

**L3 Génétique**  
**Module: Culture in vitro**  
**Enseignant : BENMAHIOUL B.**

# Stérilisation

Une des caractéristiques essentielle de la culture des tissus est la **conservation du matériel végétal et du milieu nutritif hors de toute contamination et principalement sans microorganismes.**

Le milieu de culture ainsi que la verrerie, les outils, l'eau tout autre éléments employé lors de la préparation du milieu doivent être stérilisés.

Par ailleurs, on doit (par précaution) éviter de partager les lieux de travail avec des microbiologistes ou phytopathologistes et travailler bien entendu avec le maximum de propreté et une bonne organisation.

## 1- stérilisation du matériel en verre et des instruments

- La stérilisation de la verrerie et du petit matériel peut se réaliser en employant un **autoclave**, un **étuve** ou de l'**éthanol**.
- La résistance des bactéries et spores de champignons aux températures élevées a été largement étudiée.
- Il faut signaler que ces **températures dépendent** du matériel qu'on va stériliser et surtout **des volumes traités**, s'il s'agit des milieux de culture.
- La stérilisation par l'éthanol nécessite le prolongement des outils employés dans l'éthanol à 70-80 % pendant 15 minutes puis les passer à la flamme.

Conditions générales de la stérilisation des instruments et la verrerie  
(D'après BIONDI et THORPE, 1981)

<i>Température °C de l'autoclave</i>	<i>Temps de stérilisation en minutes.</i>
121	15-30
140	10-20
160	7-15
160-180	5-10

## 2- stérilisation des milieux de culture

- La méthode généralement utilisée pour stériliser les milieux de culture est l'**autoclavage**.
- Pour une **stérilisation efficace**, il est conseillé de manipuler le **milieu de culture en petites quantités dans plusieurs récipients**.
- **Plus le volume traité est important et moins il y a d'échange de chaleur**.

Temps minimum de stérilisation par volume de milieu de culture  
(D'après *BIONDI et THORPE, 1981*)

<i>Volume du milieu de culture (ml)</i>	<i>Temps minimum de stérilisation à 121° C (minutes)</i>
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

- Un problème se pose lorsqu'on, stérilise à l'autoclave un milieu nutritif qui contient des **composés soit thermolabiles** (substances qui sont détruites ou qui perdent leurs propriétés à des T° élevées), soit risquant de se dégrader partiellement. Exemple : le fructose qui produit à des T° élevées de petites quantités de furfurals toxiques.

- **Certaines vitamines, l'acide gibbérellique, l'acide abscissique, sont thermolabiles**, mais néanmoins la plupart des auxines et cytokinines sont stables à la chaleur.

- On peut **stériliser les substances chimiques thermolabiles au froid** et les ajouter ensuite au milieu passé à l'autoclave. C'est la stérilisation **par filtration**. On fait passer la solution dans un filtre en cellulose de pores de 0,25  $\mu\text{m}$ .

### 3- Stérilisation des explants

- Ethanol
- Hypochlorite de sodium ou calcium
- Peroxyde d'hydrogène
- Bichlorure de mercure,...

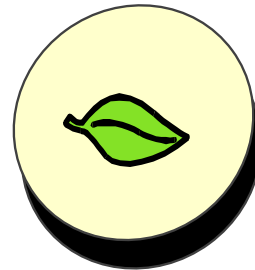


## Protocole de stérilisation des explants végétaux

  
Choix de  
l'échantillon



- 1/ Ethanol 10 s
- 2/  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  7%, 10 mn
- 3/ 3 lavages  $\text{H}_2\text{O}$  stérile



Découpage de l'explant  
et mise en culture

## 2.2- Le Choix de l'Explant

### 1- Choix de l'explant en fonction du stade et de l'âge du pied - mère.

- En règle générale, les plantes jeunes fournissent les explants les plus réactifs, les potentialités diminuent avec âge.

### 2- Choix de l'explant en fonction de l'époque de prélèvement

- Chez les espèces ligneuses par exemple, tous les prélèvements sur les rameaux en croissance ont abouti à des échecs.

- Au cours du cycle annuel, la plante va voir ses équilibres internes évoluer; au cours du printemps les organes croissent et les analyses montrent la présence de régulateurs comme l'auxine, les gibbérellines et les cytokinines; au cours de l'été ce flux de substances diminue puis, à l'automne, apparaissent des inhibiteurs.

### 3- Choix de l'explant en fonction de sa localisation sur la plante mère

Quand le meilleur stade et la meilleure époque ont été déterminés, il va falloir prélever les explants : selon le type d'organisation du fragment qui sera mis en culture, on distingue:

1- Explants qui présentent une structure ébauchée ou organisée (bourgeons, apex,..);

2- Explants constitués de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de fleurs,..)

### 4- Choix de l'explant en fonction de sa taille et de sa nature

La taille du fragment mis en culture présente une grande importance :  
- Plus l'explant est grand, plus les équilibres endogènes seront déterminants; un explant de petite taille sera plus facilement orientée par les substances contenues dans le milieu.