

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر-

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH -ALGER-

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Productions végétales

Spécialité : Ressources génétiques et Amélioration des productions végétales

THÈME

**Élicitation des chevelus racinaires du Harmel
(*Peganum harmala* L.) en vue d'optimiser le
rendement en alcaloïdes**

Présenté par : M^{lle}. AHMEDI Zahia

Soutenu le 30 /06 / 2016

Membres de Jury :

President	M^{me}. KHELIFI M.	Pr. à l'ENSA
Promoteur	Mr. KHELIFI L.	Pr. à ENSA
Co-promotrice	M^{elle}. BAKIRI N.	M.A.A. à l'Université de M'sila
Examineurs	Mr. MEFTI M.	M.C.A à ENSA
	Mr. MORSLI A.	M.C.A à ENSA

Promotion 2011-2016

SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	1
 <i>Synthèse bibliographique</i>	
I <i>Peganum harmala</i> L.	3
I.1 Taxonomie	3
I.2 Origine et répartition.....	4
I.3 Description botanique	5
I.4 Aspect génétique.....	6
I.5 Intérêts et utilisations	7
I.6 Toxicité	8
 II Métabolites secondaires	10
II.1 Les métabolites secondaires et leur rôle chez les végétaux.....	10
II.2 Les métabolites secondaires du Harmel (<i>Peganum harmala</i> L.)	10
II.3 Le contenu alcaloïdique du Harmel.	11
II.4 Biosynthèse des alcaloïdes.....	12
II.5 Propriétés biologiques des alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i>	13
II.6 Extraction et dosage des alcaloïdes.....	16
 III <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et transformation génétique (induction des chevelus racinaires)	17
III.1 Maladie du chevelu racinaire et transgénése	17
III.2 Description de la maladie et du plasmide Ri.....	17
III.3 Mécanismes de la transformation par l' <i>Agrobacterium</i>	19
III.4 Confirmation de la transformation	21
III.5 Utilisation de l' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> dans le génie génétique	22
 IV Optimisation de la production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires	23
IV.1 Intérêt de la culture des chevelus racinaires	23
IV.2 Optimisation des conditions de croissance et du milieu.....	23

IV.3 Elicitation.....	24
IV.4 Utilisation de précurseurs.....	28
IV.5 Immobilisation des cellules.....	28
IV.6 Péremiabilisation des cellules.....	29

Matériels et méthodes

I. Rappel de l'objectif du travail.....	30
II. Matériel végétal.....	30
II.1. Origine des graines.....	30
II.2. Scarification et désinfection des graines.....	30
II.3. Mise en germination des graines et obtention des vitro-plants.....	30
III. Obtention des chevelus racinaires.....	31
III.1. Origine et description de l'agrobactérie.....	31
III.2. Activation et préparation de la suspension bactérienne.....	31
III.3. Co-culture plante-bactérie.....	31
III.4. Isolement des lignées racinaires induites et leur multiplication.....	32
III.5. Sélection des lignées racinaires performantes.....	32
IV. Elicitation biotique en vue d'optimiser la production alcaloïdique.....	33
V. Extraction et dosage des alcaloïdes indoliques.....	36
VI. Analyse statistique.....	37

Résultats et interprétation

I. Taux de germination des graines de l'Harmel (<i>Peganum harmala</i> L.).....	38
II. Obtention des chevelus racinaires.....	38
II.1. Taux de réactivité racinaire.....	38
II.2. Taux d'induction racinaire.....	39

II.3. Temps moyen d'apparition de la première racine	39
II.4. Nombre moyen de racines par explant.....	39
II.5. Sélection des lignées racinaires performantes.....	39
III. Effet des PGPR et des PGPF sur la biomasse racinaire et la teneur en alcaloïdes indoliques.....	41
III.1. Effet des PGPR sur la biomasse des chevelus racinaires.....	41
III.2 Effet de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur la biomasse des chevelus racinaires.....	46
III.3. Effet des PGPR et des PGPF sur la teneur en harmine	50
<i>Discussion</i>	
I. Germination des graines	55
II. Obtention des chevelus racinaires	55
III. Sélection des lignées racinaires performantes	56
IV. Effet des éliciteurs biotiques sur la production de la biomasse racinaire et le contenu alcaloïdique de <i>Peganum harmala</i> L.....	57
V.1.Effet des PGPR	57
V.2.Effet des PGPF	59
<i>Conclusion générale</i>.....	61
<i>Références bibliographiques</i>.....	63
<i>Annexes</i>	

Résumé

La production commerciale et durable de métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes, est une question essentielle pour l'industrie pharmaceutique. À cet effet, l'élicitation des chevelus racinaires obtenus après transformation génétique des explants de *Peganum harmala* L. par *Agrobacterium rhizogenes* offre des perspectives prometteuses pour l'amélioration de la production alcaloïdique.

L'évaluation de l'influence des différents éliciteurs biotiques, parmi lesquels : les souches de *Pseudomonas fluorescens* (P64, P66 et C7R12) et *Trichoderma longibrachiatum* à différentes concentrations et plusieurs temps d'élicitation, sur les deux lignées racinaires sélectionnées (L₂ et L₆) de *P. harmala* L., permet la détermination des gains de biomasse et l'augmentation de la teneur en Harmine. L'analyse par la CPG des extraits de chevelus racinaires élicités des deux lignées, révèle une amélioration de la teneur en Harmine suivant positivement une augmentation de la biomasse fraîche et sèche pour l'ensemble des traitements, notant un maximum de production (+15,68% pour 0,4966 g de MS par rapport au témoin) avec la lignée L₆ élicitée par la suspension fongique à une concentration de 10³ spores/ml pendant 48h.

Cette étude a montré que l'application des éliciteurs biotiques permet d'atteindre un niveau d'amélioration élevé en alcaloïdes notamment l'Harmine au niveau des chevelus racinaires de *P. harmala*.

Mots clés : *Peganum harmala* L., chevelu racinaire, *Agrobacterium rhizogenes*, éliciteurs biotiques, biomasse, Harmine.

Abstract

Commercial and sustainable production of secondary metabolites, like alkaloids, is a key issue for the pharmaceutical industry. Therefore, the elicitation of hairy root obtained after genetic transformation of explants of *Peganum harmala* L. With *Agrobacterium rhizogenes* offers promising prospects for improving the alkaloid production.

The evaluation of the influence of different biotic elicitors, including: *Pseudomonas fluorescens* strains (P64, P66 and C7R12) and *Trichoderma longibrachiatum* using different concentrations and elicitation time on both root selected lines (L₂ and L₆) of *P. harmala* L., allows the determination of the weight gains and the increasing content Harmine. The analysis by GC extracts of hairy root for the two elicited lines, reveals an improvement in the content Harmine combined with an increase of fresh and dry biomass for the entire treatment, noting the maximum production (15.68 % to 0.4966 g DW relative to the control) with the L₆ line elicited by the fungal suspension at a concentration of 10³ spores /ml for 48h.

This study shows that the application of biotic elicitors achieves a high-level improvement in alkaloids including harmine at the hairy root of *P. harmala* L.

Keywords: *Peganum harmala* L., hairy root, *Agrobacterium rhizogenes*, biotic elicitors, biomass, Harmine.

ملخص

الإنتاج التجاري والمستدام للمركبات الثانوية، منها القلويدات، هو قضية أساسية في مجال تصنيع الأدوية. ولهذا الغرض يتم زرع جذور المشعرة المتحصل عليها من نبات الحرمل (*Peganum harmala* L.) المحورة جينيا باستعمال (*Agrobacterium rhizogenes*) لمحاولة تحسين إنتاج القلويدات الاندوليكية.

تقييم اثار المستنبطات الحيوية مثل سلالات (P64, P66, C7R12) للنوع *Pseudomonas fluorescens* و *Trichoderma longibrachiatum* باستعمال تراكيز و ازمدة مختلفة تسمح بتحديد تحسن الكتلة الحيوية و كمية الهرمين. لقد سمح تحليل عينات الجذور المشعرة بطريقة CPG للفصيلتين (L₂, L₆) بإظهار تحسن في كمية الهرمين التي تتناسب و ارتفاع الكتلة الحيوية و ذلك لكافة العمليات مع تسجيل اقصى انتاج (15.68% ل 0.4966 من الكتلة الحيوية مقارنة بالشاهد) مع الفصيلة L₆ المنشطة بواسطة المعلق الفطري بتركيز 10³ بوغ/مل لمدة يومين .

لقد اظهرت هذه الدراسة ان استعمال المستنبطات الحيوية تسمح بانتاج مستوى اعلي من القلويدات في جذور الحرمل المشعرة. **الكلمات المفتاحية:** الحرمل، الجذور المشعرة، *Agrobacterium rhizogenes*, مستنبطات حيوية، الكتلة الحيوية، الهرمين.