

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة، الحراش، الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger



Ecole Doctorale de Biotechnologies Végétales

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** en
Biotechnologies végétales

Option : Biotechnologie végétale

Thème

**Production par voie biotechnologique de métabolites
secondaires d'intérêt à partir de *Calotropis procera* :
application en protection des végétaux.**

Présentée par : Mme. Amina DJERDJOURI

Jury :

Président :	M. Morsli A.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Directeur de Thèse :	M. Khelifi L.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Examineurs :	Mme. Bouregghda H.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
	M. Amdoun R.	D.R. - I.N.R.F. Bouchaoui, Alger
	M. Boukhatem M.N.	Prof.- Université Blida1, Blida
	M. Harfi B.	D.R. - C.R.B.T, Constantine

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Glossaire	
INTRODUCTION GENERALE	1
1. <i>Calotropis procera</i>	4
1.1. Description et historique de la plante	4
1.1.1. Description botanique	6
1.1.2. Historique de la plante	7
1.2. Classification taxonomique	7
1.3. Métabolites secondaires	8
1.3.1. Stéroïdes	9
1.3.2. Glycosides cardiaques	13
1.4. Importance médicinale de <i>C. procera</i>	18
2. Culture de tissus végétaux	18
2.1. Culture de chevelus racinaires	20
2.2. Transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	21
2.2.1. Maladie de chevelu racinaire ou hairy root	21
2.2.2. Principales étapes du processus de transformation génétique des plantes par <i>A. rhizogenes</i>	25
2.3. Stratégies d'amélioration des rendements en métabolites secondaires	27
2.3.2. Utilisation des éliciteurs	28
2.3.2.1. Utilisation des éliciteurs abiotiques	30
2.3.2.2. Utilisation des éliciteurs biotiques	30
3. Profilage phytochimique de <i>Calotropis procera</i>	31
3.1. Analyse phytochimique qualitative	31
3.2. Analyse phytochimique quantitative	31
3.3. Techniques chromatographiques	32
3.3.1. GC-MS	32
3.3.1.1. Principe et description	32
3.3.1.2. Appareillage	34
3.3.2. UHPLC-QTOF/MS	37
3.3.2.1. Principe et description de l'UHPLC	37
3.3.2.2. Détection par l'UHPLC-QTOF/MS	37
4. Potentialité nématocide de <i>C. procera</i> contre les nématodes phytoparasites	39
4.1. Généralités sur les nématodes phytoparasites	39
4.2. Systématique et morphologie des nématodes à galles	39
4.3. Biologie et cycle de développement des nématodes à galles	42
4.4. Lutte contre les nématodes à galles	42
4.5. Nématocide d'origine végétale	43
4.6. Activité nématocide de <i>C. procera</i>	44

MATERIELS ET METHODES	46
1. Matériel végétal et conditions de croissance	46
1.1. Matériel végétal	46
1.1.1. Désinfection des graines	47
1.1.2. Test de germination	47
1.2. Source de racines et de feuilles naturelles (Essai <i>in vivo</i>)	47
1.3. Source d'explants pour l'induction de CRs (Essai <i>in vitro</i>)	47
2. Souches bactériennes utilisées et milieu de culture	48
2.1. Origine des souches bactériennes	48
2.1.1. Souche A4 de <i>A. rhizogenes</i>	48
2.1.2. Souche ATCC 15834 de <i>A. rhizogenes</i>	48
2.2. Culture et maintenance des souches bactériennes	49
2.3. Préparation de l'inoculum bactérien	49
3. Initiation des CRs	49
3.1. Co-culture des bactéries - tissus végétal blessé	49
3.1.1. Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs	49
3.1.2. Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs	50
3.1.3. Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs	50
3.2. Détermination du pourcentage d'induction de CRs	51
3.3. Détermination du nombre moyen de racines par explant	51
3.4. Subculture des CRs en culture	51
4. Vérification moléculaire de la nature transgénique des CRs induits	52
5. Analyse phytochimique de <i>C. procera</i> par GC-MS	53
5.1. Profilage chimique (screening)	53
5.1.1. Préparation des extraits	53
5.1.2. Conditions de la GC-MS	54
5.2. Quantification des phytostérols majeurs	54
5.2.1. Préparation des extraits	55
5.2.2. Conditions de la GC-MS	55
6. Profilage chimique des glycosides cardiaques chez <i>Calotropis procera</i> par UHPLC-QTOF/MS	56
6.1. Préparation des extraits	56
6.2. Analyse par UHPLC-QTOF/MS	58
6.2.1. Conditions chromatographiques	58
6.2.2. Spectrométrie de masse	58
7. Sélection des lignées racinaires performante pour la production des métabolites secondaires cibles	58
8. Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée et sa production en phytostérols	59
9. Etude de l'activité nématocide de <i>Calotropis procera</i>	59
9.1. Matériel végétal	59
9.2. Préparation de l'extrait aqueux	60
9.3. Préparation de la gamme de concentration	60

9.4	Extraction et préparation des larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	60
9.5	Test in vitro de l'efficacité nématocide de <i>C. procera</i> sur les larves L2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	61
9.6.	Test de revitalisation des larves L2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	61
10.	Analyse statistique	61
RESULTATS ET INTERPRÉTATIONS		62
1.1.	Obtention du matériel végétal	62
1.2.	Obtention de racines et de feuilles naturelles (Essai <i>in vivo</i>)	62
1.3.	Obtention des vitrosemis pour l'induction de CRs (Essai <i>in vitro</i>)	62
2.	Initiation des CRs	63
2.1.	Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	63
2.2.	Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	64
2.3.	Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	65
2.4.	Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le nombre moyen de CRs par explant chez <i>C. procera</i>	68
3.	Subculture et multiplications des CRs transgéniques	69
4.	Confirmation par PCR de la nature transgénique des CRs	71
5.	Profilage chimique (screening) des CRs de <i>C. procera</i> par GC-MS	71
6.	Profilage chimique des glycosides cardiaques chez <i>C. procera</i> par UHPLC-QTOF/MS	80
7	Sélection des lignées racinaires	92
7.1.	Indice de croissance des lignées de <i>C. procera</i>	92
7.2.	Teneur en phytostérols (campesterol, stigmastérol et β -sitostérol) des lignées de <i>C. procera</i>	93
8.	Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée HR4	99
8.1.	Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée	99
8.2.	Cinétique de production de phytostérols (campesterol, stigmastérol et β -sitostérol) de la lignée sélectionnée	100
9.	Effet nématocide de l'extrait aqueux de <i>C. procera</i>	101
a.	Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux à partir de <i>C. procera</i> sur les larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	101
b.	Etude de la réversibilité de l'effet des extraits aqueux de <i>C. procera</i> appliqués sur les larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	106
DISCUSSION DES RESULTATS		107
1.	Obtention du matériel végétal	107
2.	Initiation des CRs	107
3.	Profilage chimique	110
3.1.	Profilage chimique par GC-MS	110
3.2.	Profilage chimique des glycosides cardiaques par UHPLC-QTOF/MS	111
4.	Croissance des CRs et production de phytostérols	114

5.	Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée	116
6.	Effet nématocide de l'extrait aqueux de <i>C. procera</i>	118
	CONCLUSION GENERALE	121
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124
	ANNEXES	
	PUBLICATIONS	
	RESUME	

Résumé

Calotropis procera (*Apocynaceae*) est une plante médicinale riche en molécules bioactives ayant une importance économique de par leur utilisation en pharmacologie qu'en agriculture. De par leur intérêt, la production par voie biotechnologique (via les chevelus racinaires (CRs)) de ces métabolites constitue une voie prometteuse.

La première partie de la thèse consiste à développer un protocole d'induction de CRs efficace pour *C. procera*. La deuxième partie aborde l'analyse de la composition phytochimique des CRs de *C. procera* par GC-MS et UHPLC-QTOF/MS. Dans la perspective de valorisation dans la protection des cultures, l'évaluation du potentiel nématocide des extraits de CRs de *C. procera* a été réalisée.

Concernant l'induction des CRs, nos résultats montrent que la souche bactérienne, le type et l'âge des explants ainsi que le milieu de co-culture utilisé jouent un rôle prépondérant. Ainsi, la fréquence de transformation optimale (95%) est obtenue avec des feuilles âgées de 30 jours et inoculées par la souche A4 sur le milieu ½ B5. La nature transgénique de nos CRs a été confirmée par amplification PCR du gène *rol B*. Les différences du taux de croissance et de teneurs en phytostérols (campesterol, en stigmasterol et en β -sitostérol) entre les sept lignées racinaires sélectionnées est extrêmement significatives. La lignée HR4 a donné le rendement le plus élevé, atteignant 345,8 μ g de campesterol/g M.S., 411,8 μ g de stigmasterol/g M.S. et 438,3 μ g de β -sitostérol par g de M.S.

Par ailleurs, l'analyse des extraits des CRs par GC-MS a permis de mettre en évidence trente-six composés bioactifs de différentes classes métaboliques dont les plus importants sont les stérols. En outre, la caractérisation des glycosides cardiaques de l'extrait éthanolique des CRs de *C. procera* par UHPLC-QTOF/MS met en évidence la présence de dix molécules bioactives.

Enfin, l'évaluation de la toxicité de l'extrait aqueux des CRs de *C. procera* sur les nématodes (*Meloigogyne* spp.) montre une mortalité totale (100 %), et ce, pour les extraits des sept lignées racinaires.

Mots clés : Activité nématocide, *Agrobacterium rhizogenes*, *Calotropis procera*, Chevelus racinaires, GC-MS, Glycosides cardiaques, Métabolites secondaires, PCR, Phytostérols, UHPLC/QTOF-MS.

Summary

Calotropis procera (Apocynaceae) is a medicinal plant rich in bioactive molecules having an economic importance due to their use in pharmacology and in agriculture. Because of their interest, the biotechnological production (via hairy root) of these metabolites constitutes a promising way.

The first part of the thesis consists in developing an efficient hairy root induction protocol for *C. procera*. The second part deals with the analysis of the phytochemical composition of *C. procera* hairy root by GC-MS and UHPLC-QTOF/MS. In, the perspective of valorization in crop protection, the evaluation of the nematicidal potential of extracts of *C. procera* hairy root was carried out.

Regarding the induction of hairy root, our results show that the bacterial strain, the type and age of the explants as well as the co-culture medium used play a major role. Thus, the optimum transformation frequency (95%) is obtained with 30-day-old leaves inoculated with the A4 strain on the ½ B5 medium. The transgenic nature of our hairy root was confirmed by PCR amplification of the *rol* B gene. The differences in growth rate and phytosterol content (campesterol, stigmasterol and β -sitosterol) between the seven selected root lines is extremely significant. The HR4 line gave the highest yield, reaching 345.8 μ g campesterol/g DM, 411.8 μ g stigmasterol/g DM and 438.3 μ g β -sitosterol per g DM.

In addition, the analysis of the extracts of hairy root by GC-MS made it possible to highlight thirty-six bioactive compounds of different metabolic classes, the most important of which are sterols. In addition, the characterization of cardiac glycosides of the ethanolic extract of *C. procera* hairy root by UHPLC-QTOF/MS highlights the presence of ten bioactive molecules.

Finally, the evaluation of the toxicity of the aqueous extract of *C. procera* hairy root on nematodes (*Meloigogyne* spp.) shows a total mortality (100%), and this, for the extracts of the seven root lines.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, *Calotropis procera*, Cardiac glycosides, Hairy root, GC-MS, Nematicidal activity, PCR, Phytosterols, Secondary metabolites, UHPLC/QTOF-MS.

ملخص

نبتة العشار (*Calotropis procera*, *Apocynaceae*) هي نبتة طبية غنية بالجزينات النشطة بيولوجيًا التي لها أهمية اقتصادية نظرا لاستخدامها في علم الأدوية والزراعة. من جهة أخرى فإن هذه الجزينات تتطلب إنتاجها مخبريا عن طريق الجذور الشعرية المحورة وراثيا وهو ما يشكل طريقًا واعدًا.

يتمثل الجزء الأول من الأطروحة في تطوير بروتوكول فعال لإنتاج الجذور الشعرية لـ *C. procera*. أما الجزء الثاني فيتناول تحليل التركيب الكيميائي النباتي للجذور الشعرية لـ *C. procera* بواسطة GC-MS و UHPLC-QTOF / MS. أما فيما يخص التثمين في حماية المحاصيل، تم إجراء تقييم مستخلصات الجذور الشعرية لـ *C. procera* في مكافحة آفة النيماتودا.

فيما يتعلق بإنشاء الجذور الشعرية، تظهر نتائجنا أن السلالة البكتيرية ونوع وعمر الجزء النباتي المستخدم بالإضافة إلى وسط الزراعة المشتركة تلعب دورًا رئيسيًا.

وبالتالي، يتم الحصول على نسبة انشاء جذور شعرية مثلى (95%) بأوراق عمرها 30 يومًا محورة بسلالة A4 على وسط زراعة ½ B5. تم تأكيد الطبيعة المعدلة وراثيًا للجذور الشعرية من خلال تضخيم PCR لجين *rol B*. الاختلافات في معدل النمو ومحتوى فيتوستيرول بين سلالات الجذور الشعرية السبعة المختارة متباينة للغاية. أعطت سلالة HR4 أعلى إنتاجية حيث وصل إلى 345.8 ميكروجرام كامبستيرول / جرام مادة جافة و 411.8 ميكروجرام ستيجماستيرول / جرام مادة جافة و 438.3 ميكروجرام بيتا سيتوستيرول لكل جرام مادة جافة.

بالإضافة إلى ذلك، أتاحت تحليل مستخلصات الجذور الشعرية بواسطة GC-MS الكشف عن وجود ستة وثلاثين مركبًا حيويًا من فئات المستقبلات المختلفة، وأهمها الستيرويدات. بالإضافة إلى ذلك، فإن توصيف جليكوسيدات القلب للمستخلص الإيثانولي من الجذور الشعرية لـ *C. procera* بواسطة UHPLC-QTOF / MS يبين وجود عشرة جزينات نشطة بيولوجيًا.

أخيرًا، يُظهر تقييم سمية المستخلص المائي للجذور الشعرية لـ *C. procera* على الديدان الخيطية (*Meloigogyne* spp.) معدل وفيات إجمالي (100%)، وهذا بالنسبة لمستخلصات سلالات الجذور السبعة.

الكلمات الرئيسية: نشاط ضد نيماتودي، *Agrobacterium rhizogenes*، *Calotropis procera*، الجذور الشعرية، GC-MS، جليكوسيدات القلب، المستقبلات الثانوية، PCR، فيتوستيرول، UHPLC / QTOF-MS.