

Chapitre 1. Introduction - la culture *in vitro*

1. Généralités de la culture *in vitro*

1.1. Aspects historiques des cultures *in vitro*

Les premières tentatives de culture *in vitro* pour maintenir en survie des organes vivant isolés datent de plus de 130 ans ; il s'agit alors de conserver vivants des fragments de queue de têtards de grenouilles (**Tableau 1**).

Les premiers pas de culture *in vitro* proprement dite sont dus à un Allemand, **Haberlandt (1902)**, il obtenu sur un milieu Knop amélioré la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires (poils staminateux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme), mais il n'y avait pas de multiplication cellulaire.

Tableau 1 : Progrès réalisés dans la culture *in vitro* des différents tissus de la plante (**Sadek & Ykhlef, 2018**)

Découvertes	References
Premiers pas de culture <i>in vitro</i> sur milieu Knop	Haberlandt (1902)
Aux Etats-Unis, W.J. Robbins et en Allemagne : W. Kotte, obtiennent la croissance de pointes de racines pendant quelques mois seulement.	Robbins, 1922 (USA), Kotte (Allemagne), (1922)
Découvre l'action de la gibbérelline sur la croissance, c'est la première fois qu'une substance hormonale est extraite d'une plante.	Kurosawa, 1926
Réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale, la seule connue à l'époque : l'auxine.	White, 1932
Induit des cals et des organes à partir de tissus de tubercule de chou-navet. F.G. Gustafson obtient avec un grand succès les premiers fruits parthénocarpiques, (tomate, raisin, figue), par application d'auxine sur des ovaires non fécondés.	O. Orsos, 1936 (Hongrie)
Cultivé et obtenu une multiplication de cellules de saule à l'aide d'auxines	Gautheret (1934) (France)
Cultive et multiplie des cellules cambiales de saule en introduisant des auxines dans le milieu.	R.J. Gautheret, 1935 (France)

Tableau 1 (la suite) : Progrès réalisés dans la culture *in vitro* des différents tissus de la plante (Sadek & Ykhlef, 2018)

Découvertes	References
Obtient à partir de tissu carotte, un amas de cellules dédifférenciées : une cal. On peut cultiver cette cal indéfiniment dans le temps. Avec lui démarre vraiment la culture <i>in vitro</i> ("dans du verre").	Gautheret, 1939
Culture indéfinie de tissus de carotte et de tabac	Nobecourt, 1939; White, 1939 (USA)
En étudiant les tumeurs végétales ou crown-gall, a amorcé les travaux qui ont conduit aux premières manipulations génétiques végétales.	Braun et White, 1941
Par les techniques de culture de tissus met en évidence le phénomène de dédifférenciation : la Rejuvenation.	Buvat, 1944
Obtient la régénération de plants de lupin et de capucine à partir d'apex	Ball, 1946
Réussit une culture <i>in vitro</i> de fruits	Nitsch, 1949
Notent l'absence de virus dans les méristèmes de tabacs virosés.	Limasset et Cornuet, 1949
Mettant à profit ces travaux, à l'i.N.R.A. de Versailles, régénèrent des plantes entières saines de dahlia, variété "le Rêve" indemnes de virus à partir de culture de méristèmes de plants infectés par trois virus différents. De la même manière ils sauveront la variété de pomme de terre "la Belle de Fontenay" en 1954.	Morel et Martin, 1952
Obtiennent les premières cultures de cellules isolées à partir de cals friables cultivés en milieu liquide agité.	Muir, 1954
Les cytokines (hormones) provoquent la division cellulaire.	Miller, 1955
Découvrent que les cytokinines induisent des divisions cellulaires dans des cultures de tissus de tabac.	Miller et al., 1955

Tableau 1 (la suite) : Progrès réalisés dans la culture *in vitro* des différents tissus de la plante (Sadek & Ykhlef, 2018)

Réussit à suivre au microscope l'évolution de cellules isolées de pois, mises en culture à proximité d'un tissu nourricier. La culture <i>in vitro</i> de tissus végétaux connaîtra un essor particulier.	Torrey, 1957
Découvrent l'influence qu'ont l'auxine et la cytokine sur les cellules cultivées.	Skoog et Miller, 1957
Obtiennent des embryons somatiques de carottes à partir de culture de racines et mettent ainsi en évidence le principe de totipotence cellulaire.	Stewart et al., 1958
Mettent au point pour des cultures de tissus de tabac le fameux milieu de culture M.S. utilisé largement en culture <i>in vitro</i> . Il s'agit d'un milieu contenant des éléments minéraux, des vitamines du groupe B, du sucre, auxine et cytokinine.	Murashige et Skoog, 1962
Obtiennent des plantes haploïdes de <i>Datura innoxia</i> Mill. A partir de culture d'anthères.	Guha et Maheshwari, 1964 (Inde)
Régénération un plant de tabac grâce à une cellule isolée	Vasil (1965)
Obtenaient des plantes haploïdes de <i>Datura innoxia</i> M. LL à partir de culture d'anthères ;	Guha et Maheshwari, 1966 (Inde)
Régénèrent des plantes entières de <i>Nicotiana tabacum</i> à partir de protoplastes.	Takebe et al., 1971 (Japon)
Plantes haploïdes de tomates.	Carlson (1972)
Utilise du pollen irradié de tabac pour réaliser des croisements interspécifiques.	Pandey, 1975
Dans l'équipe du Pr. Demarly à Orsay réussit la première culture d'ovaires d'orge non fécondés. En même année, Seibert réussit à initier des pousses d'œillets à partir d'apex conservés à -196°C, c'est le début de la cryoconservation pouvant être utilisée pour la constitution de banques de gènes.	San Noem (1976)
Créent en Belgique les premières plantes transgéniques transformées par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Il s'agit d'un plant de tabac résistant à la kanamycine.	Herrera-Estrella et al., 1983

1.2. Définition de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* ou culture de tissus se définit comme des cultures d'explants de plantes, sur un milieu nutritif artificiel, en laboratoire à l'abri de toute contamination, dans des récipients placés dans un endroit où l'intensité de la lumière, la durée de l'illumination, la température et l'hygrométrie sont constamment contrôlées (Zryd, 1988).

1.3. Fondement de la culture *in vitro* :

1. Totipotence

Contrairement aux animaux, où la différenciation est généralement irréversible, chez les plantes, même les cellules hautement matures et différenciées conservent la capacité de régresser vers un état méristématique tant qu'elles ont un système membranaire intact et un noyau viable (Bhojwani et Razdan, 1986).

La totipotence est la propriété qu'ont certaines cellules de pouvoir régénérer un individu lorsqu'elles sont placées dans des conditions appropriées (Figure 1).

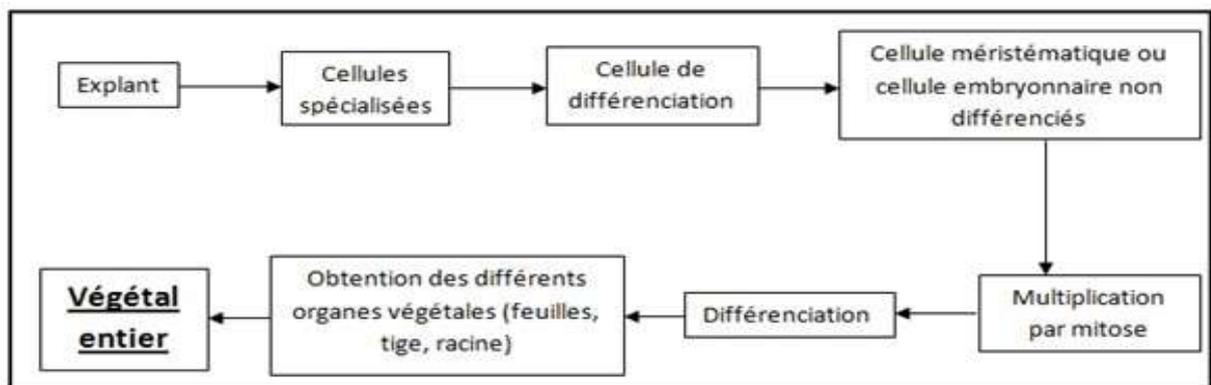


Figure 1. Principe de la totipotence.

La totipotence est l'aptitude de la cellule végétale à exprimer la totalité de ses potentialités pour donner un organisme entier (Bhojwani et Razdan, 1986) (Figure 2).

La théorie de la totipotence énoncée en 1902 par Haberlandt a été reprise et banalisée par Steward (1967). Cette théorie se base sur le fait que toutes les informations génétiques et donc le programme de l'embryogenèse sont présents dans le noyau de chaque cellule vivante.

Le terme « totipotent » a deux interprétations fondamentalement différentes :

(i) Capable de se développer en un organisme complet ou, seuls les zygotes ou les embryons unicellulaires sont totipotents.

(ii) capable de se différencier en n'importe quel type de cellule d'un organisme (**Condic, 2014**).

Au sens large, les cellules qui peuvent se développer en tous les différents types de cellules d'un organisme, mais dans des conditions différentes chacune, sont également totipotentes. Sur la base de cette seconde définition, les cellules souches animales embryonnaires qui peuvent produire un large éventail (mais pas tous !) de types cellulaires sont souvent considérées comme totipotentes (**Condic, 2014**).

On peut souvent rencontrer l'exagération, même dans les manuels universitaires, selon laquelle "toutes/la plupart des cellules végétales sont totipotentes". Ceci est basé sur la croyance erronée que si nous pouvons régénérer une plante entière à partir d'une cellule/explant qui met en évidence la totipotence cellulaire.

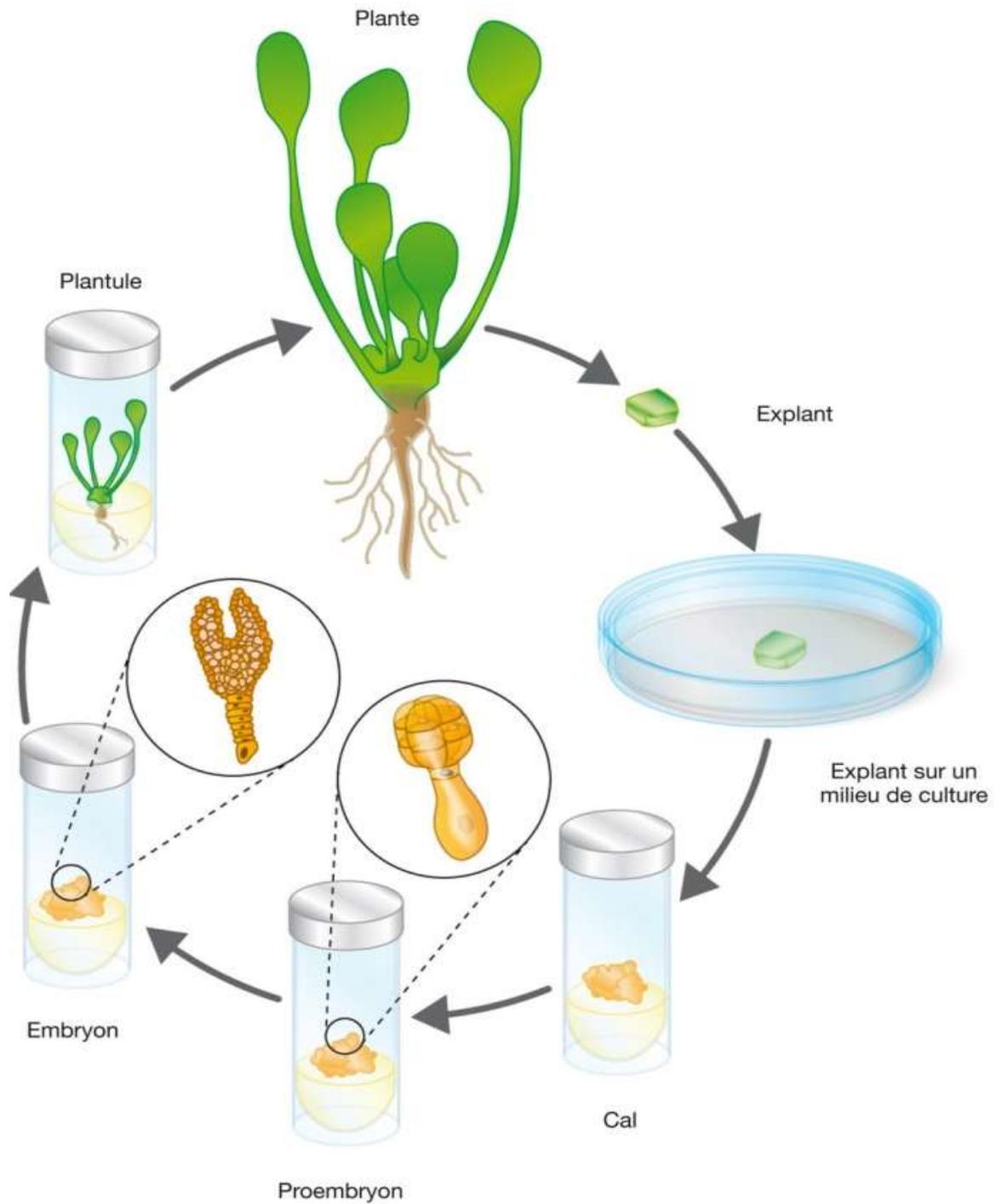


Figure 2. Totipotence et culture cellulaire végétale (site web : le monde en image).

Cependant, la régénération végétale à partir d'une cellule totipotente doit répondre à deux critères principaux :

- (i) Elle doit être initiée dans une cellule individuelle puisque la totipotence est un terme cellulaire (Condic, 2014) ;

(ii) Il doit se dérouler de manière autonome comme un processus unique (**Verdeil et al., 2007**).

La totipotentialité cellulaire s'accompagne par multiplication indéfinie que l'on peut observer dans les zones de croissance de la plante : les méristèmes.

Un tissu ou une cellule dédifférenciée peut évoluer dans toute sorte de direction cela manifeste la totipotencialité de la cellule végétale. Cette totipotence de la cellule végétale se retrouve aussi au niveau des cellules reproductrices : grains de pollen ou ovules.

Théoriquement, chaque protoplaste est capable de reproduire une plante parfaitement identique à la plante mère.

Une cellule végétale même très différenciée est souvent capable de revenir à l'état juvénile en se dédifférenciant, elle peut ensuite se diviser pour donner tel ou tel tissu dépendant des circonstances (**Djennane et Klifatti, 1996**).

La totipotence est une dédifférenciation expérimentale qui peut être déclenchée par la perturbation de corrélations organiques, par des traumatismes, de l'action des phytohormones ou par leur suppression (**Demarly et Sibi, 1996**).

Selon **Gautheret (1966)** le degré de régression que peut subir une cellule dépendrait de l'état cytologique et physiologique qu'elle a atteint in situ.

2. Organogenèse

Chez les végétaux, l'organogenèse est assurée par les méristèmes (massifs de cellules non différenciées), conservant la capacité de se diviser activement.

L'organogenèse implique une différenciation cellulaire, à l'inverse d'une dédifférenciation, dans les tissus déjà spécialisés, peut conduire à la formation de nouveaux massifs méristématiques. Cette particularité illustre la totipotence des cellules végétales, c'est-à-dire l'aptitude des cellules à se diviser puis à se différencier de nouveau en fonction des conditions expérimentales (**Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992**).

C'est à cette remarquable capacité de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension, et peut-on dire, son pouvoir. A cause de cela, tout individu du règne végétal peut ou pourra être cultivé *in vitro*, il n'y a pas d'exception. Cependant cela ne veut pas dire que le développement actuel des milieux de culture, et les connaissances que l'on peut avoir du comportement de différentes espèces sur ces milieux de culture, permettent de réaliser immédiatement et sans problème la culture *in vitro* de toutes les plantes existant sur la terre (**Augé et al., 1989**).

La base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de bourgeons (méristèmes) (Caulogénèse) et de racine (Rhizogenèse) (**Figure 3 et 4**):

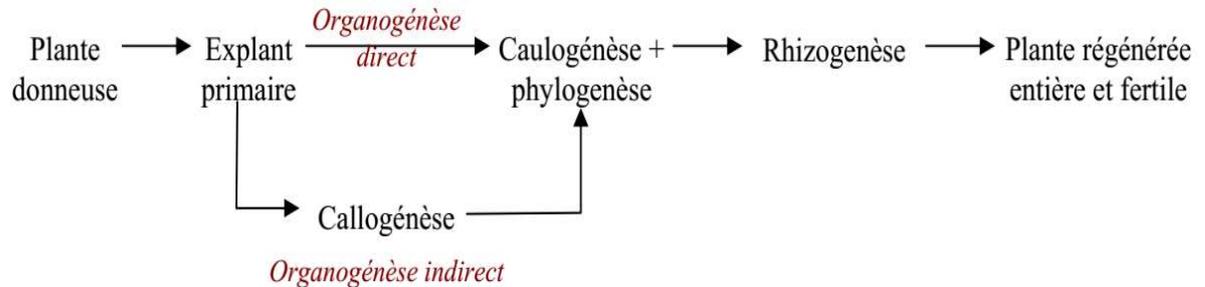


Figure 3. Schéma de la régénération d'une plante

2.1. Caulogénèse

La caulogénèse désigne à la fois l'initiation et le développement des tiges (**Figure 4**). Les tiges néoformées *in vitro* peuvent apparaître sur l'explant initial ou sur une cal. Ils sont induits sur n'importe quel type d'organe ou de tissu y compris sur ceux qui ne les produisent pas dans les conditions naturelles (**Margara, 1989**).

Les études cytologiques, conduites dans le but de déterminer l'origine des tiges néoformés à partir d'un fragment d'organe contenant divers tissus montrent souvent que l'aptitude à la caulogénèse se manifeste à partir de certaines catégories de tissus telles que : le cambium, le parenchyme vasculaire ou libérien (**Fortes et Pais, 2000**).

L'intensité de cette néoformation est nettement dépendante de la nature des tissus contenus dans l'explant. Elle est maximale pour les tissus cambiaux, élevée pour les tissus du phloème et du xylème, très faible ou nulle pour le parenchyme cortical ou médullaire (**Margara, 1989**).

2.2. Rhizogenèse

La rhizogenèse désigne la néoformation et la croissance de racine (**Figure 4**). Est un phénomène complexe, il comporte différentes phases :

- Dédifférenciation** : formation d'amas de cellules méristématiques,
- Différenciation** : et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (**Margara, 1989**).

Une activité de rhizogenèse peut être enregistrée au niveau de l'appareil racinaire, comme au niveau de l'appareil caulinaire d'un végétal. Dans le premier cas, les nouvelles racines formées et les axes sur lesquelles elles se situent sont de même nature. Il y a simplement ramification des racines existantes par production des racines latérales (secondaires, tertiaires). Dans le second cas, les racines néoformées sont portées par des axes ou des organes de nature différente. On parle alors de racines adventives. La formation des racines adventives peut être spontanée ou provoquée à l'occasion de divers processus de la multiplication végétative comme le bouturage et le marcottage (**Favre in Chaussat et Bigot, 1980**). Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines.

Rhizogenèse indirecte : la différenciation de racines sur les cals produites au cours de la phase d'induction (Callogenèse).

Les racines néoformées, au sein d'un cal, en culture in-vitro, peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs (rhizogenèse indirecte)

Rhizogenèse directe : la différenciation de racines directement sur les explants. L'émission de racines sur un explant dans des endroits inhabituelles (rhizogenèse directe). La rhizogenèse est un phénomène complexe, il comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (**Margara, 1989**) (**Figure 4**).

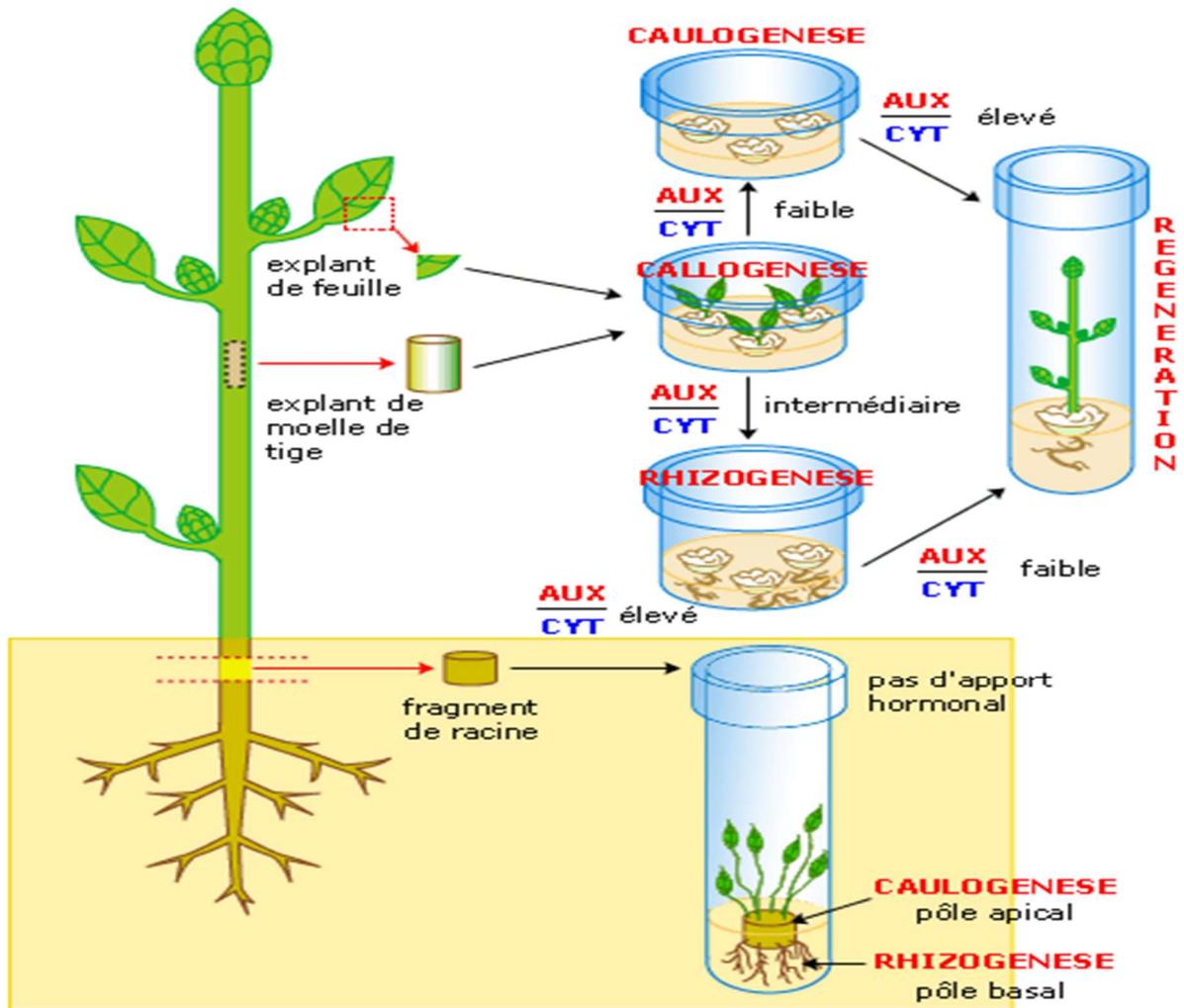


Figure 4. La culture *in vitro* (formation des organes) ([site web : le monde en image](#)).

3. La différenciation

1. Définition

La différenciation cellulaire est le processus qui conduit à la spécialisation des cellules qui acquièrent de nouvelles structures et des fonctions spécialisées. Chez les végétaux, ce processus s'exprime dans les cellules des zones de croissance, cellules nommées cellules méristématiques (**Figure 5**).

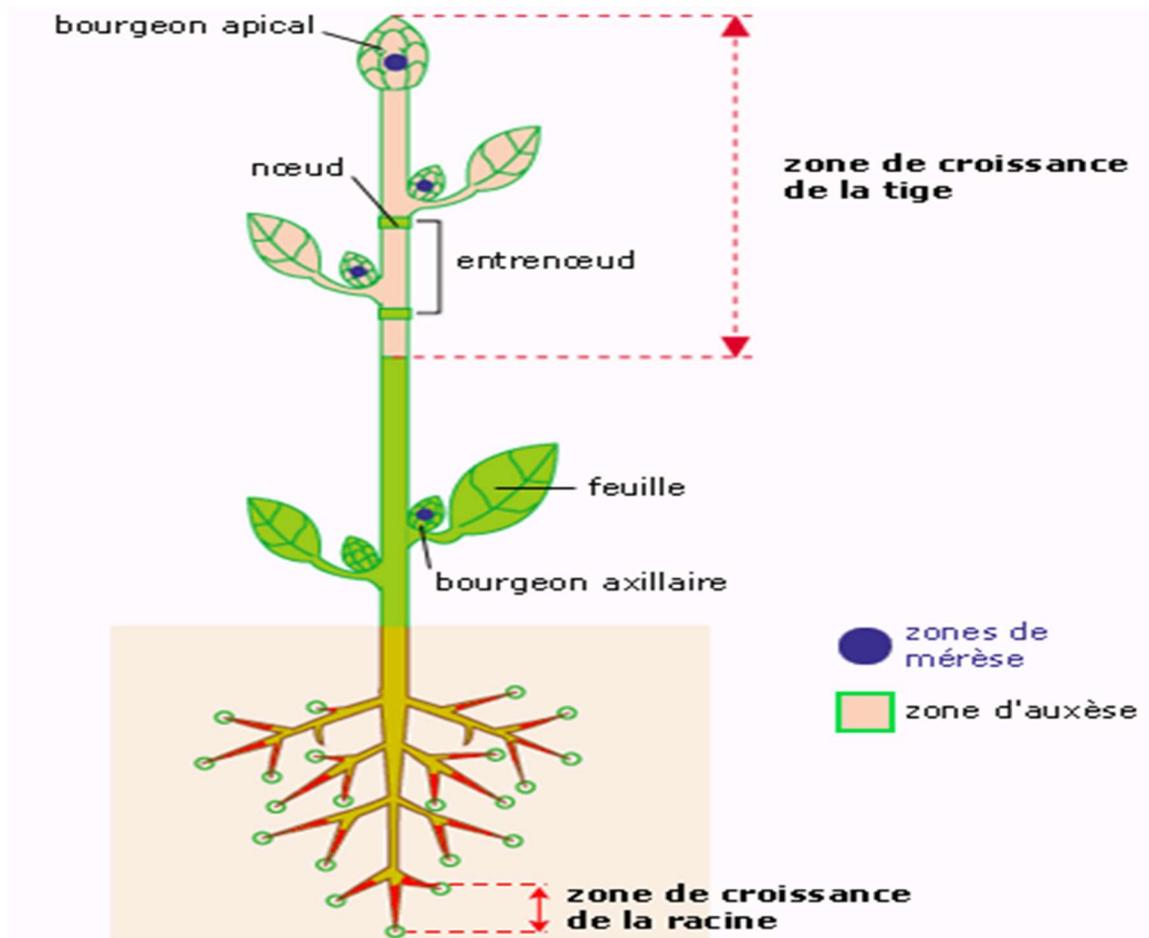


Figure 5. Localisation des zones de croissance de la plante

Tout individu est issu d'une cellule indifférenciée, cette cellule se multiplie et donne des masses cellulaires qui se différencient pour construire l'individu. Cette différenciation se fait sous la pression d'un certain nombre d'informations de différents types :

- Les régulateurs de croissance : ex : l'auxine pour former des racines
- Les ressources : les carences/disponibilités orientent les métabolismes et la différenciation
- Le troisième facteur pouvant jouer sur l'orientation de la différenciation est l'échange d'énergie.

2. Caractéristiques des cellules méristématiques

Une cellule méristématique peut être caractérisée par :

- * Son état indifférencié : Généralement toutes les cellules sont très semblables :
- * de taille réduite, isodiamétrique,
- * elles ne sont pas encore ou peu vacuolisées.
- * Leur paroi, est pectocellulosique, peu épaisse.

- * Le cytoplasme y est relativement dense, le noyau volumineux. Les organites qui s'y accumulent n'ont eux-mêmes pas commencé - ou peu - leur différenciation.
- * Son pouvoir mitotique : Les cellules méristématiques sont capables de se diviser indéfiniment permettant au végétal une croissance infinie.
- * Sa totipotence : Chez les végétaux contrairement aux animaux, les cellules méristématiques sont totipotentes, elles sont capables de se différencier en tous les types cellulaires.

3. Caractéristiques de la différenciation

- * Le processus de différenciation est présent essentiellement chez les embryons et zones de croissance
- * Il reste très actif durant toute la vie de l'organisme végétal (alors que chez les animaux, la différenciation cellulaire est majoritairement cantonnée au début de la vie)
- * Il est nettement réversible : Une cellule végétale mature et parfaitement différenciée en un type cellulaire donnée peut se **dédifférencier** après avoir déjà vécu un certain temps dans cet état de différenciation.

4. Facteurs à l'origine de la différenciation

Le moteur de processus de différenciation dépend :

- * des facteurs génétiques qui découlent de l'activité organisée des gènes.
- * des facteurs épigénétiques résultant de l'interaction des cellules les unes avec les autres (contact membranaire, actions hormonales, etc.).
- * des facteurs environnementaux qui tiennent une place importante au cours de la différenciation chez les cellules végétales.

4. La dédifférenciation

1. Définition

Le terme « dédifférenciation » a de nombreuses définitions : « processus par lequel des cellules matures ou spécialisées perdent leur caractère différencié et se rajeunissent » (**Bloch, 1941**) ; « un processus dans lequel des tissus qui ont subi une différenciation cellulaire peuvent être amenés à inverser le processus pour redevenir une cellule primordiale » (**Hale et al., 2005**) ; "implique une cellule différenciée en phase terminale revenant à un stade moins différencié à partir de sa propre lignée" (**Jopling et al., 2011**); "sa caractéristique

distinctive est le retrait d'un état différencié donné vers un état de type "cellule souche" qui confère la pluripotentialité" (**Grafi, 2004**).

Le point commun dans ces définitions est que, contrairement à la différenciation, la dédifférenciation augmente la puissance de développement des cellules. Il existe cependant une controverse quant à savoir dans quelle mesure le terme « dédifférenciation » peut être utilisé. Est-ce la réversion de la différenciation et ne peut donc avoir lieu qu'au sein d'une même lignée cellulaire (**Hale et al., 2005**) ou peut être utilisé pour tous les processus augmentant la puissance cellulaire (**Figure 6**). Le franchissement des barrières entre les lignées cellulaires est généralement considéré comme une transdifférenciation, quelle que soit la puissance de développement des cellules (**Sugimoto et al., 2011**).

Il est bien évident que le passage d'un état différencié à l'état de cellules méristématiques proliférantes, ne se fait pas sans que des modifications profondes n'apparaissent dans la structure de la cellule.

Ces modifications ramènent la cellule adulte à l'état juvénile (recouvrer les caractéristiques cytologiques et les potentialités des cellules embryonnaires), capable de s'orienter vers la formation de n'importe quel organe.

Suivant la composition du milieu de culture, les cellules dédifférenciées continueront à proliférer pour ainsi dire à l'infini, elles deviennent parfois capables de poursuivre leur prolifération, même en l'absence de substances stimulantes, telle que les auxines et les cytokinines.

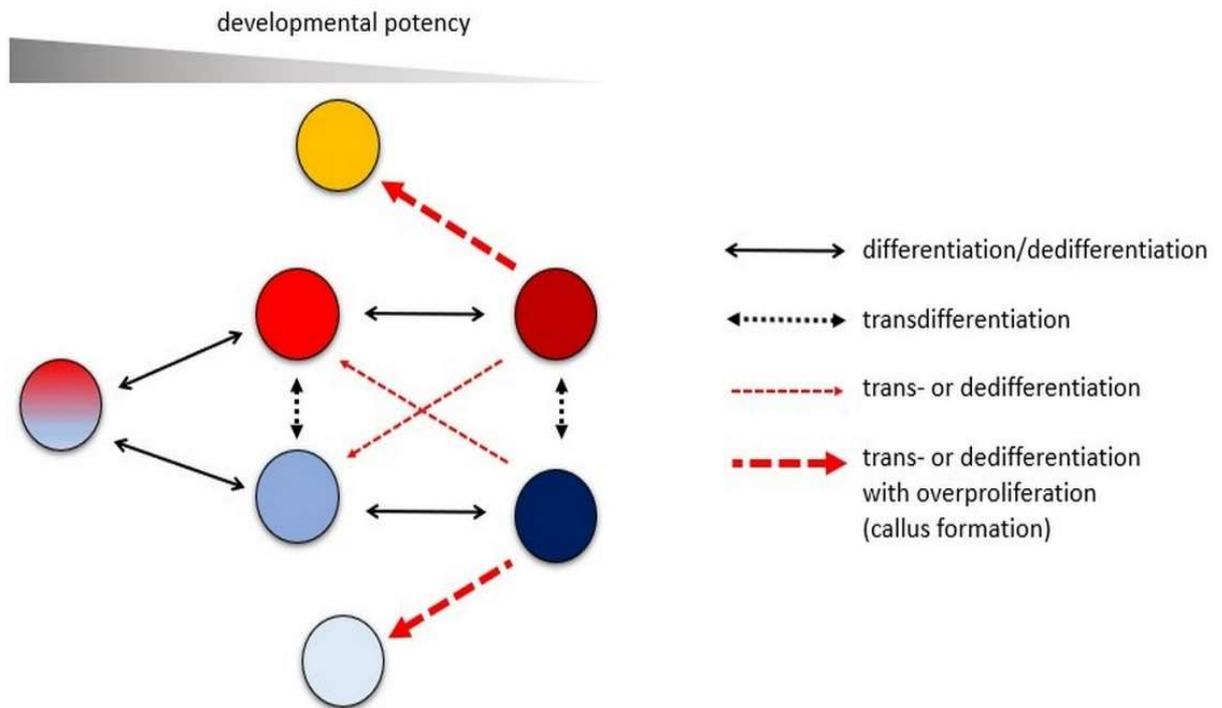


Figure 6. Différentes voies de différenciation

La différenciation est généralement associée à une diminution de la dédifférenciation avec une puissance de développement accrue. Au sens strict, la dédifférenciation ne peut avoir lieu qu'au sein d'une même lignée développementale et peut être considérée comme la réversion de la différenciation. La transdifférenciation est utilisée pour décrire les changements du destin cellulaire indépendamment de la puissance de développement. Cependant, en biologie végétale, la transdifférenciation conduisant à une puissance de développement accrue est souvent appelée dédifférenciation, en particulier lors de la formation de cals. La formation de cals n'est pas un pas en arrière dans la lignée développementale mais plutôt le résultat d'une surprolifération/transdifférenciation de cellules différenciées. Certaines ou la plupart des cellules du tissu calleux hétérogène peuvent avoir une puissance de développement accrue.

Les cellules végétales se dédifférencient et retournent à l'état cellulaire indifférencié (embryonnaire ou méristématique) (**Figure 7 et 8**). Cette perte de l'inhibition corrélative permet l'expression de toutes les possibilités embryonnaires.

Au cours de l'ontogenèse (formation d'un individu, croissance, mort), chaque cellule, sous la pression des différents paramètres, est programmée pour une fonction. Ceci se fait en exprimant seulement une partie du programme génétique disponible et en réprimant le reste. Ce phénomène a la particularité, chez les végétaux, d'être réversible, ce qui permet l'existence de la dédifférenciation. Ce phénomène n'est absolument pas possible chez les animaux. Donc, comme pour la différenciation, il y a une pression du milieu sur le devenir de la cellule. Ceci prouve que la répression du programme génétique, lors de la différenciation, n'altère pas ce

programme. Les fonctions non usitées sont encore disponibles. D'autre part, si la cellule ne subit aucune pression du milieu, elle se dédifférencie. Il y a donc entretien des fonctions par le milieu. Par exemple :

Une cellule chlorophyllienne maintenue à la lumière reste chlorophyllienne, mais si elle est placée à l'obscurité, ses chloroplastes s'étiolent et redeviennent des protoplastes indifférenciés. Dans une plante vasculaire, si un vaisseau est détruit par blessure (attaque de parasites, etc), les cellules voisines changent d'environnement direct (la sève ne circule plus). Elles redeviennent totipotentes et peuvent reformer le vaisseau en quelques jours.

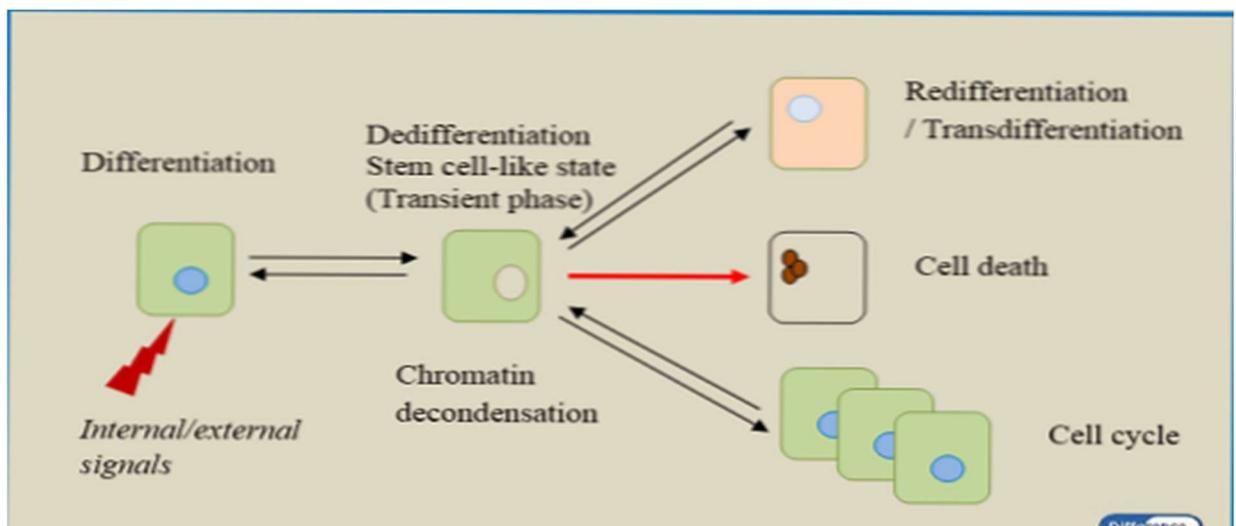


Figure 7. Différenciation et dédifférenciation chez les végétaux

2. Processus de dédifférenciation

En cas de blessure du végétal, d'une attaque fongique, de modification importante de facteurs environnementaux, etc., une cellule végétale parfaitement différenciée, peut se dédifférencier après avoir déjà vécu un certain temps dans cet état de différenciation. Les processus intracellulaires mis en jeu lors de la dédifférenciation apparaissent comme une différenciation à rebours :

- * Dans un premier temps, leur protoplasme perd les caractéristiques de leur différenciation initiale. Les réserves sont résorbées et les plastes régressent à l'état de plastes indifférenciés.
- * Au cours des divisions successives, les vacuoles se fragmentent et progressivement les cellules formées retrouvent des caractères de cellules embryonnaires.

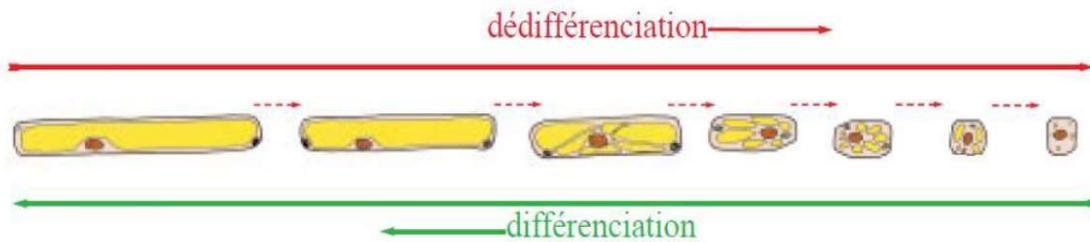


Figure 8. Différenciation et dédifférenciation chez les végétaux

4. La croissance

4.1. Croissance organisée

La croissance organisée contribue à la création ou au maintien d'une structure définie. Elle survient lorsque des organes végétaux tels que les points végétatifs (méristèmes apicaux), les initiales des feuilles, les jeunes bourgeons floraux ou les petits fruits, sont transférés en culture et continuent de croître en préservant leur structure. Une croissance organisée de manière cohérente se produit également lorsque des organes sont induits. Cela peut se produire *in vitro* soit directement sur un organe ou sur un morceau de tissu mis en culture (un explant), soit lors de la culture de tissus préalablement non organisés. Le processus de formation d'organes de novo est appelé organogenèse ou morphogenèse (le développement de la forme).

4.2. Croissance non organisée

La croissance des végétaux supérieurs dépend de l'attribution organisée de fonctions à des organes qui, en conséquence, se différencient, c'est-à-dire se modifient et se spécialisent pour leur permettre d'entreprendre leurs rôles essentiels.

La croissance non organisée est rare dans la nature, mais se produit assez fréquemment lorsque des morceaux de plantes entières sont cultivés *in vitro*. Les agrégats cellulaires, qui se forment alors, sont généralement dépourvus de structure reconnaissable et ne contiennent qu'un nombre limité des nombreux types de cellules spécialisées et différenciées que l'on trouve dans une plante intacte.

Une cellule différenciée est une cellule qui a développé une forme (morphologie) et/ou une fonction (physiologie) spécialisées. Un tissu différencié (par exemple xylème ou épiderme) est une agrégation de cellules différenciées. Jusqu'à présent, la formation de types cellulaires différenciés ne peut être contrôlée que dans une mesure limitée en culture. Il n'est

pas possible, par exemple, de maintenir et de multiplier une culture entièrement composée de cellules épidermiques.

En revanche, les tissus non organisés peuvent être augmentés en volume par sous-culture et peuvent être maintenus sur des milieux semi-solides ou liquides pendant de longues périodes. Ils peuvent souvent aussi être utilisés pour commencer des cultures de suspension cellulaire. La différenciation est également utilisée en botanique pour décrire la formation d'organes distincts par la morphogenèse.

1.4. Catégories de la culture *in vitro*

1. Catégorie de la culture *in vitro* conforme

Il s'agit d'un mode de multiplication conduisant à des individus pourvus de même stock d'information héréditaire que la plante d'ont ils sont issus (**Nozeran et Bancilhon, 1972**) :

- Culture de nœuds, Apex, Méristèmes,
- Embryogenèse somatique.

2. Catégorie de la culture *in vitro* non conforme

Ce procédé utilise un matériel végétal peu régulé et le place en conditions déstabilisants les signaux ; on voit alors apparaître une variabilité importante (**Demarly, 1985**).

- Organogenèse directe.
- Organogenèse sur cal (Callogenèse).
- Haplo méthodes.
- Culture et fusion de protoplastes.

1.5. Facteurs influençant la culture *in vitro*

1. **Facteurs internes** (ceux liés à la plante) : génotype, nature et l'âge de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère.

2. **Facteurs externes** : englobent les milieux et les conditions de cultures.

Tableau 2 : Techniques de culture in vitro et leurs principales applications :

Techniques de culture in vitro	Applications
<ul style="list-style-type: none"> • Culture d'embryons zygotiques • Embryogenèse somatique • Culture de nœuds et de bourgeons • Culture d'apex • Microgreffage • Micropropagation • Androgenèse et gynogenèse • Culture de cellules isolées • Culture de tissus, de cals 	<ul style="list-style-type: none"> • Sauvegarde de génotypes • Production et transformation génétique • Rajeunissement et microboutures • Etat sanitaire et rajeunissement • Etat sanitaire et rajeunissement • Rajeunissement et production • Amélioration (haploïdes) • Modèle d'études et de recherches • Substances pharmacologiques

1. Effet de l'explant

1.1. Nature d'explants

L'explant est choisi en fonction de la technique utilisée, de l'objectif visé, et de l'espèce travaillée.

Il y a plusieurs types d'explants :

- * Un tissu (apex, bourgeons, méristème, épiderme, phloème, pièces florales)
- * Organe (Tige, Feuille, Racine, Fleurs, etc)
- * Graine
- * Morceau d'organe
- * Cellule somatiques ou sexuelles
- * Protoplaste

Il y a plusieurs sortes d'explants :

- Explants différenciés : sont prélevés sur la tige, feuille, racine, inflorescence.
- Explants indifférenciés : sont prélevés à l'apex de : Tige, racine, bourgeons, nœuds. Sont les plus aptes à entreprendre une multiplication sont généralement riches en zones méristématiques potentielles.

1.2. Âge physiologique et ontogénique de l'explant

Généralement dans les cultures *in vitro*, on privilégiera les explants les plus jeunes (Embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc..) car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération (Davis, 1986, Saadi, 1991).

L'ontogenèse (ou ontogénie) décrit le développement progressif d'un organisme depuis sa conception jusqu'à sa forme mûre, voire jusqu'à sa mort.

1.3. Époque du prélèvement des explants

Ce problème se pose surtout pour les espèces vivaces (stade de vie active et ralentie de la plante) ce qui conduit les explants à développer des réactions différentes en culture in-vitro. Cette différence peut être expliquée par la modification des équilibres internes des régulateurs de croissance lors des différentes saisons (Auge et al, 1989).

1.4. Taille de l'explant

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. Tissu organisée : un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un nœud, un apex, ou un bourgeon entier) mais dans le cas d'une structure différenciée (feuilles, tige, racines, inflorescence.) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Auge et al., 1989 ; Hannweg et al., 1996).

2. Influence du génotype

La plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (Auge et al, 1989).

3. Influence du milieu de culture

Les milieux de culture doivent être constitués, en général, de sels minéraux, de substances organiques, de phytohormones et d'extraits naturels :

3.1. Éléments minéraux :

Pour la plupart des plantes supérieures, les sels minéraux sont de 2 types : Les macro-éléments (N, P, K, S, Mg et Ca) qui sont absorbés sous forme d'ions. Les micro-

éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

3.2. Eléments organiques

1. Le saccharose :

Afin d'assurer la survie et le développement de l'explant, il est indispensable d'ajouter une source d'énergie. C'est pour cela, on ajoute des sucres, le plus souvent du saccharose, pour fournir une source de carbone. On peut dans certains cas particuliers utiliser d'autres sources, tel que, le galactose et le lactose.

2. Les vitamines :

L'emploi de diverses vitamines tels que : thiamine, acide nicotinique, pyridoxine, favorise fréquemment la croissance des tissus des cultures in vitro.

3.Acides aminés

3.3. Régulateurs de croissances (phytohormones) :

Un régulateur de croissance, appelé également « phytohormone », ou aussi hormones de croissance est défini comme étant, une substance qui, suivant sa concentration absolue ou relative dans le milieu, peut supprimer, permettre ou modifier sous certaines conditions les processus de différenciation (**Vidalis et al., 1989**).

Indispensables au bon démarrage et à l'entretien des tissus végétaux des cultures in vitro, les régulateurs naturels de croissances des végétaux, se répartissent actuellement en cinq groupes : Auxines, Cytokinines, Gibbérellines, Acides abscissiques, Ethylènes. Ces substances de croissance peuvent agir en synergie ou en antagonisme. Le rapport hormonal auxine/cytokinine (balance hormonale) conditionne, en grande partie le type de la néoformation obtenu (**Figure 9 et Tableau 3**).

On trouve ces substances de croissance naturellement dans toutes les plantes ; cependant, on a pu synthétiser artificiellement des molécules possédant les mêmes propriétés. Les hormones les plus utilisées sont principalement : les auxines ; les cytokinines. Car ces hormones sont capables d'orienter les explants vers la formation de nouveaux organes.

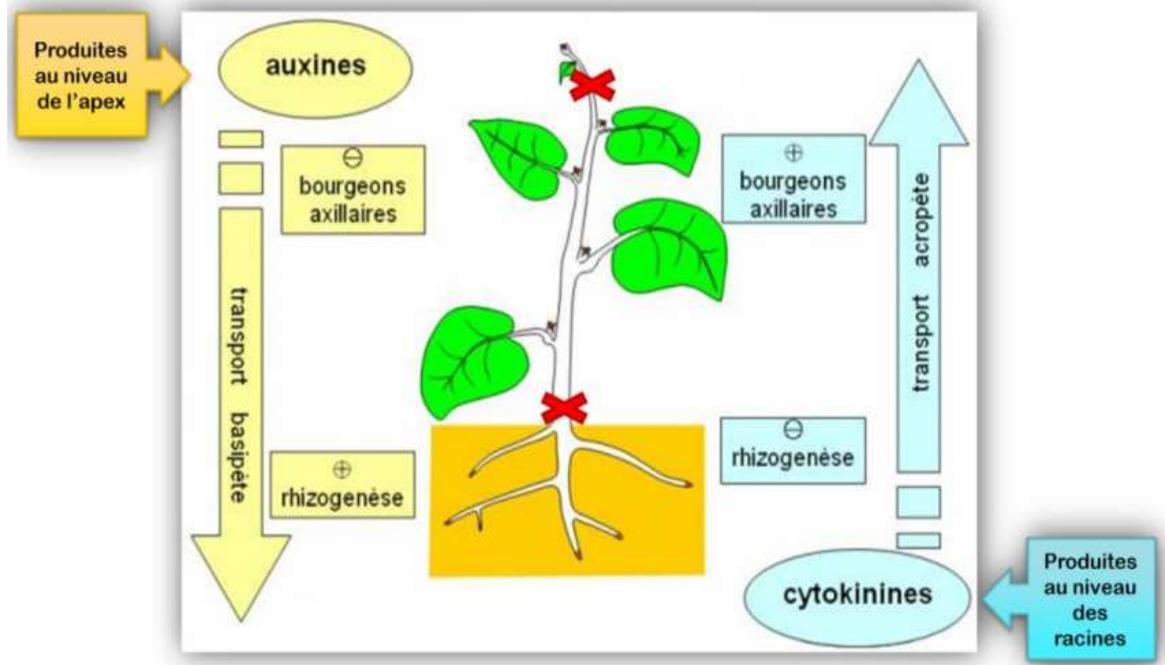


Figure 9 : Rôle des phytohormones en culture *in-vitro* (<http://labos.ulg.ac.be/>).

*Formes des milieux de culture

1. Milieu de culture solide

Est un milieu qui contient de la gélose, de la gélatine ou des biogels pour lui donner une texture gélifiée. De préférence, de la gélose pure telle que Difco-Nobel est utilisée. La gélose est ajoutée à une concentration de 0,6 à 1% (poids volumique) ou de la gélatine à une concentration de 1% (poids volumique).

2. Milieu de culture liquide

Est un environnement qui ne contient pas d'agar, il est préféré par de nombreux chercheurs en agriculture pratique plutôt qu'un environnement solide.

Tableau 3. Régulateurs de croissance des plantes couramment utilisés dans la culture de tissus végétaux (Harisha, 2008)

Classe	Nom	Abbréviation	Commentaire
Auxine	Indole-3-acetic acid	IAA	Utiliser pour l'induction de callosités à 10-30 mM. L'abaissement à 1-10 mM peut stimuler l'organogénèse. Il est inactivé par la lumière et facilement oxydé par les cellules végétales. Les auxines synthétiques ci-dessous ont largement remplacé l'IAA pour les études de culture tissulaire.
Auxine	Indole-3-butyric acid	IBA	Utilisation pour l'enracinement des pousses régénérées par organogénèse. Soit maintenir à une faible concentration (1 à 50 mM) tout au long du processus d'enracinement, soit exposer à une concentration élevée (100 à 250 mM) pendant 2 à 10 jours, puis transférer dans un milieu sans hormone. Il peut également être utilisé comme trempette pour l'enracinement in vitro ou ex vitro des pousses.
Auxine	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	L'auxine synthétique la plus couramment utilisée pour l'acide acétique induisant un cal et maintenant le cal et les cellules en suspension dans des états dédifférenciés. Habituellement utilisé comme seule source d'auxine (1–50 mM), ou en combinaison avec NAA.
Auxine	p-Chlorophenoxyacetic acid 1-Naphthaleneacetic acid	PCA NAA	Similaire au 2,4-D, mais moins couramment utilisé. Analogue synthétique de l'IAA. Couramment utilisé soit comme seule source d'auxine (2–20 mM pour l'induction des cals et la croissance des cultures de cals et de suspensions ; 0,2–2 mM pour l'induction des racines), soit en association avec le 2,4-D.

Tableau 3 (la suite). Régulateurs de croissance des plantes couramment utilisés dans la culture de tissus végétaux (Harisha, 2008)

Cytokinin	6-Furfurylamino Purine (kinetin)	K	Souvent inclus dans les milieux de culture pour l'induction de cals, la croissance de cals et de suspensions cellulaires et l'induction de la morphogenèse (1–20 mM). Des concentrations plus élevées (20 à 50 mM) peuvent être utilisées pour induire la multiplication rapide des pousses, des bourgeons axillaires/adventifs ou des méristèmes.
Cytokinin	6-Benzylaminopurine	BAP, BA	Included in culture media for callus induction, growth of callus and cell suspensions (0.5–5.0 mM), and for induction of morphogenesis (1–10 mM). More commonly used than kinetin for inducing rapid multiplication of shoots, buds, or meristems (5–50 mM).
Cytokinin	N-Isopentenylamino purine	2iP	Moins couramment utilisé que K ou BAP pour l'induction et la croissance des cals (2–10 mM), l'induction de la morphogenèse (10–15 mM) ou la multiplication des pousses, des bourgeons ou des méristèmes (30–50 mM).
Cytokinin	Zeatin	Zea	Rarement utilisé dans les cals ou les milieux de suspension. Peut être utilisé pour l'induction de la morphogenèse (0,05–10 mM). Zea est thermolabile et ne doit pas être autoclavé.
Gibberellin	Gibberellin A3	GA3	Rarement utilisé dans les callosités ou le milieu de suspension (une exception étant la pomme de terre). Peut favoriser la croissance des pousses lorsqu'il est ajouté au milieu d'induction de pousses à 0,03–14 mM. Également utilisé pour améliorer le développement dans les cultures d'embryons/d'ovules (0,3 à 48 mM). Le GA3 est thermolabile et ne doit pas être autoclavé.
Abscisic acid	Abscisic acid	ABA	Utilisé à des concentrations de 0,4 à 10 mM pour prévenir la germination précoce et favoriser le développement normal des embryons somatiques.

Tableau 4. Régulateurs de croissance, leurs abréviations et le solvant convenable pour la dissolution

Régulateurs		Solvants
1. Auxines	2-4-D	EtOH ou 1N NaOH
	AIA	EtOH ou 1N NaOH
	AIB	EtOH ou 1N NaOH
	ANA	1N NaOH
2. Cytokinines	Adénine	1.0 HCl ou NaOH
	Adénine sulfate	NaOH ou HCl
	BAP	EtOH ou NaOH
	BA	1N NaOH
	2iP	1N NaOH
	Kinétine	1N NaOH
	Thidiazuron	DMSO
	Zéatine	1N NaOH
3. Gibberellines	GA3	EtOH

3. Milieu à double phases

L'utilisation unique d'un milieu solide ou liquide en agriculture pratique peut montrer une vitreuse (vérification). Par conséquent, un environnement à double apparence est utilisé. Cet environnement est préparé en versant un environnement contenant de la gélose au fond du pot de plantation, puis en plantant le matériel végétal dessus, puis en versant un environnement liquide dessus qui contient les mêmes composants de l'environnement solide mais sans gélose.

Ainsi, la matière végétale est située entre un environnement solide et un environnement liquide contenant les mêmes composants nutritionnels. De cette manière, il est facile de changer la partie liquide de l'environnement aussi souvent que nécessaire avec un autre environnement liquide similaire mais frais.

Milieux de cultures couramment utilisés

Une variété des milieux est utilisée dans les laboratoires de culture de tissus et de cellules végétales (**Tableau 5**). Ces milieux diffèrent dans leurs composants, et parmi les plus célèbres de ces milieux :

1. Milieu de Murashige et Skoog (MS 1962)

Selon **Évans et al., (1981)**, dans 70% des cas, des milieux de culture de base de type de Murashige et Skoog (MS) ont été utilisés. Le milieu MS a été employé d'une manière générale pour tous les types de culture *in vitro*. Mais c'est essentiellement pour le déclenchement de l'organogenèse, en particulier pour la néoformation de bourgeons qu'il s'est révélé nettement supérieur à d'autres milieux (**Margara, 1989**).

Le milieu de Murashige et Skoog est caractérisé principalement par une très forte teneur en sels minéraux, en particulier en potassium et par une concentration également élevée en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 apporté sous forme réduite (Ion NH_4^+) ; le rapport nitrate/ammonium, dans ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique (**Delvesco et Guerra, 2001**).

2. Milieu de White (WH), 1963

Ce milieu caractérise par contenir de très faibles concentrations d'azote et de potassium, ce qui n'est pas à la mesure de du bon croissant des callosités et des cellules végétales.

Le chercheur devrait apporter des changements appropriés à la concentration de ces derniers deux éléments d'une manière qui convient au type de plante expérimentée.

3. Milieu de Gamborg(B5)

Ce milieu a été utilisé pour la première fois dans la culture de cellules végétales de soja, et se caractérise par une forte proportion de nitrate seul et de potassium. Il est utilisé après avoir ajouté (2,4-D) à l'environnement afin de stimuler la prolifération rapide des cellules (**Sharhabach, 2009**).

4. Lumière et Photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes, elle est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques.

La puissance lumineuse nécessaire dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture.

De façon générale, le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse (500 à 1000 lux) avec 12 à 16 h de photopériodes (**Bommeneni et Jauhar, 2003**).

5. Température

La température de beaucoup de chambres à culture est constante de l'ordre de 22° à 25° C (**Margara, 1989**).

6. Hygrométrie

L'hygrométrie 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.

Tableau 5. Composition des milieux les plus utilisés

Medium Components (mg.l ⁻¹)	MS	G ₅	W	LM	VW	Km	M	NN
Macronutrients								
Ca ₃ (PO ₄) ₂					200.0			
NH ₄ NO ₃	1650.0			400.0				720.0
KNO ₃	1900.0	2500.0	80.0		525.0	180.0	180.0	950.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.0	150.0		96.0				166.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.0	250.0	720.0	370.0	250.0	250.0	250.0	185.0
KH ₂ PO ₄	170.0			170.0	250.0	150.0	150.0	68.0
(NH ₄) ₂ SO ₄		134.0			500.0	100.0	100.0	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		150.0	16.5					
CaNO ₃ .4H ₂ O			300.0	556.0		200.0	200.0	
Na ₂ SO ₄			200.0					
KCl			65.0					
K ₂ SO ₄				990.0				
Micronutrients								
KI	0.83	0.75	0.75			80.0	0.03	
H ₃ BO ₃	6.20	3.0	1.5	6.2		6.2	0.6	10.0
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30		7.0		0.75	0.075		25.0
MnSO ₄ .H ₂ O		10.0		29.43				
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	2.6	8.6			0.05	10.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25		0.25		0.25	0.05	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025		0.25		0.025		0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025				0.025		
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O							0.05	
Na ₂ EDTA	37.3	37.3		37.3		74.6	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8		27.8		25.0	27.8	27.8
MnCl ₂						3.9	0.4	
Fe(C ₄ H ₄ O ₆) ₃ .2H ₂ O					28.0			
Vitamins and other supplements								
Inositol	100.0	100.0		100.0				100.0
Glycine	2.0	2.0	3.0	2.0				2.0
Thiamine HCl	0.1	10.0	0.1	1.0		0.3	0.3	0.5
Pyridoxine HCl	0.5		0.1	0.5		0.3	0.3	0.5
Nicotinic acid	0.5		0.5	0.5			1.25	5.0
Ca-panthothenate			1.0					
Cysteine HCl			1.0					
Riboflavin						0.3	0.05	
Biotin							0.05	0.05
Folic acid							0.3	0.5

MS Murashige and Skoog, G₅- Gamborg *et al.*, W- White, LM- Lloyd and McCown, VW- Vacin and Went, Km- Kudson modified, M- Mitra *et al.* and NN- Nitsch and Nitsch media.

2. Avantages de la culture *in vitro*

- Conservation de ressources végétales ; Grâce à la culture d'embryons zygotiques, à la micro propagation et à l'embryogenèse somatique, des génotypes peuvent être conservés *in vitro* (tubes, bocaux ou boîtes de pétri) sur de longues périodes pouvant dépasser les 10 ans (cas de l'orme, du noyer, des porte-greffes fruitiers...). Cette technique demande d'importants moyens humains pour entretenir les souches *in vitro* tout au long de l'année sur la base de repiquages mensuels. Cependant, on peut envisager de conserver les génotypes clonés dans l'azote liquide par cryoconservation (**Engelmann et Baubault, 1986**) de méristèmes (cas du merisier et du noyer), d'embryons somatiques (cas du mélèze) et zygotiques (cas du palmier à huile).
- Transport de ressources végétales d'une région à l'autre ;
- Propager des plantes réfractaires aux méthodes traditionnelles (bouturage et greffage)
- Propagation rapide est possible pour les espèces qui ont un temps de génération prolongé, de faibles niveaux de production de semences ;
- Multiplication végétative possible pendant toute l'année ;
- Surmonte les remises saisonnières pour la germination des semences ;
- Production de substances intéressantes pour l'industrie, et l'agroalimentaires.
- Obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leurs caractères intéressants (Fraisier, Bananier), leur rareté (Orchidées).
- L'assainissement des végétaux et l'amélioration des conditions sanitaires par la possibilité l'éradication des viroses par exemple. Obtention de matériels indemnes de maladies : Grâce à la culture de méristèmes ou à la technique de microgreffage on peut produire des variétés indemnes de virus en particulier (cas du fraisier, de la pomme de terre, de la vigne et des porte-greffes fruitiers) et éviter ainsi des pertes de productivité voire même la dégénérescence des plants cultivés. Ces variétés peuvent être conservées soit en culture *in vitro* soit en pépinière. Un suivi de ces variétés peut être effectué grâce à des tests sérologiques attestant la qualité de l'état sanitaire des plants commercialisés.
- Raccourcissement des cycles de vie des végétaux.
- Collection de génotypes et état physiologique du matériel conservé : A partir d'un matériel sélectionné, il est possible de produire par culture de nœuds et/ou micropropagation des copies végétatives qui serviront à l'installation de parcs à pied-mères.

- L'application des techniques de culture *in vitro* (Micropropagation et microgreffage) permet de maintenir le matériel sélectionné dans un état proche de la juvénilité favorable à la multiplication végétative, au bouturage en particulier (**Franclet et al., 1980**). Cette opération est généralement couplée à des techniques dites de rajeunissement (taille sévère, recépage) des pieds-mères ou des arbres âgés sélectionnés qu'il est nécessaire d'utiliser pour obtenir de bons résultats en culture *in vitro* (prolifération, croissance des pousses feuillées et formation des racines adventives).
- Taux de multiplication plus élevé ; développement de méthodes de production de plants : La culture *in vitro* a depuis longtemps fait ses preuves comme outil de production de plants par sa rapidité à amplifier une variété donnée, par sa capacité à raccourcir les cycles de production et à stocker de grandes quantités de matériel dans un espace réduit, par sa puissance de production en masse sur des temps courts permettant une programmation précise de la sortie des plants commandés. Dans le domaine de l'horticulture, deux principales méthodes sont aujourd'hui utilisées : la micropropagation et l'embryogenèse somatique. La première est bien adaptée à la production de plantes herbacées, d'arbres fruitiers et de feuillus forestiers, alors que la seconde est performante pour les conifères et certaines monocotylédones telles que le palmier dattier par exemple (**Jay-Allemand et al., 1992**). De nombreuses entreprises ou pépinières privées ont intégré cette technique en tant qu'outil de production leur permettant de gérer la quantité de plants selon les commandes. Mais plus rares sont celles qui l'utilisent comme un outil central de gestion du matériel et de production, situé en permanence à l'interface pieds mères et élevage en serre.
- La culture *in vitro* au service de l'amélioration variétale : L'amélioration génétique traditionnelle tient et tiendra encore toute sa place pour les années à venir afin de sélectionner des variétés bien adaptées à l'environnement dans lequel elles seront cultivées, tolérantes aux maladies et possédant des caractéristiques agronomiques intéressantes. Cependant, là encore la culture *in vitro* joue et jouera un rôle déterminant à trois principaux niveaux :
 - La sauvegarde de génotypes produits par fécondation contrôlée grâce à la culture d'embryons zygotiques ou d'axes embryonnaires.
 - La production d'haploïdes par androgenèse (culture d'anthers) ou gynogenèse (sacs embryonnaires, oosphères non fécondés) permettant d'obtenir des lignées homozygotes après diploïdisation, recherchées par les améliorateurs.

- La production de plants génétiquement modifiés via *Agrobacterium tumefaciens* par l'utilisation de techniques de régénération faisant appel à l'embryogenèse somatique au bourgeonnement adventif et à la micropropagation.

3. Limites de cultures *in vitro*

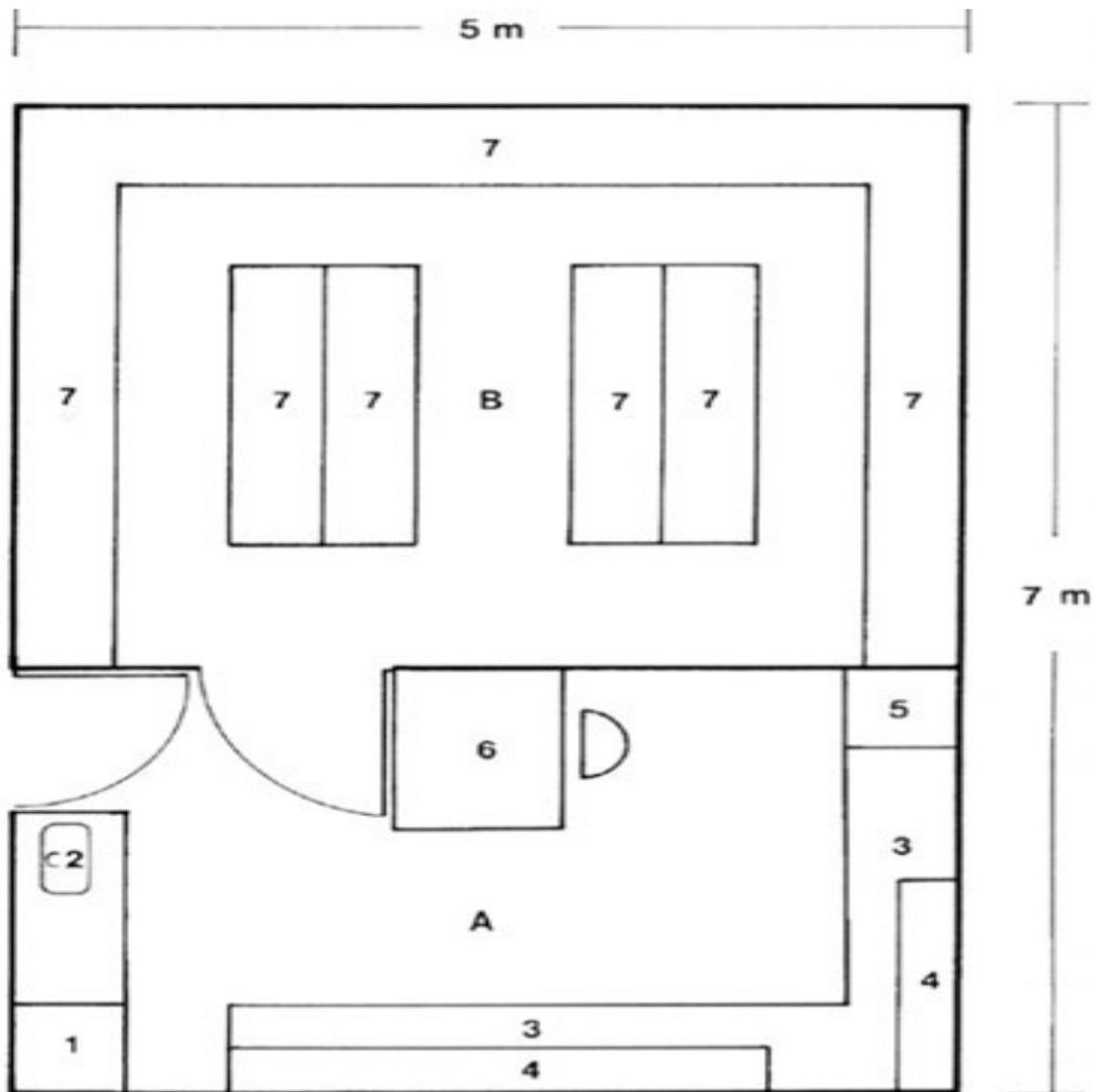
- L'exigence d'une main d'œuvre qualifiée et d'une technicité élevée.
- Possibilité de perte de caractères intéressants : la production répétée de grands nombres de clones peut entraîner la perte des gènes intéressants tels que les gènes de la résistance à certaines maladies. il faut donc conserver les pieds mères et à certains moments, repasser par la reproduction sexuée.
- Le problème de contamination : (du soit à l'explant ou à la technique), en effet, la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, peuvent contaminer la culture.
- La vitrification : Certains accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture *in vitro*, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal.
- Problèmes inhérents à la technique : -L'asepsie : La technique de culture *in vitro* exige beaucoup de soin pour le maintien des cultures en condition d'asepsie. Lorsque l'on a des cultures infectées, cela peut provenir de différentes causes. Il peut s'agir 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. 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. Si l'infection part de la zone de contact entre les tissus et le milieu, 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 (**Auger et al., 1989**). - L'acclimatation : Le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat. En effet, durant son séjour *in vitro*, la plante est à l'abri des stress. - L'apparition d'anomalies génétiques : Certains cas d'hyperfloraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux : c'est la variation somaclonale.

4.Laboratoire de culture des tissus

4.1. Organisation de base

Le laboratoire pour la culture des tissus végétaux nécessite une organisation de base comprenant trois domaines (**Figure 10**):

- Laboratoire général (salle de lavage et de préparation des milieux) A:
- Zone pour la manipulation aseptique du matériel végétal (salle de transfert 6) :
- Zone de culture (salles de culture B) : avec des conditions contrôlées pour la lumière, la température et l'humidité,
 - * Température est contrôlée par un équipement de climatisation ou des appareils de chauffage. Selon le cultivar, la température moyenne d'une salle d'incubation doit être de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.
 - *Il est recommandé d'utiliser des thermostats qui empêchent les variations de T dans la pièce de dépasser les exigences de culture.
 - *Le flux d'air doit être uniforme dans la salle de culture pour maintenir la même température dans tout l'environnement.
 - *L'équipement de climatisation contrôle indirectement l'humidité relative.
 - *La lumière est fournie par des lampes fluorescentes et la photopériode est contrôlée par une minuterie horaire. (Les lampes fluorescentes ont un avantage sur les lampes à incandescence parce qu'elles ont une meilleure qualité de lumière).
 - *La plupart des cultivars nécessitent un éclairage qui varie entre 500 et 3 000 lux.
 - * Les étagères peuvent être métalliques ou en bois, et doivent être peintes en blanc.
 - * avoir une plate-forme d'incubation de 0,45 x 0,90 m, avec une hauteur de 0,30 m parmi les étagères (**Figure 11**),
 - * placer un plateau sur le sol, avec un tapis contenant un acaricide et un fongicide pour imprégner les chaussures de ceux qui entrent dans la salle de culture.
 - *L'accès à la salle de culture ne sera permis qu'aux personnes qui y travaillent.
 - *Un laboratoire de culture de tissus peut être situé dans n'importe quelle zone géographique.



SCALE 1:50
 A Laboratory
 B Incubation room

- 1 Autoclave
- 2 Washbasin
- 3 Working tables
- 4 Wall cabinet
- 5 Refrigerator
- 6 Transference chamber
- 7 Incubation shelves

Figure 10. Laboratoire de culture des tissus

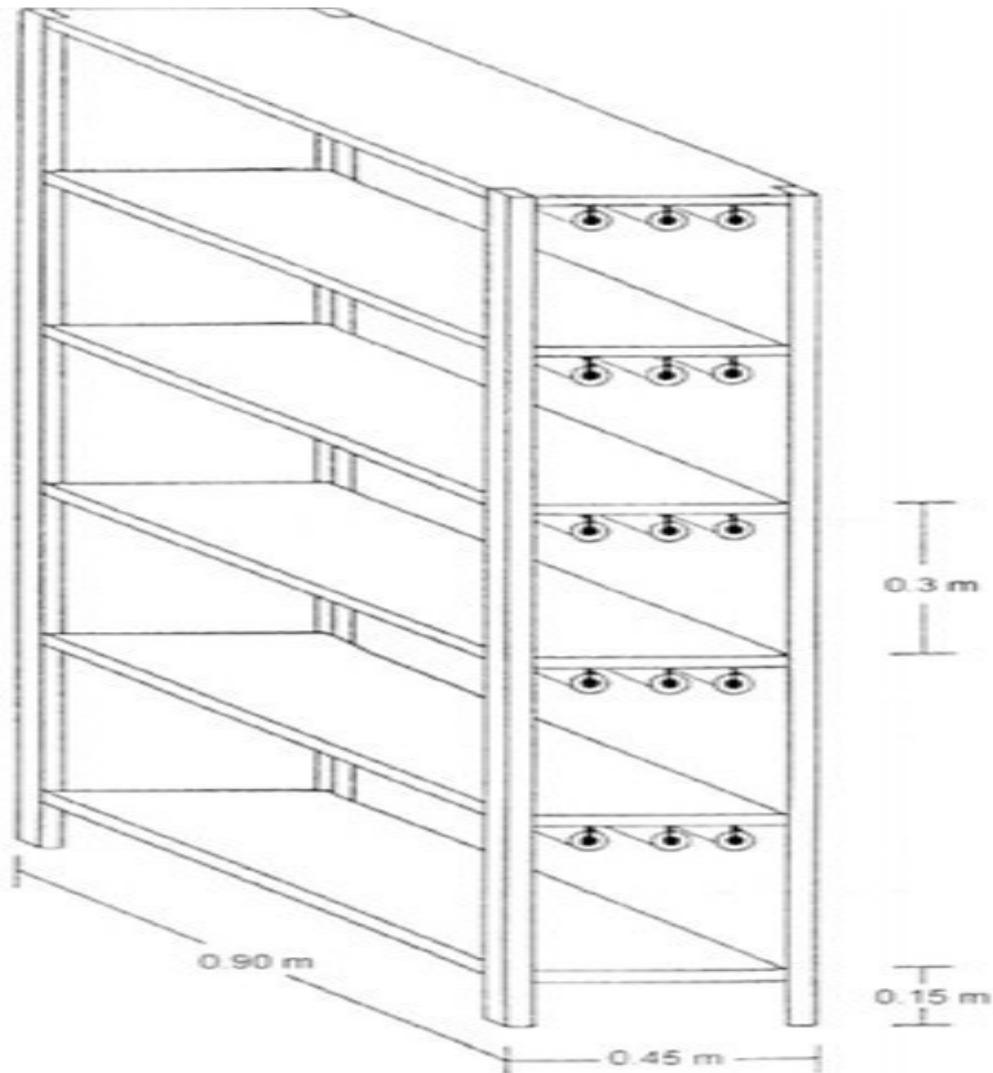


Figure 11. Etagères du laboratoire de culture des tissus

4.2. Zone de travail et équipement

- **Hottes à flux laminaire**

Il existe 2 types de hottes à flux laminaire, vertical et horizontal. Les deux types de hottes ont un déplacement continu d'air qui passe à travers un filtre (particules à haute efficacité) qui élimine les particules de l'air. Les hottes sont équipées d'une lumière UV à ondes courtes qui peut être allumée pendant quelques minutes pour stériliser les surfaces de la hotte, mais sachez que seules les surfaces exposées seront accessibles à la lumière UV. Ne placez pas vos mains ou votre visage près de la hotte lorsque la lumière UV est allumée, car la lumière à ondes courtes peut endommager la peau et les yeux. Les hottes doivent être allumées environ 10 à 20 minutes avant d'être utilisées. Essayez toutes les surfaces avec de l'éthanol avant et après chaque utilisation.

