



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Département : Foresterie et protection de la nature

قسم : علم الغابات و حماية الطبيعة

Spécialité : Foresterie

تخصص: علوم الغابات

Mémoire De Fin D'études

Pour L'obtention du Diplôme de Master

***THEME***

**Induction de chevelus racinaires *In vitro* et en hydroponie de *Datura stramonium L.* et *Atropa belladonna L.***

Présenté Par : M<sup>lle</sup> **BEDERINA Amel Feyala**

Soutenu Publiquement le 28/11/2019

Devant le jury composé de :

Mémoire dirigé par :

**M. MORSLI Abdelkader**

M.C.A ENSA-Alger

**M<sup>me</sup>. BENYAMMI Roukia**

M.C.B ENS-Kouba

Président :

**M. BOUCHARREB Brahim**

M.A.A ENSA-Alger

Examinatrices :

**M<sup>me</sup>. NACERBEY Nazli**

M.C.B ENSA-Alger

**M<sup>me</sup>. BAKIRI Nouara**

M.A.A Université-M'sila

Promotion 2016/2019

## TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS .....	II
ABSTRACT .....	III
ملخص.....	III
RESUME.....	III
TABLE DES MATIERES .....	IV
LISTE DES TABLEAUX .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IX
LISTE DES ANNEXES .....	X
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
1. GENERALITES .....	5
1.1. <i>DATURA STRAMONIUM L.</i> .....	6
1.1.1. <i>Nomenclature</i> .....	7
1.1.2. <i>Systématique</i> .....	7
1.1.3. <i>Biotope et distribution géographique</i> .....	7
1.1.4. <i>Description botanique</i> .....	8
1.1.5. <i>Utilisation de Datura stramonium</i> .....	9
1.2. <i>ATROPA BELLADONNA L.</i> .....	10
1.2.1. <i>Nomenclature</i> .....	10
1.2.2. <i>Systématique</i> .....	11
1.2.3. <i>Biotope et distribution géographique</i> .....	11
1.2.4. <i>Description botanique</i> .....	11
1.2.5. <i>Utilisation de l'Atropa belladonna</i> .....	12
1.3. INTOXICATION PAR LE DATURA ET LA BELLADONE .....	13
2. LES METABOLITES SECONDAIRES .....	13
2.1. LES ALCALOÏDES.....	14
2.2. ACTIVITE ET BIOSYNTHESE DES ALCALOÏDES TROPANIQUES .....	15
2.3. TOXICITE DES ALCALOÏDES TROPANIQUES .....	18
2.4. USAGES THERAPEUTIQUES DES ALCALOÏDES TROPANIQUES.....	18
2.5. EXTRACTION ET DOSAGE DES ALCALOÏDES.....	19
2.6. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG).....	20
• <i>Principe</i> .....	20
• <i>Appareillage de la CPG</i> .....	20
3. <i>AGROBACTERIUM</i> .....	21
3.1. PROCESSUS D'INFECTION PAR L' <i>AGROBACTERIUM</i> .....	22
3.2. LA MALADIE DE CHEVELUS RACINAIRES .....	24
4. LA CULTURE HORS-SOL .....	24

5. ELICITATION.....	25
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>27</b>
MATERIEL VEGETAL.....	28
<b>PARTIE 01 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES <i>IN VITRO</i> DE <i>DATURA</i> ET DE BELLADONE .....</b>	<b>29</b>
1. MISE EN GERMINATION DES GRAINES.....	29
1.1. DESINFECTION DES GRAINES.....	29
1.2. MISE EN CULTURE .....	30
a) <i>Datura stramonium</i> .....	30
Induction des pousses .....	30
b) <i>Atropa belladonna</i> .....	31
1.3. OBTENTION DE CHEVELUS RACINAIRES (CR) .....	34
1.3.1. <i>Le matériel bactérien</i> .....	34
1.3.2. <i>Préparation des suspensions bactériennes</i> .....	34
1.3.2.1. <i>Activation de la bactérie</i> .....	34
1.3.2.2. <i>Mise en suspension des souches bactériennes</i> .....	34
1.3.3. <i>Inoculation et Co-culture plante-bactérie</i> .....	34
• <i>Datura stramonium</i> .....	34
1.3.4. <i>Isolement des racines transformées et multiplication des chevelus racinaires</i> .....	35
1.3.5. <i>Confirmation de la transformation</i> .....	36
1.3.6. <i>Sélection des lignées racinaires</i> .....	36
<b>PARTIE 02 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES EN HYDROPONIE DE <i>DATURA</i> ET DE BELLADONE .....</b>	<b>37</b>
1. <i>DATURA STRAMONIUM</i> .....	37
1.1. CULTURE AEROPONIQUE DE <i>DATURA STRAMONIUM</i> .....	37
1.2. DESCRIPTION .....	37
1.3. L'ELICITATION.....	38
1.4. QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE .....	38
1.5. LE SECHAGE .....	38
1.6. EXTRACTION DES ALCALOÏDES ET QUANTIFICATION DE ALCALOÏDES.....	38
1.6.1. <i>Extraction des alcaloïdes</i> .....	38
1.6.2. <i>Quantification et identification des alcaloïdes</i> : .....	39
2. <i>ATROPA BELLADONNA</i> .....	40
2.1. MISE EN GERMINATION DES GRAINES DE L' <i>ATROPA BELLADONNA</i> .....	40
2.2. CULTURE HYDROPONIQUE DE L' <i>ATROPA BELLADONNA</i> .....	41
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS .....</b>	<b>42</b>
<b>PARTIE 01 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES EN <i>IN VITRO</i> DE <i>DATURA</i> ET DE BELLADONE .....</b>	<b>43</b>
1. <i>DATURA STRAMONIUM</i> .....	43
1.1. DESINFECTION DES GRAINES.....	43
1.3. TAUX D'INDUCTION DES BOURGEONS AXILLAIRES.....	44
1.4. OBTENTION DE CHEVELUS RACINAIRES .....	44
1.4.1. <i>Par dépôt</i> .....	44
a) Taux d'induction racinaire .....	45

b) Nombre moyen des CR/explant.....	45
1.4.2. <i>Par immersion</i> .....	46
a) Taux d'induction racinaire .....	46
b) Nombre moyen des CR/explant.....	46
<b>2. ATROPA BELLADONNA.....</b>	<b>47</b>
2.1. METHODES DE GERMINATION DES GRAINES .....	47
2.2. OBTENTION DES CHEVELUS RACINAIRES .....	48
a) <i>Taux de réactivité</i> .....	49
b) <i>Taux d'induction racinaire</i> .....	49
c) <i>Le nombre moyen des CR/explant</i> .....	49
<b>PARTIE 02 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES EN HYDROPONIE DE DATURA ET DE BELLADONE .....</b>	<b>51</b>
<b>1. DATURA STRAMONIUM .....</b>	<b>51</b>
1.1. TAUX DE GERMINATION .....	51
1.2. VITESSE DE LA CROISSANCE.....	51
• <i>Plantes cultivées dans de l'eau</i> .....	51
• <i>Plantes cultivées dans la solution nutritive</i> .....	52
1.3. LA BIOMASSE DES RACINES .....	52
1.4. EFFETS DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU CaCl <sub>2</sub> ET DU TEMPS DE CONTACT SUR LA BIOMASSE ET SUR LA TENEUR EN ALCALOÏDES .....	53
• <i>Sur la biomasse</i> .....	53
• <i>Sur la teneur en alcaloïdes</i> .....	54
• <i>Effet de différentes concentrations de CaCl<sub>2</sub> pendant 24h sur la teneur en alcaloïdes</i> .....	56
2.1. TAUX DE GERMINATION.....	57
2.2. L'EFFICACITE DU SYSTEME HYDROPONIQUE EN BACS .....	57
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION .....</b>	<b>58</b>
<b>PARTIE 01 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES EN <i>IN VITRO</i> DE DATURA ET DE BELLADONE .....</b>	<b>59</b>
1. GERMINATION DES GRAINES .....	59
2. OBTENTION DES CHEVELUS RACINAIRES.....	59
3. SELECTION DES LIGNEES RACINAIRES PERFORMANTES .....	60
<b>PARTIE 02 ETABLISSEMENT DES CHEVELUS RACINAIRES EN HYDROPONIE DE DATURA ET DE BELLADONE .....</b>	<b>61</b>
1. VITESSE DE CROISSANCE ET LA BIOMASSE DE DS EN SYSTEME AEROPONIQUE.....	61
2. EFFET DE L'ELICITATION PAR LE CaCl <sub>2</sub> SUR LA BIOMASSE ET LA TENEUR EN ALCALOÏDES .....	61
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>65</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>75</b>

## ABSTRACT :

*Datura stramonium* and *Atropa belladonna* are species of the solanaceous family with tropanic alkaloids that have extremely important pharmaceutical properties but the complexity and low productive capacities associated with open field cultivation are obstacles. To overcome these problems, hairy root culture *in vitro* and in hydroponics can be used, the latter offers promising prospects for the production of tropanic alkaloids in industrial quantities, our work focused on two parts, the first part is the *in vitro* germination of *Atropa belladonna* and *Datura stramonium*, the induction of hairy root by two bacterial strains of *Agrobacterium rhizogenes* (strain A4 and strain 15834) and the selection of high-performance root lines. The second part concerns the production of alkaloids under hydroponic system combined with saline stress using  $\text{CaCl}_2$  as an elicitor. The results obtained show that *Datura stramonium* has a very high germination rate compared to *Atropa belladonna* as also a better response to the induction of transgenic roots. In effect, the A4 strain is more virulent since it gave the highest root induction rate (43.88%) compared to strain 15834 (15.78%). On all the root lines obtained, the selected lines L1 ; L2; L3 and L4 resulting from the genetic transformation of *Datura stramonium*. In addition, the hydroponic system has shown a significant improvement in the growth, biomass and alkaloid content of *Datura stramonium*, the best alkaloid values in *Datura stramonium* : atropine (35.28% for the plant stressed with 1g/l  $\text{CaCl}_2$  during 24h), scopolamine (68.79% for the plant stressed with 1g/l  $\text{CaCl}_2$  during 12h).

**Key words :** *Datura stramonium*, *Atropa belladonna* , *Agrobacterium rhizogenes*, alcaloides, hairy roots, hydroponic, *in vitro* culture.

## ملخص :

ولكن التعقيد والقدرات الإنتاجية المنخفضة المتعلقة بالزراعة في الحقول المفتوحة تشكل عقبات، للتغلب على هذه المشاكل ، يمكن استخدام زراعة الجذور المشعرة في المختبر و الزراعة المائية هذه الأخيرة توفر احتمالات واعدة لإنتاج القلويدات التروبانية بكميات صناعية. ركز عملنا على جانبين، الأول هو الإنبات في المختبر *Datura stramonium* و *Atropa belladonna* ، تحريض الجذور المشعرة بواسطة سلالتين بكتيريتين من *Agrobacterium rhizogenes* (سلالة A4 وسلالة 15834)، اختيار سلالات الجذور المشعرة الأفضل. الجزء الثاني يتعلق بإنتاج القلويدات في نظام الزراعة المائية مدمج بالتوتر الملحي مستعملين  $\text{CaCl}_2$  كمحرض. النتائج التي تم الحصول عليها تبين ان *Datura stramonium* لديه معدل إنبات مرتفع للغاية مقارنة بـ *Atropa belladonna* واستجابة أفضل لتحريض الجذور المحورة جينيا. في الواقع سلالة A4 أكثر ضراوة لأنها أعطت معدل حث جنور أكثر أهمية (43.88%) مقارنة بالسلالة 15834 (15.78%). من ضمن سلالات الجذور المشعرة المحصل عليها، السلالات المختارة هي L1 , L2 , L3 و L4 الناتجة من التحول الجيني لـ *Datura stramonium*. ومن جهة أخرى، أظهر نظام الزراعة المائية تحسنا كبيرا في نمو وكتلة ومحتوى القلويدات في *Datura stramonium*، أفضل نسب القلويدات عند *Datura stramonium*: الأتروبين (35.28% بالنسبة للنباتة المحرصة ب 1 غ/ل من  $\text{CaCl}_2$  لمدة 24 ساعة)، السكوبولامين (68.79% بالنسبة للنباتة المحرصة ب 1 غ/ل من  $\text{CaCl}_2$  لمدة 12 ساعة).

**الكلمات المفتاحية:** *Datura stramonium*, *Atropa belladonna*, *Agrobacterium rhizogenes*, القلويدات, الجذور المشعرة , الزراعة المائية, الزراعة في المختبر.

## RESUME :

*Datura stramonium* et *Atropa belladonna* sont des espèces de la famille des solanacées à alcaloïdes tropaniques qui ont des propriétés pharmaceutiques extrêmement importantes mais la complexité et les faibles capacités productives liées à la culture en plein champs font des obstacles. Pour surmonter ces problèmes, la culture des chevelus racinaires *in vitro* et en hydroponie peuvent être utilisées, cette dernière offre des perspectives prometteuses pour la production d'alcaloïdes tropaniques en quantité industrielle, notre travail a porté sur deux volets, le premier est la germination *in vitro* de l'*Atropa belladonna* et *Datura stramonium*, l'induction des chevelus racinaire par deux souches bactériennes d'*Agrobacterium rhizogenes* (la souche A4 et la souche 15834) et la sélection des lignes racinaires performantes. Le deuxième volet concerne la production d'alcaloïdes sous système hydroponique combiné avec un stress salin en utilisant le  $\text{CaCl}_2$  comme éliciteur. Les résultats obtenus montrent que *Datura stramonium* L. présente un taux de germination très élevé par rapport à *Atropa belladonna* ainsi qu'une meilleure réponse vis-à-vis de l'induction des racines transgéniques. En effet la souche A4 est plus virulente puisqu'elle a donné le taux d'induction racinaire le plus important (43.88%) par rapport à la souche 15834 (15.78%). Sur l'ensemble des lignées racinaires obtenues, les lignées retenues L1 ; L2 ; L3 et L4 issues de la transformation génétique de *Datura stramonium*. Par ailleurs, le système hydroponique a montré une amélioration significative de la croissance, la biomasse et la teneur en alcaloïdes de *Datura stramonium*, les meilleurs teneurs en alcaloïdes chez *Datura stramonium* : l'atropine (35.28% pour la plante stressée avec 1g/l  $\text{CaCl}_2$  pendant 24h), la scopolamine (68.79% pour la plante stressée avec 1g/l  $\text{CaCl}_2$  pendant 12h).

**Mots clés :** *Datura stramonium* , *Atropa belladonna*, *Agrobacterium rhizogenes*, alcaloides, chevelus racinaires, hydroponie, culture *in vitro*.