

1 **Licence Sciences et Techniques (LST)**

**Technique d'Analyse et Contrôle de Qualité
« TACQ »**

PROJET DE FIN D'ETUDES

**LA MULTIPLICATION IN VITRO
DE CACTUS**

Présenté par :

Soumaya sidouna

Encadré par :

- **Pr : OULMEKKI ABDELLAH(FST)**
- **Dr : BOUAICHI ABDELAAZIZ**

Soutenu, Le 6 /7/2022 devant le jury composé de :

- **Pr.HAZM JAMAL Eddine**
- **Pr.OULMEKKI ABDELLAH**
- **Pr. ZARGUILI IKBAL**

Stage effectué à Erfoud dans laboratoire Oasis biotechnologie

Année Universitaire 2021 / 2022

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé avec le soutien du **OASIS BIOTECHNOLOGIE** qui est un laboratoire de multiplication in vitro spécialisé en culture de tissus végétaux et plus particulièrement en multiplication végétative conforme par organogenèse du palmier dattier mis en place par ALWAHA HOLDING en 2013.

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

En témoignage de mon affection et reconnaissance pour tout ce qu'ils

M'ont donné

Sans vous je ne serais jamais arrivé jusque la

Je vous remercie pour votre soutien et votre amour

Inconditionnel

Vous n'avez jamais hésité à vous sacrifier pour ma réussite

Et mon bonheur

A ma très chère sœur Assiya

A mes encadrants

Table des matières

1	Licence Sciences et Techniques (LST)	1
2	Introduction générale sur le cactus.	1
3	Production et statistique concerne le cactus.	1
4	Les conditions climatiques pour une bonne production de cactus.	1
4.1	Adaptation aux différents types de sol	1
4.2	2. Adaptation aux hautes et basses températures.....	2
5	La répartition de cactus au Maroc.	3
6	Les compositions physiques et chimiques de cactus	3
6.1	1. Description systématique des différentes parties de la plante (raquette, fleur, épine)	3
6.2	2. Répartition géographique et divers utilisations socio-économiques	5
6.3	3. Métabolisme et physiologie de la plante	5
6.4	4 : La teneur des molécules d'intérêt dans la différente partie de cactus	6
6.5	4 : Caractérisation physico-chimique des différentes parties de la plante de cactus	8
7	Maladies et parasites des cactus	10
7.1	1 .Le parasite ennemi n°1 du cactus : la cochenille.....	11
1	La multiplication de cactus in vitro	13
1.1	Les étapes de la multiplication in vitro :	15
2	Conclusion.....	18

2 Introduction générale sur le cactus.

Le cactus est une plante xérophyte qui produit des fruits comestible et du fourrage pour le bétail. Ses raquettes sont riches en eau et en éléments nutritifs .il peut être considéré comme une espèce adéquate pour une agriculture durable des régions arides et semi arides et ce grâce à sa résistance à la sécheresse et sa contribution dans l'alimentation de l'homme et du bétail.

Le Maroc est un pays qui connut par ses aléas climatique qui peuvent engendrer des périodes successives de sécheresse et par l'aridité d'un grand nombre de ses régions.

Le cactus peut être une alternative pour le développement durable de ses régions grâce à son adaptation au climat de ces zones et son importance économique.

La situation du cactus au Maroc et sin adaptation à la sécheresse vont être présentée et l'importance de cette plante dans la production de fruits comestibles et de raquettes en tant que fourrage sera abordée. La valorisation de cette espèce au Maroc et les possibilités de son développement en milieu rural seront traités.

3 Production et statistique concerne le cactus.

D'après le ministère de l'agriculture de Maroc le cactus s'étendant sur une superficie d'environ 88200 ha ,les plantation de cactus des variétés « Moussa »et « Aissa » couvrent toutes les provinces de la région et permettent de produire annuellement pas moins de 400 000 tonnes de fruits une partie de cette production est valorisée par environ 45 groupements (coopératives et GIE) pour des fins de transformation (huile de cactus Nopal Savon) la filière a bénéficié de la création d'une capacité de valorisation importante qui est de plus de 10 000 T/an pour le conditionnement du fruit de cactus et de 2 000 T/an pour l'extraction d'huile de cactus.

4 Les conditions climatiques pour une bonne production de cactus.

4.1 Adaptation aux différents types de sol

Le cactus peut être cultivé dans divers types de sol ayant différents pH. Il peut supporter aussi bien les sols acides que les sols calcaires, voire salins, à moins de ne pas dépasser 70 moles de NaCl. Si les sols très perméables, légers, sablonneux limoneux, sableux et même caillouteux ayant un faible taux d'argile (moins de 20%) lui conviennent parfaitement, le cactus redoute toute fois les sols lourds, mal drainés (sols hydro morphes) et les terres battantes. Les espèces du genre Opuntia et le Figuier de Barbarie en particulier, s'adaptent aux terrains sablonneux aux sols à empattage moyen, pauvres en substances organiques et de faibles épaisseurs. Toutefois pour la constitution de vergers cactus en culture intensive, les sols profonds (60 à 70cm) lui conviennent parfaitement. Dans ce cas, cité par, a proposé des teneurs du sol élevées en calcium (Ca) et en potassium (K) pour produire des fruits de bonne qualité.



Figure 1 : images de différents sol de cultivé le cactus

4.2 2. Adaptation aux hautes et basses températures

La plupart des espèces craignent le froid humide (minimum absolu supérieur à -10°C) car il favorise une pourriture d'origine bactérienne contre laquelle la seule méthode de lutte consiste à supprimer les pieds et les cladodes atteints. Certaines espèces adaptées en région méditerranéenne arriveraient à résister à des températures de -5 et -10°C ; Il s'agit d'*Opuntia ficus indica*, *Opuntia*

Contre l'érosion, la conservation, la restauration, la valorisation *dillenii* et *Opuntia compressa* vr. *Helvetica*. La limite thermique où se développe le cactus au Maroc n'excède généralement pas les 1000m d'altitude. Au Mexique, nous le trouvons sur des sites situés à 1800-2200m d'altitude avec une pluviosité annuelle de 400-500 mm et une température annuelle moyenne de $16-18^{\circ}\text{C}$.

Au Maroc, excepté les zones sahariennes, nous retrouvons le Figuier de Barbarie un peu partout, dans les régions côtières depuis Sidi Ifni jusqu'à Tanger, mais aussi dans presque toutes les zones continentales. Cependant, les meilleures plantations sont situées dans les régions côtières qui subissent l'influence océanique et où

La température annuelle moyenne est de 18°C et les minima des mois les plus froids ne descendent que rarement en deçà de 5°C . En effet, l'influence maritime confère, sur cette bande côtière, de plus de 10Km de largeur, un climat doux, humide et clément aussi bien en hiver qu'en été. Bien que la pluviosité dans les régions sud ne dépasse que rarement les 100mm (29,8mm seulement en 1992), les rendements en fruits sont plus élevés dans cette bande, la plante bénéficiant tout au long de l'année du brouillard nocturne et matinal.

Le cactus, de par ses caractéristiques d'adaptation aux conditions climatiques difficiles et les revenus qu'il peut générer au profit des populations des régions arides, pourrait constituer un levier pour promouvoir un développement durable au niveau de ces zones. En effet, cette plante miracle a permis la mise en valeur des terres marginales et zones arides et semi-arides, où d'autres espèces cultivées végétaient difficilement. Son adaptation à différents climats et sols lui permet de répondre efficacement lorsqu'elle est utilisée dans la lutte des sols et la régénération des espèces naturelles.

Dans le cadre de la nouvelle stratégie «Plan Maroc Vert», et dans le cadre de la mise en valeur des zones arides, la culture du cactus constitue l'une des principales options prioritaires dégagées par le Plan Agricole Régional de nombreuses régions arides et semi-arides marocaines, où des centaines de milliers d'hectares sont identifiés pour la plantation dans un avenir très proche.

Afin d'atteindre les objectifs escomptés par un tel programme, il est nécessaire d'investir sur la réussite des nouvelles plantations identifiées et également

D'avoir une vision très claire sur les voies de valorisation des produits issus du cactus pour différentes finalités.

5 La répartition de cactus au Maroc.

L'existence du cactus au Maroc date d'il y a 3 siècles et sa culture occupe aujourd'hui une surface très importante du Royaume. La filière étant sous la menace de la cochenille, un ravageur dévastateur, le Ministère, l'ONSSA ainsi que la coopération Maroc-FAO ont lancé un programme de lutte intensif pour Préserver la ressource cactus et éviter une catastrophe.

De plus d'un million ha de cactus ; le Brésil quant à lui, après avoir perdu 200.000 ha à cause de la cochenille, compte aujourd'hui 400.000 ha. En Afrique, le Maroc est recouvert

De 160.000 ha de cactus, contre 10.000 ha en Algérie et 30.000 ha en Ethiopie », indique Abderrahmane Ait Hamou, Ingénieur agronome et Membre de l'Association Nationale pour le Développement des Cactus.

Les principales populations de cactus au Maroc se répartissent « au nord à El Hoceima, avec 1.200 ha de la variété Dellahia, à Rhamna au centre (50.000 ha), au sud dans la région d'Aït Baâmrane (60.000 ha), mais aussi à Taza (500 ha), Shoul

de Rabat (100 ha), Doukkala (200ha), Boujaad (600 ha) et Essaouira (300 ha) », ajoute M. Ait Hamou. Le Maroc compte plusieurs variétés de cactus, à savoir : Dellahia, Alhamra,

Shoul, Majdoubia, Haddaouia, Rehmania 1 et 2, Akkouri, Mles, Dribina, Achefri, Moussa et Aïssa. Le cactus est largement vendu comme une collation rafraîchissante par des Vendeurs ambulants, principalement pendant les mois chauds de l'été, mais, dans la région d'Aït Baâmrane, la production peut durer jusqu'à décembre. La variété Akkouri présente aussi la particularité d'être présente sur le marché sur une période différente des autres variétés. Utilisé traditionnellement comme clôture ou en tant que base pour l'alimentation animale, le cactus a vu, au cours des dernières années, son huile de pépin se vendre à un prix très élevé.¹

6 Les compositions physiques et chimiques de cactus

6.1 1. Description systématique des différentes parties de la plante (raquette, fleur, épine)

Opuntia spp communément appelées figuier de Barbarie ou cactus Nopal, appartient à la famille des cactacées. C'est une famille qui comprend environ 1500 espèces de cactus genre *Opuntia*. C'est une plante tropicale et subtropicale, dicotylédone caractérisée par ces feuilles

¹ Ministère de l'agriculture marocain
Des articles de l'ONSSA
Des articles de journal

réduites en épines, qui présente une grande capacité d'adaptation aux conditions les plus hostiles et produit une biomasse importante d'une manière très efficace.

a. La raquette

Les espèces d'Opuntia sont des plantes vivaces. Elles ont une hauteur de quelques centimètres à plus de 6 m, un système racinaire charnu, superficiel et à dispersion horizontale et une tige charnue ou ligneuse couverte d'un épiderme. Cet épiderme est formé des cellules minces avec une paroi externe imprégnée d'une substance lipidique appelée cutine recouverte de cires. La tige et les rameaux sont divisés en longueur pour donner des raquettes cylindriques ou aplatis ayant une longueur moyenne de 30 à 50 cm et une largeur moyenne de 15 à 30 cm. La couleur des raquettes est verte.

b. la feuille

Les feuilles des espèces d'Opuntia sont réduites en épines et il est parfois difficile de les identifier ou de retrouver leurs cicatrices. Les aréoles qui sont de petite protubérance à la surface des cactées d'où émergent les aiguillons ou les soies, portent des épines et des poils spéciaux appelés les glochides. Ces épines sont blanchâtres, clarifiées, solidement implantées, avec une longueur de 1 à 2 cm. Il existe des variétés inermes (sans épines). A partir des tissus méristématiques des aréoles se développent les nouvelles cladodes, racines et fleurs.

c. La fleur

Les fleurs sont hermaphrodites, solitaires et de différentes couleurs selon les espèces avec des sépales, des pétales et des étamines en nombre indéfini et en disposition spiralée. Leur gynécée est formé par un ovaire inféré constitué de 5 carpelles soudées qui se transforme à maturité en un fruit comestible.

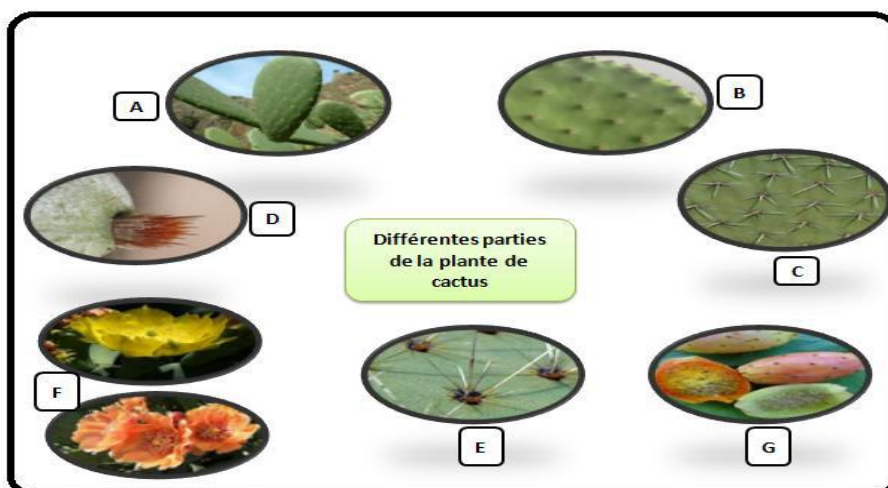


Figure 2 : Présentation des différentes parties de la plante de cactus. A : Raquette d'Opuntia Spp, B : Aréoles d'Opuntia ficus indica (inermes), C: Aréoles d'Opuntia munies d'épines D :

Glochides d'Opuntia aciculata, E : Aiguille d'Opuntia leucotricha, F : Fleurs d'Opuntia ficus indica, G : Fruits d'Opuntia spp.

6.2 2. Répartition géographique et divers utilisations socio-économiques

Cette plante a été adoptée par l'homme pour différentes fins comme : (jeune raquette = "Nopalitos"), plante pharmaceutique (fleurs, cladodes fruit consommé frais ou conservé, fourrage sur pied (raquette), légumes), plante industrielles (confiture, jus, colorants naturels, boisson alcoolisée, produits cosmétiques), plante apicole, outil de contrôle contre l'érosion en agroforesterie et en amélioration pastorale et plante clôture/haie. Elle peut pousser dans des climats arides et semi-arides avec une répartition géographique Mexique, l'Amérique latine, l'Afrique du Sud et les pays de la Méditerranée.

6.3 3. Métabolisme et physiologie de la plante

Que le dioxyde de carbone est fixé dans les tissus de chloroplaste par réaction avec le phosphoénolpyruvate (PEP), résultant du métabolisme de l'Opuntia est une plante succulente, qui a la capacité à emmagasiner l'eau dans leurs racines ou tiges et feuilles de manière à limiter la transpiration, cette faculté lui rend bien adapté à la sécheresse. L'unique différence entre le cactus et les autres plantes succulentes, est due à la présence des aréoles. La plante Opuntia est une plante de type CAM (Crassulacean Acid Métabolism) capable de diminuer leur transpiration par la fermeture des stomates pendant les heures ensoleillées et chaudes et leur ouverture pendant la nuit. Elle présente des adaptations morphologiques et physiologiques lui permettant de résister à la sécheresse, aux chaleurs torrides, aux vents violents et aux tempêtes de sable. Le métabolisme de photosynthèse CAM peut être 4 à 5 fois plus efficace en matière de fixation de CO₂ par la photosynthèse que les graminées les plus efficaces. Opuntia arrive à produire entre 8 et 12 t/ha/an de fruits frais et entre 20 à 50 t/ha/an de matière végétative fraîche. Les jeunes plantations peuvent entrer en floraison à partir de la deuxième ou la troisième année. La durée et la période du cycle annuel dépendent de l'écotype et de la zone géographique. Le figuier de Barbarie a la particularité de fixer le dioxyde de carbone et de libérer l'oxygène pendant la nuit et de fermer ses stomates pendant le jour. Ce dispositif permet une moindre perte d'eau par évapotranspiration pendant les heures les plus chaudes. La pénétration de l'air par les stomates ouverts s'effectue pendant la nuit et c'est à ce moment-là que les sucres via la glycolyse, pour donner l'oxaloacétate. Cet élément est à son tour transformé en malate pour être stocké dans la vacuole. Pendant le jour, le malate se décompose en pyruvate et libère le dioxyde de carbone et l'eau directement au niveau des tissus chlorophylliens qui s'en servent pour la suite de la photosynthèse selon le cycle de Calvin.

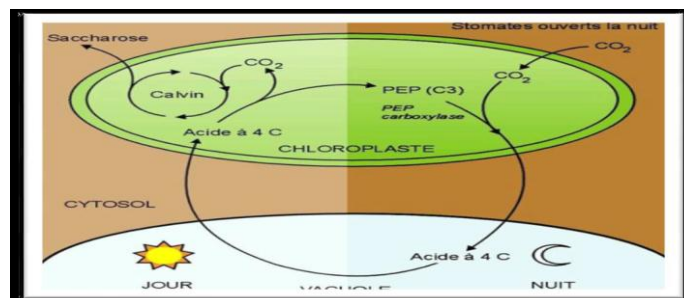


Figure 3 : cycle photosynthèse des plantes de types CAM

C'est une différence fondamentale avec les plantes ordinaires (mésophytes), pour qui la photosynthèse s'effectue le jour à partir du dioxyde de carbone fraîchement importé de l'atmosphère. Du point de vue physiologique, plusieurs travaux de fertilisation phospho-azotée ont montré des réponses considérables des taux de croissance des raquettes et des fruits par rapport au témoin. Le cactus est multiplié végétativement par bouturage des raquettes en laissant sécher au préalable les sélections pendant 14 à 30 jours durant l'automne ou le printemps, mais cette technique prend beaucoup de temps avant l'installation des racines et présente un risque de pourriture de la plante en cas de pluies excessives. L'utilisation des régulateurs de croissance pour accélérer l'initiation et la croissance racinaire ainsi que pour faciliter la réussite de l'installation du verger a été testée et a donné des résultats très prometteurs.

6.4 4 : La teneur des molécules d'intérêt dans la différente partie de cactus

Les vitamines

Chez le cactus, en particulier sa peau, est riche en vitamine E avec des quantités allant jusqu'à 17,6 g/kg d' α -tocophérol, on trouve aussi de nombreuses vitamines dans les fleurs et plus précisément la vitamine K1 est présente dans toutes les parties du fruit, allant de 0,5 à 1 g/kg. La vitamine B est uniquement présente dans la raquette dans laquelle elle se trouve dans l'état de traces.

Les phytostérols

Les recherches ont montré que le β -sitostérol extrait de différentes parties des huiles de fruits : la pulpe, la peau et les graines, avec une teneur allant de 6,75 à 21,1 g/kg. Le campestérol est présent dans la graine et la peau avec une quantité de 1,66 à 8,76 g/kg. Jusqu'à présent, la composition en stérols des huiles essentielles de fleurs et cladode et même d'épines, reste à déterminer.

Les composés minéraux

Les graines issues de fruits de cactus sont riches en minéraux avec une prédominance de potassium et de phosphore avec respectivement 163 et 152 mg/100 g. Il y a aussi une présence remarquable de grandes

quantités (données en mg/100 g), de magnésium (74,8), de sodium (67,6) et de calcium (16,2). Dans la raquette,

Les principaux minéraux sont le calcium et le potassium, avec des quantités allant de 235 à 5520 mg/100 g. Dans

La pulpe le potassium est présent à 161 mg/100 g dépassant la concentration d'autres minéraux comme le calcium et le magnésium.

Les acides aminés

Au niveau de la raquette, le principal acide aminé détecté est la glutamine, suivie par la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, la phénylalanine et l'isoleucine. En revanche, dans la graine l'acide aminé majeur est l'acide glutamique avec un pourcentage variant de 15,73% à 20,27%, suivie par l'arginine, (4,81% à 14,62%), fait intéressant est que dans le fruit, les deux acides aminés prédominants sont la proline et de la taurine, qui représentent respectivement

46% et 15,78% de la teneur totale en acides aminés. Les protéines totales dans les graines de fruits (13,62%) sont plus élevées que dans la raquette (4% -10%). Cependant plusieurs études ont rapporté que la pulpe du fruit à une teneur en protéine qui est comprise entre (0,21-1.6) g/100g. Les graines et la pulpe de fruits peuvent être considérées comme très bonne sources d'acides aminés et des protéines.

Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement distribuées dans le règne végétal. Comme leur nom l'indique, leurs structures chimiques sont caractérisées par la présence de plusieurs groupes phénoliques qui peuvent être associés à des groupements chimiques plus ou moins complexes.

Généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont généralement des sous-produits du métabolisme de la plante. L'intérêt croissant pour les polyphénols porte sur leur potentiel antioxydant, qui est impliqué dans les prestations de santé telle que la prévention contre l'inflammation, la riche en différents membres de la famille des composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques.

Dans la fleur dérégulation cardiovasculaire et les maladies neurodégénératives. Il a été également montré qu'ils ont une activité anticancéreuse. Toutes les parties de la plante de cactus sont, l'acide gallique et le 6-isorhamnétine

3-O-robinobioside sont les principaux composés, avec des teneurs respectives de 4,9 et 4,269 mg/100 g de matière sèche. D'autres molécules phénoliques sont présentes en petites quantités ne dépassant pas 10 mg/g.

Les acides gras

Les analyses chromatographiques des lipides totaux extraits de raquette de cactus montrent que l'acide palmitique (C16 :0), l'acide oléique (C18 :1), l'acide linoléique (C18 :2) et l'acide linoléique (C18 :3) contribuent respectivement à 13,87 ; 11,16 ; 34,87 et 32,83% de la teneur en acides gras totaux. Ces quatre acides gras représentent ainsi plus de 90% des acides gras totaux, les acides linoléiques et linoléiques, principaux acides gras polyinsaturés, représentant à eux seuls à 67,7%. La teneur en acide linoléique dans la raquette, 34,87%, est proche de celle de l'huile d'argan (29% à 40,41%). Plusieurs études ont indiqué que le cactus, et plus particulièrement les fruits, la pulpe, les graines et l'écorce, étaient riches en acides linoléique, oléique et palmitique. Un niveau élevé d'acides gras oméga-6 (acide linoléique) a été rapporté dans l'huile de graines de cactus (53,5% à 70,29%). En tant que précurseur de l'acide arachidonique, l'acide linoléique a longtemps été considéré comme ayant un effet hypocholestérolémiant avec des propriétés inhibitrices contre le cancer du côlon dans les cellules métastatiques. L'acide linoléique (oméga-3) est connu pour être bénéfique pour la santé, les maladies cardiovasculaires, les Affections inflammatoires, les troubles auto-immunes et le diabète.

6.5 4 : Caractérisation physico-chimique des différentes parties de la plante de cactus

(MATERIEL ET METHODE)

Raquette

Teneur en eau

Un échantillon de raquette, de poids déterminé, est placé dans une étuve à une température voisine de 52°C. Il est pesé à des intervalles de temps réguliers jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après dessiccation et refroidissement, l'échantillon est pesé à nouveau et la teneur en eau est ainsi calculée.

Teneur en cendres brutes

L'échantillon ($2 \pm 0,0003$ g) de raquette est placé dans un creuset, préalablement calciné et taré, à 550°C dans un four à moufle à chauffage électrique pendant 4 heures jusqu'à incinération totale. Après refroidissement, le résidu obtenu est pesé et la teneur en cendres est alors déterminée. Pour chaque analyse effectuée, le nombre de répétitions a été fixé à deux.

Dosage de protéines totales

Le principe est la détermination de l'azote total, il est réalisé par la méthode (Kjeldhal, 1883) qui s'effectue en trois étapes : Minéralisation de la matière organique par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur ; Distillation ; Titration de l'ammoniac libéré. Le principe consiste à hydrolyser la matière sèche par ébullition en présence d'acide sulfurique concentré. Dans ces conditions, l'azote est transformé en ammoniac fixé par l'acide sulfurique sous la forme de sulfate d'ammonium. Cette solution est titrée par de la soude et dosé, après être reçue dans une solution d'acide borique. La teneur en protéine exprimée en pourcentage est obtenue en multipliant la teneur en azote par un coefficient de 6,25.

Etape 1 : La minéralisation, on prélève 0,25 +/- 0,0003 grammes de chaque échantillon (matière sèche) de raquette dans des tubes d'hydrolyse avec 3 grammes de catalyseur à partir d'un mélange composé de : 10 grammes de cuivre et 100 grammes de sulfate de potassium. Ces produits doivent être mélangés et broyés. Ajouter 6 ml d'acide sulfurique concentré (H₂SO₄) et porter à ébullition pendant 30 minutes à 320 °C, après on augmente la température à 420 °C pendant une heure, l'extrait doit être clair. Sinon nous continuons l'hydrolyse jusqu'à ce que cette condition soit acquise. Laisser refroidir sous la hotte, jauger à 100 ml avec de l'eau distillée et mélanger au vortex. Cette étape a pour but la dégradation de la matière organique azotée et sa transformation en sel d'ammonium.

Etape 2 : La distillation, l'appareil de distillation est capable de mélanger 50 ml d'eau distillée, 40 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 10 ml d'acide borique (H₃BO₃). Son principe est de transformer l'ammonium sous sa forme volatile, l'ammoniac. La soude est ajoutée en excès afin de changer le pH acide en un pH basique, ce qui a pour effet d'obtenir de l'ammoniac (NH₃). L'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau par distillation. Les

vapeurs d'ammoniaque sont condensées au contact d'un réfrigérant et recueillies dans une solution contenant de l'acide borique. L'acide borique va retenir l'ammoniaque sous sa forme acide.

Etape 3 : La titration, on titre, avec de l'acide sulfurique 0,05N, la solution jusqu'à équivalence par le virage de l'indicateur coloré.

Dosage des sucres totaux

La détermination du sucre total est effectuée par la méthode Dubois et al. (1956) ou méthode phénol /acide sulfurique passant par trois étapes : Hydrolyse acide, filtration et lecture de l'absorbance. En présence d'acide sulfurique concentré, les produits se condensent avec le phénol pour donner des complexes de couleur jaune-orangée, l'apparition de ces complexes est suivie par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 490 nm.

Etape 1 : Hydrolyse acide de la liaison glycosidique dans la polyose. Peser, dans un bécher, 0,5 g d'échantillon sec de raquette. Ajouter 20 ml d'acide sulfurique 0.5 M. Placer dans une étuve pendant 3h à 105°C.

Etape 2 : Filtration, on transvase quantitativement le contenu du bécher dans une fiole de 500 ml. Ajuster le volume par l'eau distillée. Filtrer la solution.

Etape 3 : Lecture de l'absorbance, on dépose avec précaution, dans un tube en pyrex, 1 ml de filtrat dilué 1/10. Ajouter 1ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Maintenir les tubes 5 min à 100°C. Après 30 minutes, la lecture de l'absorbance est effectuée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la coloration reste stable pendant 3 à 4 heures. Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire. Une solution de glucose est utilisée, différentes dilutions sont préparées allant de 0 à 100 µg/ml.

Conditions d'applications : L'étape d'addition de l'acide sulfurique dans la solution phénolique aqueuse doit être réalisée avec précaution sous la hotte en raison d'un dégagement important de chaleur et de vapeur toxique lors de l'addition d'acide sulfurique.

Raquette, épine, fleur

Dosage des Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) : 100 µl d'extrait de la poudre de (raquette, fleur, épine) sont mélangées avec 500 µl du réactif FC et 400 µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant dix minutes et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Courbe d'étalonnage : Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions d'acide gallique de différentes concentrations de 0.03 jusqu'à 0.3 g/l. 100µl de la solution diluée est oxydée par le réactif de Folin-Ciocalteu (Dilué 10 fois), laissé 5 minutes et puis neutralisée avec 2 ml de carbonate de sodium 20% puis les solutions ont été agitées immédiatement et maintenues à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm.

Dosage du phosphore lipidique

L'extraction des phospholipides a été réalisée par la méthode de Folch et al., (1975). Dix g de fleur en poudre sont placés dans un bécher broyées en présence de 5 volume du mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Pour accélérer la séparation des 2 phases, nous ajoutons 0,2 v/v de solution aqueuse de chlorure de potassium 0,8%. Mettre sous agitation pendant 1 heure. Après décantation, la phase chloroformique est filtrée puis évaporée au rota vapeur. Le résidu obtenu de lipides totaux est dissout dans 3 ml de solvant d'extraction puis conservé à -28°C jusqu'à utilisation.

Minéralisation

Il s'agit de minéraliser la matière organique. Le phosphore lipidique est libéré par chauffage en présence de 0,45 ml d'acide perchlorique 70%, l'opération est effectuée sous une hotte, par chauffage dans un bain à sable pendant environ 1h jusqu'à la libération de carbone sous forme de CO₂, l'azote sous forme de NH₄⁺, l'hydrogène sous forme de H₂O et le phosphore sous forme de H₃PO₄⁻.

Dosage du phosphore

Le phosphate en présence d'un excès de molybdate d'ammonium donne un complexe phosphomolybdeux-molybdique de couleur bleue. Une gamme d'étalon allant de 0,5 à 3µg de phosphore est réalisée avec une solution de phosphore inorganique (KH₂PO₄) à 2µg/ml. Nous ajoutons successivement après refroidissement 3,5ml d'eau distillée ; 0,5ml de molybdate d'ammonium à 2.5% p/v ; 0,5ml d'acide ascorbique à 10% p/v²

7 Maladies et parasites des cactus

(Pourquoi les différentes variétés de cactus sont-elles attaquées par des parasites ?)

C'EST UNE QUESTION DE MILIEU D'ORIGINE

² Des extraits d'une thèse de doctorat

Pucerons, cochenilles, araignées, nématodes, limaces ... Plusieurs parasites peuvent s'attaquer aux cactus .Dans la région natale des cactus, les parasites eux même ont des prédateurs ce qui protège les plantes. Quand les cactus sont cultivés sous nos latitudes, les bactéries sont là. Mais pas leurs prédateurs. D'où la nécessité d'examiner régulièrement ses plantes et d'isoler rapidement celles qui paraissent suspecte. Mais quels sont les parasites des cactus les plus fréquents, et comment protéger ses cactus contre eux ?



Figure4 : images sur l'effet des parasites sur le cactus

7.1 1 .Le parasite ennemi n°1 du cactus : la cochenille

Ces petits insectes, tels des vampires, sucent la sève des cactus et se logent dans leurs parties les plus inaccessibles

A : Les différentes sortes de cochenilles

Il existe différentes types de cochenilles :

- Les cochenilles à bouclier : avec leur carapace marron, elles sautent dès qu'on tente de les approcher. Elles s'attaquent à la base de la plante avant de remonter vers les parties supérieures.
- Les cochenilles farineuses : couvertes de filament cotonneux, elles forment de petits grains blancs entre les cotes ou sur les feuilles.
- Les cochenilles des racines : elles se tiennent tapis au niveau de collet ou bien sous terre. On ne peut les détecter qu'en remportant le cactus.

LES TRAITEMENT

Le traitement consiste essentiellement à ôter les parasites avec un pinceau ou un coton imbibé d'alcool. L'opération est à répéter si nécessaire.

Si cette étape ne suffit pas, il faut utiliser un insecticide : des solutions à base d'huile sont vendues dans le commerce. Elles asphyxient les œufs des cochenilles très efficacement, mais elles sont à manier avec précaution car elles peuvent éliminer une partie de la cire qui recouvre le cactus.

B : parasite cactus : gare aux pucerons

Ils peuvent provoquer des dégâts considérables :

- Ils s'attaquent aux feuilles, aux jeunes pousses ou aux fleurs de cactus en boutons.
- Ils provoquent des sortes de boursouflures plutôt disgracieuses sur les cactus et portent des germes qui peuvent déclencher des maladies.
- Ils sont souvent amenés par les fourmis : au printemps, voir des fourmis se balader sur les cactées est le signe que les pucerons sont sur le point d'arriver.

C : Les araignées sont fait quoi sur le cactus ?

De quelles araignées s'agit-il ? Ce sont de minuscules parasites, rouges ou jaunes, qu'on a du mal à distinguer à l'œil nu. Elles ont pour caractéristiques :

- Leur attaque : elles s'intéressent aux cactus cultivés en serre ou en intérieur quand l'atmosphère est très sèche et chaude.
- Leur faiblesse : elle laisse des traces

Comment les repérer ? Par les toutes petites toiles qu'elles tissent sur le cactus ou par les minuscules taches qu'elles provoquent sur les feuilles.

D : ZOOM SUR LES NEMATODES

Ils sont encore plus difficiles à éradiquer que les insectes parce qu'on ne les repère pas facilement. Ils s'attaquent au cactus sous la terre, au niveau des racines. On comprend le problème lorsque le cactus ne pousse plus depuis un moment, alors qu'on est en pleine période de croissance. Il n'y a malheureusement plus grand-chose à faire.

Problématique :

Puisque l'insecte menace la survie de cactus,
comment les spécialistes ont-ils recouru à assurer
sa survie en raison de son importance dans
l'équilibre naturel ?

1 La multiplication de cactus in vitro

✓ C'est quoi la multiplication végétative in vitro ?

La culture in vitro est une technique de laboratoire qui permet de multiplier des plantes en grand nombre, dans un espace réduit. Elle est actuellement utilisée pour multiplier des plantes ou des variétés rares, poussant lentement, ne donnant pas ou peu de graines ou de rejets, ceci afin de répondre aux demandes commerciales.

Cette technique peut se décomposer en trois étapes : l'installation, la multiplication et le sevrage.



figure5 : images de différents types de bourgeons de cactus

✓ Quels les avantages des cultures in vitro ?

Dans un premier temps, la culture in vitro présente des avantages biologiques. Elle permet l'assainissement des végétaux, donc l'élimination des virus et des bactéries. Cette technique permet également une multiplication de masse. La conservation et l'obtention des plantes identiques ou en voies de disparition.

✓ Quelles sont les limites de la culture in vitro ?

Le problème de contamination : ce problème peut être 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.

✓ L'inconvénient de la multiplication végétative in vitro ?

Le coût du plant in vitro est plus élevé que celui d'une bouture obtenue classiquement, il demande une main-d'œuvre spécialisée qui représente environ 60% à 70 % du prix de revient car l'automatisation est limitée.

Le rôle des hormones végétales

Une hormone est un composé organique synthétisé dans un organe, transporté vers des cellules cibles dans lesquelles il déclenche une réaction précise. Chez les végétaux, on connaît actuellement 5 groupes d'hormones, qui agissent principalement sur la division cellulaire (donc la croissance de la plante) et leur différenciation (la formation de divers organes). L'effet des hormones dépend à la fois de leur concentration, de leur site d'action, du stade de développement de la plante ainsi que de leur concentration relative (une hormone pouvant inhiber le rôle d'une autre). **Vous trouverez ci-après un résumé des principales actions de ces molécules.**

Les Auxines : L'auxine extraite des végétaux est l'Acide indolacétique. D'autres composés, y compris des substances synthétiques, ont le même effet (acide 2, dichlorophénoxyacétique, acide indole-3-acétique, acide indole-3-butyrique, acide 1-naphthalèneacétique). Sa synthèse a principalement lieu dans le méristème apical des pousses (groupe de cellules non différenciées, sans fonction autre que de se diviser et participer ainsi à la croissance de la plante). Elles stimulent l'élongation de la tige, la différenciation et la croissance des racines (sur une bouture par exemple), la fructification (les graines qui se forment produisent de l'auxine et provoquent ainsi le mûrissement du fruit). La pulvérisation d'auxines sur des plants de tomates donne des fruits sans pollinisation, et les tomates obtenues sont sans graines.

Un bourgeon apical produit de l'auxine qui, en descendant dans la plante, inhibe la croissance des bourgeons latéraux. Il n'y a donc pas de ramification, c'est ce que l'on nomme la dominance apicale. Les auxines jouent aussi un rôle dans la capacité qu'a la plante de se tourner vers la lumière (phototropisme des feuilles) et de se diriger vers le sol (géotropisme des racines).

○ Trop d'auxines inhibent la croissance cellulaire.

Les cytokinines : Ces hormones (zéatine, BAP, kinétine, etc.) sont synthétisées dans les tissus en croissance active, plus particulièrement dans les racines, les embryons et les fruits. Elles sont transportées dans les autres organes par la sève brute (l'eau que la plante a absorbée du sol). En culture in vitro, leurs effets sont liés à ceux de l'auxine. On cultive un morceau de tige sans hormone, les cellules deviennent très grosses mais ne se divisent pas, si on ajoute une cytokinine, rien ne se passe, mais si on ajoute la même quantité d'auxine, les cellules se divisent, mais restent indifférenciées, on obtient une cal. S'il y a plus de cytokinines, la cal se différencie et des bourgeons apparaissent, s'il y a plus d'auxines, des racines se forment. Elles inhibent les auxines, provoquent la ramification, retardent la sénescence (on en pulvérise sur les fleurs coupées pour conserver leur fraîcheur).

Les gibbérellines : Ces molécules sont produites dans les jeunes feuilles et les racines. Elles favorisent la germination des graines, le bourgeonnement après une période de dormance, l'élongation de la tige et la croissance des feuilles, stimulent la floraison et la fructification. Leur action est souvent simultanée à celle des auxines.

L'acide abscissique : Il est produit dans les bourgeons. C'est lui qui inhibe la croissance, freine la division cellulaire, ferme les stomates en période de sécheresse et déclenche la dormance. Cet acide est soit lessivé lors de fortes pluies, soit dégradé par la lumière, mais la germination des graines dépend à la fois de la quantité d'acide abscissique, de celle des gibbérellines, et de facteurs extérieurs propres à chaque espèce (température, etc.).

L'éthylène : C'est la seule hormone végétale sous forme gazeuse. Il inhibe la croissance et est également associé à plusieurs processus de vieillissement (chute des feuilles, maturation des fruits). Il favorise la maturation des fruits, en dégradant la paroi des cellules, ce qui ramollit le fruit, bloque la synthèse de la chlorophylle, le fruit perd sa couleur verte. C'est aussi l'hormone de la floraison chez certaines plantes. Exemple : placez un plant d'ananas dans un sac plastique avec quelques pommes presque mûres (elles dégagent de l'éthylène), laissez-le ainsi quelques semaines, et vous verrez apparaître la hampe florale de votre plante.

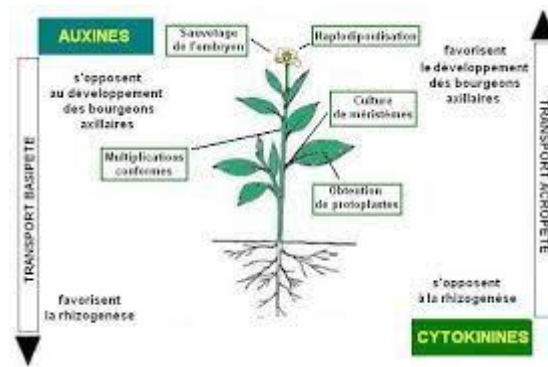


Figure7 : schéma explicative de la multiplication in vitro

1.1 Les étapes de la multiplication in vitro :

I. La stérilisation

C'est la phase qui consiste à désinfecter les boutures (mamelon avec aréole, racine, bourgeon, etc.) ou les graines afin de les rendre stériles, avant de les placer sur un milieu de culture approprié. Différentes méthodes existent, deux sont présentées ici :

Méthode 1 :

Matériel

- Eau stérile
- Papiers Filtres non stériles
- Agrafeuse
- Un bécher (ou récipient servant de poubelle)
- Une minuterie
- Solution à 0.8 % de Javel, contenant 2 gouttes de mouillant (Triton, teepol, liquide vaisselle,...)
- Solution à 3 % de Kohrsolin (Bode) liquide de désinfection du sol.
- Alcool 70%

Placer les graines dans un sachet fait à partir de papier-filtre plié et agrafé.

Mouiller le sachet dans un bain d'alcool 70 %.

Placer le sachet dans le mélange Javel 0.8 % + mouillant pendant 15 à 20 minutes et agiter de temps en temps.

Vider la Javel, rincer une fois le sachet à l'eau stérile.

Placer le sachet dans le bain de Kohrsolin 3% durant 15 à 20 minutes et agiter de temps en temps.

Vider le récipient et rincer trois fois à l'eau stérile. Chaque rinçage durant plusieurs minutes.

Placer les graines sur milieu de culture.

Méthode 2 :

Matériel :

Eau stérile, Alcool 70%, Solution à 0.2% de HgCl₂,

Mode opératoire :

Laver les boutures à l'eau courante.

Les placer dans l'alcool à 70% durant 45 secondes.

Les placer dans la solution de HgCl₂ pour 3 minutes.

Rincer cinq fois à l'eau stérile.

Rafrâchir les surfaces de coupe et placer les boutures sur leur milieu de culture, la coupe touchant le milieu.

Milieu de culture :

Il existe une multitude de milieux de culture. Ceux-ci doivent fournir à la plante tous les éléments nutritifs dont elle a besoin. On distingue deux types de milieux, ceux ayant une consistance liquide et servant aux cultures de cellules, et ceux 'solides', ayant la consistance d'un flan, servant aux cultures de tissus, bourgeons, racines ou cals.

Celle que je présente ici est celle que j'ai eu l'occasion d'utiliser avec de bons résultats. C'est un milieu Murashige-Skoog enrichi de divers éléments, dont des vitamines.

Elément	Quantité, en mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ * 2 aq.	440
MgSO ₄ * 7 aq.	370
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ * 4 aq.	16,9
ZnSO ₄ * 7 aq.	8,6
CuSO ₄ * 5 aq.	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ * 2 aq.	0,25
CoCl ₂ * 6 aq.	0,025
Na ₂ EDTA	37,2
FeSo ₄	27,8
Myoinositol	100
Thiamine-HCl	1
Acide nicotinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Saccharose	30000
Agar	6000
Ph	5,7 - 5,8

Tableau de l'élément nutritif de milieu de culture de cactus

II. La multiplication

(Marcottage), on le laisse grandir, et on peut reprendre un autre groupe de bourgeons et En horticulture, on prélève un groupe de bourgeons (une tige), on le met à raciner (bouture ainsi de suite.

Avec les cultures en laboratoire, et grâce aux hormones, il est théoriquement plantes enracinées sont placées dans un substrat composé de 50% de sable et autant de vermiculite, placées sous cloche

(Ou film plastique), et arrosées un jour sur deux durant deux semaines. Enfin, elles sont repotées dans leur pot définitif avec un substrat adéquat.



Figure9 : images des bourgeonnes de cactus dans le milieu de culture in vitro



Figure 10 : image de cactus après la plantation dans la serre



Figure 11 : image de cactus après la transplantation dans la serre



Figure 12 : image de cactus prêt à cultivé en plein air

2 Conclusion

La culture in vitro a pour avantage d'obtenir un plant identique au plan d'origine, choisi pour des qualités spécifiques :

Ainsi on peut obtenir des plantes en très bonne santé avec un enracinement régulier, de nombreuses ramifications, et elles sont résistantes au stress, aux maladies ... permettant ainsi de sauvegarder des espèces en voie de disparition. Cette technique permet de multiplier des plantes stériles et d'un niveau de productivité élevé et régulière.

Le taux de multiplication in vitro de 100 à 1000 fois plus élevées par rapport aux méthodes traditionnelles.

Les compétences acquises de stage :

- Améliorer mes connaissances en culture in vitro.
- Comment préparer de substrat.
- Développer mes connaissances en serre.