

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة  
Ecole Nationale Supérieure Agronomique  
(ENSA)  
El-Harrach – Alger



Département de Phytotechnie  
Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologie (L-RGB)

## Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Sujet:

**Optimisation de la production par voie biotechnologique des  
alcaloïdes tropaniques à partir de chevelus racinaires de *Datura  
stramonium* L. :  
Approche par modélisation mathématique.**

Présenté par : M. Amdoun R.

Jury :

<b>Président :</b>	M. Bellal M.M.	Professeur ENSA, Alger.
<b>Rapporteur:</b>	M. Khelifi L.	Professeur ENSA, Alger.
<b>Examineurs:</b>	Mme. Abrous O.	Professeur, USTHB, Alger.
	M. Benyoussef E.H.	Professeur, ENSP, Alger.
	M. Gontier E.	Professeur, Univ. Picardie, France.
	Mme. Krimi Z.	Professeur, U- SD, Blida.

Année 2009- 2010

*À ma chère mère qui ma toujours soutenu,  
A mon cher père,  
À ma chère femme et ma fille Selma,  
À mes frères et soeurs et toute ma grande famille,  
À mes amis d'enfance : Nabil, Mustapha, Amine et Mohamed,  
Sans oublier Brahim, Amar et Malik.*

*Je dédie ce modeste travail*

## Avant-propos

Mes premiers remerciements iront à Monsieur Khélifi L, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger et Directeur de ma thèse pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologie (L-RGB), pour ses orientations, ses encouragements, pour tous les moyens humains et matériels qu'il a mis à ma disposition. Je salut votre esprit de rigueur et je vous exprime ma profonde reconnaissance pour l'attention et la confiance que vous m'avez accordées durant ces années de Doctorat.

Mes vifs remerciements pour Monsieur Benyoussef E-H, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Polytechnique (ENSP) d'Alger pour sa disponibilité, son aide ainsi que pour ses excellents conseils et critiques qui m'ont beaucoup apporté. J'ai tout particulièrement apprécié de partager son expérience, sa vision objective et éclairée des différents thèmes que j'ai eu à aborder. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Mes remerciements iront également à Monsieur Bellal M.M, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger qui a accepté d'examiner et de présider le jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier Monsieur Gontier E, Professeur à l'université Jules Vernes de Picardie (France), pour son acceptation de faire partie du jury et aussi pour son aide, ses critiques, sa collaboration et pour la documentation qu'il m'a adressée. J'ai beaucoup apprécié de travailler en collaboration avec lui. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Je remercie Madame Abrous O, Professeur à l'Université des sciences et technologie Haouri Boumedienne (USTHB), pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame Krimi Z, Professeur à l'université de Saad Dahleb (Blida) d'abord pour son aide durant ma thèse et aussi pour avoir accepté de faire partie du jury ma soutenance.

Je remercie Madame Ducroq-Assaf C, Maître de conférences à l'université Jules Vernes de Picardie (France) pour sa collaboration, ses critiques très enrichissantes et aussi pour ses efforts et sa patience sans égale. Vous avez contribué à m'orienter et à me corriger dans mes publications. Pour tout cela je vous en remercie.

J'adresse mes vifs remerciements également à Mr. Mechallah N, Mr. Drahamani M, Mr. Boutoumi Y et Mr. Asch M pour leur aide. Je remercie également mes collègues Monsieur Hamadache K, M<sup>elle</sup> Sahli F et Mouhoubi T pour le coup de main qu'ils m'ont donné à l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF). Merci à tous les membres du L-RGB, notamment Madame Zaoui D, pour m'avoir permis de travailler dans la bonne humeur. Merci à toute personne qui a participé de près ou de loin à la finalisation de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères, sans oublier Madame Dao Vu Thi et Madame Bouhired L.

## Liste des abréviations

AAD: absolute average deviation.  
AC: adenylyl cyclase.  
AJ: acide jasmonique.  
ANOVA : analyse de la variance.  
CAJ : concentration de l'acide jasmonique  
CM : Carrés moyens  
CCD: central composit design.  
CI (confidence interval): intervalle de confiance.  
CR, CRs: chevelu racinaire, chevelus racinaires.  
*Ddl*: degré de liberté.  
DO : Densité optique.  
EDM: experimental design method.  
ET (exposure time) : temps d'exposition.  
EtOH: éthanol.  
F-valeur : valeur du test de Fisher.  
G3P: glucose-3-phosphate.  
GC–MS: gas chromatography – masse spectroscopy.  
H&S: hyoscyamine & scopolamine.  
H6H, *h6h*: *hyoscyamine 6  $\beta$ -hydroxylase*, gène codant l'H6H.  
HS: hyoscyamine.  
IC : indice de croissance.  
IE: indice d'élicitation.  
LSD: least significant differences.  
MeJA: methyljasmonate.  
MS: milieu de culture Murashig et skoog.  
PI (prediction interval): intervalle de prédiction.  
PMT: *putrescine N-methyl transferase*.  
*P*: valeur de la probabilité.  
rpm : rotation par minute.  
RS, RSM: response surface, response surface methodology.  
SE, StdErr: erreur standard.  
SCE : somme des carrées des écarts  
Test *F* : test de Fisher  
Test *t* : test de Student.  
*vir* : gènes de virulence.  
YEM: yeast extrait mannitol.

## Liste des symboles

B5 : milieu de culture Gamborg.

B5-OP : milieu de culture B5 optimisé.

$D$ : overall desirability.

$d_{EI}$ : desirability of elicitation index.

$d_{GI}$ : desirability of growth index.

$d_i(Y_i)$  : desirability of response  $Y$ .

$\varepsilon \sim N$  : normalité des erreurs.

$\lambda$  : longueur d'onde.

$\mu\text{M}$ : micro - mole.

$\delta Y$  : dérivée de la réponse  $Y$ .

$R^2$  : coefficient de détermination.

$R^2_{adj}$  : coefficient de détermination ajusté.

$\theta$  : première dérivée de l'équation (dans la section 3).

$X_f$  : biomasse finale (dans la section 2.).

$X_i$  : biomasse initiale (dans la section 2.).

$X_i$  : variable aléatoire indépendante (dans le reste du document).

$Y_i$  : variable aléatoire dépendante.

$\hat{Y}_e$  : réponse estimée en état d'élicitation.

$\hat{Y}_{e28}$  : réponse estimée en état d'élicitation au 28<sup>ème</sup> jour de culture.

$\forall$  : quelque soit.

$\forall i, V(\varepsilon_i) = \sigma^2$  : homoscedasticité des erreurs.

## Liste des tableaux

Tableau 1. Effet des souches d' <i>A. rhizogenes</i> sur l'induction du chevelu racinaire.....	8
Tableau 2. Variation du type de racines induites par les souches A <sub>4</sub> et K <sub>47</sub> .....	9
Tableau 3. Paramètres de croissance et contenu alcaloïdiques des 4 lignées sélectionnées après 20 jours de culture.....	14
Tableau 4. Caractérisation des lignées vis-à-vis de la réponse à l'élicitation.....	14
Tableau 5. Définition des différents milieux testés.....	20
Tableau 6. Rendement en alcaloïdes des CRs de <i>Datura stramonium</i> cultivés dans le milieu B5 (Témoin) au 28 <sup>ème</sup> jour de culture.....	24
Tableau 7. Valeurs estimées et mesurées du rendement en hyoscyamine (mg/l) sans élicitation ( $\hat{Y}_{28}$ ) et avec élicitation ( $\hat{Y}_{e28}$ ) en fonction du statut nutritionnel au 28 <sup>ème</sup> jour de culture.....	27
Tableau 8. CCD en valeurs codées ( $X_1, X_2$ ), IC et IE obtenus pour chaque expérience.....	37
Tableau 9. ANOVA du modèle quadratique : Indice de croissance (IC) et Indice d'élicitatbilité (IE).....	37
Tableau 10. Valeurs des désirabilités obtenues pour l'indice de croissance ( $d_{IC}$ ), l'indice d'élicitatbilité ( $d_{IE}$ ) et la désirabilité globale ( $D$ ) pour chaque expérience.....	40
Tableau 11. Biomasse au 16 <sup>ème</sup> jour et niveau d'optimisation du contenu en hyoscyamine au 12 <sup>ème</sup> jour de culture.....	43
Tableau 12. Tableau d'analyse de la variance du modèle quadratique.....	51
Tableau 13. Analyse des termes du modèle quadratique.....	51
Tableau 14. Diagnostic : observations influentes.....	54
Tableau 15. Biomasse et production en HS des HRs cultivés dans le milieu B5 témoin et le milieu B5-OP au 28 <sup>ème</sup> jour de culture.....	58

## Liste des figures

Figure 1. Effet du milieu de la suspension bactérienne sur le temps d'apparition de la première racine induite sur les hypocotyles de <i>D. stramonium</i> .....	10
Figure 2. Effet des concentrations d'acétosyringone sur le nombre de racines par explant chez <i>D. stramonium</i> L. après 60 jours de la transformation.....	11
Figure 3. Production de chevelus racinaires et sélection (souche A <sub>4</sub> x <i>D. stramonium</i> L).....	13
Figures 4 A et B. Evolution des effets du nitrate, du phosphore et du calcium sur le rendement en hyoscyamine des CRs de <i>Datura stramonium</i> au cours de la culture sans élicitation (A) et avec élicitation (B).....	25
Figure 5. Diagramme de Pareto des effets standardisés du rendement en hyoscyamine (la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).....	26
Figure 6. Niveau de l'hyoscyamine dans les CRs élicités de <i>Datura stramonium</i> estimés par surface de réponse de l'interaction NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Ca <sup>2+</sup> .....	27
Figures 7. A et B. Cinétique de consommation et évolution du taux d'amélioration de l'hyoscyamine en fonction du nitrate [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (A) et du calcium [Ca <sup>2+</sup> ] (B).....	29
Figure 8. Domaine d'étude du CCD: variables et leurs niveaux étudiées.....	34
Figure 9. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité de l'indice de croissance en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).....	41
Figure 10. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité de l'indice d'élicitabilité en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).....	41
Figure 11. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité globale ( <i>D</i> ) en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).....	42
Figure 12. Domaine d'étude et niveaux de chacun des 3 facteurs du CCD.....	50
Figure 13. Diagnostic : résidus studentisés en fonction des valeurs prédites; distribution normale des résidus.....	53
Figure 14. Transformation de $Y^{\lambda}$ : représentation graphique de Box-Cox.....	55
Figure 15. Surface de réponse et contours estimés de la fonction de l'erreur standard et du rendement en HS des HRs élicités par l'AJ en fonction du couple NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Ca <sup>2+</sup> .....	57
Figure 16. Aspect des CRs au 20 <sup>ème</sup> jour de culture dans le milieu B5-OP et le milieu B5 témoin.....	58

## ملخص

المواد النباتية المستخدمة في هذه الأطروحة تتكون من الجذور الشعرية المتحصل عليها في المختبر عن طريق تحويل قطع من ساق نبتة الداتوره *Datura stramonium* بسلالة A<sub>4</sub> لبكتيريا *Agrobacterium rhizogenes*. تمت عملية التشخيص واختيار أصناف الجذور الشعرية وفقا لسرعة نموها ، مداها على التحفز ومضمونها القلويدي الإجمالي. أربعة أصناف من الجذور الشعرية تم تشخيصها من بين 106 ولكن صنف واحد فقط تم استخدامه في هذه الأطروحة. استخدام الجذور الشعرية هي واحدة من إستراتيجيات البيوتكنولوجيا التي تهدف إلى تحقيق الإنتاج الأمثل من القلويدات التروبانية. الإستراتيجيات البيوتكنولوجية الرئيسية الأخرى لتحسين الإنتاج هي: تطوير تركيبة الوسط الزراعي للجذور الشعرية و التحفيز باستخدام المحفزات (elicitors). تعرض نبتة الداتوره لضغط يؤدي الى تحفيز جهازها الدفاعي ، فيترتب على ذلك بيوتركيب فعال للقلويدات. لهذا السبب تستعمل المحفزات، حيث أنها تلعب دور الضغط ، و تؤدي إلى استجابة فسيولوجية ثانوية يتم إثرها تركيب فعال لقلويدات التروبانية في الجذور الشعرية. تجاوب الجذور الشعرية للتحفيز يتوقف على تركيبة الوسط الزراعي. دراسة تأثير التركيبة المعدنية للوسط B5 على فعالية التحفيز بالحمض البسميني (acid jasmonic) للجذور الشعرية تمت من خلال إتباع نهج النمذجة الرياضية. من خلال تصميم 2<sup>3</sup> ، تم في البداية ضبط نموذج درجة أولى ، للإستخدامه في فحص (screening analysis) عناصر الوسط B5 الأكثر تأثيرا في فعالية التحفيز. النمذجة الرياضية أظهرت تأثيرا فعال على التحفيز ابتداء من اليوم الثامن (8) للزراعة. أظهرت دراسة معاملات النموذج أثارا إيجابية للنترات [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]، للفوسفور [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>]، للكالسيوم [Ca<sup>2+</sup>] ، [Ca<sup>2+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] و [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>]. أظهرت النتائج أن الجذور الشعرية المزروعة في وسط فقير من النترات [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] تظهر استجابة ضعيفة للتحفيز بالحمض البسميني. توجد صعوبة في استخدام هذا الأخير كمحفز لأنه يحسن من محتوى القلويدات التروبانية ويحد في نفس الوقت من نمو الجذور الشعرية. يتطلب تحديد الظروف المثلى لتحفيز النظر في اثنين من الاستجابات في وقت واحد و هما: إنتاج الكتلة الحيوية و إنتاج القلويدات التروبانية. للحصول على حل وسط مناسب ، تم اقتراح استعمال دالة الإستحسان (desirability). أظهرت النتائج أن تركيز 0.06 مليمول و 24 ساعة من التحفيز هما شرطين للحل الأمثل ، حيث يتيحان الحصول على 2.87 ضعف في محتوى القلويدات التروبانية (hyoscyamine) بعد اليوم الثاني عشر للزراعة و انخفاضا بنسبة 12% فقط من الكتلة الحيوية بعد 16 يوما من الزراعة مقارنة مع الجذور الشعرية التي لم يتم تحفيزها. في ظل هذه الظروف المثالية للتحفيز تمت عملية تحسين تركيبة الوسط B5 فيما يتعلق بتركيز [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] ، [Ca<sup>2+</sup>] والسكرور. في هذه المرحلة الثانية من التحسين، تم استخدام نموذج من الدرجة الثانية وفقا لمنهجية مساحة الاستجابة (Response Surface Methodology) بعد التحليل والتشخيص والإقامة من أجل تحسين دقة التنبؤ للنموذج. إن منهجية مساحة الاستجابة هي حاليا الأكثر استخداما والأكثر فعالية للتحسين الأمثل عن طريق تنفيذ عدد صغير من التجارب والأخذ بعين الاعتبار آثار التفاعلات المزدوجة بين العوامل. ولقد أجريت مع تطبيق هذه المنهجية عشرين (20) تجربة فقط لإنجاز التحسين. يعد هذا ربحا وافرا في وقت البحث حيث يقدر تحسين محتوى القلويدات التروبانية بحوالي 212.7% للجذور الشعرية المزروعة في الوسط B5 الأمثل مقارنة مع الجذور الشعرية المزروعة في الوسط B5 العادي. إن التركيزات المثلى المعدلة في ظروفنا التجريبية هي : 79.1 مليمول ، 11.4 مليمول و 42.9 ملغم / لتر على التوالي بالنسبة للنترات [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]، للفوسفور [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>] و للسكرور.

**كلمات مفتاحية :** البيوتكنولوجيا ، الجذور الشعرية ، الداتوره ، القلويدات التروبانية ، النمذجة الرياضية.

## Abstract

Plant materials used in this work are hairy root (HRs) obtained by infection of *Datura stramonium* hypocotyls by *Agrobacterium rhizogenes* (A<sub>4</sub> strain). Characterization and selection of effective lines of HRs have been achieved according to strategic criteria in order to improve alkaloid biosynthesis biotechnologically such as growth parameters, total tropan alkaloids and elicitation response. Finally, four lines are retained on 106 obtained and only one line is retained for this work. HRs culture is the first biotechnology strategy to improve alkaloids production. However, In general the major strategies to improve their productivity are the optimization of growth and the induction of secondary metabolite pathways by elicitors. Secondary metabolites are mostly involved in the relationship with plant stresses. From this point of view, elicitation is largely employed as a strategy to mimic stress effects, which then lead to a physiological response involving secondary metabolite synthesis and accumulation into the HR. A culture medium component affects the intensity of the response to elicitation. Thus, studies on the response to elicitation for HR in accordance with nutritional status are necessary. The first step in this work, which focuses on the effects of minerals in the B5 culture medium and elicitor (jasmonic acid:JA) are studied using a mathematical model approach (screening analysis) and factorial design 2<sup>3</sup> was carried out to study the response to elicitation in accordance with nutritional status of HR for [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>] and [Ca<sup>2+</sup>]. The modelization of different minerals effects showed a response to elicitation only after the 8<sup>th</sup> day of cultivation. The study of models coefficients revealed that nitrate [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], phosphorus [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>] and calcium [Ca<sup>2+</sup>] levels and combinations [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>] and [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>] were positive with elicitation; however, interaction effects [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>] and [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>] were negative. These results revealed that HR, with limited nitrate, showed lower response to elicitation by JA. This elicitor is generally considered to increase the metabolite production but decrease the biomass accumulation. So, the optimization of JA concentration (JAC) and exposure time (ET) were investigated in a HR culture of *D. stramonium*. The determination of optimum conditions of elicitation would require simultaneous consideration (multiresponse) of both responses: biomass accumulation and alkaloid production. To obtain a satisfactory compromise, the desirability function approach has been proposed. The results from this study suggest that the concentration of JA at 0.06 mM with an exposure time of 24h is the optimal compromise. In this experimental condition, an improvement in the hyoscyamine content up to 2.87 fold-up is obtained after 12<sup>th</sup> day of culture. It has also been established that treatment does not inhibited the biomass after 24h of elicitation. HR growth index decrease only to 12% of the control culture after 16 days. In this conditions, the optimisation of B5 medium components on [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [Ca<sup>2+</sup>] and sucrose concentrations is conducted. In this second step, the optimisation is achieved by RSM (Response Surface Methodology) using a quadratic model after analyse, diagnostic and accommodation. The RSM is currently among the most used and most effective to determine the optimum by performing a small number of experience including the effects of interactions between factors. With the application of RSM for optimization, only 20 experiments were conducted. This is a significant time saving. The model allows for interpolation and thus predicts the intensity of the response to elicitation. The optimizing performance of HS in elicited *D. stramonium* HR is 212.7% for the B5 medium optimized compared to those grown in unmodified B5 medium. The optimal concentrations in our experimental conditions were: 79.1 mM, 11.4 mM and 42.9 mg / l respectively for [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], the [Ca<sup>2+</sup>] and sucrose.

**Keywords:** Tropan alkaloids; biotechnology; hairy root; *Datura stramonium*; mathematical modelization; optimization.

## Résumé

Le matériel végétal utilisé pour ce travail est constitué de chevelus racinaires (CRs) sélectionnés obtenus par transformation génétique *in vitro* des hypocotyles de *Datura stramonium* par *Agrobacterium rhizogenes* (souche A<sub>4</sub>). Les lignées obtenues sont caractérisées et sélectionnées en fonction de leur croissance, leur réponse à l'élicitation et leur contenu en alcaloïdes totaux. Sur 106 obtenues, quatre lignées seulement ont été caractérisées dont une seule a été sélectionnée pour la suite du travail. L'utilisation des CRs constitue une des premières voies biotechnologiques pour l'optimisation de la production des alcaloïdes *in vitro*. Dans ces conditions, les stratégies majeures pour améliorer la productivité en alcaloïdes sont : l'optimisation de la composition du milieu de culture et la stimulation des voies métaboliques secondaires par l'utilisation d'éliciteurs. L'élicitation est largement employée comme une stratégie qui mime l'effet d'un stress, conduisant ainsi à une réponse physiologique rapide de biosynthèse des métabolites secondaires et leur accumulation dans les CRs. L'intensité de cette réponse dépend de la composition du milieu de culture. L'étude de la composition minérale du milieu B5 et de l'élicitation à l'acide jasmonique (AJ) sur la production des alcaloïdes tropaniques des CRs de *D. stramonium* a été faite selon une approche basée sur la modélisation mathématique. Dans un premier temps, un modèle linéaire mis au point moyennant un plan factoriel 2<sup>3</sup> a été utilisé pour cribler (*screening technique*) les éléments les plus influents du milieu B5 sur la réponse à l'élicitation. La modélisation des différents effets montre une réponse effective à l'élicitation après le 8<sup>ème</sup> jour de culture. L'étude des coefficients du modèle révèle que le nitrate [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], le phosphore [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>] et le calcium [Ca<sup>2+</sup>] ainsi que les effets combinés de [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>] et [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/Ca<sup>2+</sup>] sont significativement positifs pour l'élicitation. Les résultats montrent aussi que les CRs limités surtout en [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] montrent une faible réponse à l'élicitation à l'AJ. L'utilisation de ce dernier comme éliciteur est difficile car en améliorant le contenu en alcaloïde, il inhibe en même temps la croissance de la biomasse. La détermination des conditions optimales de l'élicitation requiert donc une considération simultanée de deux réponses : biomasse et production alcaloïdique. Pour obtenir un compromis satisfaisant, une approche par la fonction de désirabilité est proposée. Les résultats obtenus montrent que la concentration de 0.06 mM pour 24h d'élicitation constitue une solution optimale. Elle permet une amélioration de 2.87 fois du contenu en hyoscyamine après le 12<sup>ème</sup> jour de culture contre une diminution de seulement 12% de la biomasse par rapport aux CRs témoin après 16 jours de culture. Dans ces conditions d'élicitation, l'optimisation de la composition du milieu B5 en [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], en [Ca<sup>2+</sup>] et en saccharose a été ainsi, réalisée. Dans cette deuxième étape d'optimisation, un modèle quadratique issu de la RSM (Response Surface Methodology) a été mis au point après analyse, diagnostic et accommodation pour l'affinement de son exactitude prédictive. La RSM est actuellement l'une des méthodes les plus utilisées et les plus efficaces pour l'optimisation en réalisant un nombre réduit d'expériences tout en incluant les effets d'interactions entre facteurs. En adoptant cette approche, (application de la RSM), seulement 20 expériences ont été réalisées pour l'optimisation. Ceci constitue un gain de temps considérable. En effet, cette démarche a permis une optimisation du rendement en HS égale de 212.7% pour les CRs élicités de *D. stramonium* cultivées dans le milieu B5 optimisé par rapport à ceux cultivés dans le milieu B5 témoin (non modifié). Les concentrations optimales dans nos conditions expérimentales sont : 79.1 mM, 11.4 mM et 42.9 mg/l pour respectivement le [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], le [Ca<sup>2+</sup>] et le saccharose.

**Mots-cléfs :** Alcaloïdes tropaniques ; biotechnologie ; chevelus racinaires ; *Datura stramonium* ; modélisation mathématique ; optimisation.

# Sommaire

<b>1. Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Chevelu racinaire de <i>Datura stramonium</i> L. induit par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en vue de la production d'alcaloïdes par voie biotechnologique.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Introduction.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Matériel végétal.....	18
2.2.2. Production du chevelu racinaire.....	18
2.2.3. Caractérisation et sélection des lignées racinaires.....	19
2.2.4. Analyses statistiques.....	20
<b>2.3. Résultats et discussions.....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Effet des souches d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> sur l'induction des chevelus racinaires.....	20
2.3.2. Effet du milieu de suspension bactérienne sur l'induction des chevelus racinaires.....	21
2.3.3. Effet des concentrations d'acétosyringone sur l'induction des chevelus racinaires.....	22
2.3.4. Caractérisation et sélection des lignées racinaires.....	23
2.3.4.1. Croissance et contenu en alcaloïdes totaux.....	23
2.3.4.2. Réponse à l'élicitation.....	264
<b>2.4. Conclusion.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Modélisation de la réponse biochimique <i>in vitro</i> : Influence des éléments minéraux et de l'élicitation sur le contenu en alcaloïdes tropaniques des CRs de <i>D. stramonium</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Introduction.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Obtention et culture des CRs.....	30
3.2.2. Expériences avec les éléments minéraux.....	31
3.2.3. Criblage ( <i>screening analysis</i> ) et développement du modèle mathématique: statut nutritionnel et réponse à l'élicitation.....	32
3.2.4. Extraction et dosage des alcaloïdes.....	34
3.2.5. Analyses statistiques.....	35
<b>3.3. Résultats et discussions.....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Influence des éléments minéraux sur la biomasse et le contenu en alcaloïdes des CRs au 28 <sup>ème</sup> jour de culture.....	35
3.3.2. Criblage ( <i>screening analysis</i> ) des éléments minéraux et modélisation des effets: statut nutritionnel et réponse à l'élicitation.....	36
<b>3.4. Conclusion.....</b>	<b>42</b>
<b>4. Optimisation du rendement en alcaloïdes.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Optimisation multiréponse de l'élicitation par la fonction de désirabilité.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.1. Introduction.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>45</b>
4.1.2.1. Matériel végétal.....	45
4.1.2.2. Extraction et dosages de l'hyoscyamine.....	46
4.1.2.3. Plan d'expérience.....	46

4.1.2.4. Fonction de désirabilité.....	47
4.1.2.5. Analyse statistique.....	48
<b>4.1.3. Résultats et discussion.....</b>	<b>48</b>
4.1.3.1. Evaluation des modèles mathématiques.....	49
4.1.3.2. Optimisation simultanée par l'utilisation de la fonction de désirabilité.....	52
4.1.3.3. Niveaux d'optimisation.....	55
<b>4.1.4. Conclusion.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Optimisation de la composition du milieu B5 par la Méthode des Surfaces de Réponse.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.1. Introduction.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>58</b>
4.2.2.1. Matériel végétal.....	58
4.2.2.2. Elicitation.....	58
4.2.2.3. Extraction et dosages de l'HS.....	58
4.2.2.4. Théorie de la RSM.....	58
4.2.2.5. Capacité prédictive globale, analyse et diagnostic du modèle.....	60
4.2.2.6. Détermination de l'optimum.....	61
4.2.2.7. Application de la RSM pour l'optimisation de la composition du milieu B5.....	61
<b>4.2.3. Résultats et discussions.....</b>	<b>63</b>
4.2.3.1. Prédicativité globale du modèle.....	63
4.2.3.2. Analyses du modèle quadratique.....	63
4.2.3.3. Diagnostic du modèle quadratique.....	64
a. Méthodes graphiques.....	64
b. Observations influentes et accommodation.....	65
4.2.3.4. Analyse de la surface de réponse (RS) et détermination des concentrations optimales..	68
4.2.3.5. Niveau d'optimisation.....	69
<b>4.2.4. Conclusion.....</b>	<b>70</b>
<b>5. Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>72</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>84</b>

# 1. Introduction générale

Chez les plantes supérieures le métabolisme secondaire produit une large gamme de métabolites secondaires ayant des rôles divers dont le rôle de défense [Harborne, 1993; Croteau *et al.*, 2000]. Par ailleurs, ces métabolites constituent une importante source de biomolécules utilisées dans l'agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique [Sasson, 1991 ; Mulabagal et Tsay, 2004]. Les métabolites secondaires sont répartis dans trois grandes familles: les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés. Dans cette dernière famille, les alcaloïdes sont les plus importants de par leur nombre et leur diversité [Bruneton, 1987].

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés généralement d'origine végétale ayant une réaction basique et possédant des propriétés pharmacologiques. Ils sont distincts des autres composés azotés comme les aminoacides, les bêtaïnes, les peptides, les amino-sucres, les vitamines azotées, les porphyrines ainsi que les alkylamines de faible poids moléculaire [Bruneton, 1987]. Il existe plusieurs groupes d'alcaloïdes connus à ce jour parmi lesquels le groupe des alcaloïdes tropaniques dont l'hyoscyamine ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ) et la scopolamine ( $C_{17}H_{21}NO_4$ ). Ces deux alcaloïdes sont très utilisés en médecine humaine et vétérinaire [Houmani et Cosson, 2000]. L'hyoscyamine est synthétisée à partir de deux précurseurs, l'ornithine et l'arginine, au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la racine [Guignard *et al.*, 1985; Nakakjima *et al.*, 1993 ; Kitamura *et al.*, 1996]. Après une série de transformations initiées par l'*ornithine décarboxylase* et l'*arginine décarboxylase* ainsi que la *putricine N-methyl-transférase* (PMT), il y a formation du tropinone [Verzar et Petri, 1973]. Cette dernière molécule est réduite en tropine grâce à la *tropinone réductase* [Nakakjima *et al.*, 1993]. Lorsque la tropine est estérifiée par l'acide tropique, il y a formation de l'hyoscyamine qui migre par la suite vers les feuilles où elle sera biotransformée en scopolamine après une hydroxylation suivie d'une époxydation grâce à deux enzymes, l'*hyoscyamine 6 β hydroxylase* (H6H) et l'*hyoscyamine 6 β epoxydase* (H6E) [Guignard *et al.*, 1985 ; Bruneton, 1987 ; Kitamura *et al.*, 1996].

L'hyoscyamine et la scopolamine (H&S) sont présentes en abondance chez les *Solanaceae* dites mydriatiques. Dans cette famille, on rencontre en Algérie *Atropa belladonna* à l'Est (Guerrouche), *Brugmansia sp* cultivée comme plante ornementale, les *Datura spp* (*D. stramonium* L, *D. innoxia* Mill, *D. quercifolia* H.B.K et *D. ferox* L.) dans les champs irrigués et en bord de routes, *Hyoscyamus albus* au littoral Algérois, *Hyoscyamus niger* à l'Est et *Hyoscyamus muticus* plus particulièrement au Sud [ Houmaini *et al.*, 1994 ; Houmani et Cosson, 1998 ; Houmani *et al.*, 1999; Houmani et Cosson, 2000 ; Amdoun *et al.*, 2005 a].

Le *D. stramonium* est une espèce, riche en alcaloïdes tropaniques, méritant d'être valorisée pour la production de l'H&S [Houmani *et al.*, 1994]. Cependant, la recherche d'une production rentable, indépendante des aléas environnementaux induisant des fluctuations de rendement, et les besoins accrus

en produits purs, poussent à la recherche d'autres voies de productions plus stables et plus efficaces pour la production de ces métabolites. Les biotechnologiques peuvent justement constituer une bonne alternative pour cette production [Guignard *et al.*, 1985; Zrýd, 1988 ; Vanisree *et al.*, 2004]. Si la production par voie biotechnologique de certains métabolites à partir des microorganismes est passée à l'échelle industrielle, l'utilisation de cellules végétales reste limitée. Toutefois, de nombreuses recherches sur le métabolisme des plantes ont permis de mettre en place des procédés de production en bioréacteurs dont l'objectif est d'augmenter les rendements en métabolites [Kim *et al.*, 2002 ; Georgiev *et al.*, 2007]. Ainsi, la production par voie biotechnologique des alcaloïdes tropaniques à partir de *D. stramonium* serait envisageable grâce aux différentes stratégies d'optimisation utilisées en culture de tissus dont les plus importantes sont :

- L'utilisation de tissus différenciés performants.
- L'élicitation, qui consiste en l'utilisation de diverses substances stimulantes des défenses naturelles des plantes.
- L'optimisation de la composition minérale et/ou organique du milieu de culture.

La biosynthèse des métabolites secondaires est liée à la différenciation cellulaire. En effet, Les alcaloïdes nécessitent des tissus racinaires constitués de cellules spécialisées pour que la biosynthèse soit effective [Guignard *et al.*, 1985]. C'est donc une condition obligatoire pour envisager toute production *in vitro* [Zrýd, 1988]. Le chevelu racinaire (CR) obtenu par transformation génétique à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* s'avère un matériel végétal de choix. Ce type de tissus présente une croissance rapide et peut produire des taux significatifs de métabolites secondaires comparativement aux autres types de matériel végétal mis en culture (suspensions cellulaires, cals, tissus ou d'organes ...etc) [Bourgaud *et al.*, 1997, Shanks and Morgan, 1999; Bourgaud *et al.*, 2001; Raoa and Ravishankarb, 2002 ; Souret *et al.*, 2003 ; Amdoun *et al.*, 2007]. En effet, la productivité de certaines lignées des CRs peut même dépasser celles des plantes entières [Kovalenko et Maliuta, 2003]. La production par voie biotechnologique des métabolites secondaires, tels que les alcaloïdes, via les CRs constitue donc une voie prometteuse [Bourgaud *et al.*, 1997, Shanks and Morgan, 1999; Bourgaud *et al.*, 2001; Raoa and Ravishankarb, 2002 ; Amdoun *et al.*, 2007].

Après la phase d'obtention des CRs suite à l'infection par *A. rhizogenes*, une caractérisation est nécessaire afin de sélectionner les lignées les plus performantes : croissance rapide, bonne productivité en alcaloïdes et bonne réactivité à l'élicitation [Maldonado-mendoza *et al.*, 1993; Amdoun *et al.*, 2008].

L'élicitation est une stratégie efficace pour améliorer la productivité en métabolites secondaires [Dicosmo et Misawa, 1985; Roberts et Shuler, 1997, Amdoun *et al.*, 2005 b ]. Le plus souvent, elle consiste en l'utilisation de substances biotiques et/ou abiotiques, appelées éliciteurs, afin de stimuler la biosynthèse de métabolites secondaires spécifiques [Vasconsuelo et Boland, 2007].

L'existence de liens entre le métabolisme primaire et secondaire fait que l'intensité de la réponse à l'élicitation dépend de la composition du milieu de culture [Dunlop et Curtis, 1991; Vasconsuelo et Boland, 2007]. Il existe cinq voies métaboliques connues qui lient le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Il s'agit des voies : de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mevalonique, du G3P via la voie des pentoses phosphates [Contin *et al.*, 1998] et des acides aminés [Taiz et Zeiger, 1998]. La maîtrise des besoins en  $\text{NO}_3^-$  [Nussbaumer *et al.*, 1998], en  $\text{Ca}^{2+}$  [Gontier *et al.*, 1994 ; Amdoun, 2003, Piñol *et al.* 2004 ] et en hydrates de carbone [ Saenz-Carbonell et Loyola-Vargas, 1996] est susceptible d'améliorer considérablement le contenu alcaloïdique.

La physiologie des CRs est complexe mais dont la compréhension est essentielle en vue d'optimiser leur culture [Lanoue *et al.*, 2004 a]. Vu cette complexité, une approche par modélisation mathématique est adoptée pour trouver des solutions optimales aussi bien pour l'élicitation que pour la composition du milieu de culture des CRs de *D. stramonium* (objet du présent travail de recherche). En effet, la modélisation servira en premier lieu à cribler et à sélectionner les composantes du milieu B5 les plus influentes sur la réponse à l'élicitation. En deuxième étape, l'utilisation de la modélisation mathématique servira à calculer les concentrations optimales des composantes retenues lors de la première étape pour une réponse maximale à l'élicitation en vue d'améliorer le rendement en hyoscyamine.

La présente thèse vise donc à étudier, à l'aide d'une approche fondée sur la modélisation mathématique, l'influence de la composition du milieu de culture sur la réponse à l'élicitation des CRs de *D. stramonium* en vue d'optimiser le rendement en alcaloïdes tropaniques. Elle est structurée en quatre parties :

1. La première partie vise l'obtention de matériel végétal, en l'occurrence la production des lignées performantes de CRs via l'infection *in vitro* des hypocotyles de *D. stramonium* à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* (section 2 : article publié dans la *Revue des technologies avancées CDTA*, 2008. 10 : 39-44).
2. La deuxième partie porte sur l'utilisation de la modélisation mathématique pour le criblage des éléments les plus influents du milieu de culture B5 sur la réponse à l'élicitation moyennant un modèle linéaire (section 3 : article publié dans *Plant Science*, 2009. 177: 81–87).
3. La troisième partie consiste à utiliser la fonction de désirabilité en vue d'une optimisation multiréponse (biomasse et contenu en hyoscyamine) de l'élicitation à l'acide jasmonique (section 4.1).
4. La quatrième et dernière partie porte sur l'optimisation des concentrations de 3 éléments ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et saccharose) du milieu B5 [Gamborg, 1968] à l'aide de la méthode des surfaces de réponse (RSM) moyennant un modèle mathématique quadratique (section 4.2).

## 2. Chevelu racinaire de *Datura stramonium* L. induit par *Agrobacterium rhizogenes* en vue de la production d'alcaloïdes par voie biotechnologique.

R. Amdoun<sup>1-2</sup>, L. Khelifi<sup>1\*</sup>, M. khelifi-Slaoui<sup>1</sup>, B. Zarouri<sup>1</sup>, S. Amroune<sup>1</sup>, A. Morsli<sup>1</sup>, Y. Boutoumi<sup>3</sup> et Z. Krimi<sup>4</sup>

1: Laboratoire de Ressources Génétiques et Biotechnologie, Institut National Agronomique (El-Harrah) – Alger.

2 : Institut National de Recherche Forestière. BP 37, Cheraga -Bainem.

3 : Laboratoire de Chimie Organique, Université de Saad Dahleb – Blida.

4: Laboratoire de Microbiologie, Université de Saad Dahleb – Blida.

**Abstract.** This survey is aimed at the protocol of induction, characterization and selection of effective *Datura stramonium* L. hairy root lines. To obtain hairy roots, the *Agrobacterium rhizogenes* strain has a meaningful effect on all parameters studied as well as on the phenotype and tropism of hairy root. The bacteria suspension medium influences only the formation time of roots and the acetyosyringone has only an effect upon the number of roots by explants. Characterization and selection of effective roots have been achieved according to strategic criteria in order to improve alkaloid biosynthesis biotechnologically such as growth parameters, total tropan alkaloids and elicitation response. Finally, four lines are retained (rapid growth, high total alkaloid content and reactivity to elicitation) on 106 obtained from the combination “*A. rhizogenes* A<sub>4</sub> strain x *D. stramonium* L.”

**Keywords:** *A. rhizogenes*, characterization, *Datura stramonium*, hairy root, response to elicitation, selection.

### 2.1. Introduction

Les métabolites secondaires produits par les végétaux sont d'un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire [Sasson, 1991]. Parmi ces métabolites, les alcaloïdes tropaniques, dont la scopolamine et l'hyoscyamine, sont déjà utilisés en pharmacologie humaine et vétérinaire [Shimomura *et al.*, 1991]. Ils sont extraits à partir de *Solanaceae* dites mydriatiques tel que le *Datura stramonium* L. qui en est particulièrement riche [Houmani, 1999].

Les racines sont le siège de la biosynthèse des alcaloïdes [Guignard *et al.*, 1985]. La biosynthèse de ces métabolites secondaires nécessite donc un tissu spécialisé, car elle est liée à la différenciation cellulaire [Fliniaux *et al.*, 2004]. Il s'avère que la production des métabolites secondaires par procédés biotechnologiques à partir du chevelu racinaire (hairy root) induit par transformation génétique à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* constitue une voie prometteuse [Giri et Narasu, 2000]. Cette dernière présente l'avantage de contrôler une large gamme de paramètres influençant directement la teneur en alcaloïdes contrairement à une culture en serre ou de plein champ.

Le mécanisme d'infection par *Agrobacterium rhizogenes* se fait en trois étapes : adhésion bactérie-plante, activation des gènes de virulence *vir* et transfert du T-DNA plasmidique vers la cellule hôte. Les gènes *vir* sont activés par trois signaux chimiques provenant de la plante blessée : les monosaccharides (glucose), le pH acide et les composés phénoliques dont l'acétyosyringone. L'effet de cette dernière

molécule a été rapporté comme étant un moyen très significatif d'augmentation de la fréquence des transformations [Hu *et al.*, 1993 in Giri et Narasu, 2000].

La réponse de la plante à la transformation génétique dépend de la souche bactérienne utilisée et de la plante en question [Ercan et Taşkin, 1999 ; Park et Facchini, 2000]. Elle dépend aussi du type d'explant utilisé. Il semblerait que chez *Datura stramonium*, les hypocotyles donnent de meilleurs résultats à la transformation que les feuilles et les cals par la souche A<sub>4</sub>. Cette aptitude serait la conséquence de la vascularisation caractérisant les hypocotyles [Amdoun *et al.*, 2006].

Les chevelus racinaires induits par transformation génétique donnent généralement des rendements accrus en métabolites secondaires comme les alcaloïdes tropaniques [Giri et Narasu, 2000 ; Giri *et al.*, 2001 ; Kovalenko et Maliuta, 2003 ; Souret *et al.*, 2003]. Ces chevelus sont très denses [Souret *et al.*, 2003], génétiquement plus stables dans le temps [Giri et Narasu, 2000 ; Kovalenko et Maliuta, 2003] et doués d'une croissance rapide [Souret *et al.*, 2003 ; Kovalenko et Maliuta, 2003] jusqu'à 2,5 cm/jour [Amdoun *et al.*, 2006], mais variable en fonction des espèces et des variétés considérées [Park et Facchini, 2000]. Les chevelus racinaires présentent par ailleurs, une croissance plagiotrope et ils sont capables de croître sans aucun apport hormonal au milieu de culture [Giri et Narasu, 2000].

La variation de la vitesse de croissance observée et les différences morphologiques chez les lignées de chevelus racinaires peuvent être attribuées, d'une part, aux différents sites d'insertion de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales, et d'autre part, au nombre de copies de l'ADN-T insérées [Furze *et al.*, 1987 in Dhakulkar *et al.*, 2005]. Donc, l'obtention par transformation génétique de lignées racinaires performantes repose sur un évènement probabiliste. En effet, chaque racine peut être considérée comme une lignée unique résultant d'un évènement de transformation également unique [Amdoun *et al.*, 2006]. Il est donc nécessaire, pour augmenter la fréquence de ces évènements et l'obtention de lignées racinaires performantes, d'optimiser les protocoles expérimentaux.

Ce travail vise à étudier quelques facteurs influençant l'induction de chevelu racinaire chez le *Datura stramonium* L. : Efficience des souches bactériennes pour la transformation, effet du milieu de suspension bactérienne et la dose d'acétosyringone additionnée aux milieux de suspensions bactériennes. En outre, l'étude se propose de caractériser et de sélectionner les lignées racinaires performantes pour augmenter la biosynthèse et la teneur en métabolites secondaires. Les critères retenues sont la biomasse a croissance rapide [Dechaux et et Boitel-Conti, 2005], réponse a l'élicitation [Poulev *et al.*, 2003] et la teneur en alcaloïdes totaux.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Matériel végétal.

Le matériel végétal utilisé est constitué de graines matures d'une population spontanée de *Datura stramonium* L. récoltées dans la Mitidja (Algérie). Elles sont mises en culture selon la méthode de Slaoui *et al.* [2006] sur le milieu MS [Murashige et Skoog; 1962] pour produire des vitrosemis. Ces derniers sont utilisés pour prélever les hypocotyles destinés à la transformation génétique par les *Agrobacterium rhizogenes*.

### 2.2.2. Production du chevelu racinaire.

Deux souches d'*Agrobacterium rhizogenes* sont utilisées : A<sub>4</sub> et K<sub>47</sub>. Elles sont cultivées à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  dans l'obscurité sur le milieu YEM (*Yeast Extrait Mannitol*) gélosé. Pour infecter les fragments d'hypocotyles issus de vitrosemis, chacune des deux souches est suspendue dans les milieux YEM et MS liquide. Afin de suractiver les gènes *vir* l'effet de 3 concentrations d'acétosyringone (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  et 60  $\mu\text{M}$  plus 1 témoin : 0  $\mu\text{M}$ ) a été étudié. Ce composé phénolique présente la propriété d'activer les gènes *vir* des souches d'*Agrobacterium* [Lee *et al.*, 1996].

L'inoculation des hypocotyles est réalisée par la suite à l'aide des suspensions bactériennes obtenues à la  $\text{DO} = 0,5 - 0,6$  (lecture faite à  $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).

Au total pour induire le chevelu racinaire, l'effet de 16 traitements a été étudié (2 souches bactériennes x 2 types de milieux x 4 concentrations d'acétosyringone) pour induire le chevelu racinaire.

Les fragments d'hypocotyles d'environ 1 cm de longueur issus de vitrosemis âgés de deux mois sont infectés séparément par les suspensions bactériennes, à l'aide de seringues, et ce, conformément aux 16 traitements préconisés. L'infection se fait par simple dépôt au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles qui sont ensuite déposés selon une polarité inversée, à raison de 4 explants par boîte de Pétri, sur le milieu MS contenant 250 mg/l de céfotaxime. Chaque traitement est répété 4 fois. Pour chaque facteur étudié, la co-culture bactérie-plant se fait à l'obscurité à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Le repiquage des hypocotyles infectés sur milieu frais est nécessaire jusqu'à l'apparition des racines transformées. Pour chaque traitement, les explants témoins sont ensemencés sur les mêmes milieux sans bactéries et/ou sans acétosyringone.

Les paramètres retenus pour étudier la réponse des explants aux traitements appliqués sont : Le taux de réactivité (pourcentage d'explants ayant formé un cal), le taux d'induction des racines (pourcentage d'explants ayant formé au moins une racine), le temps d'apparition de la première racine et le nombre de racines par explant durant 60 jours de culture.

Dès que les racines atteignent 2 cm de longueur et plus, elles sont sectionnées et remises en culture sur le milieu MS gélosé (sans hormones de croissance) contenant 250 g/l de céfotaxime destinée à éliminer la bactérie. Cette dernière concentration est maintenue dans les milieux jusqu'à l'élimination définitive de la bactérie du milieu de culture. Les racines ainsi produites sont clonées (selon la méthode de l'élongation-ramification-fragmentation) sur le milieu MS.

### **2.2.3. Caractérisation et sélection des lignées racinaires.**

Les lignées obtenues sont caractérisées et sélectionnées en fonction de leur croissance, de leur réponse à l'élicitation et de leur contenu alcaloïdique total.

*Croissance des lignées.* Les paramètres de croissance retenus sont : la biomasse (matière sèche en g), la phase de dormance et l'indice de croissance (IC). Un échantillon d'environ 0,2 g de matière fraîche et placé dans 20 ml de milieu culture B5/2 [Gomborg, 1970] additionné de 30 g/l de saccharose. Cette étape de culture dure 20 jours suivie immédiatement de la récolte des échantillons séparément. La croissance racinaire moyenne est alors calculée sur la base des résultats de 3 répétitions.

*Réponse à l'élicitation.* L'acide jasmonique est reconnu pour ses propriétés d'éliciteur chez les plantes supérieures [Herbert, 2001]. Deux concentrations d'acide jasmonique ont été testées pour étudier la réponse à l'élicitation des lignées sélectionnées. Dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, environ 0,2 g de matière fraîche sont cultivées dans le milieu B5/2, additionné de 30 g/l de saccharose. Après 15 jours de culture, les lignées sont élicitées séparément par l'acide jasmonique à deux concentrations différentes : 1µg/ml et 10 µg/ml. La réponse à l'élicitation après 24 heures et/ou 48 heures après élicitation est mesurée par l'extraction du contenu alcaloïdique total selon le protocole ci-dessous. La teneur moyenne en alcaloïdes totaux est calculée sur la base des résultats de trois répétitions. La réponse à l'élicitation est exprimée en pourcentage par rapport au témoin non élicité.

*Extraction des alcaloïdes totaux.* La poudre végétale (200 mg) séchée à 40°C pendant 48 heures puis traitée avec 10 ml d'hexane pendant 5 min est ensuite épuisée avec 20 ml d'HCl (0,1N) durant 20 min. Après 5 min de centrifugation à 5000 rpm, le surnageant est alcalinisé avec du NH<sub>4</sub>OH jusqu'au pH 10. La solution aqueuse est ensuite filtrée puis épuisée 3 fois par du CHCl<sub>3</sub> à volumes égaux (v/v). Un séchage du triple volume de CHCl<sub>3</sub> récupéré est effectué par du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Après filtration, la solution de CHCl<sub>3</sub> est évaporée à sec. Le résidu sec ainsi obtenu correspond aux alcaloïdes totaux. L'extraction à partir du milieu de culture est faite selon le protocole suivant : filtration du milieu de culture, alcalinisation (à pH10) par une solution de NH<sub>4</sub>OH, concentration de la solution aqueuse suivie d'un épuisement 3 fois par du CHCl<sub>3</sub> (v/v), séchage du triple volume de CHCl<sub>3</sub> à l'aide du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre suivi d'une filtration et d'une évaporation à sec, le résidu sec ainsi obtenu correspond aux alcaloïdes totaux.

#### 2.2.4. Analyses statistiques.

L'analyse de la variance et le test de Newman & Keuls au seuil de 5% sont utilisés pour traiter les résultats obtenus. Les moyennes suivies de la même lettre alphabétique sur les graphiques ne sont pas significativement différentes, et les barres représentent les écarts types au seuil 5%.

### 2.3. Résultats et discussions

#### 2.3.1. Effet des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* sur l'induction des chevelus racinaires.

L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des souches étudiées sur l'ensemble des paramètres considérés. En effet, de nombreuses études ont montré que la variation dans l'efficacité d'induction de chevelus racinaires dépend fortement des souches d'*A. rhizogenes* utilisées pour l'infection. Park et Facchini [2000] rapportent que pour la transformation de l'*Opium poppy*, trois souches d'*A. rhizogenes* : 13333, R1000 et R1200rolD donnent un taux de réactivité supérieur à 90%, alors que 2 autres souches 15834 et C58CL infectent 80 à 85% des explants et induisent la formation de cals. Dans notre cas, les taux de réactivité enregistrés sont de l'ordre de 99% et 77% respectivement pour A<sub>4</sub> et K<sub>47</sub> (Tableau 1).

Tableau 1. Effet des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* sur l'induction du chevelu racinaire.

souches	Taux de réactivité (%)	Taux d'induction (%)	Temps d'apparition de la première racine (jours)	Nombre de racines/explant
A <sub>4</sub>	99.0	44.0	28.0 ± 8.0	1.7 ± 0.7
K <sub>47</sub>	77.0	7.0	53.0 ± 7.0	0.3 ± 0.2

Le taux d'induction de chevelus racinaires varie également en fonction des souches bactériennes [Kovalenko et Maliuta, 2003] et de l'espèce végétale utilisée [De Cleen et De ley, 1981 in Dhakulkar *et al.*, 2005]. En utilisant la souche A<sub>4</sub> pour la transformation génétique d'*Artemisia annua*, le taux d'induction de chevelus racinaires obtenu est de 75% [Giri *et al.*, 2001]. Tao et Li [2006] ont obtenu un taux de 55% avec *Torenia forniери* en utilisant la même souche. Dans notre cas des taux d'induction de 44% et 7% ont été obtenus respectivement avec les souches A<sub>4</sub> et K<sub>47</sub> (Tableau 1).

Kovalenko et Maliuta [2003], indiquent que le temps d'apparition des racines transformées au niveau du site d'infection par *A. rhizogenes* varie de 30 à 60 jours pour *Glycyrrhiza sp.* Nos résultats montrent que le temps d'induction des chevelus racinaires dépend de la souche d'*A. rhizogenes* utilisée. En effet, nous avons enregistré en moyenne 28 et 53 jours respectivement pour les souches A<sub>4</sub> et K<sub>47</sub> (Tableau 1).

Les souches d'*A. rhizogenes* présentent également un effet significatif sur le nombre de racines transformées induites par explant. Chez *Opium poppy* le nombre de racines induites par explant varie de 3 à 4 selon la souche utilisée [Park et Facchini, 2000]. Dans notre cas le nombre de racines par explant varie en moyenne de 0,3 pour la souche K<sub>47</sub> à 1,7 pour la souche A<sub>4</sub> (Tableau 1).

Les résultats précédents montrent donc que la souche A<sub>4</sub> est de loin la plus virulente et par conséquent la plus performante pour l'induction de chevelus racinaires chez *D. stramonium* par rapport à la souche K<sub>47</sub>. En outre, les cals induits par la souche A<sub>4</sub> sont plus volumineux que ceux induits par la souche K<sub>47</sub> et le nombre total de racines induites obtenues est de 106 pour la souche A<sub>4</sub> et 13 pour la souche K<sub>47</sub>. Ces résultats corroborent ceux de nombreux auteurs ayant travaillé sur d'autres espèces [Lambert *et al.*, 1998 ; White *et al.*, 1982 ; Liang *et al.*, 1998 ; Giri *et al.*, 2001 ; Amdoun *et al.*, 2006 ; Tao et Li, 2006].

Du point de vue phénotypique, les racines induites diffèrent selon qu'elles soient induites par la souche A<sub>4</sub> ou K<sub>47</sub>. Le tableau 2 résume les résultats correspondants.

Tableau 2. Variation du type de racines induites par les souches A<sub>4</sub> et K<sub>47</sub>.

Caractéristiques		Souches d' <i>A. rhizogenes</i>	
		A <sub>4</sub>	K <sub>47</sub>
Tropisme		Plagiotrope	Geotrope positif
Phénotypes des racines induites	Diamètre	Epaisses	Grêles
	Longueur	Longues	moyennes
	Ramification	Très ramifiées	Peu ramifiées
	Poils	abondant	rare

### 2.3.2. Effet du milieu de suspension bactérienne sur l'induction des chevelus racinaires

L'analyse de la variance des résultats obtenus pour les différents paramètres révèle un effet significatif de la souche bactérienne (A<sub>4</sub>) uniquement pour le temps d'apparition de la première racine avec un écart d'environ 12 jours entre les deux milieux (Figure 1). Pour ce paramètre, le milieu YEM s'est montré plus performant que le milieu MS. Les autres paramètres ne sont pas influencés (aucun effet significatif) par le milieu de suspension bactérienne. Ceci serait dû au fait que le milieu MS contient du glucose qui est un activateur des gènes *vir*, ce qui permettrait une certaine compensation par rapport aux milieux YEM. Ceci pourrait expliquer l'absence de différences significatives entre les deux milieux de suspensions sur ¾ des paramètres étudiés.

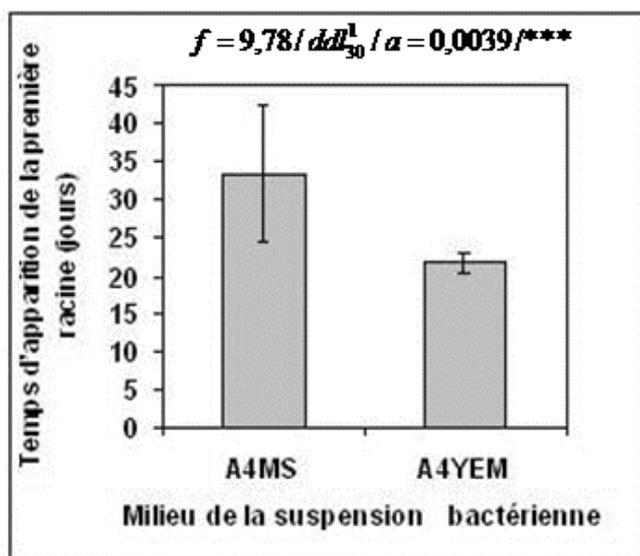


Figure 1. Effet du milieu de la suspension bactérienne sur le temps d'apparition de la première racine induite sur les hypocotyles de *Datura stramonium*.

### 2.3.3. Effet des concentrations d'acétosyringone sur l'induction des chevelus racinaires

Tao et Li [2006], rapportent que la concentration d'acétosyringone affecte le taux d'induction de chevelus racinaires. A la concentration optimale de 30  $\mu\text{M}$  un taux d'induction de 80% est obtenu contre 25% pour les explants infectés avec la bactérie sans acétosyringone dans le milieu de culture. Pour ce paramètre, nos résultats ne montrent pas de différence significative entre les concentrations d'acétosyringone appliquées.

Giri *et al.* [2001], indiquent que la virulence est radicalement influencée par l'acétosyringone. En effet, l'ajout de 50 $\mu\text{M}$  d'acétosyringone à la suspension bactérienne et aux milieux de co-culture (milieu MS), réduit le temps d'induction de chevelus racinaires d'une semaine par rapport aux explants témoins (suspensions sans acétosyringone). Aucun effet significatif pour le temps d'apparition de la première racine n'est observé dans la présente étude.

L'analyse de la variance montre que les concentrations d'acétosyringone n'affectent que le nombre de chevelus racinaire par explant. La concentration optimale est de 10 $\mu\text{M}$  (Figure 2). De faibles concentrations d'acétosyringone seraient donc suffisantes pour la suractivation des gènes *vir* de la souche A<sub>4</sub>.

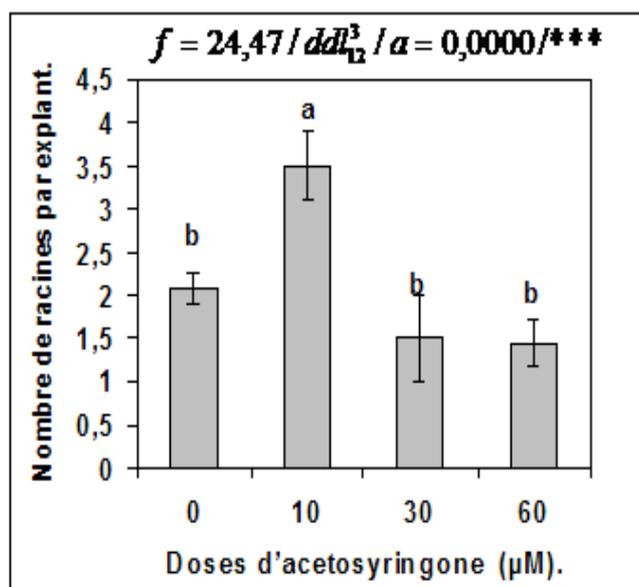


Figure 2. Effet des concentrations d'acétosyringone sur le nombre de racines par explant chez *Datura stramonium* L. après 60 jours de la transformation.

Le fait que les meilleurs résultats soient obtenus avec les faibles concentrations d'acétosyringone pourrait être attribué à l'espèce végétale en question. En effet, certaines plantes ne nécessitent pas la suractivation des gènes *vir* de l'*Agrobactérium rhizogenes* pour qu'elles réagissent à l'infection. Kovalenko et Maliuta [2003] ont observé la formation de chevelus racinaires chez les explants de *Glycyrrhiza sp.* Infectées par la souche 8196 d'*A. rhizogenes* avec ou sans activation par l'acétosyringone. Par ailleurs, Satchel *et al.* [1985] in Tao et Li [2006], rapportent que certaines plantes récalcitrantes peuvent être transformées en suractivant les gènes *vir* de la bactérie par des signaux chimiques tel que l'acétosyringone ou bien par la culture de l'*Agrobacterium* dans un milieu ayant contenu des tissus blessés de la plante à infecter.

Les résultats de cette étude montrent que le *Datura stramonium* n'est pas une espèce récalcitrante car elle répond à l'infection par *A. rhizogenes* même sans apport d'acétosyringone. Néanmoins, le nombre de chevelus racinaires par explant est influencé par la présence de l'acétosyringone dans le milieu de culture. Ce qui constitue en soit un résultat très intéressant. En effet, l'obtention d'un grand nombre de lignées racinaires est très recherché dans tout programme de sélection ce qui permettrait d'augmenter la probabilité d'induire des lignées efficaces en terme de production de biomasse et d'alcaloïdes.

### 2.3.4. Caractérisation et sélection des lignées racinaires.

#### 2.3.4.1. Croissance et contenu en alcaloïdes totaux.

Moyano *et al.* [1999] rapportent que les chevelus racinaires induits chez le tabac, le *Duboisia* et le *Datura metel* formant des cals après leur mise en culture sont caractérisés par un faible taux de

production d'alcaloïdes. Les mêmes observations ont été faites par Fliniaux *et al.* [2004]. C'est la raison pour laquelle nous avons éliminé lors de la sélection toutes les lignées callogènes.

Les observations préliminaires sur la vitesse de croissance et les caractères morphologiques des racines induites ont permis de faire une première sélection. Au sein des lignées induites par la même souche et isolées à partir d'un même explant, des variations importantes au niveau du tropisme et au niveau phénotypique ont été relevées. Pour les lignées induites par la souche A<sub>4</sub>, par exemple, certaines racines ne parviennent plus à démarrer après leur excision puis leur transfert sur le milieu MS. Cependant, d'autres lignées manifestent une croissance normale. Par ailleurs, une callogenèse plus ou moins prononcée a été observé chez certaines lignées isolées (Figure 3).

Parmi les 106 racines obtenues avec la souche A<sub>4</sub>, 28 lignées ont été sélectionnées. Ces dernières sont maintenues en culture sur le milieu MS et sont multipliées périodiquement, tous les 20 à 25 jours. Quatre lignées parmi les 28 ont été retenues pour étudier leur croissance et leur contenu en alcaloïdes totaux. Il s'agit de AK1, AK2, AZK1 et AZK2 dont la croissance ainsi que le contenu en alcaloïdes totaux sont rapportés dans le tableau 3.

Les lignées sélectionnées présentent des croissances et des contenus alcaloïdiques qui diffèrent d'une lignée à une autre malgré leur origine unique et leur induction par la même souche bactérienne A<sub>4</sub> (Tableau 3). Aucune présence d'alcaloïde n'a été détectée dans les milieux de culture.

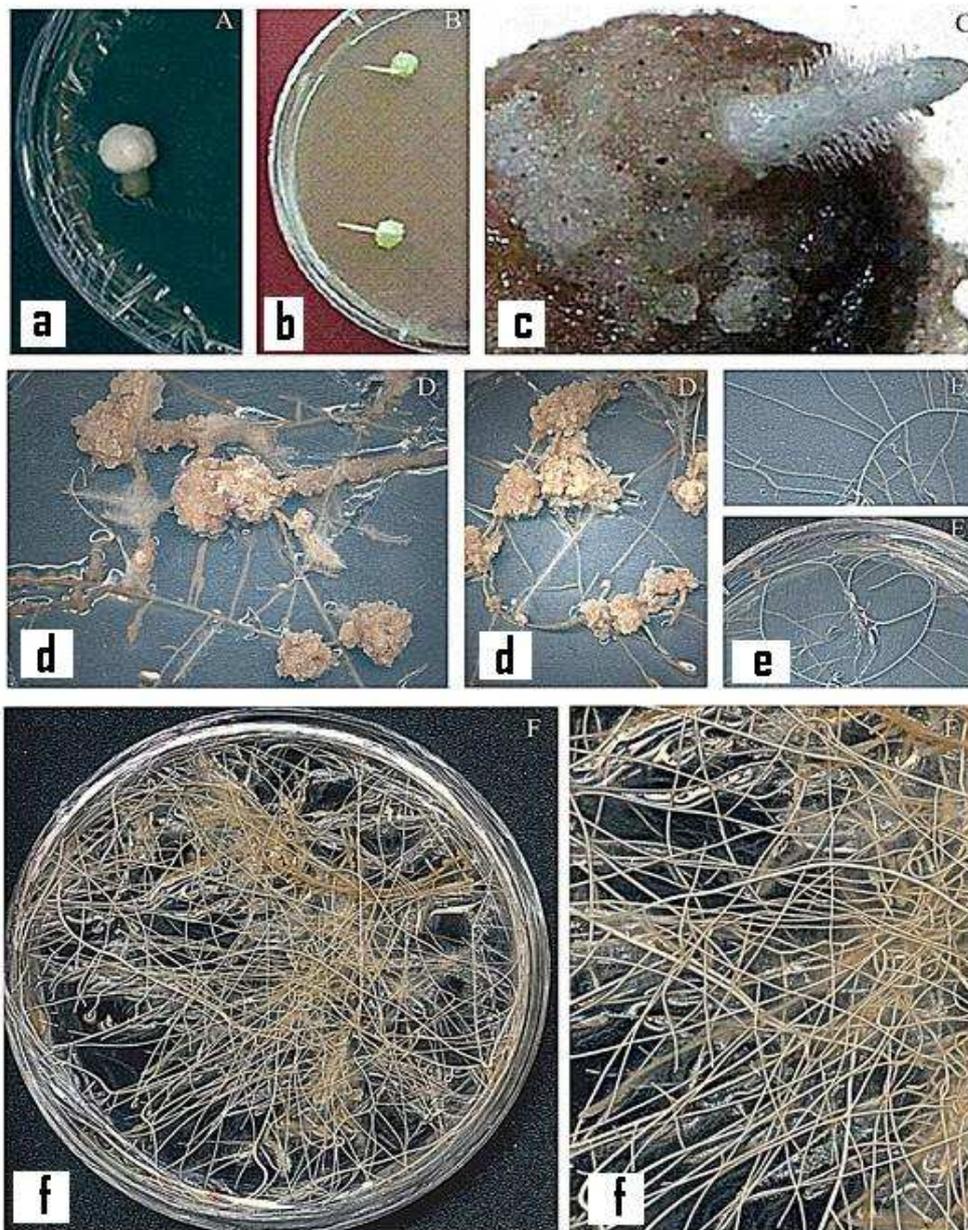


Figure 3. Production de chevelus racinaires et sélection (souche  $A_4 \times Datura\ stramonium\ L.$ ).

**a** : Apparition d'un cal au site de l'infection. **b, c** : racines sur explants avant excision. **d** : lignée callogène non sélectionnée. **e** : lignée de faible croissance (élongation-ramification) non sélectionnée (après 20 jours de culture). **f** : lignée performante, dense et non calogène (après 20 jours de culture).

Les différents sites d'insertion et le nombre de copies de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales lors de l'infection pourraient être à l'origine des variations des propriétés de croissance et des différences morphologiques chez les lignées racinaires induites [Furze *et al.*, 1987 in Dhakulkar *et al.*, 2005].

Tableau 3. Paramètres de croissance et contenu alcaloïdiques des 4 lignées sélectionnées après 20 jours de culture ( $X_i = 2,4 \pm 0,2$  g MS/l),  $X_i$  : poids sec de la biomasse initiale.  $X_f$  : poids sec de la biomasse finale.

lignées	Paramètres de croissance			Alcaloïdes totaux	
	Biomasse	Phase de latence	Indice de croissance	Production spécifique	Productivité
	Poids sec final ( $X_f$ ) g l <sup>-1</sup>	jours	IC = $(X_f - X_i)/X_i$	Mg MS g <sup>-1</sup>	Mg l <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup>
AK1	12.2 ± 0.6	0	4.0	4.4 ± 0.1	2.2
AZK	6.7 ± 1.0	0	1.8	3.7 ± 0.1	1.0
AZK	3.8 ± 0.8	2	0.6	3.3 ± 0.01	0.5
AK2	3.3 ± 0.4	4	0.4	2.8 ± 0.4	0.4

#### 2.3.4.2. Réponse à l'élicitation.

Les lignées présentent des réponses différentes. La réponse à l'élicitation aux faibles concentrations de l'acide jasmonique se maintient durant les 48 premières heures, alors que la réponse à l'élicitation aux fortes concentrations diminue au delà. Pour la même durée d'élicitation, la réponse est beaucoup plus importante pour les fortes doses que pour les faibles concentrations de l'acide jasmonique (Tableau 4).

Les différences de réponse à l'élicitation chez les lignées sélectionnées de *Datura stramonium* transformées par la souche A<sub>4</sub> pourraient aussi être attribuées aux différents sites d'insertion de l'ADN-T et le nombre de copie d'ADN-T insérées dans le génome des cellules végétales [Furze *et al.*, 1987 in Dhakulkar *et al.*, 2005]. Ceci conduirait à des comportements différents entre les lignées, même si elles sont issues du même couple de transformation : *D. stramonium*-souche A<sub>4</sub>. Par ailleurs, la réponse positive à l'élicitation, est en partie due à l'éthanol qui est le solvant utilisé pour préparer l'acide jasmonique [Spanllansky *et al.*, 2000].

Tableau 4. Caractérisation des lignées vis-à-vis de la réponse à l'élicitation (teneur en alcaloïdes totaux : mg.g<sup>-1</sup> de matière sèche).

lignées	heures	EtOH	%	1 µg/ml	%	10 µg/ml	%	observations
AK1	24	2.99 ± 0.100	35.39	3.06 ± 0.110	38.40	4.88 ± 0.600	120.63	Réactive
	48	3.12 ± 0.025	41.11	3.44 ± 0.050	55.42	3.81 ± 0.030	72.13	
AZK1	24	2.39 ± 0.200	12.38	2.45 ± 0.070	12.20	4.22 ± 0.080	98.58	Réactive
	48	2.59 ± 0.025	24.60	2.44 ± 0.150	15.04	3.39 ± 0.250	59.4	
AZK2	24	1.40 ± 0.200	30.84	1.35 ± 0.050	26.16	2.19 ± 0.050	104.98	Réactive
	48	1.44 ± 0.040	34.26	1.55 ± 0.130	44.85	1.65 ± 0.040	54.82	
AK2	24	0.52 ± 0.050	3.28	0.52 ± 0.090	3.28	0.52 ± 0.040	3.28	Non Réactive
	48	0.52 ± 0.025	3.94	0.53 ± 0.030	5.26	0.53 ± 0.110	4.6	

## 2.4. Conclusion

La sélection des lignées racinaires se fait selon des critères de production et de biomasse. En effet, chaque racine peut être considérée comme une lignée unique même si elle provient de la même combinaison "génotype végétal x bactérie". Dans ce travail, sur un totale de 106 racines induites par la

meilleure combinaison "*A. rhizogenes* (souche A<sub>4</sub>) x *D. stramonium*", seules 04 lignées sont performantes et donc retenues.

La présente étude montre que les conditions optimales pour l'induction des chevelus racinaires sont l'utilisation de la souche A<sub>4</sub> suspendue dans le milieu de culture YEM supplémenté avec 10 mM d'acetosyringone permettant sa suractivation.

### 3. Modélisation de la réponse biochimique *in vitro* : Influence des éléments minéraux et de l'élicitation sur le contenu en alcaloïdes tropaniques des CRs de *D. stramonium*

R. Amdoun<sup>a</sup>, L. Khelifi<sup>a\*</sup>, M. Khelifi-Slaoui<sup>a</sup>, S. Amroune<sup>a</sup>, E.-H. B Benyoussef<sup>b</sup>, Dao Vu Thi<sup>c,d</sup>, C. Assaf-Ducrocq<sup>d</sup>, E. Gontier<sup>d</sup>.

*a: Laboratoire des Ressources Génetiques et Biotechnologie, Institut National Agronomique, 16200 El-Harrach, Alger, Algérie*

*b: Laboratoire de valorisation des énergies fossiles, l'Ecole Nationale Polytechnique, 16200 El-Harrach, Alger, Algérie*

*c : Laboratoire Agronomie et Environnement, UMR 1121-INPL-INRA, ENSAIA, 2, avenue Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

*d: Unité de recherche EA3900 BioPI-UPJV "Biologie des Plantes et contrôle des insectes ravageurs, Université 'de Picardie Jules Verne', Faculté des Sciences, Ilot des Poulies, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France .*

**Abstract.** Secondary metabolites are mostly involved in the relationship of the organism with its environment, e.g. in plant defence mechanisms or as signal compound; their synthesis is often induced by different kinds of biotic and/or abiotic stresses. In general the major strategies to improve their productivity are: the optimization of growth and production media or induction of secondary metabolite pathways by elicitors and metabolic engineering. From this point of view, elicitation is largely employed as a strategy to mimic stress effects, which then lead to a physiological response involving secondary metabolite synthesis and accumulation into the hairy root (HR). Thus, studies on the response to elicitation for HR in accordance with nutritional status are necessary. In the present study, which focuses on tropane alkaloid production in *Datura stramonium* L. hairy roots, the effects of minerals in the B5 culture medium [O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, Exp. Cell Res. 50 (1968) 151–158] and elicitor (jasmonic acid) are studied using a mathematical model approach (screening analysis) and factorial design  $2^3$  was carried out to study the response to elicitation in accordance with nutritional status of HR for  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  and  $[\text{Ca}^{2+}]$ . The modelization of different minerals effects showed a response to elicitation only after the 8th day of cultivation. The study of models coefficients revealed that nitrate  $[\text{NO}_3^-]$ , phosphorus  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  and calcium  $[\text{Ca}^{2+}]$  levels and combinations  $[\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}]$  and  $[\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}]$  were positive with elicitation; however, interaction effects  $[\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  and  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}]$  were negative. The coefficients position on the 28th day of cultivation, with the Pareto chart allowed to adjust the mathematical model by eliminating the no significant effects  $[\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ,  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}]$  and  $[\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}]$ . As a result, we show that simulation with the adjusted model allows predicting the response to elicitation in accordance with the nutritional state of HR in nitrate and calcium. The measured values on the 28th day were statistically identical with calculated values obtained by mathematical models. These results revealed that HR, with limited nitrate, showed lower response to elicitation by jasmonic acid. Moreover, the adjusted model, of first degree, was not predictably beyond the experimental domain. As a general conclusion,  $\text{NO}_3^-$  (62.5 mM) must be added to the B5 medium at the beginning of the culture. The lack of these compounds reduced alkaloid metabolism, even in combination with elicitor treatments like jasmonic acid. The same trend was observed with  $\text{Ca}^{2+}$  (11.1 mM),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (6.06 mM) and nitrate/calcium ratio (62.5 mM/11.1 mM), which also increased alkaloid production when combined with jasmonic acid 10 mM. These positive effects appeared at the 2nd week after initiation of the culture.

**Keywords:** *Datura stramonium*, Elicitation, Hyoscyamine, Minerals nutrients, Modelization, Screening analysis.

### 3.1. Introduction

Les alcaloïdes tropaniques tels que l'hyoscyamine et la scopolamine (H&S) sont des composés végétaux naturels utilisés comme principes actifs en industrie pharmaceutique. Ces molécules sont abondantes dans de nombreuses espèces de *Solanaceae* [Parr *et al.*, 1990]. Vu que le métabolisme secondaire des espèces cultivées est soumis à des fluctuations de rendement comme celles liées au climat [Guignard *et al.*, 1985], des efforts considérables ont été consacrés pour mettre au point des procédés biotechnologiques (bioréacteurs) en vue de produire l'H&S. Le chevelu racinaire (CR) produit par transformation à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* est souvent décrit comme un matériel végétal de choix pour la production des alcaloïdes *in vitro*. Il est caractérisé par une croissance rapide et sa production en métabolites secondaires peut dépasser celle de la plante entière [Bourgau *et al.*, 1997 ; Kovalenko *et al.*, 2003 ; Souret *et al.*, 2003].

L'optimisation de la composition du milieu de culture [Robert *et al.*, 1997 ; Boitel-Conti *et al.*, 2000 ; Mulabagal et Tsay, 2004] et l'induction des voies métaboliques secondaires par les éliciteurs [Poulev *et al.*, 2003] constituent deux grandes stratégies biotechnologiques pour améliorer la productivité en métabolites secondaires.

La production des métabolites secondaires dépend de nombreux facteurs le statut nutritionnel et l'élicitation. En effet, les éléments minéraux tels que le nitrate [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] [Nussbaumer *et al.*, 1998 ; Lanoue *et al.*, 2004], le calcium [Ca<sup>2+</sup>] [Gontier *et al.*, 1994 ; Pinñol *et al.*, 1999], le potassium [K<sup>+</sup>], le soufre [SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>] [Sikuli *et al.*, 1997] et les hydrates de carbone [Saenz-Carbonell et Loyola-Vargas 1996; Nussbaumer *et al.*, 1998], sont connus pour leurs influences sur la biomasse et le contenu en alcaloïdes des CRs. Par ailleurs, l'élicitation peut induire la production de métabolites secondaires en particulier ceux impliqués dans la défense des plantes tels que les alcaloïdes. Parmi les différents d'éliciteurs, l'acide jasmonique est considéré comme l'un des plus efficaces chez les plantes supérieures [Herbert, 2001]. L'acide jasmonique est produit dans les plantes en réponse à un stress [Doares *et al.*, 1995]. Il active la transcription des gènes de défense [Blechert *et al.*, 1995]. Son accumulation après élicitation à l'extrait de levure, a été observé dans les cellules de *Rauvolfia canescens* et *Eschscholtzia californica* [Gundlach *et al.*, 1992]. Il semble être impliqué dans les événements de signalisation qui activent l'expression de gènes de défense chez les plantes en réponse au stress [Gundlach *et al.*, 1992 ; Wasternack et Parthier, 1997]. L'ajout de l'acide jasmonique au milieu de culture des CRs de *Brugmansia candida*, induit une amélioration de 12 fois plus élevée du contenu en hyoscyamine [Spollansky *et al.*, 2000].

Lorsque la plante est limitée en éléments nutritifs, les mécanismes de défense sont induits [Harborne, 1997]. Dunlop et Curtis [1991] ont montré que la production de solavetivone dans les CRs de *Hyoscyamus muticus* peut être améliorée de façon synergique en limitant le phosphate dans le milieu de culture. Cet effet a été plus prononcé lorsque une élicitation aux extraits de champignons est appliquée [Dunlop et Curtis, 1991]. Une limitation en phosphate couplée à une élicitation constituent

donc une approche intéressante pour améliorer la production de métabolites secondaires. Dans ce contexte, la compréhension du comportement physiologique des CRs est nécessaire pour l'optimisation et la conduite de leur culture [Lanoué *et al.*, 2004]. L'étude de la relation entre la réponse à l'élicitation et le statut nutritionnel est donc essentielle. En se basant principalement sur les travaux de Nussbaumer *et al.* [1998] sur le  $\text{NO}_3^-$  et de Gontier *et al.* [1994] sur le  $\text{Ca}^{2+}$ , l'étude des effets simples et combinés des éléments minéraux et de l'élicitation à l'acide jasmonique a été réalisée selon une approche par modélisation mathématique. La méthode des plans d'expériences (EDM : Experimental Design Methode) décrite par Benyoussef *et al.* [2000] a été employée pour déterminer la réponse à l'élicitation des CRs de *Datura*. L'EDM utilise des outils algèbro-statistiques pour établir et analyser la relation entre une réponse  $Y$  et les variables  $x_i$ , où la fonction générale est  $Y = f(x_i)$  [Goupy, 1990].

Il est inutile de modéliser un facteur non significatif sur la réponse étudiée [Goupy, 1990 ; Goupy et Creighton, 2006]. La technique dite « *screening analysis* » (criblage, première partie de l'EDM) est généralement effectuée afin d'identifier les facteurs les plus significatifs (principaux éléments nutritifs). En effet, parmi les différents éléments minéraux, tous ne sont pas significatifs sur le rendement en alcaloïdes après élicitation. La technique du *screening analysis* permet d'identifier les facteurs influents et comprendre le système. Néanmoins, sa pertinence est limitée au domaine expérimental. Cependant, la méthodologie de surface de réponse (deuxième partie de l'EDM), n'est pas limitée [Box et Draper, 1987 ; Goupy, 1999].

La modélisation est un outil puissant pour construire un prototype virtuel d'étude en économisant le temps. L'EDM est généralement appliquée en engineering et en chimie industrielle, mais cette approche n'est pas très utilisée pour les systèmes biologiques. Dans ce travail, nous avons appliqué la technique du criblage (plan factoriel  $2^k$ ) à un modèle biologique. L'objectif est de présenter un modèle mathématique traduisant la réponse biochimique (production des alcaloïdes tropaniques) des CRs de *Datura stramonium* en fonction des éléments minéraux du milieu de culture et de l'élicitation.

## 3.2. Matériel et méthodes

### 3.2.1. Obtention et culture des CRs

Les hypocotyles âgés de 2 mois issus de semis de graines matures de *D. stramonium* récoltées en Mitidja à (Algérie) partir des plantes sauvages ont été utilisés pour une transformation génétique avec la souche  $A_4$  d'*A. rhizogenes*. Les bactéries ont été cultivées dans l'obscurité à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  sur le milieu YEM (Yeast Extrait Mannitol) solidifié avec de l'agar. L'inoculation des hypocotyles a été réalisée à l'aide d'une suspension bactérienne présentant une  $D_0$  de 0,5 à 0,6 (lecture à  $\lambda = 600$  nm). Les fragments d'hypocotyles d'environ 1 cm de longueur ont été infectés par la suspension bactérienne à l'aide de seringues (4 explants dans des boîtes de Petri). L'infection a été réalisée par un simple dépôt sur la partie basale des fragments d'hypocotyles. Les explants ont été placés ensuite sur milieu MS supplémenté avec 250 mg/l de céfotaxime. La co-culture fragments d'hypocotyle-bactérie a

été effectuée à l'obscurité à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . S'ensuivent des transferts réguliers des hypocotyles infectées sur des milieux MS frais jusqu'à l'apparition de racines induites.

Après vingt jours de l'infection (co-culture), les racines transformées apparaissent sur le site de l'infection. Lorsque les racines néoformées atteignent 2-3 cm, elles sont excisées et transplantées sur le milieu de culture MS sans hormones additionné de 250 mg/l de céfotaxime dans le but de bloquer la croissance bactérienne. Après une étape de caractérisation - sélection, une lignée performante de CR a été retenue comme matériel expérimental vue quelle présente une croissance rapide, une teneur élevée en alcaloïdes et une bonne réactivité à l'élicitation. Cette lignée est multipliée tous les 20 à 25 jours sur le milieu de culture B5 frais (sans hormone de croissance) contenant 3% de saccharose. Les cultures de cette partie de l'expérimentation sont réalisées dans l'obscurité à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2. Expériences avec les éléments minéraux.

Les premières expériences visaient à déterminer quels ions [ $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ] et à quelles concentrations étaient les plus influents sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes. Le milieu de culture Gamborg B5 [1968] a été retenu comme témoin. Ce milieu est optimal pour la culture des CRs de *Solanaceae* comme le *Datura*. Il contient 25 mM de [ $\text{NO}_3^-$ ], 1,1 mM de [ $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ], 25 mM de [ $\text{K}^+$ ], 1,0 mM de [ $\text{Ca}^{2+}$ ] et 1,0 mM de [ $\text{Mg}^{2+}$ ].

Les pointes de racines (0,3 g de poids frais) ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml du milieu de culture sans hormone de croissance mais contenant 3% de saccharose. Différentes concentrations minérales ont été testées:  $\text{NO}_3^-$  (5 mM, 62,5 mM et 125 mM),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (0,5 mM, 3,58 mM et 6,06 mM),  $\text{K}^+$  (5 mM, 62,5 mM et 125 mM),  $\text{Ca}^{2+}$  (0,5 mM, 6,1 mM et 11,1 mM) et  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 mM, 6,01 mM et 11,01 mM) (Tableau 5).

Le calcul des concentrations du nitrate a été fait selon une suite numérique de type  $D_{n+1} = Dn + q$ , où  $q = 12,5$  (B5 = 25 mM de  $\text{NO}_3^-$ ;  $q = 25/2$  mM), sauf pour la plus faible concentration (5 mM de  $\text{NO}_3^-$ ). Les concentrations ainsi calculées sont: 37,5 mM, 50 mM, 62,5 mM, 75 mM,...etc. et 125 mM. Pour des raisons pratiques, seules les concentrations 5 mM, 25 mM (témoin), 62,5 mM, et 125 mM ont été testées. La même procédure a été appliquée pour chaque élément.

Tableau 5. Définition des différents milieux testés.

	Composition des milieux testés en ions : N, P, K, Ca et Mg (mM)				
	N O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	C a <sup>2+</sup>	M g <sup>2+</sup>
B5 (témoin) <sup>a</sup>	25. 00	1.1 0	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (5 N)	5.0 0	1.1 0	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (62.5 N)	62. 50	1.1 0	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (125 N)	12 5.00	1.1 0	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (0.5 P)	25. 00	0.5 0	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (3.58 P)	25. 00	3.5 8	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (6.06 P)	25. 00	6.0 6	25. 00	1. 00	1. 00
B5 (5 K)	25. 00	1.1 0	5.0 0	1. 00	1. 00
B5 (62.5 K)	25. 00	1.1 0	62. 50	1. 00	1. 00
B5 (125 K)	25. 00	1.1 0	12 5.00	1. 00	1. 00
B5 (0.5 Ca)	25. 00	1.1 0	25. 00	0. 50	1. 00
B5 (6.1 Ca)	25. 00	1.1 0	25. 00	6. 10	1. 00
B5 (11.1 Ca)	25. 00	1.1 0	25. 00	1 1.10	1. 00
B5 (0.5 Mg)	25. 00	1.1 0	25. 00	1. 00	0. 50
B5 (6.01 Mg)	25. 00	1.1 0	25. 00	1. 00	6. 01
B5 (11.01 Mg)	25. 00	1.1 0	25. 00	1. 00	1 1.01

<sup>a</sup> les valeurs sont calculées à partir de la composition du milieu B5 de base [Gamborg *et al.*, 1968].

Afin d'éviter d'autres modifications du milieu en raison de l'ajout de certains éléments accompagnateurs, la forme de chaque élément a été choisie avec soin : HNO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> et Mg(OH)<sub>2</sub> ont été ajoutés dans le milieu avant l'ajustement du pH à 5,8 selon les travaux de Dechaux et Boitel-Conti [Dechaux et Boitel-Conti, 2005]. La culture des CRs a été réalisée dans l'obscurité à 26 ± 1°C. La consommation des différents minéraux a été analysée à partir du milieu de culture, par spectrophotométrie selon les protocoles de Savouré [1980] tous les 4 jours pendant 28 jours. Toutes les expériences de culture ont été réalisées avec 3 répétitions.

### 3.2.3. Criblage (*screening analysis*) et développement du modèle mathématique: statut nutritionnel et réponse à l'élicitation.

La deuxième partie de nos expériences a été menée pour étudier la réponse à l'élicitation en fonction de l'état nutritionnel des CRs des éléments les plus influents. À l'aide de la technique du criblage, un modèle mathématique a été élaboré afin d'étudier la cinétique des effets individuels et d'interactions des minéraux retenus.

Le criblage consiste à déterminer un minimum d'essais pour écrire un modèle mathématique [Dugué et Girault, 1969]. Il existe plusieurs plans expérimentaux pour le « *screening analysis* » tel que le plan factoriel. Il permet de déterminer les facteurs les plus influents sur la réponse étudiée. C'est donc une technique de criblage. Les effets individuels et d'interactions des différents facteurs sont déterminés sur la base d'une matrice à deux dimensions intégrant toutes les  $2^k$  modalités possibles lorsqu'on teste  $k$  facteurs. Le calcul des effets strictement indépendants, la précision optimale et la faible sensibilité à l'erreur expérimentale sont possibles grâce à l'orthogonalité de la matrice [Perrin et Scharff, 1993]. Le principal inconvénient du plan factoriel  $2^k$  est le nombre élevé d'expériences à réaliser lorsque  $k$  est important. Ainsi, afin de réduire  $k$ , seuls les effets des trois éléments les plus significatifs seront modélisés. Le modèle {1} associé au plan factoriel  $2^k$  inclue toutes les interactions entre les facteurs.

20

$$\begin{aligned}
 Y = & \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \dots + \alpha_k X_k + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \dots \\
 & + \alpha_{1k} X_1 X_k + \alpha_{23} X_2 X_3 + \dots + \alpha_{2k} X_2 X_k + \dots + \alpha_{123} X_1 X_2 X_3 + \dots \quad \{1\} \\
 & + \alpha_{12\dots k} X_1 X_2 \dots X_k
 \end{aligned}$$

Avec :  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_k$  = effets simples;  $\alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_{23}$  = effets d'interactions doubles et  $\alpha_{123}, \dots$  = effet d'interactions triples.

Pour trouver la valeur des coefficients  $\alpha_1, \alpha_{12}, \dots$  de ce modèle, nous avons besoin de résoudre un système d'équations linéaires pour lesquelles les éléments connus sont  $Y$  et  $x_i$ , et les inconnues sont les coefficients et les écarts  $e$ . Le système d'équation à résoudre peut s'écrire sous forme matricielle {équation 2} [Goupy et Creighton, 2006].

$$Y = Xa + e \quad \{2\}$$

Où  $Y$  est le vecteur  $(n, 1)$  des réponses mesurées ou observées ;  $X$  est la matrice  $(n, p)$  des niveaux des facteurs et du modèle mathématique ;  $a$  est le vecteur  $(p, 1)$  des coefficients et  $e$  est le vecteur  $(n, 1)$  des écarts.

S'il y a  $n$  réponses  $Y$  et  $p$  coefficients dans le modèle, il y a  $n$  équations et  $n + p$  inconnues. Pour trouver les  $p$  équations manquantes, on utilise la méthode des moindres carrés qui consiste à minimiser la somme des carrés des écarts. Le système de la régression linéaire classique est donné par l'équation {3}.

$$\begin{cases} Y = X a + e \\ \frac{\partial 'e e}{\partial a} = 0 \end{cases} \quad \{3\}$$

En faisant appel à quelques hypothèses simplificatrices, on obtient la solution de ce système {équation 4}. Ayant ces coefficients, on a la possibilité d'obtenir les réponses calculées connaissant les niveaux des facteurs {équation 5}.

$$\hat{a} = (X'X)^{-1} X'Y \quad \{4\} \qquad \hat{Y} = X\hat{a} \quad \{5\}$$

Où  $\hat{Y}$  est le vecteur  $(n, I)$  des réponses calculées avec la méthode des moindres carrés (c'est la solution classique des moindres carrés) et  $\hat{a}$  est le vecteur  $(p, I)$  des coefficients calculés avec la méthode des moindres carrés.

Les trois éléments minéraux statistiquement les plus influents retenus dans la première partie seront utilisés pour la planification factorielle des expériences  $2^k$  (*screening analysis*). Deux niveaux 21 facteur sont retenus pour la planification factorielle  $2^k$  (donc  $2^3$ ), le niveau inférieur est codé [-1] et le niveau supérieur est codé [+1]. Le niveau inférieur [-1] correspond à la concentration minimale testée, alors que le niveau supérieur [+1] correspond à la meilleure concentration obtenue. Ces expériences ont été menées dans les mêmes conditions de culture que celles précédemment décrites.

Au cours des expériences préliminaires, différentes concentrations d'acide jasmonique et différents temps d'élicitation ont été étudiés. Une élicitation avec une concentration de 10 mM et une durée de 24h de traitement, donne les meilleurs résultats dans nos conditions expérimentales. Ainsi pour les expériences suivantes, pour chaque condition de culture (composition minérale), trois cultures de CRs ont été élicités par l'acide jasmonique (10 mM) 24 h avant la récolte. Ainsi six CRs sont récoltés tous les 4 jours (trois élicités et trois non élicités). L'indice d'élicitation (IE) a été calculé par la formule {6}.

$$IE = \left( \frac{\text{contenu alc. avec élicitation} - \text{contenu alc. sans élicitation}}{\text{contenu alc. sans élicitation}} \right) \times 100 \quad \{6\}$$

#### 3.2.4. Extraction et dosage des alcaloïdes.

Cent milligramme (100 mg) de la poudre végétale (matière sèche obtenue par séchage à 40 °C pendant 48 heures) est d'abord lavée avec 6 ml d'hexane pendant 5 min. La phase d'hexane contenant des composés de matières grasses (mais pas des alcaloïdes) est récupérée. La poudre est ensuite épuisée avec 12 ml d'HCl (0,1 N) durant 10 min. Après 5 min de centrifugation à 5000 rpm le surnageant est alcalinisé avec du NH<sub>4</sub>OH (28%) jusqu'au pH 10. La solution aqueuse est ensuite filtrée puis épuisée 3 fois par du CHCl<sub>3</sub> à volumes égaux (v/v). Un séchage du triple volume de CHCl<sub>3</sub> récupéré est effectué par du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Après filtration, la solution de CHCl<sub>3</sub> est évaporée à sec. Le résidu sec obtenu est récupéré dans 5 ml de dichlorométhane, filtré à 0,2 µm et injecté en GC-MS selon le protocole de Kartal *et al.* [2003].

L'analyse des résidus a été réalisée par un CPG de type HP 5890 couplé à un spectromètre de masse HP 5970. Une colonne de 30 m et diamètre interne de 0,25 mm (épaisseur de film 0,25 mm) a été utilisée pour l'analyse de 1 µl de chaque extrait. L'injection est effectuée en mode splitless SSL (injecteur à 280 °C) avec une température du four initialement programmée à 125 °C pour 1 min puis augmentée à 250 °C à raison de 10 °C/min. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à 1 ml/min. Tous les calculs concernant les analyses quantitatives ont été réalisés à l'aide d'une courbe étalon (mesure de la surface des pics).

La teneur en hyoscyamine de CRs a été calculée à partir des courbes d'étalonnage. L'étalonnage a été obtenu à partir d'une solution mère concentrée à 12 mg d'hyoscyamine dissous dans 10 ml de dichlorométhane. A partir de celle-ci, cinq solutions filles ont été préparées pour des concentrations allant de 6.250 à 1200 µg/ml. Toutes les expériences ont été menées avec 3 répétitions (1 µl pour chaque injection).

22

### 3.2.5. Analyses statistiques.

L'analyse de la variance (ANOVA) et le test de Fisher (LSD) au risque de 5% ont été utilisés pour les analyses statistiques.

## 3.3. Résultats et discussions.

### 3.3.1. Influence des éléments minéraux sur la biomasse et le contenu en alcaloïdes des CRs au 28<sup>ème</sup> jour de culture.

Les effets physiologiques du  $\text{NO}_3^-$  sur la biomasse des CRs ont été rapportés par Sikuli et Demeyer [Sikuli *et al.*, 1997] et Nussbaumer *et al.* [1998]. La biomasse la plus élevée enregistrée a été obtenue avec les CRs cultivés dans le milieu B5 contenant 62,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Par ailleurs, Nussbaumer *et al.* [1998] montrent que la concentration de  $\text{NO}_3^-$  (100 mM) apportée sous forme de  $\text{KNO}_3$ , réduit la biomasse. Dans notre cas, 125 mM de  $\text{NO}_3^-$  affecte négativement la biomasse ; la diminution est de 30% par rapport à la biomasse obtenue avec la meilleure concentration de  $\text{NO}_3^-$ . Le phosphore [ $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ] et le potassium [ $\text{K}^+$ ] influencent également la biomasse. En comparaison avec le milieu B5 (Témoin), le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  n'ont pas d'effet significatif sur la biomasse. Comme cela a été rapporté par Nussbaumer *et al.* [1998], le  $\text{NO}_3^-$  joue un rôle métabolique dans la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques, en particulier sur hyoscyamine. Les plus fortes teneurs en alcaloïdes ont été enregistrées avec les CRs cultivés sur un milieu B5 contenant 62.5 mM de  $\text{NO}_3^-$ , suivi par  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (6,06 mM) et  $\text{Ca}^{2+}$  (11,1 mM).

Sur la base de ces résultats préliminaires, le nitrate [ $\text{NO}_3^-$ ] et le phosphore [ $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ] sont retenus. Le potassium [ $\text{K}^+$ ] et le calcium [ $\text{Ca}^{2+}$ ] ont également un effet positif sur la production des alcaloïdes. Le calcium améliore le contenu en alcaloïdes, de la même manière que le potassium, mais pas la biomasse. Ainsi, le calcium a été retenu comme le troisième élément car il améliore la production spécifique (mg/g DW) des CRs.

### 3.3.2. Criblage (*screening analysis*) des éléments minéraux et modélisation des effets: statut nutritionnel et réponse à l'élicitation.

Le tableau 6 montre que hyoscyamine est l'alcaloïde majoritaire. En effet, elle représente 75-82% des alcaloïdes totaux de la lignée de CR durant toute la période de culture. La tropine ainsi que les autres alcaloïdes mineurs ( $\alpha$ -acetyltropine, cuscohygrine, et tigloyltropine) ont aussi été détectés mais à de faibles concentrations. Le contenu en hyoscyamine et en tropine augmente après élicitation à l'acide jasmonique pour tous les jours testés: 12<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup>. Ces observations ont déjà été rapportées [Zabetakis *et al.*, 1999]. Il a été démontré que les traitements au méthyle jasmonate (MeJa) ont amélioré simultanément l'accumulation de l'hyoscyamine et de la tropine dans les CRs de *D. stramonium* [Zabetakis *et al.*, 1999]. Dans notre cas, l'hyoscyamine étant l'alcaloïde le plus important avec ou sans élicitation. Nous avons donc décidé d'étudier seulement ce composé pour les expériences suivantes

23

Tableau 6. Rendement en alcaloïdes des CRs de *Datura stramonium* cultivés dans le milieu B5 (Témoin) au 28<sup>ème</sup> jour de culture.

Jours	Hyoscyamine	Tropine
0	1.89 ± 0.40	0.05 ± 0.01
4	2.22 ± 0.89	0.06 ± 0.01
8	3.12 ± 0.35	0.09 ± 0.02
12	8.76 ± 1.40	0.31 ± 0.12
12 <sup>a</sup>	<b>15.45 ± 1.23</b>	<b>3.09 ± 0.91</b>
16	11.71 ± 2.21	0.43 ± 0.11
20	15.55 ± 3.20	0.31 ± 0.10
20 <sup>a</sup>	<b>21.43 ± 3.40</b>	<b>4.51 ± 0.12</b>
24	17.40 ± 2.89	0.34 ± 0.21
28	19.16 ± 2.70	0.39 ± 0.12
28 <sup>a</sup>	<b>33.71 ± 4.85</b>	7.09 ± 1.20

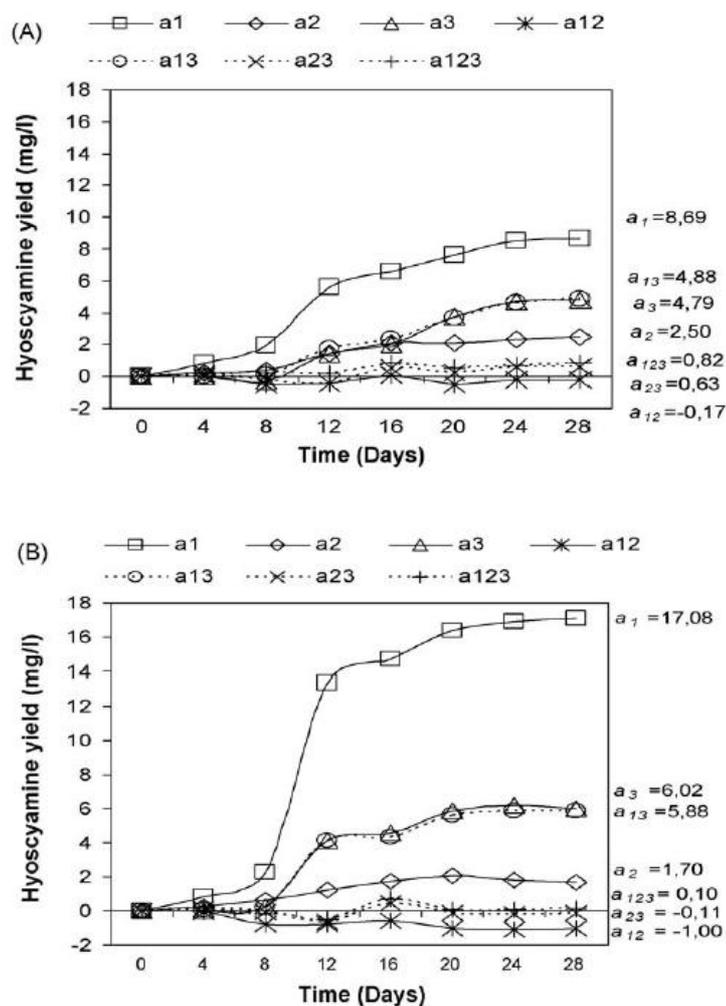
Toutes les cultures ont été menées avec 3 répétitions. Les résultats en caractère gras sont les plus significatifs et ont été obtenus avec élicitation.

En raison des effets drastiques des éléments minéraux les plus influents (nitrate, phosphore et calcium) sur la biomasse et le contenu en hyoscyamine, nous avons tenté d'améliorer notre compréhension du système par le développement d'un modèle mathématique. Une telle modélisation a été développée afin de déterminer les effets individuels et d'interactions de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  en état d'élicitation par l'utilisation du « *screening analysis* ».

Ainsi, une matrice  $2^3$  a été choisie, elle consiste à réaliser huit essais correspondants à l'ensemble des combinaisons probables pour deux niveau de concentrations (concentration minimale codé - 1, meilleure concentration codée +1) des trois éléments minéraux:  $\text{NO}_3^-$  [-1:5 mM, +1: 62.5 mM],  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  [-1: 0,5 mM, +1: 6.06 mM] et  $\text{Ca}^{2+}$  [-1: 0,5 mM, +1: 11,1 mM]. Les codes [-1,1] de chaque élément déterminent les limites de la zone expérimentale, qui peuvent être représentées par un cube. Le plan factoriel  $2^3$  a conduit à la détermination de l'accumulation de l'hyoscyamine en fonction de  $\text{NO}_3^-$  ( $\alpha_1$ ),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $\alpha_2$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\alpha_3$ ) et des interactions subséquentes ( $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{13}$ ,  $\alpha_{23}$ ,  $\alpha_{123}$ ) en utilisant le modèle mathématique {7} où  $Y$  est le rendement en hyoscyamine exprimé en (mg/l).

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 x_3 + \alpha_{12} x_1 x_2 + \alpha_{13} x_1 x_3 + \alpha_{23} x_2 x_3 + \alpha_{123} x_1 x_2 x_3 \quad \{7\}$$

Les figures 4A et B présentent l'évolution du rendement en hoscynamine. Il a été démontré que les cultures de cellules de *D. stramonium* répondent positivement à l'élicitation dans la phase exponentielle de croissance [Ballica, *et al.*, 1993]. Dans notre cas, la réponse à l'élicitation des CRs est observée à partir du 8<sup>ème</sup> jour de culture, ce qui coïncide avec le début de la production de l'hyoscynamine.



24

Figures 4 A et B. Evolution des effets du nitrate, du phosphore et du calcium sur le rendement en hoscynamine des CRs de *Datura stramonium* au cours de la culture sans élicitation (A) et avec élicitation (B) : effets du :  $\text{NO}_3^-$  ( $a_1$ ),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $a_2$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $a_3$ ) et des interactions de:  $\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $a_{12}$ ),  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$  ( $a_{13}$ ),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}$  ( $a_{23}$ ) et  $\text{NO}_3^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{Ca}^{2+}$  ( $a_{123}$ ).

Durant toute la période de culture (avec et sans élicitation), les effets des trois éléments  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  et les combinaisons  $a_{13}$  et  $a_{123}$  sont positifs, alors que les combinaisons  $a_{23}$  et  $a_{12}$  sont négatives. Au 28<sup>ème</sup> jour de culture avec élicitation, l'effet du nitrate ( $a_1$ ) est 10 fois plus élevé que l'effet du phosphore ( $a_2$ ), et 3 fois plus élevé que l'effet du calcium ( $a_3$ ) et de la combinaison nitrate/calcium ( $a_{13}$ ) (Figures 4A et

B). Le modèle mathématique traduisant les effets des 3 éléments sur la réponse à l'éllicitation ( $\hat{Y}_{e28}$ ) au 28<sup>ème</sup> jour de culture est donné par l'équation {8}.

$$\hat{Y}_{e28} = 23.89 + 17.09x_1 + 1.70x_2 + 6.03x_3 - 1x_1x_2 + 5.88x_1x_3 - 0.11x_2x_3 + 0.10x_1x_2x_3 \quad \{8\}$$

Afin d'affiner le modèle {7} et de ne garder que les effets significatifs, nous avons classé les effets standardisés des facteurs étudiés et de leurs interactions avec le diagramme de Pareto (Figure 5). Ce diagramme dresse la liste des coefficients en valeur absolue et détermine le seuil de signification avec une valeur en dessous de laquelle on élimine les coefficients insignifiants.

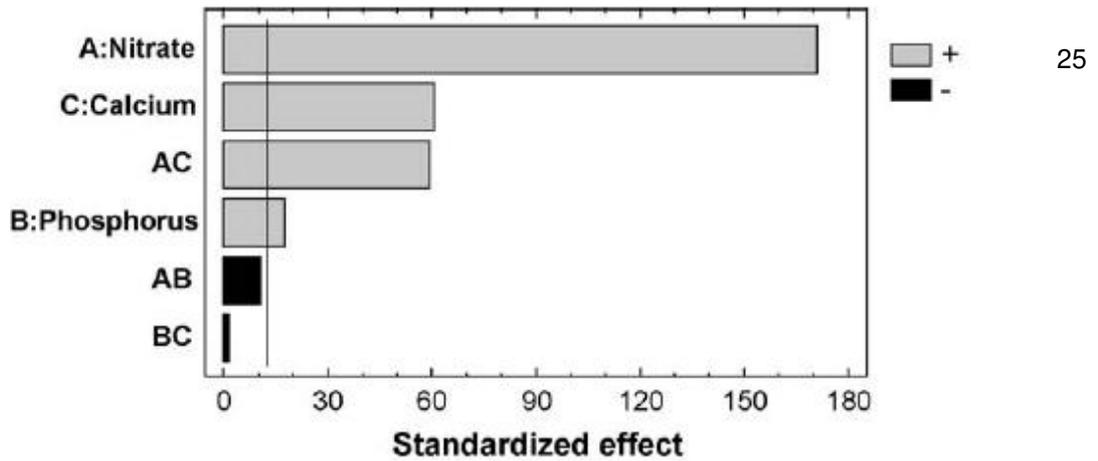


Figure 5. Diagramme de Pareto des effets standardisés du rendement en hyoscyamine (la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).

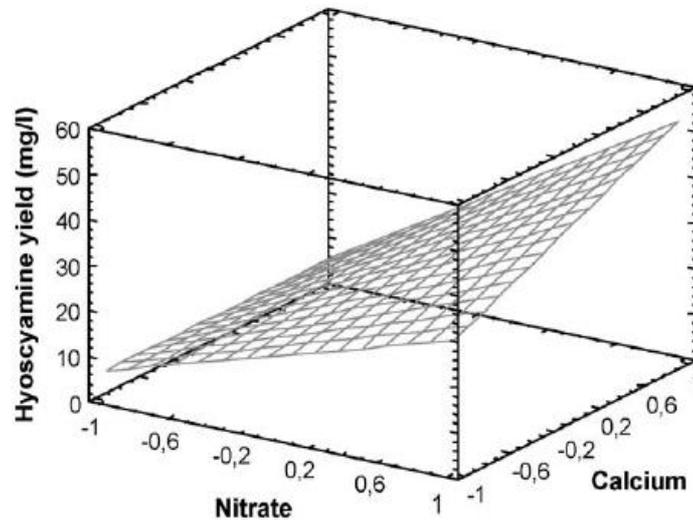
Ainsi, nous avons éliminé les coefficients des combinaisons  $a_{12}$ ,  $a_{23}$  et  $a_{123}$  {équation 9}. Le modèle ajusté s'écrit alors:

$$\hat{Y}_{e28} = 23.89 + 17.09x_1 + 1.70x_2 + 6.03x_3 + 5.88x_1x_3 \quad \{9\}$$

Les effets déterminants sur le taux d'hyoscyamine en état d'éllicitation sont: le nitrate (A:  $[\text{NO}_3^-]$ ), le phosphore (B:  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ), le calcium (C:  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) et l'effet d'interaction nitrate-calcium (AC:  $[\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}]$ ) (Figure 5). Afin d'étudier l'effet de cette interaction sur le contenu en hyoscyamine des CRs, une représentation graphique a été utilisée pour visualiser le rendement en hyoscyamine en fonction du couple  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$  dans le domaine expérimental représenté dans la figure 6.

La figure 6 est construite en utilisant une valeur constante pour  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (6,06 mM). La surface de réponse montre clairement l'effet bénéfique du  $\text{NO}_3^-$  sur le rendement en hyoscyamine et son amélioration en présence de concentrations croissantes du calcium. En effet, l'effet du nitrate dans le domaine [-1, 1] donne un rendement de 29 mg/l d'hyoscyamine. Ce rendement double (53 mg/ l) lorsque la concentration du calcium augmente dans le milieu de culture à des niveaux compris entre [-1, +1]. Ces résultats montrent l'importance de la prise en compte des effets combinés de  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$  ( $a_{13}$ )

qui conduisent à une amélioration drastique de la production de l'hyoscyamine par les CRs. Ce résultat n'aurait pas pu être mis en évidence sans une approche par modélisation mathématique.



26

Figure 6. Niveau de l'hyoscyamine dans les CRs élicités de *Datura stramonium* estimés par surface de réponse de l'interaction  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$ .

Le modèle mathématique affiné a été appliqué pour l'étude de la réponse à l'élicitation avec différents statuts nutritionnels. Donc, nous avons simulé la réponse à l'élicitation ( $\hat{Y}_{e28}$ ) des CRs au 28<sup>ème</sup> jour de culture en fonction des concentrations du nitrate ( $x_1$ ) et du calcium ( $x_3$ ). La concentration du phosphore ( $x_2$ ) et maintenue constante de 3.2 mM. Les autres composantes du milieu B5 ont été maintenues à leur valeur de base (milieu B5).

Les valeurs estimées et mesurées du rendement en hyoscyamine, sans et avec élicitation, sont reportées dans le tableau 7. Ces valeurs présentent les mêmes tendances et sont statistiquement similaires. En conséquence, le modèle proposé peut être ainsi validé.

Tableau 7. Valeurs estimées et mesurées du rendement en hyoscyamine (mg/l) sans élicitation ( $\hat{Y}_{28}$ ) et avec élicitation ( $\hat{Y}_{e28}$ ) en fonction du statut nutritionnel au 28<sup>ème</sup> jour de culture.

Milieux testés	$x_1$ $\text{NO}_3^-$	$x_2$ : $\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$x_3$ : $\text{Ca}^{2+}$	$\hat{Y}_{28}$			$\hat{Y}_{e28}$		
				estimées	mesurées	LSD test	estimées	mesurées	LSD test
B5-1	-1 [5 mM]	0 [3.2 mM]	0 [5.8 mM]	5.70	4.76 ± 0.17	NS	6.80	5.62 ± 0.28	NS
B5-2	1 [62.5 mM]	0 [3.2 mM]	0 [5.8 mM]	23.09	25.30 ± 1.02	NS	40.97	38.43 ± 1.08	NS
B5-3	0 [33.7 mM]	0 [3.2 mM]	-1 [0.5 mM]	9.60	11.02 ± 0.73	NS	17.86	15.89 ± 1.22	NS
B5-4	0 [33.7 mM]	0 [3.2 mM]	1 [11.1 mM]	19.19	14.89 ± 0.71	NS	29.91	31.65 ± 1.46	NS

Les modèles utilisés pour la simulation sont :  $\hat{Y}_{28} = 14.39 + 8.69x_1 + 2.50x_2 + 4.79x_3 + 4.895x_1x_3$  (sans élicitation) ;  $\hat{Y}_{e28} = 23.89 + 17.09x_1 + 1.70x_2 + 6.03x_3 + 5.88x_1x_3$  (avec élicitation).

Les cultures limitées en  $\text{NO}_3^-$  (5 mM) montrent une réponse quasiment nulle à l'élicitation par rapport aux cultures non limitées en nitrate. En fait, le rendement en hyoscyamine avec élicitation au 28<sup>ème</sup> jour de culture est 6 fois plus élevé chez les CRs cultivés dans le milieu B5 contenant 62.5 mM de nitrate par rapport aux cultures limitées en nitrate (5 mM) (Tableau 7). Pour la faible concentration de  $\text{NO}_3^-$  (B5-1: 5 mM), l'indice d'élicitabilité (IE) pour la production spécifique d'alcaloïde (mg/g PS) est d'environ 18%. Pour la meilleure concentration de  $\text{NO}_3^-$  (B5-2: 62,5 mM), l'indice d'élicitabilité est d'environ 52%. Ces résultats montrent que la faible réactivité à l'élicitation est corrélée aux f 27 concentrations de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu.

Les faibles concentrations de calcium [ $\text{Ca}^{2+}$ ] réduisent les capacités biosynthétiques des CRs de *D. stramonium* pour l'hyoscyamine [Pinñol *et al.*, 1999]. La réponse à l'élicitation est meilleure avec la concentration de 11.1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (B5-4) (Tableau 7). En effet, à une concentration de 0,5 mM de [ $\text{Ca}^{2+}$ ] (B5-3), l'indice d'élicitabilité est d'environ 44% alors qu'il est d'environ 113% pour la concentration 11.1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (B5-4). L'effet positif du calcium sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques a été décrit par Gontier *et al.* [1994] sur une culture de suspensions cellulaires de *D. innoxia* Mill. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le calcium stimulerait la putrescine N-méthyltransférase (PMT), qui est l'une des premières enzymes de la voie de biosynthèse de l'hyoscyamine et de la scopolamine. Cette hypothèse a été confirmée sur le CRs de *D. stramonium*. En effet, selon Pinñol *et al.* [1999], la perte de la production en hyoscyamine pour de faibles concentrations de [ $\text{Ca}^{2+}$ ] est concomitante avec la perte de l'activité de la PMT.

Le temps à partir duquel le nitrate et le calcium sont efficaces sur la réponse à l'élicitation a été examiné grâce aux dérivées des modèles polynomiaux après avoir effectué une approximation de la fonction d'évolution des coefficients ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) par des équations du 4<sup>ème</sup>/5<sup>ème</sup> degrés. Les modèles de l'évolution des effets du  $\text{NO}_3^-$  ( $a_1$ ) et du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $a_3$ ) pour les cultures non élicitées sont données par les équations {10} et {11}. Avec élicitation ( $a_{e1}$ ,  $a_{e3}$ ), les polynômes sont donnés par les équations {12} et {13}.

$$a_1 = 0.019t^4 - 0.395t^3 + 2.645t^2 - 4.918t + 2.684 \quad (R^2 = 0.98). \quad \{10\}$$

$$a_3 = 0.001t^5 - 0.029t^4 + .0250t^3 - 0.421t + 0.039 \quad (R^2 = 0.98). \quad \{11\}$$

$$a_{e1} = 0.080t^4 - 1.608t^3 + 10.550t^2 - 22.260t + 13.477 \quad (R^2 = 0.96). \quad \{12\}$$

$$a_{e3} = 0.021t^4 - 0.449t^3 + 3.195t^2 - 7.253t + 4.569 \quad (R^2 = 0.96). \quad \{13\}$$

Le calcul de la dérivée ( $\theta$ ) des équations {10}, {11}, {12} et {13} donne respectivement les polynômes {14}, {15}, {16} et {17}.

$$\theta a_1 = 0.076t^3 - 1.186t^2 + 5.290t - 4.918 \quad \{14\}$$

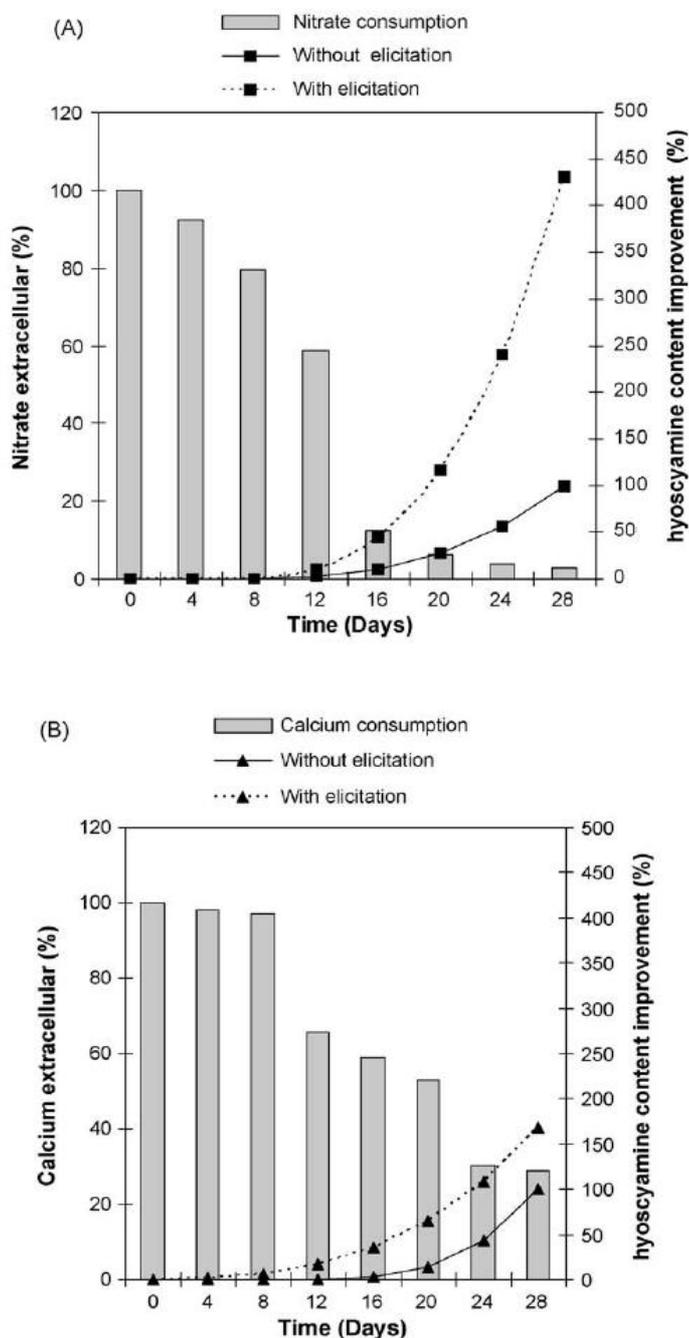
$$\theta a_3 = 0.005t^4 - 0.114t^3 + 0.751t^2 - 1.307 + 0.421 \quad \{15\}$$

$$\theta_{a_{e1}} = 0.322t^3 - 4.822t^2 + 21.100t - 22.260 \quad \{16\}$$

$$\theta_{a_{e3}} = 0.083t^3 - 1.349t^2 + 6.390t - 7.253 \quad \{17\}$$

A partir de ces dernières équations {14, 15,16 et 17}, les figures 4 A et B ont été construites (les résultats sont exprimés en pourcentages).

28



Figures 7. A et B. Cinétique de la consommation et évolution du taux d'amélioration de l'hyoscyamine en fonction du nitrate  $[NO_3^-]$  (A) et du calcium  $[Ca^{2+}]$  (B).

L'effet du  $NO_3^-$  est efficace à partir du 12<sup>ème</sup> jour de culture et n'atteint pas un palier. Avec l'élicitation, le taux d'évolution est 4 fois plus élevé au 28<sup>ème</sup> jour de culture (Figure 7A). Notons que la réponse à l'élicitation est plus intense après la consommation totale du nitrate au 20<sup>ème</sup> jour de culture.

Ces résultats préliminaires suggèrent que, la combinaison d'une carence en nitrate et l'élicitation pourrait être envisagée pour améliorer le contenu en hyoscyamine. Comme le montre la Fig. 4A, la consommation du nitrate par les CRs pendant les premiers jours de culture (12 jours) a été significative. Au 12<sup>ème</sup> jour, 40% du nitrate extracellulaire a été consommé et ceci suggère que le nitrate, dans les premiers jours de culture serait orienté vers le métabolisme primaire. Par conséquent, à partir du 12<sup>ème</sup> jour de culture, une partie du nitrate est utilisée pour le métabolisme secondaire.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec le calcium (Figure 7B) qui est consommé à 70% au 24<sup>ème</sup> jour de la culture des CRs. L'effet efficient du calcium est observé plus tôt que le nitrate (au 8<sup>ème</sup> jour). Les ions du calcium semblent avoir un rôle de messenger secondaire dans la transduction du signal dans les cellules après stimulus [Poovaiah *et al.*, 1987]. Les signaux de l'environnement, comme le stress, stimulent le flux des ions de calcium entre les membranes cellulaires [Rincon et Hanson, 1986].

### 3.4. Conclusion

Pour conclure, nous avons démontré l'intérêt de la modélisation mathématique dans l'étude des variables biologiques. Il est possible de simuler des expériences virtuelles et de prédire les réactions biologiques. Ceci constitue un gain de temps appréciable.

L'approche développée ici a permis de modéliser les effets individuels et combinés de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et à démontrer que chaque composé a une influence différente sur la croissance et la production en hyoscyamine. Le nitrate apparaît comme l'élément le plus important et l'évolution de ses effets est positive sur toute la période de croissance.

La modélisation nous a permis de démontrer, que les 12 premiers jours de culture sont importants pour permettre au nitrate d'être efficace, directement ou avec élicitation, sur la production de l'hyoscyamine. En effet, les CRs limités en nitrate dès le début de leur culture ne répondent pas significativement à l'élicitation. Au cours des premiers jours de culture, la consommation du nitrate est élevée. Ceci suggère que le métabolisme cellulaire serait consacré au métabolisme primaire (production de biomasse) en atteignant la phase stationnaire autour 20<sup>ème</sup> du jour. L'un des rôle des métabolites secondaires est la défense contre les organismes pathogènes et les herbivores [Guillon *et al.*, 2006]. Une combinaison d'une limitation en phosphate et l'élicitation aux extraits fongiques a été rapportée par Dunlop et Curtis [1991] comme stratégie efficace pour améliorer le métabolisme secondaire (production solavetivone) des CRs de *Hyoscyamus muticus* [Dunlop et Curtis, 1991]. Dans le présent travail, cette stratégie est pertinente seulement après une étape de bonne nutrition minérale. La réponse à l'élicitation avant la 1<sup>ère</sup> semaine est inefficace quelque soit le type de traitement testé.

Inversement, une étape de croissance sans limitation de nutriments peut conduire à une réponse positive à l'élicitation, même si au moment de l'élicitation, la totalité de  $\text{NO}_3^-$  initial est consommée. La réponse à l'élicitation est largement amplifiée quand le nitrate est entièrement consommé. Ainsi, on peut supposer qu'une bonne nutrition en nitrate devrait être appliquée pendant les 12 premiers jours de la culture afin de permettre aux CRs d'orienter le métabolisme secondaire en cas d'exposition à un stress par la suite (comme l'élicitation).

On peut supposer qu'en régime semi-continu ou en continu de la culture, il convient d'ajouter 30 nitrate chaque 20 jours, car il correspond au temps nécessaire pour la consommation totale du  $\text{NO}_3^-$  dans nos conditions expérimentales. Après une phase d'alimentation complète ( $\text{NO}_3^-$ : 62,5 mM), une limitation de nitrate combinée avec une élicitation à l'acide jasmonique est possible pour améliorer considérablement la productivité de l'hyoscyamine.

Enfin, la concentration de 11,01 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  combinée avec l'élicitation à l'acide jasmonique (10mM) et avec la meilleure concentration de nitrate, peut conduire à des effets très positifs. L'approche par modélisation développée ici peut démontrer ce fait, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'optimisation du contenu en hyoscyamine avec la gestion des concentrations optimales en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{NO}_3^-$ .

Les résultats de la modélisation de la réponse biochimique des CRs sont intéressants, mais des expériences physiologiques supplémentaires utilisant la modélisation mathématique sont nécessaires sur le statut nutritionnel en système de culture semi-continu ou en continu pour une production optimale des alcaloïdes tropaniques par bio-ingénierie.

D'autres expérimentations sont recommandées afin de déterminer les concentrations optimales de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'acide jasmonique par modélisation mathématique en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) (modèle du second degré).

## 4. Optimisation du rendement en alcaloïdes

### 4.1. Optimisation multiréponse de l'élicitation par la fonction de désirabilité

#### 4.1.1. Introduction

31

Les métabolites secondaires sont souvent biosynthétisés en abondance comme une réponse à un stress biotique et abiotique [Hutcheson, 1998; He *et al.* 2002]. L'élicitation est un traitement qui mime un stress. Elle constitue une stratégie de choix pour l'amélioration de la production de diverses substances par voie biotechnologique [Boitel-Conti *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Vasconsuelo et Boland, 2007]. Elle repose sur l'utilisation d'éliciteurs : composés chimiques, d'origines diverses, qui entraînent une accumulation de métabolites secondaires dans les cellules. L'efficacité des éliciteurs dépend de l'interaction complexe entre l'éliciteur en question et la plante. Le même éliciteur peut stimuler le métabolisme secondaire pour différentes lignées cellulaires, et la même lignée cellulaire peut réagir favorablement à divers éliciteurs. La concentration de l'éliciteur, les conditions environnementales et le milieu de culture sont autant de facteurs qui affectent sensiblement l'intensité de la réponse à l'élicitation [Vasconsuelo *et al.*, 2007]. Un modèle du mécanisme d'élicitation est proposé par les mêmes auteurs. Celui-ci stipule qu'après la liaison de l'éliciteur avec un récepteur localisé dans la membrane plasmique provoquant l'activation de la G-protéine, cette dernière stimule l'adénylate cyclase (AC) et la phospholipase C (PLC). Ceci augmente le niveau des messagers secondaires (AMPc, DAG, IP3) couplés à l'activation de leur kinases cibles (PKA, PKC). Le flux du  $Ca^{2+}$  augmente ainsi à travers la membrane plasmique. Comme conséquence de ce qui précède, une activation rapide et en cascade de la protéine kinase aura lieu induisant ainsi des changements dans la phosphorylation de MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) et, dans certains cas, leur translocation dans le noyau. Ceci aboutit finalement à l'activation de la transcription des enzymes des voies de biosynthèse des métabolites secondaires.

Parmi les nombreux éliciteurs connus, l'acide jasmonique (AJ) et son dérivé volatil, le méthyle jasmonate (MeJA), occupent une place privilégiée dans l'élicitation chez les plantes supérieures [Herbert, 2001, Zabetakis *et al.*, 1998]. Les jasmonates (AJ, MeJA) sont des hormones de stress qui agissent comme régulateur de défense chez les plantes [Gundlach, H. *et al.*, 1992, Wasternack and Parthier, 1997 ; Reymond et Farmer, 1998 ; Bleichert *et al.* 1995, Doares *et al.*, 1995]. Un récepteur transmembranaire est activé suite à un signal externe conduisant à la libération, dans le cytoplasme, de l'acide linoléique présent dans la membrane plasmique. L'acide linoléique est alors converti en acide jasmonique [Farmer et Ryan, 1992]. Les gènes de la biosynthèse des alcaloïdes figurent parmi ceux régulés par les jasmonates [Memelink *et al.*, 2001].

Si les jasmonates améliorent la production des alcaloïdes tropaniques, ils sont cependant inhibiteurs de la biomasse [Kang *et al.*, 2004 ; Deng, 2005]. L'optimisation de la concentration en AJ (CAJ) et du temps d'exposition (ET) doit être effectuée en tenant compte simultanément de deux réponses : la biomasse et le contenu en alcaloïdes. En effet, Lorsqu'on étudie un système complexe dont l'efficacité dépend de plusieurs réponses, Il est recommandé de se baser sur des approches qui permettent une décision fondée sur des critères multiples et pondérables [Deming, 1991; Hendriks *et al.*, 1992]. Pour ce faire, les fonctions de désirabilité sont utilisées comme un outil puissant dans les systèmes multi-réponses [Derringer and Suich, 1980 ; Jeong and Kim, 2009].

32

La fonction de désirabilité définie par Harrington [1965] puis par Derringer et Suich [1980] est l'une des approches les plus utilisées dans l'optimisation des facteurs étudiés dans les systèmes multi-réponses [Bourguignon and Massart, 1991 ; Guillaume et Guincharde, 1996 ; Vanbel, 1999 ; Marini *et al.*, 2003 ; Dewé *et al.*, 2004 ; Safa et Hadjmohammadi, 2005; Jeong and Kim, 2009]. Elle est basée sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure en une échelle unique sans dimension de désirabilité. Les valeurs des fonctions de désirabilité ( $d_i$ ) sont comprises entre 0 et 1. La valeur 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse non désirable et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs étudiés [Derringer and Suich, 1980 ; Jeong and Kim, 2009].

La présente étude se propose d'utiliser la fonction de désirabilité pour optimiser simultanément deux réponses à l'élicitation par l'acide jasmonique des CRs de *Datura stramonium* : la biomasse et le contenu en hyoscyamine (HS). Ces deux réponses sont étudiées en fonction du couple « CAJ - ET ».

#### **4.1.2. Matériels et méthodes**

##### *4.1.2.1. Matériel végétal*

Les chevelus racinaires de *D. stramonium* obtenus sur hypocotyles de vitrosemis par transformation à l'aide de la souche A<sub>4</sub> d'*Agrobacterium rhizogenes* sont caractérisées en fonction de leurs performances (biomasse, contenu alcaloïdique, réactivité à l'élicitation). La lignée la plus performante a ensuite été sélectionnée puis transférée régulièrement sur des milieux frais de type B5 [Gomborg, 1968] contenant 3% de saccharose et dépourvu de tout régulateur de croissance. La subculture des CRs a lieu dans l'obscurité à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les différentes expériences d'élicitation ont porté sur les CRs de la lignée sélectionnée cultivée dans les conditions définies précédemment. La quantité d'inoculum par boîte est de 0,3 g de poids frais prélevé sur les extrémités des CRs en pleine croissance. Les moyennes sont calculées sur la base de trois répétitions. Le témoin correspond à la culture du chevelu racinaire dans les mêmes conditions mais sans élicitation.

#### 4.1.2.2. Extraction et dosages de l'hyoscyamine

L'extraction de l'hyoscyamine (alcaloïdes majoritaires dans notre lignée) à partir du milieu de culture n'a pas été considérée dans ce travail. L'extraction des alcaloïdes a été faite selon le protocole de Amdoun *et al.* [2009] et le dosage de l'hyoscyamine selon le protocole de Kartal *et al.* [2003].

#### 4.1.2.3. Plan d'expérience.

Dans le travail précédent, l'utilisation de la concentration de 10 mM d'AJ, bien qu'elle permette de mettre en évidence l'effet de l'élicitation après 24 heures, elle inhibe la croissance des *CRS* *stramonium* entraînant par la suite la mort de la lignée. Le plan composite central (*Central Composite Design*, CCD) a été retenu en vue de recueillir les résultats qui serviront au calcul des désirabilités pour l'optimisation simultanée de la croissance et du contenu en hyoscyamine en fonction du couple CAJ - ET. Le CCD a été décrit par Box et Wilson dans les années 1950. Ce plan comporte trois parties, un plan factoriel  $2^k$ , avec au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude et, un plan en étoile dont les points axiaux  $-\alpha$  et  $+\alpha$  sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

Le domaine d'étude, les variables et leurs niveaux étudiés sont représentés dans la figure 8. Chaque point ( $R_1 \dots R_{14}$ ) correspond à une expérience. Les points  $R_1$  à  $R_4$  constituent le plan factoriel. Les points  $R_5$  à  $R_8$  constituent le plan en étoile. Les points  $R_9$  à  $R_{14}$  constituent les expériences effectuées au centre du domaine d'étude.

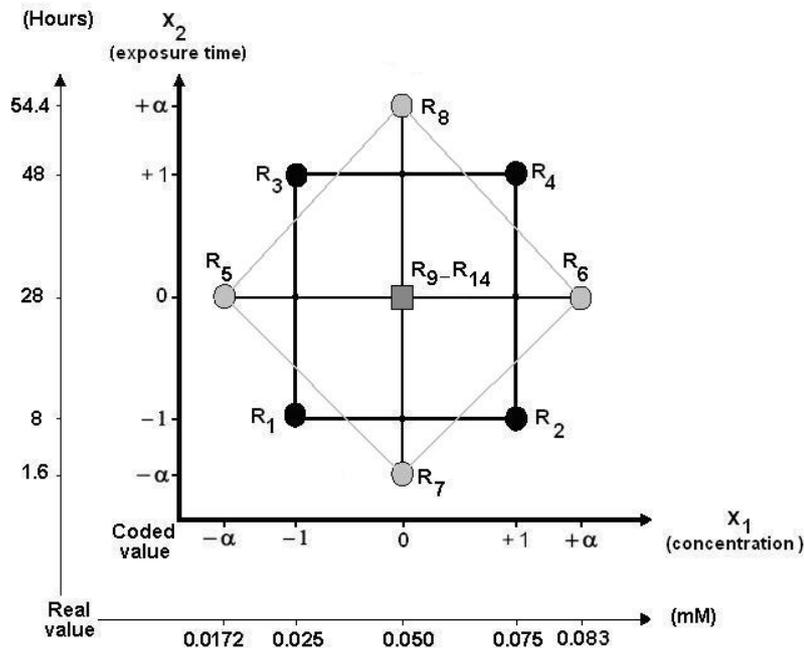


Figure 8. Domaine d'étude du CCD: variables et leurs niveaux étudiés.

Chaque point correspond à une expérience. Les points  $R_1$  à  $R_4$  constituent le plan factoriel. Les points  $R_5$  à  $R_8$  constituent le plan en étoile. Les points  $R_9$  à  $R_{14}$  constituent les expériences effectuées au centre du domaine d'étude (valeur codée de  $\alpha = 1.32$  pour respecter le critère d'orthogonalité).

Pour chaque facteur, 5 niveaux sont retenus, six répétitions (R<sub>9</sub> à R<sub>14</sub>) sont effectuées au centre du domaine d'étude et le critère d'optimalité retenu et l'orthogonalité. Dans ce cas,  $\alpha = 1.32$  est retenu pour respecter ce critère. Ainsi, seulement 14 expériences sont nécessaires dans ces conditions. Les niveaux de la variable  $X_i$  ont été codés d'après l'équation  $X_i = (A_i - A_0) / \Delta A_i$ , où  $X_i$  est la variable indépendante codée,  $A_i$  est la variable indépendante réelle,  $A_0$  est la variable indépendante au centre du domaine 34 est la pas.

L'intervalle de temps où l'élicitation doit être effectuée a été déterminé avec soin. Cet intervalle doit permettre de voir l'effet de l'élicitation sur la croissance des CRs. Ainsi, l'intervalle correspondant à la phase stationnaire de croissance a été éliminé (à partir du 20<sup>ème</sup> jour de culture pour notre lignée). L'effet de l'élicitation sur la production des alcaloïdes doit être appréciable, donc la période de culture située avant le 8<sup>ème</sup> jour a été également éliminée, car c'est une période qui correspond à une production quasiment stationnaire. L'intervalle de temps où l'élicitation peut être effectuée s'étale donc du 8<sup>ème</sup> jour au 20<sup>ème</sup> jour de culture. Le 12<sup>ème</sup> jour de culture a été retenu pour l'optimisation de l'élicitation, car elle correspond à une phase de pleine croissance des CRs (résultats non montrés ici).

Pour les deux réponses mesurées, l'indice de croissance (IC) est calculé, pour le même temps d'élicitation, par l'équation {18}. Donc, pour un IC = 1, la croissance des CRs n'est pas affectée par l'acide jasmonique, par contre si IC < 1, cela veut dire que la croissance est affectée. L'indice d'élicitabilité est calculé, pour le même temps, par l'équation {19}. Le gain en HS après l'élicitation correspond à IE > 1.

$$IC = \frac{\text{biomasse des HR élicités (g DW/l)}}{\text{biomasse des HR témoins (g DW/l)}} \quad \{18\} \quad IE = \frac{\text{production spécifique (g/g DW) des HR élicités}}{\text{production spécifique (g/g DW) des HR témoins}} \quad \{19\}$$

Les résultats obtenus sur la base des expériences définies par la figure 8 serviront à écrire les modèles mathématiques traduisant les effets du couple CAJ-ET sur IC et IE. Après évaluation globale des deux modèles (ANOVA), l'application de la fonction de désirabilité a pour objectif d'optimiser simultanément IC et IE.

#### 4.1.2.4. Fonction de désirabilité.

L'optimisation peut avoir comme objectifs de maximiser, de minimiser ou d'atteindre une valeur cible de la réponse [Pasandideh et Niaki, 2006]. En fonction de ces objectifs, différentes fonctions de désirabilité peuvent être utilisées. Derringer and Suich [1980] ont introduit une classe particulière de fonction pour la transformation des réponses  $Y_i$  en désirabilité  $d_i(Y_i)$ . Pour ce faire, deux types de transformations sont effectuées: la transformation *one-sided* utilisée dans le cas de la maximisation ou de la minimisation de  $Y_i$ , et la transformation *two-sided* {équation 20} utilisée pour atteindre une valeur

cible  $t_i$  pour  $Y_i$  dont  $l_i$  et  $u_i$  sont respectivement les limites inférieures et supérieures de la réponse étudiée (tel que  $l_i < t_i < u_i$ ). Les exposants  $s$  et  $t$  correspondent à la pondération du facteur dépendant de l'utilisateur en fonction du degré de désirabilité qu'il souhaiterait avoir pour une réponse donnée comprise entre  $l_i$  et  $u_i$ . Ces exposants déterminent la forme de  $d_i(Y_i)$ . Pour  $s = t = 1$ , la fonction de désirabilité augmente linéairement vers  $t_i$ . Pour  $s < 1$  et  $t < 1$  la fonction est convexe. Pour  $s > 1$  et  $t > 1$  la fonction est concave [Pasandideh et Niaki, 2006 ; Jeong and Kim, 2009].

La désirabilité globale  $D$  (*overall desirability*) est la moyenne géométrique des valeurs de désirabilité individuelle de chaque réponse  $d_i(Y_i)$  calculée par l'équation {21} où  $n$  est le nombre de réponses. Les solutions optimales (combinaison optimales entre les facteurs étudiés) sont celles qui maximisent  $D$  [Jeong and Kim, 2009].

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0, & Y_i < l_i, \\ \left(\frac{Y_i - l_i}{t_i - l_i}\right)^s, & l_i \leq Y_i \leq t_i, \\ \left(\frac{Y_i - u_i}{t_i - u_i}\right)^t, & t_i \leq Y_i \leq u_i, \\ 0, & Y_i > u_i \end{cases} \quad \{20\} \quad D = \left( \prod_{i=1}^n d_i(Y_i) \right)^{\frac{1}{n}} \quad \{21\}$$

#### 4.1.2.5. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA : test de Fisher) est appliquée pour l'évaluation globale des modèles obtenus. Au seuil  $p < 0.05$  le model est considéré comme significatifs. Les coefficients de détermination des modèles  $R^2$  et  $R^2_{adj}$  (ajustés) ont également été examinés pour l'évaluation des modèles mathématiques.

### 4.1.3. Résultats et discussion

Les résultats de l'application du CCD sur la réponse des CRs en IC et IE sont consignés dans le tableau 8. D'après les expériences  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_7$ , un temps de traitement court ne permet pas de voir un effet dépressif sur la croissance, car la biomasse ne change pas par rapport au témoin non élicité (IC = 1). Cependant, pour l'expérience  $R_5$ , avec une concentration plus faible et un temps d'exposition plus long, un effet négatif de l'AJ est observé sur la croissance (IC < 1) (Tableau 8).

La description des deux réponses à l'élicitation reposent sur l'utilisation d'un modèle polynomiale du second degré {équation 22} où  $Y$  est la réponse (biomasse ou contenu en hyoscyamine),  $X_1$  représente la CAJ,  $X_2$  représente ET,  $\alpha_0$  est la valeur que prend le modèle au centre du domaine d'étude et  $\alpha_1 \dots \alpha_{12}$  sont les coefficients du model.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{12} X_1 X_2 \quad \{22\}$$

Tableau 8. CCD en valeurs codées ( $X_1$ ,  $X_2$ ), IC et IE obtenus pour chaque expérience.

Expériences	$X_1$ : concentration	$X_2$ : Temps d'exposition	Réponses mesurées	
			IC	IE
R <sub>1</sub>	-1.00	-1.00	1.00	2.80
R <sub>2</sub>	1.00	-1.00	1.00	3.00
R <sub>3</sub>	-1.00	1.00	0.80	1.30
R <sub>4</sub>	1.00	1.00	0.60	1.60
R <sub>5</sub>	-1.32	0.00	0.85	1.60
R <sub>6</sub>	1.32	0.00	0.40	2.90
R <sub>7</sub>	0.00	-1.32	1.00	2.80
R <sub>8</sub>	0.00	1.32	0.65	1.60
R <sub>9</sub>	0.00	0.00	0.71	1.76
R <sub>10</sub>	0.00	0.00	0.72	1.74
R <sub>11</sub>	0.00	0.00	0.73	1.75
R <sub>12</sub>	0.00	0.00	0.75	1.76
R <sub>13</sub>	0.00	0.00	0.70	1.74
R <sub>14</sub>	0.00	0.00	0.72	1.75

#### 4.1.3.1. Evaluation des modèles mathématiques.

L'utilisation de la méthode des moindres carrés pour le calcul des coefficients des modèles quadratiques en utilisant les résultats du tableau 8 permet d'écrire les modèles {23} et {24}. Avant d'utiliser les modèles obtenus à partir des résultats du CCD, il est nécessaire de déterminer leur signification et leur pertinence dans la description des réponses, pour calculer la désirabilité. Le tableau 9 résume les résultats de l'ANOVA sur les deux modèles.

$$\hat{Y}_{IC} = 0.72 - 0.11X_1 - 0.14X_2 - 0.05X_1X_2 - 0.02X_1^2 + 0.09X_2^2 \quad \{23\}$$

$$\hat{Y}_{IE} = 1.76 + 0.30X_1 - 0.60X_2 + 0.03X_1X_2 + 0.25X_1^2 + 0.22X_2^2 \quad \{24\}$$

Tableau 9. ANOVA du modèle quadratique : Indice de croissance (IC) et Indice d'élicitabilité (IE).

Source	SCE	Ddl	CM	Test F	probabilité	signification
Indice de croissance (IC)						
Modèle	0.3044	5	0.0608	8.7526	0.0042	**
CAJ	0.0842	1	0.0842	12.1064	0.0083	**
ET	0.1506	1	0.1506	21.6611	0.0016	**
CAJ x ET	0.0100	1	0.0100	1.4374	0.2649	
(CAJ) <sup>2</sup>	0.0018	1	0.0018	0.2607	0.6234	
(ET) <sup>2</sup>	0.0577	1	0.0577	8.2974	0.0205	*
Residuelle	0.0556	8	0.00695			
Cor Totale	0.3600	13				
Indice d'élicitabilité (IE)						
Modèle	4.0142	5	0.8028	15.5609	0.0006	***
CAJ	0.6559	1	0.6559	12.7145	0.0073	**
ET	2.6864	1	2.6864	52.0678	< 0.0001	***

CAJ x ET	0.0025	1	0.0025	0.0484	0.8313	
(CAJ) <sup>2</sup>	0.3755	1	0.3755	7.2782	0.0272	*
(ET) <sup>2</sup>	0.2938	1	0.2938	5.6954	0.0441	*
Residuelle	0.4127	8	0.0515			
Cor Totale	4.4270	13				

\* : significatif ; \*\* : hautement significatif ; \*\*\* : tres hautement significatif.

Le coefficient de détermination  $R^2$  mesure la variabilité expliquée par les facteurs et interactions dans les réponses observées [Haaland, 1989]. L'examen du  $R^2$  montre que 84% variation totale de  $\hat{Y}_{IC}$  est attribuée à CAJ et ET, et seulement 16% de la variation totale n'est pas expliquée par le model. Le  $R^2$  est un indicateur pertinent, mais il a tendance à augmenter à mesure que l'on ajoute des variables dans le model. C'est pour cela qu'il est parfois préférable de compléter l'examen par l'utilisation du  $R^2_{adj}$  qui est ajusté par rapport aux degrés de libertés [Khuri and Cornell, 1987 ; Haaland, 1989]. Sa valeur de 74% assure un ajustement satisfaisant pour le model quadratique aux données expérimentales. L'Adéquation précision (*Adeq. precision*) mesure le ratio du bruit « *signal-to-noise ration* ». Un bon ratio est supérieur à 4, la valeur de l'*Adeq. precision* est de 10.52 soit 2.63-fois la norme. L'ANOVA du modèle révèle que la Valeur-F et la probabilité associée au modèle de croissance correspondent respectivement à 8.75 et  $p < 0.0042$ . Ceci signifie que le modèle proposé est significatif. Les termes significatifs du modèle sont : l'effet linéaire de CAJ, l'effet linéaire de ET et l'effet quadratique de ET. Le model ajusté est donné par l'équation {25}.

$$\hat{Y}_{IC} = 0.72 - 0.11X_1 - 0.14X_2 + 0.09X_2^2 \quad \{25\}$$

D'après le modèle {25}, on peut voir que CAJ ( $X_1$ ) et ET ( $X_2$ ) présentent une influence négative sur la croissance. Ceci implique que, si l'on augmente CAJ-ET, ceci entraîne une inhibition de la croissance (diminution de  $\hat{Y}_{IC}$ ). Par ailleurs, plus on réduit CAJ-ET et plus,  $\hat{Y}_{IC}$  augmente. Donc, les jasmonates pourraient inhiber la biomasse en fonction de leur concentration et du temps d'exposition des CRs. Bien que Stojakowska *et al.* [2002] ne détectent pas une inhibition significative de la biomasse pour la concentration de 0.3 mM et des durées d'exposition variables (24- 48- 72 -96 h) sur les CRs de *Tanacetum parthenium*, la majorité des auteurs rapportent l'effet négative des jasmonates sur la biomasse pour divers espèces. Kang *et al.*, [2004] indiquent que malgré l'augmentation de la biosynthèse de la scopolamine et de l'hyoscyamine, le MeJA présente l'inconvénient d'inhiber la croissance des racines à partir de 1 mM. Ainsi, une concentration de 2 mM entraîne une diminution de 63% (pour ET = 72 h) de la biomasse par rapport au témoin, manifestant de sérieux dommages sur les racines qui finissent par mourir. Les mêmes observations, pour des concentrations encore plus faibles, ont été rapportées par Deng [2005] sur l'inhibition par le MeJA de la croissance des racines de jeunes semis de *Datura stramonium* lorsque sa concentration dépasse  $10^{-5}$  M. Par ailleurs, ET commence à présenter une action dépressive sur la croissance à partir de 1 mM d'AJ. Cet effet disparaît aux plus faibles concentrations (0.01 mM) y compris pour de longues durées d'exposition [Kang *et al.*, 2004].

Dans notre cas, les mêmes observations ont été faites pour la forte concentration de 10 mM (résultats non montrés ici). Bien que les lignées réagissent positivement à cette concentration après 24 heures d'élicitation, les CRs finissent par mourir quelques temps après. De plus, l'action dépressive de ET a été observée même pour les faibles concentrations d'AJ (0.017 mM). En résumé, nos résultats montrent que quelle que soit la concentration d'AJ, celui-ci exerce toujours une influence dépressive sur la biomasse dont l'intensité est variable.

38

Concernant le modèle traduisant l'effet du couple CAJ-ET sur le contenu en hyoscyamine des ----, 90% ( $R^2$ ) de la variation totale de  $\hat{Y}_{IE}$  est attribuée à CAJ-ET et seulement 10% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle. La valeur de  $R^2_{adj}$  (84%) assure un ajustement satisfaisant. L'Adéquation précision est de 12.01 soit 3-fois la norme. Ce modèle présente pour F une valeur de 15.56 et  $p < 0.0006$ . Ceci signifie que le modèle est significatif. Les termes significatifs du modèle sont l'effet linéaire de CAJ, l'effet linéaire de ET et les effets quadratiques de CAJ et ET. Le modèle ajusté est donné par l'équation {26}.

$$\hat{Y}_{IE} = 1.76 + 0.30X_1 - 0.60X_2 + 0.25X_1^2 + 0.22X_2^2 \quad \{26\}$$

L'examen du modèle {26} montre l'effet positif de l'AJ ( $X_1$ ) et l'effet négatif de ET ( $X_2$ ) sur le contenu en hyoscyamine. C'est-à-dire que, l'augmentation de la concentration de AJ entraîne une augmentation de  $\hat{Y}_{IE}$  et que l'augmentation de ET entraîne sa diminution, mais à des degrés variables. L'effet bénéfique de l'acide jasmonique sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques vient du fait que les jasmonates régulent l'expression des enzymes clés comme la PMT (Putricine Methyl Transferase) et H6H (Hyoscyamine 6  $\beta$ -Hydroxylase) de la chaîne de leur biosynthèse. Ceci a été révélé par Western blot par Kang *et al.* [2004] sur des racines adventives de *Scopolia parviflora*. De même, chez *Datura stramonium*, à partir d'une concentration de  $10^{-8}$  M, le MeJA, augmente le niveau de la phénylalanine, un des précurseurs des alcaloïdes tropaniques. Il améliore par ailleurs, le niveau de la tropinone,  $\phi$ -tropine et la tropine chez les jeunes semis de la même espèce suite à un traitement avec  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  M [Deng, 2005].

Deux conclusions se dégagent de l'évaluation des deux modèles. La première est que statiquement, ces deux modèles peuvent être exploités mathématiquement et utilisés pour l'exploration de l'espace du plan expérimental car ils décrivent assez bien les deux réponses étudiées  $\hat{Y}_{IC}$  et  $\hat{Y}_{IE}$ . La deuxième concerne la stratégie d'optimisation simultanée des deux réponses par la fonction de désirabilité. Cette dernière qui visait à priori à maximiser les deux réponses, reviendrait, finalement à une culture sans AJ puisque même les faibles concentrations inhibent la biomasse d'après l'examen des modèles mathématiques. Un compromis entre CAJ et ET est donc indispensable: améliorer le contenu en hyoscyamine sans trop altérer la biomasse. Ce compromis est possible, il suffit de trouver une solution optimale (combinaison CAJ – ET) en fixant des valeurs cibles ( $t_i$ ) à atteindre pour chaque réponse. Les

valeurs moyennes des deux limites  $l_i$  et  $u_i$  constituent les valeurs cibles : pour IC,  $t_i = 0.7$  ( $l_i = 0.4$  et  $u_i = 1$ ) et pour ET,  $t_i = 2.15$  ( $l_i = 1.3$  et  $u_i = 3$ ). Ceci nous amène à appliquer la transformation tow-sided pour l'optimisation multi-réponse ou simultanée pour ces deux réponses.

#### 4.1.3.2. Optimisation simultanée par l'utilisation de la fonction de désirabilité

L'équation {20} a été utilisée pour la transformation « two-sided » des réponses à une échelle de désirabilité individuelle où elles augmentent linéairement de 0 à 1. Elles sont notées  $d_{IC}$  pour IC et  $d_{IE}$  pour IE. L'équation {21} permet de calculer la désirabilité globale  $D$  (*Overall desirability*) destinée à sélectionner une solution optimale pour le couple CAJ - ET. Les valeurs  $d_{IC}$ ,  $d_{IE}$  et  $D$  calculées pour chaque expérience sont reportées dans le tableau 10. Harrington [1965] a défini une échelle pour l'interprétation des désirabilités, pour  $D < 0.3$ , les solutions sont inacceptables. D'après ce seuil, les expériences R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>8</sub> à R<sub>14</sub> présentent des valeurs  $D > 0.3$  (Tableau 10), ce qui indique des désirabilités globales acceptables pour les solutions (combinaisons CAJ-ET) dans le domaine expérimental relatif à ces expériences.

Tableau 10. Valeurs des désirabilités obtenues pour l'indice de croissance ( $d_{IC}$ ), l'indice d'élicitabilité ( $d_{IE}$ ) et la désirabilité globale ( $D$ ) pour chaque expérience.

Expériences	$d_{IC}$	$d_{IE}$	$D$
R <sub>1</sub>	0.00	0.23	0.00
R <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00
R <sub>3</sub>	0.66	0.00	0.00
R <sub>4</sub>	0.66	0.35	0.48
R <sub>5</sub>	0.50	0.35	0.42
R <sub>6</sub>	0.00	0.11	0.00
R <sub>7</sub>	0.00	0.23	0.00
R <sub>8</sub>	0.83	0.35	0.54
R <sub>9</sub>	0.96	0.54	0.72
R <sub>10</sub>	0.93	0.52	0.69
R <sub>11</sub>	0.90	0.52	0.69
R <sub>12</sub>	0.83	0.54	0.67
R <sub>13</sub>	1.00	0.51	0.71
R <sub>14</sub>	0.93	0.53	0.70

Les figures 2,3 présentent les surfaces de réponse ainsi générées et leurs contours estimés par les deux modèles. La surface de réponse est la représentation graphique du modèle. Les valeurs des réponses ont été transformées à une échelle de désirabilité allant de 0 à 1. Pour la biomasse, les valeurs de désirabilité les plus élevées sont celles qui correspondent à IC = 0.7. Elles se situent en générale entre les faibles valeurs du ET et les valeurs moyennes de CAJ. Les plus faibles CAJ affectent la désirabilité d'obtenir IC = 0.7 des CRs si le temps d'exposition est trop long (ET > 0) ou trop court (ET < -1) (Figure 9). Pour rappel, les valeurs de IC > 0.7 sont indésirables dans le cas du compromis retenu, c'est pour cela que la surface de réponse est pliée au-delà des solutions qui maximisent IC (>0.7).

La désirabilité d'obtenir  $IE = 2.15$  est élevée ( $d_{IE}=1$ ) y compris aux faibles CAJ (Figure 10). Les solutions optimales correspondent à tous les points d'intersections possibles entre CAJ et ET, situés au niveau de la plage grise se trouvant à la base des graphiques. Elles correspondent aux valeurs de désirabilités maximales pour IC et ET, soit respectivement  $d_{IC}= 1$  et  $d_{IE}= 1$  (Figures 9 et 10).

40

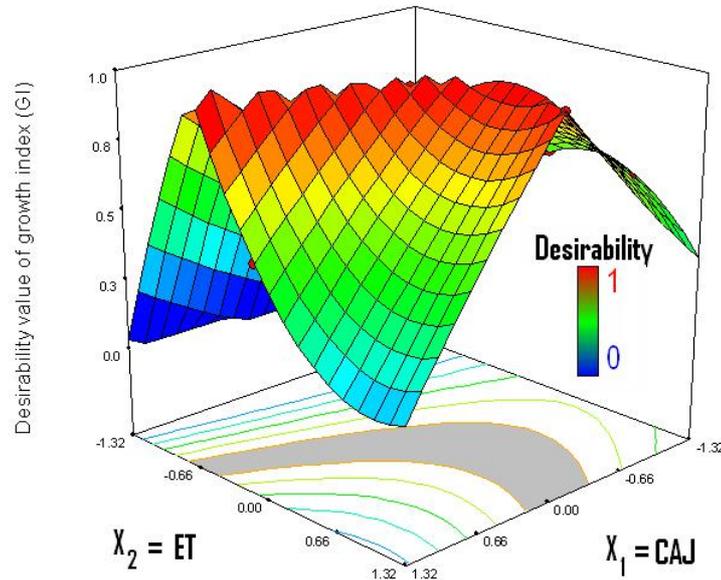


Figure 9. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité de l'indice de croissance en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).

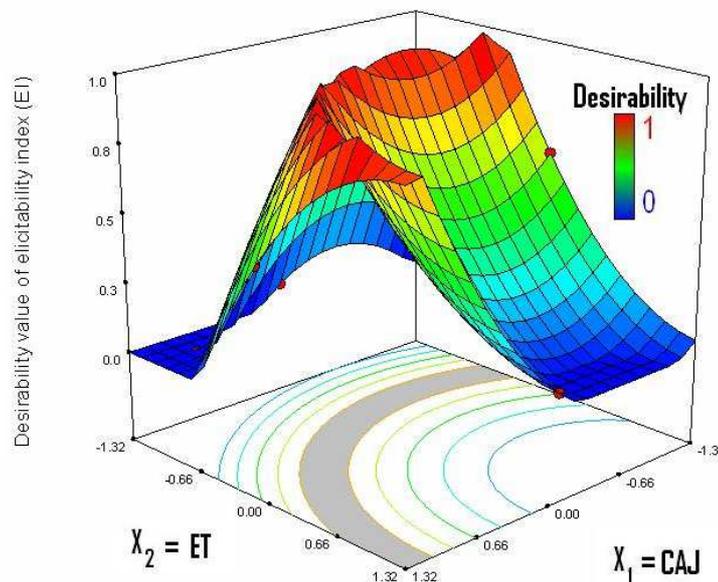


Figure 10. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité de l'indice d'élicitabilité en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).

Ces deux réponses prises séparément offrent une étendue de solutions optimales de  $d_i = 1$ . L'optimisation multi-réponse reviendrait donc à calculer la moyenne géométrique (désirabilité globale  $D$ ) de  $d_{IC}$  et  $d_{IE}$ . Le niveau de difficulté de l'optimisation multi-réponse augmente lorsque les régions

optimales des réponses à optimiser sont éloignées les unes des autres et ne se croisent pas. Il s'agit donc de trouver un compromis optimal entre le nombre total des réponses prises en compte. Pour ce faire, la fonction de désirabilité globale  $D$  est la plus importante et la plus utilisée actuellement, pour l'optimisation multi-réponse [Bezerra *et al.*, 2008].

La figure 11 représente la désirabilité globale  $D$  pour sélectionner les solutions optimales du couple CAJ-ET (meilleures combinaisons). Nous remarquons que l'étendue des solutions optimales a considérablement rétréci lorsque les deux réponses IC et IE sont prises en compte simultanément pour l'optimisation. Ceci est dû aux effets « antagonistes » du couple CAJ et ET sur la biomasse et le contenu en hyoscyamine.

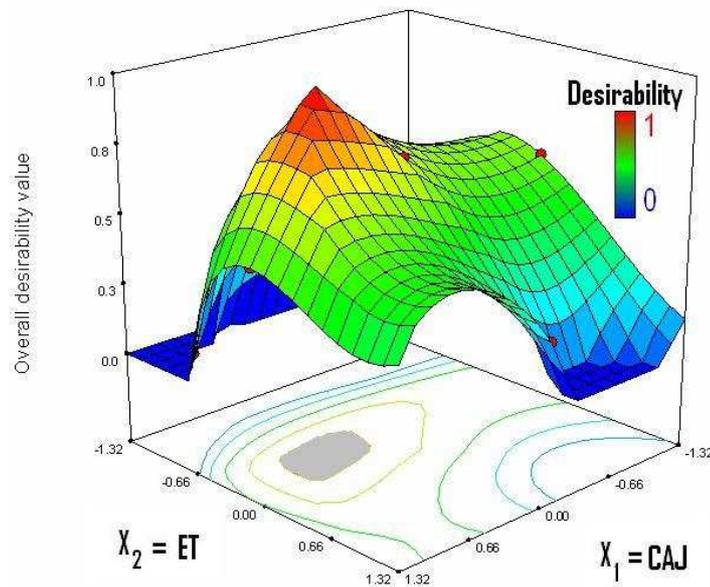


Figure 11. Surface de réponse et contours estimés des valeurs de désirabilité globale ( $D$ ) en fonction de la concentration de l'acide jasmonique (CAJ) et du temps d'exposition (ET).

Les combinaisons CAJ – ET optimales correspondent à l'intersection des deux axes (plage grise du graphique située à la base) où  $D = 1$  (Figure 11). Afin d'atteindre les valeurs cibles IC = 0.7 et IE = 2.15, la solution qui maximise  $D$  ( $=1$ ) correspond à 0.06 mM (codée 0.55) pour CAJ et 23.2 h pour ET (codée -0.24). Pour diverses espèces comme *Scopolia parviflora* [Kang *et al.*, 2004] et *Brugmansia suaveolens* [Zayed and Wink, 2004], le temps d'élicitation appliqué pour la production de l'hyoscyamine est de 24 heures. Les meilleures concentrations d'AJ, pour la production de l'hyoscyamine varient de 0.01 mM [Kang *et al.*, 2004] à 2 mM [Zayed and Wink, 2004].

Afin d'apprécier le niveau d'optimisation par rapport au témoin non élicité, des expériences de confirmation ont été réalisées avec CAJ = 0.06 mM et ET = 23.2 h. Pour des raisons pratiques le temps

d'exposition 23.2 heures a été arrondi à 24 heures. Ce dernier fait d'ailleurs, parti également des solutions optimales. Il est situé au niveau de la plage grise du graphique (Figure 11). Les mesures sont effectuées au 12<sup>ème</sup> jours et au 16<sup>ème</sup> jours afin d'apprécier les gains sur le contenu en hyoscyamine et le maintien en vigueur de la biomasse a défaut de le voire après 24 h de ET (12<sup>ème</sup> jour).

#### 4.1.3.3. Niveaux d'optimisation

Les résultats obtenus de ces expériences (Tableau 11), montrent que l'élicitation à l'AJ (0.06 M pendant 24 heures) permet une amélioration de 2.87-fois plus du rendement en hyoscyamine au 12<sup>ème</sup> jour de culture. Cependant, la biomasse a légèrement été affectée (IC = 0.88) soit une diminution de 12% par rapport au témoin non élicité. Ces résultats dépassent ceux obtenus par Zabetakis *et al.*[1999] concernant IC. En effet, le calcul de IC (biomasse fraîche) et ET à partir des résultats de ces auteurs révèlent que IC= 0.88 et une augmentation de 1.82-fois plus (IE) du contenu en hyoscyamine des racines de *D. stramonium* élicitées par 0.1 µM de MeJA par rapport au témoin au 11<sup>ème</sup> jours de culture, après une élicitation au 7<sup>ème</sup> jours [Zabetakis *et al.*1999]. Par ailleurs Kang *et al.*, [2004], ont montré que l'élicitation des racines adventives de *Scopolia parviflora* avec 0.01 mM d'AJ pendant 24 h entraîne une amélioration de 1.8-fois plus du rendement en hyoscyamine sans affecter la biomasse (elle est tout de même inférieure d'environ 10% que le témoin). De même, l'élicitation des CRs de *Brugmansia suaveolens* par 2 mM d'AJ pendant 24 heures, permet d'améliorer 25-fois plus le rendement en hyoscyamine [Zayed et Wink, 2004]. Cependant, ces auteurs ne signalent pas l'effet de cette concentration sur la biomasse.

Tableau 11. Biomasse au 16<sup>ème</sup> jour et niveau d'optimisation du contenu en hyoscyamine au 12<sup>ème</sup> jour de culture.

Concentration de l'acide jasmonique (mM)	Biomasse (gDW/l)		HS (mg/gDW)
	12 <sup>ème</sup> jour	16 <sup>ème</sup> jour	12 <sup>ème</sup> jour
0 (Témoin)	4.95 ± 0.15	6.28 ± 0.21	1.94 ± 0.27
0.06	4.98 ± 0.20	5.55 ± 0.16	5.56 ± 0.54
IC et IE (%)	IC = 1	IC = 0.88	IE = 2.87

L'élicitation est faite 24 h avant le 12<sup>ème</sup> jour.

#### 4.1.4. Conclusion

Le fait que l'AJ améliore la biosynthèse des alcaloïdes et inhibe la croissance rend l'optimisation multi-réponse délicate. Néanmoins, le calcul de la fonction de désirabilité a permis dans le cadre de cette étude, de trouver des solutions intéressantes pour l'optimisation multi-réponses. Cette fonction constitue une méthode d'optimisation puissante et simple à réaliser dans les systèmes complexes. Son application dans notre cas, a permis de trouver une solution optimale du couple CAJ-ET améliorant de 2.87-fois plus le contenu en hyoscyamine contre une inhibition de 12% de la biomasse par rapport au témoin. Ceci signifie que 88% de la biomasse des CRs est conservée après 5 jours d'élicitation. Ainsi, les valeurs optimales obtenues par cette méthode sont : CAJ = 0.06 mM et ET= 24 heures d'élicitation.

La présente étude a été menée dans un système en cuvé. L'effet inhibiteur de la croissance induit par l'AJ, même aux faibles concentrations, pourrait être dû à sa présence prolongée dans le milieu de culture (stress prolongé). On peut donc supposer que cet effet disparaîtrait dans un système où le milieu est renouvelé (sans AJ) tel que les systèmes de culture semi-continu ou continu. Ainsi, on pourrait conclure que dans ces derniers types de systèmes, les concentrations élevées ne risqueraient pas de compromettre la biomasse à condition que le temps d'exposition soit court (quelques heures) et le milieu soit renouvelé régulièrement.

## 4.2. Optimisation de la composition du milieu B5 par la Méthode des Surfaces de Réponse

44

### 4.2.1. Introduction

Les chevelus raciniars (CRs) constituent un système efficient pour la production de métabolites secondaires [Bourgaud *et al.*, 1997, Shanks and Morgan, 1999; Bourgaud *et al.*, 2001; Raoa and Ravishankarb, 2002]. Cependant, la performance de ce système de production passe obligatoirement par la maîtrise de la composition du milieu de culture. Ce dernier influe non seulement sur le contenu en alcaloïdes [Gontier *et al.* 1994 ; Saenz-Carbonell and Loyola-Vargas, 1996; Sikuli and Demeyer, 1997; Nussbaumer *et al.* 1998; Piñol *et al.* 1999; Boitel-Conti *et al.*, 2000; Lanoue *et al.*, 2004], mais aussi sur l'intensité de la réponse à l'élicitation [Amdoun *et al.*, 2009]. L'optimisation consiste à améliorer les performances d'un système et l'augmentation de son rendement en réduisant les coûts [Baş and Boyacı, 2007 ; Bezerra *et al.*, 2008].

Classiquement, la procédure expérimentale d'optimisation est réalisée par le suivi de l'influence d'un seul facteur à la fois. Lorsque ce dernier est modifié pour trouver sa valeur optimale, les autres sont maintenus à un niveau constant. C'est la technique dite « *one variable at a time technique* ». Il est clair que l'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle ne prend pas en considération les interactions entre les facteurs, donc finalement, ne représente pas les effets complets des facteurs sur le processus [Lundstedt *et al.*, 1998]. L'autre inconvénient de cette démarche est le nombre élevé d'expériences à réaliser, ce qui implique une augmentation des coûts temporels et financiers. Afin de palier à ces inconvénients, les techniques d'analyses basées sur la Response Surface Methodology (RSM) sont parmi les plus efficaces [Bezerra *et al.*, 2008]. La RSM a été introduite pour la première fois par Box & collaborateurs dans les années 50 [Box & Wilson, 1951]. Elle offre l'avantage de déterminer les conditions optimales qui maximisent ou minimisent une réponse. Elle permet d'obtenir un nombre important d'informations avec un nombre réduit d'expériences. En outre, elle révèle les interactions éventuelles entre les facteurs étudiés [Baş and Boyacı, 2007]. La RSM peut être définie comme un ensemble d'outils statistiques et techniques pour explorer et construire un rapport approximatif entre une réponse d'intérêt et un ensemble de variables. Le modèle doit décrire le comportement d'un ensemble de données en vue de faire des prédictions statistiques. L'objectif est l'optimisation simultanée des niveaux des différents facteurs pour atteindre les meilleures performances d'un système donné [Bezerra *et al.*, 2008].

La RSM est la méthode d'optimisation la plus utilisée dans les travaux de recherches ces dernières années dans les domaines de l'industrie, la chimie et la biochimie. Bien que Calam [1967] ait été l'un des pionniers à suggérer son application en biotechnologie, son champ d'application reste cependant

limité par rapport aux disciplines citées précédemment [Saval *et al.*, 1993]. Son utilisation pour l'optimisation et l'analyse des procédés biotechnologiques de production à base de microorganisme et en génie enzymatique donne de très bons résultats. A titre d'exemple, les travaux de Maddox & Richert [1977], pour l'optimisation des milieux de culture bactériens et Cheynier *et al.* [1983] pour l'optimisation de l'activité enzymatique peuvent être cités. L'application de cette technique d'analyse est cependant limitée dans les systèmes utilisant les tissus végétaux.

La présente étude fait suite à celles de Amdoun *et al.*, [2009] et vise deux principaux objectifs : le premier consiste à appliquer la RSM pour l'optimisation des composants (nitrate, calcium et saccharose) du milieu de culture B5 [Gamborg, 1968] afin d'améliorer la production en hyoscyamine (HS) des CRs élicités et le deuxième est une contribution pour démontrer l'intérêt de cette méthode dans l'optimisation des réponses d'intérêt dans les cultures de tissus végétaux.

#### **4.2.2. Matériels et méthodes**

##### *4.2.2.1. Matériel végétal*

Les CRs sont obtenus et sélectionnés puis cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites par Amdoun *et al.* [2009].

##### *4.2.2.2. Elicitation*

L'utilisation de la fonction de désirabilité a permis d'optimiser la concentration de l'acide jasmonique (AJ) et la durée de l'élicitation. Les valeurs optimales sont 0.06 mM d'AJ pour 24 heures d'élicitation (section 4.1). Ce sont ces valeurs qui ont été appliquées dans le cadre de la présente étude. Ainsi, la récolte des CRs est faite au 28<sup>ème</sup> jour de culture après élicitation à l'AJ (0.06 mM) 24 heures à l'avance. Le 28<sup>ème</sup> jour a été retenu parce qu'il correspond à la phase où la lignée sélectionnée est la plus réactive à l'élicitation et où elle présente le contenu le plus élevé en alcaloïdes tropaniques [Amdoun *et al.*, 2009]. Les témoins correspondent aux cultures non élicitées.

##### *4.2.2.3. Extraction et dosages de l'HS.*

L'extraction et le dosage de l'hyoscyamine à partir des CRs réduits en poudre (matière sèche) ont été faits selon les protocoles de Amdoun *et al.* [2009] et Kartal *et al.* [2003] respectivement.

##### *4.2.2.4. Théorie de la RSM*

La RSM vise l'ajustement des modèles empiriques aux données obtenues expérimentalement. Pour ce faire, des modèles mathématiques linéaires (1<sup>er</sup> degré) ou quadratique (2<sup>ème</sup> degré) sont utilisés pour décrire le système étudié en vue de son optimisation [Teófilo et Ferreira, 2006]. Lorsque plusieurs facteurs agissent sur un système donné, il est pratiquement impossible d'identifier et de contrôler la contribution exacte de chacun de ces facteurs. Par conséquent, il est nécessaire de ne retenir que les facteurs ayant une influence majeure. Les « *screening design* » tels que les plans factoriels  $2^k$  peuvent

être utilisés pour atteindre cet objectif, car ils sont efficaces et économiques [Lundstedt, *et al.*, 1998]. Le rapport entre la réponse et les facteurs étudiés est donné par l'équation {27}, où  $\eta$  est la réponse,  $f$  est la fonction inconnue de la réponse,  $x_1, \dots, x_n$  représentent les variables indépendantes (facteurs) et  $\varepsilon$  est l'erreur statistique qui représente les autres sources de variabilité non estimées par la fonction  $f$  y compris les erreurs dues aux mesures expérimentales.

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad \{27\}$$

Pour évaluer la courbure de la réponse, un modèle du deuxième degré doit être utilisé. Les plans factoriels  $2^k$  sont utilisés pour l'estimation des effets du premier ordre, mais ils sont inefficaces lorsque les effets additionnels, tels que les effets de second ordre, sont importants. Des points expérimentaux centraux dans les plans factoriels  $2^k$  peuvent être rajoutés pour évaluer les courbures. La fonction polynomiale du deuxième degré devrait donc contenir d'autres termes qui décrivent l'interaction entre les différentes variables expérimentales. En vue de déterminer un point critique (maximum, minimum), il est nécessaire que la fonction polynômiale du second degré contienne des termes quadratiques. Le modèle de deuxième degré est donné par l'équation {28}, où  $Y$  est la réponse,  $\alpha_0$  est l'intercepte de l'axe  $y$ ,  $\alpha_j, \alpha_{jj} \dots \alpha_{jl}$  sont les différents coefficients du modèle (linéaires et quadratiques),  $X_j$  et  $X_l$  sont les variables indépendantes (facteurs) et  $\varepsilon$  est l'erreur du modèle avec  $\forall i, V(\varepsilon_i) = \sigma^2$  (homoscédasticité) et  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$  (distribution normale).

$$Y = \alpha_0 + \sum_{j=1}^k \alpha_j X_j + \sum_{j=1}^k a_{jj} X_j^2 + \sum_{j<l}^k \sum_{l=2}^k \alpha_{jl} X_j X_l + \varepsilon \quad \{28\}$$

Le système d'équation {28} peut être résolu par la méthode des moindres carrés. Ainsi, le système d'équations à résoudre peut être écrit sous forme de matrice {29} [Goupy and Creighton, 2006]. Où  $y$  est le  $(n, 1)$  vecteur des réponses mesurées;  $X$  est la  $(n, p)$  matrice des niveaux des facteurs du modèle mathématique;  $\alpha$  est le  $(p, 1)$  vecteur des coefficients à déterminer.

$$\underbrace{\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ y_n \end{bmatrix}}_y = \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & x_{11} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{2k} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdot & \cdot & x_{nk} \end{bmatrix}}_X \underbrace{\begin{bmatrix} \alpha_0 \\ \alpha_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \alpha_k \end{bmatrix}}_\alpha + \underbrace{\begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}}_\varepsilon \quad \{29\}$$

Avec  $n$  réponses  $y$  et  $p$  coefficients dans le modèle, il y a  $n$  équations et  $n + p$  inconnues. Pour résoudre ce système, la méthode des moindres carrés est utilisée. Après calcul, la solution du système {29} est donnée par l'équation {30}.

$$\hat{a} = ({}^tXX)^{-1}{}^tXY \quad \{30\}$$

Les niveaux bas et hauts des variables (facteurs) sont codés respectivement -1 et 1. Les niveaux de la variable  $X_i$  sont codés et obtenus à l'aide de l'équation {31}, où  $X_i$  est la variable indépendante en valeur codée,  $A_i$  est la variable indépendante en valeur réelle,  $A_0$  est la variable indépendante en valeur réelle au centre et  $\Delta A_i$  est le pas.

$$X_i = (A_i - A_0) / \Delta A_i \quad \{31\}$$

Les plus connus des designs symétriques du second ordre pour la RSM sont : le plan factoriel complet, le plan de Box-Behnken, le central composite design et le plan de Doehlert. Ces plans symétriques diffèrent les uns des autres par l'emplacement des points expérimentaux dans le domaine d'étude, le nombre des niveaux des facteurs retenus, le nombre d'expériences et les blocs [Bezerra *et al.*, 2008].

#### 4.2.2.5. Capacité prédictive globale, analyse et diagnostic du modèle.

Lorsque la relation existante entre les variables et la réponse est établie grâce à la modélisation, on peut alors faire des prédictions. Cependant, le modèle mathématique obtenu après ajustement aux résultats expérimentaux peut parfois ne pas décrire de manière satisfaisante le domaine d'étude. Il est donc nécessaire d'analyser et de diagnostiquer le modèle obtenu pour en juger de sa pertinence à décrire le phénomène étudié. Si l'analyse et le diagnostic sont satisfaisants, le modèle défini peut être utilisé pour des prédictions, avec bien entendu, que les conditions demeurent identiques et qu'il existe toujours une marge d'erreur.

La capacité prédictive globale du modèle mathématique est généralement expliquée par le coefficient de détermination  $R^2$ . Cependant, une valeur élevée de ce coefficient n'implique pas nécessairement que le modèle est bon car la valeur du  $R^2$  augmente si les variables endogènes sont nombreuses même si elles ne sont pas statistiquement significatives [Myers and Montgomery, 2009]. Dans ce cas la prise en compte de la valeur de l'AAD (Absolute Average Deviation) est nécessaire [Baş and Boyaci, 2007]. L'AAD est une méthode directe qui décrit la résiduelle. Sa valeur doit être le plus faible possible entre les résultats mesurés et prédits. Elle est calculée par l'équation {32} où  $Y_{i,mes}$  et  $Y_{i,pre}$  sont respectivement les réponses mesurées expérimentalement et les réponses prédites, et  $n$  est le nombre d'expériences réalisées.

$$AAD = \left\{ \left[ \sum_{i=1}^n \left( |Y_{i,mes} - Y_{i,pre}| / Y_{i,pre} \right) \right] / n \right\} \times 100 \quad \{32\}$$

Lors de l'analyse, la signification statistique globale du modèle est déterminée par l'analyse de la variance (ANOVA, test  $F$  de Fisher). On fait aussi appel au test du manque d'adéquation. Ce dernier est appliqué afin d'estimer le bon ajustement du modèle. La signification statistique des termes du modèle

est déterminée par le test  $t$  de Student. On dit que le modèle est bien ajusté aux données expérimentales lorsqu'il est significatif et que le test du manque d'adéquation est non significatif. Ceci implique que la majorité de la variation observée doit être décrite par le modèle.

La vérification des hypothèses relatives à l'homoscédasticité et à la distribution normale des résidus est très importante lors du diagnostic. Pour ce faire, l'analyse visuelle des représentations graphiques des résidus donne des informations de valeur sur la solidité du modèle. Concernant les observations influentes sur les prédictions du modèle, les principales statistiques appliquées sont le point levier, la distance de Cook et le DFFITS.

#### 4.2.2.6. Détermination de l'optimum.

Selon le but, le point optimal peut être caractérisé comme étant le maximum ou le minimum. Par exemple, pour la fonction {33}, qui décrit la surface de réponse en fonction de deux variables  $x_1$  et  $x_2$ , il est possible de calculer les coordonnées du point stationnaire de la première dérivée des fonctions  $\delta y/x_1$  et  $\delta y/x_2$  {34}, égales à zéro. La vérification de l'exactitude de ces valeurs peut être faite par la comparaison entre les valeurs prédites par simulation mathématique à l'aide du modèle et les valeurs mesurées après la réalisation de l'expérience dans les mêmes conditions.

$$Y = f(x_1, x_2) = \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_{11} x_1^2 + \alpha_{22} x_2^2 + \alpha_{12} x_1 x_2 \quad \{33\}$$

$$\frac{\delta y}{\delta x_1} = \alpha_1 + 2\alpha_{11} x_1 + \alpha_{12} x_2 = 0 \quad \{34\}$$

$$\frac{\delta y}{\delta x_2} = \alpha_2 + 2\alpha_{22} x_2 + \alpha_{12} x_1 = 0$$

#### 4.2.2.7. Application de la RSM pour l'optimisation de la composition du milieu B5.

L'objectif est d'optimiser la composition du milieu, qui, elle-même, vise à intensifier la réponse à l'élicitation. En effet, la composition du milieu de culture influe sur l'intensité de la réponse à l'élicitation [Dunlop and Curtis, 1991; Vasconsuelo et Boland, 2007 ; Amdoun *et al.*, 2009].

Les travaux de Amdoun *et al.*, [2009] ont montré que le  $[\text{NO}_3^-]$ , le  $[\text{Ca}^{2+}]$ , l'interaction  $[\text{NO}_3^- \times \text{Ca}^{2+}]$  et enfin le  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  sont les facteurs les plus significatifs sur l'intensité de la réponse à l'élicitation des CRs (production d'HS). Bien que le  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$  est statistiquement influent, seul le  $[\text{NO}_3^-]$  et le  $[\text{Ca}^{2+}]$  sont retenus pour l'optimisation par RSM vu que leurs effets propres et leur interaction sont très importants. Le saccharose a été également retenu pour l'optimisation vu son effet avéré sur la biomasse et le contenu en alcaloïdes [ Saenz-Carbonell and Loyola-Vargas, 1996 ; Nussbaumer and al., 1998].

Le Central Composite Design (CCD) a été retenu pour recueillir les observations (réponses mesurées) qui vont servir à écrire le modèle mathématique. Le CCD a été décrit par Box et Wilson dans

les années 1950. Ce plan comporte trois parties, un plan factoriel  $2^k$ , au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude et, un plan en étoile dont les points axiaux  $-a$  et  $+a$  sont situés sur les axes de chacun des facteurs. Ce plan est parfaitement adapté à une acquisition progressive des résultats lorsqu'on applique un plan factoriel  $2^k$ . En effet, Il suffit de réaliser les expériences correspondant aux points du plan en étoile et de faire les calculs sur l'ensemble des expériences si les résultats sont insuffisamment expliqués par un modèle linéaire. La figure 12 représente le domaine d'étude, la gamme et les niveaux des variables étudiées. Au total, 5 niveaux sont retenus pour chacun des trois facteurs considérés ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et saccharose). Ainsi, l'application du CCD reviendrait à réaliser 20 expériences combinant les 3 facteurs, dont six sont situées au centre du domaine d'étude. Le critère d'optimalité choisi est l'orthogonalité, dans ce cas  $a = (Q * F / 4)^{1/4} = \pm 1.52$ , avec  $Q = [(F+T)^{1/2} - F^{1/2}]^2$  où  $F$  est le nombre de point du factoriel design,  $T = 2k + n$ , le nombre des points additionnels et  $n$  est le nombre des points dans le centre du design [Myers, 1971]. Chaque points ( $R_1 \dots R_{20}$ ) correspond à une expérience. Les points  $R_1$  à  $R_8$  constituent le plan factoriel  $2^k$ . Les points  $R_9$  à  $R_{14}$  constituent le plan en étoile. Les points  $R_{15}$  à  $R_{20}$  constituent les expériences effectuées au centre du domaine d'étude.

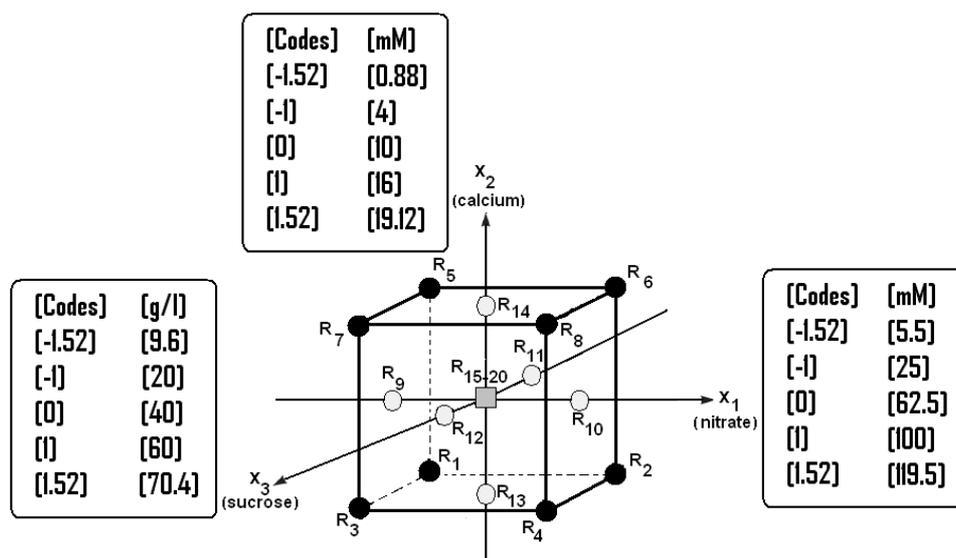


Figure 12. Domaine d'étude et niveaux de chacun des 3 facteurs du CCD ( $X_1$  :  $\text{NO}_3^-$  ;  $X_2$  :  $\text{Ca}^{2+}$  et  $X_3$  : saccharose).

Pour l'ensemble des expériences, la culture des chevelus racinaires est réalisée dans des boîtes de Petri contenant 20 ml de milieu B5 [Gamborg, 1968]. Les formes chimiques de chacun des éléments minéraux étudiés sont  $\text{HNO}_3$  pour  $[\text{NO}_3^-]$ , et  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pour  $[\text{Ca}^{2+}]$  afin d'éviter l'apport simultané des éléments accompagnateurs. Le pH des milieux est ajusté à 5,8 [Dechaux et Boitel-Conti, 2005]. La quantité de l'inoculum par boîte est de 0,3 g de poids frais prélevé sur les extrémités d'une lignée CR de *D. stramonium* sélectionnée. La réponse mesurée est le rendement en hyoscyamine (mg/l). Les moyennes sont calculées sur la base de trois répétitions. Le témoin correspond à la culture du chevelu

racinaire dans le milieu B5 contenant 25 mM de  $[\text{NO}_3^-]$ , 1.0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]$  et 3% de saccharose, et dans les mêmes conditions d'obscurité et de température.

### 4.2.3. Résultats et discussions

#### 4.2.3.1. Prédicativité globale du modèle.

Le coefficient de détermination  $R^2$  mesure la variabilité expliquée par les facteurs et leurs interactions dans les réponses observées [Haaland, 1989]. Il est de 0.97 pour le modèle obtenu, ceci suggère que 97% du rendement en HS des CRs élicités est attribué aux variables indépendantes, et que 3% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle. La valeur de l'AAD est faible (1.2%) et la valeur de l'écart type est de  $\sigma = 0.9$ . Le modèle explique donc la quasi-totalité de la variabilité, il est globalement prédictif.

#### 4.2.3.2. Analyses du modèle quadratique.

La valeur du test  $F$  et de la probabilité montrent que le modèle est statistiquement significatif. Le test du manque d'adéquation est non significatif (Tableau 12), ceci implique que le modèle est globalement bien ajusté aux données expérimentales.

Tableau 12. Tableau d'analyse de la variance du modèle quadratique.

Source	SCE	Ddl	CM	F	p
Modèle	9537.1	10	953.7	414.1	0.0 ***
Résiduelle	20.7	9	2.3		
Test du manque d'adéquation	16.1	4	4.0	4.3	0.1 n.s
Erreur absolue	4.7	5	0.9		
Total	9557.8	19			

\*\*\*: très hautement significatif ; n.s: non significatif.

Tous les termes linéaires relatifs au  $[\text{NO}_3^-]$ , au  $[\text{Ca}^{2+}]$  à l'interaction  $[\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}]$  ainsi que l'effet du saccharose sont significativement positifs (Tableau 13).

Tableau 13. Analyse des termes du modèle quadratique.

Termes du modèle	Coefficients estimés	t	p
Intercepte	104.8	172.2	-
$x_1$ : nitrate	10.5	24.6	0.0 ***
$x_2$ : calcium	5.5	12.9	0.0 ***
$x_3$ : sucrose	4.2	9.8	0.0 ***
$x_1x_2$	3.5	6.5	0.0 ***
$x_1x_3$	1.0	1.9	0.1 n.s
$x_2x_3$	1.0	1.9	0.1 n.s
$x_1^2$	-16.4	-35.4	0.0 ***
$x_2^2$	-14.4	-31.1	0.0 ***
$x_3^2$	-14.5	-31.3	0.0 ***
$x_1x_2x_3$	0.7	1.3	0.2 n.s

\*\*\*: très hautement significatif ; n.s: non significatif.

L'effet linéaire de ce dernier est presque aussi important que celui du  $[Ca^{2+}]$ . Plus la concentration de ces trois éléments augmente dans le milieu B5 est plus la réponse à l'élicitation des CI 51 significativement importante jusqu'à certaines limites où cette réponse s'atténue, comme le montre les effets quadratiques négatifs des trois composantes.

L'effet bénéfique du  $[NO_3^-]$  est double, il améliore simultanément la biomasse [Skuli and Demeyer, 1997; Nussbaumer *et al.*, 1998, Amdoun *et al.*, 2009] et la production en HS des CRs [Nussbaumer *et al.*, 1998, Amdoun *et al.*, 2009]. C'est l'un des éléments les plus importants du milieu de culture pour améliorer le rendement en HS des CRs élicités. En effet, sa carence dans la première semaine de culture influence négativement sur la réponse à l'élicitation des CRs [Amdoun *et al.*, 2009]. Par ailleurs, son excès dans le milieu (à partir de 95 mM) présente un effet négatif sur la biomasse [Nussbaumer *et al.*, 1998, Chashmi *et al.*, 2008, Amdoun *et al.*, 2009]. Le  $[Ca^{2+}]$  vient en deuxième position selon l'ordre d'importance des éléments minéraux qui améliore le rendement en HS suite à l'élicitation [Amdoun *et al.*, 2009]. Le  $[Ca^{2+}]$  active la PMT (*putricine méthyle transférase*) qui est une enzyme intervenant dans la chaîne de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques [Gontier *et al.*, 1994 ; Piñol *et al.*, 1999]. Il intervient aussi comme messenger secondaire. En effet, le  $[Ca^{2+}]$  occupe une place importante dans la transduction du signal et la régulation cellulaire. Son flux intracellulaire s'active suite à un stimulus (ex. élicitation) et déclenche ainsi les réactions de défense [Zhao *et al.*, 2005; Vasconsuelo et Boland, 2007]. Concernant le saccharose, Saenz-Carbonell & Loyola-Vargas [1996] trouvent qu'il améliore surtout la production spécifique en HS. Dans notre cas, le saccharose améliore surtout la biomasse (jusqu'à une certaine limite).

#### 4.2.3.3. Diagnostic du modèle quadratique

##### a. Méthodes graphiques

La validité d'un modèle peut être testée par l'analyse des résidus. On appelle résidu la différence entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites par le modèle. C'est donc, la partie non expliquée par l'équation du modèle. Cette analyse permet aussi de détecter d'éventuelles observations atypiques parmi l'ensemble des données.

On utilise principalement des méthodes graphiques pour l'analyse des résidus dont le graphique des résidus en fonction des valeurs prédites [Dodge, 1993]. Cette représentation graphique est utile pour vérifier l'hypothèse de l'homoscédasticité des erreurs. Si le modèle choisi est adéquat, les résidus sont distribués uniformément sur une bande horizontale du graphique. L'examen de la figure 13A montre une dispersion aléatoire des résiduelles studentisées en fonction des valeurs prédites, donc l'hypothèse de l'homoscédasticité est vérifiée. Une autre hypothèse importante sur les résidus est leur distribution normale. La représentation graphique de la distribution normale des résidus studentisés est un outil important pour le diagnostic [Draper and Smith, 1981; Montgomery, 2008]. La figure 13B montre une

distribution normale des résidus studentisés et une indépendance les uns des autres. Ceci suggère qu'il n'y a aucun signe d'un quelconque problème dans nos résultats.

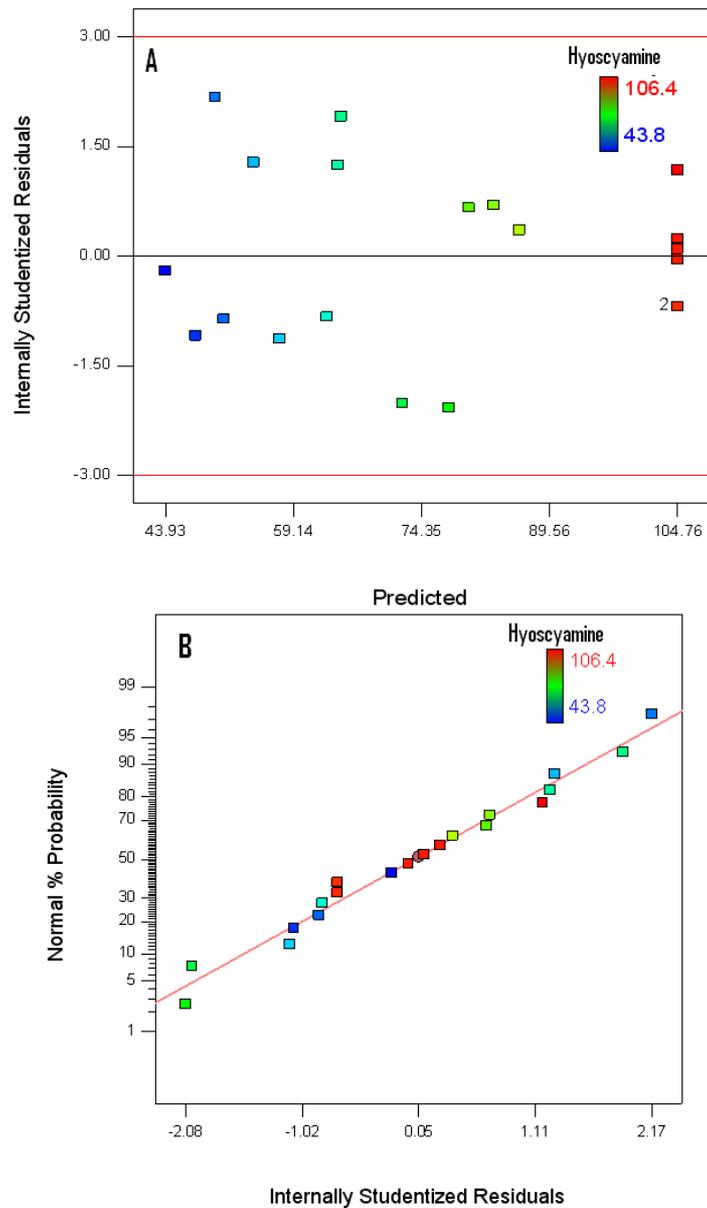


Figure 13. Diagnostic : résidus studentisés en fonction des valeurs prédites (A); distribution normale des résidus (B).

*b. Observations influentes et accommodation.*

Si la valeur d'une observation s'écarte fortement de la forme supposée de la distribution de l'ensemble des observations, elle est dite atypique. Si cette forme est modifiée, l'observation peut alors devenir concordante avec le nouveau modèle [Dodge, 1993]. Après la détection des observations atypiques, leur accommodation peut se faire de différentes manières, telle que la collecte des données supplémentaires, la respécification du modèle ou la suppression des observations [Mason, *et al.* 2003]. Une valeur atypique est dite « observation influente » si sa présence dans les données affecte fortement les coefficients estimés du modèle [Mason, *et al.* 2003]. Les mesures classiques de l'influence des

observations sur les prédictions d'un modèle sont le point levier, la distance de Cook et DFFITS (Tableau 14).

Tableau 14. Diagnostic : observations influentes.

<i>Modèle avec tous les termes</i>									
<i>Ordre des expériences</i>	<i>Niveaux codés des variables</i>			<i>Mesuré</i>	<i>Prédit</i>	<i>Résidu</i>	<i>Point levier</i>	<i>Distance de Cook</i>	<i>DFFITS</i>
	$x_1$ [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	$x_2$ [Ca <sup>2+</sup> ]	$x_3$ [sucrose]						
R <sub>1</sub>	-1.00	-1.00	-1.00	43.8	43.9	-0.1	0.8	0.0	-0.4
R <sub>2</sub>	1.00	-1.00	-1.00	56.8	57.5	-0.7	0.8	0.5	-2.5*
R <sub>3</sub>	-1.00	1.00	-1.00	46.8	47.5	-0.7	0.8	0.5	-2.4*
R <sub>4</sub>	1.00	1.00	-1.00	70.8	72.0	-1.3	0.8	1.7*	-5.6*
R <sub>5</sub>	-1.00	-1.00	1.00	51.2	49.8	1.4	0.8	2.0*	6.5*
R <sub>6</sub>	1.00	-1.00	1.00	65.2	64.4	0.8	0.8	0.7	2.8*
R <sub>7</sub>	-1.00	1.00	1.00	55.2	54.4	0.8	0.8	0.7	2.9*
R <sub>8</sub>	1.00	1.00	1.00	86.2	86.0	0.2	0.8	0.1	0.7
R <sub>9</sub>	-1.52	0.00	0.00	50.0	50.9	-0.9	0.6	0.1	-1.0*
R <sub>10</sub>	1.52	0.00	0.00	83.6	83.0	0.7	0.6	0.1	0.8
R <sub>11</sub>	0.00	-1.52	0.00	62.3	63.1	-0.8	0.6	0.1	-0.9
R <sub>12</sub>	0.00	1.52	0.00	80.6	79.9	0.7	0.6	0.1	0.7
R <sub>13</sub>	0.00	0.00	-1.52	66.7	64.8	1.8	0.6	0.4	2.7*
R <sub>14</sub>	0.00	0.00	1.52	75.5	77.5	-2.0	0.6	0.5	-3.1*
R <sub>15</sub>	0.00	0.00	0.00	103.8	104.8	-1.0	0.2	0.0	-0.3
R <sub>16</sub>	0.00	0.00	0.00	104.7	104.8	-0.0	0.2	0.0	0.0
R <sub>17</sub>	0.00	0.00	0.00	105.1	104.8	0.3	0.2	0.0	0.1
R <sub>18</sub>	0.00	0.00	0.00	106.4	104.8	1.6	0.2	0.0	0.5
R <sub>19</sub>	0.00	0.00	0.00	103.8	104.8	-1.0	0.2	0.0	-0.3
R <sub>20</sub>	0.00	0.00	0.00	104.9	104.8	0.1	0.2	0.0	0.0
<i>Modèle avec seulement les termes significatifs (équation 35)</i>									
R <sub>4</sub>	1.00	1.00	-1.00	70.8	74.8	-4.0	0.6	0.9	-4.7*
R <sub>8</sub>	1.00	1.00	1.00	86.2	83.2	2.3	0.5	0.5	2.4*
R <sub>14</sub>	0.00	0.00	1.52	75.5	77.5	-2.0	0.6	0.5	-2.2*

\*: observations influentes.

On appelle point levier une observation  $i$  telle que l'estimation de la  $i^{\text{ème}}$  variable réponse  $Y_i$  est fortement influencée par la valeur de la variable indépendante  $X_i$  correspondante ; tout point levier est compris entre 0 et 1 [Dodge, 1993]. Le tableau 14 ne montre pas de valeurs extrêmes concernant le point levier pour l'ensemble des observations. Cependant, les valeurs des observations R<sub>1</sub> à R<sub>8</sub> se rapprochent de 1. Le point levier ne prend pas en compte le résidu de l'observation, pour compléter le diagnostic, la distance Cook et le DFFITS sont alors examinés. Ces dernières combinent étroitement leviers et résidus. La distance de Cook d'une observation est une mesure de l'influence de cette observation sur l'ensemble des prédictions du modèle. La valeur de la distance de Cook doit être inférieure à 1 [Cook, 1977]. Les observations R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> présentent une influence importante sur l'ensemble des prédictions du modèle (Tableau 14). La mesure DFFITS d'une observation est une mesure de l'influence de cette observation sur la prédiction de sa propre valeur par le modèle. La valeur DFFITS ne devrait pas dépasser 1 [Belsley, 2004]. Comme nous pouvons le constater, les expériences

R<sub>2</sub> à R<sub>7</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>13</sub> et R<sub>14</sub> présentent des influences importantes (Tableau 14). D'après ce diagnostic, on devrait s'attendre à des écarts si on est amené à faire des prédictions dans le domaine expérimental voisin de ces points (observations atypiques). Pour améliorer l'exactitude du modèle, une des premières opérations à faire est la sélection des termes statistiquement les plus influents. Dans ce cas, le modèle est donné par l'équation {35}.

$$\hat{Y}_{HS} = 1047 + 105X_1 + 5.5X_2 + 4.2X_3 + 3.5X_1X_2 - 164X_1^2 - 144X_2^2 - 145X_3^2 \quad \{35\}$$

Après cette opération, seules les observations R<sub>4</sub>, R<sub>8</sub> et R<sub>14</sub> présentent des valeurs DFFITS importantes (Tableau 14). Vu que les données ne nécessitent pas de transformation ( $Y^\lambda$ ) comme c'est vérifié par l'examen du Box-Cox Plot (Figure 14), nous décidons d'accommoder ces observations par leur suppression étant donné qu'ils ont pour origine des erreurs de mesures. Après la suppression de l'observation R<sub>4</sub> qui possède la plus forte valeur DFFITS, seul l'observation R<sub>14</sub> présente une valeur atypique. Après la suppression de cette dernière, le diagnostic des observations influentes ne révèle aucune valeur atypique. Notons que les hypothèses relatives à la distribution normale des résidus et leur indépendance, l'homoscédasticité ainsi que la signification statistique du modèle sont toujours vérifiées.

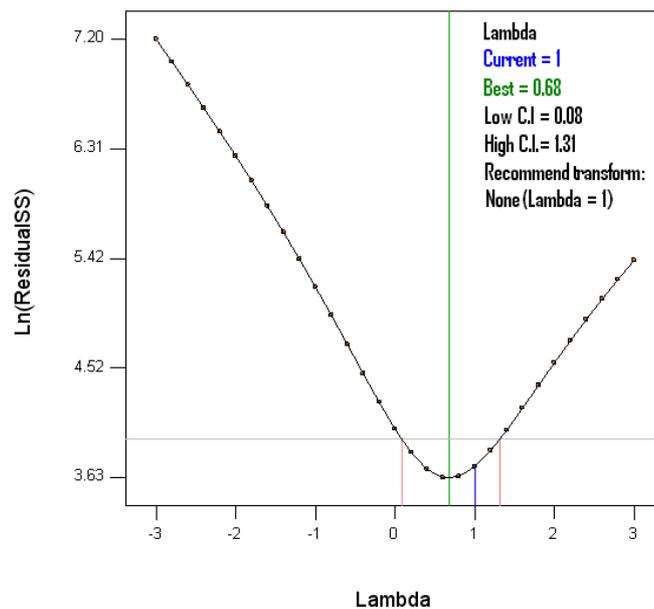


Figure 14. Transformations de  $Y^\lambda$  : représentation graphique de Box-Cox.

La déletion des observations R<sub>4</sub> puis R<sub>14</sub> améliore l'exactitude des coefficients estimés. Le CV % est passé de 2.0 à 0.9, notons que l'AAD dans ce cas est de 0.4%. Plus exact, c'est donc le modèle  $\hat{Y}_{HS}$  {équation 36} qui a été retenu pour l'analyse des surfaces de réponse et la détermination des concentrations optimales.

$$\hat{Y}_{HS} = 104.7 + 11.0 X_1 + 6.0 X_2 + 4.1 X_3 + 4.3 X_1 X_2 - 16.4 X_1^2 - 14.4 X_2^2 - 13.7 X_3^2 \quad \{36\}$$

#### 4.2.3.4. Analyse de la surface de réponse (RS) et détermination des concentrations optimales

La représentation graphique de la fonction de l'erreur standard (StdErr) (Figure 15A) est symétrique et sa plus grande valeur est atteinte au niveau des quatre coins du domaine d'étude. Par contre, elle est de 0.3 dans la région centrale du domaine d'étude. Ces faibles valeurs sont assimilées à une bonne qualité de modélisation, par conséquent, le modèle {36} permet d'estimer les valeurs de la réponse  $\hat{Y}_{HS}$  dans tout le domaine d'étude.

Les RS sont la représentation graphique du modèle mathématique dans le domaine d'étude. La figure 15B représente la RS de la teneur en HS des CRs élicités en fonction des concentrations de  $[\text{NO}_3^-]$  ( $X_1$ ) et du  $[\text{Ca}^{2+}]$  ( $X_2$ ). La valeur du saccharose a été fixée à sa valeur centrale codée 0.0 (équivalent à 40 g/l). A partir de cette figure, pour différentes combinaisons du  $[\text{NO}_3^-]$  et du  $[\text{Ca}^{2+}]$ , les réponses peuvent être prédites. Cette figure offre un outil intéressant pour visualiser l'effet simultané du  $[\text{NO}_3^-]$  et du  $[\text{Ca}^{2+}]$  sur le rendement en HS des CRs élicités. L'augmentation du rendement en HS est corrélée avec l'augmentation des concentrations du couple  $[\text{NO}_3^-, \text{Ca}^{2+}]$  jusqu'à une certaine limite où la réponse tend à diminuer, au delà de la région plus ou moins centrale du domaine d'étude (Figure 15B). L'effet bénéfique de cette interaction est déjà rapporté par Amdoun *et al.* [2009]. Dans le cas des faibles réponses associées aux faibles valeurs du couple  $[\text{NO}_3^-, \text{Ca}^{2+}]$ , les cellules se trouveraient dans un état nutritionnel critique pour se défendre face au stress (élicitation) [Amdoun *et al.*, 2009]. Par contre, les fortes valeurs du couple  $[\text{NO}_3^-, \text{Ca}^{2+}]$  influencent négativement la biomasse, ce qui se répercute négativement sur le rendement en HS. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Skuli and Demeyer [1997] concernant la biomasse. Ces auteurs trouvent les valeurs les plus faibles de la biomasse et de l'HS des CRs (non élicités) de *D. stramoium* cultivés dans le milieu B5 où la balance ionique est à tendance nitrate-calcium. Cet effet est accentué surtout lorsque la valeur du  $[\text{Ca}^{2+}]$  est importante. Notons que l'activité de la *nitrate réductase* mesurée dans ces CRs est très importante pour ce milieu [Skuli and Demeyer, 1997].

Toutes les combinaisons du couple  $[\text{NO}_3^-, \text{Ca}^{2+}]$  passant par la zone grise sur la figure 4B représentent des solutions optimales. Cependant, les concentrations de l'optimum local correspondent aux valeurs positives des variables où les premières dérivées ( $\delta Y_{HS}/x_1$ ;  $\delta Y_{HS}/x_2$ ;  $\delta Y_{HS}/x_3$ ) du modèle {36} s'annulent. Les concentrations optimales en valeurs codées ainsi calculées correspondent à 0.37 pour  $[\text{NO}_3^-]$ , 0.26 pour  $[\text{Ca}^{2+}]$  et 0.14 pour le saccharose, ce qui est équivalent en valeurs réelles à 79.1 mM, 11.4 mM et 42.9 g/l respectivement. Ceci correspond au milieu B5 optimisé (B5-OP). Les concentrations optimales calculées se situent dans les environs où la fonction de StdErr est la plus faible du domaine d'étude où l'exactitude prédictive du modèle {36} est avérée.

Après simulation du rendement en HS que donnerait les CRs élicités cultivés dans le milieu B5-OP, la valeur prédite par le modèle est de 107.90 mg par litre. L'intervalle de prédiction (95% PI) calculé est égale à 95% PI = [106.17 ; 109.72]. Le rendement mesuré pour ces mêmes concentrations et dans les mêmes conditions est de  $110.3 \pm 1.4$  mg par litre. Cette valeur est incluse dans l'intervalle 95% PI, validant ainsi les concentrations optimales de  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]$  et saccharose.

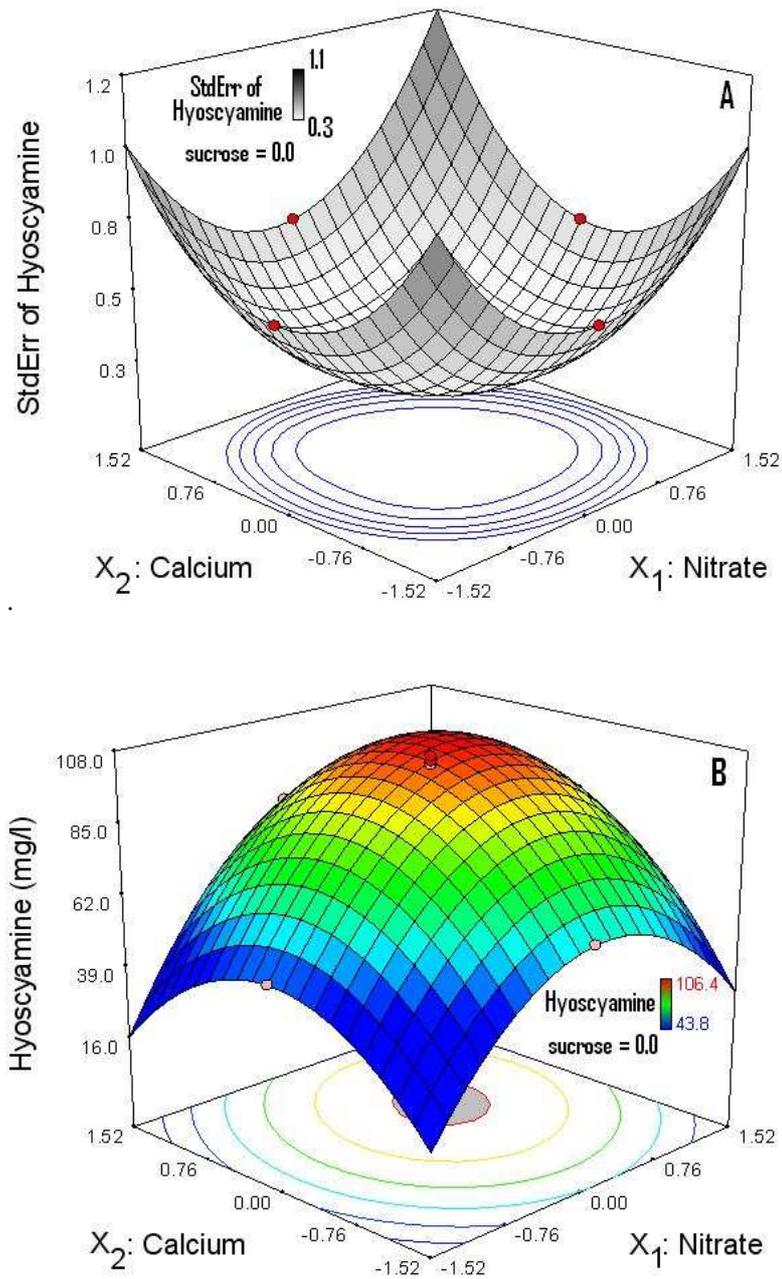


Figure 15. Surface de réponse et contours estimés de la fonction de l'erreur standard (StandErr) (A) et du rendement en HS (B) des CRs élicités par l'AJ en fonction du couple  $[\text{NO}_3^-]-[\text{Ca}^{2+}]$ .

#### 4.2.3.5. Niveau d'optimisation.

La figure 16 montre une culture en Erlenmeyer de 250 ml et en boîte de Petri des CRs dans le milieu B5-OP présentant une biomasse importante par rapport à une culture des CRs en milieu B5 témoin (non modifié).

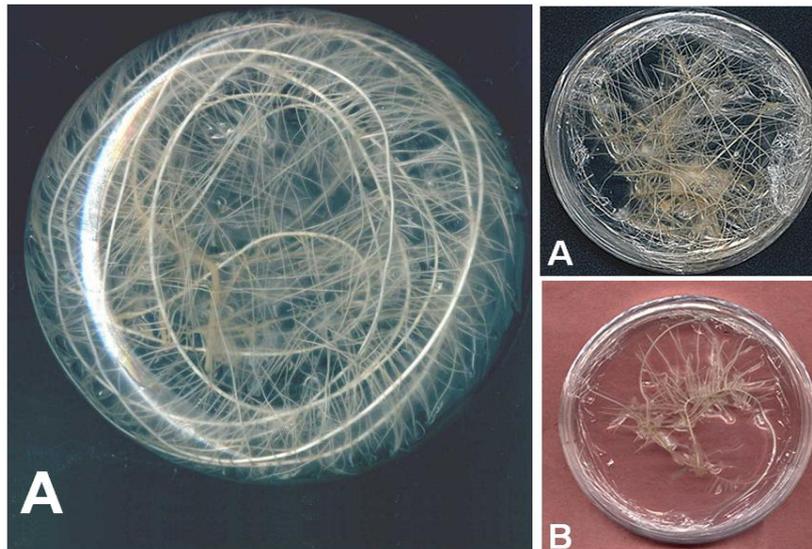


Figure 16. Aspect des CRs au 20<sup>ème</sup> jour de culture dans le milieu B5-OP (A) et le milieu B5 témoin (B).

Le milieu B5-OP permet d'obtenir une amélioration significative de 51.2% sur la biomasse par rapport aux CRs témoins (Tableau 15). De même, une différence significative est observée pour la production spécifique en HS des CRs élicités et non élicités, l'optimisation est de 81.0% et 101.2% respectivement, par rapport aux CRs témoins. L'amélioration du rendement en HS est d'environ 173.6% pour les CRs non élicités et de 212.7% pour les CRs élicités cultivés respectivement dans le milieu B5-OP par rapport aux CRs témoins.

Tableau 15. Biomasse et production en HS des CRs cultivés dans le milieu B5 témoin et le milieu B5-OP au 28<sup>ème</sup> jour de culture.

	Biomasse (g DW/l)	Production en HS				
		(mg/g DW)		(mg/l)		
		sans élicitation	avec élicitation	sans élicitation	avec élicitation	
B5 *	8.4 ± 0.6	2.1 ± 0.1	4.2 ± 0.6	17.6 ± 1.6	35.3 ± 2.0	
B5-OP **	12.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	8.5 ± 0.3	48.3 ± 2.3	110.3 ± 1.4	
Optimisation	51.2%	81.0%	101.2%	173.6%	212.7%	
LSD test	différence	-4.3	-1.7	-4.3	-30.6	-75.0
	± limites	0.9	0.2	0.8	4.4	13.8
	signification	significatif	significatif	significatif	significatif	significatif

\* B5 control (25 mM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1.0 of Ca<sup>2+</sup> et 3% of sucrose); \*\*: B5-OP optimized (79.1 mM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 11.4 of Ca<sup>2+</sup> et 42.9% of sucrose).

#### 4.2.4. Conclusion

La sélection des variables statistiquement significatives permet d'améliorer l'exactitude du modèle. En effet, après le diagnostic, certaines observations atypiques liées au modèle comprenant tous les termes ne le sont plus après cette sélection. L'accommodation des observations atypiques par délétion doit être faite prudemment, elle est surtout utilisée lorsqu'elles ont comme origine une erreur

expérimentale. Deux observations seulement ont été supprimées dans cette étude après la sélection des variables significatives. La suppression est faite en deux étapes avec une seule observation supprimée à chaque étape suivie d'une nouvelle analyse et d'un nouveau diagnostic.

L'optimisation du milieu B5 améliore la réponse à l'élicitation. En effet, l'optimisation du rendement en HS est de 212.7% pour les CRs élicités de *D. stramonium* cultivés dans le milieu B5-OP (optimisé) par rapport à ceux cultivés dans le milieu B5 témoin (non modifié). Les concentrations optimales pour la lignée sélectionnée et dans nos conditions de travail sont : 79.1 mM, 11.4 mM et 42.9 g/l pour respectivement le  $[\text{NO}_3^-]$ , le  $[\text{Ca}^{2+}]$  et le saccharose. Ces valeurs correspondent aux solutions des premières dérivées du modèle (optimum local). Toutefois, toutes les concentrations appartenant à la région optimale de la surface de réponse, donnant lieu au même rendement, peuvent être utilisées.

Le rendement en HS des CRs élicités et cultivés dans le milieu B5-OP pourrait être encore amélioré en introduisant des carences intermittentes en macroéléments surtout en nitrate comme le recommandent Amdoun *et al.*[2009] dont la faisabilité reste, évidemment, à confirmer et la durée de ces phases ainsi que les fréquences de carence et d'élicitation à déterminer. En condition de production en bioreacteur, il est clair que ces concentrations optimales devront, à ce moment, être déterminées et apportées en fonction du volume du milieu B5 et de la biomasse (taux de croissance).

Cette nouvelle approche dans l'optimisation du milieu B5 pour maximiser la réponse à l'élicitation a permis d'améliorer significativement à la fois la biomasse et le contenu en alcaloïdes. Ceci est rendu possible grâce au pouvoir de simulation et de prédiction du modèle quadratique mis au point. Ceci dispense les chercheurs de réaliser de beaucoup d'expériences et de gagner ainsi du temps. La modélisation mathématique constitue un outil puissant pour l'étude des phénomènes biologiques. Dans le cadre de cette étude, l'application de la RSM pour optimiser la composition du milieu B5 en  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]$  et saccharose a été faite en ne réalisant que seulement 20 expériences, ce qui a permis d'écrire un modèle quadratique traduisant les effets de ces nutriments sur le contenu en HS des CRs élicités à l'AJ.

## 5. Conclusion générale et perspectives

Au terme de ce travail, la conclusion et les perspectives porteront sur deux principaux points : 1) productions de lignées racinaires performantes ; 2) optimisation de l'élicitation et de la composition du milieu de culture.

### *1. Production de lignées racinaires performantes*

L'optimisation de la production par voie biotechnologique des alcaloïdes tropaniques à partir de CR de *D. stramonium* doit débiter par l'utilisation de lignées performantes (bonne croissance, bonne productivité et bonne réactivité à l'élicitation). Ceci est possible grâce à la mise au point d'un protocole optimisé pour l'induction du maximum de racines visant à produire des lignées performantes de CRs.

Bien que le milieu de culture bactérien et l'acétosyringone soient des facteurs influents sur l'obtention des CRs, la souche bactérienne est le facteur le plus important. Elle influe sur plusieurs caractères aussi bien morphologiques que physiologiques. En utilisant la souche A<sub>4</sub> suspendue dans le milieu YEM additionnée avec 10 mM d'acétosyringone, on peut avoir une bonne production de CRs. Cependant, la recherche d'autres souches bactériennes est nécessaire pour optimiser le protocole d'infection. L'obtention doit être suivie par une caractérisation et une sélection rigoureuse en se basant au moins sur trois critères de performance : la biomasse, le contenu alcaloïdique et la réactivité à l'élicitation. Sur les 106 racines induites par la meilleure combinaison "*A. rhizogenes* x *D. stramonium*", seules 4 lignées ont été caractérisées et sélectionnées selon ces critères.

Certaines lignées perdent leur performance productive au cours des subcultures successives. Les travaux de Dechaux et Boietl-Conti [2005] ont déjà décrit ce phénomène pour la scopolamine. Cette perte n'est pas liée à des modifications moléculaires car ces auteurs ont prouvé qu'il y a toujours transcription du gène *h6h* codant pour l'enzyme H6H qui est l'une des dernières enzymes intervenant dans la bioconversion de l'hyoscyamine en scopolamine. De ce fait, il ne suffit pas donc que la lignée sélectionnée soit performante, il faut aussi qu'elle soit stable. L'intégration du critère «stabilité de la lignée» au cours de la caractérisation-sélection doit être pris en considération pour définir la performance d'une lignée.

La caractérisation moléculaire de lignées obtenues peut se révéler fort intéressante sur plusieurs plans. La détermination des sites d'insérsions et du nombre de copies du T-DNA dans le génome de la plante donnant lieu à des racines performantes pourra révolutionner radicalement les protocoles d'obtention. En effet, ceci peut s'avérer d'un grand intérêt, l'infection sera mieux contrôlée et le transfert des gènes Ri de *A. rhizogenes* plus maîtrisé. Ainsi, l'obtention de lignées performantes de CRs ne sera pas aléatoire. De même, les phases de sélection et de caractérisation n'auront plus raison d'être. Elles auront pour simple objectif la confirmation des performances des CRs obtenus. L'ingénierie

moléculaire pourrait jouer un rôle essentiel dans la mise au point de lignées performantes par l'introduction de gènes comme celui qui code la PMT comme le montre les travaux de Zhang et al. [2004] sur les CRs de *Hyoscyamus muticus*.

## ***2. Optimisation de l'élicitation et de la composition du milieu de culture***

L'optimisation de l'élicitation et de la composition du milieu de culture, qui sont deux stratégies complémentaires, a été faite selon une approche par modélisation mathématique moyennant la technique du *screening* et de la RSM. L'objectif est de tirer le maximum d'informations tout en minimisant le nombre d'expériences nécessaires pour atteindre ce but.

La présente étude a montré que lorsque la lignée se trouve dans de bonnes conditions nutritionnelles, l'élicitation est efficace à partir du 8<sup>ème</sup> jour de culture. Les cellules du CR consomment les macronutriments pour accumuler, dans un premier temps, la biomasse avant de produire les alcaloïdes de manière significative ; un minimum de 12 jours est nécessaire selon nos conditions expérimentales concernant le  $\text{NO}_3^-$  pour que son effet soit effectif sur la réponse à l'élicitation par la suite. La réponse la plus importante à l'élicitation des CRs correspond à la phase où le milieu B5 est épuisé surtout en  $\text{NO}_3^-$ . Ces observations nous ont amenés à préconiser une stratégie de carence intermittente en système de culture continue après des phases de culture dans un milieu de composition optimale pour maximiser le rendement en alcaloïdes. Evidemment, la faisabilité et la pertinence de cette stratégie reste à vérifier et la durée de ces phases ainsi que les fréquences de carence et d'élicitation à déterminer.

La modélisation a permis de départager les effets de quelques éléments clés du milieu B5 et de les classer en fonction de leur importance dans le phénomène de la réponse à l'élicitation mesurée en termes de rendement (mg/l). Ainsi le  $\text{NO}_3^-$  occupe la première position, il améliore aussi bien la biomasse que la production en hyoscyamine. Sa carence dans le milieu B5 dès le début de la culture conduit à une réponse faible à l'élicitation des CRs de *D. stramonium*. Le  $\text{Ca}^{2+}$  influe surtout sur la production spécifique en hyoscyamine et sa présence est importante lors de l'élicitation à l'acide jasmonique pour une réponse maximale. La modélisation a mis en évidence l'interaction significativement positive du couple  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$ . Dans les meilleures conditions, cette interaction permet de doubler le contenu en hyoscyamine après élicitation. Le saccharose améliore aussi la biomasse mais pas la production spécifique dans nos conditions expérimentales. D'autres composantes du milieu de cultures telles que le phosphore méritent d'être étudiées. Environ 6 mM du  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  sont consommées durant les 8 premiers jours de culture ; ce qui correspond au début de la production effective des alcaloïdes pour la lignée utilisée dans ce travail. L'étude approfondie de cet élément pourrait être fort intéressante pour l'optimisation.

Bien l'acide jasmonique fait partie des meilleurs éliciteurs chez les plantes supérieures, il a l'inconvénient d'inhiber l'accumulation de la biomasse même à faible concentration. Lors de nos premières expériences, l'utilisation de 10 mM permettait de mettre en évidence l'effet de l'élicitation sur la production en hyoscyamine. Comme la durée de son application n'était que de 24 heures, il ne permettait pas de détecter l'effet toxique de cette dose sur les CRs. Des essais ultérieurs pour des durées plus longues ont révélé l'effet nocif de cette dose et mettaient en évidence la dégénérescence des CRs. Dans notre cas, l'utilisation de l'AJ à des concentrations non maîtrisées s'est montrée problématique. Il fallait donc trouver une concentration optimale qui améliore le contenu en hyoscyamine tout en préservant la viabilité des lignées et leur croissance. Pour ce faire, l'utilisation de la fonction de désirabilité a permis de trouver une bonne solution à ce problème : 0.06 mM pour une durée d'élicitation d'environ 24 h. Cette fonction a permis ainsi d'améliorer de 2.87 fois le contenu en hyoscyamine contre une réduction de seulement 12% du volume de la biomasse par rapport au témoin non élicité.

La recherche d'autres éliciteurs chimiques ou physiques sans inconvénient sur l'accumulation de la biomasse et l'intégrité des cellules constitue un champ d'investigation ouvert. Les futurs travaux devraient être orientés dans ce sens en prenant en compte plusieurs critères tels que la concentration, la durée de l'élicitation et les fréquences de l'élicitation dans les cultures en bioréacteur.

Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle quadratique (RSM) a permis, après analyse du modèle, diagnostic et accommodation des observations atypiques, de calculer les concentrations optimales du milieu B5 en nitrate, calcium et saccharose. Il était d'abord nécessaire d'améliorer l'exactitude du modèle avant de faire des interpolations en commençant, après analyse, par ne retenir que les termes significatifs du modèle. Dès lors que cette opération a été effectuée, certaines observations qui étaient atypiques ne le sont plus. Cependant, si un nouveau diagnostic révèle que des observations influentes subsistent, leur accommodation s'impose alors. Celle-ci peut être faite par différentes manières.

- Si les observations atypiques ont pour origine des erreurs de mesure, leurs accommodations par déletion peu être faite de manière séquentielle avec une observation supprimée suivie d'un diagnostic à chaque fois. Cependant, le nombre d'observations restantes (non supprimées) ne doit jamais être inférieur aux nombres de termes du modèle. Par ailleurs, la suppression d'un nombre élevé d'observations peut changer la structure du design.

- Si les observations atypiques n'ont pas pour origine des erreurs de mesures et qu'après confirmation des écarts par la collecte de nouvelles données au même point d'expérience, le phénomène admettrait d'autres extrema (ou minima). Dans ce cas, l'utilisation d'un modèle mathématique de degré plus élevée que le modèle quadratique est nécessaire pour l'ajustement aux données expérimentales car le modèle quadratique n'est pas assez flexible pour mettre en évidence d'éventuelles irrégularités à l'intérieur du domaine d'étude.

Lorsque les CRs sont cultivés dans le milieu B5-OP (79.1 mM de  $\text{NO}_3^-$ , 11.4  $\text{Ca}^{2+}$  mM et 42.9 g/l de saccharose), l'optimisation du rendement en HS au 28<sup>ème</sup> jour de culture est de 212.7 % après élicitation par rapport au milieu B5 témoin (25 mM de  $\text{NO}_3^-$ , 1.0  $\text{Ca}^{2+}$  mM et 40 g/l de saccharose). Ces concentrations optimales ont été calculées à partir des premières dérivées (optimum local) du modèle quadratique mis au point, toutefois la surface de réponse, qui est la représentation graphique du modèle, permet de dégager plusieurs solutions (concentrations) passant par l'optimum et donc donnant lieu au même rendement. Le modèle quadratique mis au point traduisant les effets du nitrate, du calcium et du saccharose constitue un outil virtuel d'étude des phénomènes biologiques sans avoir recours à l'expérience. Ainsi, on peut par exemple étudier l'effet de l'un des éléments en annulant simultanément l'effet des autres dans le domaine d'étude, et vis-versa.

En bioreacteur, les concentrations optimales devront être déterminées et apportées en fonction du volume du milieu B5 et de la biomasse (taux de croissance). Ceci implique donc la mise au point de modèle cinétique prédictif traduisant les effets et les relations entre le métabolisme primaire et secondaire et pouvant même inclure d'autres stratégies biotechnologiques comme la perméabilisation cellulaire et le piégeage des alcaloïdes.

## Références bibliographiques

- [1]. Amdoun R. (2003). Contribution à l'amélioration de la production d'alcaloïdes tropaniques par des apports calciques chez *Datura stramonium* L. Thèse de magistère, université Saad Dahleb – Blida, 70 p.
- [2]. Amdoun R., Khelifi-Saloui M., Amroune S. et Khelifi L. (2005a). L'élicitation : outil incontournable pour optimiser la production des alcaloïdes tropaniques *in vitro*. Acte du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (INA) : 156-157.
- [3]. Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroune S. et Khelifi L. (2005b). Ressources génétiques des *Datura* en Algérie. Acte du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (INA): 212-213.
- [4]. Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Slaoui M. et Amroune S. (2006). Production de chevelus racinaires chez deux espèces de *Datura* par transformation génétique *in vitro*. *Revue Biotechnologies végétales*. 00: 7-9.
- [5]. Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Hadjimi G., Amroune S. et Khelifi L. (2007). Etude des propriétés de croissance et du contenu en hyoscyamine d'une culture de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de *Datura stramonium* L. *Revue Biotechnologies végétales*. 1: 7-9.
- [6]. Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Zarouri B., Boutoumi Y. et Krimi Z. (2008). Chevelu racinaire de *Datura stramonium* L. induit par *Agrobacterium rhizogenes* en vue de la production d'alcaloïdes par voie biotechnologique. *Revue des technologies avancées CDTA*. 10 : 39-44.
- [7]. Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.-H., Thi D.V., Assaf-Ducrocq C. and E. Gontier. (2009). Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science*. 177: 81–87.
- [8]. Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Asch M., Assaf-Ducrocq C. and Gontier E. (2010). Simultaneous optimization of biomass accumulation and hyoscyamine content of *Datura stramonium* L. hairy roots elicited by jasmonic acid: using the desirability function. Article soumis a *Plant Science*.
- [9]. Ballica R., Ryu D.D.Y. and Kado C.I. (1993). Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures: elicitor and precursor effects. *Biotechnol. Bioeng*. 41: 1075–1081.
- [10]. Baş D., Boyacı I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 78: 836–845.
- [11]. Belsley D.A., Kuh E. and Welsch R.E. (2004). Regression Diagnostics - Identifying influential data and sources of collinearity. A John Wiley & Sons Publication, 292 p.
- [12]. Benyoussef E.H., Beddek N., Belabbes R. and Bessiere J.M. (2000). Evolution des effets de certains paramètres opératoires de l'entraînement à la vapeur d'eau des graines de coriandre sur le rendement en huile essentielle. *Entropie*. 229 (36) : 19–23.
- [13]. Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S. and Escaleira L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. Vol.76, Issue 5: 965-977.
- [14]. Bleichert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.Q. and Zenk M.H.(1995). The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4099–4105.
- [15]. Boitel-Conti M., Laberche J.C., Lanoue A., Ducrocq C. and Sangwan-Norreel B.S. (2000). Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 60: 131–7.

- [16]. Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161: 839–851.
- [17]. Bourgaud F., Bouque V., Gontier E. and Guckert A. (1997). Hairy root cultures for the production of secondary metabolites. *AgBiotech News Inf*. 9 (9): 205–208.
- [18]. Bourguignon B., Massart D.L. (1991). Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *J. Chromatogr.* 586: 11 – 20.
- [19]. Box G. E. P. and Wilson K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. Vol. 13, No. 1: 1-45.
- [20]. Box G.E.P. and Draper N.R. (1987). *Empirical Model-Building and Response Surfaces*, John Wiley & Sons.
- [21]. Bruneton J. (1987). *Elément de phytochimie et pharmacognosie*, Paris : Lavoisier - Tech. & doc., 584 p.
- [22]. Calam C.T. (1967). Media for industrial fermentations. *Process Biochem.*: 19-22.
- [23]. Chashmi N.A., Sharifi M., Karimi F. and Rahnama H. (2008). Enhanced production of tropane alkaloids by nitrate treatment in hairy root cultures of *Atropa belladonna*. *Journal of Biotechnology*. 136: 22-71.
- [24]. Cheynier V., Feinberg M., Chararas C. and Ducauze C. (1983). Application of Response Surface Methodology to Evaluation of Bioconversion Experimental Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(2):634-639.
- [25]. Contin, A., Van Der Heijden R., ten Hoopen H. J. G. and Verpoorte R. (1998). The inoculum size triggers tryptamine or scopolamine biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. *Plant Science*. 139: 205-211.
- [26]. Cook R. D. (1977). Detection of influential observation in linear regression. *Technometrics*, 19 (1) :15-18. <http://www.ime.usp.br/~abe/lista/pdfWiH1zqnMHo.pdf>.
- [27]. Croteau R., Kutchan T.M. and Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville: 1250– 1318*.
- [28]. Dechaux C., Boitel-Conti M. (2005). A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. *Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica*. 1(47):101–107.
- [29]. Deming S.N. (1991). Multiple-criteria optimization. *J. Chromatogr. A*. 550: 15 – 25.
- [30]. Deng F. (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 82: 16–26.
- [31]. Derringer G. and Suich R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*. 12 (4): 214 – 219.
- [32]. Dewe W., Marini R.D., Chiap P. and Ph. Hubert.J. (2004). Crommen, B. Boulanger, Development of response models for optimising HPLC methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 74: 263 – 268.
- [33]. Dhakulkar S., Ganapathi T.R., Bhargava S. and Bapat V.A. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy root. *Plant science*. 169: 812-818.
- [34]. Dicosmo F., Misawa M. (1985). Eliciting secondary metabolism in plant cell culture. *Trends in biotech.* 3:318-322.

- [35]. Doares S.H., Syrovets T., Weiler E.W. and Ryan C.A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway, *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 92 : 4095–4098.
- [36]. Dodge Y. (1993). *Statistique : Dictionnaire encyclopédique*. Edition DUNOD, Paris, 409 p.
- [37]. Draper N.R. and Smith H. (1981). *Applied regression analysis*. Second ed. John Wiley and Sons Publication, New York.
- [38]. Dugué D. et Girault M. (1969). *Analyse de la variance et plans d'expérience*, Ed. Dunod.
- [39]. Dunlop D.S., Curtis W.R. (1991). Synergistic response of plant hairy-root cultures to phosphate limitation and fungal elicitation. *Biotechnology progress.* 7: 434-438.
- [40]. Ebel J. (1986). Phytoalexin synthesis: biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Plant Pathol.*: 235–64.
- [41]. Ercan A.G., Taşkin M. (1999). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. population grown in Turkey. *Tr. J. of Botany.* 23: 373-377.
- [42]. Farmer E.E., Ryan C.A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* 4: 129-134.
- [43]. Fliniaux O., Mesnard F., Raynaud-Le Grandic S., Baltora-Rosset S., Bienaimé C., Robin R.J. and Fliniaux M.A. (2004). Altered nitrogen metabolism associated with de-differentiated suspension cultures of *Datura stramonium* L. studied by heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) NMR spectroscopy. *J. of Exp. Botany.* (55) 399:1053-1060.
- [44]. Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- [45]. Georgiev M.I., Pavlov A.I. and Bley T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Vol. 74, N°6: 1175-1185.
- [46]. Giri, A. and Narasu M.L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.*, 18: 1–22.
- [47]. Giri A., Ravindra S.T., Dhingra V. and Narasu M.L. (2001). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Curr. Sci.*, (81) 4:378– 382.
- [48]. Gomborg, O.L. (1970). The effects of amino-acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant physiol.*, 45: 372-375.
- [49]. Gontier E., Sangwan B.S. and Barbotin J.N. (1994). Effects of calcium, alginate, and calciumalginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of stable suspension cell line of *Datura innoxia* Mill. *Plant Cell Rep.* 9 (13): 533–536.
- [50]. Goupy J. (1990). Etude comparative de divers plans d'expériences. *Revue de statistique appliquée* 4 (38) :5–44.
- [51]. Goupy J., Creighton L. (2006). *Introduction aux plans d'expériences*, Ed. Dunod.
- [52]. Goupy J.(1999). *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*, Ed. Dunod.
- [53]. Guignard J.L., Cosson L., Henry M. (1985). *Abrégé de phytochimie*. Ed. Masson.
- [54]. Guillaume Y., Guinchard C. (1996). Method to study the separation of eight phydroxybenzoic esters by gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 727 : 93 – 99.

- [55]. Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M. and Gantet P. (2006). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 341–346.
- [56]. Gundlach H., Müller M.J., Kutchan T.M. and Zenk M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2389-2393.
- [57]. Haaland P.D. (1989). Statistical problem solving. In: Experimental Design in Biotechnology. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc.:1-18.
- [58]. Harborne J.B. (1993). Introduction to ecological biochemistry, 4<sup>th</sup> edn. London Academic Press.
- [59]. Harborne J.B. (1997). Biochemical plant ecology, in: Plant Biochemistry, Academic Press.
- [60]. Harrington Jr. E.C. (1965). The desirability function. *Ind Qual Control.* 21: 494–8.
- [61]. He C.Y., Hsiang T. and Wolyn D.J. (2002). Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.* 51: 225–230.
- [62]. Hendriks M.M.W.B., De Boer J.H., Smilde A.K. and Doornbos D.A. (1992). Multicriteria decision making. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System.* 16: 175 –191.
- [63]. Herbert R.B. (2001). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18 : 50–65.
- [64]. Houmani Z. et Cosson L. (2000). Quelques espèces algériennes a alcaloïdes tropnaïques. *Ethnopharmacology. Edt. ERGA.* : 205-219.
- [65]. Houmani Z. et Cosson L. (1998). Composition en alcaloïdes tropnaïques de deux espèces de *Datura* identifiées en Algérie : *Datura ferox* L. et *Datura quercifolia* H.B.K. *Acta Bot. Gallica.* 145 (3) : 195-198.
- [66]. Houmani Z., Cosson L. and Houmani M. (1999). *Datura ferox* L. and *Datura quercifolia* Kunth (*solanaceae*) in Algeria. *Flora mediterranea.* 9 :57-60.
- [67]. Houmani Z., Cosson L., Corbiveau F. et Come D. (1994). Etude de la teneur en hyoscyamine et scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. *Acta Bot. Gallica.* 141 (1) : 61-66.
- [68]. Houmani, Z. (1999). Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Thèse de Doctorat. INA El-harrach, Algérie, 124p.
- [69]. Hutcheson S.W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 59–90.
- [70]. Jeong I.J., Kim K.J. (2009). An interactive desirability function method to multiresponse optimization. *European Journal of Operational Research.* 195: 412-426.
- [71]. Kang S.M., Jung H.Y., Kang Y.M., Yun D.J., Bahk J.D., Yang J.k., Choi M.S. (2004). Effects of methyljasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science.* 166: 745–751.
- [72]. Kartal M., Kurucu S., Altun L., Ceyhan T., Sayar E., Cevheroğlu S. and Y. Yetkin (2003). Quantitative analysis of l-hyoscyamine in *Hyoscyamus reticulatus* L. by GC–MS, *Turk. J. Chem.* 27: 565–569.
- [73]. Khuri A.I. and Cornell J.A. (1987). Response surfaces: design and analysis. New York: Marcel Dekker, Inc, 1987.

- [74]. Kim Y., Wyslouzil B. and weathers P. (2002). Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 1-10.
- [75]. Kitamura Y., Shigehiro M. and Ikenaga T. (1996). Tropic acid moiety of atropine may be recycled in *Duboisia*. *Phytochemistry*. Vol. 42, n°5: 1331-1334.
- [76]. Kovalenko P.G. and Maliuta S.S. (2003). An effect transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukr. Bioorg. Acta* 1 (1):50-60.
- [77]. Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N. and Tepfer D. (1998). Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbres fruitiers. 8<sup>em</sup> colloque sur les recherches fruitières - Bordeaux Ed INRA-CTIFL, 73-84.
- [78]. Lanoue A., Shakourzadeh K., Marison I., Laberche J.C., Christen P., Sangwan-Norrel B. and Boitel-Conti M. (2004 a). Occurrence of circadian rhythms in hairy root culture grown under controlled conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 6 (88) : 722-729.
- [79]. Lanoue A., Boitel-Conti M., Dechaux C., Laberche J.C., Christen P. and Sangwan-Norreel B. (2004 b). Comparison of growth properties, alkaloid production and water uptake of tow selected *Datura* hairy root lines. *Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica*. 46: 185-192.
- [80]. Lee Y.W., Jin S., Sim W.S. and Nester E.W. (1996). The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene*. 179: 83-88.
- [81]. Liang, Y., Aoyama T. and Oka A. (1998). Structural characterisation of the *virB* operon hairy-root-inducing plasmid A<sub>4</sub>. *DNA research*, 5: 85-93.
- [82]. Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström Å., Pettersen J. and Bergman R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Vol.42, Issues 1-2, 24: 3-40.
- [83]. Maddox I.S. and Richert S.H. (1977). Use of response surface methodology for the rapid optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 197-204.
- [84]. Malarz J., Stojakowska A. and Kisiel W. (2007). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. *Acta Physiol. Plant.* 29: 127-132.
- [85]. Maldonado-Mendoza I.E, Ayora-Talavera T. and Loyola-Vargas V.M. (1993). Establishemnt of hairy root culture of *Datura stramonium*: caractérisation and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Cuture*. 33: 321-329.
- [86]. Marini R.D., Chiap P., Dewé W., Boulanger B., Ph. Hubert J. and Crommen L.C. (2003). Method for the simultaneous determination of R-timolol and other closely related impurities in S-timolol maleate: Optimization by use of an experimental design. *J. Sep. Sci.* 26: 809 – 817.
- [87]. Mason R.L., Gunst R.F. and Hess J.L. (2003). Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science. A John Wiley & Sons Publication – Wiley Interscience. Wiley Series in Probability and Statistics. Second Edition, 728 p.
- [88]. Memelink J., Verpoorte R. and Kijne J.W. (2001). ORCANization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism. *TRENDS in Plant Science*. Vol.6 N°5: 212 – 219.
- [89]. Montgomery D.C. (2008). Design and analysis of experiments. Wiley, 672 p.
- [90]. Moyano E., Jouhikainen K., Tammela P., Palazon J., Cusido R.M., Pinõl M.T., Teeri T.H. and Oksman-Caldenty K.M. (2003). Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J. of Exp. Botany*. (54) 381: 203-211.

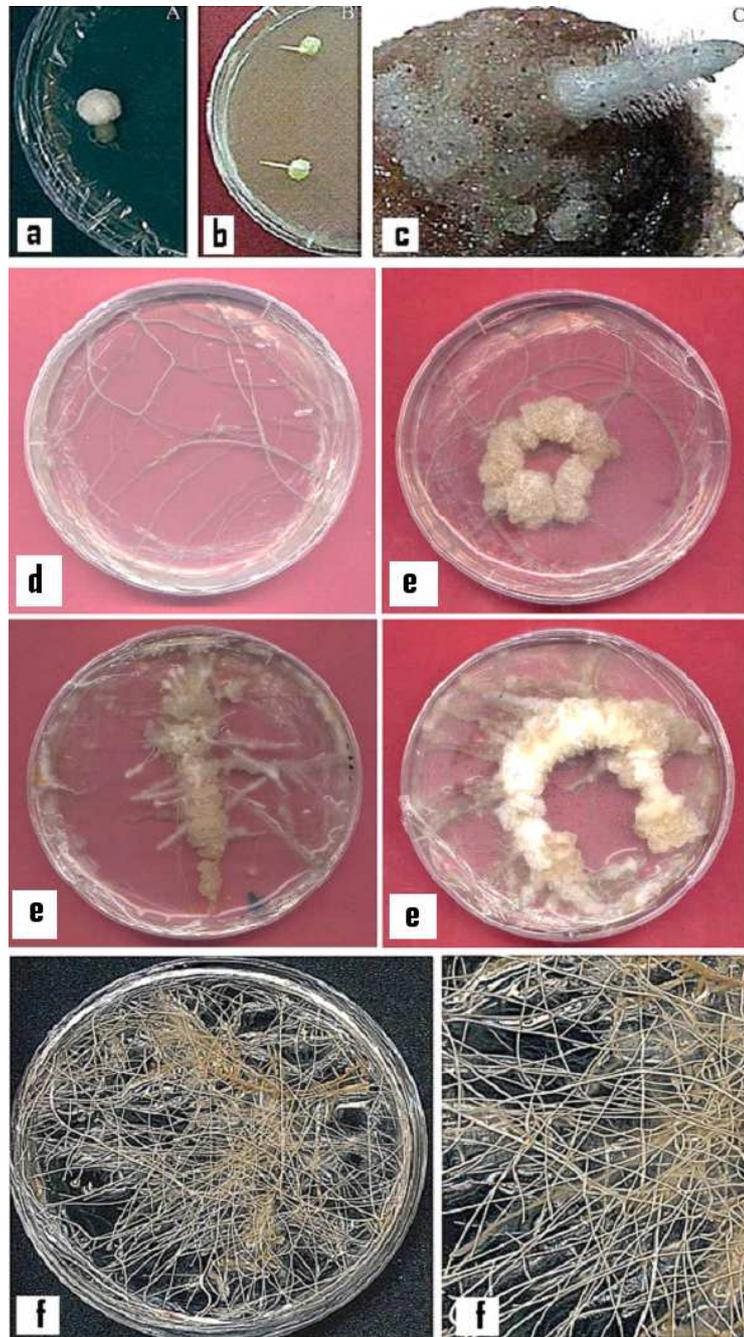
- [91]. Mulabagal V. and Tsay H.S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 1,2: 29–48.
- [92]. Murashige M. and Skoog T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473–497.
- [93]. Murthy H.N.; Hahn E.J. and Paek K.Y. (2008). Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese journal of biotechnology*, Vol. 24, issue 5: 711-716.
- [94]. R.H. Myers and D.C. Montgomery (1995). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [95]. Nakakjima K., Hashimoto T. and Yamada Y. (1993). Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain deshydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* vol.9: 9591-9595.
- [96]. Nussbaumer P., Kapétanidis I. and Christen P. (1998). Hairy root of *Datura candida* x *aurea*: effect of culture medium composition on growth and biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 17: 405–409.
- [97]. Park, S.U. and Facchini P.J. (2000). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L., and *California poppy*, *Eschscholzia californica* Cham. Root cultures. *J. of Exper.bot.* (51) 347:1005-1016.
- [98]. Parr A.J., Payne J., Eagles J., Chapman B.T., Robins R.J. and Rhodes M.J.C. (1990). Variation in tropane alkaloid accumulation within the *solanaceae* and strategies for its exploitation, *Phytochemistry* 8 (29):2545–2550.
- [99]. Pasandideh S.H.R., A.Niaki S.T. (2006). Multi-response simulation optimization using genetic algorithm within desirability function framework. *Appl. Math. Comput.* 175: 366–382.
- [100]. Perrin R., Scharff J.P. (1993). Chimie industrielle, vol. 1, Ed. Masson, Paris.
- [101]. Pinñol M.T., Palazón J., Cusidó R.M. and Ribó M. (1999). Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots, *Plant Science*. 141: 41–49.
- [102]. Pitta–Alvarez S.I., Spollansky T.C. and Giulietti A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 252–258.
- [103]. Poovaiah B.W., McFadden J.J. and Reddy A.S.N. (1987). The role of calcium ions in gravity signal perception and transduction. *Physiol. Plantarum* 3 (71): 401–407.
- [104]. Poulev A., O’Neal J.M., Logendra S., Pouleva R.B., Timeva V., Garvey A.S., Gleba D., Jenkins I.S., Halpern B.T., Kneer R., Cragg G.M. and Raskin I. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.* 12 (46): 2542–2547.
- [105]. Rao S.R., Ravishankar G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101–153.
- [106]. Reymond P., Farmer E.E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol.1, N°5: 404-411.
- [107]. Roberts S.C. and Shuler M.L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*. 8:154–159.
- [108]. Saenz-Carbonell L., Loyola-Vargas V.M. (1996). *Datura stramonium* hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg’s B5 medium, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 3 (61): 321-337.

- [109].Safa F., Hadjmohammadi M.R. (2005). Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. *J. Chromatogr. A*. 1078: 42-50.
- [110].Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., and Harper J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell, American Society of Plant Biologists, Supplement: 401-417*. www.plantcell.org © 2002.
- [111].Sasson A. (1991). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological economic aspects. *Option méditerranées – série séminaire*. 14 : 59-74.
- [112].Saval S., Pablos L. and Sanchez S. (1993). Optimization of culture medium for streptomycin production using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 43: 19-25.
- [113].Savouré B. (1980). Manipulations pratiques en physiologie végétale, Ed. Masson, Paris.
- [114].Shanks J.V. and Morgan J. (1999). Plant hairy root culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:151-155.
- [115].Shimomura K., Sauerwein M. and Ishimaru K. (1991). Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochemistry*, (30) 7: 2275-2278.
- [116].Sikuli N.N., Demeyer K. (1997). Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by hairy roots of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3 (47): 261-267.
- [117].Slaoui M., Khelifi L., Rezine R., Amdoun R., Morsoli A. et Amroune S. (2006). Embryogénèse somatique et bourgeons néoformés induits sur explants issus de vitrosemis de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. *Revue Biotechnologies Végétales*. 00:33-36.
- [118].Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K. and Weathers P.J. (2003). Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root culture produces complex patterns of terpenoid gene expression, *Biotechnol. Bioeng.* (83):653-667.
- [119].Spollansky T.C., Pitta-Alvarez S.I. and Giulietti A.M. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Electron. J. Biotechnol.* 1 (3) : 72-75. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/6>.
- [120].Stojakowska A., Malarz J. and Kisiel W. (2002). Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. *Plant science*. 163: 1147-1152.
- [121].Taiz L., Zeiger E. (1998). Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2nd ed.
- [122].Tao, J. and L. Li. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South Afri. J. of botany*. 72: 211-216.
- [123].Teófilo R.F., Ferreira M.M.C. (2006). Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. *Quim. Nova*, 29 (2): 338-350.
- [124].Vanbel P.F. (1999). Development of flexible and efficient strategies for optimizing chromatographic separation. *J. Pharm. Biomed. Appl.* Vol.21, N°3: 603 – 610.
- [125].Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y. and Tsay H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad.* 45: 1-22.
- [126].Vasconsuelo A., Boland R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172: 861-875.

- [127].Verpoorte R., van der Heijden R., Hoge J.H.C. and Ten Hoopen H.J.G. (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure & Appl.Chem.*, vol.66, Nos 10/11: 2307-2310.
- [128].Verpoorte R., Alfermann A.W. (2000). Metabolic engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers.
- [129].Verzar-Petri G. (1973). Alkaloid metabolism and Localization in *Datura Innoxia*. *Die Pharmazie* 28: 603-9.
- [130].Wasternack C., Parthier B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression, *Trends Plant Sci.* 2: 302–307.
- [131].White F.F., Ghidossi G., Milton P., Gordon M.P. and Nester E.W. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Botany.* 79: 3193-3197.
- [132].Yamada Y. and Tabata M. (1997). Plant biotechnology of tropane alkaloids. *Plant biotechnology*, 14(1):1-10.
- [133].Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M. and Xu H.B. (2002). High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells. *Process Biochem.* 38: 207–210.
- [134].Zabetakis L., Edwards R. and O'Hagan D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry.* 50: 53–56.
- [135].Zayed R. and Wink M. (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (*Solanaceae*). *Z. Naturforsch.* 59 c: 863-867.
- [136].Zhao J., Davis L.C. and Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* 23 : 283–333.
- [137].Zhang L., Ding R., Chai Y., Bonfill M., Moyano E., Oksman-Caldentey K.M., Xu T., Wang Z., Zhang H., Kai G., Liao Z., Sun X. and Tang K. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *PNAS*, Vol.101, N°17: 6786-6791. [www.pnas.org/cgi/content/full/101/17/6786](http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/17/6786).
- [138].Zrýd J.P. (1988). Culture *in vitro* et production de métabolites secondaires. In Cultures de cellules, tissus et organes végétaux, fondement théoriques et utilisations pratiques. Ed. Press polytechniques Romandes, première édition, Lausanne, 308 p.

## Annexes.

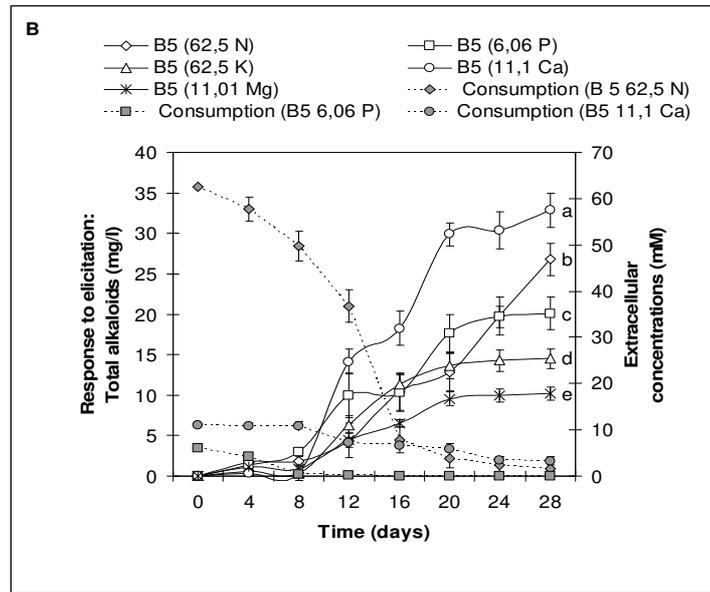
### Annexe 1.



Production de CRs performants de *D. stramonium*.

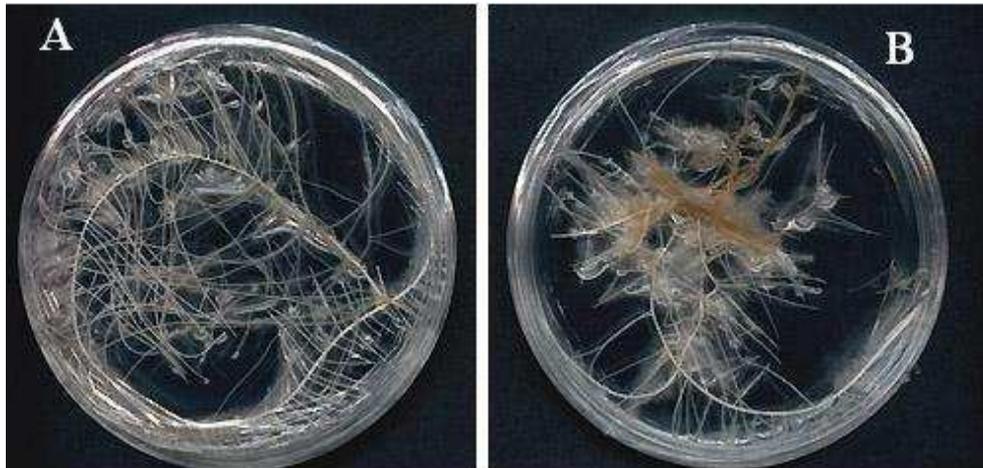
**a** : Apparition d'un cal au site de l'infection. **b, c** : racines sur explants avant excision. **d** : lignée de faible croissance (élongation-ramification) non sélectionnée. **e** : lignée callogène non sélectionnée. **f** : lignée performante sélectionnée, dense et non calogène.

## Annexe 2.



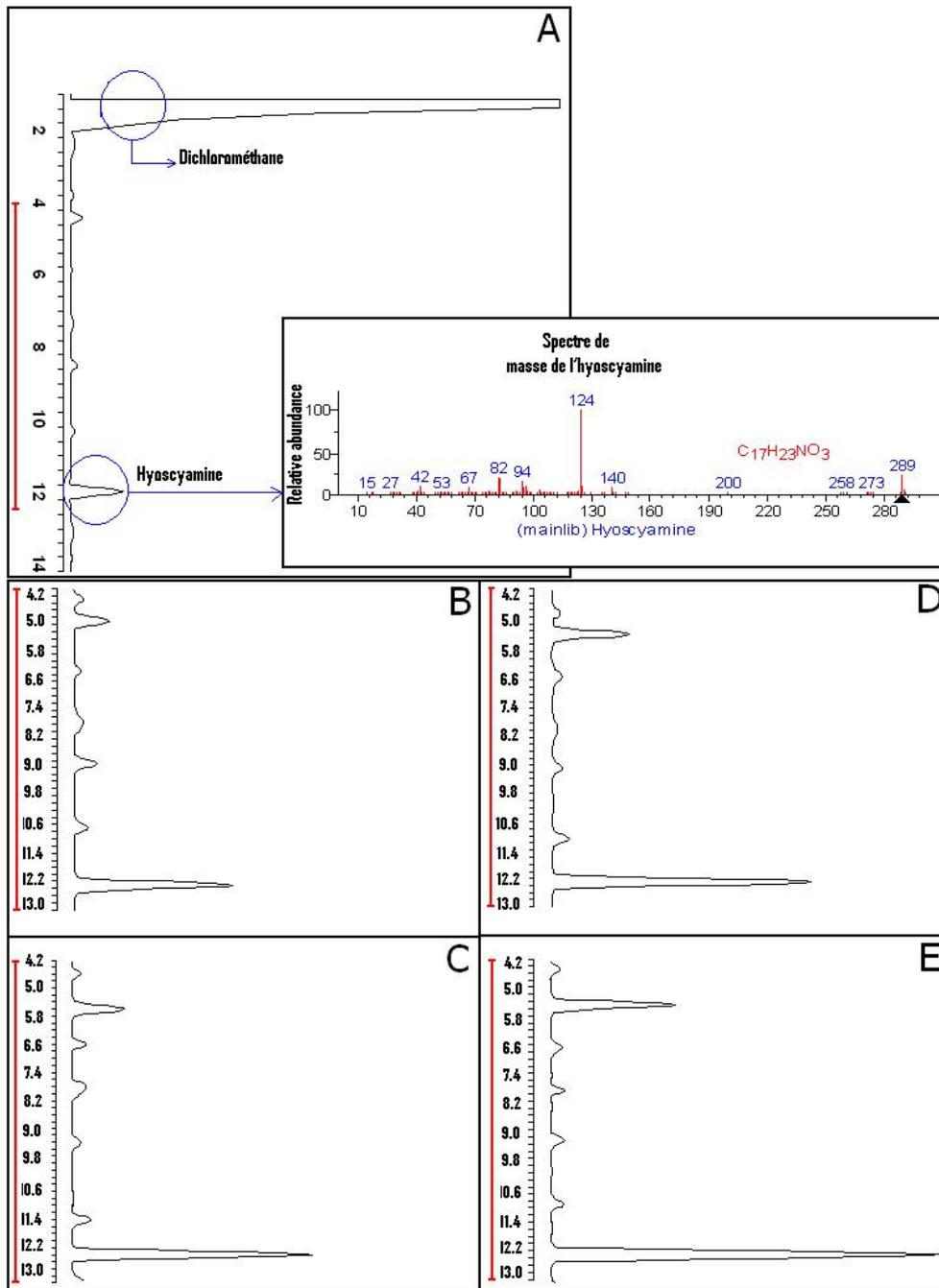
Cinétique de consommation des macroéléments et réponse à l'élicitation des CRs.

## Annexe 3.



Culture de CRs dans le milieu B5 contenant 62.5 mM de nitrate (A) et dans le milieu B5 témoin (25 mM) (B).

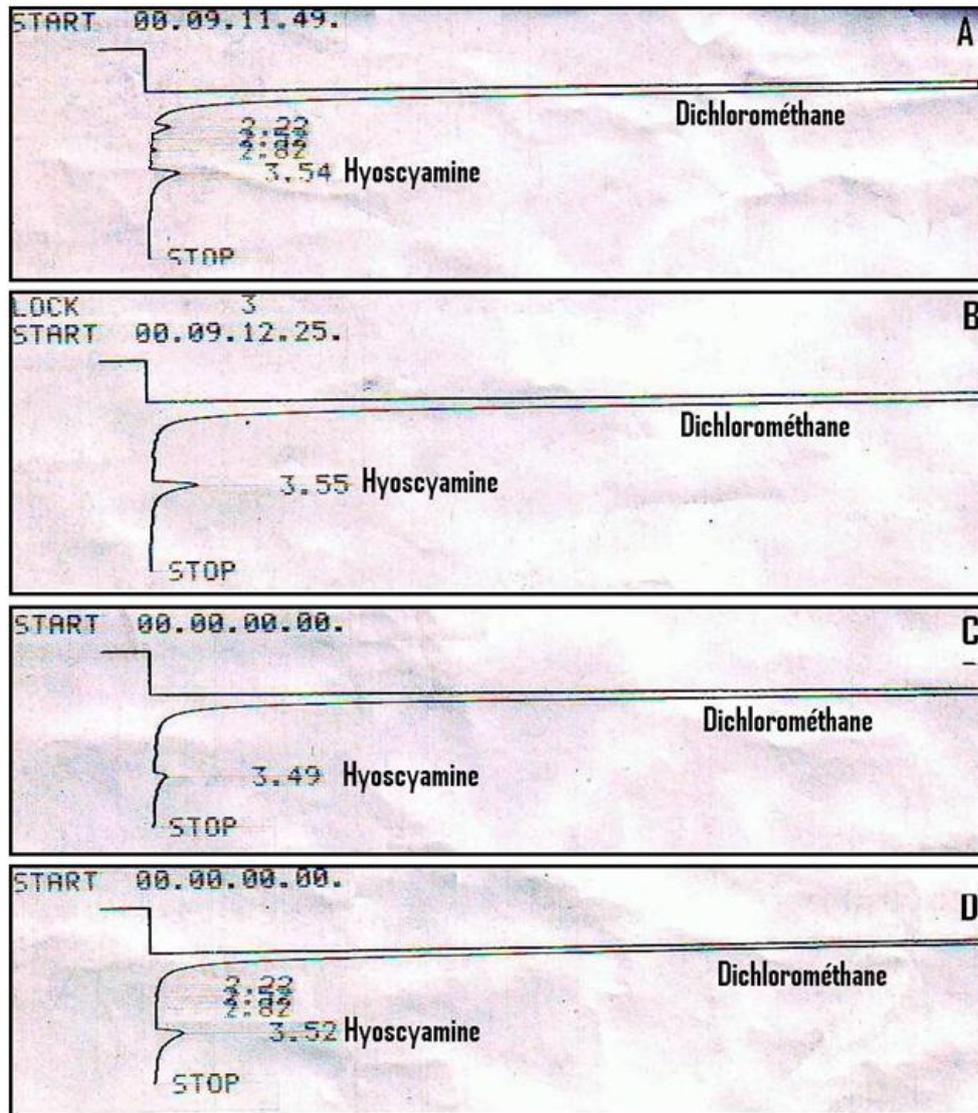
## Annexe 4.



Spectre de masse et chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de CRs au 28<sup>ème</sup> jour cultivés dans :

**A** : milieu B5 témoin (25 mM de nitrate) sans élicitation (chromatogramme global). **B** : milieu B5 témoin sans élicitation (chromatogramme zoomé). **C** : milieu B5 témoin avec élicitation (chromatogramme zoomé). **D** : milieu B5 (62.5 mM de nitrate) sans élicitation (chromatogramme zoomé). **E** : milieu B5 (62.5 mM de nitrate) avec élicitation (chromatogramme zoomé).

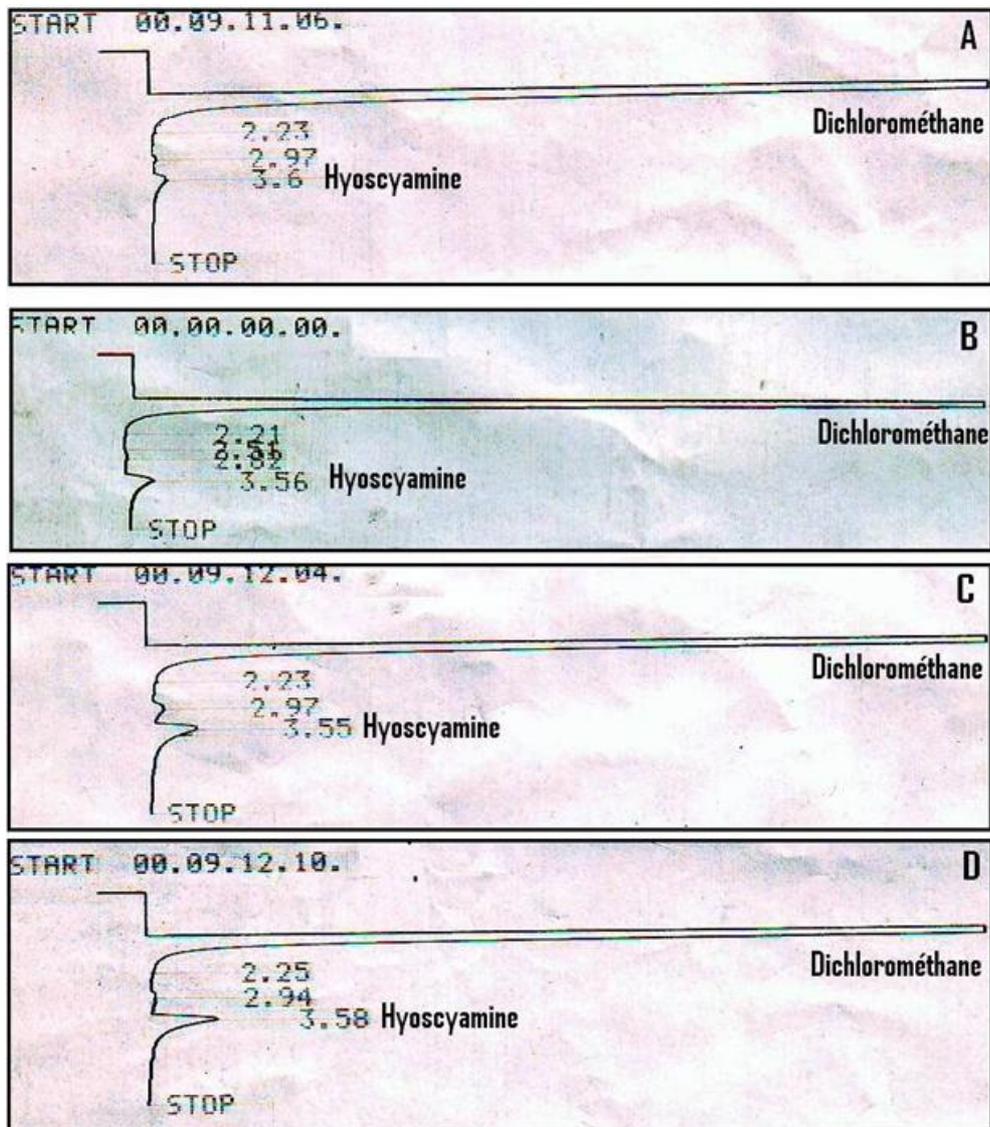
## Annexe 4.



Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de CRs au 12<sup>ème</sup> jours de culture: optimisation de l'élicitation par la fonction de désirabilité.

**A** : CRs élicités avec JAC = 0.075 mM et ET = 8 heures ; GI = 0,4 et EI = 2.90. **B** : CRs élicités avec JAC = 0.083 mM et ET = 28 heures ; GI = 1 et EI = 3. **C** : Témoin : 0 mM de JAC. **D** : compromis optimale JAC = 0.06 mM et ET = 24 heures ; GI = 0.88 et EI = 2.87.

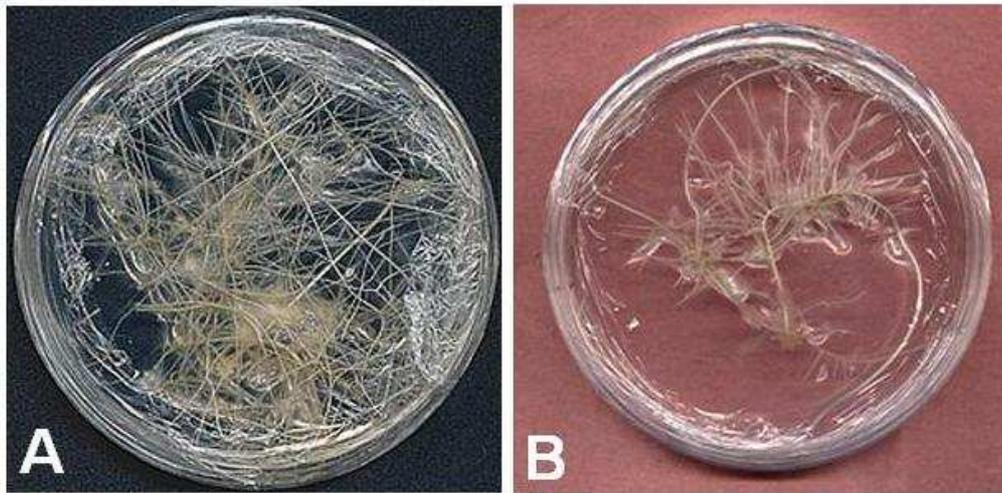
## Annexe 5.



Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de CRs au 20<sup>ème</sup> jour de culture: optimisation du milieu B5.

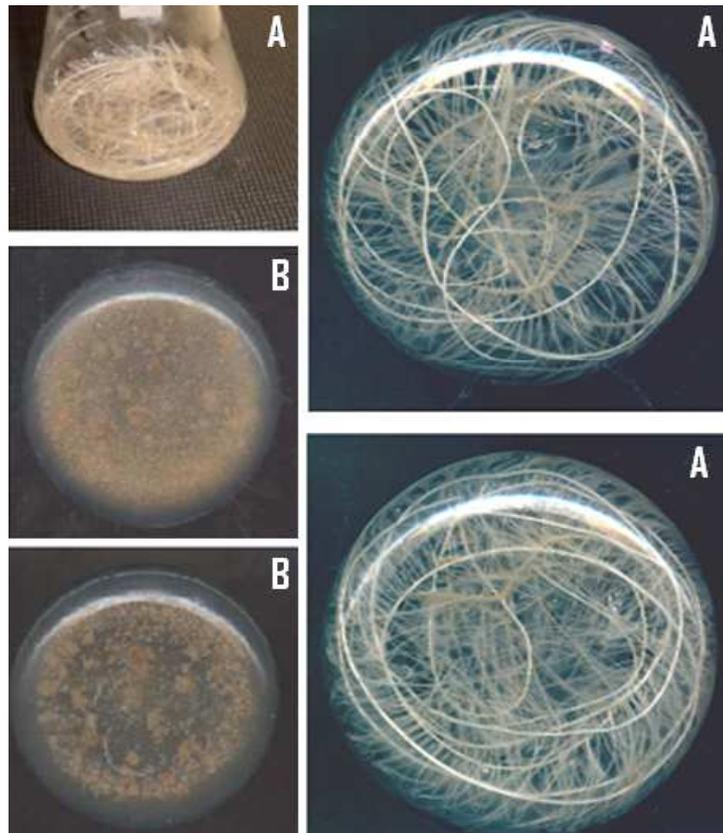
**A** : CRs cultivés dans le milieu B5 témoin sans élévation. **B** : CRs cultivés dans le milieu B5 témoin avec élévation. **C** : CRs cultivés dans le milieu B5-OP sans élévation. **D** : CRs cultivés dans le milieu B5-OP avec élévation.

## Annexe 6.



Aspect du CR au 20<sup>ème</sup> jour de culture dans le milieu B5-OP (A) et le milieu B5 témoin (non modifié).

## Annexe 7.



Culture des CRs (A) et de suspensions cellulaires (B) dans des Erlen de 250 ml sur agitateur rotatif 80 rpm.