



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث 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

القسم : علم الغابات وحماية الطبيعة

Spécialité : Science forestière

تخصص : علم الغابات

Mémoire De Fin D'études

Pour L'obtention du Diplôme de Master

Thème

**Etat des connaissances de l'induction des chevelus racinaires des
Daturas in vitro et en hydroponie**

Présenté Par : Mlle BELGHARBI Fallah

Soutenu Publiquement le 30/09/2020

Devant le jury composé de :

Présidente :

Mme. NACERBEY Nazli

M.C.B ENSA-Alger

Mémoire dirigé par :

M. MORSLI Abdelkader

M.C.A ENSA-Alger

Examineur :

M.SBABDJI Mohamed

M.C.A ENSA-Alger

Promotion 2017/2020

TABLE DES MATIÈRES

Dédicace	
Abstract	
ملخص	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Liste des Annexes	
Introduction.....	1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. Les Datura.....	5
I.1 Généralités.....	5
I.2 Systématique de <i>Datura stramonium</i> selon APG III.....	5
I.3 Description botanique.....	6
I.4 Utilisation de <i>Datura stramonium</i>	7
II. Les Métabolites des plantes.....	7
II.1 Métabolites primaires.....	7
II.2 Métabolites secondaires.....	8
II.2.1 Nature, distribution et rôle écologique des métabolites secondaires.....	8
II.2.2 Importance économique et pharmaceutique des métabolites secondaires.....	8
II.3 Les alcaloïdes.....	9
II.3.1 Généralités.....	9
II.3.2 Classification des alcaloïdes.....	9
II.3.3 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.....	10
II.3.4 Usages thérapeutiques des alcaloïdes tropaniques.....	12
II.3.5 Extraction des alcaloïdes.....	12
II.3.6 Dosage et identification des alcaloïdes.....	12
III. <i>Agrobacterium</i> :.....	14
III.1 Plasmide Ri.....	15
III.2 Processus d'infection par l' <i>Agrobacterium</i>	15
III.3 La maladie de chevelus racinaires.....	17

IV.	La culture hors-sol	18
IV.1	Culture hydroponique	18
IV.2	Culture aéroponique	19
V.	L'Elicitation	19
V.1	Généralités	19
V.2	Eliciteurs biotiques	20
V.3	Eliciteurs abiotiques	20

Chapitre II: Matériel et démarche méthodologie

I.	Matériel végétal	23
I.1	Origine des graines de <i>Datura</i>	23

Partie 01: Etablissement des chevelus racinaires *in vitro*

I.	Mise en germination des graines	23
I.1	Scarification des graines de <i>Datura</i>	23
I.2	Désinfection des graines.....	23
II.	Mise en culture	24
III.	Obtention des chevelus racinaire	24
III.1	Le matériel bactérien	24
	Les souches bactériennes utilisées	24
III.2	Préparation des suspensions bactériennes	25
III.2.1	Activation de la bactérie	25
III.2.2	Mise en suspension de la souche bactérienne	25
III.2.3	Co-culture plante-bactérie.....	25
III.3	Entretien des lignées racinaires obtenues	28
III.4	Sélection des lignées racinaires performantes.....	28
III.5	Essai de certains milieux de base pour la culture des chevelus racinaires	28
III.6	Elicitation des chevelus racinaires	29
III.6.1	Elicitation abiotique	29
III.6.2	Elicitation biotique.....	32
III.7	Extraction des alcaloïdes tropaniques	33
III.8	Dosage et identification des alcaloïdes	34
III.9	Analyse statistique.....	34

Partie 02: Etablissement des chevelus racinaires en hydroponie

I.	Culture des <i>Datura</i>	36
----	---------------------------------	----

I.1	Mise en germination des graines de <i>Datura</i>	36
I.2	Culture hydroponique.....	37
I.2.1	Description.....	37
I.3	L'élicitation	37
I.3.1	Quantification de la biomasse.....	38
I.3.2	Le séchage	38
I.4	Traitements effectués	38
I.4.1	Paramètres mesurés	38
I.4.2	Extraction des alcaloïdes	39
I.4.3	Dosage des alcaloïdes :	39

chapitre III: Résultats et interprétations

Partie 01: Etablissement des chevelus racinaires *in vitro*

I.	Désinfection des graines	41
II.	Taux de germination de <i>Datura</i>	41
III.	Obtention de chevelus racinaire	41
III.1	Taux de réactivité	41
III.2	Taux d'induction racinaire	42
III.3	Sélection des lignées racinaires performantes.....	45
III.4	Réponse des chevelus racinaire à la culture dans différents milieux de base	46
III.5	Elicitation des chevelus racinaires :	47
III.5.1	Elicitation abiotique	47
III.5.2	Elicitation biotique.....	50
III.6	Comparaison des meilleurs traitements biotiques par rapport aux abiotiques	52

Partie 02: Etablissement des chevelus racinaires en hydroponie

I.	Taux de germination	54
II.	Effet des PGPRs sur la Croissance végétative.....	54
II.1	Longueur moyenne des plantes	54
II.2	Poids total moyen des plantes (poids frais).....	54
II.3	Poids sec moyens des feuilles et des racines.....	54
II.4	Effets des PGPRs sur les teneurs en scopolamine et hyoscyamine.....	55
III.	Effet de la solution nutritive sur la Croissance végétative.....	55
III.1	Vitesse de la croissance	55
III.2	La biomasse des racines	55

III.3 Effets de différentes concentrations du CaCl ₂ et du temps de contact sur la biomasse et sur la teneur en alcaloïdes	56
III.3.1 Sur la biomasse	56
III.3.2 Sur la teneur en alcaloïde	56

chapitre IV : Discussion

Partie 01: Etablissement des chevelus racinaires *in vitro*

Partie 02: Etablissement des chevelus racinaires en hydroponie

Partie 03: comparaison entre la production des chevelus racinaires de *Datura* en Hydroponie et *in vitro*

Conclusion générale	67
Références Bibliographiques	69
Annexes.....	79

Abstract:

Datura stramonium is an annulus plant from the *Solanaceae* family, producing tropanic alkaloids which have important pharmaceutical properties. With the aim of reducing the importation of secondary metabolites in Algeria for its pharmaceutical needs, and to overcome the problems linked to the complexity and the low productivity from plants resulting from open fields, numerous studies have been carried out at the level of the laboratory LRGB on plant physiology, the biosynthesis of secondary metabolites in *Datura* and the cultivation of hairy roots in vitro and in hydroponics. As part of future research our work is a synthesis focused on two parts the first is to determine all the parameters related to obtaining a quality biomass and high content of tropanic alkaloids. The second is to determine the best culture conditions in vitro or in hydroponics for a strong development of the root system and production of alkaloids.

The synthesis of the work shows that the A4 strain is the most virulent for the induction of CRs compared to the other strains used, and that the etiolation presents the best aptitudes for transformation expressed by the rate of induction of the roots with 93.75%, also the best induction rates are obtained by the hypocotyl with 95% compared to the other parts, on the other hand the B5 medium the most suitable for the culture of hairy roots. In addition, the biotic and abiotic elicitation of the hairy roots of *Datura stramonium* brought very significant results with an improvement of 583% by the strain C7R12 compared to the control and an improvement of 196%, 132%, 120%, 108%, 42%, 30% respectively with AgNO₃, KCL, jasmonic acid, CaCl₂, acetylsalicylic acid, salicylic acid. Moreover, the elicitation in hydroponics by CaCl₂ recorded an improvement of 754% in dry weight, also the PGPRs increased by 90% in scopolamine and 72% in hyoscyamine and the elicitation by CaCl₂ recorded an increase of 266% in scopolamine.

In addition, the comparison of the results of the works synthesized on the production of tropanic alkaloids in vitro and in hydroponics showed that the production of biomass and alkaloids in hydroponics is very advantageous and more important comparing to the culture in vitro and also comparing to cultivation in the open fields. The optimization of alkaloid production which is based on the use of elicitors shows a positive effect.

Key words: *Datura stramonium*, *Agrobacterium rhizogenes*, elicitation, alkaloids, hairy roots, *in vitro* culture, hydroponics.

ملخص :

Datura stramonium هي نبات حلقي تنتمي إلى عائلة الباذنجانيات، تتميز بإنتاج القلويدات التروبانية التي لها خصائص دوائية مهمة. بهدف الحد من استيراد الايضيات الثانوية في الجزائر لاحتياجاتها الصيدلانية، وللتغلب على المشاكل المرتبطة بصعوبة وانخفاض الإنتاجية في الحقول المفتوحة، تم إجراء العديد من الدراسات على مستوى معمل البحث في الموارد الوراثية والتكنولوجيا الحيوية في فسيولوجيا النبات، والإنتاج الحيوي للايضيات الثانوية من *Datura* وزراعة الجذور المشعرة في المختبر وفي الزراعة المائية. من أجل توجيه البحوث المستقبلية، فإن عملنا هو عبارة عن دراسة تحليلية تنقسم إلى جزأين، الأول هو استخلاص جميع الخصائص المتعلقة بالحصول على كتلة عالية الجودة ونسبة عالية من القلويدات التروبانية. والجزء الثاني هو عبارة عن تحديد أفضل طريقة من أجل تطوير نمو الجذور وإنتاج القلويدات (الزراعة في المختبر أو الزراعة المائية).

يوضح تحليل الأبحاث أن سلالة A4 هي الأكثر فعالية لتحريض الجذور المشعرة مقارنة بالسلالات الأخرى المستخدمة، وأن الذبول (الزراعة في الظلام) يقدم أفضل استعدادات للتحويل معبراً عنها بمعدل تحريض الجذور بـ 93.75% ، كما يتم الحصول على أفضل معدلات التحريض بواسطة hypocotyl بنسبة 95% مقارنة بالأجزاء الأخرى ، ومن ناحية أخرى ، فإن الوسط B5 هو الأنسب لزراعة الشعيرات الجذرية. بالإضافة إلى ذلك ، فإن التحفيز الحيوي وغير الحيوي للشعيرات الجذرية حقق نتائج مهمة للغاية مع تحسن بنسبة 583% بـ C7R12 مقارنةً بالشاهد، وتم التحسين بـ 196% ، 132% ، 120% ، 108% ، 42% ، 30% على التوالي مع $AgNO_3$ ، KCL ، حمض الياسمين، $CaCl_2$ ، حمض أسيتيل الساليسيليك، حمض الساليسيليك. علاوة على ذلك، ساهم التحفيز في الزراعة المائية بواسطة $CaCl_2$ في تحسين الإنتاج بنسبة 754% في الوزن الجاف، كما زادت معدلات PGPR بنسبة 90% في scopolamine و 72% في hyoscyamine وسجل التوتر بواسطة $CaCl_2$ زيادة قدرها 266% scopolamine.

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت مقارنة نتائج الأبحاث المحللة في إنتاج قلويدات التروبانية في المختبر وفي الزراعة المائية أن إنتاج الكتلة الحيوية والقلويدات في الزراعة المائية مفيد جداً والأكثر أهمية من الزراعة في المختبر و في الحقول المفتوحة. كما أن لاستعمال المحفزات تأثيراً إيجابياً على تحسين إنتاج القلويدات .

الكلمات المفتاحية : *Datura stramonium*، *Agrobacterium rhizogene*، تحفيز، القلويدات، الجذور المشعرة، الزراعة المائية، الزراعة في المختبر.

Résumé:

Datura stramonium est une plante annuelle de la famille des Solanacées, produisant les alcaloïdes tropaniques qui ont des propriétés pharmaceutiques importantes. Dans le but de diminuer l'importation des métabolites secondaires en Algérie pour ses besoins pharmaceutiques, et pour surmonter les problèmes liés à la complexité et les faibles productivités à partir des plantes issues de plein champ, de nombreuses études ont été réalisées au niveau du laboratoire LRGB sur la physiologie végétale, la biosynthèse de métabolites secondaires chez *Datura* et la culture des chevelus racinaires *in vitro* et en hydroponie. Dans le cadre d'orienter les recherches prochaines, notre travail est une synthèse qui porte sur deux volets : le premier est de déterminer l'ensemble des paramètres liés à l'obtention d'une biomasse de qualité et teneur élevée en alcaloïdes tropaniques. Le deuxième est de déterminer la meilleure condition de culture *in vitro* ou en hydroponie pour un fort développement du système racinaire et production des alcaloïdes.

La synthèse des travaux montre que la souche A4 est la plus virulente pour l'induction des CRs par rapport aux autres souches utilisées, et que l'étiollement présente les meilleures aptitudes à la transformation exprimée par le taux d'induction des racines avec 93.75%, aussi les meilleurs taux d'induction sont obtenus par l'hypocotyle avec 95% par rapport aux autres parties, d'autre part le milieu B5 le plus adéquat pour la culture de chevelus racinaires. Par ailleurs, l'élicitation biotique et abiotique des chevelus racinaires de *Datura stramonium* a apporté des résultats très importants avec une amélioration de 583% par la souche C7R12 par rapport au témoin et une amélioration de 196%, 132%, 120%, 108%, 42%, 30% respectivement avec l'AgNO₃, KCl, acide jasmonique, CaCl₂, acide acétylsalicylique, acide salicylique. D'ailleurs, l'élicitation en hydroponie par le CaCl₂ a enregistré une amélioration de 754% du poids sec, aussi les PGPRs ont augmenté de 90% en scopolamine et de 72% en hyoscyamine et l'élicitation par le CaCl₂ a enregistré une augmentation de 266% en scopolamine.

Par ailleurs, la comparaison des résultats des travaux synthétisés sur la production des alcaloïdes tropaniques *in vitro* et en hydroponie a montré que la production de biomasse et des alcaloïdes en hydroponie est très avantageuse et plus importante par rapport à la culture *in vitro* et par rapport à la culture en plein champ. L'optimisation de la production d'alcaloïdes qui est basée sur l'utilisation des éliciteurs montre un effet positif.

Mots clés : *Datura stramonium*, *Agrobacterium rhizogenes*, élicitation, alcaloïdes, chevelus racinaires, culture *in vitro*, hydroponie.