)

- Substance de synthèse relativement stable;
- Auxine relativement faible;
- Soluble dans l'éthanol ou le méthanol (96°).

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.

3.2. 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.

Isopenthényladéine (2-i-P)

- Substance naturelle;
- Cytokinine relativement faible.

Kinéatine

- 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.

3.3. 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-nœuds;
- 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 96⁰) au réfrigérateur.

3.4. 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



4. 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.

5. 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'objectif de la culture.

5.1. 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 polysaccharide (donc un glucide).

Elle se dissout dans l'eau entre 90 et 100°C. En refroidissant, elle demeure à l'état liquide jusque vers 55°C et elle se solidifie en un gel relativement clair au environ de 40°C. 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.

5.2. 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 Phytigel 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.

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 microorganismes). 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.

6. Les composés organiques divers

Les **acides aminés** (constituants des protéines) et les **extraits de protéines** (exemple l'hydrolysate 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 ($C_2H_5O_2$) 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.

7. 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.