

**TP N°1 : Equipement et bonnes pratiques au laboratoire de culture *in vitro*****1- Objectifs du TP:**

- Présentation du matériel nécessaire à la culture *in vitro* végétale,
- Initiation aux règles à respecter et aux bonnes pratiques de laboratoire pour une manipulation réussie.

**2- Matériel de laboratoire**

Pour le bon déroulement des manipulations ; le laboratoire doit posséder un équipement de base :

- **Loupe binoculaire** : Cette loupe sert à isoler des méristèmes. Elle doit avoir une très bonne qualité optique. Le grossissement jusqu'à 40 fois permet une bonne visualisation du tissu.
- **pH mètre** : Cet appareil est absolument indispensable, et en aucun cas le test au papier pH ne peut remplacer les mesures précises du pH du milieu de culture préparé.
- **Balance de précision, 0,001g** : La balance doit être électronique, dotée d'une infime précision. Elle doit être placée à l'extrémité de la paillasse afin d'éviter son déplacement et les bousculements, qui peuvent être source de son endommagement. Donc à une distance des appareils à moteurs puissants qui peuvent être source de vibrations. L'horizontalité de la balance doit être vérifiée et éventuellement corrigée avant chaque utilisation.
- **Etuve** : Nécessaire pour certaines cultures réclamant des températures différentes de la température ambiante.
- **Autoclave** : Utilisé pour stériliser les solutions, les milieux de cultures, et le matériel sensible aux températures élevées. La stérilisation se fait à 120°C pendant 20 mn. Il est strictement interdit de remplir l'autoclave avec l'eau courante, qui risque de l'endommager par la présence du calcaire. Dans le cas de l'absence de cet appareil, une cocote minute neuve peut être utilisée pour la stérilisation. Il faut juste la remplir avec de l'eau distillée jusqu'au niveau de la moitié des bouches des milieux de culture, fermer et compter 20 minutes après le premier sifflement.
- **Four pasteur** : Destiné pour la stérilisation à la chaleur sèche de tous le matériel qui résiste à des températures élevées. Le matériel, préalablement nettoyé, est enveloppé soit par le papier filtre ou par le papier aluminium. Il est par la suite stérilisé à 170°C pendant 30 minutes.
- **Bec bunsen** : C'est le brûleur le plus utilisé pour une stérilisation sèche, dite à la flamme, des instruments (pinces, Scalpels et bistouris). La flamme du bec bunsen doit être non pas jaune mais bleu. Ce type de flamme est obtenu par le réglage de la virole qui permet d'agencer l'entrée de l'air dans le bec bunsen. Dans ce cas-là, la température peut atteindre à l'intérieur de la flamme 5000°C. La chaleur

produite stérilise l'atmosphère au-dessous de la flamme, et se produit tout autour du bec un déplacement ascendant de l'air, créant ainsi une zone stérile d'un diamètre de 20 cm maximum.

- **Plaque chauffante- agitateur** : Cet appareil est indispensable au laboratoire. Il est utilisé généralement pour préparer les milieux de cultures, et pour chauffer les solutions si nécessaire.
- **Hotte à flux laminaire** : C'est un appareil qui permet de faire des manipulations en conditions d'asepsie maximale.

### 3- Règles à suivre au laboratoire de culture *in vitro* :

Le laboratoire exige une tenue exemplaire. Les manipulations doivent être effectuées avec grand soins. Les règles que tout étudiant devra suivre dans son propre intérêt, comme celui de ses confrères sont les suivants :

- Mettre d'une blouse blanche propre est de rigueur, elle doit toujours être fermée ;
- Les étudiants aux cheveux longs doivent les attacher lors de la manipulation ;
- Ne jamais oublier de se laver les mains avant et après chaque séance de travail, avec du savons additionné antiseptique des distributeurs. Evitez les pains de savon solides. En se fissurant, ils deviennent eux-mêmes source de contamination ;
- IL est strictement interdit de manger ou de fumer au laboratoire. L'étudiant doit respecter la présence d'une hygiène parfaite du laboratoire ;
- Eviter tout courant d'air avant les manipulations, et prévenir les contaminations en assurant la destruction des souches microbiennes au niveau du laboratoire ;
- L'étudiant doit éviter de parler ou de se déplacer lors de la manipulation en conditions stériles, cela évitera les contaminations des cultures ;
- Après chaque séance de travail, le matériel et la paillasse devront être nettoyés et les déchets éliminés.

### D- Mode d'évaluation de l'étudiant :

L'évaluation écrite de l'étudiant est faite en lui exposant des questions sur la thématique du TP