

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REpubLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة أمحمد بوقرة – بومرداس  
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES



Faculté Des Sciences

Département de Biologie

## Mémoire de projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de **MASTER ACADIMIQUE**

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière** : Biotechnologies

**Spécialité** : Biotechnologie Végétale

## THEME

### *Multiplication in vitro de la belladone*

Réalisé par : **M<sup>elle</sup>. Djaidier Oumaima**

**M<sup>elle</sup>. Mecellem Meriem**

Soutenu le 20/09/2023 devant le jury :

<b>M<sup>me</sup>. AIT KAKI</b>	<b>Sabrina</b>	Professeur	FS/UMBB	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup>. MOUHOU B</b>	<b>Faiza</b>	M.A.B.	FS/UMBB	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr. MORSLI</b>	<b>Abdelkader</b>	Professeur	ENSA/Alger	<b>Promoteur</b>
<b>M<sup>me</sup>. ROUANE</b>	<b>Asma</b>	M.C.B.	FS/UMBB	<b>Co- promotrice</b>

Année Universitaire 2022 -2023

## **Remerciements**

*Nous remercions avant tout, **Allah** qui nous a donné la santé, la volonté et la patience pour accomplir ce travail.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements : A  
Nos parents pour leur contribution pour chaque travail que nous  
avons effectué.*

*A nos promoteur **Mr MORSLI.A**, le responsable de laboratoire de foresterie et protection de la nature **ENSA-EL HARRACH ALGER** d'avoir accepté recevez-nous l'ambiance et les moyens appropriés pour terminer notre expérimentation et qui malgré le peu de temps que y avons passé, nous avons appris beaucoup de choses. Sans oublier les efforts de **Mme DALI-ZEMIH.N (Doctorante à l'ENSA)** et tout l'équipe et les collègues de ce laboratoire.*

*Nos promotrice **Mme ROUANE.A**, nos profond respect pour avoir accepté de nous encadré, pour ces orientations, ses encouragements et pour l'effort consenti à nous faire profiter de ses connaissances.*

*A l'ensemble des enseignants du département de biotechnologie végétale ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et ceux qui ont fait l'honneur de jurer ce mémoire.*

*En fin, nous remercions le **Pr Mme AIT KAKI.S** le président de jury et l'examinatrice **Mme MOUHOU.B.F** qui ont accepté de juger avec volonté notre travail et d'avoir contribué à notre formation.*

## ***Dédicaces***

*À mes très chers parents qui n'ont pas cessé de prier pour moi et qui m'ont aidé durant toute la durée de mes études, que dieu les garde pour nous.*

*À mes très chères frères et sœurs qu'ils m'ont fourni tous leur effort et moyen pour que je termine mes études. A mes très chers cousins À mon binôme et meilleur ami avec qui j'ai partagé les plus beaux moments ainsi que toute sa famille.*

*A ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et pires moments de ma vie, à mes amis les plus fidèles.*

*A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je dédie ce modeste travail.*

**OUMAIMA**

## *Dédicace*

*A la mémoire de ma collègue de master*

*A la mémoire de mes grands-parents paternels*

*A mes grands-parents maternels*

*A celle qui m'est plus chère au monde, qui m'a soutenu durant toute  
ma vie grâce à son amour et son affection, que Dieu te bénisse maman*

*A mon très chère père qui grâce à ses sacrifices, je suis devenu ce que*

*je suis aujourd'hui. A ma cher frère, à mes chère sœurs*

*A mes oncles et mes tantes , A tous mes cousins et cousines*

*A tous mes amis , A toute l'Equipe de biun je dédie ce mémoire .*

***MERIEM***

# SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	

<b>INTRODUCTION</b> .....	01
---------------------------	----

## CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.1. Généralité sur <i>Atropa bella-donna</i></b> .....	03
I.1.1. Origine et répartition de la belladone dans le monde et en Algérie.....	03
I.1.2. Classification systématique.....	04
I.1.3. Description botanique.....	05
I.1.4. Les caractéristiques biochimiques de la belladone.....	06
I.1.5. Intoxication de la belladone.....	10
I.1.6. L'utilisation traditionnelle.....	11
I.1.7. L'utilisation médicinale.....	12
I.1.8. Culture et récolte.....	12
<b>I.2. Généralités sur la culture <i>in vitro</i></b>	
I.2.1. Historique de la culture <i>in vitro</i> .....	13
I.2.2. Rôle de la culture <i>in vitro</i> .....	14
I.2.3. Les applications de la culture <i>in vitro</i> .....	14
I.2.4. Les conditions de la culture <i>in vitro</i> .....	15
I.2.5. Avantages de la culture <i>in vitro</i> .....	18
I.2.6. Les inconvénients.....	18
I.2.7. Les milieux de cultures couramment utilisés.....	18

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Objectif du travail.....	20
II.2. Matériel végétale.....	20
II.3. Mise en culture.....	20
II.4. Induction des cals (Callogenèse).....	21
II.5. Multiplication par bourgeonnement axillaire.....	23
II.6. La production de la biomasse des chevelus racinaires dans le milieu liquide.....	25

## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISSCUTION**

### **1. RESULTATS**

<b>III.1.1. La callogenèse</b> .....	27
III.1.1.1. Effet du traitement hormonal sur l'induction de callogenèse.....	27
III.1.1.2. Le taux d'induction de la callogenèse .....	27
III.1.1.3. Surface des cals.....	28
III.1.1.4. Couleurs et textures des cals.....	29
<b>III.1.2 .La multiplication</b> .....	29
III.1.2.1. Influence des régulateurs de croissance .....	30
III.1.2.2. Le taux de multiplication.....	30
<b>III.1.3. La production de la biomasse des chevelus racinaires dans le milieu liquide..</b>	31
III.1.3.1. La surface des chevelus racinaires.....	31
III.1.3.2. La vitesse moyenne de croissance.....	33
III.1.3.3.Le poids frais et le poids sec des chevelus racinaires.....	34

### **2. DISCUSSION**

III.2.1.Initiation de la callogenèse .....	36
III.2.2.Induction de la callogenèse .....	36
III.2.3.Surface des cals .....	37
III.2.4.Multiplication .....	37
III.2.5.Production des chevelus racinaires dans un milieu liquide.....	38
III.2.5.1.La surface des chevelus racinaires.....	38
III.2.5.2.La vitesse de croissance des chevelus racinaires.....	38
III.2.5.3. Le poids frais et le poids sec des chevelus racinaires.....	39
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	40
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	41

### **ANNEXES**

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

- AIB** : Acide indole-3-butyrique
- ANA** : Acide Naphtalène Acétique
- BAP** : 6-Benzylaminopurine
- B5** : Milieu de culture de Gamborg *et al*(1968)
- Crs** : Chevelus racinaires
- PF** : Poids frais
- Ph** : Potentiel hydrique
- PM** : Plante médicinale
- PS** : Poids sec

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Distribution mondiale de la belladone.....	04
<b>Figure 2</b> : Les éléments caractéristiques de <i>l'Atropa bella-donna</i> . ....	05
<b>Figure 3</b> : Photographie montrant la position alterne des feuilles de la belladone .....	06
<b>Figure 4</b> : Photographie d'une fleur de la belladone, zoom sur le calice.....	06
<b>Figure 5</b> : Photographie de baies de la belladone.....	06
<b>Figure 6</b> : Photographie des racines de la belladone.....	06
<b>Figure 7</b> : La structure chimique de la scopolamine.....	08
<b>Figure 8</b> : Structure chimique de l'atropine.....	09
<b>Figure 9</b> : Structure chimique de l'hyoscyamine.....	10
<b>Figure 10</b> : Synthèse de l'atropine, de l'hyoscyamine et de scopolamine à partir de l'acide tropique .....	10
<b>Figure 11</b> : Schéma représentant les différentes mesures à prendre face à une intoxication.....	11
<b>Figure 12</b> : Processus général de la micro-propagation à partir d'un explant à une plante ....	15
<b>Figure 13</b> : Effet de l'auxine et des cytokinines sur l'organogènes.....	17
<b>Figure 14</b> : 1 litre de milieu de culture B5 préparée.....	21
<b>Figure 15</b> : Des explants d' <i>Atropa bella-donna</i> placés dans le milieu de culture B5 afin d'obtenir des cals .....	22
<b>Figure 16</b> : Schéma représentant le protocole adopté pour l'induction des cals .....	23
<b>Figure 17</b> : Le matériel végétal initial stérile et fragmenté en micro boutures.....	24
<b>Figure 18</b> : Schéma général de la multiplication par bourgeonnement axillaires.....	25
<b>Figure 19</b> : Les racines transformées cultivées dans le milieu B5 liquide.....	25
<b>Figure 20</b> : Réactivité des explants de chevelus racinaires crs mis en culture sur le milieu de callogenèse après 40 jours de culture pour deux lignées .....	27
<b>Figure 21</b> : L'effet du traitement hormonal sur le taux de callogenèse induite avec des explants de chevelus racinaires des trois lignées après six semaines de culture.....	28
<b>Figure 22</b> : L'évolution de la surface moyenne des cals en fonction du temps et des milieux testés.....	29
<b>Figure 23</b> : Des boutures obtenues dans le milieu M2 (0.12 D'AIB + 0.5 BAP mg/L) Après 4 semaines de culture.....	30
<b>Figure 24</b> : Représente les taux de multiplication de chaque concentration hormonale.....	31

<b>Figure 25 :</b> Évolution de la surface moyenne de La lignée L0 et L139 en fonction du temps.. .....	33
<b>Figure 26 :</b> Cinétique de la vitesse de la croissance en fonction de temps .....	34
<b>Figure 27:</b> Les deux lignées cultivées dans le milieu B5 après un mois de culture.....	34
<b>Figure 28 :</b> Les poids frais (PF) et les poids secs (PS) de la lignée L139 et L0 obtenue après 6 semaines de culture .....	35

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1</b> : Teneurs en alcaloïdes, atropine et hyoscyamine dans la plante d' <i>Atropa bella-donna</i> , quelques références bibliographiques. ....	07
<b>Tableau 2</b> : Les différentes concentrations de l'ANA testées pour l'induction de la callogenèse à partir des chevelus racinaires d' <i>Atropa bella-donna</i> .L.....	22
<b>Tableau 3</b> : Les combinaisons hormonales utilisées pour la multiplication.....	24
<b>Tableau 4</b> : Représente les observations de l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles et la morphologie des racines néoformées après un mois de culture.....	31
<b>Tableau 5</b> : Représente la variation de la surface, vitesse et le degré des ramifications après 40 jours.....	32

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1** : La composition chimique de milieu de culture B5.

**Annexe 2** : Les solutions mères préparées des macro et micro-éléments, vitamine, Fer.

**Annexe 3** : Le matériel de laboratoire utilisé.

# **INTRODUCTION**

## ***Introduction***

L'exploitation et l'utilisation intensive par l'homme des ressources génétiques ont entraîné la disparition de beaucoup d'espèces d'intérêts (**Boullard,2001**) . Pour pallier à ce problème de surexploitation des plantes utiles, la micropropagation des plantes par les techniques de vitroculture sont utilisées pour répondre aux besoins de l'agriculture, de l'industrie et de l'horticulture. Ces techniques restent des outils très efficaces pour la préservation des espèces en risque de disparition et la production en masse du matériel végétal à grande échelle (**Auge et al.,1989**).

Les plantes médicinales (PM) ont toujours été considérées comme les premiers réservoirs de nouveaux médicaments et sont aussi considérées comme des matières premières importantes pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires au développement des médicaments futurs à base de plantes (**Maurice,1997**).

Les plantes médicinales, aromatiques et à parfums sont très précieuses en termes de biodiversité, mais aussi de plus-value économique. Elles sont très demandées sur le marché mondial, en particulier les entreprises pharmaceutiques et cosmétiques (**Salhi et al.,2010**) .

L'Algérie par son aire géographique et sa diversité climatique, riche en plantes médicinales spontanées, utilisées par les riverains en médecine traditionnelle (phytothérapie), dont au moins certaines parties de la plante, ont des vertus thérapeutiques. Leurs composés (métabolites primaires et secondaires) où de la synergie entre *différents* composés existants (**Moreau, 2003**). Parmi ces plantes on trouve *Atropa Bella -donna L.*

La Belladone (*Atropa bella -donna L*) est une plante connue pour ses propriétés médicinales et toxiques .C'est une source importante d'alcaloïdes tropaniques, la production de ces alcaloïdes peut être obtenue par la culture de plantes en plein champs mais le rendement sont souvent faible et variables et affectés par des facteurs biotiques (pathogènes, insectes) ou abiotiques (Température, Sécheresse, le sol...etc) (**Labrousse et al.,2022**).

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles principalement dérivées des plantes, plus de dix milles alcaloïdes ont été isolés des plantes depuis leurs premières découvertes en 1806 (**Mauro,2006**). Ils forment une grande famille très hétérogène de métabolites secondaires qui ont présentent un certain intérêt en raison de leurs propriétés pharmacologiques et de leurs applications en médecine (**Hopkins,2003**). Parmi eux, on

## ***Introduction***

distingue 3 familles d'alkaloïdes tropaniques dont les plus importantes sont le scopolamine, l'atropine et l'hyoscyamine (**Benhizia,1989**). Ces substances sont extraites à partir des plantes de la famille des solanacées dont l'espèce d'*Atropa bella -donna* L.

Ces dernières années, les chevelus racinaires (*Hairy root* en Anglais) établis par la transformation génétique des racines de la plante à l'aide d'une bactérie du sol appelée (*Agrobacterium rhizogenes*). Cette technique est une alternative de la culture cellulaire, est intéressante pour la production de métabolites secondaires chez les végétaux (**Bourgaud *et al.*,2001**) .

Les racines transformées se développent rapidement dans un milieu sans hormones (**Belabbassi et Benouaret,2009**). Le Phénotype est caractérisé par une croissance rapide des racines, une stabilité génétique et une biosynthétique des métabolites élevée (**Giri et Narasu,2000; Guillon *et al.*,2006; Srivastava *et al.*, 2007**).

Le présent travail est structuré en deux parties, la première partie représente des rappels bibliographiques sur *Atropa bella-donna* et la culture *in vitro*. La deuxième partie est consacrée à la présentation du matériel biologique et les méthodes utilisées, et enfin, la dernière partie représente les résultats obtenus et leurs interprétations.

**CHAPITRE I**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I.1. Généralités sur *Atropa bella-donna*

La belladone, *Atropa bella -donna* « *Deadly Nightshade* », est une plante herbacée vivace de la famille des Solanacées qui compte environ 2000 espèces. Elle est annuelle ou bisannuelle porte parfois nom communément l'herbe empoisonnée ou la morelle furieuse (**Goullé et al,2004**). Les Grecs et les Romains la connaissaient comme une plante mortelle depuis l'Antiquité, et elle était également utilisée par les sorcières et les magiciens au Moyen Âge à la Renaissance, et les femmes l'utilisaient localement pour accentuer leurs yeux par dilatation pupillaire, d'où le nom Bella-donna (belle femme) en italien (**Hostettman,1997; Lee,2007; Laffargue et al,2011**).

Le nom du genre *Atropa* est dérivé de "*Atropos*" divinité du destin dans la mythologie grecque pouvant mettre à la vie, rappelle ainsi la toxicité de la plante (**Hostettmann,1997**). L'*Atropa Bella -donna*, plante au pouvoir létale, contient des alcaloïdes responsables de la toxicité anti cholinergique (**Nisse,2003**). Cette espèce est considérée comme rare en Algérie, confinée dans quelques forêts au nord de l'Algérie. C'est aussi une plante très toxique et hallucinogène. Des auteurs ont signalé l'empoisonnement accidentel des enfants par la belladone en consommant ses grains et pour le cas des adultes par des intentions suicidaires ou des effets hallucinogènes (**çaksen et al,2003**).

## I.2. Origine et répartition de la belladone dans le monde et en Algérie

Elle pousse spontanément en Europe centrale et méridionale, dans l'Ouest de l'Asie et au Nord de l'Afrique. Par le passé, étant donné son importance en pharmacie et pour obtenir une activité constante, elle a été cultivée dans de nombreux pays.

En Algérie, bien qu'elle soit assez rare, on la trouve dans les forêts en montagne : la Kabylie, les monts du Hodna et les Aurès (**Quezel et Santa,1962**).

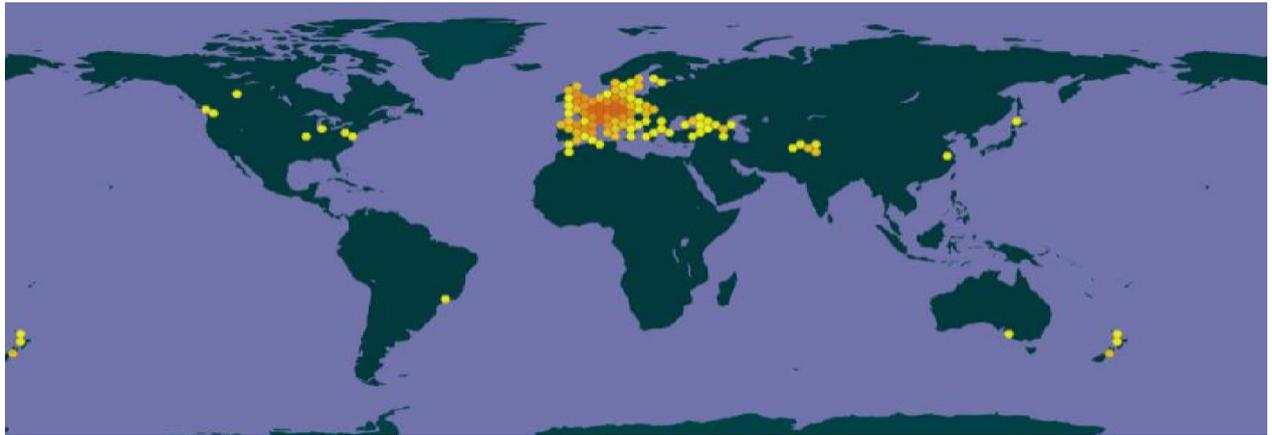


Figure 1 : Distribution mondiale de la belladone.

source : <https://www.gbif.org/species/3802655> (GBIF Global Biodiversity Information Facility)

### I.3. Classification systématique selon la classification APG IV (2009)

**Règne :** *Plantae*

**Sous règne :** *Tracheobionta*

**Embranchement :** *Spermatophyta*

**Sous embranchement :** *Magnoliophyta*

**Classe :** *Magnoliopsida*

**Ordre :** *Solanales*

**Famille :** *Solanaceae*

**Genre :** *Atropa*

**Espèce :** *Atropa bella-donna L.*

**Nom en arabe:** ست الحسن

**Nom berbère:** Bou rendjoug , Bou gini

**Nom français :** Belladonne , Belle-dame , Bouton noir , Morelle furieuse , Mandragore baccifère.

**Nom anglais :** Deadly Nightshade.

### I.4.Description botanique

La belladone est une plante vivace de 50 à 150 cm de haut, se retrouve fréquemment aux bords des bois montagneux, dans les fossés, au milieu des décombres, elle dégage une forte odeur fétide due à la présence de poils sécréteurs. Ses feuilles sont alternées ou opposées, à pétioles courts. Ses fleurs mesurent 2 à 3 cm de long, sont en forme de cloche et possèdent 5 gammes violettes, dicotylédones, brunes ou vertes. Elles portent des baies sphériques de 1 à 1,5 cm, noires, luisantes, entourées d'un calice à 5 sépales de juin à août. Il pousse de manière dispersée, de préférence dans les haies, les clairières sur sols calcaires, jusqu'à 1500 m d'altitude. Nous récoltons les feuilles en été et les racines de la première année en automne **(Goullé et al,2004)**.

Avec des tiges violettes, robustes, non divisées à la base, mais divisées au-dessus du sol en trois branches ou plus, rarement 2 ou 4 branches, chaque branche librement ramifiée. Ces racines riches en alcaloïdes, épaisses, charnues, blanchâtre, ramifiées. Toutes les parties de la plante sont toxiques à des degrés variés **(Goullé et al,2004 ; Rita et Animesh,2011)**.



Figure 2 : Les éléments caractéristiques de l'*Atropa bella-donna*.

Source: [www.google.fr](http://www.google.fr) consulté le 09/10/2018.

Les baies de fruits et le calice à cinq lobes s'étendant autour de la base sont de couleur noire, remplis d'encre noire, au goût sucré et mangés par des animaux occasionnellement, bien que les graines contiennent des alcaloïdes toxiques **(Rita et Animesh,2011)**.



Figure 3: Photographie montrant la position alterne des feuilles de la belladone Source : (Bernar

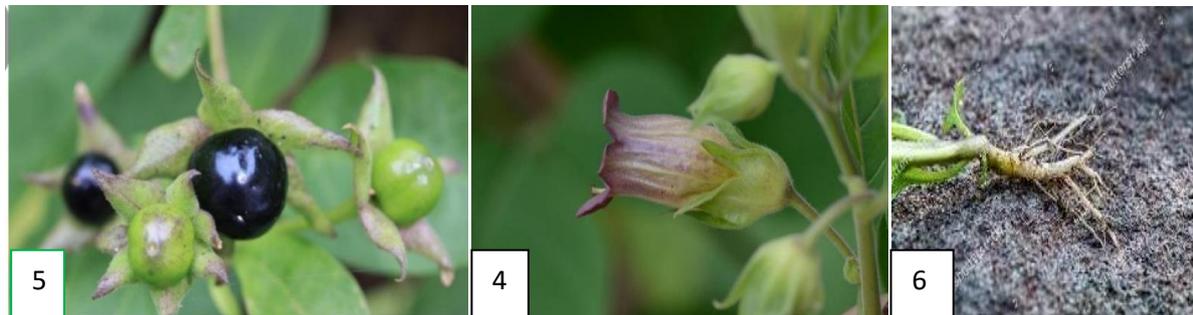


Figure 4 : Photographie d'une fleur de la belladone, zoom sur le calice, Source : (ANAB 2017) .

Figure 5 : Photographie de baies de la belladone ,Source : ( Toxiplante 2018).

Figure 6 :Photographie des racines de la belladone,Source :( Toxiplante 2018).

### I.5. Les caractéristiques biochimiques de la belladone

La plante est riche en métabolites secondaires, en majorité des alcaloïdes tropaniques. Ces derniers sont synthétisés au niveau des racines et transportés vers les parties aériennes traversant le xylème. (Fattorusso et Tagliatela-Scafati, 2008 ; Georgiev *et al*, 2013). Il existe 13 alcaloïdes tropaniques différents au niveau des racines et 7 dans les parties aériennes (Rita *et al*, 2011). Les principaux alcaloïdes présents dans la plante sont l'atropine et l'hyoscyamine, qui représentent 90% à 95% des alcaloïdes totaux (Goullé, *et al*, 2004).

Le troisième alcaloïde est le scopolamine qui représente 2 à 3 % des alcaloïdes totaux (Hammiche *et al*, 2013). La teneur en alcaloïdes ,atropine et hyoscyamine décrite chez atropa Bella-donna varie selon les auteurs (tableau 1) .

**Tableau 1 :** Teneurs en alcaloïdes, atropine et hyoscyamine dans la plante d'Atropa Bella-donna, quelques références bibliographiques.

Source	Molécules	Plante	Fruit	Feuille	Racine	Dose létale
<b>Bruneton, 2005</b>	Alcaloïdes	-	0.65%	0.50%	0.85%	0.2 mg/kg
	Atropine	-	~1 mg/g	-	-	-
<b>Hammiche et al.,2013</b>	Alcaloïdes	0.3 à 1%	Jusqu'à 0.6%	0.3 à 0.6%	0.7 à 0.9%	2 à 5 baies = 4 à 10mg
	Atropine	-	~1 mg/g	-	-	-
<b>Rita et al.,2011</b>	Hyoscyamine	-	-	-	2.1mg/g(+0.2 )	-

Les trois alcaloïdes importants chez la belladone :

### II.5.1.Scopolamine

La scopolamine (aussi appelée scopolamine = scopolamine atropine ester) est un ester de scopolamine et d'acide tropique de formule C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub> (Figure 6) (**Fabre et Truhaut,1961; El Bazaoui,2009**). Sa masse molaire est de 303,36 (**Steenkamp et al,2004 ; Pujol et al, 2006**).

C'est une poudre alcaline blanche et ses sels sont solubles dans l'eau (**Dangoumau et al, 2006**), tels que l'éthanol, l'éther et le chloroforme(**Drager,2002**). Le point de fusion est de 59°C (**Drager,2002 ; Alexander et al,2008**).

La scopolamine orale est rapidement absorbée. Il est presque entièrement métabolisé par le foie, seulement partiellement inchangé (<5%) (**Alexander et al,2008**).

La scopolamine a des effets sédatifs et hypnotiques sur l'agitation psychomotrice et elle augmente l'intensité et la durée des effets dépressifs des autres alcaloïdes sur le système nerveux central (**Monteriol et al,2007**). C'est un antagoniste muscarinique (**Patricia et al,2004; Nurhan et al,2005**) ; **Weiwei Zhang et al,2008**), structurellement similaire à l'acétylcholine, il réduit les concentrations cérébrales d'acétylcholine et provoque une inhibition des récepteurs, entraînant une libération d'acétylcholine, qui est rapidement détruite par la cholinestérase (**Henri et al,2003**). Cependant, les organes dépendant du système parasympathique ont montré une sensibilité différentielle aux effets bloquants de la scopolamine.

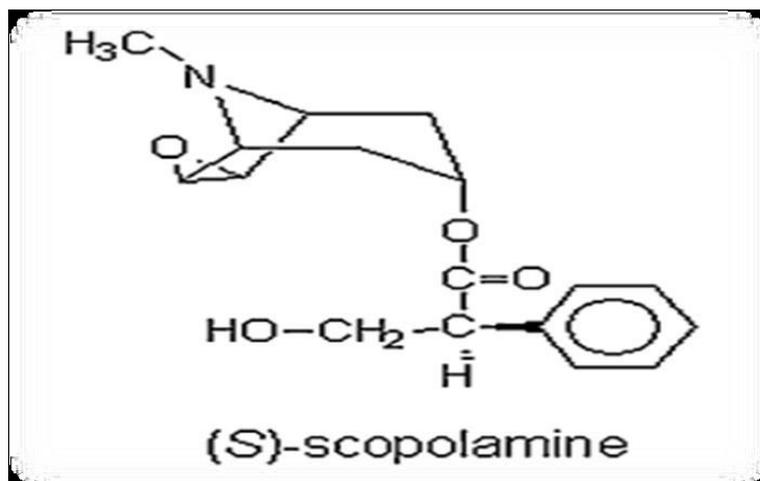


Figure 7: La structure chimique de la scopolamine (Aehle et Drager., 2010).

## II.5. Atropine

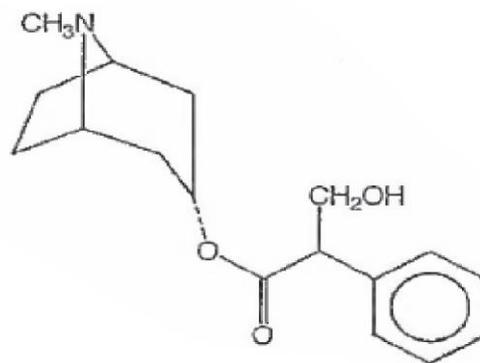
L'atropine est une poudre blanche (Dangoumau *et al*,2006), formule moléculaire C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub> (Goullé *et al*,2004 ; Alexander *et al*,2008 ; El Bazaoui,2009), son poids moléculaire est de 289,37 g (Steenkamp *et al*,2004; Alexander *et al*,2008), ayant un point de fusion de 115,5 C° (Fabre et Truhaut,1961 ; Alexander *et al*,2008) cristallisé sous forme de cristaux d'aiguilles filamenteux, incolores et anhydres. Son goût est amer et désagréable. Elle est peu soluble dans l'eau (Grevoz et Laubriet,2007).

L'atropine agit sur le cœur via l'accélération cardiovasculaire (Kenneth *et al*,2001) et provoque des bronchectasies (bronchectasies). Mais l'effet le plus important de l'atropine est son effet sur la pupille en la dilatant et en provoquant une photophobie (Alexander *et al*,2008 ; Javier *et al*,2008). De plus, il est utilisé dans le traitement des ulcères gastriques et comme antispasmodique dans le traitement des troubles intestinaux (Mateus *et al*,1999 ; Kenneth *et al*,2001) ; L'atropine est également utilisée dans le traitement du parkinsonisme (Steenkamp *et al*,2004).

L'atropine est rapidement absorbée par les muqueuses, se diffuse dans tout l'organisme, y compris le système nerveux central (SNC), le placenta, et des traces d'atropine se retrouvent dans diverses sécrétions, dont le lait maternel. (Pretoria et Max,2006). L'hydrolyse sérique n'existe pas chez l'homme. L'atropine est partiellement métabolisée dans le foie. Principalement éliminé par les reins. Jusqu'à 60 % sont excrétés sous forme inchangée dans l'urine, le reste étant excrété sous forme de fraction métabolique. (Alexandre *et al*,2008). L'atropine est une substance classée comme un antagoniste compétitif non sélectif des

récepteurs muscariniques (**Halpern et Sewell,2005 ; Pretorius et Marx,2006 ; Diether et al,2007**).

Cette substance a des effets parasympholytiques (**Attenhofer et Pellikka,2003; Barguil, 2011**). Elle inhibe de façon compétitive et réversible la fixation de l'acétyl choline aux récepteurs muscariniques (**Flesch,2005**), localisés dans les organes périphériques innervés par les fibres post- ganglionnaires parasymphatiques, ainsi que dans le système nerveux central (**Bruneton,1999; Salen et al,2003**), d'où ses effets sympathomimétiques (**Flesch, 2005**). Seules les formes lévogyres (L-hyoscyamine, fraction L de la DL-atropine) ont une activité sur les



*Figure 8: Structure chimique de l'atropine (Pujol et al., 2006).*

### II.5.3.Hyoscyamine

Selon (**Grzegorz et al,2008**). L'hyoscyamine et l'atropine ont la même formule chimique et la même activité pharmacologique, mais la première est plus active que la deuxième et c'est cette dernière qui est utilisée en médecine, car elle est stable et moins sensible aux enzymes hydrolytiques. L'hyoscyamine, est un ester du tropanol et de l'acide tropique gauche, est lévogyre ; elle s'isomérise assez facilement en atropine, dénuée de tout pouvoir rotatoire. Comme l'atropine, l'hyoscyamine possède des propriétés parasympholytiques.

L'action la plus caractéristique de l'hyoscyamine est l'intense dilatation de la pupille (mydriase) qu'elle provoque, d'où son usage pour les examens ophtalmologiques du fond de l'œil. Elle diminue aussi les différentes sécrétions, comme la sueur et la salive, et le tonus intestinal. L'atropine a les mêmes actions pharmacologiques, mais elle est deux fois moins active. On la prescrit contre les crises d'épilepsie et contre les douleurs stomacales ; le sulfate d'atropine est aussi très employé en pathologie cardio-vasculaire (**Pelletier,2001**).

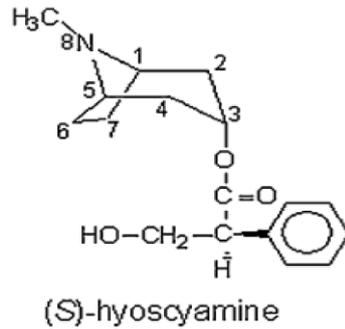


Figure 9 : structure chimique de l'hyoscyamine (Aehle et Drager., 2010).

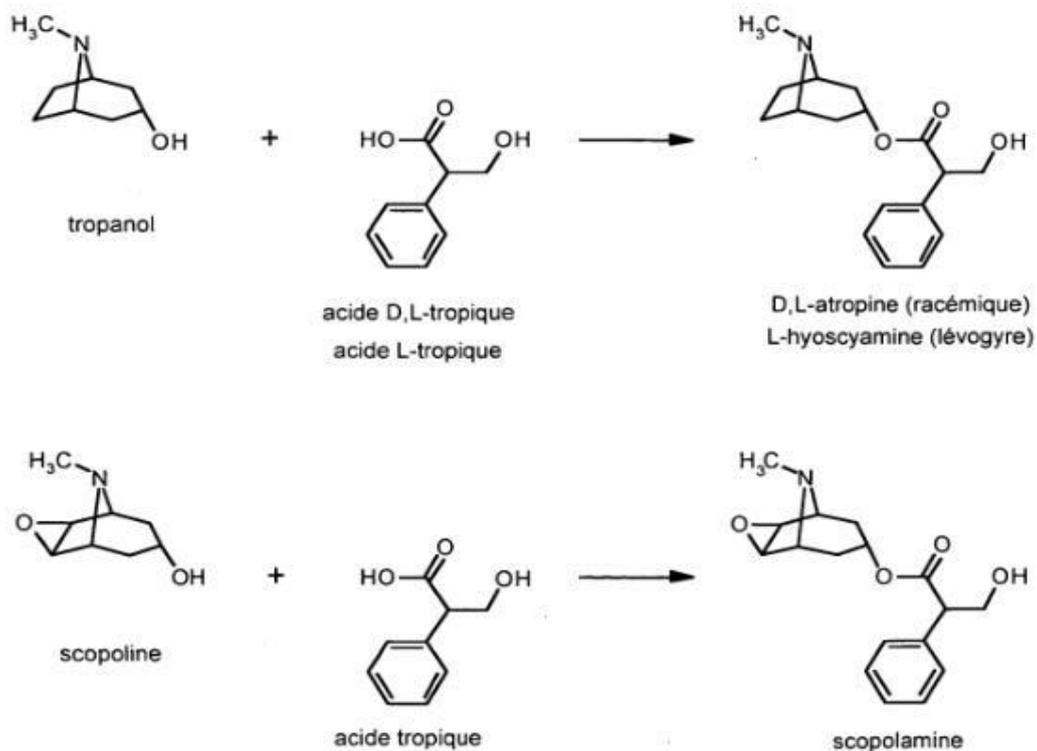


Figure 10: Synthèse de l'atropine, de l'hyoscyamine et de scopolamine à partir de l'acide tropique (Goullé et al., 2004).

### I.6. Intoxications provoquées par la belladone

Les symptômes causés par l'empoisonnement à la belladone peuvent varier en gravité de léger à modéré à sévère, selon la dose et la source. Les concentrations d'alcaloïdes présents dans les baies et les feuilles peuvent également varier d'une espèce à l'autre. Certaines espèces de belladone sont des hybrides et peuvent ne pas produire tous les symptômes du syndrome anticholinergique toxique (Berdai et al., 2012).

La répétition doit également être prise en compte lors de la détermination de la gravité des symptômes, car les effets centraux dépendent de la dose et de la source (Fidan et Kirpinar,2001 ; Joshi *et al.*,2003 ; Berdai *et al.*,2012). L'atropine traverse la barrière hémato-encéphalique, la perte de mémoire, la confusion, la désorientation chez les patients atteints du syndrome anticholinergique central, les hallucinations, l'incoordination motrice et délire excitateur dans la psychose aiguë (Joshi *et al.*,2003 ; Berdai *et al.*,2012).

Les cas graves de toxicité anticholinergique centrale peuvent se manifester par un coma, des convulsions et un collapsus respiratoire et cardiovasculaire (Joshi *et al.*,2003).

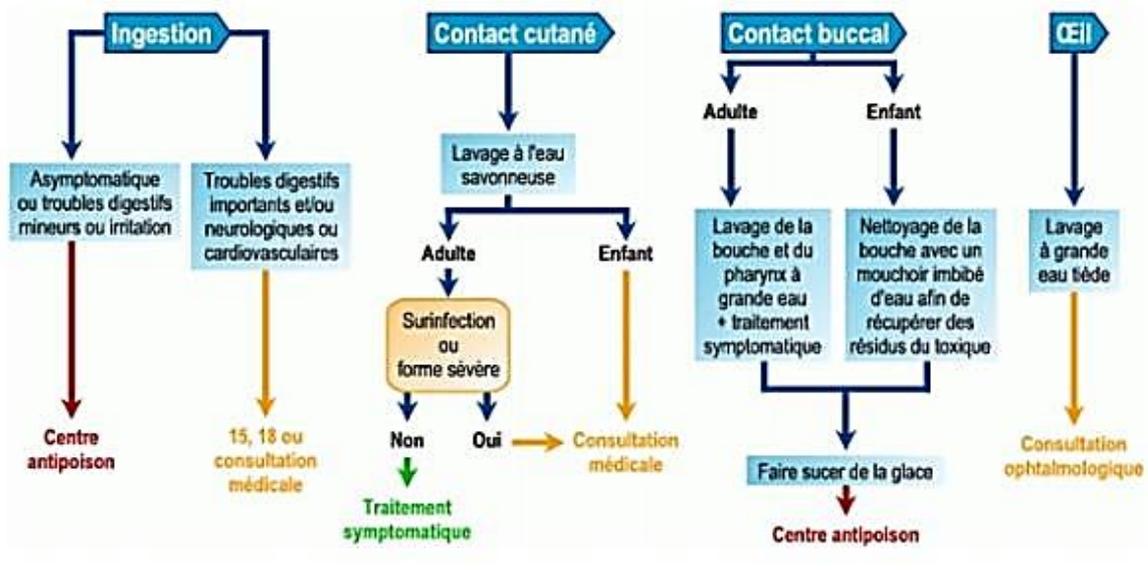


Figure 11 : Schéma représentant les différentes mesures à prendre face à une intoxication

Source : <http://floronet.pagesperso-orange.fr/gene/tox/tox2.htm#Conduite>

### I.7.L'utilisation traditionnelle

Selon (Ivancheva et Stantcheva,2000), les femmes utilisaient des extraits de cette plante en collyre pour dilater la pupille ce qui était considéré comme une caractéristique souhaitable à l'époque (Berdai *et al.*,2012), et utilisé également pour donner au teint un éclat rouge rosé sur les pommettes (Cikla *et al.*,2011). Les feuilles, les fleurs et les racines sont utilisées comme antispasmodique, ou utilisées pour soulager la maladie de parkinson (Ivancheva et Stantecheva ,2000).

### I.8.L'utilisations médicinales

En Europe, la plante mortelle de la morelle noire est utilisée depuis l'Antiquité pour traiter diverses affections respiratoires, par exemple, l'inhalation de la fumée des plantes en combustion peut soulager la broncho constriction (**Moulton et Fryer,2011**).

Les antagonistes muscariniques sont connus pour être utiles comme agent bronchodilatateur dans l'asthme. En raison de leurs effets secondaires, les médicaments anticholinergiques ne sont pas certains troubles cardiovasculaires tels que la bradycardie, bien qu'il ai été démontré que amo de l' atropine provoque une bradycardie (**Mirakhu et Dundee,1980**). .

L'atropine est également utilisée comme prémédication pour anesthésie avec d'autres médicaments anti cholinergiques. Parce qu'il réduit les sécrétions (**Mirakhu et Dundee ,1979**). Les alcaloïdes de la belladone sont anti émétiques, anti spasmodiques et également efficaces dans le traitement des ulcères gastro-intestinaux (**Mintzer et Burns,2000**) un traitement de première intention ; à la place, les agonistes bêta-adrénergiques et les corticostéroïdes anti-inflammatoires sont couramment utilisés chez les patients souffrant d'asthme et de MPO (**Mintzer et Burns,2000 ; National heart lung and blood institute,2007**). À la fin des années 1800, la belladone était utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson en raison de ses alcaloïdes naturels atropine et la scopolamine (**Adler,2008**).

### I.9.Culture et récolte

Cette espèce préfère:

- Sol bien drainé, léger et calcaire perméables conviennent mieux à la plantation.
- Le sol doit rester constamment humide.
- Exposition: elle pousse mieux en plein soleil à mi-ombre.
- Multiplication: elle se multiplier à partir de graines semées dans un sol plat, les graines prennent généralement de 4 à 6 pour germer. Une fois qu'elles ont germé et que les plants ont atteint environ un pouce de hauteur, vous pouvez les espacer de 18 à 20 pouces , arrosées après le repiquages et plantées de nombreux endroits.
- Propagation par bouturage: vous pouvez également propager la belladone en coupant les extrémités des branches vertes (**Rita et Animesh,2011**).

La belladone, est largement répartie sur les flancs des collines. La croissance de cette espèce est limitée entre 50 et 55 de latitude Nord et entre 100 et 200 mètres au-dessus du niveau de la mer, bien qu'elle puisse descendre jusqu'au niveau de la mer où les sols calcaires ont un bon drainage et beaucoup d'ombre. Les rendements peuvent être considérablement augmentés grâce à l'utilisation. Fumier ou mélange de nitrates, de soude, de scories alcalines et de kénitra. Les plantes de la première année mesurent généralement 50 cm de haut, fleurissent en septembre, à ce stade uniquement les feuilles sont récoltées. La deuxième année, la plante est entièrement récoltée, les racines, plus riches en alcaloïdes, sont séchées directement au soleil, au même titre que les feuilles, cependant, elles produisent de petites quantités alcaloïdes (Rita et Animesh,2011).

### I.2.Généralités sur la culture *in vitro*

#### I.2.1.Historique de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* est une technologie très récente car elle a été développée seulement au début du 19ème siècle (Jay-Allemand *et al*,1992). Les premiers travaux de culture *in vitro* sont dus à l'allemand **Haberlandt en 1902**. Il a obtenu de petits amas de cellules avec une survie améliorée pendant plusieurs mois sur le milieu de KNOP. Mais pas de multiplication cellulaires (Augé *et al*,1989).

Il a fallu attendre 1922 et les travaux de Rabais pour voir apparaître une croissance chez les pointes et racines isolées sur un milieu synthétique, mais la date qui marque réellement le début de la culture *in vitro* est l'année 1932 avec les travaux de White aux USA, sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racine de tomates.. Ce succès est certainement le point de départ d'un nouvel effort qui portera sur la culture des tissus végétaux.

En 1935, Gautheret cultive et fait multiplier des cellules de saule (*Salix*) à partir du cambium en introduisant de l'auxine dans le milieu, malheureusement, cela ne dépasse pas plus de 8 mois de culture (Morel,1952 ; Scriban,1988).

D'après d'autres travaux de White aux USA en 1932 sur le tabac, les travaux français de Nobecourt sur les carottes et les observations de l'absence de virus dans les méristèmes de tabac infectés par le virus publiées par Limasset et Cornuet en 1949.

En 1952, Morell et Martin profitent de ces observations pour cultiver *in vitro* les méristèmes de dahlia et de la pomme de terre atteints de maladies virales. Ils obtiennent des plantes

entières *in vitro* et les remettent en culture avec des résultats normaux et constatent que les témoins sont sains (Augé et al,1989).

### I.2.2.Rôle de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* est la culture de tissus ou de cellules dans des conditions totalement artificielles, applicable aussi bien aux plantes entières qu'aux fragments des plantes (tissus ou organes) et aux cellules isolées (Augé et al,1989).

C'est un ensemble de méthodes qui implique d'une part la stérilité (stérilisation du matériel, désinfection des explants) en utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés..), et d'autres part les conditions de croissance parfaitement maîtrisées (milieu, température, lumière, humidité) définis pour chaque type de plante.

Elle est utilisée à des fins de multiplication massive car elle permet à partir d'un seul individu (plante) d'obtenir un nombre considérables à la plante mère. Les plantes reproduites sont non seulement conformes mais présentent une grande uniformité (Ferry et al,1998).

### I.2.3.Les applications de la culture *in vitro*

Il existe deux voies principales de micro propagation :

- la première voie qui utilise le tissu du méristème (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires), après un développement normal, il est possible de produire des individus appelés micro boutures. Cette technique est souvent appelée "multiplication conforme" car elle commence par un méristème préexistant dans lequel les cellules sont génétiquement stables (Boxus ,1995). Les individus sont généralement obtenus par deux étapes successives, d'abord la production de tiges puis l'enracinement.
- la deuxième voie consiste à utiliser divers tissus différenciés (fragments de tige , de racine, pétioles, de feuilles, fragments d'embryons matures et immatures, hypocotyles, cotylédons, etc.) pour provoquer de néoformation soit de bourgeons ou de racines, ce qui est l'organogenèse, soit de structures semblable à la structure de l'embryon zygotique , c'est l'embryogenèse somatique (Zryd,1988 ; Margara,1989).

- **Organogenèse**

L'organogenèse est la néoformation d'organes, le terme est généralement utilisé pour décrire la formation des bourgeons mais s'applique également aux racines (Auge et al,1989) ;

(Simonin,2006). C'est la base fondamentale de la multiplication végétative et dépend de la formation de nouveaux méristèmes (Margara,1984).

Peut être réalisée soit par

- Voie directe, conduisant à une morphogénèse directe des tiges (caulogénèse) ou des racines (rhizogénèse), résultant en des semis viables qui peuvent progressivement s'adapter aux milieux naturels (Margara,1984).
- voie indirecte, qui passe d'abord par une callogénèse (la néoformation d'un cal, tissu cellulaire indifférencié), l'organogénèse se produisant plus tard après la repiquage (Margara,1984 ; Zrýd,1988).

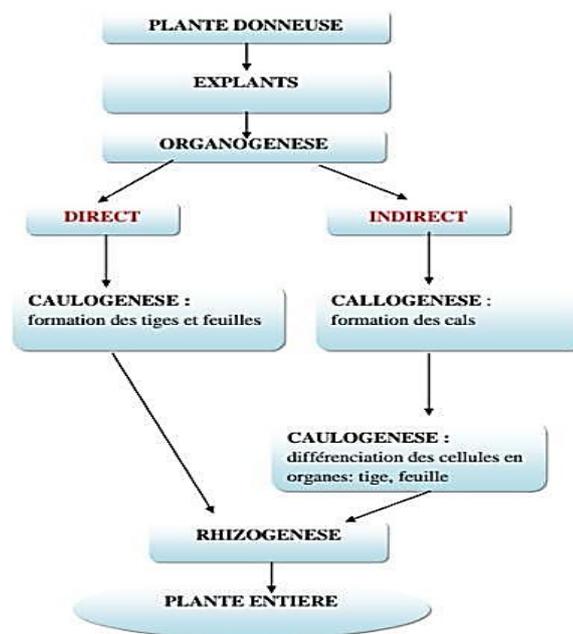


Figure 12 : Processus général de la micro-propagation à partir d'un explant à une plante entière.

source :Mohammedi,Ziraoui (2016).

#### I.2.4.Les conditions de la culture *in vitro*

- **Le milieu de culture** : l'explant doit trouver dans le milieu tout ce dont il a besoin pour survivre , se reproduire et éventuellement générer un nouvel individu ,en fait , tout ce que la plante-mère peut fournir :

Par les racines : les éléments minéraux, l'eau.

Par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés.

Les hormones, pour orienter la formation des organes (**Augé,1989**).

- **Les éléments minéraux** : Les différents éléments minéraux, principalement par leurs concentrations en sel, leurs exigences. Ces derniers varient avec l'espèce, la nature du tissu et son état physiologique, mais aussi avec la méthode de culture et type d'organogénèse.

Parmi les éléments nécessaires à la vie de la plante végétale, souvent on distingue les macro éléments (NPK) et les micro éléments « oligo-éléments ». (**Margara,1989**).

- **Les macroéléments** : Il interviennent en grande quantité. Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées telles que l'azote(N), le calcium(Ca), le potassium(K), le soufre(S), le magnésium(Mg) et le phosphore(P), ils sont absorbés sous forme d'ions (**Augé,1989**).
- **Les micro éléments** : Appelés parfois oligo-éléments, ils jouent un rôle essentiel dans les mécanismes enzymatiques comme activateurs ou constituants des coenzymes. Les principaux sont: le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn). À ces éléments sont associés les nickels (Ni), l'iode (I) et l'aluminium (Al). Le fer est apporté sous forme chélaté (Fe-EDTA) pour éviter sa précipitation (**Margara,1989**).
- **Les éléments organiques**
- **Les sucres** : Pour les tissus végétaux placés in vitro, une assimilation nulle ou insuffisante de la chlorophylle assure la survie et le développement des explants. Donc on ajoute des sucres (le plus souvent du saccharose) aux milieux pour fournir une source de carbone aux explants. Dans la nature, les sucres sont synthétisés à partir du gaz carbonique atmosphérique et de l'eau du sol (**Auge,1989**).
- **Les vitamines** : certaines vitamines favorisent la croissance tissulaire en culture in vitro, il n'est donc pas exclu qu'une carence en certains de ces vitamines puisse être un facteur limitant du phénomène d'organogénèse. Les plus couramment utilisés sont : la thiamine HCL, la pyridoxine, glycine (figure 3), la biotine, le pantothénate de calcium et le myo-inositol (des vitamines B) (**Gautheret,1977**).
- **Les acides aminés** : Il a été observé parfois que l'apport d'acides aminés favorise la prolifération cellulaire (**Augé,1989**).
- **Les régulateurs de croissances** : Les régulateurs de croissance, également appelés (phytohormones), sont définis comme des substances qui, selon leurs concentrations absolues ou relatives dans le milieu, peuvent dans certaines conditions inhiber, permettre ou altérer le processus de différenciation (**Vidalis et al,1989**).

Avec la découverte de ces substances (auxines, gibbérellines, cytokinines, acide abscissique, éthylène), ces substances de croissance sont naturellement présentes dans toutes les plantes cependant nous avons pu synthétiser artificiellement des molécules ayant les mêmes propriétés. Les hormones les plus couramment utilisées sont principalement :

- les auxines.
- les cytokinines.

Car ces hormones peuvent guider les explants pour former de nouveaux organes. Les milieux ainsi constitués sont liquides et doivent être solidifiés en ajoutant un agent gélifiant pour empêcher les explants de tomber au fond du récipient et s'asphyxier (Fredj,2007).

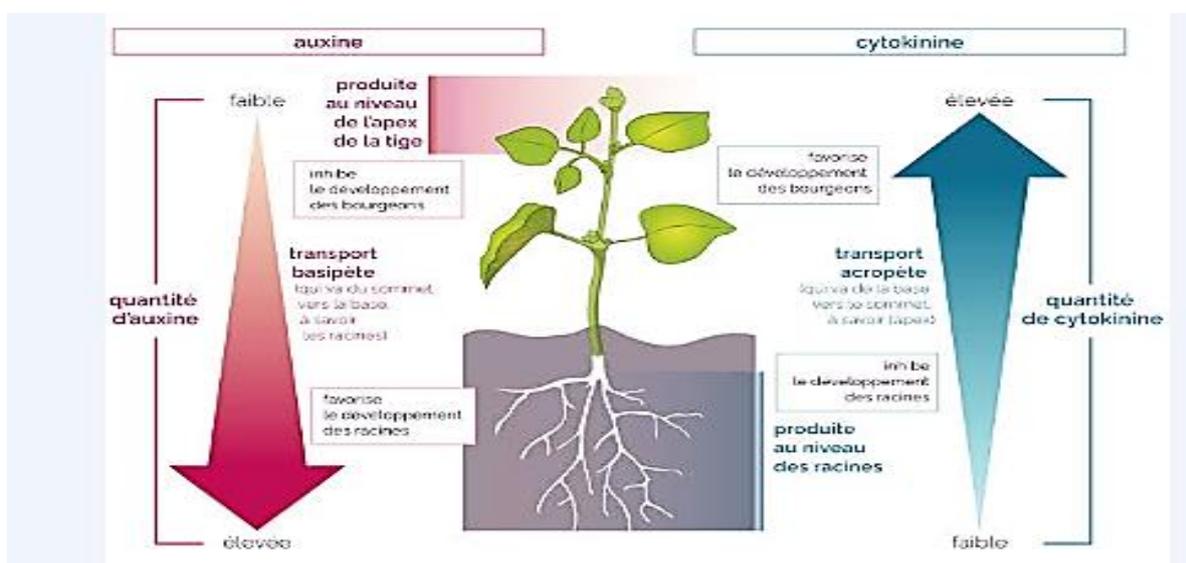


Figure 13 : Effet de l'auxine et des cytokinines sur l'organogènes

## • L'effet de l'explant

**.l'âge physiologique :** de manière générale, en culture in vitro, on favorise l'utilisation de jeunes explants (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes, ct), car l'état juvénile semble offrir le plus grand potentiel de régénération. Ce type de tissu est considéré comme compétent en raison d'une bonne performance ou capacité à se régénérer (Saadi ,1991).

**.L'époque de prélèvement :** ce problème est particulièrement vrai pour les espèces où l'on peut distinguer les stades de vie actifs et lents des plantes, ce qui conduit à des réponses différentes des explants en culture in vitro ,différences qui peuvent s'expliquer par des équilibres internes des régulateurs de croissance pour différentes saisons(Augé et al ,1989).

### I.2.5. Avantages de la culture *in vitro*

- Conservation des ressources génétiques végétales et constitution de banques génotypiques pour la possibilité de plantation hors saison de croissance (Lé et al, 2002) .
- L'amélioration de l'assainissement grâce aux techniques de culture de méristèmes *in vitro* est souvent associée à l'éradication des virus (Sibi, 1981) .
- La reproduction végétative d'une espèce qui ne déploie pas ses capacités dans des conditions conventionnelles (Sibi, 1981) .
- Multiplication rapide, cette dernière étant due à l'augmentation de la propagation cellulaire par ces techniques (Smith et al, 1985 ; Collet et Lé, 1988).
- L'obtention de plantes saines, indemnes de maladies.
- Avec cette technique on peut programmer les cultures tout au long de l'année (Augé et al, 1989).
- L'intérêt économique : coût d'entretien du pied mère moins important, durée de récolte courte.

### I.2.6. Les inconvénients

**.l'asepsie des explants :** la présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, peuvent contaminer la culture et tuent les Jeunes plantules.

**.L'acclimatation :** l'étape d'acclimatation est l'un des facteurs limitant de la culture *in vitro*, la mortalité des plantes peut être élevée à ce stade en raison des conditions *in vitro*.

**.L'apparition d'anomalies génétiques :** (certains cas d'hyper floraison, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux) : c'est la variation soma clonale (Lachachi, 2010).

**.Le problème de vitrification (anomalie physiologique) :** qui peut affecter les plants régénérés.

**.La production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) :** peut entraîner la perte des gènes souhaités, tels que les gènes de résistance aux maladies nouvelles.

**.L'exigence de main-d'œuvre qualifiée (Belguendouz, 2011).**

### I.2.7. Les milieux de cultures couramment utilisés

Les laboratoires de culture de tissus et de cellules végétales utilisent une variété de milieux. Ces milieux varient en composition, dont les plus connus sont :

**.Milieu de Murashige et Skoog (MS 1962)**

Selon (Evans et al,1981), des milieux de culture de basaux de type de Murashige et Skoog (MS) ont été utilisés dans 70% des cas. Le milieu MS a été utilisé de manière générale pour tous les types de culture *in vitro*. Mais c'est essentiellement pour déclencher l'organogenèse, notamment pour la néoformation de bourgeons qui s'est révélé nettement supérieur aux autres milieux (Margara,1989).

Le milieu de Murashige et Skoog se caractérise principalement par une très forte teneur en sels minéraux, notamment de potassium et une concentration également élevée en azote (sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 est disponible sous forme réduite (Ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ; le rapport nitrate/ammonium, dans ce milieu est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique (Delvesco et Guerra,2001).

### **.Milieu de White (WH) ,1963**

Ce milieu caractérisé par de très faibles concentrations d'azote et de potassium, qui ne sont pas en rapport avec une bonne croissance des cals et des cellules végétales. Les chercheurs doivent varier de manière appropriée les concentrations de ces deux derniers éléments d'une manière appropriée au type de plante testée.

### **.Milieu de Gamborg, et al., (B5), (1976)**

Ce milieu a d'abord été utilisé pour la culture des cellules végétales de soja, et se caractérise par le fait qu'il ne contient qu'une forte proportion de nitrate et de potassium. Il est utilisé après avoir ajouté (2,4-D) dans l'environnement pour stimuler la prolifération cellulaire rapide (Sharhabach ,2009).

# **CHAPITRE II**

## **MATERIEL ET METHODES**

Cette étude a été réalisée au Département de foresterie et protection de la nature, au sein du Laboratoire de recherche sur les Ressources Génétiques et Biotechnologies (LRGB), de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El Harrach, Alger, Algérie.

Le présent travail est une contribution dans le cadre d'un projet de recherche à impact socio-économique (PISE) financé par la DGRSDT et d'une thèse de Doctorat de Mme Dali-zemih N ( Doctorante à l'ENSA).

### II.1.Objectif du travail

L'objectif de notre travail est de :

- Induction de la callogenèse en vue de régénérer des plantes transgéniques *D'Atropa bella-donna L.* à partir des chevelus racinaires induits par l'*Agrobacterium rhizogenes* en appliquant la technique de micropropagation .
- la multiplication des microboutures *D'Atropa bella -donna L* en vue de la production en masse et rapide des plantules utilisables.
- la production de la biomasse des chevelus racinaires dans un milieu liquide.

### II.2.Matériel végétale

Le matériel végétal de départ pour entamer notre expérimentation, est constitué de chevelus racinaires d'*Atropa bella-donna .L.* obtenus à l'issue des travaux de recherche de Mme Dali-zemih N (doctorante à L'ENSA) deux souches de l'*Agrobacterium rhizogenes* ( la souche 15834 et A4) et trois lignées sont utilisées dans notre travail (en parlant de lignées sélectionnées au niveau du laboratoire) .

La multiplication de ces trois lignées est faite, chaque mois, par mise en culture d'explants( bout de chevelus racinaire de 5cm) sur un milieu de culture solide B5 (**Gamborg et al 1968**), additionné de 7.5 g/ L d'agar et 30 g/L de saccharose. Les cultures sont placées dans la chambre de culture à une température de  $25 \pm 2$  °C, et à l'obscurité totale.

### II.3.Mise en culture

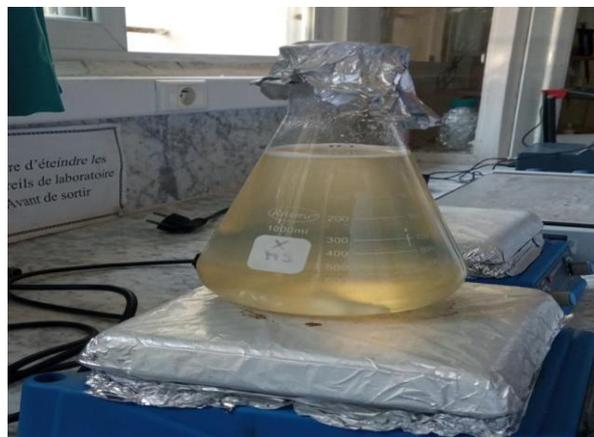
Durant toute l'expérimentation, le milieu de base utilisé est celui de B5 (**Figure 13** ).

#### .Préparation de milieu B5

(voir **Annexe 1**) pour la composition chimique

- La première étape : préparer les solutions mères de macro et micro-éléments, de la vitamine et de Fer(**Annexe2**).
- La deuxième étape : préparer 1L de milieu B5 dans un Erlenmeyer de (1000 ml) verser quelques ml d'eau distillée ensuite verser :
  - 50 ml des macroéléments

- 10 ml des micro-éléments
- 10 ml de vitamines
- 10 ml de Fer
- Ajuster avec l'eau distillée jusqu'au 1L
- Ajouter de 30 g de saccharose
- Placer la solution sur l'agitateur magnétique pour l'agitation
- Ajuster le PH (5,6-5,8) **Annexe 3**.
- Ajouter 7,5 g d'agar-agar avec l'agitation.
- Autoclaver le milieu à 120°C pendant 20 minutes, sous une pression de 1Bar.



*Figure 14 : 1 litre de milieu de culture B5 préparée.*

- Se laver soigneusement les mains, puis les désinfecter avec l'alcool.
- Allumer la hotte et désinfecter le plan de travail avec l'hypochlorite de sodium puis par l'éthanol.
- Placer le bec benzène au centre du plan de travail et l'allumer pour avoir une flamme bleue.
- Tous les instruments métalliques (Pincettes, scalpels, bistouris) sont mis dans l'étuve à une température de 170° à 180°C pendant 1 heure, l'utilisation de ces instruments se fait sous une hotte stérile (**Annexe 3**).

### **II.4. Induction des cals (Callogenèse)**

Après un mois de culture dans des boîtes de pétri (dans des conditions stériles). Les chevelus racinaires de deux lignées *D'Atropa bella-donna .L* ont été coupés à raison d'un centimètre sous hotte à flux laminaire afin d'obtenir des explants, puis, les placés sur le milieu B5

supplémentés de saccharose (30 g/L), d'agar (7,5 g/L) et de différentes concentrations de régulateur de croissance (ANA).

- Puis ont été répartis sous hotte en raison de 25 ml dans chaque boîte de pétri.
- 5 explants (à raison d'un centimètre) ont été inoculés dans les différents traitements préalablement préparés dans chaque boîte de pétri(**Figure15**).
- Ensuite on ferme les boîtes hermétiquement clos à l'aide d'un parafilm pour éviter les contaminations après la mise en culture.
- Pour chaque traitement, 20 explants sont utilisés .Puis ont été incubées dans l'obscurité à une température de  $25 \pm 2C^{\circ}$  sous une photopériode de 16 heures par jour/08 heures d'obscurité pendant 1 mois. A chaque fois on élimine les boîtes contaminées qui apparaissent.

*Tableau 2 : les différentes concentrations de l'ANA testées pour l'induction de la callogenèse à partir des chevelus racinaires d'Atropa bella-donna.L en photo 15: Des explants d'Atropa bella-donna.L placés dans le milieu de culture B5 afin d'obtenir des cals .*

Traitement (ANA)	Concentrations (mg/l)	
T0 (Témoin)	0	
T1	0,25	
T2	0,5	
T3	0,75	
T4	1	

### .Les observations réalisées

Après 6 semaines de culture, les observations ont porté sur :

-Le taux d'induction de la callogenèse (en pourcentage) représente le nombre total d'explants présentant un début de callogenèse par rapport au nombre total d'explants inoculés.

- La surface des cals.
- la texture et la couleur des cals.

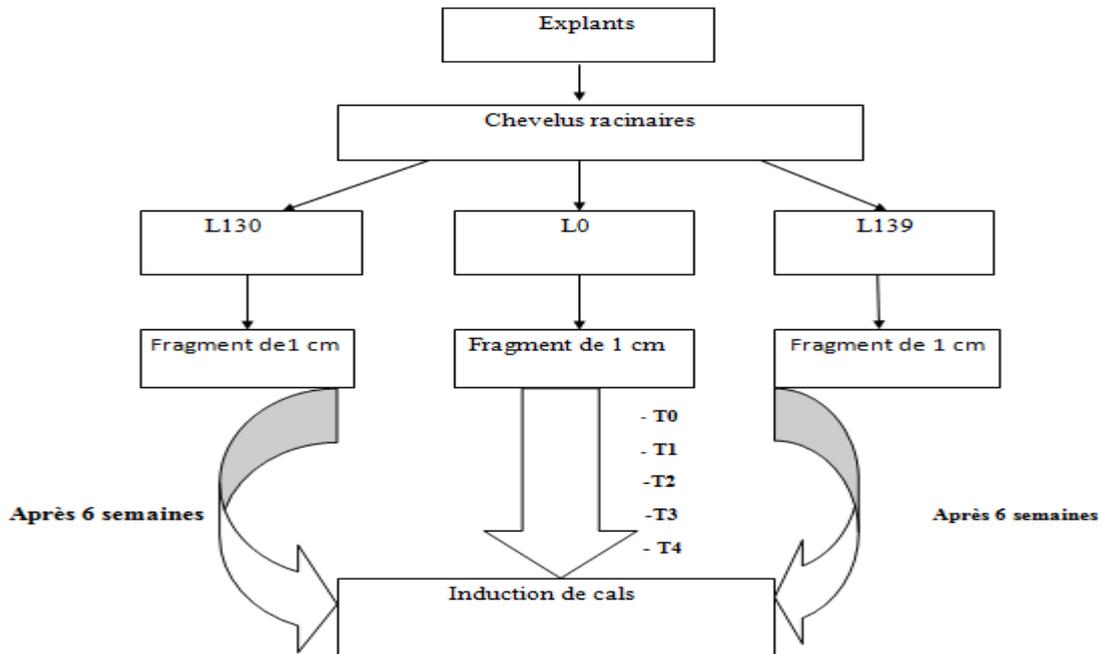


Figure 16 :Schéma représentant le protocole adopté pour l'induction des cals .

### II.5.Multiplication par bourgeonnement axillaire

Dans un premier temps, les différentes boutures stériles sont prélevées des vitrosemis (germinations obtenus *in vitro*) sont découpées dans une boîte en verre stérile sous hotte à flux laminaire avec la présence de deux feuilles qui sont liées par un nœud ,chaque bouture est introduit dans les tubes à essai et des bocaux en verre contient 20 ml de milieu B5 additionné de 7,5 g/L d'agar ,de 30g /L de saccharose et différentes concentrations hormonales : AIB, BAP, ANA, puis on ferme les tubes à l'aide des cotons pour éviter les contaminations après la mise en culture.

Ces cultures sont placées dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 2C^{\circ}$  sous une photopériode de 16 heures par jour et 08 heures d'obscurité.



*Figure 17 : le matériel végétal initial stérile et fragmenté en micro boutures.*

*Tableau 3 : les combinaisons hormonales utilisées pour la multiplication.*

Traitements	(BAP/AIB) mg/l	(BAP/ANA) mg/L
<b>T0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>T1</b>	<b>0.5/0</b>	<b>1/1</b>
<b>T2</b>	<b>0.5/0.5</b>	<b>1/1</b>
<b>T3</b>	<b>0.5/0.12</b>	<b>1/1</b>
<b>T4</b>	<b>0.5/0.25</b>	<b>1/1</b>
<b>T5</b>	<b>0.5/0.75</b>	<b>1/1</b>

### . Les observations réalisées

Après 6 Semaines, Les observations ont porté sur :

- Le taux de multiplication(le nombre de nouvelles feuilles).
- La morphologie des racines néoformées.

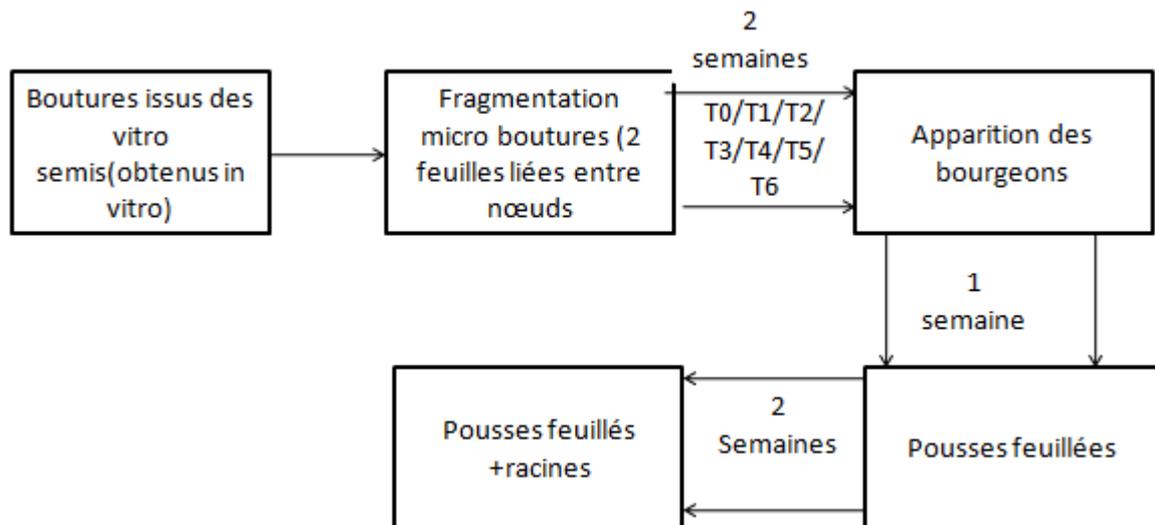


Figure 18 :Schéma général de la multiplication par bourgeonnement axillaires.

## II.6.la production de la biomasse des chevelus racinaires dans le milieu liquide

Pour la croissance des chevelus racinaires (Crs) dans le milieu liquide 0,1 g de poids frais des deux lignées de Crs à savoir la L0 et L 139 (4 racines non ramifiées de 3 centimètre) sont introduits dans des erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml de milieu de culture B5, supplémentés de 30g /L de saccharose . Pour chaque lignée 8 erlenmeyers sont utilisés (8 Répétitions) **Figure 19**.

Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8.la culture est conduite dans l'obscurité avec une vitesse d'agitation à 100 rpm et à température de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A la fin de chaque essai les Crs sont lavés à l'eau distillée pour éliminer le reste du milieu de culture, séchés au papier buvard ,puis pesés pour prendre le poids frais.la mesure du poids sec est réalisée 48 h après dessiccation des crs dans l'étuve à une température de  $45^{\circ}\text{C}$ .



Figure 19: les racines transformées cultivées dans le milieu B5 liquide .

### .Les observations réalisées

ont été porté sur :

- La surface des racines.
- La vitesse moyenne de la croissance en cm.
- Les ramifications (estimation visuelle).
- Le poids frais et le poids sec des Crs exprimé en gramme.

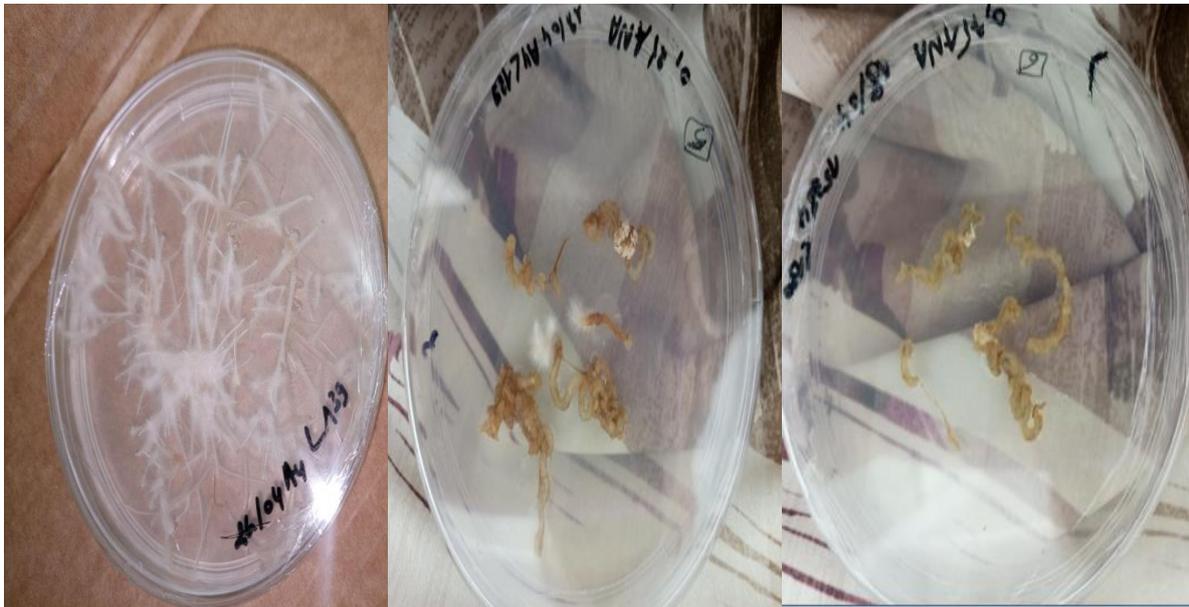
**CHAPITRE III**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSION**

# 1. RESULTATS

## III.1. la Callogenèse

### III.1.1.Effet du traitement hormonal sur l'induction de callogenès

L'induction de callogenès est réalisée à partir des chevelus racinaires de deux lignées. Une réactivité, visiblement, différente entre les explants des deux lignées s'est manifestée dès le 15ème jour de culture, et s'est déterminé par un gonflement total ou partiel des explants (**Figure20**). À partir du 16ème jour, des structures de couleur blanchâtre au niveau des explants réactifs ont été observées, indiquant l'initiation de la dédifférenciation cellulaire, en donnant par la suite des cals de nature friable ou compacte. Sur les explants témoins (milieu sans hormones), aucun changement n'a été remarqué, ni gonflement des explants, ni formation de cals proprement dits.



*Figure 20 : Réactivité des explants de chevelus racinaires Crs mis en culture sur le milieu de callogenèse après 40 jours de culture pour deux lignées .*

*Photo 1 : aspect des Crs en T0 Photo 2 : Aspect des Crs lignée L139 après 40 jours de culture*

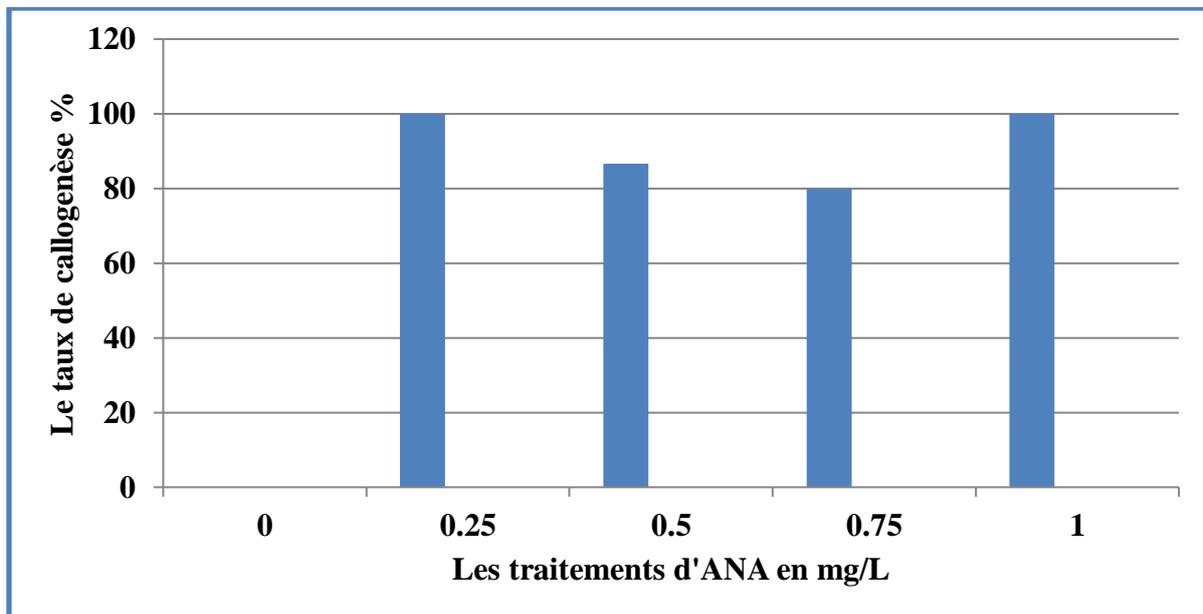
*Photo 3 : Aspect des Crs lignée L130 après 40 jours culture .*

### III.1.2.Le taux d'induction de la callogenèse

Les milieux testés avec les différentes balances hormonales ont induit la formation des cals à partir des explants (chevelus racinaires : Crs).

La **Figure 21** illustre les résultats de l'effet du traitement hormonal sur le taux de callogénèse induite avec des explants de chevelus racinaires des trois lignées après six semaines de culture. Le taux de callogénèse varie en fonction de la concentration de l'hormone appliquée

(ANA). Les Crs ayant subi une faible concentration hormonale (0.25 mg/l) et une forte concentration hormonale de 1 mg/l, sont celles ayant induit plus de taux de callogénèse de 100% que les traitements intermédiaires (0.5 et 0.75 mg/l) en donnant un taux d'induction de cal de 80% et 86.66% respectivement. Tandis que le milieu de culture dépourvu d'hormone se solde par une absence totale d'activité cellulaire.



*Figure 21: l'effet du traitement hormonal sur le taux de callogénèse induite avec des explants de chevelus racinaires des trois lignées après six semaines de culture.*

### **III.1.3.Surface des cals**

La surface des cals est estimée à chaque semaine de culture sur le milieu de callogénèse. Cette surface peut déterminer le meilleur traitement hormonal testé et la meilleure lignée qui correspond à une bonne callogénèse.

Les cals des trois lignées L0, L130 et L139 présentaient initialement au départ les mêmes longueurs (3 cm) et les mêmes surfaces (3x 0.2).

Les meilleurs surfaces de cals ont été obtenus sur le milieu contenant 0.25 mg/l, est le plus intéressant (0.25 mg/L d'ANA + la lignée L139 qui a été utilisée) dont la surface moyenne des cals est de 250.9 cm<sup>2</sup>.

Autrement, les traitements T2 qui contient (0.5 mg/L d'ANA la lignée L0 qui a été utilisée) et T4 qui contient (1 mg/L d'ANA la lignée L139 qui a été utilisée) sont aussi intéressants, dont la surface moyenne des cals est de 199.37 et 187.69 cm<sup>2</sup> respectivement. Cependant, la surface le moins intéressante est représentée par le traitement T3, qui contient (0.75 mg/L d'ANA la lignée L130 qui a été utilisée) avec surface moyenne des cals ne dépassant pas les 131.56 cm<sup>2</sup>.

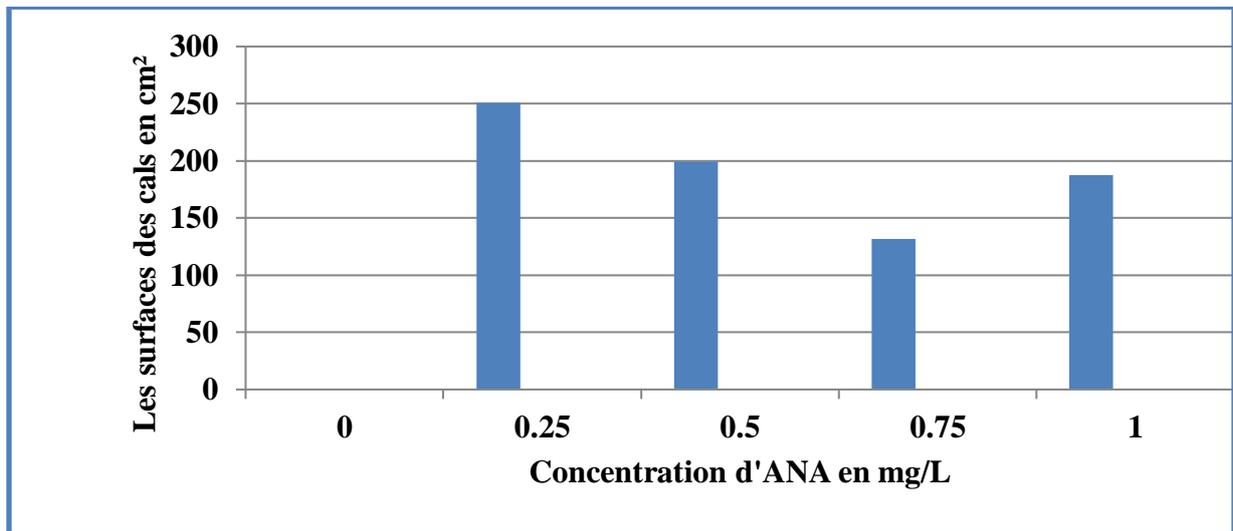


Figure 22 :L'évolution de la surface moyenne des cals en fonction du temps et des milieux testés.

### III.1.4. Couleurs et textures des cals

En plus des caractères liés à la croissance, les cals obtenues diffèrent aussi par leur coloration et leur texture. Cependant le type et la couleur de cal dépendent directement selon le type d'hormone utilisée, Ainsi deux types de cals ont été observés :

- Cals friables, translucides et rarement durs et de couleur souvent blanche, souvent ce type de cals sont recherchés pour l'induction de l'embryogenèse somatique.
- Cals compacts, de couleur beige ou brune finissant le plus souvent par dégénérer.

### III.2. La multiplication

Elle consiste à favoriser l'apparition de pousses axillaires, qui seront à leur tour fragmentées et multipliées. Cette phase, permet de multiplier de façon indéfinie le matériel de départ en culture *in vitro*, en vue d'amortir le prix de la culture primaire sur un grand nombre de copies. Cette étape, la plus importante, simplement parce que le coefficient de multiplication est le critère économique majeur en vue d'une propagation à des fins commerciales (Sbay et Lamhamedi).

### III.2.1. Influence des régulateurs de croissance

En l'absence des traitements, les micro-boutures *d'Atropa bella-donna* n'émettent pas de racines, de feuilles ou de bourgeons. Par contre l'application des deux auxines (AIB et ANA) a eu un effet promoteur sur la rhizogenèse des micro-boutures de *l'Atropa bella-donna* et l'application de BAP favorise la multiplication des pousses axillaires feuillées.

### III.2.2. Le taux de multiplication

Après 7 jours les formations des bourgeons néoformés sont apparus, tous les traitements utilisés provoquent une réaction morphologique exprimée par un gonflement des bourgeons axillaires et qui présentent des feuilles chlorophylliennes. Le taux de multiplication varie d'une concentration à l'autre selon les six différents traitements :

Le traitement T0 (sans hormones) : Aucun changement sur les deux feuilles qui ont été cultivées au début de l'expérience.

Le traitement T3 contenant (0.5 mg/L de BAP et 0.25 mg/L d'AIB) est moins favorable à la formation des bourgeons et de nouvelles feuilles à des taux moyen faibles 1,98% , et de nombre de nouvelles feuilles moyen faibles 6,75.

Les traitements T1, T4, T5, T6 supplémentées (0.5 mg/L de BAP et 0 d'AIB) ;( 0.5 mg/L de BAP et 0.5 mg/L d'AIB) ;(0.5 mg/L de BAP et de 0.75 mg/L d'AIB) ;(1 mg/L de BAP et 1 mg/L d'ANA) ont été à l'origine des résultats intermédiaires avec des taux moyen et nombres des feuilles différentes respectivement :M1 3,71%,12,62 /M4 2,41% 8,12 /M5 3,13%,10,87/M6 2,23%,7.

Le traitement T2 additionnée (0.5 mg/L de BAP et 0.12 mg/L d'AIB) a donné également une multiplication et formation des feuilles assez important avec des taux moyen plus élevés et de nombre de feuilles élevés 4,49%,14,25 et l'apparition des racines caractérisées par des poils blanchâtres(Figure 23) .

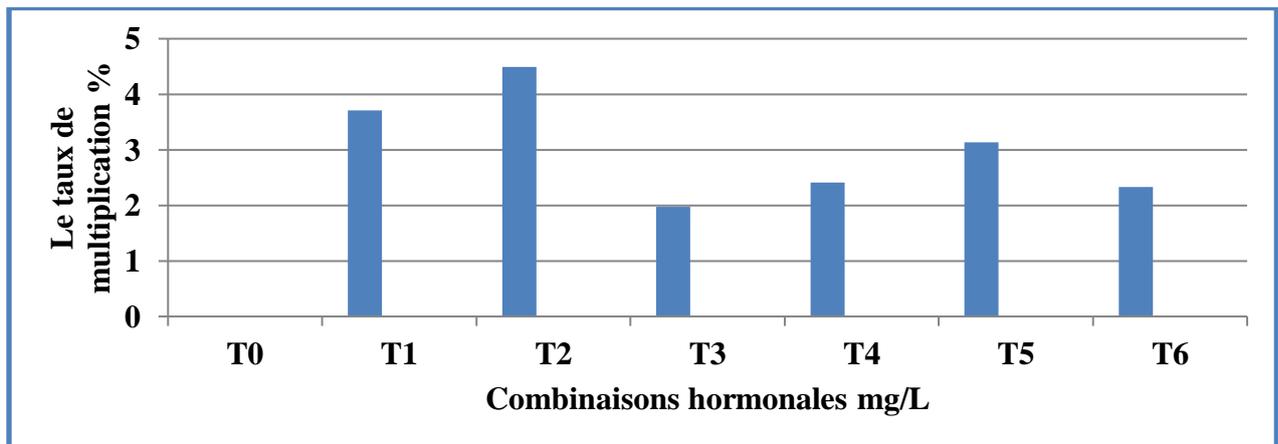
Et par d'autre côté, aucune racine n'est apparue dans les traitements T1 et T6 (l'absence totale des racines) et dans D'autres milieux: l'absence et la présence des racines varient selon le tableau.



Figure 23 : des boutures obtenus dans le milieu M2 (0.12 D'AIB + 0.5 BAP mg/L) Après 4 semaines de culture.

**Tableau 4 : Représente les observations de l'effet des régulateurs de croissance sur le nombre des feuilles et la morphologie des racines néoformées après un mois de culture.**

Répétitions	Les concentrations des combinaisons hormonales (mg/l)	Le nombre de nouvelles feuilles après n jours de culture				La morphologie des racines néoformées
		7 jours	14 jours	21 jours	28 jours	
8	(AIB/BAP) 0/0,5	3,12	5,62	9,62	12,62	Pas de racines formées
8	(AIB/BAP) 0,12/0,5	2,37	6,62	11,87	14,25	Racines avec des poiles blanchâtres
8	(AIB/BAP) 0,25/0,5	1,12	2,75	5,25	6,75	Pas de racines formées/ des racines translucides
8	(AIB/BAP) 0,5/0,5	1	3,25	7	8,12	Des racines translucides
8	(AIB/BAP) 0,75/0,5	1,62	3,5	9,12	10,87	Racines avec des poiles blanchâtres/des racines translucides
8	(BAP/ANA) 1/1	1,62	3,12	6,12	7	Pas de racines formées



**Figure 24 : Représente les taux de multiplication de chaque concentration hormonale.**

### III.3. La production de la biomasse des chevelus racinaires dans le milieu liquide

#### III.3.1. La surface des chevelus racinaires

La surface des Crs est estimée chaque 10 jour de culture. Cette surface peut déterminer la meilleure lignée pouvant offrir une bonne croissance de la biomasse racinaire et une bonne ramification.

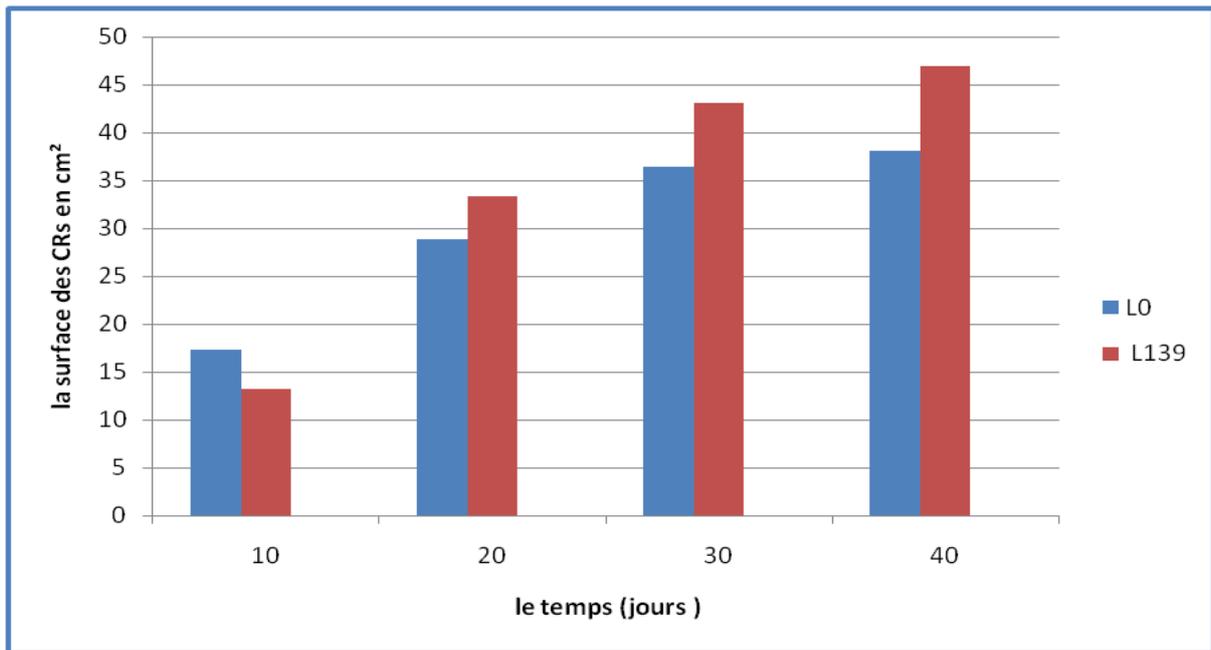
Les crs des deux lignées L0 et L139 présentaient initialement au départ la même quantité de biomasse introduite qui était de 0.1g.

La surface des crs la plus intéressante est représentée par la lignée L139 dont la surface moyenne des crs est de 46.86 cm<sup>2</sup>.

La surface le moins intéressant est représentée par la lignée L0 avec surface moyenne ne dépassent pas 38.09 cm<sup>2</sup>.

*Tableau 5 : représente la variation de la surface, vitesse et le degré des ramifications après 40 jours.*

La lignée	La surface en cm <sup>2</sup>	La vitesse en cm/10J	Les ramifications
L0	<b>38.09± 6.54</b>	<b>4.5± 1.5</b>	Peu ramifiée
L0	29.81± 15.81	3.5 ±2.5	Peu ramifiée
L0	31.31± 11.92	4± 3	Ramifiée
L0	30.95 ±17.26	4± 1	Ramifiée
L0	32.02± 10.67	4± 1.5	Très Ramifiée
L0	35.62± 10.23	3 ±1.5	Ramifiée
L0	16 ±1.46	3± 1.5	Très ramifiée
L0	16 ±15.17	4 ±1	Ramifiée
L139	38.09± 10.31	3± 1	Très ramifiée
L139	42.97± 6.98	3± 1.5	Très ramifiée
L139	36.35± 6.86	3 ±2	Très ramifiée
L139	37.76±7.02	2.5 ±0.5	Très ramifiée
L139	43.01±10.47	3± 2.5	Très ramifiée
L139	35.08±6.63	2± 1	Très ramifiée
L139	46.62 ±13.26	5 ±1.5	Très ramifiée
L139	<b>46.86±9.75</b>	<b>5± 1.5</b>	Très ramifiée



*Figure 25 : évolution de la surface moyenne de La lignée L0 et l 139 en fonction du temps.*

### **III.3.2. La vitesse moyenne de croissance**

Les courbes de croissance obtenues peuvent être décomposées en deux phases de développement :

La première phase à partir du dixième jour jusqu'au quarantième jour: c'est la phase d'adaptation des deux lignées aux conditions de culture où nous avons enregistré une augmentation relative de la vitesse de croissance des deux lignées.

La deuxième phase est la phase stationnaire de croissance caractérisée par une vitesse constante. Elle commence au 40ème jour pour les deux lignées.

La lignée L139 est caractérisée par une vitesse de croissance élevée variant entre 1.5 et 5 cm/jour. Cependant, la lignée L0 enregistré une croissance moyenne moins importante par rapport à la lignée L139 varie entre 1.5 et 4.5 cm/jour.

Du point de vue morphologique, nous avons noté que les crs de la lignée L139 sont épais et sont de couleur blanchâtre alors que les crs de la lignée L0 sont fins et ont un aspect translucide.

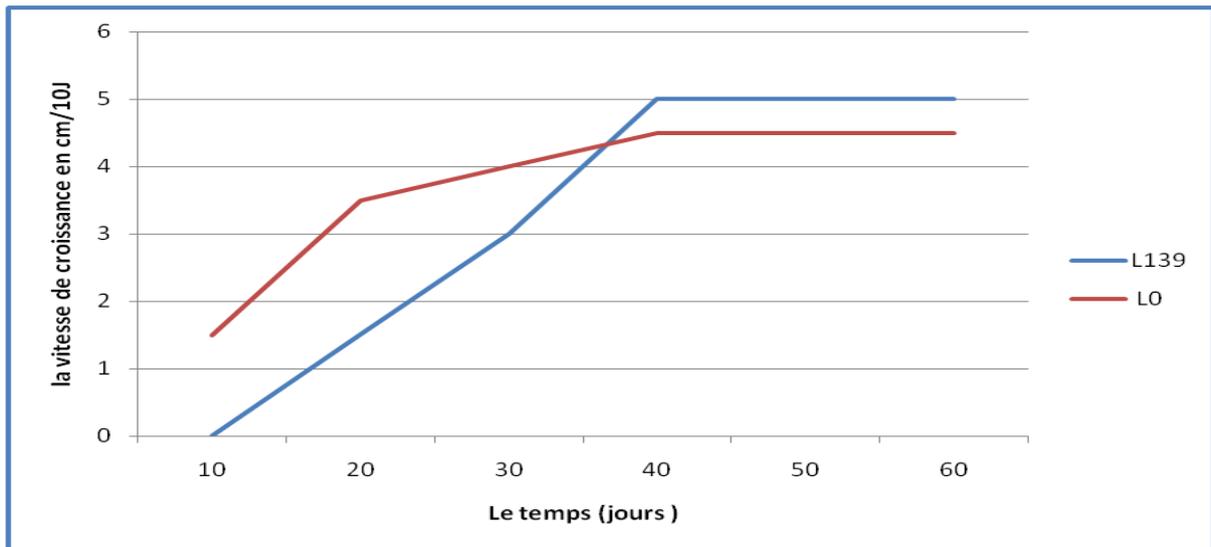


Figure 26 : Cinétique de la vitesse de la croissance en fonction de temps.

### III.3.3. Le poids frais et le poids sec des chevelus racinaires

#### III.3.3.1. Le poids frais

Ce paramètre illustre la production de la biomasse (**Figure 27**), Après 40 jours de culture sous agitation des 2 lignées cultivées dans le milieu de culture B5, le poids frais moyen le plus important sont obtenue avec la lignée L139 a été de **6,69g** dans 50 ml de milieu de culture B5. Cependant, dans la lignée L0, le poids frais obtenu a été de **3,91 g** dans 50 ml de milieu de culture B5 aussi. Sachant que la quantité des crs introduite au départ dans chaque erlenmeyer est la même pour les deux lignée.

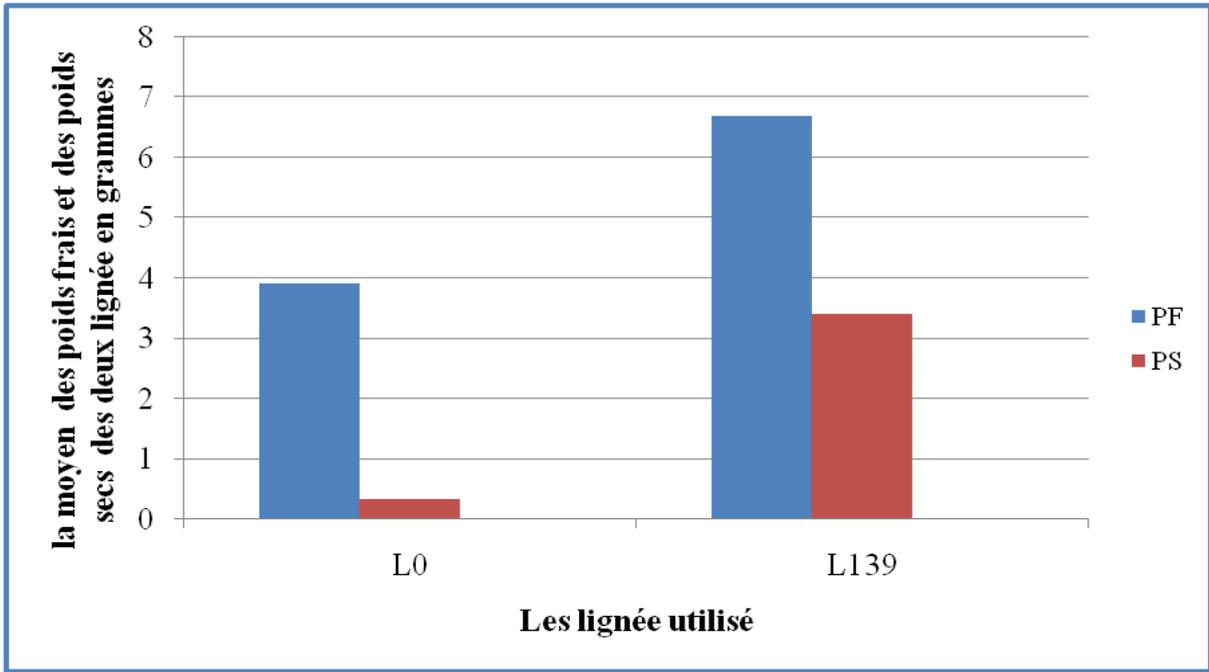
#### III.3.3.1. Le poids sec

Après le séchage des crs la lignée L139 donne les poids sec les plus intéressants sont respectivement de **3,41g** contenu dans 50 ml de milieu de culture.

Par contre, la lignée L0 donne les poids sec les moins intéressants sont respectivement de **0,33 g** contenu dans 50 ml de milieu de culture.



Figure 27: les deux lignées cultivées dans le milieu B5 Après un mois de culture.



*Figure 28 : les poids frais (PF) et les poids secs (PS) de la lignée L 139 et L0 obtenue après 6 semaines de culture*

## 2. DISCUSSION

### III.1. Initiation de la callogenèse

Plusieurs chercheurs ont étudié l'induction de callogenèse (**Kalidass et al,2010; R.Singh et al,2011; A.K.Verma et al,2012; Haq et al,2013; Aslam et al,2014; Sandhya et al,2016**). Dans notre étude, l'induction et la croissance des cals ainsi que leurs aspect demeure un objectif prépondérant pour induire la formation des embryons somatiques et donc produire des plants ayant de grande capacité de production de métabolites secondaires

### III.2. Induction de callogenèse

Selon (**George et al,2008 ; Afshari et Kalantari,2011**). La callogenèse passe par trois étapes de développement : la première phase est l'induction de la division cellulaire, puis la dédifférenciation qui est une période de division cellulaire active au cours de laquelle des cellules différenciées des explants perdent toutes caractéristiques spécialisées, enfin, la dernière étape est la période pendant laquelle la division cellulaire diminue ou cesse : C'est la différenciation cellulaire augmente au niveau du cal . Dans notre étude, l'induction de la callogenèse a été réalisée à partir de chevelus racinaires de trois lignées d'*Atropa bella-donna*, L0, L 139 et L130 en utilisant 4 traitements avec des concentrations d'auxine .

D'après nos résultats, les chevelus racinaires des 3 lignées testées. Ainsi que la fréquence d'apparition des cals est variable selon la lignée cultivée et aussi selon les traitements hormonaux appliqués. Les meilleurs résultats sont enregistrés avec la lignée L139 et avec le traitement T1 et T4 qui correspond à une concentration de **0,25 et 1 mg/L** de l'auxine ANA respectivement, avec un taux de **100%** par rapport les traitements T2 et T3 avec un taux respective de **80%** et **86,66%**.

D'après les milieux et les lignées utilisées, les cals issues des Crs d'*Atropa bella-donna*, se distinguent par la couleur et la texture ainsi que son aspect. Les milieux contenant **0,25 et 1 mg/L** d'ANA correspondent aux traitements T1 et T4, offrant des cals brunâtres et compacts. Par contre, les milieux de culture contenant **0,5 et 0,75 mg/L** d'ANA, qui correspond aux traitements T2 et T3, qui ont donné des cals blanchâtres et friables. Des résultats similaires sont obtenus par plusieurs auteurs, on cite (**Martin,2004 ; Elaleem et al,2009 ; Rahayo et al,2016**) .qui montrent que la morphologie des cals ainsi que leur couleurs et textures sont

fortement influencée par la concentration d'auxine et la lignée utilisés dans les milieux de culture.

### III.3.surface des cals

Les trois lignées testées ont tous induit la callogenèse. La surface de la callogenèse varie selon la lignée et la concentration de l'ANA additionné aux milieux de cultures, les plus grand surfaces des cals sont enregistré après 6 semaines de culture, au niveau des cals issus de la lignée L139 et formées avec les traitements T1 (0.25 mg/l d'ANA) et (1 mg/l d'ANA) dont les moyennes de surface sont respectivement de **250.9 cm<sup>2</sup>** et **187.69 cm<sup>2</sup>**.

Concernant les lignées Lo et L 139, les surfaces moyennes les plus intéressantes sont obtenues avec les traitements T2 (0.5 mg/l) avec **199.37cm<sup>2</sup>** et T3 (0.75 mg/l ) avec **131.56 cm<sup>2</sup>** . Malgré la surface des cals au début de l'expérimentation présentent la même surface qui été environ 0.6 cm<sup>2</sup>. La structure des cals issues des deux lignées L0 et L130 sont volumineux mais généralement friables. Ces observations se concordent avec d'autres recherches (**Khelifi-Slaoui et al,2006; Saibi,2006 ; Bakiri,2011**). Selon (**Ducreux et al,1986**), les cals friables montrent une croissance rapide par rapport aux cals compacts.

### III.4.Multiplication

Toutes les microboutures cultivées ont montré des résultats positifs c'est-à-dire une multiplication des bourgeons axillaires quels que soient les milieux de culture utilisés. Néanmoins dans les milieux de culture additionnée de régulateurs de croissance, la meilleure croissance a été observée.

Les résultats obtenus lors de notre étude ont montré que la BAP est une cytokinine efficace dans la multiplication des bourgeons axillaires et l'auxine AIB favorise l'apparition des racines, dont le milieu M3 contenant (0.5 mg/l de BAP +0.25 mg/l d'AIB ) présente des taux faibles de multiplication des bourgeons axillaires. Le milieu M2 composé de 0.5 mg/l de BAP et de 0.12 mg/l d'AIB, présente des taux élevés. Les milieux M1, M4, M5, M6 supplémentée respectivement de (0.5mg/l de BAP + 0.5 mg/l d'AIB);(0.5 mg/l de BAP +0.75 mg/l d'AIB) et (1mg/l de BAP +1 mg/l d'ANA) présentent des résultats intermédiaires avec des taux faibles par rapport aux M2 .

Selon (Klein *et al*,2004), l'apparition des racines pourrait s'expliquer par le fait que la concentration de l'AIB induirait la facilité de la rhizogenèse même en phase de Multiplication.

En conclusion, les combinaisons BAP-AIB sont les plus performantes sur l'induction du Bourgeonnement axillaire et la multiplication des entre-nœuds, ce facteur est fortement lié à la balance hormonale.

### **III.5.La production de chevelus racinaires dans un milieu liquide**

Plusieurs auteurs du même laboratoire LRGB de l'ENSA (Harfi,2009; Zarouri,2012 ; Amdoun *et al*,2022) qui ont étudié la culture des Crs dans un milieu liquide afin d'obtenir des racines transformées de plusieurs espèces ont été largement étudiées pour la production *in-vitro* de métabolites secondaires. Les lignées racinaires sont sélectionnées selon trois critères : la vitesse moyenne de croissance des racines (cm/j) et le degré de ramification, la biomasse (poids frais et le poids sec en gramme) .

#### **III.5.1.La surface des Chevelus racinaires**

Les deux lignées testées, issues de la souche A4, favorisent la croissance des racines transformées d'*Atropa bella-donna*. La surface varie selon la lignée utilisée. Les plus grandes

Surfaces des racines sont enregistrées après 5 semaines de culture, au niveau des racines issus de la lignée L139 dont la moyenne de la surface est de **46.86 cm<sup>2</sup>**. Concernant la lignée L0, la surface moyenne obtenue est de **38.09 cm<sup>2</sup>**.

Malgré le poids initial est environ de **0,1 g**. Les résultats montrent donc que la lignée L139 est la plus performante par rapport à la lignée L0.

#### **III.5.2.La vitesse de croissance des chevelus racinaires**

La variation de la vitesse de croissance des Crs observée et le degré de ramification chez les deux lignées racinaires. La lignée L139 est la meilleure lignée, ayant enregistré une vitesse de croissance variant entre **1.5** et **5cm/jour** avec des racines épais très ramifiées caractérisées par des poils absorbants blanchâtres. Concernant la lignée L0 qui enregistré une croissance moyenne moins importante par rapport à la lignée L139, la vitesse de croissance varie entre **1.5** et **4.5cm/jour** avec des racines fines peu ramifiées.

### **III.5.3. Le poids frais et le poids sec des chevelus racinaires**

Une variabilité au niveau de poids frais des Crs des deux lignées. Cependant la lignée L139 donne le poids frais moyen le plus intéressant a été de **6,69g**.

Par contre, dans la lignée L0, le poids frais obtenu présente en moyenne de **3,91 g**. Sachant que la quantité introduite au départ est la même pour les deux lignée.

D'autre part, nous avons des poids secs différents des deux lignées. L139 donne le poids sec moyen le plus intéressant de **3,41g** par rapport à la lignée L0 qui donne de poids sec moyen, le moins intéressant de **0,33g**.

D'après nos résultats obtenus, il s'avère qu'il y a une variabilité de la production de la biomasse des poids frais et des poids secs des Crs et cela dépend de la lignée utilisée et les conditions de culture (Milieu de culture/ balance hormonale).

# **CONCLUSION**

## **GENERALE**

## Conclusion Générale

D'après la synthèse bibliographique, il est admis que *l'Atropa bella -donna L.* a toujours été considérée comme l'une des plantes médicinales riches en alcaloïdes tropaniques forts intéressants pour le secteur pharmaceutique.

Dans le cadre de la conservation et la valorisation durable des ressources génétiques algériennes (Flore) par voie biotechnologique, notre travail a porté sur la multiplication et l'induction de cals à partir de chevelus racinaires de la belladone, *Atropa bella-donna L.* en vue de produire des plants in vitro. Il faut savoir que cette espèce est rare dans son milieu naturel et que cette technique de vitroculture offrira la possibilité de produire en masse cette plante et de la valoriser au laboratoire, une manière de valoriser les ressources et de les protéger.

Les résultats obtenus montre que :

La réponse de la callogenèse des chevelus racinaires des trois lignée (L0, L 130, L139) se sont comportés différemment vis-à-vis des différentes concentrations de l'hormone ANA testées.

Les meilleurs résultats de la callogenèse (**100%**) sont enregistrés avec la concentration **0,25mg et 1 mg d'ANA** pour la même lignée qui est L139. Cependant, les plus grandes surfaces des cals sont enregistrées après 6 semaines de culture, issus de la lignée L139 et ayant subi le traitement T1 (**0,25 mg d'ANA**) dont la surface moyenne est de **250,9 cm<sup>2</sup>** caractérisée par une structure des cals compacts de couleur beige ou brune.

Dans l'objectif de multiplier des microboutures de la Belladone, l'utilisation des combinaisons hormonale (AIB-BAP) est nécessaire pour l'augmentation de la multiplication rapide, en effet, l'ajout au milieu de culture de **0,5mg BAP et de 0,12 d'AIB mg**, offrant des taux de multiplication moyen des bourgeons axillaires les plus élevées (**6,12% /5,5 % /5% /4,62 % /4 ,5% /3% /2,62%** ) avec l'apparition des racines néoformées .

Les racines transformées est caractérisées par une croissance et développement rapide dans le milieu de culture B5 sans hormones, en effet, la lignée L139 est la meilleur pour la production de la biomasse des cRs dont la surface moyenne est de **46,86cm<sup>2</sup>** avec une vitesse de croissance de **1,5 et 5 cm /10 jours**, de **PF 6,69g** et **PS 3,41**, une structure épais, très ramifiée et de couleur blanchâtre.

# **RÉFÉRENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références Bibliographiques

- 1) **AABOUCHE(2018)** ,université sidi mohamed ben abdellah (36P).
- 2) **ADLER CH (2008)** Amantadine and anti-cholinergics. Parkinson's Disease- Diagnostic and Clinical Management Demos, New York.
- 3) **AEHLE E., DRÄGER B. (2010)**. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of Chromatography B*, 878, 1391–1406.
- 4) **ALEXANDER J., BENFORD D., COCKBURN A., CRAVEDI J., P., DOGLIOTTI. E, DI DOMENICO A., FERNANDEZCRUZ M. L., FÜRST P., FINK-GREMMELS J., LODOVICO GALLI C., GRANDJEAN P., GZYL J., HEINEMEYER G., JOHANSSON N., MUTTI A., SCHLATTER J., VAN LEEUWEN R., VAN PETEGHEM C. ET VERGER P. (2008)** - Tropane alkaloids from *Daturasp.*, as undesirable substances in animal feed. The EFSA Journal: 691, 55 p
- 5) **ANAB. Belladone**, Bouton-noir, Morelle furieuse... [Internet]. Association Nature Alsace Bossue. (2017) [cité 28 mars 2019]. Disponible sur:<http://naturealsacebossue.overblog.com/2017/12/belladone-bouton-noir-morelle-furieuse.html>
- 6) **ARQUINET, MANON (2019)**.*Écologie, utilisations et risques sanitaires associés à la belladone: Atropa belladonna L.* Thèse de doctorat.
- 7) **ATTENHOFER JOST C., PELLIKKA, P. (2003)**. Atropine for inconclusive exercise tests: A beautiful solution or just cosmetics?. *Am Heart J*; 145:938-40
- 8) **AUGE D., (1992)**. La culture in vitro et ses applications horticoles, 3ème édition. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 225-256p.
- 9) **AUGE, R., BEAUCHESNE, G., BOCCON-GIBOD, J., DECOURTYE, L., DIGAT, B., JALOUZOT, R., MUNIER, R., MORAND, J-CL., REYNOIRD, J.P., ET STRULLU, D.G. (1989)**. La culture *in vitro* et ces applications horticoles. 3ème édition revue. Corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Lavoisier 225p
- 10) **BARGUIL Y. (2011)**. Etude de trois plantes psychotropes consommées en Nouvelle-Calédonie kava, cannabis et datura Aspects médicaux et médico-légaux. *Thèse de docteur en chimie des biomolécules*. La Nouvelle-Calédonie.
- 11) **BELABASSI O.,BENOUARET R.,(2009)**.Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires :quelques provenances locales de *datura stramonium L.*Mém.Ing.Agro.,Inst.Nat.Agro.,El harrach,58P
- 12) **Benhizia Z.,(1989)**. Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium L.* Th. magistère. INA, Alger, 68 P.

## Références Bibliographiques

- 13) **Berdai MA, labib S, Chetouani K, Harandou, (2012)** M. Case Report-*Atropa belladonna* intoxication : A case report, *Pan Afer Med J* ;11 :1 :72
- 14) **BERNARD P (2010)** LA BELLADONE (solanacées) - FLORE DE SENLISSE [Internet]. [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: <http://floredeesenlisse.hautetfort.com/archive/2010/09/20/la-belladonesolanacees1.html>
- 15) **BOCCHI, FEDERICA, LAUBE, MARCUS, ET PARRET, THIERRY, (2015)**. Intoxication à l'Atropa belladonna. In : *Swiss Medical Forum*. EMH Media. p. 607-610
- 16) **BOULLARD B., (2001)**. Plantes médicinales du monde (Réalités et croyances), ESTEM, ISBN 2 84371 1177, p 515-516-660
- 17) **BOURGOUD F., GRAVOT A., MILESI S ET GONTIER F., (2001)**. Production of plant secondary metabolites : A historical perspective. *Plant science* 161(5). PP.839\_851.
- 18) **BOXUS, P., (1995)**. Multiplication végétative: micropropagation et embryogenèse somatique. In: *Biotechnologies végétales BV 93*, Ed CNED. AUPELF-UREF 191p.
- 19) **BRUNETON J. (2005)**. Plantes toxiques – Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. 3 éd., Editions médicales internationales, Paris, 632 p.
- 20) **BRUNETON J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Edition tec et doc, Paris, pp783-823.647- 673
- 21) **ÇAKSEN, HÜSEYİN, ODABAŞ, DURSUN, AKBAYRAM, SINAN, et al, (2003)**. Deadly nightshade (*Atropa belladonna*) intoxication: an analysis of 49 children. *Human & experimental toxicology*, vol. 22, no 12, p. 665-668
- 22) **CHICKEN**. *Experimental Eye Research* 84, 266-274.
- 23) **CIKLA U, TURKMEN S, KARAKA Y, AYAZ AF, TUREDI S, GUNDUZ (1998-2001)** A. An *Atropa belladonna* L. Poisoning with acute subdural hematoma. *Hum Exp Toxicol* 2011;30
- 24) **DANGOUMAU J. MOORE N., MOLIMARD M., REGLAT A.F., LATRY K., HARAMBURU F. SALAME G. M., TITIER K. (2006)**. Pharmacologie générale. Edition 2006. ISBN N° 2-909176-24-X. pp174, 272-273.
- 25) **DELVESCO, L.L., GUERRA, P.M. (2001)**. The effectiveness of nitrogen source in Feijoa somatic embryogenesis *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 64:19-25
- 26) **DICKINSON, S. AND BERNER, P. O., (2010)**. Ambatovy project: Mining in a challenging biodiversity setting in Madagascar. In: *Biodiversity, exploitation, and*

## Références Bibliographiques

- conservation of the natural habitats associated with the Ambatovy project, eds. S. M. Goodman & V. Mass. Malagasy Nature, 3: 2-13p.
- 27) **DIETHER S., SCHAEFFEL F., LAMBROU G. N., FRITSCH C., TRENDELENBURG A. (2007).**
- 28) **DRAGER B. (2002).** Analysis of tropane and related alkaloids. Journal of Chromatography A, 978; 1–35.
- 29) **EL BAZAOUI A., STAMBOULI H., BELLIMAM M. A., SOULAYMANI A. (2009).** Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du *Datura stramonium L.* par CPG/SM et CL/SM. Ann Toxicol Anal.; 21(4): 183-188
- 30) **FABRE R., TRUHAUT R. (1961).** Précis de toxicologie. Tome 2. Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, pp 379-454
- 31) **FATTORUSSO E. ET TAGLIALATELA-SCAFATI O. (2008).** Modern Alkaloids - Structure, Isolation, Synthesis and Biology. Wiley-VCH, Weinheim, 689 p
- 32) **FERRY, M., BOUGUEDOURA, N. et EL HADRAMI, I., (1998).** Patrimoine génétique et technique de propagation *in vitro* pour le développement de la culture du palmier dattier. Numéro spéciale oasis. Sècheresse. 9(2):139-146p.
- 33) **FIDAN T, KIRPINAR I (2011)** Psychiatric Aspects of a Case with Deadly Nightshade Intoxication. Journal of academic emergency medicine 10: 86-88.
- 34) **FLESCH F.( 2005).** Intoxications d'origine végétale : Plant poisoning. EMC-Médecine 2, pp 532–546
- 35) **FREDJ, H., ABED, S., BENELBAR, H. (2007).** La multiplication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) par les techniques de culture *in vitro*. Mémoire de fin d'étude. Université de Msila. Georgiev V., *et al.* (2013). Plant *in vitro* systems as sources of tropane alkaloids. In: Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolic and Terpenes, Springer, Berlin, pp.173-211.
- 36) **GIRI A., NARASU M.L., (2000).** Transgenic hairy roots : recent trends and applications. Biotechnology advances, vol. 18, p. 1-22
- 37) **GOULLE JP., PEPIN G., DUMESTER-TOULET V. ET LACROIX C., ( 2004).** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. Annales de Toxicologie Analytique, 16 (1), 34p.
- 38) **GOULLÉ, JEAN-PIERRE, PÉPIN, GILBERT, DUMESTRE-TOULET, VERONIQUE, et al, (2004) .** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes: belladone, datura, jusquiame, mandragore. In : *Annales de toxicologie analytique*. EDP Sciences. p. 22-35

## Références Bibliographiques

- 39) **GREVOZ G. D., LAUBRIET A. (2007)**. Reconnaissance et préparation de médicaments à l'officine. Edition Maloine, Paris, p 18
- 40) **GUILLON S., TREMOUILLAX-GUILLER J., PATI K.P., RIDEAU M., GANTET P., (2006)**. Hairy research : recent scenario and exiting prospects. Current opinion in plant biology, vol 9, p.p:341-346
- 41) **HALPERIN W., (1967)**. Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures. Exp. Cell Res. 48:170-173.
- 42) **HALPERN J., SEWELL R. (2005)**. Hallucinogenic botanicals of America: A growing need for focused drug education and research. Life Sciences 78; 519 – 526.
- 43) **HAMMICHE V., et al. (2013)**. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer-Verlag France, Paris, 409 p.
- 44) **HOPKINS W.G., (2003)**. Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514P
- 45) **HOSTETTMANN K (1997)**. Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources 6 de médicaments. Lausanne. Edition Favre.
- 46) <http://floranet.pagesperso-orange.fr/gene/tox/tox2.htm#Conduite>
- 47) <https://www.gbif.org/species/3802655> (GBIF Global Biodiversity Information Facility)
- intravitreally and intraperitoneally injected atropine on two types of experimental myopia
- 48) **JAY-ALLEMAND, C., CAPELLI, P., ET CORNU, D., (1992)**. Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in vermiculite containing gelrite medium. Station d'amélioration des arbres forestiers INRA, 45160. Ardon France.
- 49) **JOSHI P, WICKS AC, MUNSHI SK (2003)** Recurrent autumnal psychosis. Postgrad Med J 79: 239-240.
- 50) **KENNETH J. BROADLEY D. ET KELLY R., (2001)** - Muscatine Receptor Agonists and Antagonists. Molecules 6, 142-193.
- 51) **LABROUSSE, PASCAL, GALLOIS, ALEXANDRE, DULAURENT, SYLVAIN, et al., (2022)**. Micropropagation d'Atropa belladonna et de Mandragora officinarum: évaluation du développement sur différents milieux de culture et analyse de quelques marqueurs biologiques. *Annales Scientifiques du Limousin*, no 30.
- 52) **LACHACHI S. (2010)**. Organogénèse et embryogénèse somatique directe chez la tomate. Thèse de magister. Université d'Oran.
- 53) **Laffargue F, Oudot C, Constanty A, Bedu A, Ketterer-Martinon S, (2011)**. Deadly 2 nightshade (Atropa belladonna) intoxication in a 2-year-old child. Arch Pediatr. 18(2):186–188.

## Références Bibliographiques

- 54) Lavage in a *Datura stramonium*-Induced Anticholinergic Poisoning Epidemic. *Am. J. Emerg.*
- 55) LE C L., THOMAS D., NOWBUTH L ., (2002). Conservation de pomme de terre *in vitro* et caractérisation des variétés cultivées en suisse .suisse Agric 34(3):133-136.
- 56) LEE MR. Solanaceae IV: *Atropa belladonna* mars(2007). deadly nightshade.3 J R Coll Physicians Edinb.37(1):77–84.
- 57) MAHAMMEDI,ZIRAOUI (2016),essais de régénération de deux cépages de vigne (*Vitis vinifera* L .)autochtones,par embryogénèse somatique indirect (60P),université blida 1 .
- 58) MARGARA, F., (1989). Bases de la multiplication végétative des méristèmes et l'organogenèse. Ed INRA Paris, 262p.
- 59) MARGARA, J. (1989). La multiplication végétative le méristème et l'organogenèse. Ed INRA, Paris. 230pMauro N.M., 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier – GRENOBLE 1, 186P.*Med.* 21:316-317.
- 60) MINTZER J, BURNS A (2000) Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people. *J R Soc Med* 93: 457-462.
- 61) MIRAKHUR RK, DUNDEE JW (1979) Cardiovascular changes during induction of anaesthesia. Influence of three anticholinergic premedicants. *Ann R Coll Surg Engl* 61: 463-469.
- 62) MIRAKHUR RK, DUNDEE JW (1980) Comparison of the effects of atropine and glycopyrrolate on various end-organs. *J R Soc Med* 73: 727-730.
- 63) MONTCRIOL A., KENANE N., DELORTB G., ASENCIO Y., & PALMIER B., (2007) Intoxication volontaire par *Datura stramonium* : une cause de mydriase mal connue. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 26, 810–813.
- 64) MOREAU, (2003) .Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie.Thèse de doctorat en pharmacie,université henri poincaré-Nancy1(France)165.
- 65) MOREL, G. (1952). Guérison de dahlias atteints de maladie à virus. *C.R. Acad. SCI.Paris.*235 :1324\_1325
- 66) MOULTON BC,FREYER AD.MUSCARINIC (2011).receptor antagonists,from folklore to pharmacology;finding drugs that actually work in asthma and COPD.*Br J Pharmacol* :163(1):44-52

## Références Bibliographiques

- 67) NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE, NATIONAL ASTHMA EDUCATION AND PREVENTION PROGRAM (2007)** EPR-3 Expert Panel Report 3 (EPR3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (EPR-3). Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, US Department of Health & Human Services, USA.
- 68) NISSE P (2003).** Intoxications par les végétaux plantes et baies Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS Paris) Pédiatrie. 4-125-A-20.
- 69) PELLETIER S. W., (2001).** Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives. Vol 5. Ed. Wiley & Sons. New York. vol 5.
- 70) PRETORIUS P., MARX J., (2006).** *Datura stramonium* in asthma treatment and possible effects on prenatal development. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21 (3):331-337.
- 71) PUJOL M., VILLAIN M., VALLET G., CIRIMELE V., KINTZ P, (2006).** Scopolamine : un nouveau cas de soumission médicamenteuse sur des enfants. Annales de Toxicologie Analytique, vol. 18, n° 3
- 72) QUEZEL, P., SANTA, S., & SCHOTTER, O. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2.
- 73) RITA, Paul et ANIMESH, Datta K,(2011).** An updated overview on *Atropa belladonna* L. *International Research Journal of Pharmacy*, vol. 2, p. 11-17
- 74) SAADI A (1991).**Régénération des plantes de pois (*Pisum sativum*L) par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon, p162.
- 75) SALEN P., SHIH R., SIERZENSKI P., REED J. (2003).** Effect of Physostigmine and Gastric
- 76) SALHIS ;FADLIM ;ZIDANE,L ET DOUIRA,A,(2010).**Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de kénitra(Maroc).lazaroa, 31.133-146
- 77) SBAY, H., AND M. S. LAMHAMEDI.** "Multiplication végétative: outil pour." 54.Scienda horticultura. 51(3-4) : 335-342.
- 78) SCRIBAN, R. (1988).** Biotechnologie. 3ème édition revue, corrigée et augmentée. Ed. Tec et Doc. Paris 400p
- 79) SIBI M (1981).** Hérité de variants épi géniques obtenus par culture des tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs .ThèseDocSci ,Univ Paris RSud, Orsay, p 280.

## Références Bibliographiques

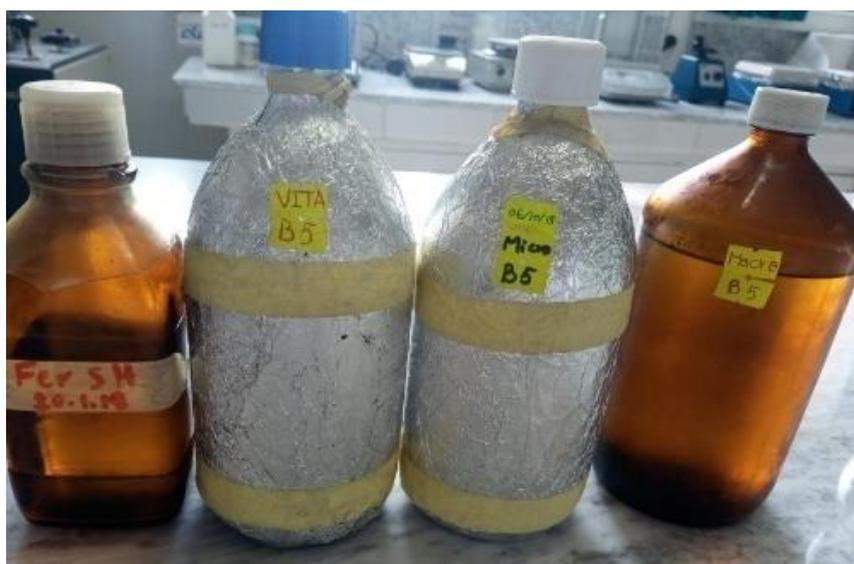
- 80) SMITH, R.H., BHASKARAN, S., MILLER, F.R. (1985). Screening for drought tolerance in Sorghum activity: localization using cell culture *in Vitro* cell. Dev. Biol .21:541-545.
- 81) SRIVASTAVA S.,SRIVASTAVA A.K.,(2007).Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites.Critical reviews in biotechnology,vol 27,p.p:29-43
- 82) STEENKAMP P.A., HARDING N.M., VAN HEERDEN F.R., VAN WYK B.-E. (2004). Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. Forensic Science International 145, pp 31–39.- 313.
- 83) TEOULE E ., (1999). Biotechnologie et Amélioration des plantes in Biotechnologie Seriban R. Ed: TEC et DOC, p 565-589.
- 84) TOXIPLANTE. Atropa belladonna L. [Internet]. [cité 22 sept 2018a]. Disponible sur:<https://www.toxiplante.fr/monographies/belladone.html>
- 85) VIDALIS, H., AUGE, R., BEAUCHESNE, G. (1989). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Lavoisier, Tec Doc (ed). 7- 24
- 86) WEI-WEI ZHANG., MING-KE SONG., YONG-YAO CUI., HAOWANG., LIANG ZHU., YIN-YAO NIU., LI-MIN YANG.,, YANG LU.,, HONG-ZHUAN CHEN (2008).Differential neuropsychopharmacological influences of naturally occurring tropane alkaloids anisodamine versus scopolamine. Neuroscience Letters 443, 241–245
- 87) [www.google.fr](http://www.google.fr)consulté le 09/10/2018.
- 88) ZRYD, J.P., (1988). Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Ed. Press. Polytechniques Roman des Suisse, 308p.

# **Annexes**

**Annexe 1 : la composition chimique de milieu de culture B5.**

Macroélément	Concentration 20 fois g/l	N°
KNO3	50	36
CaCl2 2H2O	3	92
Mg SO4 7H2O	5	14
(NH4)2 SO4	2,6	64
Na2 H2 PO4 H2O	3	
Microélément	Concentration 100 fois g/l	N°
KI	0,075	73
H3 BO3	0,3	35
Mn SO4	1	1
Zn SO4	0,2	34/119
Na2 Mo O4 2H2O	0,025	45/39
Cu SO4 5H2O	0,0025	50
CaCl2 6H2O	0,00125	43
Fer	concentration 100 fois g/l	N°
Na2 EDTA	3,73	5
Fe SO4 7H2O	2,78	2
Vitamine	concentration 100 fois g/l	N°
Acide nicotinique	0,1	1
pyridoxine	0,1	4
thiamine HCl	10	7
Sacharose	30	

**Annexe 2 : les solutions mères préparées des macro et micro-éléments ,vitamine, Fer.**



### Annexe 3 : le matériel de laboratoire utilisées.

Nous avons utilisées dans notre travail le matériel suivant :

- Verrerie de laboratoire
- La boîte d'outils
- Autoclave
- Ph mètre
- Plaque chauffante
- Agitateur
- La hotte
- Etuve
- Balance à précision
- Réfrigérateur



## Résumé

*Atropa bella-donna* communément appelée belladone ou morelle mortelle, est une plante herbacée vivace de la famille des Solanacées. C'est une plante mythique, à cause de ses propriétés médicinales et pharmaceutiques. Ses racines, feuilles et fruits contiennent des alcaloïdes : l'atropine, l'hyocyamine et la scopolamine. Cependant, ces alcaloïdes sont produits par la plante en de petites quantités ce qui empêche leurs exploitation d'où le recours à la culture in vitro. Cette dernière nous permet de produire en continue des alcaloïdes en de grande quantité potentiellement exploitables en industrie pharmaceutiques. Le présent travail traite sur trois parties, le premier concerne l'induction de la callogenèse in vitro d'*Atropa Bella-donna* à partir des chevelus racinaires , le deuxième volet traite de la mise en place d'un procédé de la multiplication par l'utilisation des combinaisons de régulateurs de croissance ( BAP + AIB ) et ( BAP+ANA) la dernière partie concerne la production de la biomasse des chevelus racinaires par lignées (L0 et L139). Les résultats obtenus montrent que l'optimum de callogenèse de l'*Atropa Bella-donna* est obtenu sur le milieu de culture qui contiennent 0,25 et 1 mg/L avec un taux de 100%. Pour la multiplication des micro bouture de l'*Atropa Bella-donna* par les différentes combinaisons , la concentration de( 0,5 de BAP+ 0,12 AIB) offre un coefficient de multiplication très intéressant de 4,49% par rapport aux autres combinaisons. D'autre part, la biomasse de chevelus racinaires de la lignée L139 montre que cette dernière est plus intéressante par rapport à la lignée L0 avec un poids frais moyen 6,69 g ,une structure des racines épais très ramifiées.

**Mots clés :** *Atropa Bella-donna*, , callogenèse , multiplication ,Biomasse, chevelus racinaires ,BAP,ANA ,AIB ,A4,15834,B5.

## Abstract:

*Atropa bella-donna* commonly called belladonna or deadly nightshade, is a perennial herbaceous plant of the Solanaceae family. It is a mythical plant, because of its medicinal and pharmaceutical properties. Its roots, leaves and fruits contain alkaloids: atropine, hyocyamine and scopolamine, including the foliage and berries which are extremely toxic. The period necessary for the growth of the plant varies from several weeks to several months, which constitutes a difficulty and low productivity of alkaloids, For this reason, we decided to use the in vitro culture. For this reason, we decided to use the in vitro culture. This last one allows us to produce in industrial quantities of alkaloids. The present work deals with three parts, the first concerns the induction of *in vitro* callogenesis of *Atropa bella-donna* from the root hairs, the second part deals with the establishment of a process of multiplication by use of combinations of growth regulators (BAP + AIB) and (BAP + ANA) the last part concerns the production of root hair biomass by lines (L0 and L139). The results obtained show that the optimum callogenesis of *Atropa bella-donna* is obtained on the culture medium which contains 0.25 and 1 mg/L with a rate of 100%. For the multiplication of *Atropa belladonna* microcuttings by different combinations, the concentration of (0.5 BAP + 0.12 AIB) offers a very interesting multiplication coefficient of 4.49% compared to other combinations. On the other hand, the biomass of root hairs of the L139 line shows that the latter is more interesting compared to the L0 line with an average fresh weight of 6.69 g, a thick, very branched root structure.

**. Key Word:** *Atropa belladonna*, callogenesis, multiplication,biomass,Hairy roots, BAP, ANA, A4, 15834,B5.

## ملخص

*Atropa belladonna* المعروف باسم البيلادونا أو الباذنجان القاتل ، هو نبات عشبي معمر من عائلة Solanaceae إنه نبات أسطوري ، بسبب خصائصه الطبية والصيدلانية. تحتوي جذوره وأوراقه وثماره على قلويدات: الأتروبين والهوسيامين والسكوبولامين ، بما في ذلك أوراق الشجر والتوت شديدة السمية . الفترة اللازمة لنمو النبات تختلف من عدة أسابيع إلى عدة أشهر ، وهي صعوبة وانخفاض إنتاجية قلويدات ، ولهذا السبب قررنا استخدام الزراعة في المخبرية . هذا الأخير يسمح لنا بإنتاج قلويدات بكميات صناعية. يتناول العمل الحالي ثلاثة أجزاء، الأول يتعلق بتحرير تكوين الخلايا أتروبا بيلادونا في المختبر من الشعيرات الجذرية، أما الجزء الثاني فيتناول تأسيس عملية الضرب باستخدام مجموعات من منظمات النمو (BAP + AIB) و (BAP + ANA) الجزء الأخير يتعلق بإنتاج الكتلة الحيوية للشعر الجذري بواسطة الخطوط (L0 و L139). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه تم الحصول على التولد الأمثل لنبات أتروبا البيلادونا في وسط الاستزراع الذي يحتوي على 0.25 و 1 ملغم/لتر بمعدل 100%. بالنسبة لتكاثر قطع *Atropa belladonna* الدقيقة بواسطة توليفات مختلفة، فإن تركيز (BAP + 0.12 AIB 0.5) يوفر معامل تكاثر مثير جداً يبلغ 4.49%. مقارنة بالتوليفات الأخرى. من ناحية أخرى، تُظهر الكتلة الحيوية لشعيرات الجذر في خط L139 أن الأخير أكثر إثارة للاهتمام مقارنة بخط L0 بمتوسط وزن طازج يبلغ 6.69 جم، وهو عبارة عن بنية جذر سميكة ومتفرعة جداً .

**الكلمات المفتاحية:** BAP,ANA ,AIB ,A4,15834,B5, الشعيرات الجذرية,الكتلة الحيوية, التكاثر,التولذ *Atropa belladonna*