

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة, الحراش, الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT en Biotechnologies Végétales

Thème

Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la
production de l'hyoscyamine chez *Datura sp.*

Présentée par : M.HARFI Boualem

Jury :

Président :	M. ABDELKRIM H.	Pr.-E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Directeur de Thèse :	M. KHELIFI L.	Pr.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Examineurs :	M. BOUJDENIBA M.	Pr.- E.N.S. Kouba, Alger
	M. BENCHABANE M.	Pr.- U.S.D., Blida
	M. HAZZITM.	M.C.-E.N.S.A. El-Harrach, Alger

Soutenu le : 09 Septembre 2013

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout, *Dieu* qui m'a donné la volonté et l'énergie de réaliser ce modeste travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr. KHELIFI L., Prof. à l'ENSA et mon Directeur de thèse, qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.

Je remercie, Mr. ABDELKRIM H., Prof. à ENSA, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

Un grand remerciement à Mr. BOUJDENIBA M., Prof. à l'ENS, d'avoir accepté d'examiner notre travail de recherche.

Un chaleureux remerciement à Mr. BENCHABANE M., Prof. à l'USD, de nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Un profond remerciement à Mr. HAZZIT M., M.C. à l'ENSA, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner notre travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme. KHELIFI-SLAOUI M., Prof. à l'ENSA, pour tous ses conseils le long de la réalisation de ma thèse, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Mes remerciements les plus profonds vont aussi à :

Mme. Zaoui D., Ingénieur du laboratoire, et toute l'équipe du Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (L-RGB) de l'ENSA. A tous mes amis (es). Je tiens à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

- Mes très chers parents, auxquels je dois tout mon respect et que je ne remercierais jamais assez pour leurs sacrifices ;
- Ma femme ;
- Mes sœurs et mes frères ;
- Toute ma famille ;
- Tous mes amis.

Boualem ☺

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1	Le <i>Datura</i> _____	5
2	La maladie du chevelu racinaire _____	6
3	Le métabolisme secondaire _____	8
3.1	Alcaloïdes _____	8
3.2	Alcaloïdes tropaniques _____	9
3.3	Production des alcaloïdes par voies biotechnologiques _____	10
4	L'élicitation de la production des métabolites secondaires _____	11
4.1	Eliciteurs biotiques _____	12
4.2	Eliciteurs abiotiques _____	12
4.3	Molécules signales de réactions de défense des plantes _____	13
5	La perméabilisation des chevelus racinaires _____	13

MATERIELS ET METHODES

1	Matériel végétal _____	16
2	Conditions de germination _____	16
3	Etiollement des plantules _____	17
4	Etablissement des cultures de chevelus racinaires _____	17
5	Entretien des lignées racinaires obtenues _____	18
6	Sélection des lignées racinaires performantes _____	18
7	Cinétique de croissance des CRs et de l'accumulation de l'HS _____	19
8	Elicitation par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique _____	19
9	Elicitation par le stress salin _____	20
10	Perméabilisation des chevelus racinaires avec le Tween 20 _____	21
11	Combinaison de l'élicitation et de la perméabilisation _____	22
12	Combinaison du temps de l'élicitation et de la concentration en éliciteurs (AS et AAS) _____	23
13	Etablissement de procédés de production de l'HS <i>in-vitro</i> _____	25
14	Extraction, dosage et identification de l'hyoscyamine _____	25
14.1	Extraction de l'HS à partir du CRs _____	26
14.2	Extraction de l'hyoscyamine à partir de la solution nutritive _____	26
14.3	Dosage et identification de l'HS _____	27
15	Analyse statistique _____	27

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1	Effet de l'étiollement sur l'induction des chevelus racinaires _____	30
2	Sélection des lignées racinaires performantes _____	32
3	Cinétique de croissance et de production d'alcaloïdes _____	33
3.1	Evolution de la biomasse des chevelus racinaires _____	33
3.2	Evolution de la production de l'HS _____	34
3.3	Corrélation entre la biomasse et la TH _____	35
4	Effet de l'élicitation des CRs _____	36
4.1	Elicitation par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique _____	36
4.2	Elicitation par le stress salin (KCl et CaCl ₂) _____	39
5	Effet de la perméabilisation des CRs _____	41
6	Effet combiné de l'élicitation et de la perméabilisation _____	42
7	Effet combiné du temps de l'élicitation et de la concentration de l'AS et l'AAS _____	45
8	Etablissement de procédés de production de l'hyoscyamine <i>in-vitro</i> _____	48
8.1	En système discontinu _____	48
8.2	En système semi-continu _____	49

DISCUSSION DES RESULTATS

1	Mise en place de lignées de CRs performantes _____	52
2	Cinétique de croissance des CRs _____	53
3	Evolution de la TH des CRs et de la solution nutritive _____	54
3.1	Elicitation par l'AS et AAS de la TH _____	55
3.2	Elicitation par le stress salin de la TH _____	59
3.3	Perméabilisation des CRs _____	60
4	Procédés de production de l'hyoscyamine <i>in-vitro</i> _____	61

CONCLUSION GENERALE.....	62
--------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUMES

PUBLICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

- AS** : Acide salicylique
AAS : Acide acétylsalicylique
B5 : Milieu de culture de **Gamborg et al., 1968**
CRs : Chevelus racinaires
CPG : Chromatographie phase gazeuse
DI : *Datura innoxia*
DS : *Datura stramonium*
DT : *Datura tatula*
FA : Facteur d'amélioration
G. : Grossissement
HS : Hyoscyamine
L_{DI} : Lignée racinaire sélectionnée de l'espèce *Datura innoxia*
L_{DS} : Lignée racinaire sélectionnée de l'espèce *Datura stramonium*
L_{DT} : Lignée racinaire sélectionnée de l'espèce *Datura tatula*
M : Mole
M.S. : Matière sèche
MS : Milieu de culture de **Murashige et Skoog, 1962**
PS : Poids sec
rpm : Round per minute (tour par minute)
S.N. : Solution nutritive
TH : Teneur en hyoscyamine
Tween 20 : Monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de travaux de production des métabolites secondaires par voies biotechnologiques (<i>in-vitro</i>)	11
Tableau 2 : Modalités d'élicitation par l'AS et l'AAS.....	20
Tableau 3 : Modalités d'élicitation par le stress salin.....	21
Tableau 4 : Modalités de la perméabilisation des CRs avec le Tween 20.....	22
Tableau 5 : Modalités de la combinaison de l'élicitation et de la perméabilisation.....	23
Tableau 6 : Modalités de la combinaison du temps de l'élicitation et la concentration des acides salicylique et acétylsalicylique	24
Tableau 7 : Effet de l'étiollement sur l'induction racinaire.....	31
Tableau 8 : Caractéristiques des lignées racinaires retenues.....	32
Tableau 9 : Effet de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse et la TH des CRs....	38
Tableau 10 : Effet de l'élicitation par le stress salin sur la biomasse et la TH des CRs..	40
Tableau 11 : Effet du Tween 20 sur la biomasse des CRs et la concentration en HS de la solution nutritive (extracellulaire)	42
Tableau 12 : Effet du Tween 20 sur la biomasse et la TH des CRs (intracellulaire).....	42
Tableau 13 : Effet de la combinaison du Tween 20 et de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse des CRs et la concentration en HS de la solution nutritive (extracellulaire).....	44
Tableau 14 : Effet de la combinaison du Tween 20 et de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse et la TH des CRs (intracellulaire).....	45
Tableau 15 :Effet de la combinaison du temps de l'élicitation et la concentration en AS et AAS sur la biomasse et la TH des CRs.....	47
Tableau 16 : Effets de l'AS et l'AAS sur les facteurs d'amélioration de la TH des CRs des trois lignées de <i>Datura</i> en comparaison avec différents témoins (T, B et P)	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Plasmide Ri de type agropine (pRiA4b) (Huffman <i>et al.</i> , 1984).....	6
Figure 2 : Alcaloïdes tropaniques (Mauro, 2006).....	9
Figure 3 : Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Fester, 2010).....	10
Figure 4 : Graines de <i>Datura</i>	16
Figure 5 : Synthèse du protocole classique et du protocole expérimental pour l'élaboration des procédés de production de l'HS <i>in-vitro</i>	28
Figure 6 : Racines induites sur explants non-étiolé (1) et étiolé (2) de <i>D. tatula</i>	31
Figure 7 : Aspect morphologique de lignées racinaires retenues	32
Figure 8 : Cinétique de croissance des CRs.....	33
Figure 9 : Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide.....	34
Figure 10 : Evolution de la TH des lignées retenues.....	35
Figure 11 : Corrélation entre la biomasse et le contenu en HS des CRs.....	36
Figure 12 : Procédés de production de l'hyoscyamine <i>in-vitro</i>	50

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'Homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules une source immense de molécules complexes utilisées, entre autre, dans l'industrie pharmaceutique (Tikhomiroff, 2001). Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne sont pas produites directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisées à partir des métabolites primaires et résultent de réactions biochimiques ultérieures (Croteau *et al.*, 2000). La production de ces métabolites par voie biotechnologique offre une alternative prometteuse aux cultures de plein champ et / ou sous serre. En effet, la culture *in-vitro* offre l'avantage d'un contrôle des conditions environnementales donc une régularité de production. De plus, la synthèse par voie chimique de ces molécules bioactives est à la fois complexe et onéreuse (Toivonen, 1993 ; Srivastava et Srivastava, 2007).

Par ailleurs, pour ses besoins pharmaceutiques, l'Algérie importe ces métabolites secondaires et ce, malgré la présence en Algérie, à l'état spontané, de nombreuses ressources phytogénétiques qui peuvent être valorisées (Houmani, 1999). Ce qui nous amène à poser la problématique suivante : *comment produire in-vitro ces métabolites, d'intérêt médicinal, en utilisant les ressources phytogénétiques locales ?*

On qualifie d'*in-vitro* toute expérimentation biologique qui se fait en dehors de l'organisme d'origine. La culture *in-vitro*, est une technique visant à régénérer une plante ou une partie de la plante à partir de cellules ou de tissus végétaux mis en culture sur des milieux de culture nutritifs, dans des conditions stériles, un environnement contrôlé (température, pH et éclairage) et un espace réduit (Zryd, 1988 ; Matkowski, 2008).

La possibilité de produire les métabolites secondaires via les cultures cellulaires (cellules non spécialisées) a été largement étudiée (Toivonen, 1993). Cependant, celles-ci sont souvent caractérisées par une instabilité génétique et un faible rendement en molécules bioactives (Toivonen, 1993 ; Giri et Narasu, 2000). En effet, la production des métabolites secondaires nécessite un tissu spécialisé comme les chevelus racinaires (CRs) induits par l'*Agrobacterium rhizogenes*. Leur croissance rapide et leur stabilité génétique et biosynthétique en font un matériel de choix pour la production de ces substances (Giri et Narasu, 2000 ; Amdoun *et al.*, 2006).

A l'état naturel, les cultures de racines ont besoin d'un apport exogène en phytohormones et ont un rythme de développement très lent d'où une faible

synthèse de métabolites. L'utilisation de CRs a révolutionné les cultures de tissus végétaux en leur conférant un avantage considérable qui consiste en une production accrue et stable dans le temps de différents métabolites secondaires (Hamill *etal.*, 1986 ; Mukundan *etal.*, 1998).

Afin de répondre à la problématique que nous nous sommes posés, le présent travail de recherche sera consacré à la mise au point de procédés biotechnologiques pour la production de l'hyoscyamine (HS)*in-vitro*. Il sera articulé autour de trois principales parties :

- Optimisation de l'induction des cultures de CRs suivie d'une sélection de lignées performantes issues de la transformation par la souche A4 de l'*Agrobacterium rhizogenes* ;
- Optimisation des conditions de culture, en étudiant les effets de l'élicitation par l'acide salicylique, l'acide acétylsalicylique et le stress salin et les effets de la perméabilisation, dans le but d'améliorer la productivité en l'HS ;
- De l'ensemble des résultats de la recherche, un procédé biotechnologique destiné à la production de l'HS*in-vitro* sera proposé.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Le *Datura*

Le genre *Datura* appartient à l'embranchement des spermaphytes et sous embranchement des angiospermes, il fait partie de la classe des dicotylédones et de la famille des *Solanaceae*. (**Spichiger et al., 2002**).

Selon **Poletti (1988)**, l'origine du terme « *Datura* » proviendrait de « *dhatura* » qui est le nom indien de la plante et qui signifie "pomme épineuse" ou "pomme de la mort". **Bianchini et Pantano (1986)** indiquent que le nom générique, d'origine arabe, est dérivé du mot « tatorah » dont la racine "tat" signifie piquer.

L'origine des *Datura* est très discutée, il semblerait qu'ils soient originaires de l'Amérique et naturalisés dans les régions chaudes de l'Europe, d'Asie et d'Afrique (**Bianchini et Pantano, 1986 ; Bruneton, 1987 ; Houmani, 1999 ; Hensel, 2008**). D'autres auteurs conçoivent que les *Datura* poussent spontanément en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique (**Cosson, 1972**). Les *Datura* sont répandus dans les régions chaudes, tempérées et tropicales (**Paris et Moyse, 1971 ; Luna-Cavazos et Bey, 2011**).

En Algérie, selon **Quezel et Santa (1962)**, les *Datura* poussent à l'état sauvage. **Houmani (1999)** déclare qu'ils sont présents à l'état spontané, préfèrent les sols argileux, légèrement basiques, humides et les expositions bien ensoleillées. Le même auteur signale la présence de cinq espèces en Algérie, il s'agit de : *Datura ferox* L., *D. innoxia* Mill., *D. quercifolia* H.B.K., *D. stramonium* L. et *D. tatula* L.

Bianchini et Corbitta (1975) indiquent que les *Datura* sont des solanacées à alcaloïdes tropaniques, ayant des propriétés thérapeutiques très recherchées. Ils sont particulièrement riches en hyoscyamine et en scopolamine (**Houmani, 1999**). A faible dose, ces alcaloïdes peuvent avoir d'importantes applications pharmaceutiques (**Hopkins, 2003**).

Les *Datura* trouvent plusieurs autres applications dans de multiples domaines. Dans le cadre de la lutte biologique, le *D. stramonium* figure parmi les plantes qui peuvent diminuer les populations de nématodes à galle de la tomate, et même pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre (**Adabio, 2004**). Dans le domaine de l'agriculture biologique, l'allélopathie des *Datura* pourrait être utilisée pour le désherbage (**Roberts et Winks, 1998**). D'après **Rolard (2002)**, les *Datura* peuvent être aussi utilisés dans le domaine écologique, dans la bioremédiation des sols et des eaux pollués par les métaux lourds. Ces

On considère trois grandes étapes dans l'établissement de la maladie du chevelu racinaire ; la reconnaissance et l'attachement de la bactérie aux cellules végétales blessées, le transfert et l'intégration de l'ADN-T plasmidique dans le génome de la cellule végétale et, finalement, l'expression des gènes portés par l'ADN-T à l'origine des symptômes de la maladie du chevelu racinaire (**Chriqui, 1998**).

Quatre gènes sont responsables de la formation des CRs et de leur phénotype, les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* (**Tikhomiroff, 2001**). Selon **Slightom et al. (1986)** les gènes *rol* (*root locus*) correspondent à des *ORF* (*open reading frames*) spécifiques. L'expression de *rolA* est nécessaire pour l'établissement du phénotype des CRs, celle du *rolB* détermine la densité du tissu des CRs. *rolC* est lié au métabolisme de l'acide gibbérellique et *rolD* n'est pas essentiel pour induire le phénotype de la maladie, mais son absence retarde l'apparition des racines transformées (**Schmulling et al., 1988**).

Les cultures de CRs sont caractérisées par un taux de croissance élevé et peuvent synthétiser les métabolites secondaires au même titre que les racines des plantes d'origine. Naturellement, les cultures de racines ont besoin d'un apport exogène en phytohormone et ont un rythme de développement très lent ayant pour résultat une faible synthèse de métabolites secondaires. Cependant, l'utilisation de la culture des CRs a révolutionné la culture de tissus végétaux destinés à la biosynthèse de métabolites secondaires. Leur facilité d'entretiens et leur capacité de synthétiser une grande gamme de composés chimiques offre un avantage additionnel comme source continue de production de métabolites secondaires (**Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998**).

Afin d'obtenir des cultures de CRs à haute densité, il est nécessaire de maintenir les conditions de culture à un niveau optimal. Les CRs suivent un modèle de croissance définie, toutefois, la production de métabolites secondaires n'est pas proportionnellement liée à la croissance. Des racines transformées de plusieurs espèces ont été largement étudiées pour la production *in-vitro* de métabolites secondaires (**Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998**).

Des lignées de CRs peuvent être une source prometteuse pour la production normalisée de métabolites secondaires. Il est généralement admis que les CRs produisent des métabolites secondaires génération après génération sans perte de leur stabilité génétique et biosynthétique. Cette propriété peut être

utilisée pour des manipulations génétiques en vue d'améliorer les capacités biosynthétiques des CRs (Giri et Narasu, 2000 ; Veena et Taylor, 2007).

3 Le métabolisme secondaire

En plus des métabolites primaires ;les hydrates de carbone, les acides aminés, les acides gras, et les métabolites intermédiaires des voies anaboliques et cataboliques (produits par toutes les plantes où ils ont les mêmes fonctions métaboliques), les plantes produisent également une grande variété de substances, appelées *métabolites secondaires*, sans fonction métabolique apparente. Certains métabolites secondaires sont limités à quelques espèces végétales, où ils accomplissent des fonctions écologiques spécifiques, comme attirer les insectes pour le transfert du pollen et agir en tant que pesticides naturels (Polya, 2003 ; Heldt, 2005 ; Makkaret *al.*, 2007).

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).

3.1 Alcaloïdes

Un alcaloïde peut être défini comme un composant basique contenant dans sa structure moléculaire complexe un atome d'azote et qui peut manifester une activité pharmacologique significative (Roberts et Wink, 1998). L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Ainsi, il existe des alcaloïdes dérivés de l'ornithine, de la lysine, de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane (Mauro, 2006).

On distingue différents types d'alcaloïdes, parmi lesquels, les alcaloïdes tropaniques (Facchini, 2001). Ces substances sont extraites à partir de plantes de la famille des *Solanaceae* dont les *Datura*. Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses recherches en raison de leurs contenus alcaloïdiques (Ramadan et *al.*, 2007).

3.2 Alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques dérivés de l'acide aminé « ornithine » (**Hartmann, 1995**) dont les plus importants sont la scopolamine, l'hyoscyamine et l'atropine (Figure 2) ont un noyau tropane (squelette de C₄N⁺), structurellement, ces alcaloïdes synthétisés comme postcureurs des pyrrolines, ont une activité biologique forte, particulièrement comme neurotransmetteurs (**Facchini, 2001 ; Tadeusz, 2007**).

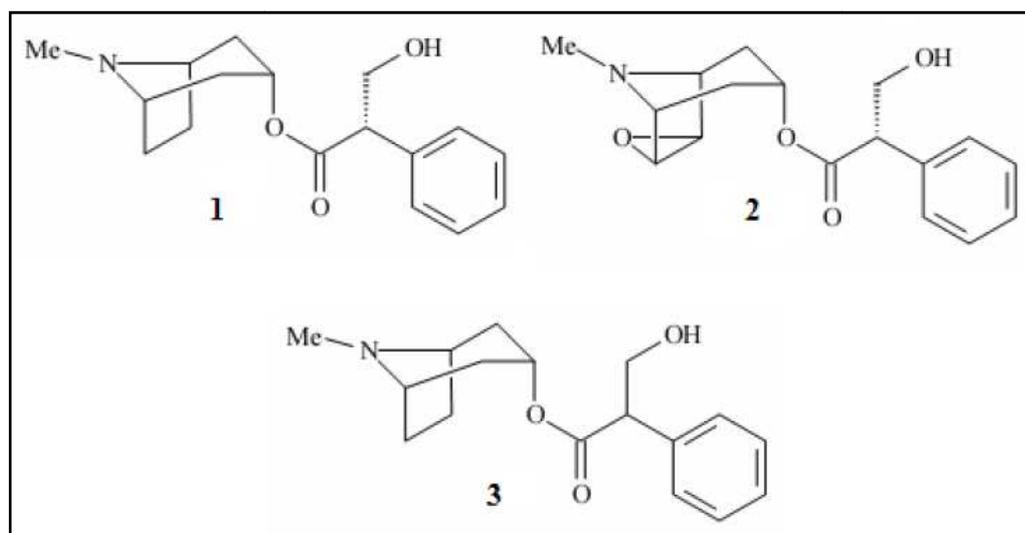


Figure 2 :Alcaloïdes tropaniques (**Mauro, 2006**)

1 : Hyoscyamine, **2 :** Scopolamine, **3 :** Atropine

La première étape de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est catalysée par laputrescine N-méthyltransférase (PMT). Le tropinone est le premier intermédiaire avec un noyau tropane. Deux déshydrogénases, la tropinone réductase I (TR-I) et la tropinoneréductase II (TR-II) réduisent le tropinone en tropine et γ -tropine respectivement. L'hyoscyamine est produite par la condensation du tropine et de l'acide tropique. L'hyoscyamine peut être convertie en scopolamine par hydroxylation du noyau tropane (**Facchini, 2001**). Le schéma suivant résume les étapes de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Figure 3).

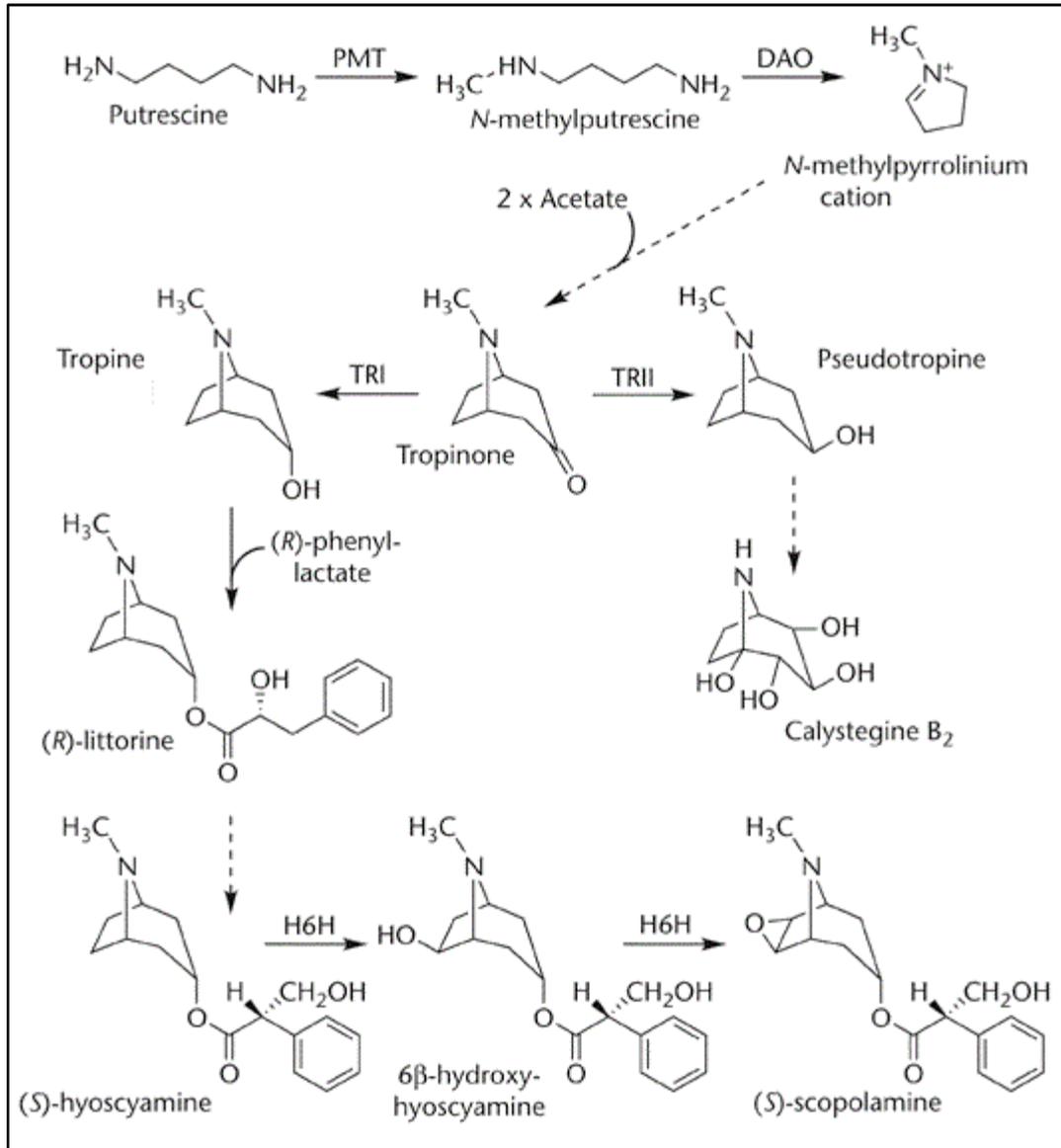


Figure 3 : Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Fester, 2010)

PMT : putrescine methyltransferase ; DAO : diamine oxydase ; TRI et TRII : tropinone reductases I et II ; et H6H : hyoscyamine 6-hydroxylase.

3.3 Production des alcaloïdes par voies biotechnologiques

La production des métabolites secondaires, particulièrement des alcaloïdes, par voies biotechnologiques, a fait l'objet de très nombreuses études. Plusieurs techniques basées sur la culture *in-vitro* sont utilisées, principalement, les cultures de pousses (sans racines), les cultures de cals, les cultures cellulaires et les cultures de CR induits par *Agrobacterium rhizogenes*. Le tableau 1 illustre quelques travaux réalisés dans ce sens.

Tableau 1 : Exemples de travaux de production des métabolites secondaires par voies biotechnologiques (*in-vitro*)

Technique	Métabolite	Référence
Cultures de pousses	Alcaloïdes indoliques	Hernandez-Dominguez <i>et al.</i> , 2006.
	Alcaloïdes tropaniques	Khanam <i>et al.</i> , 2001.
Cultures de cals	Alcaloïdesisostéroïdiens	Chen <i>et al.</i> , 2011.
	Alcaloïdes pyrroloquinazolines	Jayapaul <i>et al.</i> , 2005.
Cultures cellulaires	Alcaloïdes imidazoliques	Andreazza <i>et al.</i> , 2009.
	Alcaloïdes tropaniques	Iranbakhsh <i>et al.</i> , 2007.
Cultures de chevelus racinaires	Alcaloïdes tropaniques	Dehghan <i>et al.</i> , 2012 ; Harfi <i>et al.</i> , 2011 ; Amdoun <i>et al.</i> 2010.
	Alcaloïdes indoliques	Li <i>et al.</i> , 2011.
	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Abd El-Mawla, 2010.
	alcaloïdes Pyridinique	Fecker <i>et al.</i> , 1993.

4 L'élicitation de la production des métabolites secondaires

Lors d'une attaque, d'une infection ou d'agressions occasionnées par les conditions du milieu environnant, pour beaucoup de plantes, le métabolisme secondaire s'accélère; la biosynthèse de nouveaux composés dont les phytoalexines a lieu et la concentration des composés déjà existants augmente (Wink, 1999 ; Vasconsuelo et Boland, 2007). L'élicitation désigne l'action de mimer une telle attaque (stressbiotiques et abiotiques) sur une cellule de la plante (Tikhomirof, 2001). Elle consiste en l'induction de la biosynthèse des métabolites secondaires par des substances dites « *éliciteurs* » (Radman *et al.*, 2003).

Les éliciteurs peuvent être classés, sur la base de leur nature, en éliciteurs biotiques et éliciteurs abiotiques (Namdeo, 2007). Récemment, ils sont aussi groupés en une troisième classe : molécules signales de réactions de défense des plantes (Wang et Wu, 2013).

4.1 Eliciteurs biotiques

Les éliciteurs biotiques sont des substances d'origine organique. Ils comprennent des polysaccharides dérivés des parois cellulaires de la plante (pectine ou cellulose) et les micro-organismes (chitine ou glucane) et les glycoprotéines. La G-protéine ou les protéines intracellulaires dont les fonctions sont couplées aux récepteurs en activant ou en désactivant un certain nombre d'enzymes ou de canaux d'ions (Namdeo, 2007).

Selon Wang et Wu (2013), les principaux éliciteurs biotiques sont :

- Des cellules bactériennes ;
- Des éliciteurs d'origine fongique ;
- Des polysaccharides microbiens ou d'origine végétale ;
- Des éliciteurs de nature lipidique ou protéique.

4.2 Eliciteurs abiotiques

Les éliciteurs abiotiques sont des substances dont l'origine n'est pas biologique et dont les sels inorganiques sont les plus dominants. Ces derniers, présentent des facteurs physiques agissant en tant qu'éliciteurs comme le Cu, les ions Cd et le Ca (Veersham, 2004).

Selon Namdeo (2007), les principaux éliciteurs abiotiques sont :

- De nature physique ou chimique fonctionnant par l'intermédiaire des éliciteurs biotiques formés de manière endogène ;
- Des rayons UV ou des protéines dénaturées ;
- Des composants non essentiels du milieu de culture (agarose, étain) ;
- Des métaux lourds ;
- Des fongicides ;
- Des herbicides.

4.3 Molécules signales de réactions de défense des plantes

Suite à une attaque, les réactions de défense des végétaux passent par une cascade d'événements entre la perception du signal par un récepteur à la surface cellulaire et l'activation de gènes liés à la défense dans le noyau. Des molécules signales induisent la réponse de défense par la peroxydation des lipides, l'activation de gènes liés à la défense, et la synthèse de métabolites secondaires (Zhao *et al.*, 2005). Ces molécules signales sont, selon Wang et Wu (2013), principalement :

- Acide salicylique (AS) et acide acétylsalicylique (AAS) ;
- Acide jasmonique (AJ) et méthyljasmonate (MeJ) ;
- Espèce active d'oxygène (ROS) ;
- Oxyde nitrique (NO).

5 La perméabilisation des chevelus racinaires

Le grand potentiel des cultures de CRs comme source stable de produits biologiquement actifs a attiré l'attention de la communauté scientifique (Wilson *et al.*, 1987). En même temps elles fournissent beaucoup de défis pour la culture à grande échelle (Kim *et al.*, 2002). Dans un bioréacteur, le processus de la culture est en continu pendant des périodes prolongées, le produit est récupéré avec le milieu de culture épuisé de façon périodique (Giri et Narasu, 2000).

Les cultures de CRs des *Solanacées* sont les plus étudiées en raison de leur capacité à synthétiser des quantités relativement stables d'alcaloïdes tropaniques (Avery *et al.*, 1987 In Boitel-Conti *et al.*, 1995). Malheureusement, les composés cibles sont généralement mal libérés dans le milieu de culture (Singh *et al.*, 1988 In Boitel-Conti *et al.*, 1995) et leur accumulation dans la racine peut être limitée par une rétroaction (feed-back) d'inhibition des enzymes (Pras *et al.*, 1991 In Boitel-Conti *et al.*, 1995). La libération des alcaloïdes, dans le milieu de culture, avec la prolongation de l'activité biosynthétique des racines transformées peut être une solution (Boitel-Conti *et al.*, 1995).

Le traitement avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit un dégagement passager des alcaloïdes, dans le milieu nutritif, sans affecter la viabilité des racines transformées (Lee *et al.*, 1998). Bais *et al.* (2001) ont utilisé

du diméthylsulfoxyde (DMSO) et un adsorbant solide (XAD-7) pour perméabiliser les CRs issus de *Cichorium intybus* afin de produire de la coumarine. **Boitel-Conti et al. (1995)**, ont utilisé le Tween 20 (monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) comme un agent de perméabilisation des CRs.

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel végétal

Les graines de *Datura stramonium* L., *D. tatula* L. et *D. innoxia* Mill. (Figure 4) sont récoltées dans les populations des trois espèces, respectivement originaires d'Oran, de Skikda et de Tizi-Ouzou, maintenues en collection, depuis plusieurs années à l'E.N.S.A – El-Harrach, Alger (Ex-I.N.A.).

La scarification et la désinfection des graines des trois espèces sont effectuées selon le protocole préconisé par **Khelifi-Slaoui et al. (2005)**. Les graines scarifiées, par frottement entre deux feuilles de papier verre (p 80), sont désinfectées dans l'éthanol à 70° pendant 30 secondes et dans l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 12° pendant 10 minutes. La désinfection est suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérile et un séchage sur du papier filtre stérile. La scarification et la désinfection des graines sont réalisées sous hotte dans des conditions stériles.



Figure 4* : Graines de *Datura*

1 : *D. stramonium*, 2 : *D. tatula* et 3 : *D. innoxia*

2 Conditions de germination

Les graines désinfectées sont ensemencées dans des tubes à essai contenant environ 20 ml de milieu de culture MS (**Murashige et Skoog, 1962**) (annexe 1) additionné de 7 g/l d'agar et de 20 g/l de saccharose puis placées dans la chambre de culture à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Pour chacune des espèces, deux lots de tubes à essai sont constitués ; 48 tubes à essai par lot. Au total, 288 tubes à essai sont utilisés.

* Travail encadré par nous-mêmes et soutenu par M. BEKHOUCHE M. en 2011 à l'E.N.S.A.

- 1^{er} lot de 144 tubes à essai (48 x 3): Germination sous photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité (jour long), le 1^{er} lot constitue le lot de vitrosemis témoin ;
- 2^{ème} lot de 144 tubes à essai (48 x 3) : Germination sous obscurité totale. Ce 2^{ème} lot constitue le lot de vitrosemis étiolés.

3 Etiolement des plantules

Afin d'évaluer l'effet de l'étiollement (vitrosemis cultivés dans l'obscurité totale) sur l'induction des CRs, les paramètres suivants sont mesurés et comparés à ceux de l'induction des CRs à partir des plantules obtenues en conditions photopériodique de jours longs :

- Taux d'induction racinaire (exprimé en %) ;
- Temps moyen d'apparition de la première racine transgénique (exprimé en jours) ;
- Nombre moyen de racines par explant.

4 Etablissement des cultures de chevelus racinaires

Les CRs sont obtenus selon le protocole adopté par **Amdoun et al. (2009)**. La souche A4 d'*A. rhizogenes* utilisée dans cette étude est une souche à agropine (**Lambert et al., 1988**), originaire de la Californie (Etats-Unis).

Deux mois après le semis des graines de *Datura* (en condition photopériodique et dans l'obscurité), les vitrosemis sont suffisamment développés. L'inoculation, avec l'agrobactérie, a lieu 72 heures après la mise en suspension des agrobactéries, préalablement activées, dans le milieu de culture YEM (**Vincent, 1970**) liquide. L'inoculation se fait par simple dépôt à l'aide d'une seringue au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles de 0,5 à 1 cm de longueur. Ils sont ensuite déposés, selon une polarité inversée, à raison de 4 explants par boîte de Pétri, sur le milieu MS contenant 250mg/l de céfotaxime (antibiotique). La co-culture, explants et agro-bactérie, est réalisée dans l'obscurité et à $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les racines qui apparaissent sur les explants inoculés sont excisées lorsqu'elles atteignent environ 2 cm de longueur. Elles sont transférées sur un milieu MS

solide additionné de 250 mg/l de céfotaxime afin d'éliminer les bactéries qui accompagnent éventuellement ces racines. Lorsque les racines atteignent une taille et un degré de ramification jugés suffisants elles sont découpées en portions de deux centimètres non ramifiées, puis cultivées séparément sur un milieu MS solide frais sans antibiotique.

5 Entretien des lignées racinaires obtenues

Les lignées racinaires obtenues sont entretenues dans des boîtes de Pétri contenant environ 20 ml de milieu de culture B5 (**Gamborg et al., 1968 ; Gamborg et al., 1976**)(annexe 1)semi-solide additionné de 5 g/l d'agar et de 20 g/l de saccharose. Les conditions de culture sont : Obscurité totale, température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et pH ajusté à 5,6 - 5,8.

La fréquence de multiplication des lignées obtenues est de deux semaines. L'inoculum primaire est représenté par l'extrémité des lignées racinaires non ramifiée d'environ 2 cm. Pour chaque lignée trois boîtes de Pétri sont utilisées (trois répétitions) pour chaque multiplication.

6 Sélection des lignées racinaires performantes

Les lignées racinaires obtenues sont sélectionnées, principalement, en fonction de leur biomasse et leur production en hyoscyamine. Les racines qui présentent une faible croissance ou qui sont callogènes sont systématiquement éliminées.

La sélection des lignées racinaires performantes est réalisée dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant environ 50 ml de milieu de culture B5 liquide additionné de 20 g/l de saccharose. Les conditions de culture sont : Obscurité totale, température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH ajusté à 5,6 - 5,8 et une vitesse d'agitation de 100 rpm. L'inoculum primaire (matériel végétal) est constitué des extrémités de 3 racines non ramifiées d'environ 3 cm (environ 0,1 g de poids frais). Pour chaque lignée trois Erlenmeyers sont utilisés (trois répétitions).

Les CRs qui présentent une bonne croissance sont retenus, ils sont choisis selon les 5 critères suivants :

- Vitesse moyenne de croissance (cm/jour) ;
- Longueur moyenne totale (cm) après 20 jours de culture ;
- Degré de ramification (estimation visuelle) ;

- Poids sec des CRs exprimé en gramme ;
- Teneurs moyennes en HS (mg/g M.S.).

7 Cinétique de croissance des CRs et de l'accumulation de l'HS

De l'ensemble des lignées racinaires obtenues, trois lignées non callogènes (une par espèce) caractérisées par une bonne croissance seront retenues pour l'étude de la cinétique de croissance des CRs et d'accumulation de l'HS.

La biomasse est exprimée en gramme de matière sèche (M.S.) obtenue dans 50 ml de milieu de culture, les teneurs en hyoscyamine (TH) sont exprimées en mg/g M.S. Les mesures sont réalisées dès le 10^{ème} jour de culture à raison d'une mesure, répétée trois fois, tous les deux jours, et ce, jusqu'au 26^{ème} jour de culture.

Tous les essais sont réalisés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture B5 liquide additionné de 20 g/l de saccharose, pH ajusté à 5,6 - 5,8. Les cultures sont placées dans les conditions de température de 26±1 °C, dans l'obscurité totale et sous agitation à 100 rpm, l'inoculum primaire est d'environ 0,1 g de CRs frais pour chacune des trois lignées étudiées.

8 Elicitation par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique

Des extrémités de CRs non ramifiées issues des lignées performantes ayant atteint au moins 3 cm de longueur sont cultivées pendant 20 jours dans des Erlenmeyers contenant 50 ml de milieu de culture B5 liquide additionné de 20 g/l de saccharose, pH ajusté à 5,6 – 5,8. Elles sont placées dans l'obscurité à une température de 26 ± 1°C et sous agitation à 100 rpm. L'inoculum primaire des CRs est d'environ 0.1 g de poids frais.

L'élicitation des CRs est réalisée au 19^{ème} jour de culture. Le temps de contact éliciteur-CRs est de 24 heures. En plus du témoin (milieu de culture B5 liquide sans éliciteur), deux acides organiques combinés avec quatre différentes concentrations sont utilisés comme éliciteurs des lignées racinaires préalablement sélectionnées.

Les deux éliciteurs, l'acide salicylique (AS) et l'acide acétylsalicylique (AAS), sont appliqués séparément aux concentrations de 10⁻² M ; 10⁻³ M ; 10⁻⁴ M ; et 10⁻⁵ M (tableau 2). Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

Les effets de ces éliciteurs sont évalués sur la base du poids sec (PS) des lignées de CRs étudiées et leurs TH. Les PS et les TH des CRs élicités sont comparés avec les PS et TH des témoins expérimentaux non élicités, avec les TH obtenus dans le cadre d'autres travaux similaires et avec des TH des plantes entières correspondantes.

Tableau2 : Modalités d'élicitation par l'AS et l'AAS

Eliciteur (24 d'élicitation)	Concentration (M)	Lignées
AS	10 ⁻²	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻³	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻⁴	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻⁵	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
AAS	10 ⁻²	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻³	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻⁴	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
	10 ⁻⁵	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}
Témoin	0	L _{DS} , L _{DT} et L _{DI}

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

9 Elicitation par le stress salin

L'élicitation par le stress salin est réalisée dans le milieu B5 liquide additionné de 30 g/l de saccharose. Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave (120 °C pendant 20 mn) dans des Erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de culture par Erlenmeyer. L'inoculum primaire est constitué des extrémités de trois racines transgéniques d'environ 3 cm de longueur. Le poids frais de l'inoculum primaire est d'environ 0.1 g.

Les conditions de culture sont : l'obscurité, vitesse d'agitation de 100 rpm et la température de la chambre de culture est de 26±1 °C.

L'élicitation est effectuée sur les 3 lignées racinaires sélectionnées (L_{DS}, L_{DT} et L_{DI}) des trois espèces étudiées. L'étude est réalisée en un dispositif factoriel complet combinant les trois lignées racinaires retenues avec quatre concentrations (0,5, 1, 2, et 3 g/l) pour chacun des deux sels (KCl et CaCl₂) et trois temps d'élicitation (10 heures, 24 heures et 48 heures) comme cela est détaillé dans le tableau 3. Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

Tableau3 :Modalités d'élicitation par le stress salin

Sel	Temps d'élicitation(h)	Concentration(g/l)	Lignées
KCl	10	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
	24	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
	48	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
CaCl ₂	10	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
	24	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
	48	0,5	LDS, LDT et LDI
		1	LDS, LDT et LDI
		2	LDS, LDT et LDI
		3	LDS, LDT et LDI
Témoin	0	0	LDS, LDT et LDI

LDS: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; LDT: Lignée du *D. tatula* ; LDI: Lignée du *D. innoxia*.

10 Perméabilisation des chevelus racinaires avec le Tween 20

Environ 0,1 g de chevelus racinaires, ce qui correspond à trois racines non ramifiées de 3 centimètres, sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture B5 ajusté au pH de 5,6 – 5,8. La culture est conduite dans l'obscurité totale avec une agitation de 100 rpm et à une température de 26 ± 1 °C.

Trois concentrations de Tween 20 (0,5%, 1% et 2%) sont testées sur les trois lignées racinaires sélectionnées. Le Tween 20 est additionné au 19^{ème} jour de culture, 24 heures avant de récolter les CRs et le milieu de culture épuisé (Tableau 4). Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

Le témoin est représenté par les cultures des trois lignées retenues dans le milieu de culture B5 sans agent de perméabilisation. L'effet du Tween 20 sur la viabilité des chevelus racinaires est évalué par le poids sec de ces derniers. Les alcaloïdes libérés par les chevelus racinaires sont extraits à partir du milieu de culture.

Tableau 4 : Modalités de la perméabilisation des CRs avec le Tween 20

Agent de perméabilisation	Concentration (%)	Lignées
Tween 20	0,5	LDS, LDT et LDI
	1	LDS, LDT et LDI
	2	LDS, LDT et LDI
Témoin	0	LDS, LDT et LDI

LDS: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; LDT: Lignée du *D. tatula* ; LDI: Lignée du *D. innoxia*.

11 Combinaison de l'élicitation (AS et AAS) et de la perméabilisation (Tween 20)

Les conditions de culture et le matériel végétal de départ, représenté par les extrémités de CRs de 3 cm des trois lignées retenues, sont les mêmes que pour les essais de l'élicitation par l'AS et l'AAS et les essais de perméabilisation avec le Tween 20.

L'étude de la combinaison de l'élicitation de la production de l'HS et de la perméabilisation des CRs est réalisée en un dispositif factoriel complet combinant les trois lignées racinaires (LDS, LDT et LDI), les deux acides organiques (AS et AAS) avec quatre concentrations de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} moles additionnés au milieu de culture au 18^{ème} jour de culture (soient 48 heures d'élicitation) et 1% de Tween 20 rajouté au 19^{ème} jour de culture (soit 24 heures de perméabilisation), comme c'est décrit dans le tableau 5.

Toutes les combinaisons des quadruples ; agent de perméabilisation, éliciteurs (AS ou AAS), concentrations des éliciteurs et les lignées racinaires, sont individuellement répétées trois fois.

Les effets combinés de ces éliciteurs et le tween 20 sont évalués sur la base du PS des lignées de CRs étudiées, leurs TH et la concentration de l'HS dans la solution nutritive épuisée. Les PS et les TH des CRs perméabilisés et élicités sont comparés avec les PS et TH des témoins expérimentaux non traités. Quant aux concentrations de l'HS dans la solution nutritive sont comparées aux concentrations de l'HS de la solution nutritive obtenues après perméabilisation avec 1% de Tween 20 et sans élicitation.

Tableau 5: Modalités de la combinaison de l'élicitation et de la perméabilisation

Perméabilisation 24 h de contact	Elicitation 48 heures de contact	Concentration de l'éliciteur (M)	Lignées
Tween 20 à 1%	AS	10 ⁻²	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻³	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻⁴	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻⁵	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻²	LDS, LDT et LDI
	AAS	10 ⁻³	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻⁴	LDS, LDT et LDI
		10 ⁻⁵	LDS, LDT et LDI
		0	LDS, LDT et LDI
	Témoin	-	0

LDS: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; LDT: Lignée du *D. tatula* ; LDI: Lignée du *D. innoxia*.

12 Combinaison du temps de l'élicitation et de la concentration en éliciteur (AS et AAS)

Suite aux résultats de l'élicitation obtenus dans la partie 8 (Elicitation par l'AS l'AAS avec un temps d'élicitation de 24 heures), et sachant que les éliciteurs provoquent une réponse physiologique du végétal par l'augmentation de la biosynthèse des métabolites secondaires mais avec une baisse de la biomasse, expliqué par l'état du stress (Zabetakis *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Hayat et Ahmad, 2006 ; Jungla *et al.*, 2009), nous avons jugé utile d'expérimenter des concentrations très faibles en éliciteurs mais avec des temps d'élicitation plus importants, l'objectif étant l'amélioration des TH des lignées racinaires retenues tout en gardant des poids secs des CRs traités proches de ceux des témoins, ou même, plus importants.

L'étude est réalisée en un dispositif factoriel complet combinant les trois lignées racinaires retenues (LDS, LDT et LDI), les deux acides organiques (AS et AAS),

trois concentrations des deux éliciteurs de 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8} M avec quatre temps d'élicitation. Les éliciteurs sont additionnés au milieu de culture au 12^{ème} jour de culture (8 jours d'élicitation), au 14^{ème} jour de culture (6 jours d'élicitation), au 16^{ème} jour de culture (4 jours d'élicitation) et au 18^{ème} jour de culture (2 jours d'élicitation), comme cela est présenté dans le tableau 6. Toutes les combinaisons sont individuellement répétées trois fois.

Les conditions de culture sont les mêmes que dans les parties précédentes, une température de 26 ± 1 °C, agitation à 100 rpm et obscurité totale. Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture B5 ajusté au pH de 5,6 – 5,8 avec un inoculum primaire de 0.1 g de CRs frais. Toutes les observations sont faites après 20 jours de culture.

Tableau 6 : Modalités de la combinaison du temps de l'élicitation et la concentration des acides salicylique et acétylsalicylique

Eliciteur	Temps d'élicitation	Concentration (M)	Lignées
AS	2 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	4 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	6 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	8 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
AAS	2 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	4 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	6 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
	8 jours	10^{-4}	LDS, LDT et LDI
		10^{-6}	LDS, LDT et LDI
		10^{-8}	LDS, LDT et LDI
Témoin	0	0	LDS, LDT et LDI

LDS: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; LDT: Lignée du *D. tatula* ; LDI: Lignée du *D. innoxia*.

13 Etablissement de procédés de production de l'HS *in-vitro*

Afin d'établir les procédés de production de l'hyoscyamine *in-vitro*, basés sur les techniques de cultures de CRs, plusieurs opérations sont réalisées sur le protocole classique d'obtention des chevelus racinaires.

A chaque étape, le (ou les) résultat(s) le(s) plus significatif(s) sera (seront) retenu(s) lors de l'établissement des procédés de production de l'HS. Ces procédés décriront :

- Les conditions idéales de germination des graines ;
- Les modalités de l'élicitation ;
- Les modalités de la perméabilisation ;
- Les modalités de la combinaison de l'élicitation de la production de l'HS et de la perméabilisation des CRs ;
- Les modalités de la combinaison du temps d'élicitation et de la concentration en éliciteur.

Mais aussi :

- L'espèce qui répond le mieux à l'induction racinaire par l'agro-bactérie ;
- La lignée racinaire la plus intéressante.

14 Extraction, dosage et identification de l'hyoscyamine

L'extraction de l'HSa été réalisée selon le protocole de **Kartal *et al.*, (2003)** adapté par **Amdoun *et al.*(2009)**. Elle est basée sur le principe que, les alcaloïdes sont sous forme de sels dans une solution acide et sous forme organique dans une solution basique. L'extraction de l'HS est réalisée à partir d'échantillons de chevelus racinaires de 50 mg de matière sèche, séchés dans l'étuve à 50 ± 3 °C pendant 24 heures. Elle est aussi réalisée à partir de 20 ml de solution nutritive épuisée afin de déterminer les concentrations en HS extracellulaire dans les cas de perméabilisation des CRs.

Quant au dosage et à l'identification de l'hyoscyamine, ils sont réalisés par chromatographie phase gazeuse (CPG) en utilisant un étalon (atropine) pour préparer la courbe d'étalonnage (annexe 2).

L'atropine étant un isomère de l'hyoscyamine, elle est utilisée comme étalon pour identifier et quantifier cette dernière (Cieri *et al.*, 2003), au niveau des CRs et des solutions nutritives.

Neuf répétitions sont réalisées pour chaque modalité (trois extraits par modalité x trois injection dans le chromatographe).

14.1 Extraction de l'HS à partir du CRs

Le protocole consiste en :

- Broyage des CRs (poids sec de 50 mg) dans une solution d'HCl 0,1 N ;
- Agitation pendant 10 minutes ;
- Filtration suivie d'un rinçage avec la solution d'HCl 0,1N;
- Introduction du filtrat dans une ampoule à décanter après avoir alcalinisé jusqu'au pH d'environ 10 par une solution d'ammoniac (NH_3) ;
- Addition du chloroforme (CHCl_3) dans le rapport 1 : 1 en volume (solution alcaline :chloroforme) ;
- Agitation sans former d'émulsion, puis après décantation, récupération de la phase organique ;
- Reprise des deux dernières étapes avec la phase aqueuse ;
- Mélange des deux phases organiques puis déshydratation avec le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) ;
- Filtration et récupération de la phase organique dans une capsule ;
- Evaporation de la solution du chloroforme à l'aide d'un rotavapor.

14.2 Extraction de l'hyoscyamine à partir de la solution nutritive

Les alcaloïdes extracellulaires sont extraits par du chloroforme et à partir de 20 ml de la solution nutritive récupérée après 20 jours de culture (soient 24 heures de perméabilisation). Ainsi, il faut successivement :

- Filtrer 20 ml de milieu de culture liquide et épuisé ;
- Alcaliniser jusqu'à un pH d'environ 10 ;
- Agiter pendant 10 minutes, deux fois de suite, la solution aqueuse alcalinisée à laquelle est additionné le même volume de chloroforme ;
- Mélanger les deux phases organiques et les déshydrater sur du sulfate de sodium anhydre ;
- Filtrer et récupérer la phase organique dans une capsule ;

- Evaporer la solution du chloroforme.

La teneur moyenne en HS (TH) est alors exprimée en mg/l S.N. (solution nutritive)

14.3 Dosage et identification de l'HS

Le dosage et l'identification de l'HS des lignées racinaires étudiées sont réalisés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le résidu sec, obtenu de l'extraction, est repris dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2) puis filtré. Le filtrat est ensuite analysé par CPG.

L'appareil utilisé est un CHROMPACK CP 9002, muni d'un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'une colonne capillaire de type DB1, de marque *Agilent*, d'une longueur de 30 m, d'un diamètre interne de 0,32 mm et d'une épaisseur du film de 0,25 μm . L'azote est le gaz vecteur et l'hydrogène le gaz de combustion.

Deux courbes d'étalonnage (annexe 2) sont réalisées pour l'étalonnage du chromatographe. La première pour le dosage de l'HS des CRs (intracellulaire) avec les caractéristiques :

- Température Détecteur : 260 °C ;
- Température Injecteur : 260 °C ;
- Température Four (Colonne) : 250 °C.

La deuxième pour le dosage de l'HS de la solution nutritive (extracellulaire), suite à la perméabilisation des CRs, avec les caractéristiques :

- Température Détecteur : 280 °C ;
- Température Injecteur : 280 °C ;
- Température Four (Colonne) : 260 °C.

15 Analyse statistique

L'analyse de la variance à un facteur (annexe 3) ainsi que le test de Tukey (classification en groupes homogènes) au seuil de 5% sont utilisés pour traiter les résultats obtenus à l'aide du logiciel SPSS version 10.0. Aussi, une analyse de la corrélation entre le PS et la TH est réalisée.

Les moyennes suivies de la même (ou les mêmes) lettre alphabétique ne sont passignificativement différentes. Les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5%.

16 Synthèse

Le schéma suivant synthétise les principales opérations réalisées au cours de l'établissement des procédés de production de l'hyoscyamine *in-vitro*.

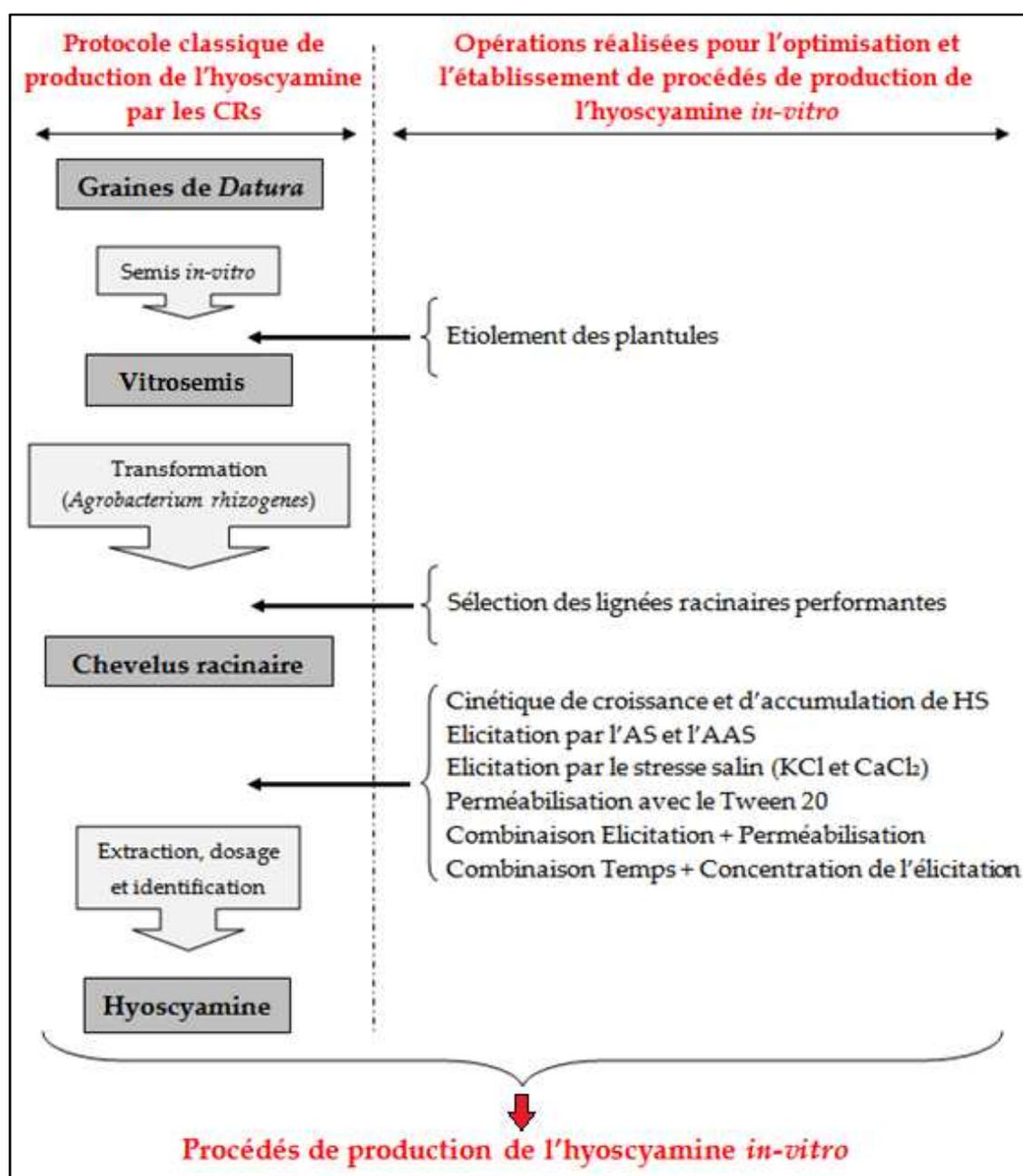


Figure 5 : Synthèse du protocole classique et du protocole expérimental pour l'élaboration des procédés de production de l'HS *in-vitro*.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1 Effet de l'étiollement sur l'induction des chevelus racinaires

Chacune des lignées racinaires obtenues suite à la transformation par l'*Agrobacterium rhizogenes* peut être considérée comme une lignée à part, différente de toutes les autres (Zhi-Bi et Min, 2006 ; Georgiev et al., 2007). Ainsi, dans les programmes de production d'alcaloïdes *in-vitro*, l'optimisation de la transformation par l'*A. rhizogenes* constitue une étape cruciale et incontournable pour l'obtention d'un grand nombre de CRs permettant la sélection de lignées performantes. Le tableau 7 illustre les résultats de l'effet de l'étiollement sur l'induction des CRs par la souche A4 d'*A. rhizogenes* sur les trois espèces de *Datura* : *D. stramonium* (DS), *D. tatula* (DT) et *D. innoxia* (DI).

Les résultats obtenus (Tableau 7) montrent que l'étiollement a un effet très hautement significatif (Annexe 3) sur le nombre moyen de racines transgéniques par explant, le groupe homogène le plus intéressant est représenté par l'espèce DS dans les conditions d'étiollement des plantules avec un nombre moyen de racines par explant égale 2,62.

Les explants étiolés présentent les meilleures aptitudes à la transformation génétique exprimée par le taux d'induction des racines, le temps moyen d'apparition de la première racine et le nombre moyen de racines par explant par rapport aux explants non étiolés.

Pour l'espèce DT, l'étiollement des explants permet d'obtenir des taux d'amélioration significatifs par rapport aux explants non étiolés avec des facteurs d'amélioration de 2,09 et 3,01 fois respectivement pour le taux d'induction et le nombre de racines par explant. Le temps moyen d'apparition de la 1^{ère} racine est plus court pour les explants étiolés, il passe de 15,24 à 7,92 jours.

Le DS présente des facteurs d'amélioration intermédiaires pour le taux d'induction de racines (1,80 fois) et le temps moyen d'apparition de la première racine (0,53 fois), mais elle est classée en dernier pour le nombre moyen de racines par explant (2,40 fois).

Le DI est le moins réactif et aussi celui qui présente les taux d'amélioration, dû à l'étiollement, les plus faibles notamment pour le taux d'induction et le nombre moyen de jours nécessaires pour l'apparition de la première racine. Cependant, pour le nombre moyen de racines par explant il est classé juste après DT.

Tableau 7 : Effet de l'étiollement sur l'induction racinaire

		Taux d'induction racinaires (%)	Temps moyen d'apparition 1 ^{ère} racine (jours)	Nombre moyen de racines par explant
Vitrosemis non étiolés (A)	DS	52.08	16.58	1.12 ^C
	DT	43.75	15.24	0.64 ^D
	DI	16,67	16,97	0,23 ^E
Vitrosemis étiolés (B)	DS	93.75	8.75	2.62^A
	DT	91.66	7.92	1.93 ^B
	DI	29.16	11.02	0.58 ^D
Facteur d'amélioration (B/A)	DS	1.80	0.53	2.40
	DT	2.09	0.52	3.01
	DI	1.74	0.65	2.52

DS : *Datura stramonium* ; DT : *D. tatula* ; DI : *D. innoxia*.

Au total, 343 racines induites par l'*A. rhizogenes* sont obtenues, 96 racines à partir des vitrosemis non étiolés (54 racines de DS, 31 racines de DT et 11 racines de DI) et 247 racines issues des vitrosemis étiolés (126 racines de DS, 93 racines de DT et 28 racines de DI).

La figure 6 représente des racines induites, suite à la co-culture Agro-bactérie et hypocotyles, sur un explant non-étiolé et étiolé de *Datura tatula*.

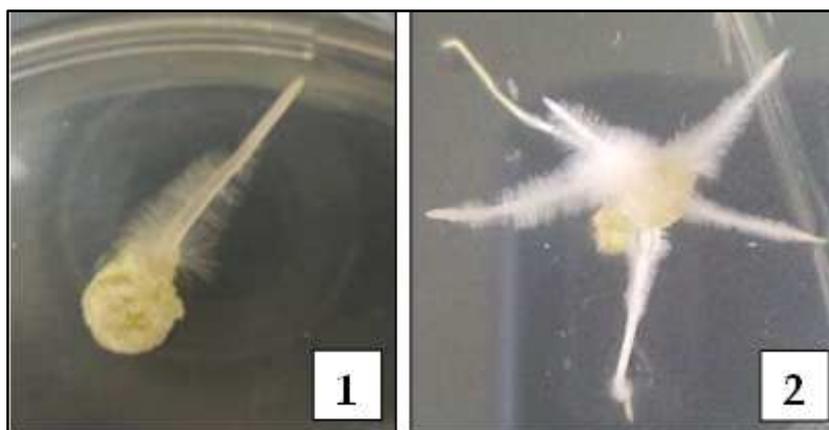


Figure 6 : Racines induites sur explants non-étiolé (1) et étiolé (2) de *D. tatula* (G. = 3.1 x)

2 Sélection des lignées racinaires performantes

Les racines transformées présentent généralement une bonne croissance. Cependant, une partie d'entre elles sont caractérisées par une faible croissance et/ou par la formation de cals. Les racines exprimant ce type de phénotype sont systématiquement éliminées.

Sur un total de 343 lignées de CRs, 96 sont obtenues sur des vitrosemis non étiolés et 247 sur des vitrosemis étiolés, les trois meilleures lignées racinaires issues de la transformation génétique (1 pour chaque espèce) sont retenues sur la base de leurs bonnes croissances, leurs degrés de ramification et leurs teneurs élevées en hyoscyamine (Tableau 8).

Sur les trois lignées retenues, deux lignées sont obtenues à partir des vitrosemis étiolés, L_{DT} (issue du *Datura tatula*) et L_{DI} (issue du *D. innoxia*), et la troisième est obtenue à partir d'un explant non étiole, L_{DS} (issue du *D. stramonium*).

Tableau 8 : Caractéristiques des lignées racinaires retenues

	Longueur totale (cm)	Vitesse moyenne de croissance (cm/jour)	Degrés de ramification	PS (g)	TH (mg/g M.S.)
L _{DS}	20.8 ± 1.3	1.04	Très ramifiée	0.205 ± 0.002	8.16 ± 0.613
L _{DT}	24.8 ± 1.2	1.24	Très ramifiée	0.295 ± 0.006	8.57 ± 0.442
L _{DI}	21.7 ± 0.8	1.09	Très ramifiée	0.229 ± 0.004	3.15 ± 0.135

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

La figure 7 illustre la morphologie des lignées racinaires retenues après 20 jours de culture sur milieu de culture B5 semi-solide.

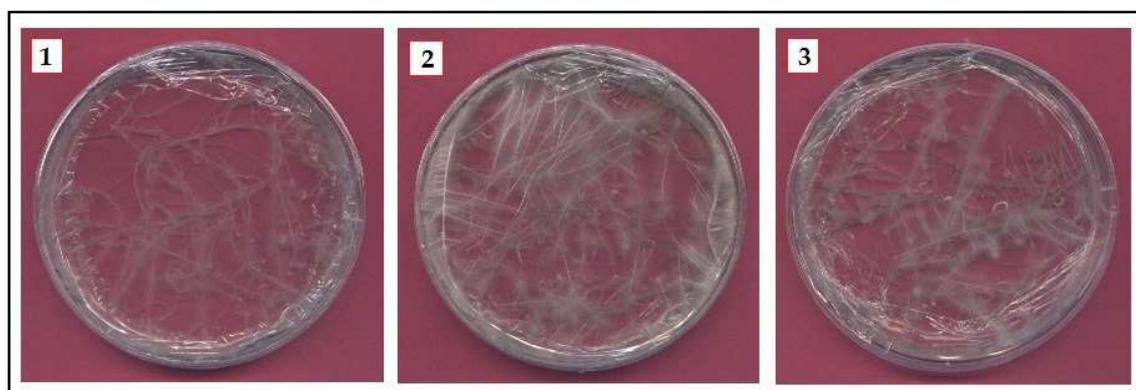


Figure 7 : Aspect morphologique de lignées racinaires retenues (G.=0.48x)

1 : L_{DS}, 2 : L_{DT} et 3 : L_{DI}

3 Cinétique de croissance et de production d'alcaloïdes

3.1 Evolution de la biomasse des chevelus racinaires

L'allure générale des courbes de croissance obtenues peut être décomposée en trois phases de développement. Le modèle de croissance des CRs est sensiblement le même pour les trois lignées sélectionnées (Figure 8).

Les premiers jours de culture coïncident avec la phase de latence (**Baiza et al., 1998**) qui correspond à la phase d'adaptation des lignées aux conditions de culture. Après cette première phase, c'est la phase de croissance accélérée, qui s'étale jusqu'au 22^{ème} jour pour les lignées L_{DS} et L_{DI} et au 20^{ème} jour pour la lignée L_{DT} . Durant cette phase, les poids secs enregistrés sont respectivement de 0,218, 0,239 et 0,298 g par 50 ml de milieu de culture B5, sachant que la quantité de CRs introduite au départ dans chaque récipient est la même pour les trois lignées. La lignée L_{DT} montre une nette supériorité en terme de biomasse par rapport aux deux autres lignées.

La dernière phase, est la phase stationnaire de croissance caractérisée par un poids sec constant. Elle commence au 20^{ème} jour pour la lignée L_{DT} et au 22^{ème} jour pour les lignées L_{DS} et L_{DI} .

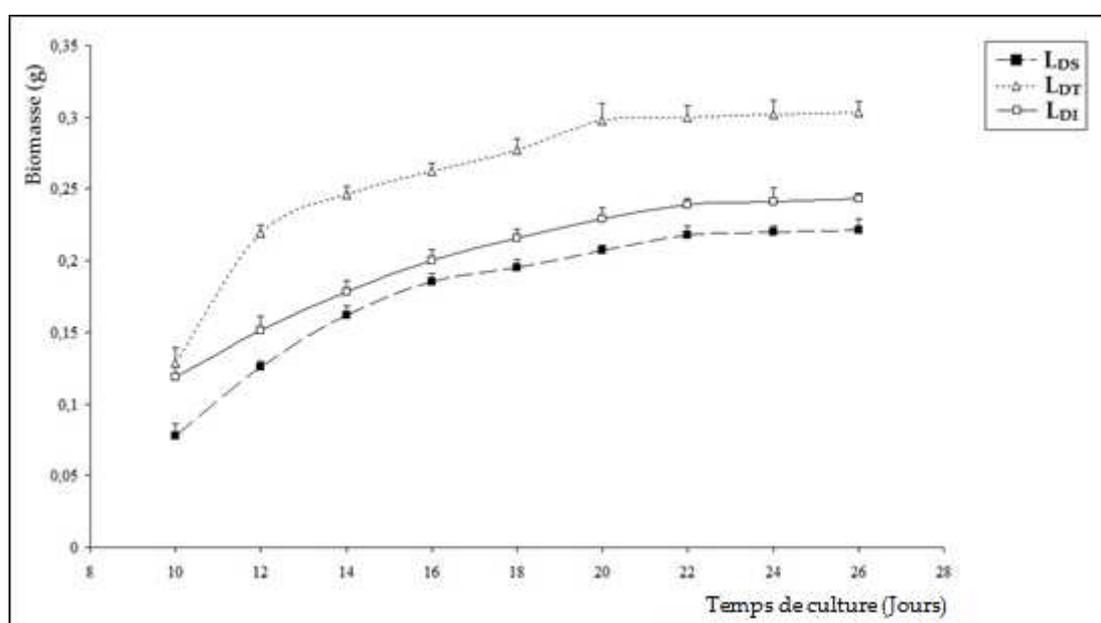


Figure 8 : Cinétique de croissance des CRs

La figure 9 illustre l'aspect de chacune des trois lignées sélectionnées et cultivées dans des Erlenmeyers, contenant le milieu B5 liquide, au 10^{ème}, 20^{ème} et 26^{ème} jour de culture.

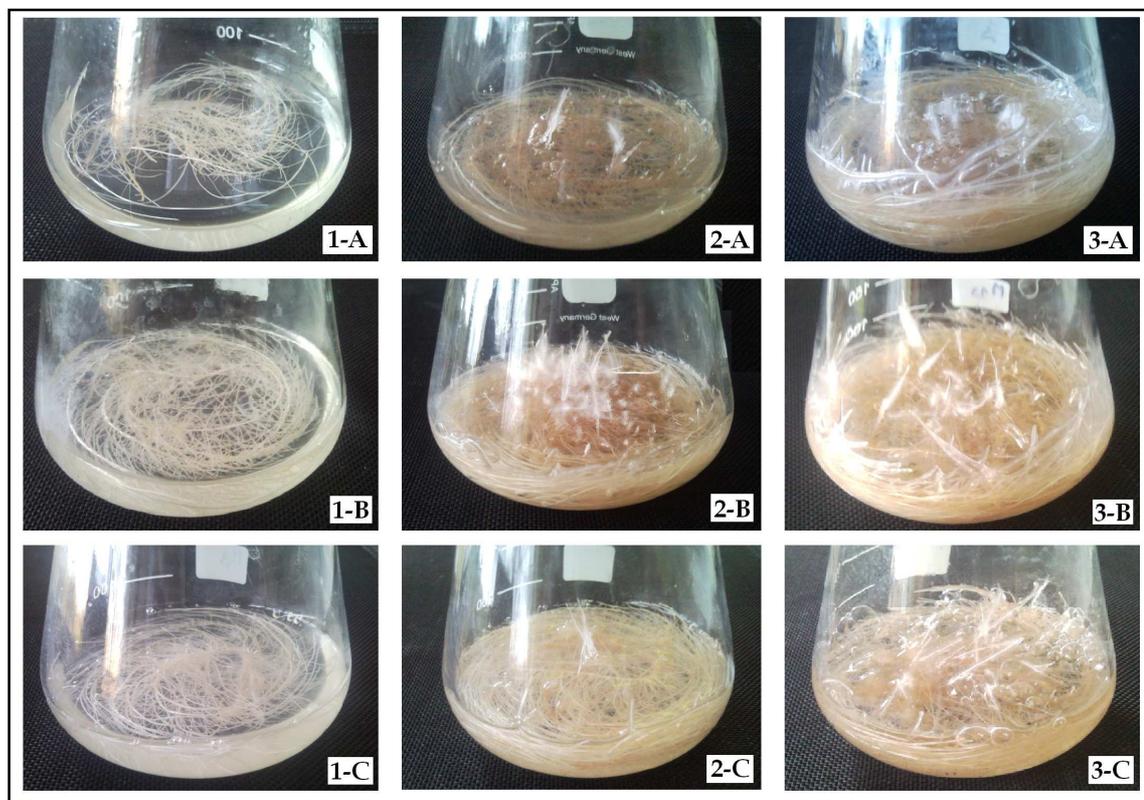


Figure 9 : Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide (G.=0.44x) ; 1 : 10 jours, 2 : 20 jours et 3 : 26 jours de culture
A : LDS, B : LDT et C : LDI

3.2 Evolution de la production de l'HS

Contrairement à la biomasse, où le modèle de croissance des CRs est comparable pour les trois lignées, l'accumulation de l'HS diffère entre les trois lignées étudiées (Figure 10).

Un pic d'accumulation de l'HS est enregistré au 22^{ème} jour pour les lignées LDS et LDT, par contre, pour la lignée LDI, l'accumulation de l'HS est relativement constante pendant tout le cycle (entre 2,4 et 3,15 mg/g M.S.), mais avec une légère augmentation au 20^{ème} jour de culture.

Pour les trois lignées étudiées, les pics de production de l'HS coïncident avec le début de la phase stationnaire de croissance des CRs, qui, elle-même coïncide avec l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. D'où les

diminutions des taux de l'HS pour les lignées L_{DS} et L_{DT} au-delà de 22 jours de culture.

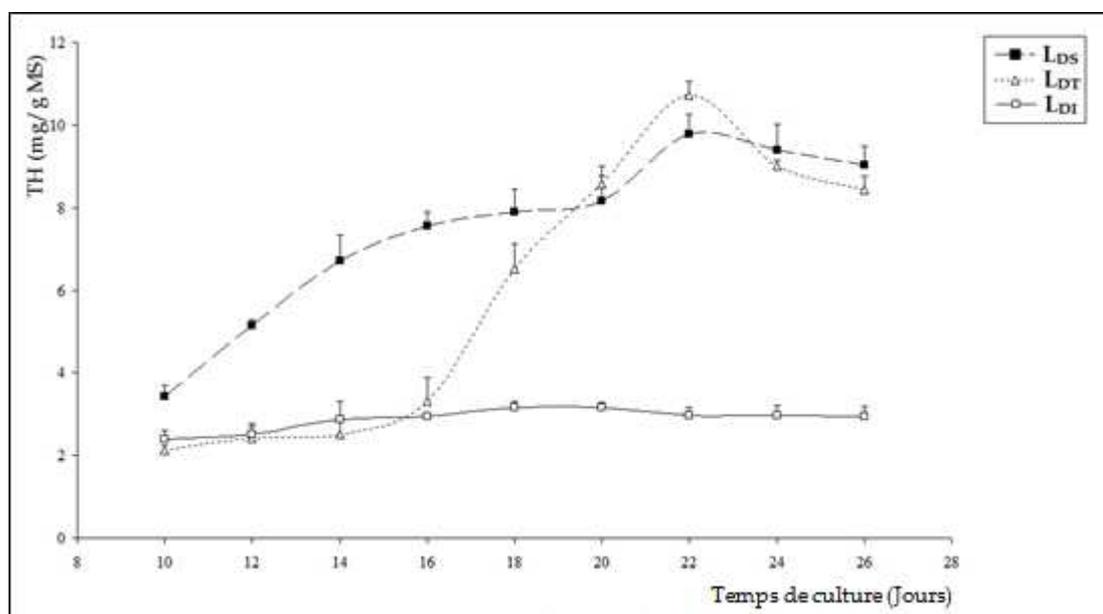


Figure 10 : Evolution de la TH des lignées retenues

3.3 Corrélation entre la biomasse et la TH

Le maximum de production de l'HS pour les lignées L_{DS} et L_{DT} est obtenu au 22^{ème} jour de culture. Il correspond à la phase stationnaire de croissance des CRs (Figure 11).

Pendant la phase active de croissance, la relation entre la croissance des CRs et l'accumulation de l'HS varie en fonction de la lignée racinaire. Elle est « linéaire » pour L_{DS} ($R^2 = 0.97$) et « exponentielle » pour L_{DT} ($R^2 = 0.71$). Pour la lignée L_{DI} , aucune relation claire n'a été définie entre la biomasse et la TH.

De plus, quand la biomasse atteint la phase stationnaire (20^{ème} jour de culture), le contenu en HS continue à augmenter pour L_{DT} , pour cette phase, cela suggère que la biosynthèse de l'HS est « inversement proportionnelle » à la croissance des CRs. Ce phénomène n'a pas été vérifié chez la lignée L_{DI} .

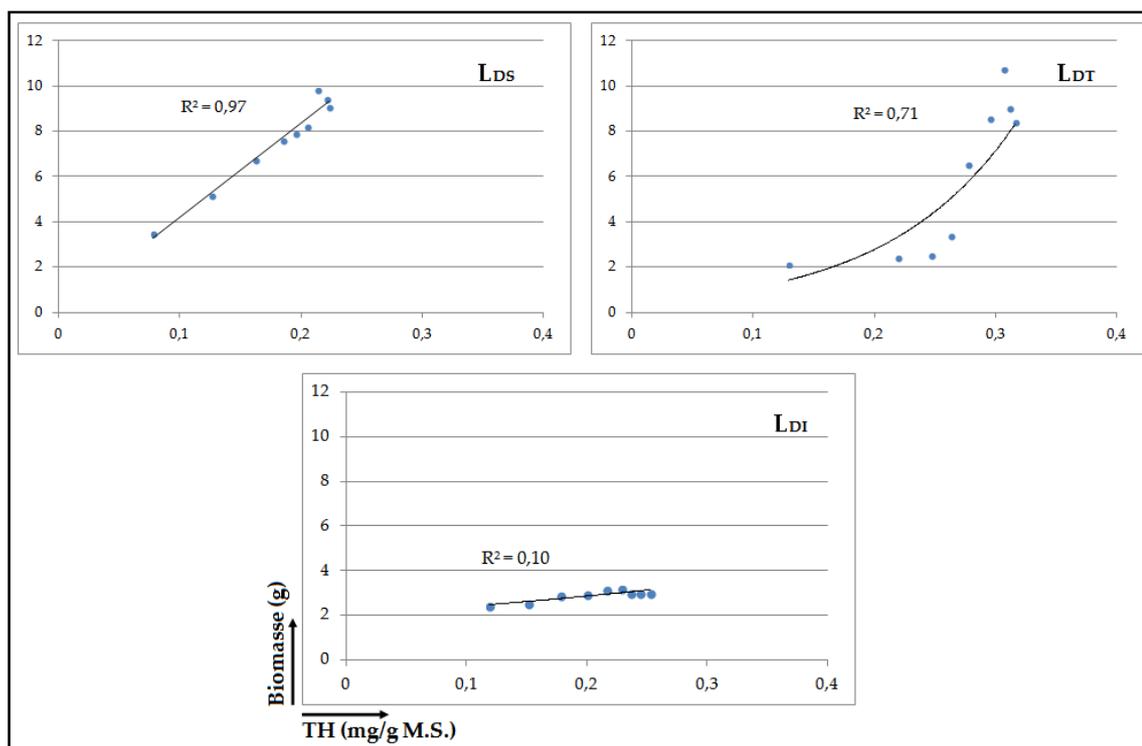


Figure 11 : Corrélations entre la biomasse et le contenu en HS des CRs

4 Effet de l'élicitation des CRs

4.1 Elicitation par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique

Le tableau 9 regroupe les résultats obtenus après l'élicitation avec les deux acides organiques (AS et AAS) et un temps d'élicitation de 24 heures des CRs précédemment sélectionnés pour les trois espèces de *Datura*.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de l'AS et l'AAS sur la TH des CRs (annexe 3). Le test de Tukey montre 5 groupes homogènes pour L_{DS}, 6 groupes homogènes pour L_{DT} et 7 groupes homogènes pour L_{DI}. Le groupe le plus intéressant est formé par la lignée L_{DT} élicité avec 10⁻⁴ M de l'AAS.

La teneur moyenne en HS de la lignée sélectionnée de *D. stramonium* (L_{DS}) passe de 8,16 mg/g M.S. (témoin) à 11,58 mg/g M.S. avec 10⁻⁴ M d'AAS (annexe 4), soit une amélioration de 1,42 fois. Les effets des deux éliciteurs testés sur la biomasse des CRs de L_{DS} ne sont pas significatifs. Cependant, à la concentration de 10⁻² M d'AAS une perte de biomasse (de 38%) est enregistrée.

La réponse de L_{DT} à l'élicitation par l'AS et l'AAS est positive pour les concentrations 10⁻⁴ et 10⁻⁵ M (facteurs d'amélioration de la TH supérieurs à 1) avec des teneurs en HS moyennes de 17,94 et 16,78 mg/g M.S. respectivement pour 10⁻⁴ M d'AAS et d'AS. Par contre, pour la concentration 10⁻² M d'AAS, le facteur d'amélioration n'est que de 0,47 ce qui correspond à une perte de production en HS par rapport au témoin correspondant.

Pour la L_{DI}, c'est avec la concentration 10⁻⁴ M d'AAS que la meilleure amélioration de la production de l'HS est obtenue avec une teneur de 8,89 mg/g M.S. et un facteur d'amélioration de 2,82.

En ce qui concerne la biomasse des CRs, nous avons enregistré une légère baisse des PS au niveau des CRs traités par rapport aux témoins correspondants. Cependant, pour certaines modalités, une petite amélioration du poids sec est notée, comme c'est le cas pour la lignée L_{DT} traitée avec 10⁻⁵ M d'AAS où le poids sec passe à 0,300 g par 50 ml de milieu de culture alors qu'avec le témoin il est de 0,295 g par 50 ml de milieu de culture B5 au 20^{ème} jour de culture.

Pour les trois lignées retenues, les baisses de biomasse les plus importantes sont respectivement de 37,56%, 20,33% et 19,21% pour les lignées L_{DS}, L_{DT} et L_{DI}. Ces pertes sont obtenues avec la même concentration de 10⁻² M et le même éliciteur (AAS).

Tableau 9 : Effet de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse et la TH des CRs

Lignées	Eliciteur	Concentration(M)	PS (g)	TH(mg/g MS)	Facteur d'amélioration	
					PS	TH
LDS	T	0	0,205±0,002	8,159±0,613 ^{CD}	-	-
	AS	10 ⁻²	0,173±0,010	6,840±0,503 ^D	0,84	0,84
		10 ⁻³	0,195±0,006	7,843±0,254 ^D	0,95	0,96
		10⁻⁴	0,206±0,004	10,577±0,433^{AB}	1,00	1,30
		10 ⁻⁵	0,203±0,003	9,305±0,622 ^{BC}	0,99	1,14
		AAS	10 ⁻²	0,128±0,003	2,868±0,534 ^E	0,62
	10 ⁻³		0,182±0,006	7,559±0,443 ^D	0,89	0,93
	10⁻⁴		0,199±0,002	11,578±0,176^A	0,97	1,42
	10 ⁻⁵		0,204±0,003	11,477±0,481 ^A	0,99	1,41
	LDT	T	0	0,295±0,006	8,575±0,442 ^E	-
AS		10 ⁻²	0,246±0,010	9,654±0,646 ^E	0,83	1,13
		10 ⁻³	0,277±0,004	11,413±0,737 ^D	0,94	1,33
		10⁻⁴	0,299±0,006	16,782±0,213^B	1,01	1,96
		10 ⁻⁵	0,296±0,006	14,014±0,242 ^C	1,00	1,63
		AAS	10 ⁻²	0,235±0,006	4,013±0,234 ^F	0,80
10 ⁻³			0,274±0,005	13,431±0,165 ^C	0,93	1,57
10⁻⁴			0,297±0,003	17,942±0,143^A	1,01	2,09
10 ⁻⁵			0,300±0,005	14,344±0,153 ^C	1,02	1,67
LDI		T	0	0,229±0,004	3,153±0,135 ^{EF}	-
	AS	10 ⁻²	0,191±0,006	2,661±0,401 ^F	0,83	0,84
		10 ⁻³	0,203±0,003	3,818±0,133 ^E	0,89	1,21
		10⁻⁴	0,239±0,002	6,607±0,095^C	1,04	2,10
		10 ⁻⁵	0,231±0,004	5,757±0,303 ^D	1,01	1,82
		AAS	10 ⁻²	0,185±0,005	1,763±0,223 ^G	0,81
	10 ⁻³		0,204±0,004	3,569±0,186 ^E	0,89	1,13
	10⁻⁴		0,233±0,004	8,890±0,292 ^A	1,01	2,82
	10 ⁻⁵		0,236±0,004	7,680±0,221 ^B	1,03	2,44

Le facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants) ; T : témoin ; PS : Poids sec ; TH : Teneur en hyoscyamine.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

4.2 Elicitation par le stress salin (KCl et CaCl₂)

La teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires sélectionnées varie de 3,985 à 16,978 mg/g de M.S. (tableau 10 ; annexe 4). Les teneurs en HS des lignées élicitées sont plus élevées que celles des témoins correspondant aux concentrations des deux sels de 0,5, 1 et 2 g/l. Cependant elles sont plus faibles que les témoins correspondants avec la concentration de 3 g/l du KCl et du CaCl₂. En effet, l'analyse de la variance révèle des effets très hautement significatifs (annexe 3) des deux sels sur la teneur en HS. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique de chaque lignée racinaire révèle :

- Pour la lignée L_{DS} avec le KCl : 7 groupes homogènes ;
- Pour la lignée L_{DT} avec le KCl : 10 groupes homogènes ;
- Pour la lignée L_{DI} avec le KCl : 10 groupes homogènes ;
- Pour la lignée L_{DS} avec le CaCl₂ : 9 groupes homogènes ;
- Pour la lignée L_{DT} avec le CaCl₂ : 9 groupes homogènes ;
- Pour la lignée L_{DI} avec le CaCl₂ : 8 groupes homogènes.

Les niveaux d'améliorations les plus intéressants, en fonction de la lignée, de la concentration du sel et du temps d'élicitation, varient de 1,99 à 2,32 fois par rapport aux témoins correspondants. Cependant, la teneur en HS la plus élevée est obtenue avec la lignée L_{DT}, la concentration de 2 g/l du CaCl₂ et un temps d'élicitation de 24 heures. Un taux d'amélioration de 2,07 fois par rapport au témoin est alors enregistré.

Concernant les PS des CRs, ils sont, d'une manière générale, plus faibles que les témoins, ce qui révèle un effet négatif du stress salin sur la croissance des racines transgéniques. Les PS les plus faibles, par lignée, sont de 0,100, 0,179 et 0,076 g obtenus respectivement avec L_{DS}, L_{DT} et L_{DI}, des pertes de 26,47%, 30,88% et 36,13% par rapport aux témoins correspondants sont enregistrées. Les pertes les plus élevées, en fonction de la lignée, sont obtenues avec un temps d'élicitation de 48 heures.

N.B. :L'étude de l'effet du stress salin (KCl et CaCl₂) sur la production de l'HS est réalisée à la fin de la deuxième année du présent travail (2011). Donc, les témoins et les courbes d'étalonnage sont réalisés aussi à la fin de la deuxième année, ils sont différents de ceux des autres parties de la présente étude ; réalisés à la fin de la première année universitaire (2010).

Travail encadré par nous-mêmes et soutenu par M. BEKHOUCHE M. en 2011 à l'E.N.S.A.

Tableau 10* : Effet de l'élicitation par le stress salin sur la biomasse et la TH des CRs

Sel	Temps d'élicitation	Concentration (g/l)	Poids sec (g)			Teneur en hyoscyamine (mg/g M.S.)			Facteur d'amélioration de la TH		
			L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}	L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}	L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}
KCl	10 h	0.5	0,137±0,007	0,257±0,049	0,117±0,004	5,369±0,098 ^F	8,287±0,186 ^J	8,391±0,268 ^F	1,03	1,01	1,22
		1	0,126±0,029	0,238±0,028	0,114±0,014	5,607±0,061 ^F	12,437±0,200 ^D	10,444±0,090 ^D	1,08	1,52	1,52
		2	0,124±0,012	0,235±0,008	0,102±0,018	6,005±0,049 ^{EF}	16,289±0,382^A	11,470±0,197 ^{BC}	1,15	1,99	1,67
		3	0,118±0,019	0,224±0,004	0,098±0,022	5,853±0,034 ^{EF}	11,253±0,326 ^{EF}	11,984±0,181 ^B	1,13	1,37	1,75
	24 h	0.5	0,130±0,020	0,227±0,009	0,113±0,012	8,327±0,208 ^C	8,815±0,055 ^{HJ}	11,030±0,286 ^{CD}	1,60	1,08	1,61
		1	0,132±0,007	0,221±0,009	0,109±0,007	9,941±0,262 ^B	13,582±0,114 ^C	11,628±0,180 ^{BC}	1,91	1,66	1,70
		2	0,120±0,016	0,206±0,015	0,108±0,008	12,074±0,138^A	14,659±0,256 ^B	12,651±0,342^A	2,32	1,79	1,85
		3	0,121±0,007	0,197±0,005	0,103±0,007	5,386±0,394 ^F	10,309±0,268 ^G	9,324±0,131 ^E	1,04	1,26	1,36
	48 h	0.5	0,112±0,023	0,211±0,015	0,105±0,013	6,942±0,110 ^D	9,175±0,274 ^H	11,363±0,176 ^{BC}	1,33	1,12	1,66
		1	0,109±0,007	0,208±0,012	0,103±0,012	8,027±0,699 ^C	11,525±0,217 ^E	9,651±0,106 ^E	1,54	1,41	1,41
		2	0,107±0,013	0,198±0,018	0,099±0,003	6,626±0,242 ^{DE}	10,787±0,316 ^{FG}	6,142±0,302 ^H	1,27	1,32	0,90
		3	0,100±0,004	0,179±0,006	0,090±0,010	4,189±0,460 ^G	8,941±0,241 ^{HI}	5,285±0,137 ^I	0,81	1,09	0,77
CaCl ₂	10 h	0.5	0,139±0,010	0,235±0,006	0,120±0,004	5,164±0,127 ^H	9,790±0,219 ^G	6,998±0,200 ^G	0,99	1,19	1,02
		1	0,136±0,008	0,230±0,031	0,114±0,012	9,517±0,206 ^{BC}	11,522±0,090 ^E	7,535±0,173 ^F	1,83	1,41	1,10
		2	0,125±0,027	0,228±0,006	0,115±0,013	10,828±0,261^A	12,368±0,139 ^D	8,375±0,153 ^E	2,08	1,51	1,22
		3	0,124±0,012	0,222±0,009	0,106±0,019	9,023±0,128 ^{CD}	13,520±0,135 ^C	9,284±0,204 ^D	1,73	1,65	1,36
	24 h	0.5	0,135±0,017	0,232±0,021	0,105±0,019	6,165±0,259 ^G	13,007±0,049 ^C	9,995±0,102 ^C	1,19	1,59	1,46
		1	0,134±0,009	0,224±0,006	0,101±0,023	10,017±0,093 ^B	16,096±0,101 ^B	12,697±0,242^A	1,93	1,96	1,85
		2	0,130±0,008	0,224±0,036	0,091±0,012	8,458±0,138 ^E	16,978±0,380^A	10,682±0,091 ^B	1,63	2,07	1,56
		3	0,122±0,017	0,203±0,014	0,088±0,020	4,777±0,235 ^H	10,954±0,183 ^F	7,892±0,117 ^F	0,92	1,34	1,15
	48 h	0.5	0,125±0,023	0,226±0,009	0,097±0,012	6,588±0,161 ^G	11,855±0,160 ^{DE}	11,015±0,077 ^B	1,27	1,45	1,61
		1	0,124±0,013	0,202±0,023	0,093±0,021	8,690±0,146 ^{DE}	10,275±0,134 ^G	7,493±0,151 ^F	1,67	1,25	1,09
		2	0,122±0,011	0,198±0,017	0,078±0,019	7,204±0,126 ^F	8,554±0,174 ^H	6,691±0,186 ^G	1,39	1,04	0,98
		3	0,108±0,009	0,189±0,011	0,076±0,017	3,985±0,248 ^I	7,329±0,148 ^I	5,412±0,120 ^H	0,77	0,89	0,79
Témoins			0,136±0,012	0,259±0,028	0,119±0,009	5,201±0,141	8,198±0,167	6,851±0,144	-	-	-

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *Datura stramonium*; L_{DT}: Lignée du *D. tatula*; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*. Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants); TH: Teneur en hyoscyamine.

* Travail encadré par nous-mêmes et soutenu par M. BEKHOUCHE M. en 2011 à l'E.N.S.A.

5 Effet de la perméabilisation des CRs

Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer les alcaloïdes dans le milieu de culture, différentes concentrations de Tween 20, comme agent de perméabilisation, sont utilisées.

Pour chaque lignée (L_{DS} , L_{DT} et L_{DI}) nous avons testé trois concentrations de Tween 20 (0,5%, 1% et 2%) avec un temps de perméabilisation de 24 heures. Le dosage de l'hyoscyamine est réalisé sur les chevelus racinaires perméabilisés (TH intracellulaire) et à partir des solutions nutritives épuisées (concentration en HS extracellulaire).

Les concentrations en HS des solutions nutritives varient de 13,965 à 40,588 mg/l de solution nutritive (tableau 11). Le test de Tukey révèle huit groupes homogènes dont le groupe le plus intéressant est représenté par la combinaison : lignée L_{DT} avec la concentration 1% de Tween 20.

La TH des CRs perméabilisés (tableau 12) nous renseigne sur la résistance des racines transgéniques à la perméabilisation avec le Tween 20. Pour les trois lignées retenues, la TH a chuté, d'une manière significative, par rapport aux témoins correspondants.

Cependant, c'est avec la lignée L_{DI} que nous avons notées TH intracellulaires les plus proches du témoin avec des rapports entre les valeurs des CRs traités et le témoin de la lignée L_{DI} de 0,71 à 0,84. Ce résultat est confirmé par les poids secs enregistrés, puisque les rapports des poids secs des CRs traités sur les témoins sont plus élevés pour L_{DI} (de 0,73 à 0,90) contrairement à L_{DS} et L_{DT} , respectivement avec les rapports de 0,45 à 0,65 et de 0,48 à 0,66.

Tableau 11: Effet du Tween 20 sur la biomasse des CRs et la concentration en HS de la solution nutritive (extracellulaire)

Lignée	Concentration du Tween 20	PS(g)	TH (mg/l S.N.)	Facteur d'évolution	
				PS	TH
L _{DS}	0,5 %	0,133±0,004	20,408±0,313 ^D	0,65	-
	1 %	0,106±0,004	22,491±0,346 ^C	0,52	-
	2 %	0,093±0,005	17,711±0,504 ^E	0,45	-
	Témoin (0)	0,205±0,002	0 ^H	1	-
L _{DT}	0,5 %	0,194±0,004	24,983±0,256 ^B	0,66	-
	1 %	0,163±0,005	40,588±0,267^A	0,55	-
	2 %	0,143±0,004	18,102±0,212 ^E	0,48	-
	Témoin (0)	0,295±0,006	0 ^H	1	-
L _{DI}	0,5 %	0,207±0,003	14,191±0,198 ^G	0,90	-
	1 %	0,185±0,004	16,828±0,205 ^F	0,81	-
	2 %	0,167±0,004	13,965±0,156 ^G	0,73	-
	Témoin (0)	0,229±0,004	0 ^H	1	-

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants).

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

Tableau 12: Effet du Tween 20 sur la biomasse et la TH des CRs (intracellulaire)

Lignée	Concentration du Tween 20	PS(g)	TH (mg/g M.S.)	Facteur d'évolution	
				PS	TH
L _{DS}	0,5 %	0,133±0,004	1,489±0,052 ^D	0,65	0,18
	1 %	0,106±0,004	1,384±0,085 ^D	0,52	0,17
	2 %	0,093±0,005	1,130±0,113 ^D	0,45	0,14
	Témoin (0)	0,205±0,002	8,159±0,613 ^A	1	1
L _{DT}	0,5 %	0,194±0,004	1,922±0,254 ^{CD}	0,66	0,22
	1 %	0,163±0,005	1,598±0,424 ^D	0,55	0,19
	2 %	0,143±0,004	1,424±0,403 ^D	0,48	0,17
	Témoin (0)	0,295±0,006	8,575±0,442 ^A	1	1
L _{DI}	0,5 %	0,207±0,003	2,656±0,535 ^{BC}	0,90	0,84
	1 %	0,185±0,004	2,300±0,484 ^C	0,81	0,73
	2 %	0,167±0,004	2,236±0,362 ^C	0,73	0,71
	Témoin (0)	0,229±0,004	3,153±0,135 ^B	1	1

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants).

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

6 Effet combiné de l'élicitation (AS et AAS) et de la perméabilisation (Tween20)

De l'ensemble des résultats de l'effet de la perméabilisation des CRs sur la TH des lignées racinaires et sur la concentration en HS de la solution nutritive, il

ressort clairement que la concentration de 1% de Tween 20 est la plus intéressante, nous l'avons combinée avec quatre concentrations des deux acides organiques (AS et AAS) à savoir 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} M pour étudier l'effet combiné de l'élicitation et de la perméabilisation sur la biomasse et la TH des CRs et de la solution nutritive.

Les concentrations en HS des solutions nutritives varient de 8,474 à 87,667 mg/l de solution nutritive (tableau 13). L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif (annexe 3) des traitements sur la concentration en HS de la solution nutritive et la TH des chevelus racinaire élicités et perméabilisés. Le test de Tukey révèle, au totale, 21 groupes homogènes pour la concentration en HS de la solution nutritive, le groupe homogène le plus intéressant (A) est représenté par la combinaison :

(L_{DT} * 1% Tween 20 * 10^{-4} M d'AAS).

Le groupe homogène le moins intéressant (U) est représenté par les deux combinaisons :

(L_{DS} * 1% Tween 20 * 10^{-2} M d'AAS) avec la concentration de 9,022 mg/l S.N ;
(L_{DI} * 1% Tween 20 * 10^{-2} M d'AS) avec la concentration de 8,474 mg/l S.N.

Les TH intracellulaires obtenues après élicitation et perméabilisation des CRs (Tableau 14) sont significativement inférieures aux TH des témoins correspondants, elles varient de 1,074 à 8,159 mg/g M.S. (témoin) pour L_{DS}, de 1,758 à 8,575 mg/g M.S. (témoin) pour L_{DT} et de 1,833 à 3,153 mg/g M.S. (témoin) pour L_{DI}. Les taux de pertes de la TH intracellulaires les moins importants sont obtenus avec la lignée L_{DI}, ils varient de 21,85% à 41,86%.

Comme pour les TH intracellulaires, les PS des CRs traités sont significativement inférieurs aux témoins correspondants. Ils passent de 0,085 à 0,205 g (témoin) pour L_{DS}, de 0,117 à 0,295 g (témoin) pour L_{DT} et de 0,099 à 0,229 g (témoin) pour L_{DI}. Les poids secs les plus faibles, par lignée, sont obtenus avec la concentration 10^{-2} M de l'éliciteur.

Par rapport aux résultats de la partie précédente (effet de la perméabilisation des CRs sans élicitation), le résultat de la concentration en l'HS de la solution nutritive le plus intéressant est obtenu avec la lignée L_{DT}, 1% de Tween 20 et sans élicitation, qui passe de 40,588 mg/l S.N. à 87,667 mg/l S.N. (annexe 4) suite

à l'élicitation avec 10^{-4} M d'AAS. Une amélioration du meilleur résultat de la perméabilisation des CRS sans élicitation de 2,16 fois est notée après avoir combiné la perméabilisation des CRS et l'élicitation de la production de l'HS.

Tableau 13 : Effet de la combinaison du Tween 20 et de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse des CRS et la concentration en HS de la solution nutritive (extracellulaire)

Lignée	Eliciteur + 1% T20	Concentration Eliciteur (M)	PS (g)	TH (mg/l S.N.)	Facteur d'évolution		
					PS	TH	
L _{DS}	AS	10 ⁻²	0,085±0,005	15,720±0,163	0,80	0,70	
		10 ⁻³	0,094±0,003	20,578±0,375	0,89	0,91	
		10 ⁻⁴	0,105±0,003	24,752±0,237	0,99	1,10	
		10 ⁻⁵	0,109±0,003	24,776±0,211	1,03	1,10	
	AAS	10 ⁻²	0,087±0,004	9,022±0,118 ^U	0,82	0,40	
		10 ⁻³	0,098±0,003	21,854±0,144	0,92	0,97	
		10 ⁻⁴	0,108±0,002	31,934±0,236	1,02	1,42	
		10 ⁻⁵	0,111±0,004	23,968±0,243	1,05	1,06	
	Témoin *			0,106±0,004	22,491±0,346	1	1
	L _{DT}	AS	10 ⁻²	0,117±0,004	36,695±0,234	0,72	0,90
10 ⁻³			0,156±0,005	48,162±0,252	0,96	1,19	
10 ⁻⁴			0,191±0,002	74,103±0,276	1,17	1,82	
10 ⁻⁵			0,194±0,002	68,294±0,323	1,19	1,68	
AAS		10 ⁻²	0,167±0,003	36,014±0,250	1,02	0,89	
		10 ⁻³	0,177±0,004	55,212±0,153	1,08	1,36	
		10 ⁻⁴	0,199±0,002	87,667±0,456^A	1,22	2,16	
		10 ⁻⁵	0,201±0,003	66,498±0,289	1,23	1,64	
Témoin*			0,163±0,005	40,588±0,267	1	1	
L _{DI}		AS	10 ⁻²	0,099±0,002	8,474±0,118 ^U	0,53	0,50
	10 ⁻³		0,118±0,003	16,193±0,101	0,64	0,96	
	10 ⁻⁴		0,179±0,004	27,958±0,159	0,97	1,66	
	10 ⁻⁵		0,182±0,005	21,990±0,197	0,98	1,31	
	AAS	10 ⁻²	0,098±0,004	15,098±0,175	0,53	0,90	
		10 ⁻³	0,131±0,003	18,775±0,125	0,71	1,11	
		10 ⁻⁴	0,190±0,004	30,176±0,138	1,03	1,79	
		10 ⁻⁵	0,192±0,003	21,608±0,165	1,04	1,28	
	Témoin*			0,185±0,004	16,828±0,205	1	1

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

Témoin* : Milieu B5 + 1% de T20 sans éliciteurs ;

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins* correspondants) ;

PS : Poids sec ; TH : Teneur en hyoscyamine.

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

Tableau 14 : Effet de la combinaison du Tween 20 et de l'élicitation par l'AS et l'AAS sur la biomasse et la TH des CRs (intracellulaire)

Lignée	Eliciteur + 1% T20	Concentration Eliciteur (M)	PS(g)	TH (mg/gM.S.)	Facteur d'évolution		
					PS	TH	
L _{DS}	AS	10 ⁻²	0,085±0,005	1,172±0,065	0,41	0,14	
		10 ⁻³	0,094±0,003	1,182±0,076	0,46	0,14	
		10 ⁻⁴	0,105±0,003	1,367±0,122	0,51	0,17	
		10 ⁻⁵	0,106±0,003	1,295±0,091	0,52	0,16	
	AAS	10 ⁻²	0,085±0,004	1,074±0,087	0,41	0,13	
		10 ⁻³	0,094±0,003	1,111±0,053	0,46	0,14	
		10 ⁻⁴	0,108±0,002	1,338±0,185	0,53	0,16	
		10 ⁻⁵	0,107±0,004	1,301±0,143	0,52	0,16	
	Témoin			0,205±0,002	8,159±0,613 ^A	1	1
	L _{DT}	AS	10 ⁻²	0,117±0,004	1,758±0,072	39,66	0,20
			10 ⁻³	0,156±0,005	1,907±0,154	52,88	0,22
			10 ⁻⁴	0,191±0,002	2,268±0,298	64,75	0,26
10 ⁻⁵			0,194±0,002	2,171±0,291	65,76	0,25	
AAS		10 ⁻²	0,167±0,003	1,632±0,104	0,57	0,19	
		10 ⁻³	0,177±0,004	1,955±0,107	0,60	0,23	
		10 ⁻⁴	0,199±0,002	2,606±0,215	0,67	0,30	
		10 ⁻⁵	0,201±0,003	2,231±0,093	0,68	0,26	
Témoin			0,295±0,006	8,575±0,442 ^A	1	1	
L _{DI}		AS	10 ⁻²	0,099±0,002	1,833±0,254	43,23	0,58
			10 ⁻³	0,118±0,003	2,038±0,224	51,53	0,65
			10 ⁻⁴	0,179±0,004	2,336±0,185	78,17	0,74
	10 ⁻⁵		0,182±0,005	2,244±0,183	79,48	0,71	
	AAS	10 ⁻²	0,099±0,004	1,960±0,137	0,43	0,62	
		10 ⁻³	0,131±0,003	2,128±0,181	0,57	0,67	
		10 ⁻⁴	0,190±0,004	2,486±0,151	0,83	0,79	
		10 ⁻⁵	0,192±0,003	2,372±0,253	0,84	0,75	
	Témoin			0,229±0,004	3,153±0,135 ^B	1	1

L_{DS} : Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT} : Lignée du *D. tatula* ; L_{DI} : Lignée du *D. innoxia*.

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants) ;

PS : Poids sec ; TH : Teneur en hyoscyamine.

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

7 Effet combiné du temps de l'élicitation et de la concentration de l'AS et l'AAS

Les résultats obtenus après élicitation des CRs sélectionnés à différents temps d'élicitation (2, 4, 6 et 8 jours), à différentes concentrations (10⁻⁴ M, 10⁻⁶ M et 10⁻⁸ M) et par les deux acides organiques (AS et AAS) sont détaillés dans le tableau 15.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de la combinaison du temps d'élicitation et de la concentration des éliciteurs (AS et AAS) sur la TH des CRs (annexe 3). Le test de Tukey montre 12 groupes homogènes pour L_{DS} , 15 groupes homogènes pour L_{DT} et 13 groupes homogènes pour L_{DI} . Les combinaisons les plus importantes (A), par lignée et en fonction de la TH des CRs, sont respectivement:

($L_{DS} * 10^{-8}$ M d'AS * 6 jours d'élicitation), TH de 13,051 mg/g M.S.
 ($L_{DT} * 10^{-8}$ M d'AAS * 8 jours d'élicitation), TH de 21,959 mg/g M.S.
 ($L_{DI} * 10^{-6}$ M d'AAS * 8 jours d'élicitation), TH de 10,897 mg/g M.S.

Pour la lignée L_{DI} , toutes les modalités étudiées ont induit une amélioration de la TH par rapport au témoin (tous les rapports sont supérieurs à 1).

Pour la lignée L_{DT} , c'est uniquement avec la combinaison (10^{-4} M d'AS * 8 jours d'élicitation) que nous avons enregistré une baisse de la TH avec un facteur inférieur à 1 (0,62), pour cette combinaison la TH est de 5,319 mg/g M.S., une perte de 37,97%, par rapport au témoin est alors notée. C'est avec la combinaison ($L_{DT} * 10^{-8}$ M d'AAS * 8 jours d'élicitation) que nous avons enregistré la TH la plus élevée (21,959 mg/g M.S.; annexe 4), cela pour l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de recherche, le facteur d'amélioration obtenu est alors de 2,56 fois.

Par contre, pour la lignée L_{DS} , les facteurs d'évolution de la TH sont supérieurs à 1 pour 15 modalités et inférieurs à 1 pour 9 modalités. La perte la plus élevée est obtenue avec les deux combinaisons (10^{-4} M d'AS * 8 jours d'élicitation) et (10^{-4} M d'AAS * 8 jours d'élicitation) elle est d'environ 40% et le facteur d'amélioration le plus intéressant est de 1,60 fois.

Ce qui est notable pour cette partie d'étude, c'est que les PS obtenus pour les CRs aux teneurs en hyoscyamine élevées sont supérieurs aux PS des témoins correspondants. Le PS de la lignée L_{DS} avec la TH la plus importante est de 0,287 g, il est 1,4 fois plus élevé que le témoin correspondant et pour L_{DT} est de 0,339 g, il est 1,15 fois plus élevé que le témoin correspondant.

Les PS les plus élevés sont obtenus, en fonction de la lignée, avec les combinaisons suivantes :

($L_{DS} * 10^{-8}$ M d'AS * 8 jours d'élicitation) : 0,299 g ;
 ($L_{DT} * 10^{-6}$ M d'AS * 6 jours d'élicitation) : 0,398 g ;
 ($L_{DI} * 10^{-8}$ M d'AS * 8 jours d'élicitation) : 0,363 g.

Tableau 15: Effet de la combinaison du temps de l'élicitation et la concentration en AS et AAS sur la biomasse et la TH des CRs

Eliciteurs	Temps d'élicitation	Concentration (M)	Poids sec (g)			Teneur en hyoscyamine (mg/g MS)			Facteur d'amélioration		
			L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}	L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}	L _{DS}	L _{DT}	L _{DI}
AS	2 jours	10 ⁻⁴	0,294±0,005	0,338±0,020	0,324±0,006	11,165±0,472	17,787±0,593	6,136±0,125	1,37	2,07	1,95
		10 ⁻⁶	0,273±0,006	0,300±0,006	0,300±0,003	9,776±0,323	12,340±0,484	4,844±0,346	1,20	1,44	1,54
		10 ⁻⁸	0,217±0,005	0,291±0,005	0,285±0,008	8,623±0,423	10,594±0,224	3,465±0,297 ^{LM}	1,06	1,23	1,10
	4 jours	10 ⁻⁴	0,257±0,011	0,264±0,007	0,291±0,007	6,794±0,212	15,250±0,371	6,524±0,252	0,83	1,78	2,07
		10 ⁻⁶	0,293±0,003	0,299±0,008	0,355±0,011	10,867±0,163	19,125±0,307	7,148±0,292	1,33	2,23	2,27
		10 ⁻⁸	0,242±0,005	0,312±0,005	0,318±0,006	9,121±0,273	13,952±0,526	5,767±0,361	1,12	1,63	1,83
	6 jours	10 ⁻⁴	0,182±0,006	0,224±0,009	0,225±0,007	6,411±0,512	14,027±0,373	4,794±0,303	0,78	1,63	1,52
		10 ⁻⁶	0,280±0,002	0,318±0,010	0,308±0,008	9,868±0,543	20,541±0,395	6,724±0,422	1,21	2,39	2,13
		10 ⁻⁸	0,287±0,004	0,398±0,012	0,305±0,006	13,051±0,883^A	14,230±0,314	7,127±0,294	1,60	1,66	2,26
	8 jours	10 ⁻⁴	0,156±0,005	0,202±0,005	0,193±0,013	4,906±0,342 ^L	5,319±0,333 ^O	4,543±0,241	0,60	0,62	1,44
		10 ⁻⁶	0,247±0,007	0,237±0,007	0,240±0,007	6,156±0,552	8,869±0,254	5,641±0,233	0,75	1,03	1,79
		10 ⁻⁸	0,299±0,003	0,320±0,008	0,363±0,011	9,963±0,396	10,013±0,352	6,754±0,437	1,22	1,17	2,14
AAS	2 jours	10 ⁻⁴	0,246±0,006	0,340±0,004	0,303±0,006	7,917±0,374	13,219±0,343	4,004±0,236	0,97	1,54	1,27
		10 ⁻⁶	0,220±0,012	0,306±0,006	0,292±0,005	10,830±0,313	13,578±0,382	5,272±0,276	1,32	1,58	1,67
		10 ⁻⁸	0,197±0,009	0,298±0,003	0,239±0,004	8,490±0,362	11,150±0,492	4,167±0,113	1,04	1,30	1,32
	4 jours	10 ⁻⁴	0,200±0,006	0,274±0,006	0,289±0,006	6,447±0,314	11,199±0,136	5,950±0,194	0,79	1,31	1,89
		10 ⁻⁶	0,258±0,005	0,303±0,005	0,339±0,004	11,727±0,405	14,885±0,495	8,502±0,295	1,44	1,73	2,70
		10 ⁻⁸	0,242±0,006	0,320±0,008	0,327±0,006	10,001±0,455	13,398±0,757	5,785±0,347	1,22	1,56	1,83
	6 jours	10 ⁻⁴	0,144±0,006	0,263±0,007	0,211±0,007	5,000±0,421 ^L	9,703±0,203	7,136±0,281	0,61	1,13	2,26
		10 ⁻⁶	0,216±0,007	0,374±0,021	0,307±0,007	8,562±0,325	17,508±0,344	8,279±0,214	1,05	2,04	2,62
		10 ⁻⁸	0,257±0,004	0,385±0,009	0,350±0,008	10,576±0,423	16,995±0,547	5,919±0,403	1,30	1,98	1,88
	8 jours	10 ⁻⁴	0,123±0,005	0,216±0,004	0,185±0,006	4,935±0,321 ^L	9,619±0,422	8,087±0,263	0,60	1,12	2,56
		10 ⁻⁶	0,185±0,006	0,239±0,009	0,219±0,007	8,117±0,452	15,449±0,501	10,897±0,424^A	0,99	1,80	3,46
		10 ⁻⁸	0,290±0,003	0,339±0,006	0,361±0,004	11,044±0,324	21,959±0,671^A	9,418±0,245	1,35	2,56	2,99
Témoins			0,205±0,002	0,295±0,006	0,229±0,004	8,159±0,613	8,575±0,442	3,153±0,135 ^M	1	1	1

L_{DS}: Lignée sélectionnée du *D. stramonium* ; L_{DT}: Lignée du *D. tatula* ; L_{DI}: Lignée du *D. innoxia*.

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

Facteur d'amélioration = (chevelus racinaires traités / témoins correspondants).

8 Etablissement de procédés de production de l'hyoscyamine *in-vitro*

De l'ensemble des résultats obtenus, deux procédés, englobant les modalités de production de l'HS *in-vitro* les plus intéressantes, sont retenus. Ces deux procédés biotechnologiques sont proposés sur la base de la conduite probable de la culture *in-vitro*; le premier en système de culture discontinu et le deuxième en système de culture semi-continu.

La première partie, qui consiste à l'obtention de lignées racinaires performantes, est commune aux deux procédés de production de l'HS *in-vitro*.

Il ressort clairement, des résultats de la recherche, que la lignée L_{DT} obtenue moyennant les plantules étiolées est plus intéressante par rapport aux deux autres lignées sélectionnées. Les étapes et les modalités clés de la première partie (figure 12) des deux procédés sont :

- Espèce à retenir en priorité : *Datura tatula* ;
- Vitrosemis étiolés (cultivés dans les conditions de culture d'obscurité totale);
- Transformation par souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* ;
- Sélection des lignées, issus du *D. tatula* en fonction de la TH et de la biomasse ;
- Entretien des lignées retenues sur milieu B5 semi-solide ;
- Rythme de multiplication : 1 fois tous les 20 jours.

8.1 En système discontinu

En système de culture discontinu, l'HS est extraite à partir des CRs (intracellulaire), et cela après arrêt de la culture et destruction du matériel végétal. Les étapes et les modalités clés de la deuxième partie du système de culture en discontinu (Figure 12) sont :

- Milieu de culture B5 liquide ;
- Elicitation avec l'AAS ;
- Concentration de l'éliciteur : 10^{-8} M ;
- Temps d'élicitation : 8 jours ;
- Temps totale de culture : 20 jours ;
- Extraction de l'HS à partir des CRs.

8.2 En système semi-continu

En système de culture semi-continu, l'HS est extraite à partir de la solution nutritive épuisée (extracellulaire), ce qui permet de garder les CRs viables et renouveler le milieu de culture pour d'autres extractions extracellulaires. Les étapes et les modalités clés de la deuxième partie du système de culture en semi-continu (Figure 12) sont :

- Milieu de culture B5 liquide ;
- Eliciteur : AAS ;
- Concentration de l'éliciteur : 10^{-4} M ;
- Temps d'élicitation : 48 heures ;
- Agent de perméabilisation : Tween 20 ;
- Concentration de Tween 20 : 1% ;
- Temps de perméabilisation : 24 heures (avant la récolte) ;
- Temps minimal de culture avant de renouveler le milieu de culture : 20 jours ;
- Extraction de l'HS à partir de la solution nutritive.

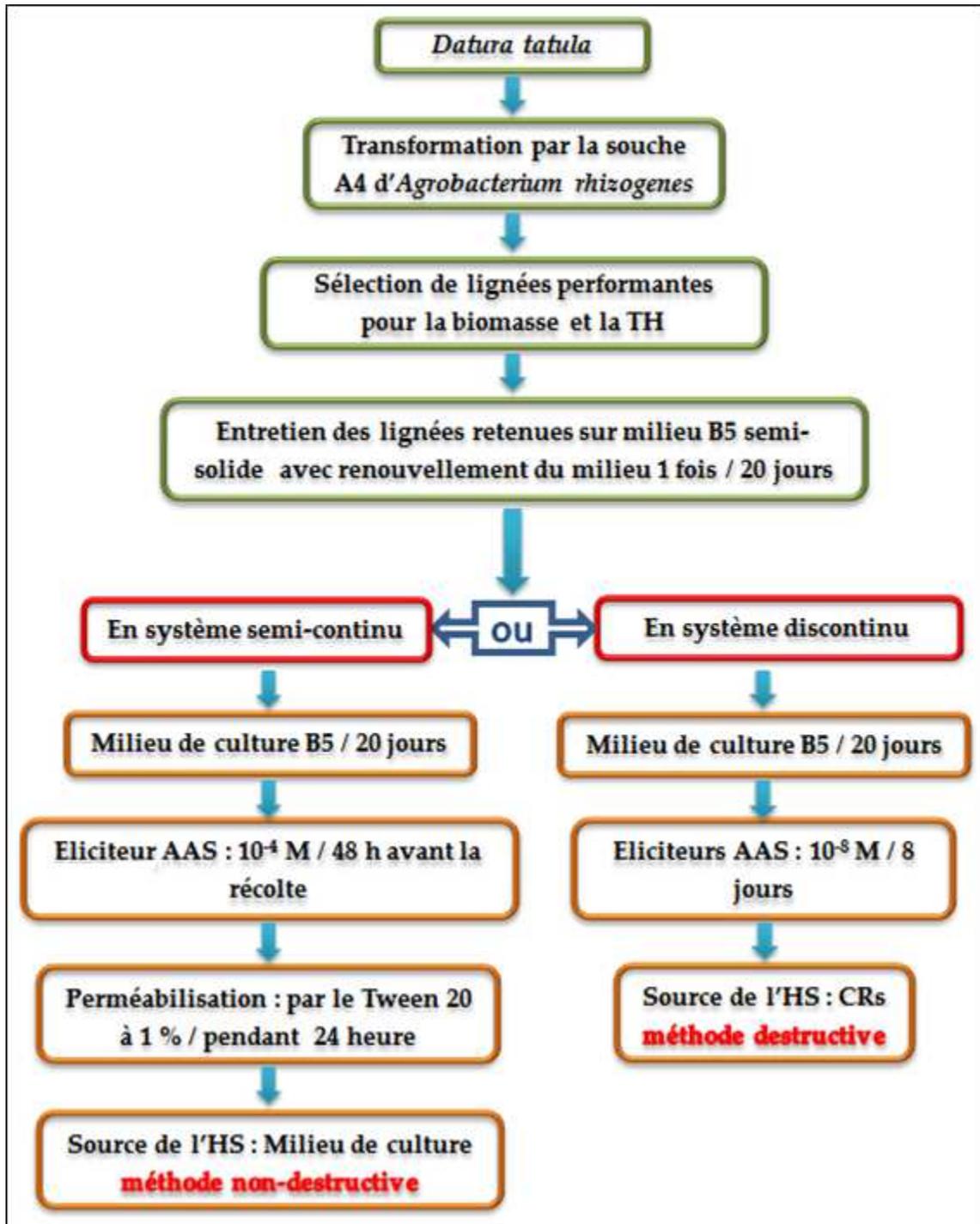


Figure 12 : Procédés de production de l'hyoscyamine *in-vitro*

DISCUSSION DES RESULTATS

1 Mise en place de lignées de CRs performantes

Le développement des cultures de tissus végétaux génétiquement transformés et principalement des CRs induit par l'*Agrobacterium rhizogenes* est une étape clé dans l'utilisation des cultures *in-vitro* pour la production de métabolites secondaires (Bensaddek *et al.*, 2008). Sachant que les lignées racinaires sont uniques, l'optimisation de la transformation par l'*A. rhizogenes* constitue une étape incontournable pour la sélection des lignées performantes.

Maldonado-Mendoza *et al.* (1993) ont mis en évidence une grande variabilité génétique au niveau du taux de croissance et du contenu alcaloïdique entre les lignées racinaires du *Datura stramonium*. Cette variabilité serait due au fait que le site d'intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte ainsi que le nombre de copies insérées sont complètement aléatoires. Ceci se traduirait par des différences considérables aussi bien au niveau de la croissance des lignées racinaires qu'au niveau de l'accumulation des métabolites secondaires même lorsqu'elles sont issues d'un même événement de transformation (Zhi-Bi et Min, 2006 ; Georgiev *et al.*, 2007). Ces résultats confortent notre stratégie qui consistait à induire le maximum de racines transformées pour augmenter la probabilité de sélectionner des lignées hautement performantes.

Les vitrosemis étiolés sont caractérisés par une absence de chlorophylle dans les tissus et par une elongation démesurée de la plantule (Donald et Fosket, 1994). La lumière est un facteur primordial pour la croissance, le développement et la réponse aux stress des plantes. La cellule végétale est équipée de mécanismes «lumière-signal» localisés au sein du chloroplaste qui est impliqué dans les relations de défense de la plante. La perception de la lumière et la réponse aux stress pourraient fonctionner et agir ensemble pour former un réseau de défense des plantes (Karpinski *et al.*, 2003). Selon Yaeno *et al.* (2004) les acides gras triénoïques de la membrane lipidique du chloroplaste sont décisifs pour l'adaptation aux stress et ont un rôle important dans la régulation de la défense de la plante contre les agressions externes (stress biotiques et stress abiotiques).

En effet, l'amélioration des résultats de l'induction des CRs par l'*A. rhizogenes*, suite à l'étiollement des vitroplants, peut être expliquée par la fragilité des vitroplants étiolés, ils sont plus sensibles aux agressions microbiennes que les non étiolés. Cette sensibilité induirait une réponse plus favorable à la transformation par l'*A. rhizogenes*.

Par ailleurs, chez les plantes entières spontanées de *D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia*, les teneurs moyennes en hyoscyamine sont respectivement de 0,67, 0,73 et 0,27 mg/g MS (Houmani et Cosson, 2000). En outre, les teneurs moyennes en HS des CRs de ces mêmes espèces sont de 5,6 mg/g M.S., 2,91 mg/g M.S. et 1,72 mg/g M.S. respectivement chez *D. stramonium* (Altabella et al., 1994), *D. tatula* (Harfi et al., 2011) et *D. innoxia* (Shimomura et al., 1991).

Les trois lignées sélectionnées dans le cadre de la présente thèse montrent ainsi deux niveaux d'amélioration de la TH par rapport à la plante entière avec 12,2, 11,8 et 11,7 fois respectivement pour *D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia*, et par rapport aux CRs obtenus de ces mêmes espèces et cités dans la bibliographie avec des facteurs d'amélioration respectivement de 1,5, 2,9 et 1,8 fois. Ceci montre à quel point nos lignées sont performantes par rapport à celles rapportées dans la littérature.

2 Cinétique de croissance des CRs

Les résultats de la cinétique de croissance des CRs montrent, sensiblement, le même modèle de croissance pour les trois lignées sélectionnées. Ces résultats correspondent à ceux de De Sapio (1976) et Baiza et al. (1998). Les premiers jours de culture coïncident avec la phase de latence (Baiza et al., 1998) qui correspond à l'adaptation des CRs à leur nouvel environnement et est caractérisée par un poids de la matière sèche faible et constant.

Selon Baiza et al. (1998), la phase de croissance accélérée correspond au début du développement des méristèmes des racines latérales (proximales et distales) et s'arrête quand ces racines secondaires atteignent leur taille maximale. Selon les mêmes auteurs, la phase de croissance stationnaire commence quand les racines latérales ont la même taille que les racines primaires, mais les racines latérales ne développent pas de zones méristématiques intercalaires ou de nouvelles racines latérales (tertiaires).

De même, la phase stationnaire de croissance peut être expliquée par l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture.

Contrairement à la biomasse, les modèles de production des alcaloïdes changent quantitativement et qualitativement en fonction de la lignée racinaire choisie, et donc en fonction de l'espèce aussi (Baiza et al., 1998). La variabilité

entre les lignées racinaires est due au positionnement de l'ADN-T du plasmide Ri inséré sur le chromosome de la cellule végétale, la longueur et le nombre de copies de l'ADN-T intégré dans le génome (Mano *et al.*, 1989), mais aussi, aux effets génétiques du matériel végétal d'origine (Baiza *et al.*, 1998).

Maldonado-Mendoza *et al.* (1992) ont obtenu un pic de production de l'HS entre le 35^{ème} et le 40^{ème} jour de culture pour la lignée G et entre le 30^{ème} et le 35^{ème} jour de culture pour la lignée T de *D. stramonium*. Comme dans notre étude, ces teneurs en HS sont obtenues pendant les phases stationnaires de croissance des CRs. La phase correspondant à la chute de l'accumulation de l'HS coïncide avec l'utilisation de ce même métabolite comme source d'azote par les CRs lorsque le milieu se trouve dépourvue en cet élément (Heldt, 2005).

Amdoun *et al.* (2009) et Baiza *et al.* (1998) ont noté des relations entre la biomasse et la production de l'HS similaires à celles que nous avons montrées dans le présent travail de recherche. Cette relation entre la biomasse et la productivité des métabolites secondaires est également observée chez les cultures de racines non transgéniques (Baiza *et al.*, 1998) ainsi que chez les cultures cellulaires (Hall et Yeoman, 1986).

La relation entre la cinétique de croissance des chevelus racinaires et le pic de l'accumulation de l'HS sont inversement proportionnels. Ce phénomène peut être expliqué par un rapport inversement proportionnel entre l'indice des divisions cellulaires (activité mitotique) et la production des alcaloïdes (Baiza *et al.*, 1998).

3 Evolution de la TH des CRs et de la solution nutritive

Afin d'établir un procédé de production de l'HS *in-vitro*, en plus de la sélection des lignées performantes, deux principales stratégies ont été adoptées :

- Elicitation de la production de l'HS des CRs, soit par des molécules signales des réactions de défense des plantes (AS et AAS) ou par des éliciteurs abiotiques (KCl et CaCl₂) ;
- Perméabilisation des CRs avec le Tween 20, dont le but de produire l'HS en système de culture semi-continu, donc extraire l'HS à partir de la solution nutritive.

3.1 Elicitation par l'AS et AAS de la TH

Le tableau 16 résume les résultats, de l'élicitation avec l'AS et AAS pendant 24 heures d'élicitation, les plus significatifs obtenus dans cette étude, ils sont comparés aux TH des trois lignées non élicitées (témoins expérimentaux (**T**)), aux TH des CRs citées par d'autres auteurs (témoins bibliographiques (**B**)), et aux TH des plantes entières correspondantes (témoins bibliographiques (**P**)).

Ainsi, le facteur d'amélioration le plus élevé par rapport aux TH des témoins bibliographiques (6,08) est obtenu avec la lignée L_{DT} après élicitation à l'AAS (10^{-4} M). Les facteurs d'amélioration les plus élevés par rapport au témoin expérimental d'une part et la teneur en hyoscyamine de la plante entière d'autre part (T et P) sont respectivement de 2,82 fois (182 %) et 32,93 fois (3193 %), ils sont obtenus avec la lignée L_{DI} et la concentration 10^{-4} M d'AAS.

Les acides salicylique et acétylsalicylique sont largement utilisés comme éliciteurs pour l'amélioration de la production en alcaloïdes chez différentes espèces (**Zhao et al., 2000 ; Lee et al., 2001 ; Khelifi et al., 2009**), d'où leur utilisation comme éliciteurs de la biosynthèse de l'HS dans cette étude.

Les stratégies basées sur le principe de l'élicitation ont été développées pour améliorer le rendement et la productivité *in-vitro* en métabolites secondaires des cultures de cellules/tissus (**Zhao et al., 2005**). Lorsqu'une cellule végétale reçoit une molécule de signalisation sur sa membrane plasmique, un réseau de transduction du signal se déclenche conduisant à l'activation des gènes cibles ou à la biosynthèse des facteurs de transcription qui régulent les gènes codant les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèses des métabolites recherchées (**Zhao et al., 2005**).

L'AS est l'une de ces molécules de signalisation. Il constitue un inducteur connu de la résistance acquise systémique (SAR) de l'interaction plante – pathogène, mais il n'est pas connu comme un inducteur universel de la production de métabolites de défense. Il est néanmoins connu pour ses propriétés inductrices de l'expression des gènes liés à la biosynthèse et à la production de quelques classes de métabolites secondaires (**Taguchi et al. 2001**), tels que les alcaloïdes indoliques et tropaniques (**Zhao et al., 2000 ; Kang et al., 2004**).

Selon **Ajungla et al., (2009)**, les racines non transgéniques dérivées de feuilles de *Datura metel* cultivées sur le milieu B5 contenant $1,2 \mu\text{M}$ d'AIA, sont utilisées

pour étudier l'effet des éliciteurs biotiques et abiotiques sur la croissance, la teneur en hyoscyamine et la teneur en scopolamine. La TH des témoins est de 1,39 mg/g M.S., la meilleure teneur en hyoscyamine (4,35 mg/g MS) a été obtenue avec 0,5 mM de l'AS, soit une amélioration de 3,13 fois (213 %).

Par ailleurs, lorsque des cultures de CRs du *Datura stramonium* sont traitées avec du méthyle jasmonate, extrait de levure ou des oligogalactoronides, le niveau d'amélioration de la teneur en alcaloïdes topaniques des CRs dépend de la nature de l'éliciteur selon l'ordre : méthyle jasmonate, extrait de levure, oligogalactorunide. La TH obtenue avec le méthyle jasmonate est augmentée de 1,82 fois (82 %) par rapport au témoin non élicité (Zabetakis *et al.*, 1999).

En outre, Pitta Alvarez *et al.*, (2003), rapportent que l'utilisation de la pectinase comme éliciteur améliore la teneur en hyoscyamine intracellulaire de 200 à 300% (soient 3 à 4 fois) des CRs de *Brugmansia candida*.

La présente étude révèle que les meilleurs niveaux d'améliorations de la teneur en hyoscyamine après élicitation, (1,30 fois = +30 % à 2,82 fois = +182 %) correspondent à ceux des auteurs précédemment cités. Cependant, vu que les TH de nos lignées sélectionnées sont déjà élevées, les niveaux d'amélioration obtenus lorsqu'ils sont comparés aux témoins bibliographiques se situent alors entre 1,89 fois (89 %) et **6,08 fois (508 %)**.

Tableau 16: Effets de l'AS et l'AAS sur les facteurs d'amélioration de la TH des CRs des trois lignées de *Datura* en comparaison avec différents témoins (T, B et P)

Lignées	Eliciteurs (10 ⁻⁴ M/24h)	TH (mg/g M.S.)	Valeurs des témoins(mg/g M.S.)			Facteurs d'amélioration		
			Expérimental Non élicité (T)	Bibliographique CRs (B)	Bibliographique Plante entière (P)	Expérimental Non élicité	Bibliographique CRs	Bibliographique Plante entière
L _{DS}	AS	10,58±0,43 ^B	8,16	5.6 [1]	0.67 [4]	1,30	1,89	15,79
	AAS	11,58±0,17 ^B				1,42	2,07	17,28
L _{DT}	AS	16,78±0,21 ^A	8,57	2.95 [2]	0.73 [4]	1,96	5,69	22,99
	AAS	17,94±0,14 ^A				2,09	6,08	24,58
L _{DI}	AS	6,61±0,09 ^C	3,15	1.72 [3]	0.27 [4]	2,10	3,84	24,48
	AAS	8,89±0,29 ^C				2,82	5,17	32,93

T : TH des témoins expérimentaux ; **B** : TH des CRs des témoins Bibliographiques ; **P** : TH de la plante entière ; **[1]** : TH des CRs de *D. stramonium* obtenue par **Shimomura et al., (1991)** ; **[2]** : TH des CRs de *D. tatula* obtenue par **Harfi et al., (2011)** ; **[3]** : TH des CRs de *D. innoxia* obtenue par **Altabella et al., (1994)** ; **[4]** : TH moyenne de la plante entière des espèces *D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia* obtenues par **Houmani et Cosson (2000)**.

Par ailleurs, l'élicitation se répercute, d'une manière générale, négativement sur la biomasse des CRs. En effet, des cultures de racines adventices non transgéniques de *Scopolia parviflora* exposées pendant 72 heures à 2 mM de méthyle jasmonate montrent que l'indice de croissance diminue de 63% par rapport au témoin (**Kang et al., 2004**). Selon **Zabetakis et al., (1999)**, le traitement des CRs de *Datura stramonium* avec 0,1 μ M de méthyle jasmonate réduit le poids frais de 11,3 % par rapport au témoin. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'acide jasmonique appliqué sur les CRs de *D. stramonium* (**Amdoun et al., 2009 et 2010**). Aussi, l'élicitation avec des concentrations croissantes de NaCl et Na₂SO₄ améliore l'accumulation de l'HS et de la scopolamine des racines adventices non transgéniques de *D. metel* mais réduit significativement l'indice de croissance des cultures racinaires (**Ajungla et al., 2009**).

Amdoun et al. (2010) ont obtenu, après 28 jours de culture des CRs de *D. stramonium*, 2,1 et 3,8 mg/g M.S. d'hyoscyamine respectivement dans le milieu B5 et le milieu B5 optimisé. Le même travail montre que l'élicitation avec l'acide jasmonique des CRs dans les milieux B5 et B5 optimisé induit respectivement une accumulation d'hyoscyamine de 4,2 et 8,5 mg/g M.S. accompagnée d'une réduction importante de la biomasse des CRs. Nos résultats montrent que la TH de la lignée L_{DS} sélectionnée de *D. stramonium* (témoin) est de 8,16 mg/g M.S. après seulement 20 jours de culture dans le milieu B5. En outre, la meilleure TH après élicitation de cette lignée avec l'AAS est de 11,58 mg/g M.S. Cependant, la teneur la plus élevée de 17,94 mg/g M.S. est obtenue avec la lignée L_{DT} avec la concentration 10⁻⁴ M d'AAS sans que la biomasse des CRs ne soit affectée.

Selon **Kang et al., (2004)**, l'AS ne présente pas d'effet négatif sur la croissance des racines adventices de *Scopolia parviflora* et n'induit pas leur brunissement comme c'est le cas avec le méthyle jasmonate.

Nos résultats confirment ces conclusions. En effet, les meilleures TH sont obtenues aux concentrations de 10⁻⁴M et 10⁻⁵ M d'AS et d'AAS, avec un temps d'élicitation de 24 heures, sans que les biomasses des CRs ne soient significativement affectées en comparaison avec les CRs témoins. Cependant, les plus fortes concentrations de l'AS et de l'AAS (10⁻² et 10⁻³ M) induisent une perte de biomasse d'environ 38% pour la L_{DS}. Des résultats similaires ont été obtenus par **Lee et al. (2001)**, qui ont enregistré une perte de biomasse de 9% pour les CRs de la belladone traités avec 2 mM d'AS.

Dans le cadre de cette étude, en augmentant les temps d'élicitation (jusqu'à 8 jours) et en diminuant significativement les concentrations des deux éliciteurs, l'AS et l'AAS (jusqu'à 10^{-8} M), nous avons réussi à améliorer les TH des lignées retenues (jusqu'à plus de 21 mg/g M.S.) tout en enregistrant des augmentations de la biomasse des CRs.

L'effet de la combinaison du temps d'élicitation (2, 4, 6 et 8 jours) et de la concentration des deux éliciteurs (AS et AAS à 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8} M) a montré les résultats de la TH intracellulaire et de la biomasse des CRs les plus intéressants de ce travail de recherche. La TH obtenue avec la lignée L_{DT}, 8 jours d'élicitation avec l'AAS à la concentration de 10^{-8} M est de 21,959 mg / g M.S. elle est 2,56 fois (156 %) plus importante que le témoin expérimental, 7,44 fois (644 %) plus élevée que le témoin bibliographique précédemment cité par **Harfi et al., (2011)** et 30,08 fois (2908 %) par rapport à la plante entière du *D. tatula* obtenue par **Houmani et Cosson (2000)**.

La présente étude réaffirme le rôle de l'AS et de l'AAS dans l'accumulation de l'HS dans les CRs des trois espèces du genre *Datura* étudiées sans affecter la biomasse, même en améliorant cette dernière.

3.2 Elicitation par le stress salin de la TH

Kang et al.(2010), rapportent que le traitement des suspensions cellulaires de *Ginkgo biloba* avec une concentration de 50 mM (= 1,8 g/l) de KCl pendant 48 heures n'a pas d'influence sur l'accumulation de la bilobalide et de Ginkgolide. Selon **Zhao et al.(2001)**, le traitement pendant 72 heures d'une culture de cals de *Catharanthus roseus* par 4 g/l de KCl induit une augmentation de la production d'ajmalicine de 177 % (2,77 fois) par rapport au témoin. Selon **Khelifi et al.(2011)**, le traitement de cultures de racines transformées de *Datura stramonium* par 1 à 2g/l de NaCl pendant 24 heures augmente l'accumulation des alcaloïdes tropaniques jusqu'à 3 fois (200%) par rapport au témoin.

Ajungla et al.(2009) ont exposé des racines adventices de *Datura metel* au CaCl₂. Le traitement des cultures par 15 mM de CaCl₂(= 0,8 g/l) augmente l'accumulation de l'HS 2 à 3 fois (100 à 200 %) par rapport au témoin. Par ailleurs, **Pitta Alvarez et al.(2000)** ont montré que le traitement pendant 24 heures des CRs de *Brugmansia candida* par le CaCl₂ à la concentration de 50 mM de CaCl₂ (= 2,7 g/l) entraîne une amélioration de 45 % de la teneur en hyoscyamine. Cependant, il y'a une diminution de 56% (à la même

concentration) pendant 48 heures de traitement. L'augmentation de l'accumulation de métabolites secondaires par l'utilisation du CaCl₂ a également été notée chez *Datura innoxia* (Gontier et al., 1994) et *Glorisa superba* (Seemanti et al., 2006).

Nos résultats corroborent ceux des auteurs précédemment cités, c'est-à-dire une amélioration de la production en HS après une phase d'élicitation au KCl ou au CaCl₂ à une concentration de 1 à 2 g/l pendant 24 heures. Notre meilleur résultat est obtenu avec le CaCl₂ appliqué sur la lignée L_{DT}. Il représente une amélioration de 2,07 fois (107 %) par rapport au témoin et une teneur de 16.978 mg/g M.S. est enregistrée. Le meilleur taux d'amélioration est de 2,32 fois (132 %) obtenu avec la lignée L_{DS} est la concentration de 2 g/l de KCl. Les niveaux d'amélioration obtenus rejoignent ceux des auteurs précités.

Cependant, les TH des lignées sélectionnées (L_{DS}, L_{DT} et L_{DI}), dans le cadre de ce travail de recherche, sont élevées, les meilleures valeurs obtenues, après élicitation avec le KCl et le CaCl₂, sont supérieures à celles citées dans la bibliographie (Khelifi et al., 2011 ; Ajungla et al., 2009 ; Zhao et al., 2001 ; Amdoun et al., 2010).

3.3 Perméabilisation des CRs

Selon Boitel-Conti et al. (1995), les effets du Tween 20 en tant qu'agent de perméabilisation des CRs issus de la transformation des *Datura* pour libérer les alcaloïdes tropaniques a été étudié. Pour diverses concentrations de Tween20, les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine accumulées dans le milieu de culture et la viabilité des racines transformées ont été mesurés. La viabilité du chevelu racinaire est préservée après 24 heures de traitement avec du Tween20 à 2% ; alors que, l'accroissement de la biomasse s'annule.

Le traitement avec 5 mM de peroxyde d'hydrogène induit une libération passagère des alcaloïdes tropaniques de racines transformées, dans le milieu de culture, sans affecter leur viabilité Lee et al. (1998).

Boitel-Conti et al. (1995) ont obtenu un maximum de perméabilisation des CRs après un contact de 20 heures avec le Tween20. A ce moment, une concentration en hyoscyamine supérieure à 25 mg/l a été détectée dans la solution nutritive.

Les résultats du présent travail de recherche sur la perméabilisation des CRs des *Datura* avec le Tween20 sont cohérents avec ceux cités plus haut. La

concentration en HS de la solution nutritive obtenue avec la lignée L_{DT} et 1% de Tween 20 pendant 24 heures est de 40,588 mg/l de solution nutritive.

La croissance et la production d'alcaloïdes indoliques des CRs de *Catharanthus roseus* ont été étudiées pour sélectionner une lignée à haut rendement. Pour améliorer la production et la sécrétion d'alcaloïdes (catharanthine et ajmalicine), un agent de perméabilisation (diméthylsulfoxyde) et un éliciteur fongique (*Penicillium sp.*) ont été utilisés avec l'adsorption *in situ*. Les quantités totales de catharanthine et ajmalicine produites étaient respectivement de 67 et 30,15 mg/l et un effet synergique a été noté (Sim *et al.*, 1994).

Les résultats de la concentration en HS de la solution nutritive obtenus suite à la perméabilisation des CRs et sans élicitation sont moins importants respectivement par rapport à ceux avec la combinaison de la perméabilisation des CRs et l'élicitation de la production de l'HS avec l'AS et l'AAS. La concentration de l'HS détectée dans la solution nutritive, avec la lignée L_{DT}, 1% de Tween 20 et sans élicitation est de 40,588 mg/l, elle passe à 87,667 mg/l suite à l'élicitation avec 10⁻⁴ M d'AAS. Ce qui démontre clairement l'importance de combiner les deux stratégies.

4 Procédés de production de l'hyoscyamine *in-vitro*

Les cultures de CRs jouent un rôle important dans les recherches visant à produire les d'alcaloïdes *in-vitro*. La complexité des travaux scientifiques et les limites de leur production associées aux systèmes de cultures cellulaires non organisées peuvent être surmontées en utilisant la culture des CRs (Dechaux et Boitel-Conti, 2005). En outre, le potentiel des cultures de CRs est en constante augmentation et différentes stratégies biotechnologiques comme le génie génétique, l'élicitation et le piégeage métaboliques sont actuellement explorés pour la mise en évidence de nouveaux métabolites et de nouvelles voies biosynthétiques dont le but d'accroître la biosynthèse des métabolites secondaires et/ ou leur libération dans la solution de culture. La conception de bioréacteurs appropriés pour une croissance optimale des CRs est d'un grand intérêt, ce qui permettra l'intégration de cette technologie dans les procédés industriels (Talano *et al.*, 2012).

Les protocoles visant à produire les métabolites secondaires d'origine végétale, par les techniques de culture de CRs obtenus par *Agrobacterium rhizogenes*, sont divers. Ils sont basés principalement sur :

-
- Sélection de lignées racinaires performantes (**Dahkulkar et al., 2005 ; Georgiev et al., 2007**) ;
 - Optimisation de la composition du milieu de culture (**Sugimoto et al., 1988 ; Pinol et al., 1999 ; Pavlov et al., 2009**) ;
 - Elicitation de la production des alcaloïdes(**Kang et al., 2004 ; El Jaber-Vazdekis et al., 2008 ; Ajungla et al., 2009**) ;
 - Perméabilisation des CRs(**Sim et al.,1994 ; Boitel-Conti et al., 1995 ; Bais et al., 2001**) ;
 - Utilisation des précurseurs de la biosynthèse des alcaloïdes(**Morgan et Shanks, 1997 ; Peebles et al., 2006 ; Namdeo et al., 2007**)
 - Surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse des alcaloïdes(**Kang et al., 2005 ; Yanget al., 2011**)
 - Optimisation des conditions de culture en bioréacteur (culture en continu) (**Kim et al., 2002; Srivastava et Srivastava, 2007**) ;
 - Modélisation de la production des alcaloïdes par les CRs (modèles statistiques) (**Cuello et al., 2003 ; Amdoun et al., 2009**) ;
 - Combinaison de deux ou plusieurs stratégies (**Satdiveet al., 2007 ; Amdoun et al., 2010**).

Au terme du présent travail de recherche, nous avons proposé deux procédés biotechnologiques pour la production de l'HS *in-vitro*, basés sur la culture des CRs de trois espèces du genre *Datura*. Le premier procédé en système de culture discontinu et le deuxième en culture semi-continu. Les stratégies adoptées pour l'établissement de ces protocoles concernent toutes les étapes de production depuis la transformation génétique jusqu'à l'extraction de la molécule cible :

- Sélection de lignées racinaires performantes ;
- Elicitation de la production de l'HS par l'AS, l'AAS ou le stress salin (KCl et CaCl₂) ;
- Perméabilisation des CRs avec le Tween 20 ;

- Combinaison de l'élicitation de la production de l'HS et de la perméabilisation des CRs ;
- Combinaison de la concentration de l'éliciteur et du temps d'élicitation.

CONCLUSION GENERALE

Les métabolites secondaires sont présents dans les plantes en quantités infimes et souvent déclenchés en réponse aux changements environnementaux (**Wu et al., 2005**). Les cultures organisées, et particulièrement les cultures de racines, peuvent apporter une contribution significative à la production de ces métabolites secondaires. Les cultures de CRs offrent une alternative de premier rang pour améliorer la production et la productivité des métabolites secondaires d'intérêt médicinal (**Srivastava et Srivastava, 2007**).

L'étude de l'effet de l'étiollement sur l'induction des CRs à l'aide de la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* chez les trois espèces du genre *Datura*, a permis d'améliorer qualitativement et quantitativement les CRS (taux d'induction des CRs, nombre moyen de racines par explant, temps moyen d'apparition de la première racine et teneur moyenne en HS des CRs). L'effet positif de l'étiollement sur l'induction des CRs est donc incontestable.

Les CRs constituent en général une population hétérogène dont les lignées individuelles présentent des caractéristiques génétiques et physiologiques différentes (**Dicosmo et Misawa, 1995**). Cela justifie le recours à la sélection comme un préalable à l'obtention de lignées performantes. En effet, **Yukimune et al., (1994)**, ont pu démontrer que la sélection répétée peut constituer un outil incontournable pour l'obtention de lignées hautement productives de métabolites secondaires. Nos résultats corroborent ces conclusions.

Malgré la différence des teneurs en alcaloïdes des trois lignées racinaires étudiées et la variabilité de l'évolution de l'accumulation de l'HS, les résultats obtenus suggèrent que le maximum de production de l'hyoscyamine est atteint quand la biomasse des CRs se stabilise (début de la phase stationnaire de croissance). Aussi, une relation linéaire et une relation exponentielle sont observées, respectivement pour les lignées sélectionnées du *D. stramonium* et du *D. tatula*, entre la biomasse et la teneur en HS pendant la phase active de croissance. Mais aussi, une relation inversement proportionnelle pendant la phase stationnaire de croissance pour *D. tatula* (L_{DT}).

Il ressort de l'étude que la meilleure période pour éliciter les CRs en vue d'accroître la production en hyoscyamine se situe vers le 20^{ème} jour de culture. Par ailleurs, *D. tatula* et *D. stramonium* semble présenter les meilleures aptitudes à produire l'HS *in vitro*.

L'élicitation induit l'expression de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (Roberts et Shuler, 1997). Il a été établi, que le traitement exogène des CRs avec l'AS et l'AAS favorise l'accumulation de plusieurs classes d'alcaloïdes (Aerts et al., 1996 ; Zabetakis et al., 1999 ; Spollansky et al., 2000 ; Zayed et Wink, 2004). Ceci est confirmé une nouvelle fois par la présente étude.

En effet, le traitement des CRs issues des lignées sélectionnées avec de l'AAS (10^{-4} M pendant 24 heures) améliore considérablement la teneur en HS, des teneurs de 11,58, 17,94 et 8,89 mg/g M.S. ont été obtenues respectivement chez les lignées sélectionnées de *D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia* sans que la biomasse ne soit affectée.

La combinaison du temps d'élicitation et la concentration des deux acides organiques AS et AAS a révélé des résultats encore plus intéressants que ceux obtenus avec ces mêmes éliciteurs et 24 heures d'élicitation. Une TH de 21,959 mg/g M.S. est alors enregistrée avec la combinaison de la lignée L_{DT}, 10^{-8} M de l'AAS et 8 jours d'élicitation. Une amélioration de 2,56 fois (156 %) par rapport au témoin expérimental et une augmentation de 30,08 fois (2908 %) par rapport à la plante entière (*Datura tatula*) obtenue par Houmaniet Cosson (2000) sont notées.

Non seulement les niveaux d'amélioration de la TH les plus importants du présent travail de recherche sont obtenus avec la combinaison du temps d'élicitation et la concentration d'éliciteur, mais aussi, le fait de réduire les concentrations en AS et en AAS et augmenter les temps d'élicitation a eu un effet positif sur les biomasses (PS) des modalités avec lesquelles nous avons enregistré les TH les plus intéressantes.

L'élicitation par le stress salin inhibe la croissance racinaire. L'effet inhibiteur du KCl et du CaCl₂ est d'autant plus marqué que la concentration ou le temps d'élicitation augmentent. Les deux éliciteurs abiotiques utilisés, dans le cadre de la présente étude, exercent un effet statistiquement significatif sur la production de l'HS des CRs. Des améliorations du contenu alcaloïdique des trois lignées traitées sont enregistrées avec les concentrations des deux sels de 0,5 à 2 g/l. Cependant, des pertes de la TH avec la concentration de 3 g/l ont été enregistrées.

Quant à la perméabilisation des CRs, les différentes concentrations du Tween 20 testées affectent la viabilité des CRs, puisque nous avons noté des pertes des PS des CRs par rapport aux témoins correspondants. La meilleure concentration en l'HS de la solution nutritive est obtenue avec la lignée L_{DT} et 1% de Tween20. Cette concentration de la solution nutritive en HS passe de 40,588 mg/l sans élicitation des CRs à 87,667 mg/l suite à la combinaison de la perméabilisation des CRs avec 1% de Tween 20 pendant 24 heures et l'élicitation de la production de l'HS avec 10⁻⁴ M d'AAS. Une augmentation de 2,16 fois (116 %) est alors notée.

Suite à l'ensemble des résultats de la présente étude et afin de répondre à la problématique que nous nous sommes posés, deux procédés biotechnologiques, englobant les modalités de production de l'HS *in-vitro* par les cultures de CRs les plus intéressantes, sont présentés.

Un premier procédé en système de culture discontinu et un deuxième procédé en système de culture semi-continu. La première partie des deux procédés proposés est commune, elle décrit les étapes de la mise en place de lignées racinaires performantes.

Au terme de cette étude, les résultats obtenus démontrent l'intérêt de la culture des CRs et confirment, une fois de plus, l'importance de développer des stratégies de production des métabolites secondaires par des procédés biotechnologiques. Il est temps de passer à l'étape suivante, c'est-à-dire l'initiation de la production de l'HS à l'échelle préindustrielle en bioréacteur. Dans ces nouvelles conditions, il y aura certainement de nouveaux ajustements à apporter aussi bien en terme de milieu de culture, d'élicitation que de perméabilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Mawla A.M.A., 2010.** Effect of certain elicitors on production of pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Echium rauwolfii*. *Pharmazie*, 65(3): 224-226.
- Aerts R.J., Shafer A., Hesse M., Baumann T.W. & Slusarenko A., 1996.** Signaling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, 42(2): 417-422.
- Ajungla L., Patil P.P., Barmukh R.B. & Nikam T.D., 2009.** Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian journal of biotechnology*, 8(3): 317-322.
- Altabella T., Palazôn J., Ribô M., Angel E. & Pifiol MT., 1994.** Comparative study of tropane alkaloid production in transformed roots of *Datura stramonium* and *Scopolia carniolica*. *Plant physiology*, 13: 113-23.
- Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Asch M., Assaf-Ducrocq C. & Gontier E., 2010.** Optimization of the Culture Medium Composition to Improve the Production of Hyoscyamine in Elicited *Datura stramonium* L. Hairy Roots Using the Response Surface Methodology (RSM). *International journal of molecular sciences*, 11(11): 4726-4740.
- Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.-H., Dao Vu Thi, Assaf-Ducrocq C. & Gontier E., 2009.** Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant science*, 177(2): 81-87.
- Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Amroun S. & Khelifi-Slaoui M., 2006.** Production de chevelus racinaires par transformation génétique *in vitro* de deux espèces de *Datura*. *Biotechnologie végétale*. Ed. Khelifi. Alger, 0: 83-85.
- Andreazza N.L., Abreu I.N., Sawaya A.C.H.F., Eberlin M.N. & Mazzafera P., 2009.** Production of imidazole alkaloids in cell cultures of jaborandi as affected by the medium pH. *Biotechnology letters*, 31(4): 607-614.
- Bais H.P., Sudha G., Suresh B. & Ravishankar G.A., 2001.** Permeabilization and *in situ* adsorption studies during growth and coumarin production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. *Indian journal of experimental biology*, 39(6): 564-571.
- Baiza A.M., Quiroz A., Ruiz J.A., Maldonado-Mendoza I. & Loyola-Vargas V.M., 1998.** Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 54(2): 123-130.

- Bensaddek L., Villarreal M.L. & Fliniaux M.A., 2008.** Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic journal of integrative biosciences, Special issue on hairy roots*, 3(1): 2-9.
- Bianchini F. & Corbetta F., 1975.** Atlas des plantes médicinales. Ed. Fernand Nathan, Paris, 120 P.
- Bianchini F. & Pantano A.C., 1986.** Guide vert des plantes et des fleurs. Ed. Solar, 125 P.
- Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J.C., Ducrocq C. & Sangwan-Norreel B.S., 1995.** Permeabilization of *Datura innoxia* hairy root for releas of stored tropane alkaloids. *Planta medica*, 61(3): 287-289.
- Bruneton J., 1987.** Elément de phytochimie et pharmacognosie, Ed. Lavoisier - Tec. & doc., Paris, 584 P.
- Chen R., Zhu D., Dai Y., Wang X., Wang Y., He Y., Xu S., Sun Y., Deng Q. & Zhang K., 2011.** Improving total alkaloids content of *Fritillaria cirrhosa* involves culturing callus of *Fritillaria cirrhosa* in culture medium. UNIV CHENGDU. Patent Number(s): CN101974478-A ; CN101974478-B.
- Chilton M.D., 1983.** L'introduction de gènes étrangers dans les plantes. *Pour la science*, 70: 89-99.
- Chriqui D., 1998.** Biotechnologies végétales : Génie génétique. Laboratoire CEMV – Université Pierre & Marie Curie, Paris VI, 84 P.
- Cieri U.R., Bertrand R., Choi K.K., Gagnon J., Krol P., Latzo P., Lau D., Melendez J., Pyramides G., Sen S., Steible D. & Weigand J., 2003.** Determination of atropine (hyoscyamine) sulfate in commercial products by liquid chromatography with UV absorbance and fluorescence detection: Multilaboratory study. *Journal of AOAC international*, 86(6): 1128-1134.
- Cosson, L., 1972.** Influence de l'éclaircissement sur la teneur en alcaloïdes tropaniques des *Datura*: Analyse des processus pouvant en expliquer les effets. Thèse de Doctorat d'État en Sciences Naturelles, Université Paris VI.
- Croteau R., Kutchan T.M. & Lewis N.G., 2000.** Natural products (secondary metabolites). *In: Buchanan BB, Gruissen W, Jones (eds) Biochemistry and molecular Biology of plants*. American society of plant physiologists, Rockville, p.p.: 1250-1318.
- Cuello J.L., Walker P.N. & Curtis W.R., 2003.** Design of ebb-and-flow bioreactor (EFBR) for immobilized "hairyroot" cultures: Part I. Preliminary design models and culture parameters. *Transactions of the ASAE*, 46(5): 1457-1468.

- De Sapio R., 1978.** Calculus for the life sciences, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 403-439.
- Dechaux C. & Boitel-Conti M., 2005.** A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. ACTA biologica Cracoviensia series Botanica, 47(1): 101-107.
- Dehghan E., Hakkinen S.T., Oksman-Caldentey K.-M. & Ahmadi F.S., 2012.** Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant cell, tissue and organ culture, 110(1): 35-44.
- Dicosmo F. & Misawa M., 1995.** Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. Biotechnology advances, 13(3): 425-445.
- Donald E. & Fosket, 1994.** Plant growth and development: A molecular approach. Ed. Academic press, 557 P.
- El Jaber-Vazdekis N., Laure Barres M., Ravelo A. G. & Za'rate R., 2008.** Effects of elicitors on tropane alkaloids and gene expression in *Atropa baetica* transgenic hairy roots. Journal of natural products, 71(12): 2026–2031.
- Facchini P.J., 2001.** Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 52: 29-66.
- Fecker L.F., Rugenhagen, C. & Berlin J., 1993.** Increased production of cadaverine and anabasine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* expressing a bacterial lysine decarboxylase gene. Plant molecular biology 23(1): 11-21.
- Fester K., 2010.** Plant alkaloids. eLS Book, John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0001914.pub2].
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K., 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental cell research, 50(1): 151-158.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., & Vasil I.K., 1976.** Plant tissue culture media. *In vitro* – Journal of the tissue culture association, 12(7): 473-478.
- Georgiev M.I., Pavlov A.I. & Bley T., 2007.** Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Applied microbiology and biotechnology, 74(6): 1175-1185.

- Giri A. & Narasu M.J., 2000.** Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*, 18(1): 1-22.
- Gontier E., Sangwan B.S. & Barbotin J.N., 1994.** Effects of calcium, alginate, and calcium alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of stable suspension cell line of *Datura innoxia* Mill. *Plant cell reports*, 9(13): 533-536.
- Hall R.D. & Yeoman M.M., 1986.** Temporal and spatial heterogeneity in the accumulation of anthocyanins in cell cultures of *Catharanthus roseus* L. *Journal of experimental botany*, 37(1): 48-60.
- Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J. & Rhodes M.J.C., 1986.** Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant cell reports*, 5(2): 111-114.
- Harfi B., Khelifi-Slaoui M., Zaoui D., Benyammi R., Belabbassi O. & Khelifi L., 2011.** Effect of culture medium on hyoscyamine production from four *Datura sp* hairy roots. *Advances in environmental biology*, 5(5): 1023-1030.
- Hartmann T., Witte L., Oprach F. & Toppel G., 1986.** Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants root cultures, and cell suspension cultures. *Planta medica*, 52(5): 390-395.
- Hayat S. & Ahmad A., 2006.** Salicylic acid: A plant hormone. Springer edition, 401 P.
- Heldt H.-W., 2005.** Plant biochemistry. Elsevier academic press (An update and translation of the German third edition), London, 630 P.
- Hensel W., 2008.** 350 plantes médicinales : les indispensables. Ed. Délachaux et Niestlé, Paris, 256 P.
- Hernandez-Dominguez E., Campos-Tamayo F., Carrillo-Pech M. & Vazquez-Flota F., 2006.** *Catharanthus roseus* shoot cultures for the production of monoterpenoid indole alkaloids. *Methods in molecular biology*, 318: 349-355.
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514 P.
- 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. Th. Doctorat, INA, Alger, 124 P.
- Houmani Z., Cosson L., 2000.** Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. *Ethnopharmacology*, Ed. Erga, Italie, 205-214.

- Huffman G.A., White F.F., Gordon M.P. & Nester E.W., 1984. Hairyrootinducing plasmid - Physical map and homology to tumorinducing plasmids. *Journal of bacteriology*, 157(1): 269-276.
- Iranbakhsh A.R., Oshagi M.A. & Ebadi M., 2007. Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan journal of biological sciences*, 10(8): 1236-42.
- Jayapaul K., Kishor P.B.K. & Reddy K.J., 2005. Production of pyrroloquinazoline alkaloid from leaf and petiole-derived callus cultures of *Adhatoda zeylanica*. *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 41(5): 682-685.
- Kang S.M., Jung H.-Y., Kang Y.M., Yun D.J., Bahk J.D., Yang J.k. & Choi M.S., 2004. Effects of methyl jasmonate 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(3): 745-751.
- Kang S.M., Min J.Y., Park D.J., Jeong M.J., Song H.J., Heo C.M., Kim H.G., Yang J.K., Lee C.-H., Karigar C.S. & Choi M.S., 2010. Potassium chloride elicits enhancement of bilobalide and ginkgolides production by *Ginkgo biloba* cell cultures. *Forest science and technology*, 6(2): 49-54.
- Kang Y.M., Lee O.S., Jung H.Y., Kang S.M., Lee B.R., Karigar C., Prasad T., Bahk J.D. & Choi M.S., 2005. Overexpression of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase (h6h) gene and enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* hairyroot lines. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(1): 91-98.
- Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B. & Mullineaux P.M., 2003. Light perception in plant disease defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 6(4): 390-396.
- Khanam N., Khoo C., Close R. & Khan A.G., 2001. Tropane alkaloid production by shoot culture of *Duboisia myoporoides* R.Br. *Phytochemistry*, 56(1): 59-65.
- Khelifi L., Harfi B., Amdoun R., Morsli A., Zaoui D. & Khelifi-Slaoui M., 2009. Effets de l'élicitation et de la perméabilisation sur la biomasse et le rendement en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura sp.* *Revue des régions arides - Numéro spécial* -, 999-1006.
- Khelifi L., Zarouri B., Amdoun R., Harfi B., Morsli A. & Khelifi-Slaoui M., 2011. Effects of elicitation and permeabilization on hyoscyamine content in *Datura Stramonium* hairy roots. *Advances in environmental biology*, 5(2): 329-334.

- Khelifi-Slaoui M., Rezine R., Amroun S., Amdoun R. & Khelifi L., 2005.** Embryons somatiques et bourgeons néoformés induit sur explants issus de vitrosemis de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi. 114-118.
- Kim Y.J., Wyslouzil B.E. & Weathers R.J., 2002.** Invited review : Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 38(1): 1-10.
- Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N. & Tepfer D., 1988.** Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbres fruitiers. 8^{ème} colloque sur les recherches fruitières, Bordeaux, Ed. INRA-CTIFL, 73-84.
- Lee K.T., Yamakawa T., Kodama T. & Shimomura K., 1998.** Effects of chemicals on alkaloids production by transformed roots of *Belladonna*. *Phytochemistry*, 49(8): 2343-2347.
- Lee K.T., Hirano H., Yamakawa T., Kodama T., Igarashi Y. & Shimomura K., 2001.** Response of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(6): 586-589.
- Li M., Peebles C.A.M., Shanks J.V. & San K.Y., 2011.** Effect of sodium nitroprusside on growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology progress*, 27(3): 625-630.
- Luna-Cavazos M. & Bye, R., 2011.** Phylogeographic analysis of the genus *Datura* (*Solanaceae*) in continental Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(3): 977-988.
- Makkar H.P.S., Siddhuraju P. & Becker K., 2007.** Plant secondary metabolites. Ed. *Methods in Molecular Biology* (vol. 393) Humana Press Inc., Totowa, NJ, 130P.
- Maldonado-Mendoza I.E., Ayora-Talavera T. & Loyola-Vargas V.M., 1992.** Tropane alkaloid production in root cultures of *Datura stramonium*. *In vitro cellular and development biology - Plant*, 28(2): 67-72.
- Maldonado-Mendoza I.E., Ayora-Talavera T. & Loyola-Vargas V.M., 1993.** Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*: Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant cell, tissue and organ culture*, 33(3): 321-329.

- Mano Y., Ohkawa H. & Yamada Y., 1989.** Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant science*, 59(2): 191-201.
- Matkowski A., 2008.** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology advances*, 26(6): 548-560.
- Mauro N.M., 2006.** Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier - GRENOBLE 1, 186 P.
- Morgan J.A. & Shanks J.V., 1997.** Effects of precursor feeding upon alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairyroot cultures. Abstracts of papers of the American chemical society, 213: 244.
- Mukundan U., Rai A., Dawda H., Ratnaparkhi S. & Bhide V., 1998.** Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures. *In: Plant tissue culture and molecular biology applications and prospects*, Narosa Publishing House, New Delhi, 302-333.
- Murashige T. & Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant physiology*, 15(3): 473-497.
- Namdeo A.G., 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1): 69-79.
- Namdeo A.G., Jadhav T.S., Rai P.K., Gavali S. & Mahadik K.R., 2007.** Precursor feeding for enhanced production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy reviews*, 1(2): 227-231.
- Paris R.R. & Moyses H., 1971.** Les solanacées médicinales : Précis de matière médicale (matière première d'origine végétale). Ed. Masson et Cie, Paris, tome III, 482 P.
- Pavlov A.I., Georgiev V.G., Marchev A.S. & Berkov S.H., 2009.** Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairyroot cultures. *World journal of microbiology and biotechnology*, 25(12): 2239-2245.
- Peebles C.A.M., Hong S.B., Gibson S.I., Shanks J.V. & San K.Y., 2006.** Effects of terpenoid precursor feeding on *Catharanthus roseus* hairy roots over-expressing the alpha or the alpha and beta subunits of anthranilate synthase. *Biotechnology and bioengineering*, 93(3): 534-540.
- Pinol M.T., Palazon J., Cusido R.S. & Ribo M., 1999.** Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant science*, 141(1): 41-49.

- Pitta-Alvarez S.I., Marconi P.L. & Giulietti A.M., 2003.** Comparison of the influence of different elicitors on hyoscyamine and scopolamine content in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 39(6): 640–644.
- Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C. & 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(2-4): 252-258.
- Poletti A., 1988.** Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Neislé S.A. Paris, 222 P.
- Polya G., 2003.** Biochemical targets of plant bioactive compounds: A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects. Ed. CRC PRESS, Washington, D.C, 847 P.
- Quezel P. & Santa S., 1962.** Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris, 1170 P.
- Radman R., Saez T., Bucke C. & Keshavarz T., 2003.** Elicitation of plant and microbial cell systems. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(1):91-102.
- Ramadan M.F., Zayed R. & El-Shamy H., 2007.** Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some *Solanaceae* plants. *Food chemistry*, 103(3): 885-890.
- Roberts S.C. & Shuler M.L., 1997.** Large-scale plant cell culture. *Current opinion in biotechnology*, 8(2): 154-159.
- Roberts M.F. & Wink M., 1998.** Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal application. Plenum press, New York, 486 P.
- Rolard B., 2002.** Pollution chimique et radioactivité : les plantes au secours de l'Homme. *In*:<http://www.perso.club-internet.fr/phyto2000/pollution.html>.
- Talano M.A., Oller A.L.W., Gonzalez P.S. & Agostini E., 2012.** Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent patents on biotechnology*, 6(2): 115-33.
- Satdive R.K., Fulzele D.P. & Eapen S., 2007.** Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of biotechnology*, 128(2): 281-289.
- Schmulling T., Schell J. & Spena A., 1988.** Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *The EMBO journal*, 7(9): 2621- 2629.

- Seemanti G., Bisswijit G. & Sumita J., 2006.** Aluminium chloride enhances colchicine production in root cultures of *Gloriosa superba*. *Biotechnology letters*, 28(7): 497-503.
- Shimomura K., Sauerwein M. & Ishimaru K., 1991.** Tropane alkaloids in adventitious and hairy root cultures of *Solanaceous* plants. *Phytochemistry*, 30(7): 2275-2278.
- Sim S.J., Chang H.N., Liu J.R. & Jung K.H., 1994.** Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Effects of *in situ* adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *Journal of fermentation and bioengineering*, 78(3): 229-234.
- Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L. & Tepfer D., 1986.** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *Journal of biological chemistry*, 261(1): 108-121.
- Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat M. & Jeanmonod D., 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs. Troisième édition revue et corrigée, Presses polytechniques et universitaires Romandes, 413 P.
- Spollansky T.C., Pitta-Alvarez S.I. & Giulietti A.M., 2000.** Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic journal of biotechnology*, 1(3): 72-75.
- Srivastava S. & Srivastava A.K., 2007.** Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1): 29-43.
- Sugimoto Y., Sugimura Y. & Yamada Y., 1988.** Effects of culture conditions on bisbenzylisoquinoline alkaloid production in cultured roots of *Stephania cepharantha*. *Agricultural and biological chemistry*, 52(6): 1495-1498.
- Symon D. & Laurence H.A.R., 1991.** *Datura (Solanaceae)* is a new world genus. Royal botanic gardens Kew and Linnean Society of London, *Solanaceae III*, p.p. 197-210.
- Tadeusz A., 2007.** Alkaloids - secrets of life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Ed. Elsevier. 316 P.
- Taguchi G., Yazawa T., Hayashida N. & Okazaki M., 2001.** Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *European journal of biochemistry*, 268(14): 4086-4094.

- Tikhomiroff C., 2001.** Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Th. es sciences appliquées, Génie chimique, Université de Montréal, Ecole polytechnique, 235 P.
- Toivonen L., 1993.** Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnology progress*, 9(1): 12-20.
- Vasconsuelo A. & Boland R., 2007.** Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant science*, 172(5): 861-875.
- Veena V. & Taylor C.G., 2007.** *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 43(5): 383-403.
- Veersham C., 2004.** In elicitation: Medicinal plant biotechnology, C.B.S. Publisher, India, 270-293.
- Vincent J.M., 1970.** Manual for the practical study of the root nodule bacteria. Ed. IBP, 164 P.
- Wang J.W. & Wu J.Y., 2013.** Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Advances in biochemical engineering / biotechnology*, in press.
- Wilson P.D.G., Hilton M.G., Robins R.J. & Rhodes M.J.C., 1987.** Fermentation studies of transformed root cultures. *In*: Moody G.W. & Baker P.B., Ed. International conference on bioreactors and biotransformation, Elsevier, London, 38-51.
- Wink M., 1999.** Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual plant reviews, Sheffield academic press and CRC press, Volume 2, 358 P.
- Wu J.D., Wong K., Ho K.P. & Zhou L.G., 2005.** Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme and microbial technology*, 36(1): 133-138.
- Yaeno T., Matsuda O. & Iba K., 2004.** Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *The plant journal*, 40(6): 931-941.
- Yang CX., Chen M., Zeng LJ., Zhang L., Liu XQ., Lan XZ., Tang KX. & Liao ZH., 2001.** Improvement of tropane alkaloids production in hairyroot cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing pmt and h6h genes. *Plant OMICS*, 4(1): 29-33.

- Yukimune Y., Hara Y. & Yamada Y., 1994.** Tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 58(8): 1443-1446.
- Zabetakis I., Edwards R. & O'Hagan D., 1999.** Elicitation of tropane alkaloids biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1): 53-56.
- Zayed R. & Winka M., 2004.** Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (*Solanaceae*). *Zeitschrift für Naturforschung, C. A journal of biosciences*, 59(11-12): 863 - 867.
- Zhao J., Davis LC. & Verporte R., 2005.** Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4): 283-333.
- Zhao J., Hu Q. & Guo Y.Q., 2001.** Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(6): 693-698.
- Zhao J., Zhu W.H., Hu Q. & He X.W., 2000.** Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnology letters*, 22(15): 1221-1226.
- Zhi-Bi H. & Min D., 2006.** Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology*, 48(2): 121-127.
- Zryd J.P., 1988.** Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses polytechniques romandes, 1^{ère} édition. 308 P.

ANNEXES

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Composition chimique du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

Composition chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments	
H ₃ BO ₃	6,20
Ki	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Additifs	
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Glycine	2

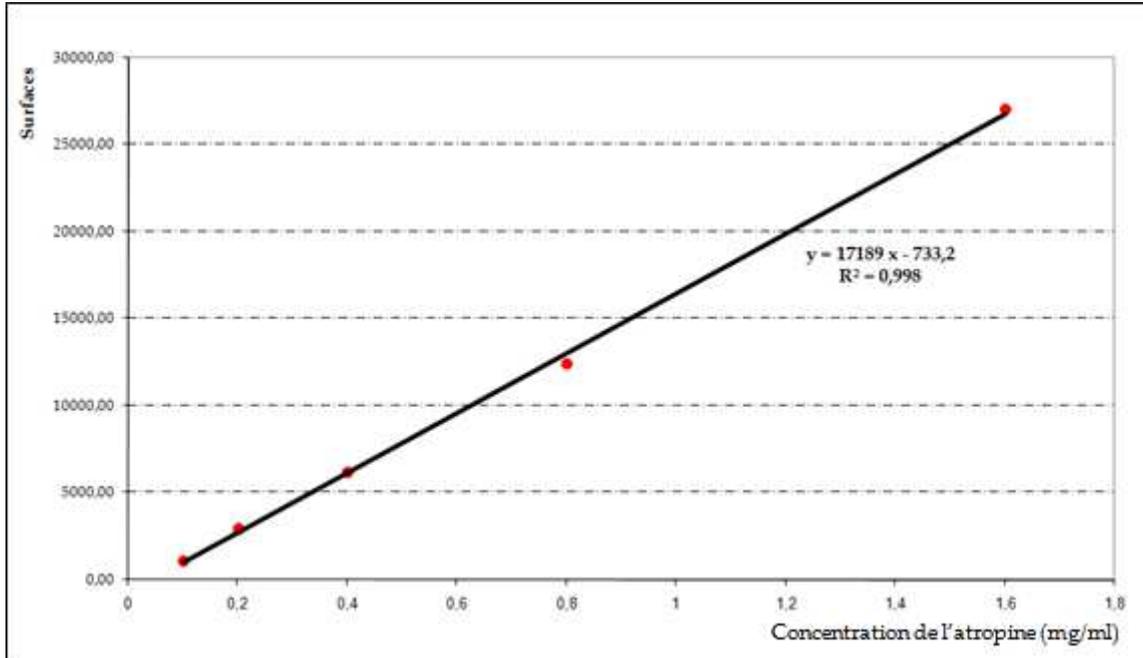
Composition chimique du milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968)

Composition chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	
KNO ₃	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
Microéléments	
H ₃ BO ₃	3
Ki	0,75
MnSO ₄ .H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ , 7(H ₂ O)	27,85
Additifs	
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

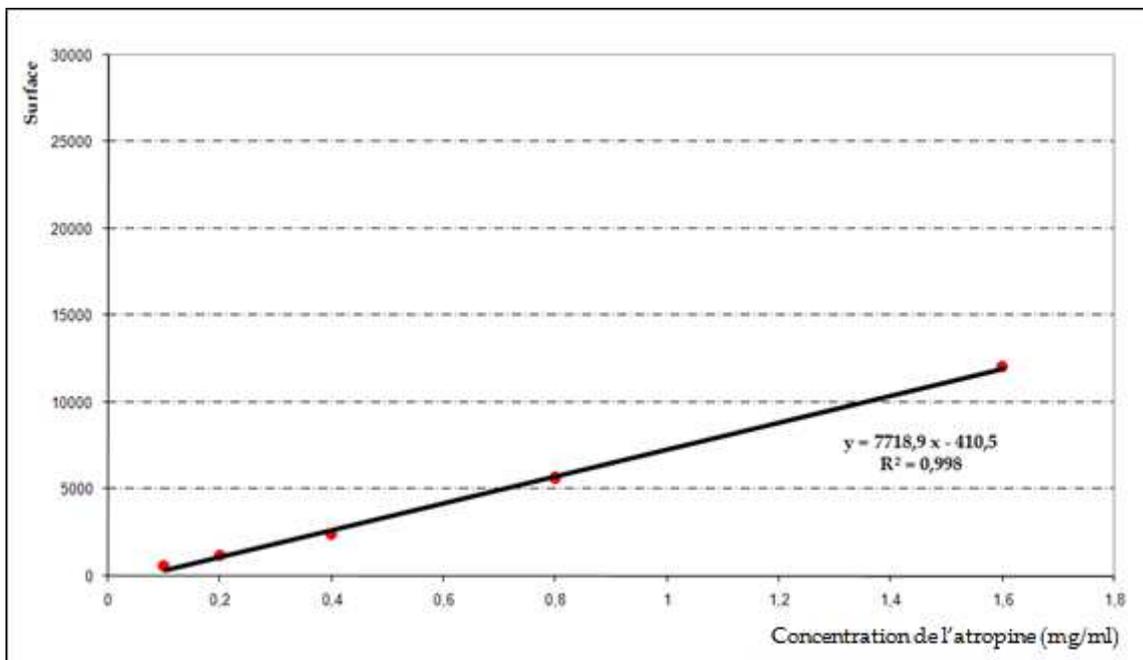
Composition chimique du milieu YEM (Vincent, 1970)

Composition chimique	Concentration (mg/l)
K ₂ HPO ₄	500
MgSO ₄ , 7(H ₂ O)	200
NaCl	100
Extrait de levure	400
Mannitol	10000

ANNEXE 2 : COURBES D'ETALONNAGES



Pour le dosage de l'hyoscyamine intracellulaire



Pour le dosage de l'hyoscyamine extracellulaire

ANNEXE 3 : ANALYSES STATISTIQUES (ANOVA)

Nombre de racines par explant

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	12,581	5	2,516	301,934	0,000
Intra-groupes	1,000E-01	12	8,333E-03		
Total	12,681	17			

Elicitation de la TH de Lignée L_{DS} par l'AS et l'AAS pendant 24 heures

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	177,633	8	22,204	100,537	0,000
Intra-groupes	3,975	18	0,221		
Total	181,609	26			

Elicitation de la TH de Lignée L_{DT} par l'AS et l'AAS pendant 24 heures

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	451,978	8	56,497	374,319	0,000
Intra-groupes	2,717	18	0,151		
Total	454,695	26			

Elicitation de la TH de Lignée L_{DI} par l'AS et l'AAS pendant 24 heures

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	144,496	8	18,062	238,389	0,000
Intra-groupes	1,364	18	7,577E-02		
Total	145,859	26			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DS} par le stress salin (CaCl₂)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	162,152	11	14,741	423,085	0,000
Intra-groupes	0,836	24	3,484E-02		
Total	162,988	35			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DT} par le stress salin (CaCl₂)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	262,992	11	23,908	755,442	0,000
Intra-groupes	0,760	24	3,165E-02		
Total	263,751	35			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DI} par le stress salin (CaCl₂)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	145,769	11	13,252	524,312	0,000
Intra-groupes	0,607	24	2,527E-02		
Total	146,375	35			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DS} par le stress salin (KCl)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	164,263	11	14,933	166,794	0,000
Intra-groupes	2,149	24	8,953E-02		
Total	166,411	35			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DT} par le stress salin (KCl)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	207,845	11	18,895	298,166	0,000
Intra-groupes	1,521	24	6,337E-02		
Total	209,366	35			

Elicitation de la TH de la lignée L_{DI} par le stress salin (KCl)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	177,424	11	16,129	351,402	0,000
Intra-groupes	1,102	24	4,590E-02		
Total	178,525	35			

Perméabilisation des CRs avec le Tween 20 (TH extracellulaire)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4588,951	11	417,177	6595,385	0,000
Intra-groupes	1,518	24	6,325E-02		
Total	4590,469	35			

Combinaison de l'élicitation de la TH et de la perméabilisation des CRs (TH extracellulaire)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	33845,409	26	1301,746	23319,751	0,000
Intra-groupes	3,014	54	5,582E-02		
Total	33848,423	80			

Combinaison du temps d'élicitation et de la concentration d'éliciteurs (AS et AAS)

- Pour la lignée L_{DS}

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	367,074	24	15,295	82,130	0,000
Intra-groupes	9,311	50	0,186		
Total	376,385	74			

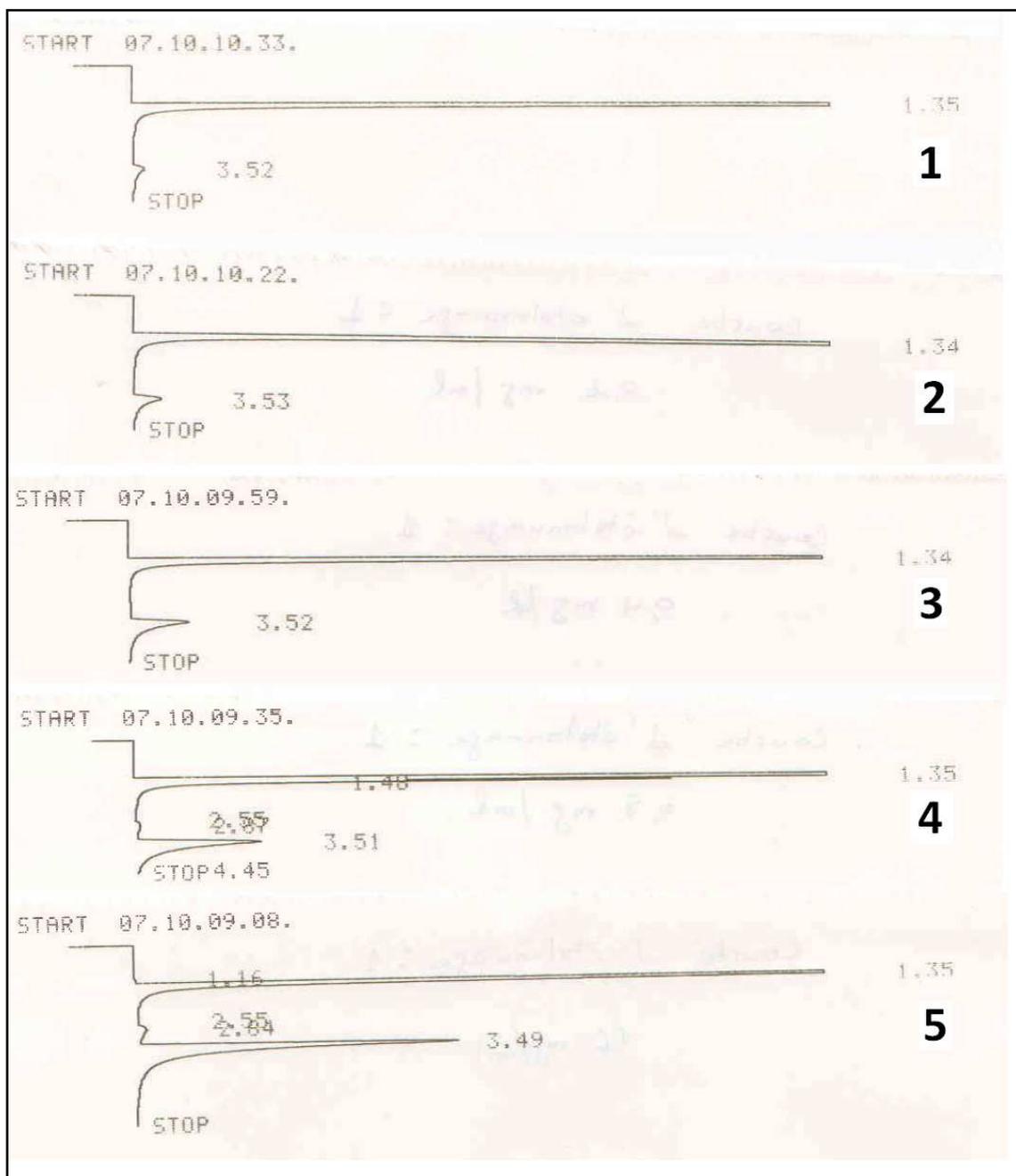
- Pour la lignée L_{DT}

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1152,202	24	48,008	254,640	0,000
Intra-groupes	9,427	50	0,189		
Total	1161,629	74			

- Pour la lignée L_{DI}

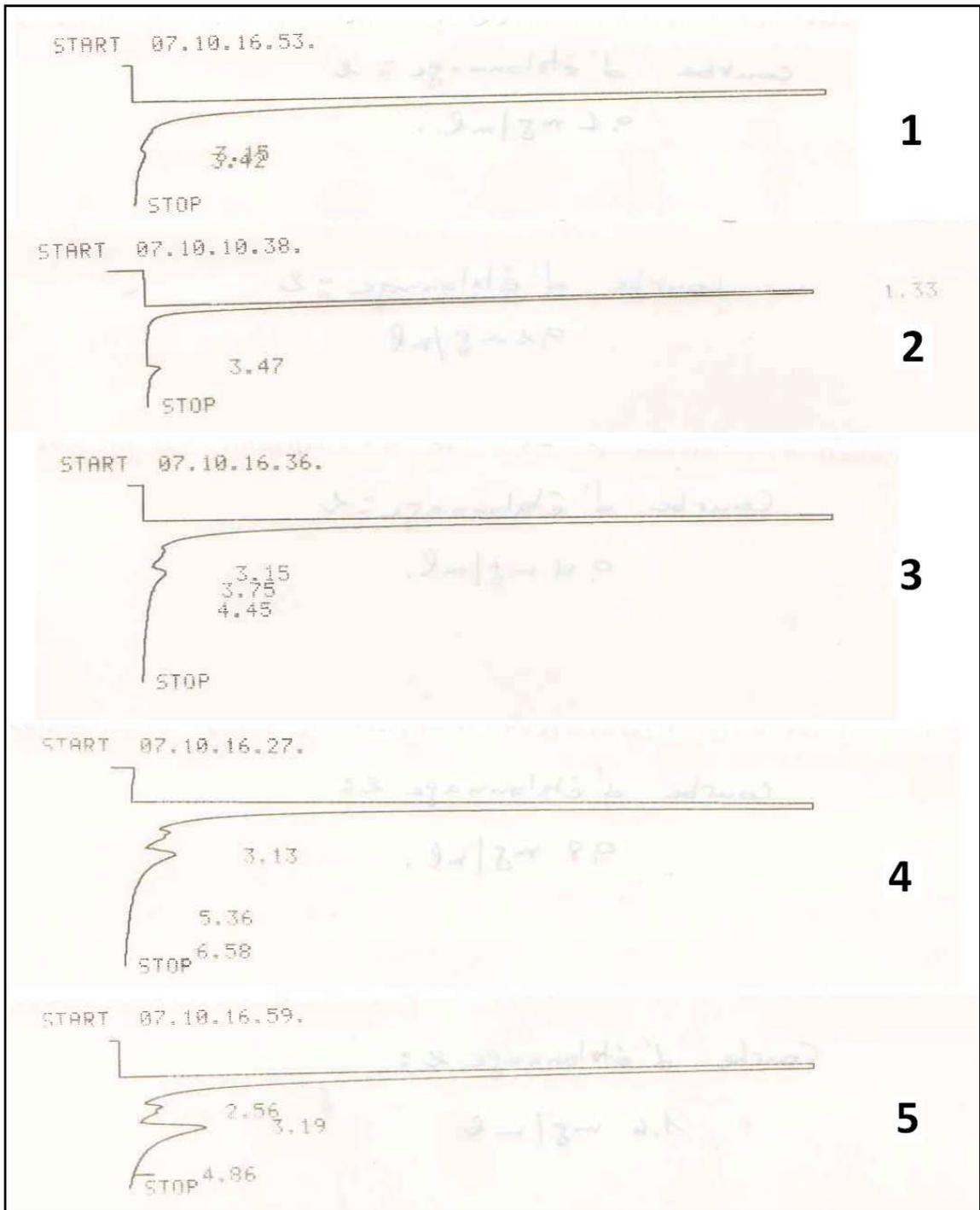
	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	248,512	24	10,355	119,493	0,000
Intra-groupes	4,333	50	8,666E-02		
Total	252,845	74			

ANNEXE 4 : CHROMATOGRAMMES



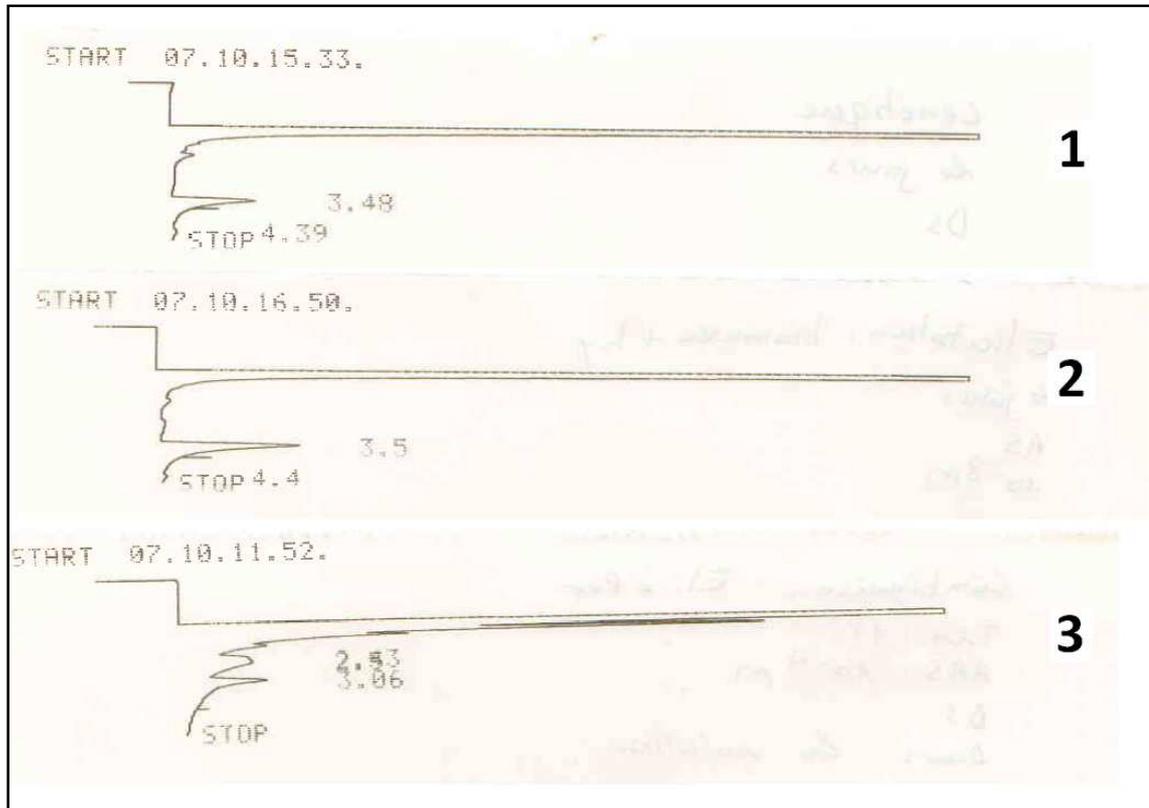
Chromatogrammes de la courbe d'étalonnage pour le dosage de l'hyoscyamine intracellulaire

1 : 0.1, 2 : 0.2, 3 : 0.4, 4 : 0.8 et 5 : 1.6 mg de l'HS par 1 ml de dichlorométhane



Chromatogrammes de la courbe d'étalonnage pour le dosage de l'hyoscyamine extracellulaire

1 : 0.1, 2 : 0.2, 3 : 0.4, 4 : 0.8 et 5 : 1.6 mg de l'HS par 1 ml de dichlorométhane

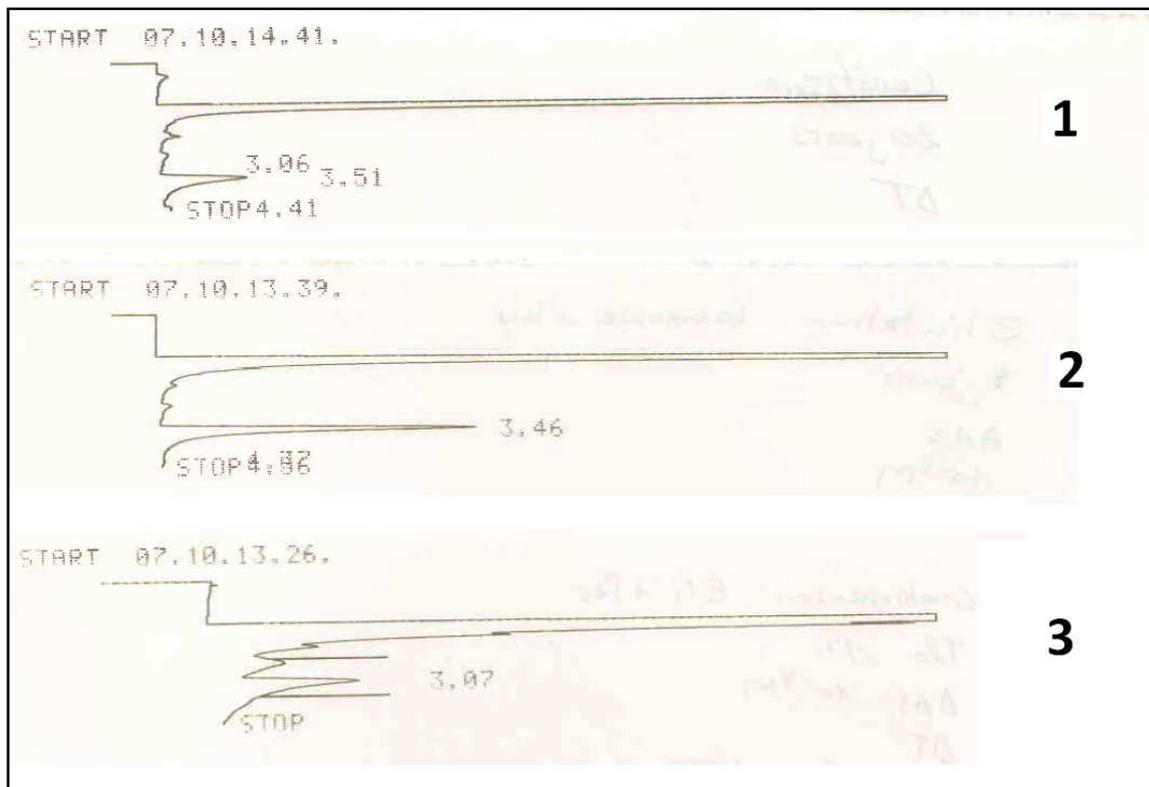


Chromatogrammes correspondant aux extrais de l'HS à partir de la lignée L_{DS}

1 : A partir des CRs témoins de la lignée L_{DS}

2 : TH de la lignée L_{DS} élicitée avec 10⁻⁶ M d'AS pendant 6 jours

3 : Concentration en HS de la solution nutritive obtenues avec la lignée L_{DS} élicitée avec 10⁻⁴ M d'AAS et perméabilisée avec 1% de Tween 20

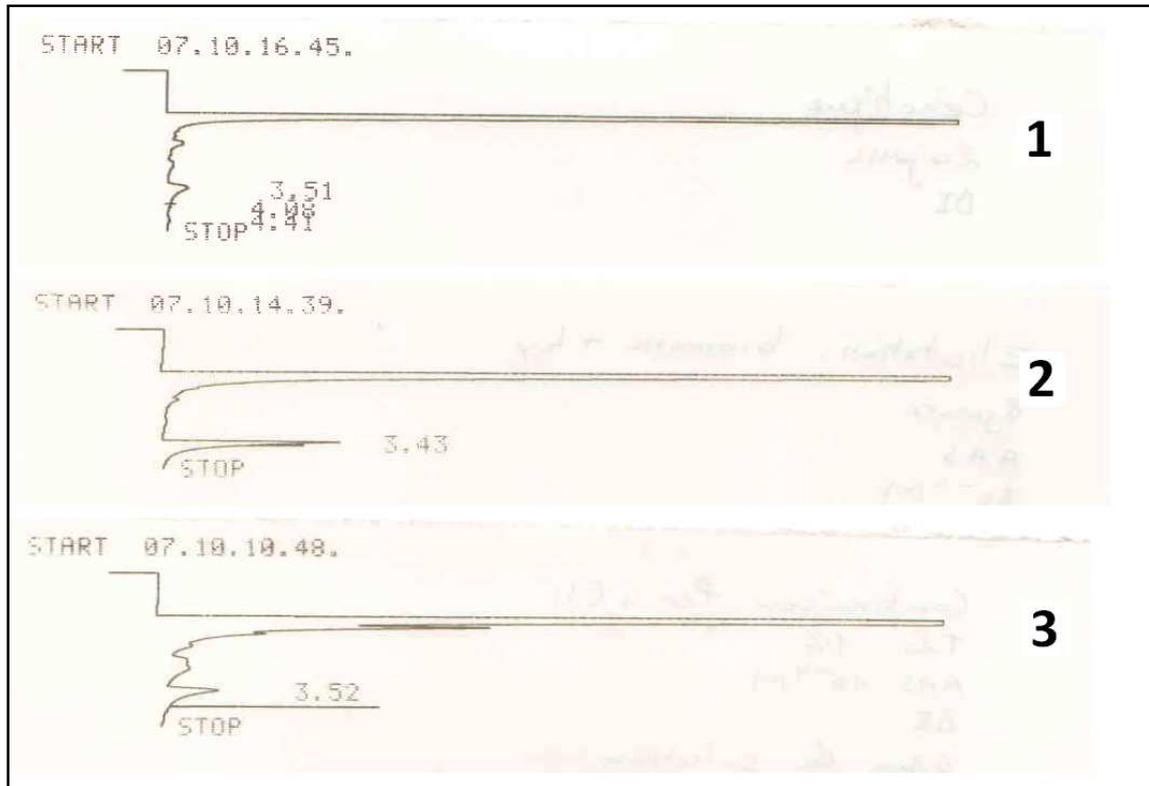


Chromatogrammes correspondant aux extraits de l'HS à partir de la lignée L_{DT}

1 : A partir des CRs témoins de la lignée L_{DT}

2 : TH de la lignée L_{DT} élicitée avec 10^{-8} M d'AS pendant 8 jours

3 : Concentration en HS de la solution nutritive obtenues avec la lignée L_{DT} élicitée avec 10^{-4} M d'AAS et perméabilisée avec 1% de Tween 20



Chromatogrammes correspondant aux extrais de l'HS à partir de la lignée L_{DI}

1 : A partir des CRs témoins de la lignée L_{DI}

2 : TH de la lignée L_{DI} élicitée avec 10^{-6} M d'AS pendant 8 jours

3 : Concentration en HS de la solution nutritive obtenues avec la lignée L_{DI} élicitée avec 10^{-4} M d'AAS et perméabilisée avec 1% de Tween 20

RESUMES

Résumé : L'hyoscyamine (HS), de par ses propriétés médicinales, est un important alcaloïde tropanique utilisé en médecine humaine et vétérinaire. Dans le but de mettre en place un procédé biotechnologique pour sa production *in-vitro*, les chevelus racinaires (CRs) de trois espèces du genre *Datura* issus de la transformation génétique par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* ont fait l'objet de la présente thèse. Pour ce faire, plusieurs étapes ont été considérées :

Tout d'abord, les conditions d'induction des CRs ont été explorées en étudiant l'effet de l'étiollement sur la transformation par l'*A. rhizogenes*. Ainsi, 247 racines transgéniques issues de vitrosemis étiolés et 96 racines transgéniques issues des vitrosemis non étiolés ont été obtenues. Les vitrosemis étiolés semblent plus favorables à l'induction des CRs que les non étiolés.

Ensuite, le travail a porté sur la sélection des lignées de CRs performantes. Sur un total de 343 lignées racinaires induites, trois lignées (1 par espèce) ont été sélectionnées sur la base de leurs performances avérées aussi bien pour la production de biomasse (PS) que de l'HS. Elles ont été retenues pour les étapes suivantes.

La cinétique de croissance des CRs et l'accumulation de l'HS révèlent une relation linéaire et une relation exponentielle respectivement pour les lignées sélectionnées du *D. stramonium* et du *D. tatula* pendant la phase active de croissance. Mais aussi, un rapport inversement proportionnel entre le PS des CRs et le pic de production de l'HS pour L_{DT} . Pour les trois lignées étudiées, le maximum d'accumulation de l'HS est atteint entre le 20^{ème} et le 22^{ème} jour de culture lorsque le PS des CRs se stabilise.

Les résultats de l'effet des acides salicylique (AS) et acétylsalicylique (AAS), éliciteurs de la teneur en HS (TH) des lignées de CRs sélectionnées, révèlent que la concentration optimale des éliciteurs est de 10^{-4} M à 24 heures d'élicitation. Par ailleurs, la lignée L_{DT} est la plus productive en HS (17,94 mg/g M.S.). La combinaison du temps d'élicitation (2, 4, 6 et 8 jours) et la concentration de ces mêmes éliciteurs (AS et AAS à 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8} M) a révélé des résultats encore plus intéressants. La combinaison de la lignée L_{DT} , 10^{-8} M de l'AAS et 8 jours d'élicitation a donné 21,959 mg/g M.S. d'HS. En comparaison avec les teneurs en HS de la plante entière, le meilleur niveau d'amélioration après élicitation est de 40,36 fois (3936 %) obtenu avec la lignée L_{DI} , 10^{-6} M de l'AAS et 8 jours d'élicitation.

L'étude de l'effet du KCl et du CaCl₂ utilisés comme éliciteurs de la biosynthèse de l'HS avec différents temps d'élicitation révèle des résultats statistiquement significatifs. Les niveaux d'amélioration de la TH par rapport aux témoins non élicités sont respectivement de 2,32, 1,99 et 1,85 fois (132 %, 99 % et 85%) pour les lignées L_{DS} , L_{DT} et L_{DI} élicitées avec le KCl et de 2,08, 2,07 et 1,85 fois (108 %, 107 % et 85 %) pour L_{DS} , L_{DT} et L_{DI} élicitées avec le CaCl₂. Par ailleurs, la lignée L_{DT} élicitée avec le CaCl₂ est la plus productive en HS (16,978 mg/g M.S.).

Les concentrations du Tween 20 testées affectent la viabilité des CRs, puisque nous avons noté des pertes du PS des CRs par rapport aux témoins. La meilleure concentration en l'HS de la solution nutritive est obtenues avec la lignée L_{DT} et 1% de Tween 20. Cette concentration de la solution nutritive en l'HS passe de 40,588 mg/l sans élicitation des CRs à 87,667 mg/l suite à la combinaison de la perméabilisation des CRs et l'élicitation de la production de l'HS. Une augmentation de 2,16 fois (116 %) est alors notée.

Enfin, les résultats de la présente étude ont abouti à l'établissement de deux procédés englobant les modalités de production de l'HS *in-vitro* par les cultures de CRs les plus intéressantes. Un premier procédé en système de culture discontinu et un deuxième procédé en système de culture semi-continu.

Mots clés : cinétique, combinaison, *Datura sp.*, élicitation, étiollement, hyoscyamine, perméabilisation, procédés biotechnologiques, sélection.

Summary: hyoscyamine (HS), with its medicinal properties, is an important tropane alkaloid used in human and veterinary medicine. In order to develop a biotechnological process for its *in vitro* production, hairyroots(HRs), of three *Datura* species induced by genetic transformation with strain A4 of *Agrobacterium rhizogenes*, were the subject of this thesis. To do this, several steps were considered:

First, the conditions of HRs induction were explored by studying the effect of etiolation on the genetic transformation by *A. rhizogenes*. Thus, 247 transgenic roots from etiolated seedlings and 96 transgenic roots from non-etiolated plantlets have been obtained. The etiolation of seedlings seems more favorable to HRs induction.

Then, the work has focused on the selection of effective root lines. On a total of 343 induced root lines, three lines (one per species) were selected, based on their proven performance as well for the production of biomass (DW) than the HS. They were selected for the following steps.

The growth kinetics of the HRs and the HS accumulation show a linear relationship and an exponential relationship respectively for selected lines from *D. stramonium* and *D. tatula* during the active growth. But also, an inverse relationship between DW and the peak of HS production. For the three studied lines, the maximum of HS accumulation is reached between the 20th and 22nd day of culture when the DW of HRs stabilizes.

The results of salicylic acid (SA) and acetylsalicylic acid (ASA) effect, elicitors of HS content of selected HRs lines, reveal that the optimal concentration of elicitors is 10^{-4} M for 24 hours elicitation. In addition, the L_{DT} line is the most productive in HS (17.94 mg / g DM). The combination of elicitation time (2, 4, 6 and 8 days) and the concentration of these elicitors (AS and AAS at 10^{-4} , 10^{-6} and 10^{-8} M) revealed even more interesting results. The combination of L_{DT} line, 10^{-8} M of ASA and 8 days elicitation gave 21,959 mg / g DM HS. In comparison with the levels of HS of the whole plant, the best level of improvement, after elicitation, is 40.36 folds (3936 %) obtained with the line L_{DT}, 10^{-6} M of ASA and 8 days elicitation.

The study of KCl and CaCl₂ effect used as elicitors of HS biosynthesis with different time elicitation revealed statistically significant results. Levels to improve the HS content versus non elicited witnesses are respectively 2.32, 1.99 and 1.85 folds (132 %, 99 % and 85 %) for L_{DS}, L_{DT} and L_{DI} lines elicited with KCl and 2.08, 2.07 and 1.85 folds (108 %, 107 % and 85 %) for L_{DS}, L_{DT} and L_{DI} elicited with CaCl₂. In addition, the L_{DT} line elicited with CaCl₂ is the most productive in HS (16.978 mg / g DM).

The tested concentrations of Tween 20 affect the viability of HRs, as we noted loss of DW of HRs compared to controls. The best concentration of the HS in the nutrient solution is obtained with the L_{DT} line and 1% of Tween 20. This concentration of HS in the nutrient solution passes from 40.588 mg/l without elicitation of HRs to 87.667 mg/l due to the combination of the permeabilization of HRs and eliciting HS production. An increase of 2.16 folds (116 %) is then noted.

Finally, the results of this thesis led to the establishment of two biotechnological processes including the most interesting modalities of *in-vitro* HS production by HRs. A first process, in batch culture system and a second process, in semi-continuous culture system.

Keywords: biotechnological processes, combination, *Datura* sp., elicitation, etiolation, hyoscyamine, kinetics, permeabilization, selection.

ملخص : الهيسيامين (HS) عبارة عن قلويد التروبونيك، يملك خصائص طبية هامة تستعمل في الطب البشري و البيطري. لتطوير طرق بيوتكنولوجية باستعمال الزراعة الأنبوبية لإنتاجه مخبرياً، الشعيرات الجذرية (CRs) لثلاثة أنواع من الصنف *Datura* التي تكونت من التحول الجيني بواسطة السلاسة A4 للبكتيريا *Agrobacteriumrhizogenes* استعملت لموضوع هذه الأطروحة. لإجراء هذه الدراسة، اتخذت عدة مراحل :

أولاً، شروط تحريض الشعيرات الجذرية استكشفت بدراسة الذبول (المزروعة في الظلام) على التحول بواسطة *Agrobacteriumrhizogenes* و تم التحصل على 274 شعييرة جذرية معدلة وراثياً التي تكونت من الشتلات المخبرية المزروعة في الظلام و 96 شعييرة جذرية معدلة وراثياً التي تكونت من الشتلات المخبرية المزروعة في ظروف عادية. إن الشتلات المخبرية المزروعة في الظلام ملائمة أكثر لتحفيز الشعيرات الجذرية مقارنة مع الشتلات المخبرية المزروعة في ظروف عادية (تتأوب الضوء و الظلام).

ثم، ارتكز العمل على انتقاء سلالات الشعيرات الجذرية الأثر فعالية. من مجموع 343 سلالة جذرية الناتجة، 3 سلالات (واحدة في كل نوع) أختيرت على أساس فعاليتها الظاهرة لإنتاج الكتلة الحية (الوزن الجاف) و الهيسيامين. تم اختيارها من أجل استعمالها في المراحل الآتية.

إن تغيرات نمو الشعيرات الجذرية و تراكم الهيسيامين يبين علاقة خطية وعلاقة أسية على التوالي للسلالات المختارة من *D. stramonium* و *D. tatula*. خلال مرحلة النمو النشط. أيضاً، هناك علاقة عكسية نسبياً بين الوزن الجاف للشعيرات و ذروة إنتاج الهيسيامين. بالنسبة للسلالات الثلاث المدروسة، تم التحصل على التراكم الأقصى للهيسيامين بين اليوم 20 و اليوم 22 للزراعة عندما يستقر الوزن الجاف للشعيرات الجذرية.

إن نتائج تأثير أمحاض الساليسيليك (AS) و الأسيتيل ساليسيليك (AAS) المحفزين لنسبة الهيسيامين لسلالات الشعيرات الجذرية المختارة، تبين أن التركيز الأمثل للمحفزين هو 10^{-4} مول لمدة 24 ساعة من التحفيز. من جهة أخرى، السلالة L_{DT} هي الأكثر إنتاجاً للهيسيامين (17,94 مع/غ من الوزن الجاف). إن الجمع بين مدة التحفيز (2، 4، 6، و 8 أيام) و تركيز هذه المحفزات (AS و AAS، 10^{-4} ، 10^{-6} و 10^{-8} مول) بين نتائج أكثر أهمية. إن الجمع بين السلالة L_{DT} ، 10^{-8} مول لحمض الأسيتيل ساليسيليك و 8 أيام تحفيز أعطى 21,959 مغ من الهيسيامين /غ من الوزن الجاف. بالمقارنة مع نسب الهيسيامين للنبتة الكاملة، قدر أفضل مستوى تحسين بعد التحفيز بـ 40,36 مرة تحصل عليه في الجمع بين السلالة L_{DI} ، 10^{-6} مول لحمض الأسيتيل ساليسيليك و 8 أيام تحفيز.

إن دراسة تأثير KCl و $CaCl_2$ المستعملين كمحفزين للتركيب الحيوي لإنتاج الهيسيامين في مدات تحفيز مختلفة، تبين نتائج معبرة إحصائياً. فمستويات تحسين نسبة الهيسيامين مقارنة مع الشواهد غير المحفزة هي على التوالي 2,32، 2,07، و 1,85 مرة بالنسبة للسلالات L_{DS} ، L_{DT} و L_{DI} المحفزة بـ KCl و 2,08، 2,07، و 1,85 مرة بالنسبة لسلالات L_{DS} ، L_{DT} و L_{DI} المحفزة بـ $CaCl_2$. من جهة أخرى السلالة L_{DT} المحفزة بـ $CaCl_2$ هي الأكثر إنتاجية للهيسيامين (16,978 مغ/غ من الوزن الجاف).

إن تراكيز توين 20 (Tween 20) المفحوصة تؤثر سلباً على حيوية الشعيرات الجذرية، بما أنه لوحظ نقصان في الوزن الجاف للشعيرات الجذرية مقارنة بالشواهد. تم التحصل على أفضل تركيز للهيسيامين في المحلول المغذي مع السلالة L_{DT} و 1% من توين 20. هذا التركيز للهيسيامين في المحلول المغذي ينتقل من 40,588 مغ/ل بدون تحفيز الشعيرات الجذرية إلى 87,667 مغ/ل بعد الجمع بين تحرير الشعيرات الجذرية و تحفيز إنتاج الهيسيامين. لوحظ في هذه الحالة ارتفاع بـ 2,16 مرة.

و في الأخير، أدت نتائج هذه الأطروحة إلى تأسيس طرق تشمل أهم الأنماط لإنتاج الهيسيامين بالزراعة الأنبوبية بواسطة الشعيرات الجذرية. الطريقة الأولى باستعمال الزراعة غير المستمرة و الطريقة الثانية باستعمال الزراعة شبه المستمرة.

الكلمات المفتاحية : تغيرات، جمع، *Datura sp.*، تحفيز، ذبول، هيسيامين، تحرير، طرق بيوتكنولوجية، انتقاء.