

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 sciences agronomiques

Thème

**Production par voie biotechnologique d'alcaloïdes d'intérêt
médical à partir de la pervenche de Madagascar
(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)**

Présentée par : Mme. Roukia BENYAMMI

Jury:

Président :	M. ABDELKRIM H.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Directeur de Thèse :	M. KHELIFI L.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
Examineurs :	M. BOUDJENIBA M.	Prof.- E.N.S. Kouba, Alger
	M. TOUMI M.	Prof.- E.N.S. Kouba, Alger
	Mme. KHELIFI-SLAOUI M.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
	Mme. YKHLEF N.	Prof.- U.M., Constantine

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout, *Dieu* tout puissant qui m'a guidé durant toutes mes années de recherche et qui m'a donné la volonté et l'énergie de réaliser ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à **M. Lakhdar KHELIFI**, 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 malgré ses nombreuses charges.

Je remercie profondément, **M. Hassen ABDELKRIM**, Prof. à ENSA, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance.

Un grand remerciement à M. **Messaoud BOUJENIBA**, Prof. à l'ENS, d'avoir accepté d'examiner notre travail de recherche.

Un profond remerciement à M. **Mohammed TOUMI**, Prof. à l'ENS, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner notre travail.

Un chaleureux remerciement à Mme. **Majda KHELIFI-SLAOUI**, Prof. à l'ENSA, de nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Je tiens à remercier vivement et tout particulièrement Mme. **Nadia YKHLEF**, Prof. à UM, Constantine, d'avoir accepté d'examiner notre travail de recherche.

Toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus profonds vont à l'équipe du Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (LRGB) de l'ENSA, spécialement à Mme. Djamila ZAOUI, M. Abdelkader MORSLI, Mlle Ouarda BELABASSI, M. Mohammed BEKHOUCHE, Mlle Nouara BAKIRI, M. Boualem HARFI, Mlle Nawel BELALIA, Mlle Nour El Imène OUARAS et M. Khair-Eddine TITOUH. Ainsi que, Mlle Kheira YUCEFI et Mlle Katia AMMI.

Je remercie vivement mes chères collègues de l'ENS : Mme KRIMAT Soumia, Mme Rabiaa MERROUCHE, Mme Kheira BENMAKHLOUF, Mme Saliha ZBIRI, Mme Faten BENMERZOUGUE, Mme Djamila BENAZIZA, M. Mohammed KHENAK, M. Abderahmane BENKHALIFA, M. Salim MOKRANE, M. Abdelghani ZETOUNI et M. Rabeh FORAR.

Je remercie profondément l'équipe du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) de l'ENSA Nancy (France) d'avoir contribué à ce travail, et particulièrement à M. Stéphane DESOBRY et M. Cédric PARIS.

Je remercie grandement mon collègue M. Abdullah MAKHZOUM du Département de Biologie, Université de Western Ontario (Canada) pour ses précieux conseils.

Une pensée également pour tous mes amis que je n'ai pas vu autant que je l'aurai souhaité, mais qui me soutenaient de partout en Algérie et de l'étranger. Je remercie mes étudiants qui m'ont pardonné les moments où j'ai privilégié la thèse.

Enfin, je remercie ma famille. A ma maman et à mon papa qui me soutient depuis des années dans mes études, et me poussent à continuer malgré toutes les étapes que nous avons dû franchir toutes ces années. J'ai une pensée pour mon grand père et ma grande mère que nous avons perdus et qui n'auront pas vu ce projet aboutir.

Mon dernier mot sera pour mon mari et mon partenaire de vie Omar. Très compréhensive, tu as toujours été là pour moi. Tu as été ma force ces dernières années. Merci !

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

- *Mes très chers parents... Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation ;*
- *Mon cher mari Omar... Mon âme sœur et la lumière de ma vie ;*
- *Mon fils Soulayman... Aucune dédicace, ne peut valoir pour exprimer toute ma tendresse, mon affection et mon amour vis-à-vis à toi. Tu es l'espoir de ma vie et source de mon bonheur ;*
- *Ma chère grand mère Aicha ;*
- *Ma très chère sœur Nassima et à la princesse Maryam ;*
- *Mon cher frère Salah, son épouse Aicha et ses petits jumeaux Adam et Razan ;*
- *Mon cher frère Yacine ;*
- *Mes beaux parents ;*
- *Tout mes oncles et toutes mes tantes, à tous mes cousins et cousines ;*
- *Tous mes amis, plus particulièrement, Soumia, Ferial, Rabiaa et Nacera ;*
- *Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Roukja

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1	Considérations générales sur la Plante modèle pervenche de Madagascar.....	3
1.1	Botanique.....	3
1.1.1	Classification taxonomique.....	3
1.1.2	Caractéristiques morphologiques.....	5
1.2	Origine et répartition géographique.....	5
1.3	Principes actifs essentiels.....	7
1.4	Utilisation.....	7
1.4.1	Importance ethnobotanique.....	7
1.4.2	Importance thérapeutique.....	8
1.5	Mode d'action.....	9
2	Métabolites secondaires (Les alcaloïdes) de la pervenche de Madagascar.....	9
2.1	Alcaloïdes.....	10
2.1.1	Généralité.....	10
2.1.2	Classification.....	10
2.2	Alcaloïdes indoliques.....	11
2.3	Biosynthèse des AITs.....	12
2.3.1	Biosynthèse des précurseurs des AITs, la tryptamine et la secologanine.....	13
2.3.2	Biosynthèse du précurseur principale des AITs, la strictosidine.....	15
2.3.3	Biosynthèse des AITs à partir de la strictosidine.....	16
2.3.4	Compartimentation et Différenciation cellulaire de la voie de biosynthèse des AITs.....	21

3	Maladie du chevelu racinaire.....	22
3.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	22
3.2	Plasmide Ri.....	23
3.3	Processus de transformation de la cellule végétale par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	25
3.3.1	Reconnaissance chimique entre la cellule végétale hôte et l' <i>Agrobacterium</i>	26
3.3.2	Expression des gènes Vir.....	27
3.3.3	Attachement de bactérie à la cellule hôte.....	28
3.3.4	Sécrétion des protéines Vir et le transfert de ADN-T dans la cellule végétale.....	29
3.3.5	Intégration d'ADN-T dans le génome de la cellule hôte.....	30
3.4	Intérêt des chevelus racinaires (CRs) en biotechnologies végétales.....	31
4	Régénération et micropropagation.....	32
5	Optimisation de la production de la biomasse et des AITs.....	35
5.1	Optimisation par l'élicitation.....	35
5.1.1	Mécanisme général de l'action des éliciteurs.....	36
5.1.2	Caractéristiques d'une élicitation efficace.....	38
5.2	Optimisation par facteurs à effets épigénétiques.....	39
5.2.1	La méthylation de l'ADN.....	40
5.2.2	L'acétylation des histones.....	43
5.2.3	Effet des agents épigénétiques sur la production de la biomasse et des métabolites secondaires.....	46

MATERIELS ET METHODES

1	Matériel végétal.....	48
1.1	Obtention des vitrosemis.....	48
1.2	Induction des pousses (Ps) par caulogénèse.....	48
1.3	Multiplication des Pousses.....	49
1.4	Etablissement des chevelus racinaires (CRs).....	50

1.4.1	Origine des souches d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> utilisées.....	50
1.4.2	Activation des souches bactériennes et mise en suspension	50
1.4.3	Transformation génétique par co-culture <i>C. roseus</i> - bactérie	51
1.5	Isolement et multiplication des racines obtenues	52
1.6	Sélection des lignées racinaires et adaptation au milieu liquide	52
1.7	Confirmation de la nature transgénique des lignées racinaires obtenues	53
2	Cinétique de croissance.....	54
2.1	Cinétique de croissance de Pousses et de l'accumulation des alcaloïdes	54
2.2	Cinétique de croissance des CRs et de l'accumulation des alcaloïdes	54
3	Elicitation du matériel végétal	55
3.1	Elicitation des chevelus racinaires (CRs)	55
3.1.1	Elicitation par l'acide salicylique (AS).....	55
3.1.2	Elicitation par le chlorure de calcium (CaCl ₂)	56
3.1.3	Elicitation combiné par l'AS et le CaCl ₂	56
3.1.4	Elicitation par des agents épigénétiques	57
3.2	Elicitation des Pousses (Ps)	58
3.2.1	Elicitation par l'acide salicylique (AS)	58
3.2.2	Elicitation par le chlorure de calcium (CaCl ₂)	59
3.2.3	Elicitation combiné par l'AS et le CaCl ₂	59
3.2.4	Elicitation par des agents épigénétiques	60
4	Extraction des alcaloïdes indoliques à partir des CRs et des Ps	60
5	Identification et dosage et des alcaloïdes indoliques	61
6	Analyse statistique	61

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1	Obtention du matériel végétale.....	63
1.1	Germination des graines de <i>C. roseus</i>	63

1.2	Induction de la caulogénèse.....	65
1.3	Etablissement des chevelus racinaires (CRs).....	67
1.3.1	Induction de la rhizogénèse.....	67
1.3.2	Sélection des lignées de CRS performantes	71
1.3.3	Vérification par PCR de la nature transgénique des racines induites	73
2	Cinétique de croissance.....	75
2.1	Cinétique de croissance des pousses (PS)	75
2.1.1	Évolution de la biomasse	75
2.1.2	Évolution de l'accumulation des alcaloïdes indoliques	75
2.2	Cinétique de croissance des chevelus racinaires (CRs).....	78
2.2.1	Évolution de la biomasse	78
2.2.2	Évolution de l'accumulation des alcaloïdes indoliques	80
2.2.3	Corrélation entre biomasse et l'accumulation des alcaloïdes indoliques	82
3	Effet de l'élicitation	83
3.1	Effet de l'élicitation des CRs.....	83
3.1.1	Elicitation par l'acide salicylique (AS).....	83
3.1.2	Elicitation par le sel CaCl ₂	85
3.1.3	Elicitation combinée par CaCl ₂ et l'AS	86
3.1.4	Elicitation par des agents à effet épigénétique	88
3.1.4.1	Elicitation par la 5-Azacytidine.....	88
3.1.4.1	Elicitation par la trichostatine.....	90
3.2	Effet de l'élicitation des pousses.....	92
3.2.1	Elicitation par l'acide salicylique	92
3.2.2	Elicitation par CaCl ₂	93
3.2.3	Elicitation combinée par CaCl ₂ et l'AS	93
3.2.4	Elicitation par agent d'épigénétique: la 5-Azacytidine.....	94

DISCUSSION DES RESULTATS

1 Etablissement du matériel végétale.....	96
2 Croissance des tissus et teneurs en AITs.....	99
2.1 Dans les pousses	99
2.2 Dans les chevelus racinaires (CRs).....	101
3 Effet de l'élicitation.....	103
3.1 Effet de l'élicitation des CRs.....	103
3.1.1 Elicitation par l'acide salicylique	103
3.1.2 Elicitation par le CaCl ₂	108
3.1.3 Elicitation combinée par l'AS et le CaCl ₂	111
3.1.4 Elicitation par des agents épigénétiques	113
3.1.4.1 Elicitation par la 5-Azacytidine	113
3.1.4.1 Elicitation par la trichostatine	115
3.2 Effet de l'élicitation des pousses.....	117
3.2.1 Elicitation par l'acide salicylique	117
3.2.2 Elicitation par CaCl ₂	118
3.2.3 Elicitation combinée par l'AS et le CaCl ₂	119
3.2.4 Elicitation par la 5-Azacytidine.....	121
CONCLUSION GENERALE.....	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	126

ANNEXES

RESUMES

PUBLICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA : Acide abscissique.

AC : Acétosyringone.

ADN-T : ADN transféré.

ADN-T_L: ADN-T left.

ADN-T_R: ADN-T Right.

AITs : Alcaloïdes indole terpénoïdes.

AJ : Acide jasmonique.

AMTs : ADN méthyltransférases.

AS : Acide salicylique.

AUX : Auxine.

B5: Milieu de culture de Gamborg *et al.*(1968).

BAP: 6-Benzylaminopurine.

CE: concentration d'élécteur.

CR: Cathenamine réductase.

CRs : Chevelus racinaires.

D4H : Desacetoxyvindoline-4-hydroxylase.

DAB : Decitabine.

DAT : Deacetylvindoline-4-O-acétyltransférase.

ERA (en anglais RNS): Espèces réactives de l'azote.

ERO (en anglais ROS) : Espèces réactives de l'oxygène.

ET : Éthylène.

FT: Facteurs de transcription.

G10H: Geraniol 10- hydroxylase.

GDPS: Geranyl diphosphate synthase.

HATs : Histone acétyltransférases.

HDACs : Histone Désacétylases.

IC: Indice de croissance.

IPP : Isopentényl diphosphate.

KNOX : Knotted-like homeobox.

LC-MS / MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

M.S : Matière sèche.

MAPK: Mitogen activated protein kinase.

MAT : Minovincinine-19-hydroxy-O-acétyltransférase.

MeJa : Méthyle jasmonate.

MS : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962).

M.S : Matière sèche.

NMT : N-méthyltransférase.

ON : Oxyde nitrique.

ORF: Open reading frame.

PCR: Polymerase chain reaction.

PdS : Poids sec.

PL: Phospholipase

Prx: Peroxydase.

Ps : Pousse.

R: récepteur.

RE: Réticulum endoplasmique.

rpm: Round per minute (tour par minute).

SGD: Strictosidine b-D-glucosidase.

SLN: Signaux de localisation nucléaire

SLS: Secologanine synthase.

STR: Synthase strictosidine.

T16H : Tabersonine 16-hydroxylase.

T19H : Tabersonine 19-hydroxylase.

TA : Teneur en ajmalicine.

TAALs : Taux d'Amélioration en alcaloïdes.

TALs: Teneur en alcaloïdes.

TC: Teneur en catharanthine.

TDC: Tryptophane decarboxylase.

TE: Temps d'élicitation.

TPX : Tapoxine.

TSA : Trichostatine A.

TV: Teneur en vindoline.

Vir : virulence.

YEM : Yeast Extract Mannitol.

ZBL : Zebularine.

16OMT : O-méthyltransférase.

5-AC : 5-azacytidine.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les noms vernaculaires de la pervenche de Madagascar dans différentes langues.	4
Tableau 2. Action de quelques AITs, leurs fonctions et les plantes source.....	12
Tableau 3. Modalités d'élicitation des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par de l'acide salicylique (AS).	55
Tableau 4. Modalités d'élicitation des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par CaCl ₂	56
Tableau 5. Modalités d'élicitation combinée des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par l'AS et le CaCl ₂	57
Tableau 6. Différentes concentrations d'azacytidine et la trichostatine utilisées pour les trois lignées (LP10, LP21 et L54).	58
Tableau 7. Effet de différentes concentrations de BAP sur l'induction de bourgeons.....	66
Tableau 8. Variation de l'indice de croissance (IC) des lignées issues de la deuxième sélection de CRs.	72
Tableau 9. Niveaux de corrélation entre la croissance de la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes.....	82
Tableau 10. Effet de l'élicitation par l'AS sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.	84
Tableau 11. Effet de l'élicitation par CaCl ₂ sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.....	86
Tableau 12. Effet de l'élicitation combinée par CaCl ₂ et l'AS sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.	88
Tableau 13. Effet de l'élicitation par la 5-Azacytidine sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.	90
Tableau 14. Effet du traitement par la TSA sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.....	91
Tableau 15. Effet de l'élicitation par l'AS sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.	92

Tableau 16. Effet de l'élicitation par CaCl ₂ sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.	93
Tableau 17. Effet de l'élicitation combinée par CaCl ₂ et l'AS sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.	94
Tableau 18. Effet de l'élicitation par l'5-Azacytidine sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.	95
Tableau 19. Comparaison avec différent témoins et les meilleures teneurs moyennes en ajmalicine et en catharanthine des CRs de <i>C. roseus</i> , élicitées par l'AS.	108
Tableau 20. Comparaison avec différents témoins et des meilleures TA et TC des CRs de <i>C. roseus</i> , élicitées par CaCl ₂	110
Tableau 21. Comparaison avec différents témoins et des meilleures TA et TC des CRs de <i>C. roseus</i> , élicitées par CaCl ₂ et l'AS.	112
Tableau 22. Comparaison avec différents témoins et des meilleurs TA et TC des CRs de <i>C. roseus</i> , éliciter par la 5-AC.	115
Tableau 23. Comparaison avec différentes témoins et des meilleures TA et TC des CRs de <i>C. roseus</i> , élicitées par la TSA.	116
Tableau 24. Comparaison avec différents témoins et des meilleures TA, TC et TV des pousses de <i>C. roseus</i> , élicitées avec l'AS et CaCl ₂	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Caractéristiques morphologiques (photographie prise à l'ENSA).....	6
Figure 2. Biosynthèse de l'IPP par la voie mévalonate et la voie MEP	14
Figure 3. Biosynthèse de la secologanine.	15
Figure 4. Biosynthèse de la strictosidine et de la 4,21-dehydrogeissoschizine.	16
Figure 5. Biosynthèse de l'ajmalicine et la serpentine.	17
Figure 6. Biosynthèse de la catharanthine et la tabersonine.	17
Figure 7. Biosynthèse de la vindoline	19
Figure 8. Biosynthèse de la vinblastine et de la vincristine.....	20
Figure 9. Voie de biosynthèse des AITs et sa compartimentation cellulaire.....	22
Figure 10. Structure de plasmide Ri d'A. rhizogènes	24
Figure 11. Représentation schématique de l'interaction Agrobacterium-plante	26
Figure 12. Représentation schématique des réponses possibles des cellules à l'élicitation.	37
Figure 13. Méthylation de l'ADN par AMT à la position 5 de la cytosine	41
Figure 14. Structure chimiques de la cytosine et de ses analogues.....	42
Figure 15. Acétylation et déacétylation des histones de la chromatine.....	45
Figure 16. Structure chimique de la trichostatine A.....	45
Figure 17. Germination des graines de <i>C. roseus</i>	64
Figure 18. Effet de la scarification et du temps d'imbibition sur la germination	64
Figure 19. Vitrosemis de <i>C. roseus</i>	65

Figure 20. Aspect des pousses sur milieu semi-solide MS.....	66
Figure 21. Effets de la variété, du type d'explant, de la souche bactérienne et du temps de co-culture sur la fréquence d'induction des racines de <i>C. roseus</i>	69
Figure 22. Effets de la variété, du type d'explant, de la souche bactérienne et du temps de co-culture sur le nombre moyen de racines par explant de <i>C. roseus</i>	69
Figure 23. Racines de <i>C. roseus</i> induites sur milieu semi-solide B5 dilué de moitié	70
Figure 24. Aspect Morphologique des lignées racinaires de <i>C. roseus</i>	73
Figure 25. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques de gènes <i>rol B</i> , des ADN extraits des bactéries d' <i>A rhizogenes</i> (A4 et AR15834) et des ADN extraits d'échantillons des lignées de CRs de <i>C. roseus</i> après électrophorèse sur gel d'agarose.	74
Figure 26. Aspect des pousses de <i>C. roseus</i> , du cultivar « Cooler blush », dans le milieu liquide MS	76
Figure 27. Cinétique de croissance des Ps de <i>C. roseus</i> du cultivar « Cooler blush ».....	77
Figure 28. Évolution de la teneur en vindoline, en catharanthine et en ajmalicine des Ps du cultivar « Cooler blush ».....	77
Figure 29. Cinétique d'accumulation du poids sec des trois lignées de CRs	79
Figure 30. Aspect des CRs de la lignée LP10 sur milieu liquide B5 dilué de ½	79
Figure 31. Évolution de l'accumulation de la catharanthine dans les trois lignées de CRs.....	81
Figure 32. Évolution de l'accumulation d'ajmalicine dans les trois lignées de CRs.....	81

INTRODUCTION GENERALE ET PROBLEMATIQUE

Les métabolites secondaires sont des composés connus pour leur rôle clé dans l'adaptation des plantes à leur environnement (Bourgaud *et al.*, 2001). Ils dérivent principalement de plantes. Ils sont depuis longtemps utilisés par les humains.

Au cours des 50 dernières années, les travaux de recherche sur les métabolites secondaires des plantes ont enregistré des avancées spectaculaires. Ces dernières sont en relation directe avec celles enregistrées dans le domaine de la santé humaine (Hussain *et al.*, 2012). La production à partir de la plante présente des limites majeures, faible teneur en métabolites et risque d'exploitation abusive susceptible de conduire à l'anéantissement des espèces qui les produisent. Par conséquent, afin de répondre à la demande du marché, de plus en plus croissante, la culture *in vitro* de plantes médicinales offre une voie de choix par la stabilité et la durabilité de la production de ces métabolites secondaires (Siddiqui *et al.*, 2013). Les plantes médicinales *in vitro* fournissent ,en outre, également un excellent environnement pour l'approfondissement des études de métabolomiques de ces métabolites (Malik *et al.*, 2014).

Le *Catharanthus roseus* (L.) G. Don est une plante médicinale bien connue pour ses propriétés thérapeutiques majeures. Cette espèce de la famille des *Apocynaceae* produit une large gamme de métabolites secondaires de la famille des alcaloïdes indoliques terpéniques (Aslam *et al.*, 2010), dont deux sont des anticancéreux très puissants: la vinblastine et la vincristine (Ishikawa *et al.*, 2009). Cette plante synthétise également d'autres composants, l'ajmalicine et la serpentine, utilisées dans le traitement de l'hypertension et les troubles cardiaques (Thakore *et al.*, 2012). Mais hélas, le rendement de ces composés (en particulier la vincristine et la vinblastine) est très faible, donc très coûteux (van Der Heijden *et al.*,

2004), ce qui présente un sérieux défi aux biotechnologues afin d'améliorer les rendements et réduire le coût de production.

Par ailleurs, vue la facilité de leur manipulation, les cultures cellulaires (cellules non spécialisées) ont été largement utilisées pour étudier le développement de la synthèse des métabolites secondaires chez la *C. roseus* (Liu *et al.*, 2013). Cependant, celles-ci sont souvent caractérisées par une instabilité génétique (Almagro *et al.*, 2013). De ce fait, les cultures des pousses et des chevelus racinaires (qui sont des tissus spécialisés) présentent une meilleure alternative pour la production de ces métabolites secondaires (Siddiqui *et al.*, 2013). Ceci passe inévitablement par l'optimisation des conditions / facteurs de culture qui contrôlent la synthèse des alcaloïdes, ainsi que l'ingénierie métabolique et/ou la surexpression excessive d'enzymes clés (Mujib *et al.*, 2012).

Afin de répondre à la problématique posée, le présent travail de recherche s'appuie sur deux principales parties:

- ✓ Optimisation de l'induction des cultures de pousses et des chevelus racinaires, puis sélection des lignées racinaires performantes;
- ✓ Optimisation des conditions de culture, en étudiant les effets de l'élicitation des pousses et des lignées racinaires sélectionnées, par l'acide salicylique, le stress salin et les agents épigénétiques (la trichostatine et la 5-azacytidine), dans le but d'améliorer la production de la biomasse et des alcaloïdes indoliques terpéniques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Considérations générales sur la Plante modèle pervenche de Madagascar

Le genre *Catharanthus* se compose de huit espèces dont sept sont endémiques à Madagascar et un autre, *Catharanthus pusillus*, est endémique en Inde (Nejat *et al.*, 2015). *Catharanthus roseus*, pervenche de Madagascar, est une espèce importante dans l'horticulture florale et est l'une des rares plantes pharmacologiques qui a une longue histoire. Son utilisation, comme remède, remonte à l'époque mésopotamienne (2600 av. JC) (Bajaj, 1994). Aujourd'hui, cette plante joue encore un rôle considérable en phytothérapie et en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies. Depuis les années 50, la pervenche de Madagascar est considérée comme une plante modèle pour étudier le métabolisme des alcaloïdes, en raison de sa capacité à synthétiser une large gamme d'alcaloïdes indole terpénoïdes (AITs), dont les alcaloïdes anti-tumoraux : vinblastine et vincristine, isolées pour première fois en 1958 et 1965, respectivement (Owens *et al.*, 1965; Wright, 2002).

1.1 Botanique

1.1.1 Classification taxonomique

La nomenclature de la pervenche de Madagascar a connue une incohérence dans la littérature à cause des modifications apportées, avec les progrès continus dans la classification et la taxonomie végétales (Hao *et al.*, 2010). Le nom scientifique de la pervenche de Madagascar est *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Catharanthus* signifie pure (katharos) et fleur (anthos) en grec, *roseus* veut dire couleur rose en latin. Linné, est le premier auteur qui a publié la description de la plante, en 1758, sous le nom de *Vinca rosea*, et Don se réfère à George Don, qui a introduit le nom *Catharanthus* dans la littérature en 1837, pour différencier la Pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*, des *Vinca* européens (Bergen and Snoeiijer, 1996).

La classification de la Pervenche de Madagascar selon APG III (2009) (*Bot.J.Linn.Soc.*) est la suivante:

Règne: Plantae.

Division: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida: dicotylédones.

Ordre: Gentianales.

Famille: Apocynaceae.

Sous-famille: Rauvolfioideae.

Genre: *Catharanthus* G. Don.

Les noms vernaculaires de la pervenche de Madagascar dans diverses cultures et langues sont énumérés dans le tableau 1.

✓ **Tableau 1. Les noms vernaculaires de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) dans différentes langues (Bergen and Snoeijer, 1996; Joy *et al.*, 1998).**

langues	Nom commun
Anglais	Madagascar periwinkle, rosy periwinkle
Arabe	عناقية مدغشقر، وينكا مدغشقر
Français	Pervenche de Madagascar, rose amère
Allemand	Rosafarbene Catharanthe
Néerlandais	Roze maagdenpalm
Chinois	Chang Chun Hua
Espagnol	Chatas, Chula, Pervinca de Madagascar, Vinca pervinca, Hierba doncella
Indien	Sadabahar, Baramassi, Ainskati, Ushamanjairi
Persan	Gul-e-farang
Portugais	Boa-noite, Boa-tarde, Lavadeira, Pervinca-rosa, Vinca-de-gato, Vina-rosea
Afrikaans	Kanniedood

1.1.2 Caractéristiques morphologiques

Catharanthus roseus est une plante vivace, arbuste et sub-ligneuse à latex. Elle peut atteindre un mètre de hauteur et porte des tiges glabres et rougeâtres et des racines très développées qui s'étendent jusqu'à 70 cm de profondeur. Ses feuilles sont entières, opposées et d'une forme elliptique à oblongue (2,5-9 cm de long, de 1-3,5 cm de large), leur couleur est d'un vert brillant au-dessus et vert pâle au-dessous avec une nervure médiane pâle. Les pétioles sont verts ou rouges (1-1.8 cm de longue). Les fleurs sont pentamères, actinomorphes, avec des pétales ob-ovales de couleur rose, rose-violet, bleu, saumon, écarlate, ou blanc avec un œil violet, rouge, rose, jaune pâle, ou blanc dans le centre. Les fruits sont des follicules cylindriques, étroits et allongés, de 15 à 25 mm de longueur, qui abritent de 10 à 20 petites graines noirs oblongues de 2 à 3 mm de longueur. Cette plante fleurit tout au long de l'année et se propage par les graines ou les boutures (Bergen and Snoeijer , 1996; Joy *et al.*, 1998). La figure 1 représente la morphologie des différentes parties de la plante.

1.2 Origine et répartition géographique

Catharanthus roseus est une plante native de la grande île de Madagascar. Depuis des siècles, elle a été introduite en tant que plante ornementale populaire dans de nombreuses régions du monde en raison de sa résistance particulière à la sécheresse, ainsi que pour ses jolies fleurs roses ou blanches. Récemment, cette plante est largement cultivée commercialement pour ses utilisations médicinales aux États-Unis, Chine, Afrique, Australie, Inde, et en Europe du Sud (Ji *et al.*, 2009; Nejat *et al.*, 2015).



Figure 1. Caractéristiques morphologiques (photographie prise à l'ENSA). A: Plant de *Catharanthus roseus* (G = 0,3 X) ; B: Fruit (G = 4 X) et C: Graines (G= 1,7X).

1.3 Principes actifs essentiels

La Vinblastine et la Vincristine sont, les principes actifs majeurs, produit par *C. roseus*. Ces deux molécules appartiennent à la famille des alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs). Ces deux dimères cytotoxiques ont un intérêt pharmaceutique et commercial grâce à leur action anti-tumorale. Cependant, le rendement de ces deux principes actifs est extrêmement faible dans toute la plante. Cette faible capacité d'accumulation a incité les chercheurs à tenter d'optimiser leurs productions par la voie biotechnologique (van Der Heijden *et al.*, 2004).

Par ailleurs, d'autres molécules qui appartiennent, aussi, à la famille des alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs) sont également synthétisées naturellement par la *C. roseus*, l'ajmalicine, la serpentine et la yohimbine qui ont une action hypotensive (van Der Heijden *et al.*, 2004; Aniszewski, 2007). Mustafa and Verpoorte (2007), ont inscrit d'autres principes actifs qui sont des composés phénoliques, tels que l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide férulique trans-cinnamique, quercétine, syringétine glycosides, malvidol, petunidine, etc...

En plus des alcaloïdes et des composés phénoliques (comme les composés les plus importants de *C. roseus*), la présence de différents groupes chimiques, tels que les polyphénols, les stéroïdes, les glycosides flavonoïdes, les anthocyanes et les glucosides iridoïdes, a été confirmée dans différentes parties de la plante (Ferrerres *et al.*, 2011; Nejat *et al.*, 2015).

1.4 Utilisation

1.4.1 Importance ethnobotanique

La pervenche de Madagascar a été historiquement utilisée pour traiter plusieurs maladies. Elle a été utilisée comme remède populaire pour traiter le diabète (Tiong *et al.*, 2013), le paludisme, les piqûres d'insectes, l'infection de la peau (Joy *et al.*, 1998), la dysenterie, l'irritation des yeux, la dyspepsie, les maux de dents, le mal de gorge, la congestion pulmonaire (Nejat *et al.*, 2015), la diarrhée (Hassan 2011), et la leucémie (van Der Heijden *et al.* 2004), etc...

A Madagascar, les feuilles sont utilisées comme émétique; et les racines sont utilisées comme purgatif, vermifuge, dépuratif, hémostatique. Aux Philippines, les feuilles sont utilisées comme un traitement de base pour le diabète, les jeunes feuilles sont utilisées pour stopper les crampes d'estomac, et les racines sont utilisées contre les parasites de l'intestin. Aux Antilles, l'infusion aqueuse de fleurs ou de feuilles pulvérisées est employée contre la toux et contre l'hypertension artérielle (Bergen and Snoeijer, 1996; Aslam *et al.*, 2010).

Même en Europe, la pervenche de Madagascar a été utilisée comme un remède populaire contre le diabète pendant des siècles. A Hawaï, la plante est utilisée pour arrêter le saignement. Les Chinois ont largement appliqué cette plante dans le traitement de la leucémie, l'hypertension, le lymphome folliculaire géant et comme un remède contre la toux, l'inflammation et les maux de gorge. A Hong Kong et en Corée, cette plante est approuvée en tant que source de traitement médical alternatif pour la leucémie. Au Japon, la *C. roseus* est appliquée en tant qu'antidiabétique, elle est utilisée aussi pour arrêter les tumeurs malignes lymphatiques (Nejat *et al.*, 2015).

1.4.2 Importance thérapeutique

Catharanthus roseus renferme des AITs ayant des propriétés thérapeutiques, essentiellement, anticancéreuses : la vinblastine et la vincristine (van Der Heijden *et al.*, 2004). La vinblastine est spécialement destinée pour le traitement de la maladie de Hodgkin, la vincristine de son côté est prescrite pour les leucémies aiguës de l'enfant. Quand à la Navelbine, alcaloïde obtenu par hémisynthèse (Magnus and Thurston, 1991), elle est indiquée dans le traitement du cancer du poumon et du sein (Tanaka and Yoneda, 2015; Pang *et al.*, 2016).

Cependant, la catharanthine, la vindoline et la vindolinine sont connues comme des diurétiques (Zhu *et al.*, 2015). Tandis que, l'ajmalicine possède une action antihypertensive et la leurosine présente une action hypoglycémiant et cytotoxique (Daniel, 2016).

Ainsi, nous pouvons constater qu'un certain nombre de pratiques traditionnelles ont un fondement réel. Après les criblages et analyses effectués par les compagnies pharmaceutiques dans les années 1960, l'analyse des pratiques de la médecine traditionnelle s'est avérée d'une

grande utilité pour orienter les recherches dans le domaine médicinal pour l'élaboration de différentes thérapies.

1.5 Mode d'action

L'activité anticancéreuse de la vinblastine et la vincristine est reliée au blocage de la division cellulaire. C'est-à-dire, qu'au début de la mitose, les deux dimères se fixent d'une manière spécifique sur la tubuline en inhibent la formation des microtubules qui forment le fuseau achromatique, par la suite le cycle cellulaire s'arrête au niveau de la métaphase. De ce fait, ces alcaloïdes sont désignés sous le terme de poisons du fuseau achromatique ou inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. Lobert *et al.* (1996) ont mis en évidence le mécanisme de l'interaction des alcaloïdes vinca (vinblastine, la vincristine et Navelbine) avec la tubuline et l'inhibition de l'assemblage des microtubules.

2 Métabolites secondaires (Les alcaloïdes) de la pervenche de Madagascar

Les métabolites secondaires sont une classe de composés phytochimiques représentée par un grand nombre (plus de 100.000) substances différentes susceptibles d'être utilisées en médecine, dans la protection des végétaux ainsi que dans l'attraction des pollinisateurs par les pigments et les arômes (Bourgaud *et al.*, 2001). Ces composés présentent un grand intérêt, car ils possèdent des propriétés essentielles comme antibiotique, antifongique, antivirale (Bourgaud *et al.*, 2001), antioxydant et antidiabétique (Tiong *et al.*, 2013), antiarythmiques et anticancéreux (Wink *et al.*, 2005). Ces métabolites sont produits en très petites quantités (moins de 1% du carbone total), bien qu'ils soient souvent très efficaces à ces concentrations (Verpoorte *et al.*, 2000).

La synthèse des métabolites secondaires est fréquemment influencée par les conditions environnementales comme la lumière, la chaleur, la sécheresse, les insectes, les attaques de pathogènes et les blessures mécaniques (Bourgaud *et al.*, 2001).

Les métabolites secondaires sont répartis en trois grands sous-groupes: les terpénoïdes qui constituent le plus grand sous- groupe, les composés phénoliques et les composés azotés. Dans ce dernier sous-groupe, les alcaloïdes sont les plus importants vu qu'ils se retrouvent dans 20% des espèces végétales, et ils comprennent plus de 20.000 composés (Gruissem, 2015).

2.1 Alcaloïdes

2.1.1 Généralité

Le terme alcaloïde ou « alkaly-like » (alkaly = soude ; like = qui a l'apparence) a été proposé pour la première fois par le pharmacien allemand Meissner en 1819 (Friedrich and von Domarus, 1998). Du point de vue biologique, les alcaloïdes sont des substances naturelles organiques basiques et hétérocycliques contenant dans leurs structures chimiques complexes un atome d'azote (Wink *et al.*, 2005). Ces composés sont très majoritairement d'origine végétale et peuvent manifester des activités biologiques et/ou pharmacologiques diverses (Aniszewski, 2007).

D'autre part, Waller et Nowacki (1978), ont mentionné de nombreuses caractéristiques des alcaloïdes. Ils ont surtout attiré l'attention sur la présence de l'atome d'azote dans la structure chimique des alcaloïdes, ce qui leur confère une nature alcaline. Cet atome provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. En outre, ces composés chimiques ont au moins un cycle dans leur structure qui n'est pas nécessairement hétérocyclique.

2.1.2 Classification

Guirimand *et al.* (2010), estiment qu'il y a au moins 12 000 alcaloïdes différents déjà identifiés et isolés à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. En général, les alcaloïdes sont classés selon leur précurseur biosynthétique qui est un acide aminé. De ce fait, il existe des alcaloïdes dérivés de l'ornithine, de la lysine, de la tyrosine, de la phénylalanine ou du tryptophane (Aniszewski, 2007).

Autrement, d'un point de vue structurel, les alcaloïdes sont divisés selon leurs formes et leurs origines en trois principaux types d'alcaloïdes: les alcaloïdes vrais ; les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes. Les alcaloïdes vrais et les protoalcaloïdes sont dérivés des acides aminés, alors que les pseudoalcaloïdes ne sont pas dérivés des acides aminés (Thomson, 2012). De ce fait, l'atome d'azote est incorporé, dans la structure des pseudoalcaloïdes, à un stade avancé de la biosynthèse par réaction d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (Muniz, 2006).

2.2 Alcaloïdes indoliques

Les alcaloïdes indoliques sont une classe d'alcaloïdes contenant dans leurs structures chimiques un groupe d'indole. Le tryptophane est le précurseur biochimique des alcaloïdes indoliques, qui possède une chaîne d'indole latérale dans sa structure chimique. Il dérive de la voie du shikimate (Ramani *et al.*, 2013). En fonction de la voie de biosynthèse, deux types d'alcaloïdes indoliques sont distingués : non-isoprénoïdes et isoprénoïdes. Ces derniers comprennent des résidus d'isoprène dans leurs structures, d'où le groupe des alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs), qui forme l'un des plus grand groupe d'alcaloïdes chez les végétaux, soit plus de 4100 composés différents connus (Cseke *et al.*, 2016). Un grand nombre d'entre eux possède une activité physiologique importante et certains d'entre eux sont utilisés en médecine (Pan *et al.*, 2015).

Malgré la diversité structurelle considérable des AITs, la plupart d'entre eux est localisée dans trois familles de plantes dicotylédones: *Apocynaceae*, *Rubiaceae* et *Loganiaceae* (Aniszewski, 2007). Plusieurs produits pharmaceutiques, appartenant aux AITs, sont isolés à partir des plantes de ces trois familles (Tableau 2), comme l'alcaloïde antipaludique «la quinine» rencontrée dans *Cinchona officinalis*, l'antinéoplasique «la camptothécine» extrait de la *Camptotheca acuminata*, le stimulant « la yohimbine » isolé à partir de *Pausinystalia yohimbe* et de *C. roseus*, les antihypertenseurs et tranquillisants « la réserpine et l'ajmalicine » isolées à partir d'espèces de *Rauwolfia sp.* et les agents antitumoraux vinblastine et la vincristine à partir de *C. roseus* (Bergen and Snoeijer 1996; van Der Heijden *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2015).

✓ **Tableau 2. Action de quelques AITs, leurs fonctions et les plantes sources.**

Alcaloïdes	Fonction	Plantes	Famille	Références
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Rauwolfia</i> sp.	<i>Apocynaceae</i>	(Thakore <i>et al.</i> , 2012; Mehrotra <i>et al.</i> , 2014; Pan <i>et al.</i> , 2015)
Camptothecine	Antinéoplasique	<i>Camptotheca acuminata</i>	<i>Cornaceae</i>	(Muniz, 2006)
Ellipticine	Anticancéreux	<i>Ochrosia elliptica</i>	<i>Apocynaceae</i>	(Ramawat, 2007)
Emetine	Anti-protazoaire	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	<i>Rubiaceae</i>	(Nomura and Kutchan, 2010)
Quinine	Antipaludique	<i>Cinchona</i> sp.	<i>Rubiaceae</i>	(Achan <i>et al.</i> , 2011)
Rescinnamine, Reserpine	Antihypertenseur	<i>Rauwolfia</i> sp.	<i>Apocynaceae</i>	(Cseke <i>et al.</i> , 2016)
Serpentine	Sédatif	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Apocynaceae</i>	(Hughes <i>et al.</i> , 2004)
Toxiferine	Myorelaxant	<i>Strychnos toxifera</i>	<i>Loganiaceae</i>	(Manske, 2014)
Vinblastine, vincristine	Anticancéreux	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Apocynaceae</i>	(Ishikawa <i>et al.</i> , 2009)
Vincamine	Augmente le flux sanguin vers le cerveau	<i>Vinca minor</i>	<i>Apocynaceae</i>	(Farahanikia <i>et al.</i> , 2011)
Yohimbine	Stimulant et effet aphrodisiaques	<i>Pausinystalia yohimbe</i> , <i>Catharanthus roseus</i>	<i>Rubiaceae</i>	(Bruneton, 1999)

2.3 Biosynthèse des AITs

La *Catharanthus roseus* a une capacité à produire une grande variété des AITs (plus de 130), qui ont une valeur économique très importante en relation avec leurs utilisations dans l'industrie pharmaceutique (Pan *et al.*, 2015). Les très faibles quantités de ces AITs et la difficulté de leur purification expliquent leurs coûts élevés. Cela a incité les chercheurs à consentir des efforts considérables pour mener des études approfondies sur la biosynthèse des AITs. Aujourd'hui, les outils " omiques ", tels que la génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique, peuvent nous fournir d'énormes quantités d'informations sur les gènes, les enzymes, les facteurs de transcription, les intermédiaires, les voies et la compartimentation de la biosynthèse des AITs chez *C. roseus*. Ces outils seront très utiles pour clarifier certaines parties

non résolues de la voie iridoïdes, la biosynthèse de la catharanthine, le transport, et le signal de transduction et la régulation de la voie de biosynthèse, afin de permettre d'augmenter l'accumulation de ces molécules d'intérêt dans les tissus végétaux (Mahroug *et al.*, 2007).

La voie biosynthétique des AITs chez *Catharanthus roseus* est complexe, elle comprend au moins 30 étapes régulées de manière coordonnée par des enzymes, produisant au moins 35 intermédiaires connus (Pan *et al.*, 2015).

2.3.1 Biosynthèse des précurseurs des AITs, la tryptamine et la secologanine

La tryptamine et la secologanine sont les deux précurseurs impliqués dans la biosynthèse des AITs chez *C. roseus*. Ils proviennent de deux voies métaboliques indépendantes. Le précurseur de l'indole, la tryptamine, est dérivé de la voie shikimate, alors que le précurseur de monoterpène glucoiridoïde, secologanine, dérive d'une voie beaucoup plus complexe, la voie sécoiridoïdes, que la voie shikimate, (Almagro *et al.*, 2013).

En effet, le précurseur initial de la biosynthèse de la secologanine est l'isopentényl diphosphate (IPP), qui provient de deux voies différentes (Figure 2): la voie mévalonate qui se déroule dans le cytoplasme ; et la voie 2-méthyl-érythritol 4-phosphate (MEP) qui a lieu au niveau des plastides (Almagro *et al.*, 2013). L'IPP se transforme en geraniol par deux enzymes : la geranyl diphosphate synthase (GDPS) ; et la phosphatase (Figure 3). Ensuite, la geraniol subit une hydroxylation par la geraniol 10- hydroxylase (G10H), cette enzyme est une monooxygénase de la famille des cytochromes P450, conduit à la formation de la 10-hydroxygeraniol. Cette dernière molécule va être convertie en loganine (El-Sayed and Verpoorte, 2007). La dernière étape de la conversion de loganine en secologanine est effectuée par la secologanine synthase (SLS), qui appartient aussi à la famille des cytochromes P450 (Pan *et al.*, 2015).

Quant à la tryptamine, elle est produite par la décarboxylation du tryptophane avec la tryptophane decarboxylase (TDC) au niveau du cytosol des cellules apicaux des racines (Zhu *et al.*, 2014).

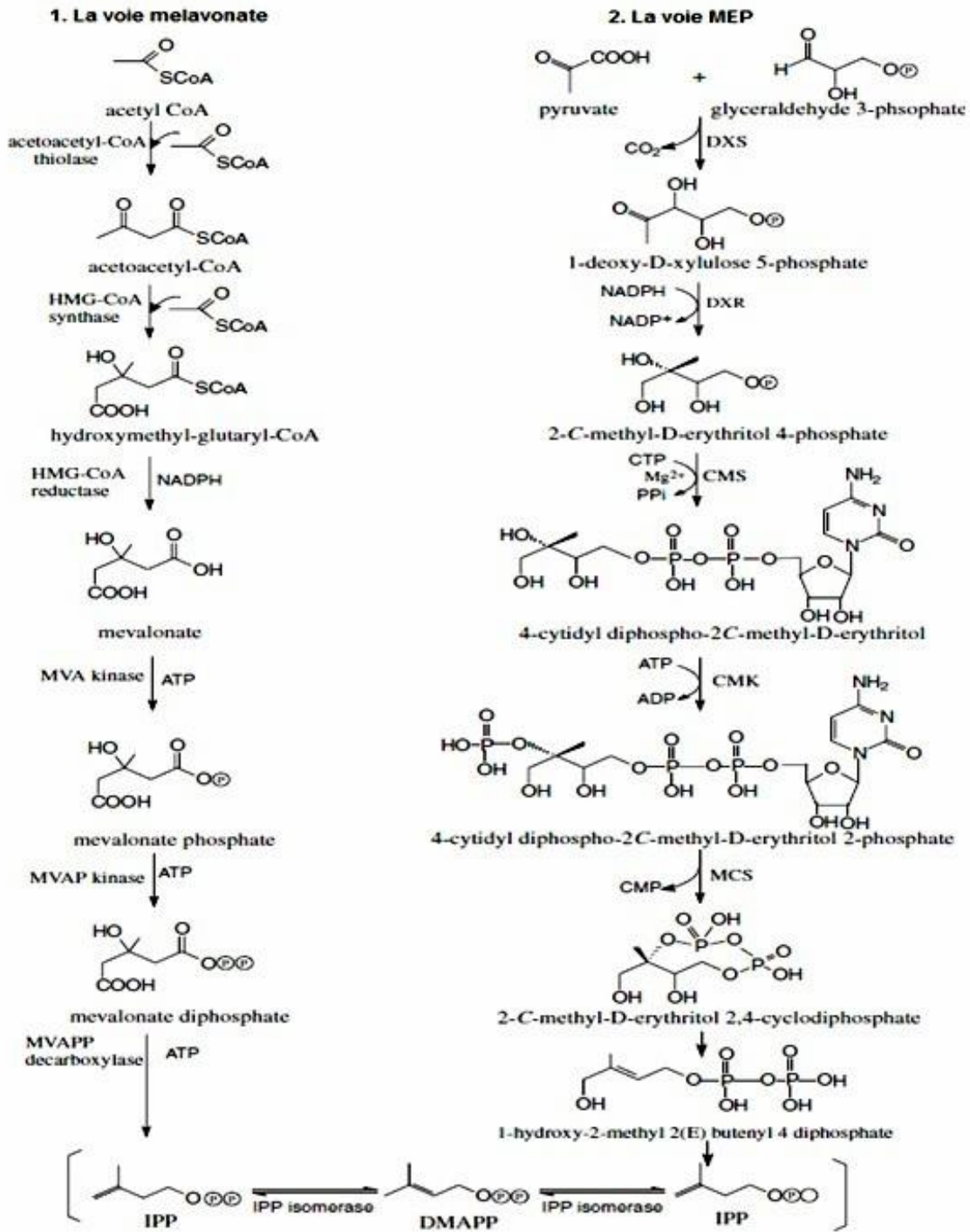


Figure 2. Biosynthèse de l'IPP par la voie mévalonate et la voie MEP (El-Sayed and Verpoorte, 2007).

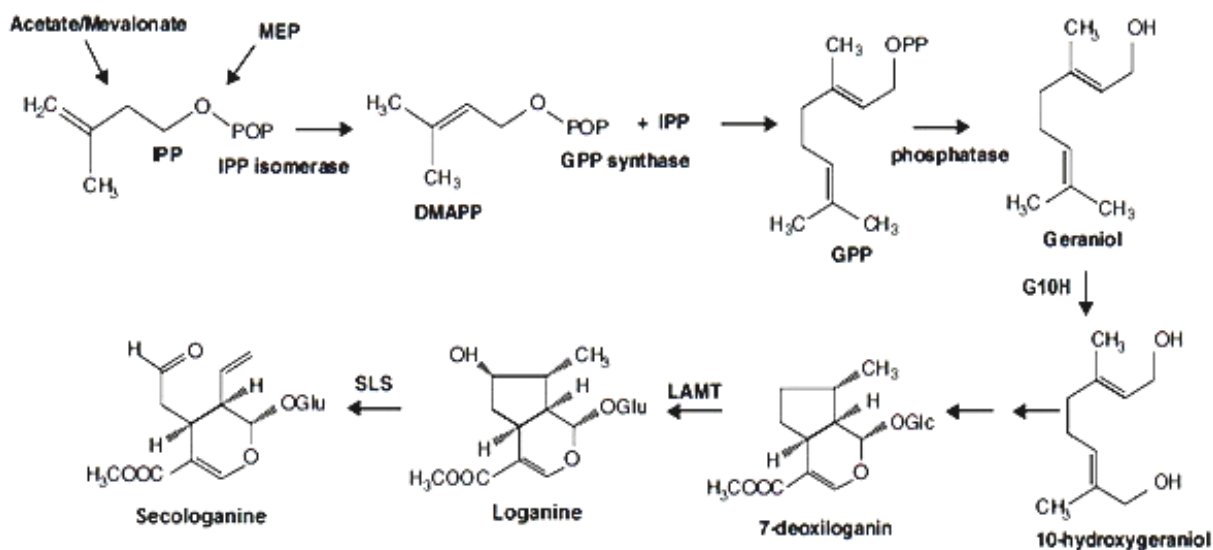


Figure 3. Biosynthèse de la secologanine (Almagro *et al.*, 2013).

2.3.2 Biosynthèse du précurseur principale des AITs, la strictosidine

L'étape stratégique de la voie de biosynthèse des AITs est la condensation des deux précurseurs la tryptamine et la secologanine par la synthase strictosidine (STR) pour produire, le précurseur aglycone universel de tous les AITs, la strictosidine (Figure 4). Par la suite, la strictosidine b-D-glucosidase (SGD) hydrolyse la fraction de glucose de la strictosidine pour former un produit instable, qui est rapidement converti en 4,21- dehydrogeissoschizine (Figure 4), un dialdéhyde hautement réactif, à partir duquel plus de 2000 AITs sont dérivées (Guirimand *et al.*, 2010). La SGD est une glycoprotéine localisée dans le réticulum endoplasmique et est hautement spécifique pour la strictosidine. Cette enzyme est codée par un seul gène, qui s'exprime à différents niveaux dans les fleurs, les tiges, les feuilles et les racines, ce qui suggère une régulation spécifique au niveau des tissus (Geerlings *et al.*, 2000).

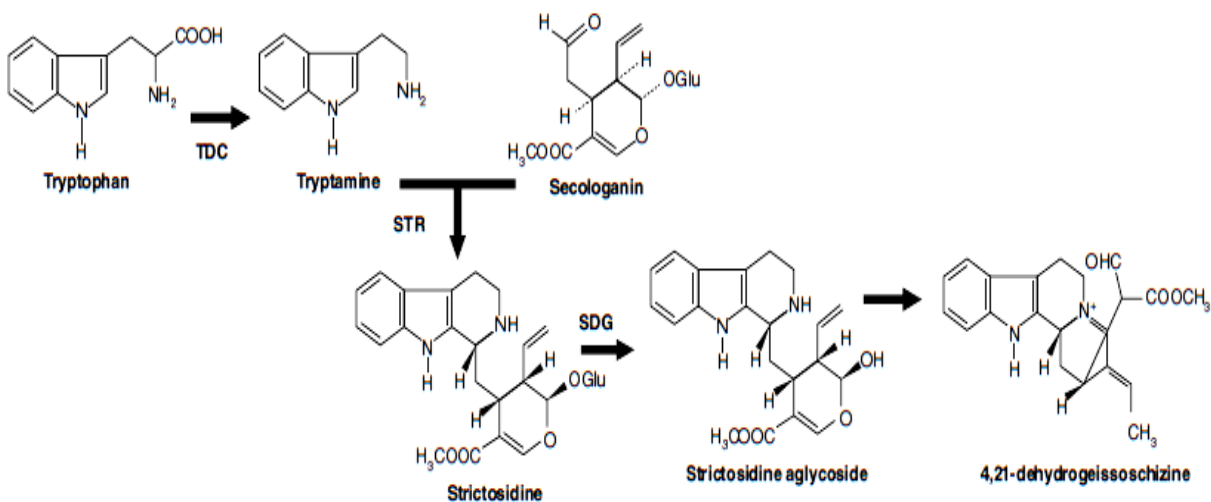


Figure 4. Biosynthèse de la strictosidine et de la 4,21-dehydrogeissoschizine (Almagro et al., 2013).

2.3.3 Biosynthèse des AITs à partir de la strictosidine

La 4,21-dehydrogeissoschizine, produite à partir de la strictosidine (Figure 4), représente un intermédiaire clé qui mène à la biosynthèse de plusieurs AITs. La 4,21-dehydrogeissoschizine est convertie en stemmadenine et en cathenamine (Almagro *et al.*, 2013).

La cathenamine, qui est une carbinolamine très réactive, est réduite par l'enzyme cathenamine réductase (CR) pour former l'ajmalicine (Figure 5), dans le cytosol des cellules épidermiques (Almagro *et al.*, 2013). Ensuite, l'ajmalicine est oxydée, au niveau des vacuoles, par des peroxydases de la classe III (Prx) pour former la serpentine (Blom *et al.*, 1991).

Par ailleurs, la stemmadenine est la molécule de départ pour la formation de la catharanthine et / ou la tabersonine (Figure 6), au niveau du cytosol des cellules d'épiderme (El-Sayed and Verpoorte, 2007). Cependant, les enzymes et les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces deux molécules sont mal caractérisés jusqu'à maintenant (Pan *et al.*, 2015).

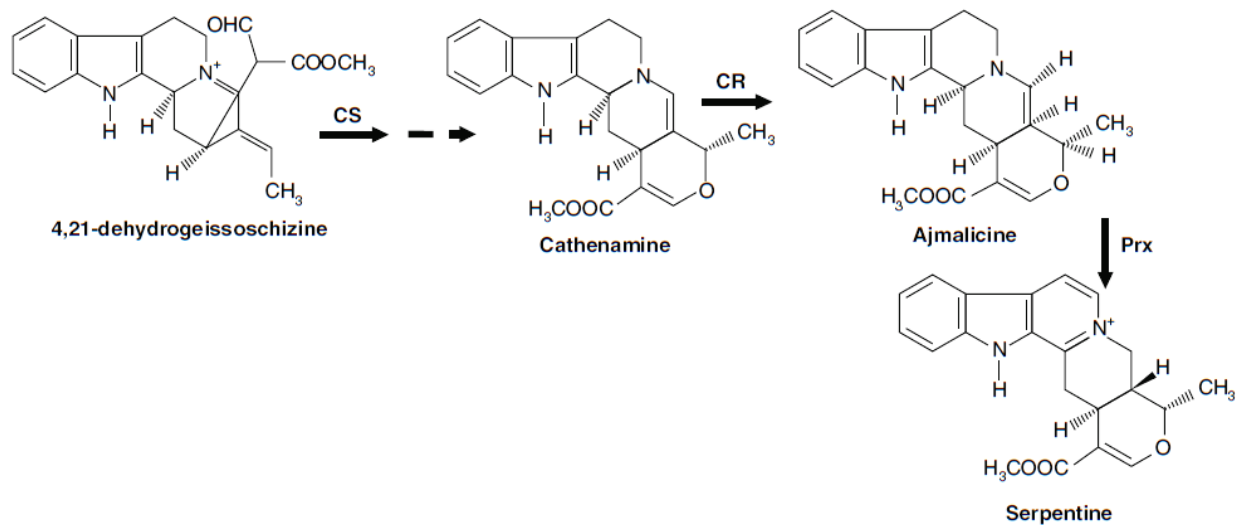


Figure 5. Biosynthèse de l'ajmalicine et la serpentine (Almagro et al., 2013).

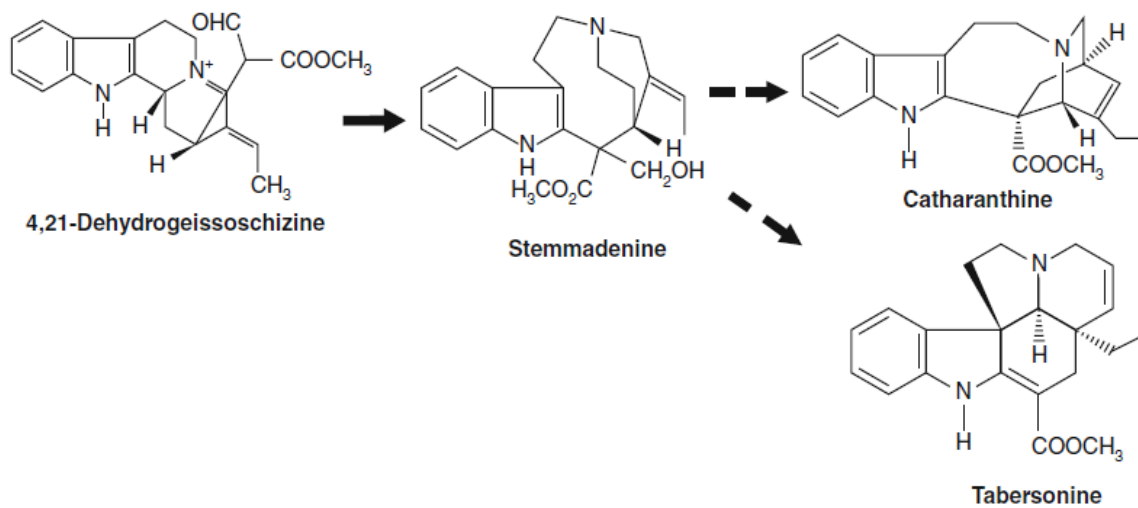


Figure 6. Biosynthèse de la catharanthine et la tabersonine (Almagro et al., 2013).

D'autre part, la voie de biosynthèse de la vindoline à partir de la tabersonine est assez bien établie. Cette voie comprend 6 étapes enzymatiques (Figure 7):

- ✓ L'hydroxylation de la tabersonine en position 16 par la tabersonine 16-hydroxylase (T16H), une enzyme qui appartient à la famille des cytochromes P450 localisée au niveau du réticulum endoplasmique dans les cellules épidermiques des feuilles, en donnant la 16-hydroxytabersonine (Besseau *et al.*, 2013);
- ✓ L'o-méthylation de 16-hydroxytabersonine par O-méthyltransférase (16OMT) pour former la 16-méthoxytabersonine (Murata and De Luca 2005);
- ✓ L'hydratation de la double liaison 2,3 du 16-méthoxytabersonine par une hydroxylase non identifiée (Guirimand *et al.*, 2011);
- ✓ La méthylation du 16-méthoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine par la N-méthyltransférase (NMT) pour produire la desacetoxyvindoline, la NMT est localisée dans la membrane des thylacoïdes des chloroplastes dans les cellules de parenchyme (Guirimand *et al.*, 2011);
- ✓ L'hydroxylation en position 4 de la desacetoxyvindoline par l'enzyme cytosolique desacetoxyvindoline-4-hydroxylase (D4H) pour établir la deacetylvindoline (Pan *et al.*, 2015);
- ✓ En dernier, l'acétylation de la deacétylvindoline par la deacétylvindoline-4-O-acétyltransférase (DAT) pour former la vindoline au niveau du cytosol des cellules laticifères (St-Pierre *et al.*, 1999).

La biosynthèse de la vindoline est restreinte aux cotylédons et aux jeunes feuilles des plantes adultes, où l'activité enzymatique de NMT, D4H et DAT est élevée dans ces tissus (Vázquez-Flota *et al.*, 2002). En outre, l'activité de D4H et DAT augmente de manière significative, dans les plantules de *C. roseus* exposées à la lumière (Zhao *et al.*, 2001a). D'autre part, plusieurs travaux montrent que l'application du méthyl jasmonate (MeJa) augmente l'activité enzymatique de D4H, DAT, STR et TDC et induit également une importante accumulation de vindoline (Zhao *et al.*, 2001a; Hernández-Domínguez *et al.*, 2004; Campos-Tamayo *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015).

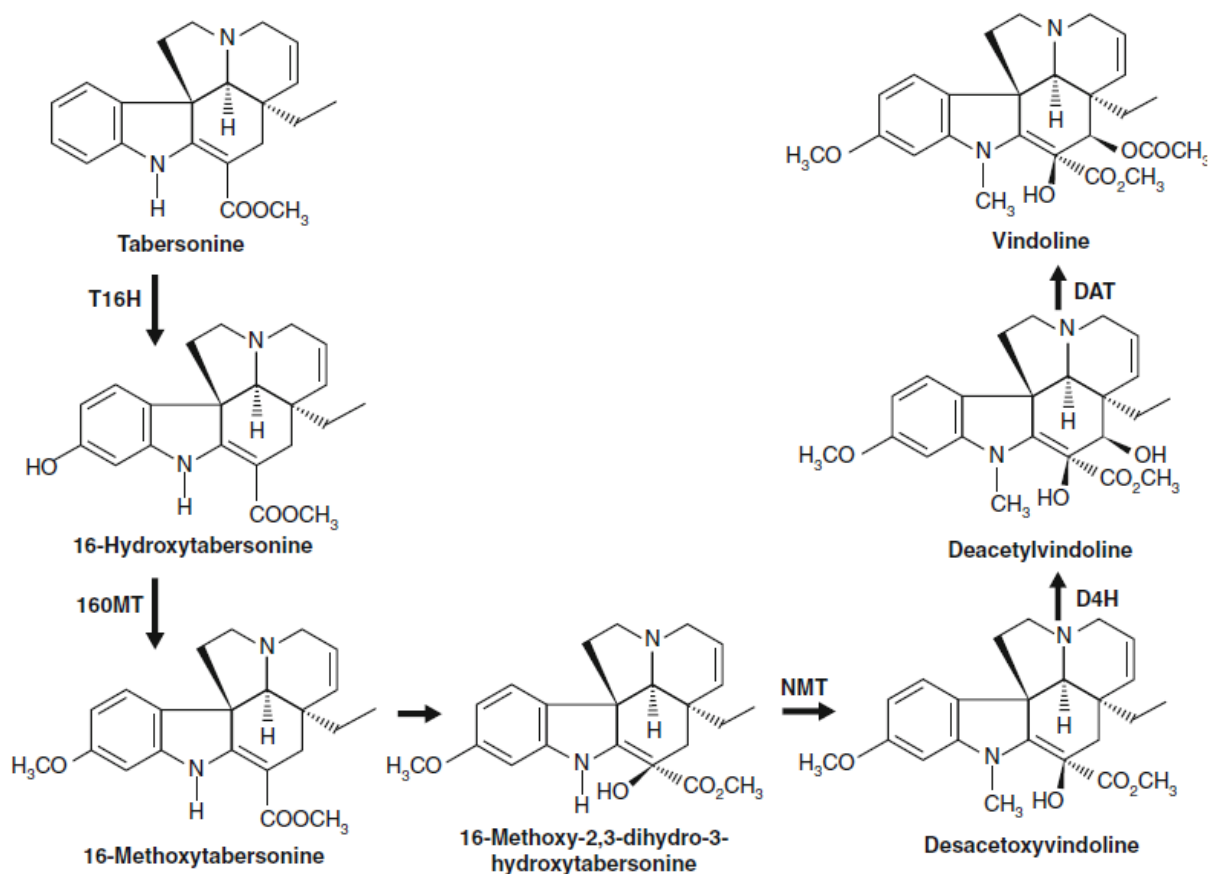


Figure 7. Biosynthèse de la vindoline (Guirimand *et al.*, 2011).

Par ailleurs, dans les racines, la tabersonine est convertie en 19-O-acétylhörhammericine dans le cortex racinaire, par deux voies alternatives (Hughes *et al.*, 2004). La première est la conversion de la tabersonine en lochnericine suivie par la formation d'hörhammericine par l'intermédiaire de la tabersonine 19-hydroxylase (T19H), une enzyme qui appartient à la famille des cytochromes P450 localisée au niveau du réticulum endoplasmique des cellules épidermiques de racines (Giddings *et al.*, 2011). Par la suite, la hörhammericine est convertie en 19-O-acétylhörhammericine par la minovincinine-19-hydroxy-O-acétyltransférase (MAT). L'autre voie commence par la formation du 6,7-dehydrominovincinine qui sera convertie par la MAT en 19-O-acétylhörhammericine (Pan *et al.*, 2015).

Enfin, les précurseurs monomères de la vindoline et la catharanthine sont couplés dans une réaction catalysée par une peroxydase de classe III (CrPrx1) localisée dans les vacuoles (Costa *et al.*, 2008), pour donner l'alcaloïde dimérique 3',4'-anhydrovinblastine, qui est converti en vinblastine puis en vincristine (Figure 8) (Sottomayor *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

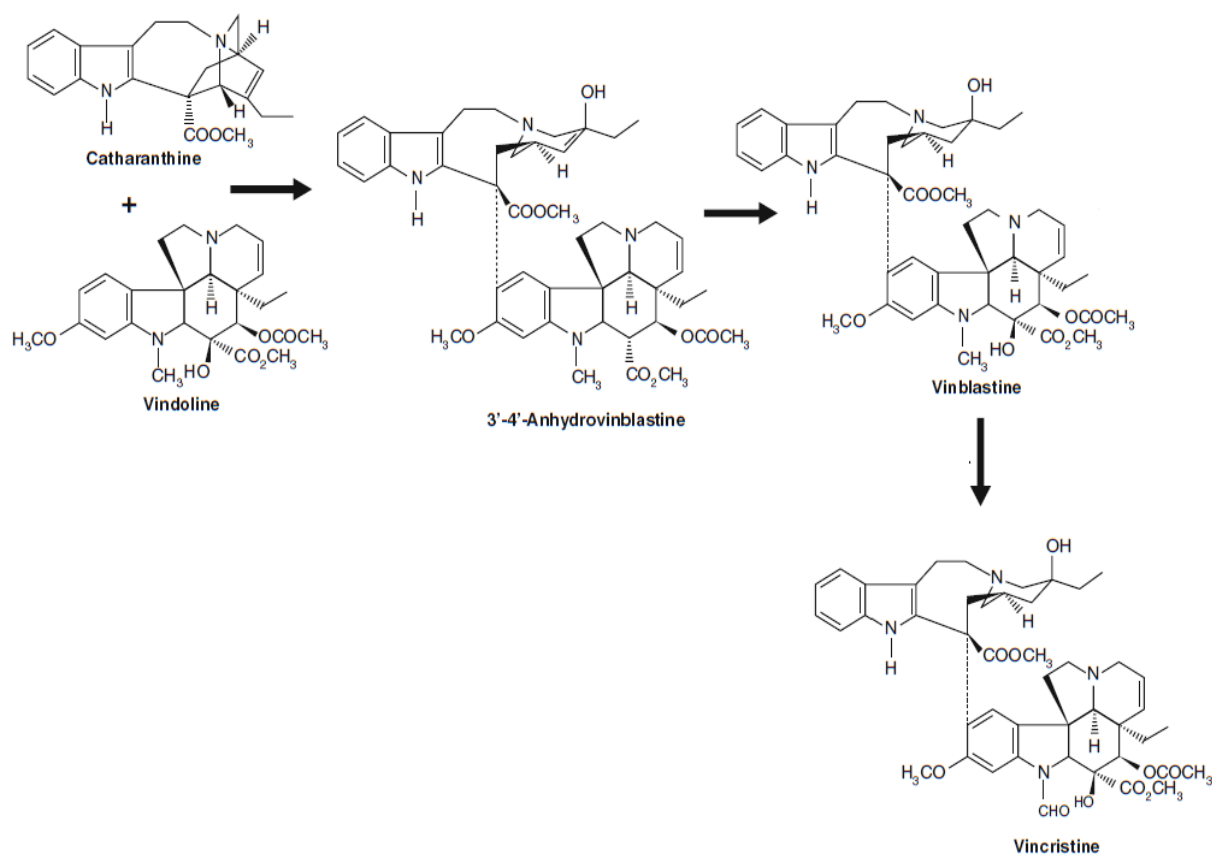


Figure 8. Biosynthèse de la vinblastine et de la vincristine (Zhu *et al.*, 2014).

2.3.4 Compartimentation et Différenciation cellulaire de la voie de biosynthèse des AITs

Les enzymes impliquées dans la voie de la biosynthèse des AITs sont réparties au moins sur quatre différents types de cellules, qui se trouvent au moins dans cinq compartiments subcellulaires différents (Courdavault *et al.*, 2014).

La compartimentation cellulaire et subcellulaire impliquée dans la voie de biosynthèse des AITs (Figure 9), est considérée comme un autre mécanisme de régulation (Guirimand *et al.*, 2011). Les enzymes TDC, T19H et MAT sont localisées dans les cellules apicales des racines (Pan *et al.*, 2015). Tandis que, les enzymes SLS, STR, SGD, T16H et 16OMT sont localisées dans les cellules épidermiques des organes aériens (Yu and Luca, 2014). Cependant, les enzymes D4H et DAT sont limitées aux cellules laticifères au niveau des feuilles, des tiges et des bourgeons floraux (Mahroug *et al.*, 2007). D'autre part, les deux enzymes la G10H et la NMT sont localisées dans les cellules parenchymateuses du phloème, au niveau des organes aériens (El-Sayed and Verpoorte, 2007).

Au niveau subcellulaire, les cytochromes P450 la SLS, la SGD et la T16H sont situées dans les systèmes endomembranaires, plus précisément dans le réticulum endoplasmique (RE) (St-Pierre *et al.*, 1999; Murata and De Luca 2005; Giddings *et al.*, 2011). Seulement, l'enzyme G10H est une cytochrome P450 localisée sur le tonoplaste des vacuoles (El-Sayed and Verpoorte, 2007).

Par ailleurs, les réactions catalysées par les enzymes TDC, 16OMT, D4H, et DAT sont réalisées dans le cytosol (Mahroug *et al.*, 2007). Tandis que, les réactions catalysées par l'enzyme STR et les enzymes peroxydases la classe III sont situées dans les vacuoles (Costa *et al.*, 2008). D'autre part, l'enzyme NMT est restreinte au niveau de la membrane des thylacoïdes dans les chloroplastes (Yu and Luca, 2014).

La compartimentation cellulaire et subcellulaire complexe de la voie des AITs, indique que le transfert des intermédiaires entre les différents types de cellules et compartiments cellulaires,

révèle une grande difficulté qui peut entraver sa production par voie biotechnologique (Courdavault *et al.*, 2014).

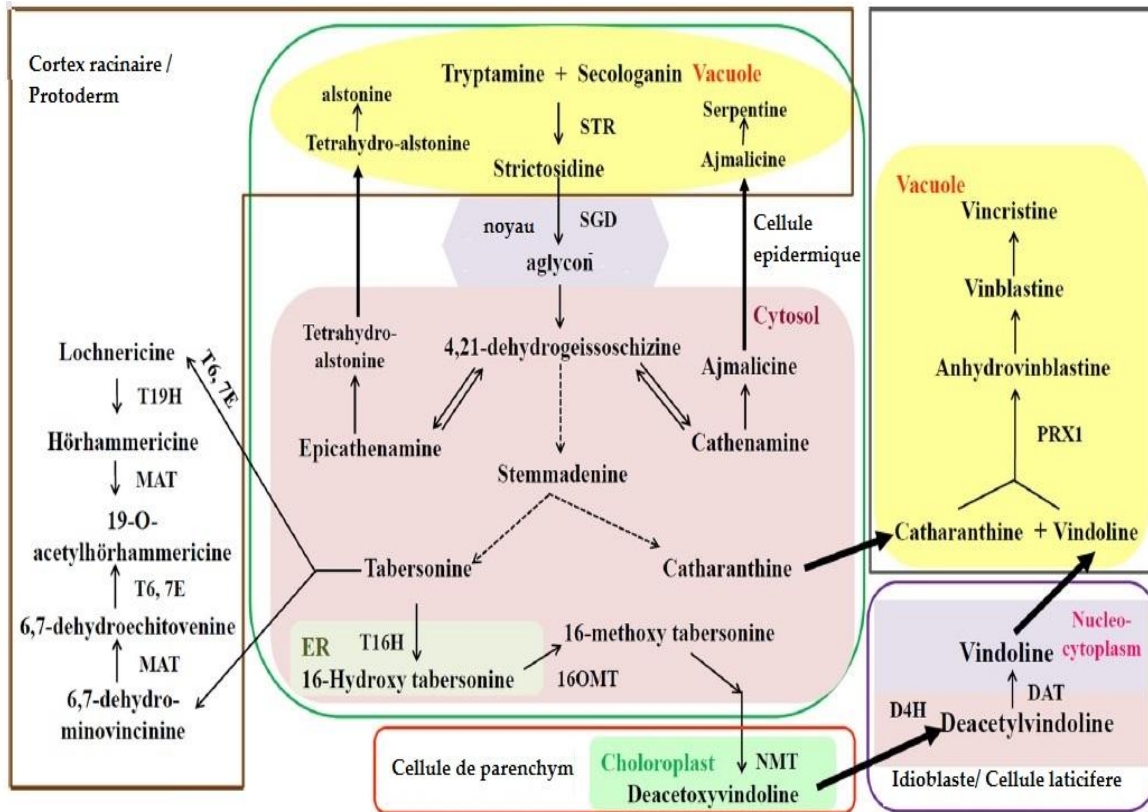


Figure 9. Voie de biosynthèse des AITs et sa compartimentation cellulaire et subcellulaire (Pan *et al.*, 2015).

3 Maladie du chevelu racinaire

3.1 Agrobacterium rhizogenes

La bactérie *Agrobacterium rhizogenes* appartient à la famille des *Rhizobiacées*. Elle a été isolée pour la première fois à partir du sol par Beijerinck et van Delden en (1902). Puis, elle a été nommée comme *Phytomonas rhizogenes* et identifiée comme un agent responsable de la maladie des chevelus racinaires (Hairy root) par Riker *et al.*, (1930). En 1942, Conn a établi le genre

Agrobacterium dans la famille des *Rhizobiacées* et il a donné l'appellation *Agrobacterium rhizogenes* à cette bactérie. Récemment, Young *et al.*(2001) a révisé le nom de l'*A. rhizogenes* pour lui donner une nouvelle appellation: *Rhizobium rhizogenes*.

L'*A. rhizogenes* est une bactérie du sol à coloration Gram- négative, elle se présente sous forme d'un bacille de 0,6 à 1 µm de largeur et de 1,5 à 3 µm de longueur. Ainsi, elle est mobile grâce à 1 à 6 flagelles (Conn, 1942; White and Nester, 1980). Elle vit en aérobie, car elle possède un métabolisme de type respiratoire avec l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons (Veena and Taylor, 2007).

L'*A. rhizogenes* infecte les cellules végétales blessées, en raison de leur production de composés phénoliques qui attirent ces bactéries, qui se déplacent vers le site de lésion par chimiotaxie (Gelvin, 2012). Après le déplacement et l'infection de la plante au niveau du site de la blessure, l'*A. rhizogenes* s'attache à la cellule végétale et transfère son matériel génétique (ADN-T) dans le génome de la plante, ce qui conduira au développement de la maladie des chevelus racinaires (Chilton *et al.*, 1982; Hwang and Gelvin, 2015).

3.2 Plasmide Ri

L'*A. rhizogenes* possède un grand plasmide Ri (250 kb) (Figure 10), qui induit la maladie des chevelus racinaires, en provoquant la prolifération des racines transgéniques à partir du site d'infection (Veena and Taylor, 2007). Lorsque *A. rhizogenes* infecte les plantes, une partie du plasmide Ri, l'ADN-T (ADN transféré) est transféré dans la cellule végétale, intégré dans le génome de la plante, ensuite exprimé en ARNm polyadénylé (Chilton *et al.*, 1982; White *et al.*, 1985).

Les souches d'*A. rhizogenes* les plus étudiées, qui appartiennent au groupe des souches de type agropine, ont deux régions d'ADN-T sur leur plasmide Ri. Ces régions, désignées l'ADN-T_R (Right) et l'ADN-T_L (Left), qui peuvent être transférées indépendamment au génome nucléaire des cellules végétales infectées (Camilleri, 1991). Les souches AR15834 et A4 sont des souches typiques d'*A. rhizogenes*, de type agropine, et contiennent de grands plasmides totalement identiques pRi15834 et pRiA4, respectivement (White and Nester, 1980).

L'ADN-T_L transporte environ 18 gènes potentiels, dont quatre gènes *rol* (*root locus*), *rol A*, *rol B*, *rol C* et *rol D*, qui correspondent à des *ORF* (*open reading frames*) spécifiques (Slightom *et al.*, 1986). L'action synergique de ces gènes conduit à l'induction du syndrome des chevelus racinaires (CRs) chez la plante (Gaudin *et al.*, 1993). Néanmoins, des recherches sur *Nicotiana tabacum*, ont montré que chaque gène *rol* peut favoriser la formation des CRs. Cependant, chaque gène diffère de son efficacité; par exemple, *rol B* est plus puissant que *rol A* et *rol C* (Palazon *et al.*, 1997). L'ADN-T_R porte les gènes responsables de la synthèse d'opine, et les gènes représentant les deux étapes de la biosynthèse de l'auxine, appelés AUX1 et AUX2 (aussi appelé TMS1 et TMS2, respectivement) (Gaudin *et al.*, 1993; Nemoto *et al.*, 2009).

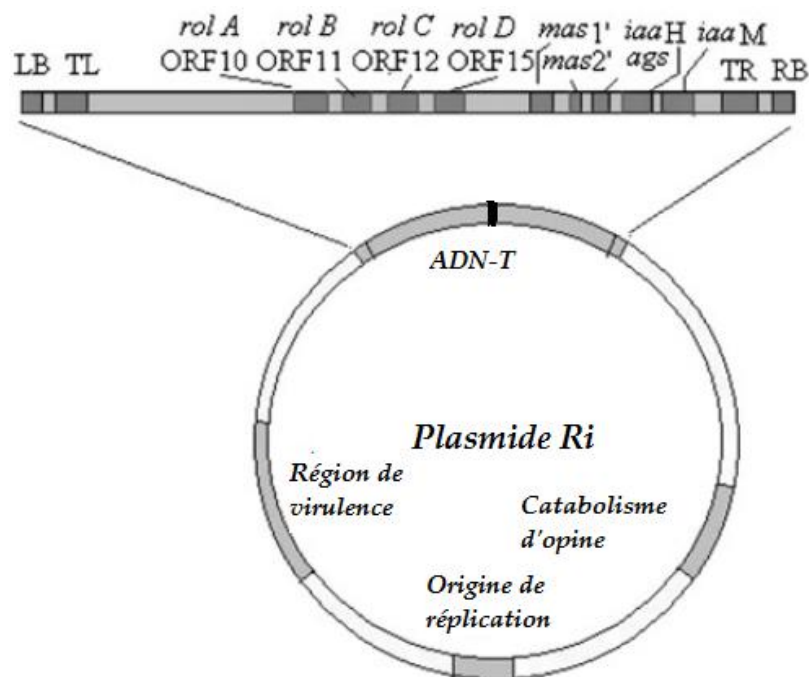


Figure 10. Structure de plasmide Ri d'*A. rhizogenes* (Chandra, 2012).

3.3 Processus de transformation de la cellule végétale par *Agrobacterium rhizogenes*

L'interaction entre l'*A. rhizogenes* et les cellules végétales peut être divisée en plusieurs étapes (Figure 11): reconnaissance; expression des gènes de virulence (*Vir*); attachement de la bactérie à la cellule hôte, sécrétion des protéines *Vir* et transfert de l'ADN-T dans la cellule végétale ; intégration d'ADN-T dans le génome de la cellule hôte et Expression des gènes portés par l'ADN-T.

Les cellules végétales blessées produisent des composés phénoliques, qui attirent les *A. rhizogenes* vers le site de la lésion par chimiotaxie (Gelvin, 2012). Lors de cette reconnaissance chimique, l'expression des gènes *Vir* sur le plasmide Ri est induite, suivie par l'attachement entre la bactérie et les cellules végétales (Lacroix and Citovsky, 2013). Par la suite, un mécanisme de transfert bactérien est produit et assemblé pour transférer le complexe T, c'est-à-dire, l'ADN-T associé à certaines protéines *Vir* dans le cytoplasme de la cellule hôte (Tzfira and Citovsky, 2006). Une fois à l'intérieur de la cellule végétale, un réseau sophistiqué de facteurs bactériens et végétaux, orientent la translocation de l'ADN-T dans le noyau de la cellule hôte (Ziemienowicz *et al.*, 2001). Par la suite, l'ADN-T s'intègre dans le génome de la cellule hôte, et, finalement, l'expression des gènes portés par l'ADN-T à l'origine des symptômes de la maladie du chevelu racinaire (Veena and Taylor, 2007).

Pour mieux comprendre le processus de transformation, une explication bien définie des étapes de transformation est présenté ci-dessous (Figure 11).

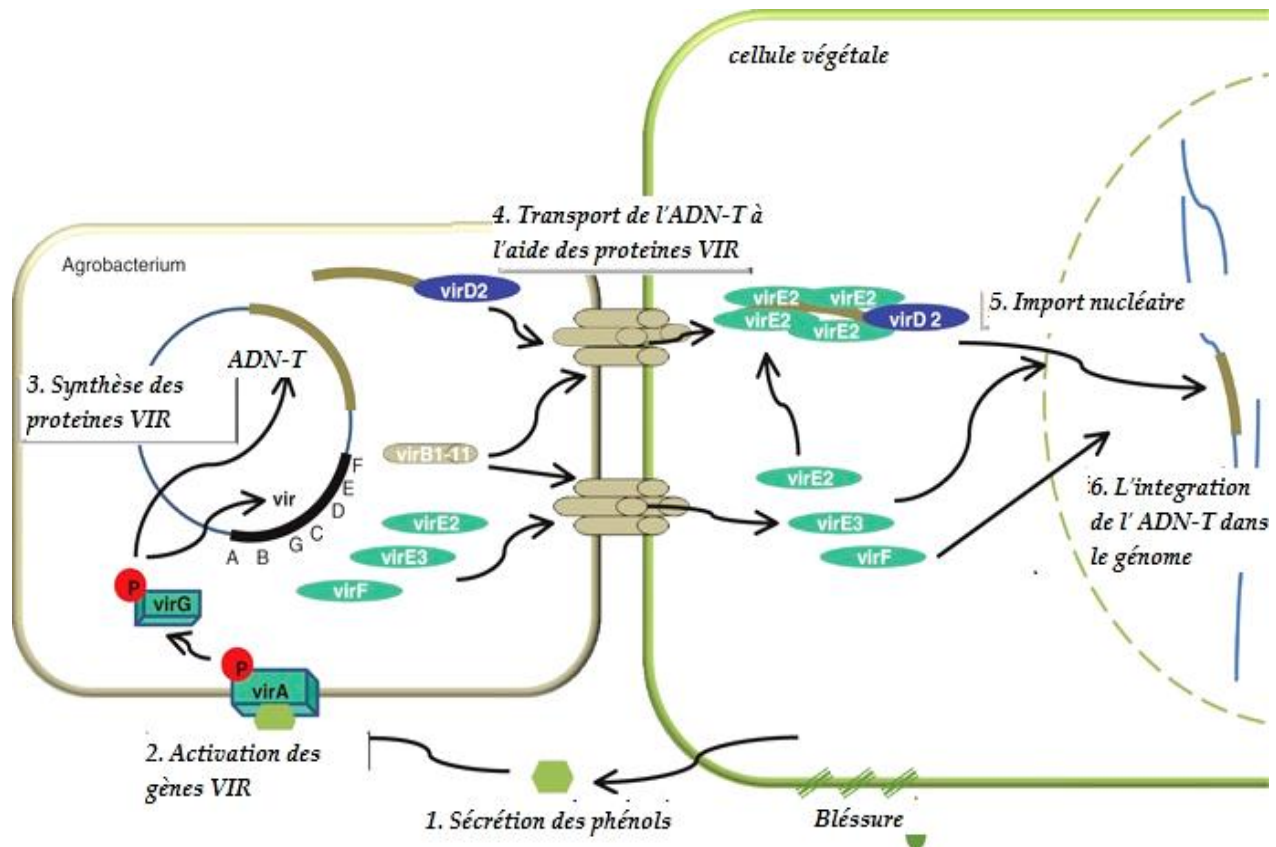


Figure 11. Représentation schématique de l'interaction *Agrobacterium*-plante (Pitzschke and Hirt, 2010).

3.3.1 Reconnaissance chimique entre la cellule végétale hôte et l'*Agrobacterium*

Le succès du processus de transformation des plantes par l'*Agrobacterium*, dépend principalement de la régulation de l'expression des gènes *Vir* par des composés phénoliques émis par les cellules végétales blessées (Gelvin, 2003). Le principal facteur végétal régulateur et activateur de la virulence d'*Agrobacterium* est le composé phénolique acétosyringone (AC), ce signal chimique capable d'induire l'expression du gène *Vir* même en l'absence de cellules végétales (Bolton *et al.*, 1986). Cependant, de nombreux autres composés phénoliques qui ont des caractéristiques structurales similaires à l'AC, peuvent également activer l'expression des gènes *Vir*, ce qui suggère qu'ils sont reconnus par un récepteur spécifique et unique sur la membrane plasmique bactérienne (Lee *et al.*, 1992).

Au niveau moléculaire, l'AC est reconnue par un système de récepteur composé de deux protéines *VirA* et *VirG* (Stachel and Zambryski, 1986; Wolanin *et al.*, 2002). Cette reconnaissance chimique de l'AC par les récepteurs *VirA / VirG* entraîne une forte expression de tous les gènes *Vir* (Pitzschke and Hirt, 2010).

Selon Shimoda *et al.* (1990), il y a une action synergique entre les signaux chimiques végétaux et les monosaccharides sur l'efficacité de la reconnaissance chimique. Plus précisément, lorsque la concentration de l'AC est faible, la présence des monosaccharides favorise la liaison entre l'AC et les récepteurs *VirA / VirG*. De plus, la présence de monosaccharides comme co-inducteurs peut aboutir à une augmentation de la gamme de composés phénoliques reconnue par le système d'induction des gènes *Vir* bactérien (Peng *et al.*, 1998). D'autre part, Deux conditions sont connues pour augmenter l'activation du système de virulence, un faible pH et une faible concentration en phosphate (Gao and Lynn, 2005).

3.3.2 Expression des gènes *Vir*

L'activation des gènes *Vir* par des signaux végétaux nécessite deux gènes *VirA* et *VirG* (Stachel and Zambryski, 1986), qui sont particulièrement exprimés à un niveau faible en absence des signaux végétaux, mais peuvent être hautement induits par l'intermédiaire d'un système d'autorégulation (Winans *et al.*, 1988). Les gènes *VirA* et *VirG* codent pour un système de récepteurs (régulation) à deux composants, dont la protéine *VirA* (récepteur membranaire) et la protéine *VirG* (récepteur intracellulaire) (Wolanin *et al.*, 2002). Lors de la détection du signal végétal par les bactéries, par l'intermédiaire du système de récepteur, l'histidine kinase de la *VirA* active *VirG* en transférant son phosphate à un aspartate particulier dans la *VirG*. Ensuite, la *VirG* phosphorylée se lie à des séquences d'ADN spécifiques de 12 pb des promoteurs du gène *Vir*, en activant ainsi la transcription (Brencic and Winans, 2005).

3.3.3 Attachement de bactérie à la cellule hôte

Évidemment, il est nécessaire d'avoir un contact étroit entre les cellules d'*Agrobacterium* et leurs cellules hôtes pour le transfert d'ADN-T et des protéines *Vir*. Comme dans beaucoup d'autres cas d'association des bactéries aux plantes, le contact entre cellule d'*Agrobacterium* et cellule végétale est censée se produire en deux étapes successives (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Premièrement, un attachement réversible est conçu par des facteurs extracellulaires bactériens et végétaux. Cependant, aucun de ces facteurs n'a encore été identifié pour l'interaction *Agrobacterium*-cellule végétale (Lacroix and Citovsky, 2013). Deuxièmement, sécrétion d'une matrice adhésive exo-cellulaire par les bactéries, appelée « Biofilm », composée par des polysaccharides cycliques (Matthysse *et al.*, 2005). La formation du biofilm semble essentielle pour la virulence de l'*Agrobacterium*, en consolidant leur attachement initial avec la cellule végétale par des lectines (Tomlinson and Fuqua, 2009). Ces derniers représentent une famille de protéines végétales qui se lient de manière réversible à des mono ou oligosaccharides, interagissent avec des exopolysaccharides de plusieurs espèces de Rhizobiaceae (Hirsch, 1999). De même, des lectines des cellules hôtes pourraient être impliquées dans la reconnaissance des polysaccharides cycliques exo-cellulaires d'*Agrobacterium* (Matthysse, 2014).

Certaines études moléculaires ont fourni des informations supplémentaires sur des molécules végétales impliquées potentiellement dans le processus d'attachement (Nam *et al.*, 1999; Gelvin, 2003; Zhu *et al.*, 2003). Selon Zhu *et al.* (2003), un nombre de mutants d'*Arabidopsis* sont récalcitrants à la transformation par l'*Agrobacterium*, car cette dernière ne pouvait pas se lier efficacement à ces mutants à cause d'une modification dans le gène codant pour une protéine arabinogalactane de la paroi cellulaire à laquelle les bactéries se lient mal.

Du côté bactérien, des composants extracellulaires du système de sécrétion de type IV, à savoir *VirB1*, *VirB2* et *VirB5*, ont été proposés pour jouer un rôle dans l'attachement initial avec des récepteurs végétaux potentiels. Spécifiquement, *VirB2* et *VirB5* ont été suggérés pour fonctionner comme adhésines (Backert *et al.*, 2008).

3.3.4 Sécrétion des protéines *Vir* et le transfert de l'ADN-T dans la cellule végétale

Après l'activation des gènes *Vir* et l'attachement d'*Agrobacterium* aux cellules végétales, un complexe de transport est formé par les protéines *VirB* et *VirD4* et permet aux protéines *Vir* et à l'ADN-T de traverser la membrane bactérienne interne, la couche peptidoglycane et la membrane externe ainsi que la paroi de la cellule végétale hôte et sa membrane (Christie, 2004).

Le complexe *VirB* appartient à la classe des systèmes de sécrétion de type IV (T4SS), qui se retrouvent dans une large gamme de bactéries Gram-négatives (Wallden *et al.*, 2010). Ce complexe est requis pour la virulence, où il est impliqué dans le transfert des ADN-T et les facteurs pathogènes *Vir* aux cellules hôtes pendant l'infection (Christie *et al.*, 2005).

Le complexe *VirB* est composé d'au moins 12 protéines: *VirB1-11* et *VirD4*. Les protéines constituent une structure sous forme de canal composée de multi-sous-unité, cette structure appelé « pilus conjugatif » fonctionne en tant que dispositif de fixation, de sécrétion et de transfert entre la cellule bactérienne et la cellule végétale (Christie *et al.*, 2005). Les facteurs bactériens transportés dans les cellules hôtes par le pilus conjugatif sont *VirD2*-ADN-T, *VirE2*, *VirE3*, *VirF* et *VirD5* (Vergunst *et al.*, 2000).

Le transfert de l'ADN-T à la cellule hôte est assuré par les deux protéines bactériennes *VirD2* et *VirE2*. Cependant, la *VirD2* est une endonucléase qui incise la région d'ADN-T du plasmide *Ri*, au cours de cette opération la *VirD2* se lie d'une manière covalente à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T résultant (Ziemienowicz *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2005) (voir figure 11). D'autre part, la protéine *VirD2* sert comme un pilote pour conduire l'ADN-T, à travers le complexe protéique *VirB*, vers la cellule hôte (Gelvin, 2012). Une fois dans l'hôte, *VirD2* joue probablement un rôle majeur dans l'importation et l'intégration nucléaire de l'ADN-T dans le génome végétal (Gelvin, 2009; Pitzschke and Hirt, 2010).

3.3.5 Intégration d'ADN-T dans le génome de la cellule hôte et Expression des gènes portés par l'ADN-T

La translocation de l'ADN-T dans le noyau de la cellule hôte et son intégration dans le génome, représente une étape importante du processus de transformation génétique. Plusieurs protéines *Vir*, ainsi qu'un certain nombre de protéines végétales, semblent être impliquées dans ce processus. Les protéines *VirD2* et *VirE2* contiennent des signaux de localisation nucléaire (SLN). La *VirD2* liée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN-T, contient deux régions SLN dont une se trouve dans l'extrémité amino-terminal et l'autre dans l'extrémité carboxy-terminale (Tinland *et al.*, 1992; Zupan *et al.*, 1996; Kado and Crosa, 2012). Mais seulement ce dernier est nécessaire pour l'importation nucléaire du complexe *VirD2*-ADN-T (Ziemienowicz *et al.*, 2001).

Jusqu'à présent, relativement, peu d'informations sont connues sur le mécanisme de l'intégration de l'ADN-T dans le génome végétale. D'une manière générale, le principal mode de l'intégration d'un ADN étranger dans les génomes des plantes se fait soit par une recombinaison aléatoire et non homologue, de ce fait, l'ADN-T s'intègre dans les génomes végétaux par un mécanisme similaire (Gelvin, 2003).

Selon Gelvin (2012), la protéine *VirD2* a probablement une certaine fonction dans le processus d'intégration en collaboration avec des facteurs hôtes (Tzfira and Citovsky, 2006). Parmi ces facteurs végétaux : la protéine végétale la RAD5 impliquée dans le transfert nucléaire de l'ADN-T et ciblage du site d'insertion (Nam *et al.*, 1999) ; l'ADN polymérase Pol II qui régénère l'ADN-T double brin (Tzfira and Citovsky, 2006); les protéines Ku70 et Ku80 qui fonctionnent en complexe et possèdent une activité endonuclease ; ainsi que les ADN ligases Sir4 et la Lig4 (Saika *et al.*, 2014).

L'intégration de l'ADN-T, avec plusieurs copies, au sein du génome nucléaire se fait au hasard dans l'euchromatine dont la chromatine est décondensé et active (Kim *et al.*, 2007). En outre, la fréquence de l'intégration de l'ADN-T est plus importante dans les cellules non différenciées et pendant la phase S du cycle cellulaire, au cours de laquelle la chromatine est décondensée (Graf *et al.*, 2011).

3.4 Intérêt des chevelus racinaires (CRs) en biotechnologies végétales

Stewart *et al.* (1900), sont les premiers à nommer et à décrire le phénomène « Hairy root » qui est une maladie des plantes causée par *Agrobacterium rhizogenes*. Le symptôme caractéristique de cette maladie est la formation d'une masse de petites racines portant des poils très fins qui poussent, directement, à partir du site d'infection.

Les CRs se caractérisent par un rythme de croissance rapide, et par une ramification très importante. Ils peuvent se développer *in vitro* dans un milieu exempt de phytohormones, après élimination des bactéries (Mano and Matsushashi, 1995). La variation phénotypique et la stabilité génétique des CRs sont attribuées aux fragments ADN-T_L et ADN-T_R, qui ont été intégrés dans le génome de la plante (Pitzschke and Hirt, 2010).

La stabilité génétique des CRs est, en partie, responsable de la production stable de métabolites secondaires (Makhzoum *et al.*, 2013). De même, le profil des métabolites secondaires de la plante d'origine, est souvent conservé dans les CRs (Chandra, 2012). Cependant, parfois, la quantité des biomolécules dans les CRs est modifiée (positivement ou négativement), par rapport aux racines non transformées (Hughes *et al.*, 2004). Plusieurs recherches ont rapporté que la transformation génétique par l'ADN-T était capable de stimuler, à la fois, la production de la biomasse et la production d'alcaloïdes dans les CRs (Baíza *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2005; Amdoun *et al.*, 2010; Mehrotra *et al.*, 2014; Harfi *et al.*, 2015; Benyammi *et al.*, 2016). Par conséquent, les CRs constituent un système attractif, qui pourrait jouer un rôle potentiel dans l'industrie pharmaceutique, afin de produire des biomolécules actives à partir des plantes médicinales importantes (Sharma *et al.*, 2013). Le maintien des conditions de culture à un niveau optimal, permet d'obtenir une forte croissance des CRs, vu que le modèle de croissance de biomasse des CRs est bien défini (Georgiev *et al.*, 2007). Tandis que, la production de métabolites secondaires n'est pas relativement liée à la croissance de biomasse (Sharma *et al.*, 2013).

Les CRs représentent une véritable plate-forme d'ingénierie génétique basée sur le transfert des ADN-T du Ri sauvage ou recombiné, dans les tissus de la plante hôte. A ce jour, différentes espèces végétales ont été transformées par l'intégration des ADN-T dans leurs génomes (Choi *et*

al., 2004; Jeong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009; Abbott *et al.*, 2010; Mehrotra *et al.*, 2014; Benyammi *et al.*, 2016).

L'utilisation d'*A. rhizogenes* en tant que système de transfert de gènes donne une possibilité pour le développement de nouvelles stratégies biotechnologiques, tel que l'augmentation de l'accumulation des métabolites d'intérêt dans les racines transgéniques (Sharma *et al.*, 2013; Tian, 2015), ou bien la production de protéines recombinantes, et la découverte de nouveaux gènes en utilisant le marquage moléculaire de l'ADN-T (Seki *et al.*, 2005).

4. Régénération et micropropagation

La micropropagation est la régénération d'une plante entière et / ou la propagation clonale rapide de plante à partir d'explants provenant de bourgeons, de racines, de feuilles, de cotylédons, d'anthères, de chevelus racinaires, de méristèmes et / ou d'embryons, cultivées aseptiquement sur des milieux nutritifs définis dans des conditions environnementales contrôlées (Loberant *et al.*, 2009).

Selon Murashige (1974) la micropropagation se fait en trois étapes principales:

- ✓ Mise en culture d'explants sélectionnés et stériles, sur un milieu nutritif.
- ✓ Multiplication de pousses induites sur les explants cultivés.
- ✓ Transfert des pousses vers un milieu d'enracinement en vue de leur acclimatation.

D'autre part, Skoog et Miller (1957) ont indiqué que le niveau relatif des hormones végétales auxine et cytokinine dans le milieu de culture, dirige le sort du développement de la régénération des tissus végétaux. Des rapports élevés de cytokinine / auxine induisent la caulogénèse et le développement de nouveaux bourgeons, inversement des rapports faibles permettent le développement des racines, et lorsque les concentrations des deux hormones sont équivalentes une masse de cellules indifférenciées (cals) est induite sur les explants (Sugimoto and Meyerowitz, 2013). La cytokinine et l'auxine jouent des rôles antagonistes mais synergiques, dans le contrôle de l'activité des méristèmes. Plus précisément, l'auxine inhibe la biosynthèse et la signalisation de la cytokinine (Naseem and Dandekar, 2012). Par exemple, au niveau des bourgeons axillaires de la partie aérienne juste en dessous du méristème apical, la

signalisation de la cytokinine est réprimée par l'auxine, où les protéines KNOX (Knotted-like homeobox), qui activent la signalisation de la cytokinine, sont absentes à cause du taux élevé de l'auxine (Stepanova and Alonso, 2011). En revanche, la cytokinine affecte de manière antagoniste le flux, la distribution et la signalisation de l'auxine. Par exemple, dans le méristème racinaire d'*A. thaliana*, la cytokinine favorise la différenciation cellulaire en réprimant à la fois la signalisation et le transport des auxines (Moubayidin *et al.*, 2009).

Cependant, une interaction synergique entre l'auxine et la cytokinine existe également dans des processus du développement des plantes tels que la division cellulaire (Yoshida *et al.*, 2011) et l'organogenèse (Hwang *et al.*, 2012).

En culture *in vitro*, l'effet synergique de l'auxine avec la cytokinine est présent dans la formation des cals où les deux hormones provoquent la division cellulaire. Tandis que, l'acte antagoniste entre ces deux hormones est visible dans la caulogenèse où le rapport de la cytokinine à l'auxine est élevé. Tandis qu'un faible rapport de la cytokinine à l'auxine entraîne la rhizogenèse (Oka, 2003).

Le modèle de régénération des organes (ou organogénèse) varie en fonction du système utilisé. Selon Hicks (1980) l'organogénèse peut être généralement classée comme étant directe ou indirecte. Dans le cas de l'organogénèse directe, les bourgeons et / ou les racines sont directement induites à partir d'explants de départ qui contient des méristèmes. Alors que, l'organogénèse indirecte nécessite la formation de cals, comme intermédiaire, avant l'induction des bourgeons et / ou des racines.

La capacité de régénération *in vitro* varie considérablement selon les espèces végétales. Certaines familles et genres tels que les Solanacées (*Nicotiana*, *Petunia* et *Datura*), les Crucifères (*Brassica* et *Arabidopsis*), les Gesneriacées (*Achimenes* et *Streptocarpus*), les Asteracées (*Chichorium* et *Chrysanthemum*) et les Liliacées (*Lilium* et *allium*) peuvent avoir une capacité de régénération élevée. En revanche, la régénération est difficile dans les familles telles que les Malvacées (*Gossypium*) et les Chenopodiacées (*Beta*), ce qui suggère que les mécanismes nécessaires à la régénération *in vitro* sont insuffisants ou absents (Hill and Schaller, 2013). Il existe même une variabilité considérable du potentiel de régénération parmi les

différents écotypes d'*A. thaliana* et les différents cultivars de riz (Hill and Schaller, 2013). Cela pose un problème important pour la micropropagation et la transformation génétique des plantes cultivées (Birch, 1997).

La micropropagation a été largement acceptée comme outil biotechnologique pour la propagation végétative (*in-vitro*) de diverses espèces végétales, y compris de nombreuses plantes médicinales. Cela a été rapportée par plusieurs chercheurs (Hirata *et al.*, 1994; Rout *et al.*, 2000; Pietrosiuk *et al.*, 2007; Abbott *et al.*, 2010; Benyammi *et al.*, 2011). Les deux outils biotechnologiques la régénération *in vitro* et la transformation génétique ont été largement adoptés pour la multiplication et l'amélioration génétique des plantes médicinales en vue de leur conservation et en vue d'une production rapide de biomasse et des métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique (Shahzad *et al.*, 2013). La micropropagation permet aussi d'obtenir des régénérations d'un génotype génétiquement stable et invariable (Pietrosiuk *et al.*, 2007).

Catharanthus roseus a été régénéré avec succès par la culture *in vitro*, aussi bien par l'organogénèse directe (Hirata *et al.*, 1987) que par l'organogénèse indirecte en passant par les embryons somatiques (Dhandapani *et al.*, 2007). Les études menées dans différents laboratoires hautement spécialisés ont démontré que, dans de nombreux cas, la capacité de produire des métabolites secondaires est associée au processus de l'organogénèse. Cette constatation a contribué à des progrès considérables dans le domaine de la micropropagation (van Der Heijden *et al.*, 2004).

Selon Hirata *et al.* (1987) le procédé de réalisation de cultures des pousses de *C. roseus*, par une organogénèse directe sur un milieu MS additionné de 1 mg / L de 6-Benzylaminopurine (BAP) est capable de produire des quantités importantes d'AITs, y compris la vinblastine, la vincristine, la vindoline, la catharanthine et l'ajmalicine. Les spectres d'AITs des cultures de pousses et des parties vertes des plantes intactes étaient semblables les uns aux autres, mais ils sont différents à ceux des racines transformées et des cultures en suspension (Hirata *et al.*, 1994).

La micropropagation de *C. roseus*, par la formation et le développement des pousses, dépend énormément des phytohormones additionnées au milieu de culture, et la balance hormonale joue un rôle primordiale sur le taux de croissance et l'augmentation de quantités

d'AITs (Hirata *et al.*, 1994). Selon Satdive *et al.*(2003), les pousses cultivées dans le milieu MS additionné de concentrations élevées d'auxine et de concentrations faibles de cytokinine, permettent d'accumuler des niveaux élevés d'ajmalicine et de vindoline, mais sans vinblastine et vincristine.

5 Optimisation de la production de la biomasse et des AITs

5.1 Optimisation par l'élicitation

Antérieurement, le terme éliciteur a été utilisé pour les molécules qui induisent la production de phytoalexines. Aujourd'hui, ce terme est désigné comme un facteur biotique ou abiotique qui stimule les systèmes de défense des plantes (Eder and Cosio, 1994). En outre, les éliciteurs peuvent être, également, définis comme des substances qui stimulent ou améliorent la biosynthèse des composés spécifiques lorsqu'ils sont ajoutés en petite quantité à un système cellulaire vivant en culture (Angelova *et al.*, 2006). Les éliciteurs peuvent être classés comme biotiques et abiotiques, sur la base de leur origine, leur nature et leur structure (Barz *et al.*, 1988). Les éliciteurs biotiques proviennent des sources microbiennes, fongiques et / ou végétales, ils comprennent des peptides, des polysaccharides, des glycoprotéines et des dérivés de cellules microbiennes, fongiques ou végétales. Tandis que, les éliciteurs abiotiques comprennent divers facteurs de stress chimique et physique tels que les rayons UV, les métaux lourds, choc osmotique et choc thermique (Barz *et al.*, 1988; Giri and Zaheer, 2016).

Par ailleurs, les éliciteurs biotiques peuvent être classés comme endogène ou exogène. Les éliciteurs endogènes sont originaires de la plante hôte à la suite de son interaction avec l'agresseur, ces éliciteurs jouent un rôle important dans le système de transduction du signal intracellulaire (Eder and Cosio, 1994; Wang and Wu, 2013). Parmi les éliciteurs endogènes les mieux caractérisés on trouve les oligosaccharides pectiques libérés des parois cellulaires des plantes et les molécules signales de réactions de défense des plantes, tels que la systémine, l'acide salicylique (AS), l'éthylène (ET), l'acide abscissique (ABA), l'acide jasmonique (AJ), et le méthyle jasmonate (MeJa) (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000; Wang and Wu, 2013; Giri and Zaheer, 2016). En outre, Les éliciteurs endogènes peuvent également être des intermédiaires dans la

réponse des plantes aux stress abiotiques (Wang and Wu, 2013). Cependant, les éliciteurs exogènes proviennent de l'agent pathogène, la plupart des champignons et des bactéries, et certains virus et insectes (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000).

5.1.1 Mécanisme général de l'action des éliciteurs

La réponse des plantes au stress induite par les éliciteurs commence, généralement, au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales, en impliquant une cascade d'événements entre la perception du signal (éliciteur) par un récepteur membranaire et l'activation des gènes liés à la défense dans le noyau (Zhao *et al.*, 2005; Gorelick and Bernstein, 2014).

Plusieurs événements précoces se produisant, dès la perception du signal émis par l'éliciteur. Ces événements sont importants pour le système de transduction du signal, tel que l'induction d'influx de Ca^{2+} au niveau de la membrane, et ainsi la production provisoire des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS), de l'oxyde nitrique (ON) et la biosynthèse de l'AJ et / ou de l'AS (Barz *et al.*, 1988; Angelova *et al.*, 2006; Gorelick and Bernstein, 2014). Ces molécules jouent un rôle de signalisation pour activer les réactions de défense en aval telles que la peroxydation lipidique, l'activation des gènes liés à la défense et la synthèse de métabolites secondaires (Zhao *et al.*, 2005; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). La cascade des événements intervenant dans les réactions de défense induite par les éliciteurs peut se résumer comme suit (Figure 12):

- ✓ Perception de l'éliciteur par le récepteur membranaire (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999);
- ✓ Phosphorylation réversible et déphosphorylation des protéines de la membrane plasmique et des protéines cytosoliques (Zimmermann *et al.*, 1999);
- ✓ Augmentation de la concentration cytosolique du calcium [Ca^{2+}] (Laxalt and Munnik, 2002);
- ✓ Influx de Cl^- et K^+ et de l'efflux H^+ , conduisant à l'alcalinisation extracellulaire et l'acidification cytoplasmique (Zimmermann *et al.*, 1999);
- ✓ Activation de la « mitogen activated protein kinase (MAPK) » (Romeis, 2001);
- ✓ Activation de la NADPH oxydase et la production des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) (Lebrun-Garcia *et al.*, 1999);

- ✓ Début de l'expression des gènes de défense (Memelink *et al.*, 2001);
- ✓ Accumulation des phytoalexines et des tanins qui stimulent la production des composés de signaux intracellulaires, tels que AJ, AS, ON et ET (Pedras *et al.*, 2002);
- ✓ Expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires (Memelink *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2002).
- ✓ Biosynthèse et accumulation des métabolites secondaires, dont les alcaloïdes (Siddiqui *et al.*, 2013).

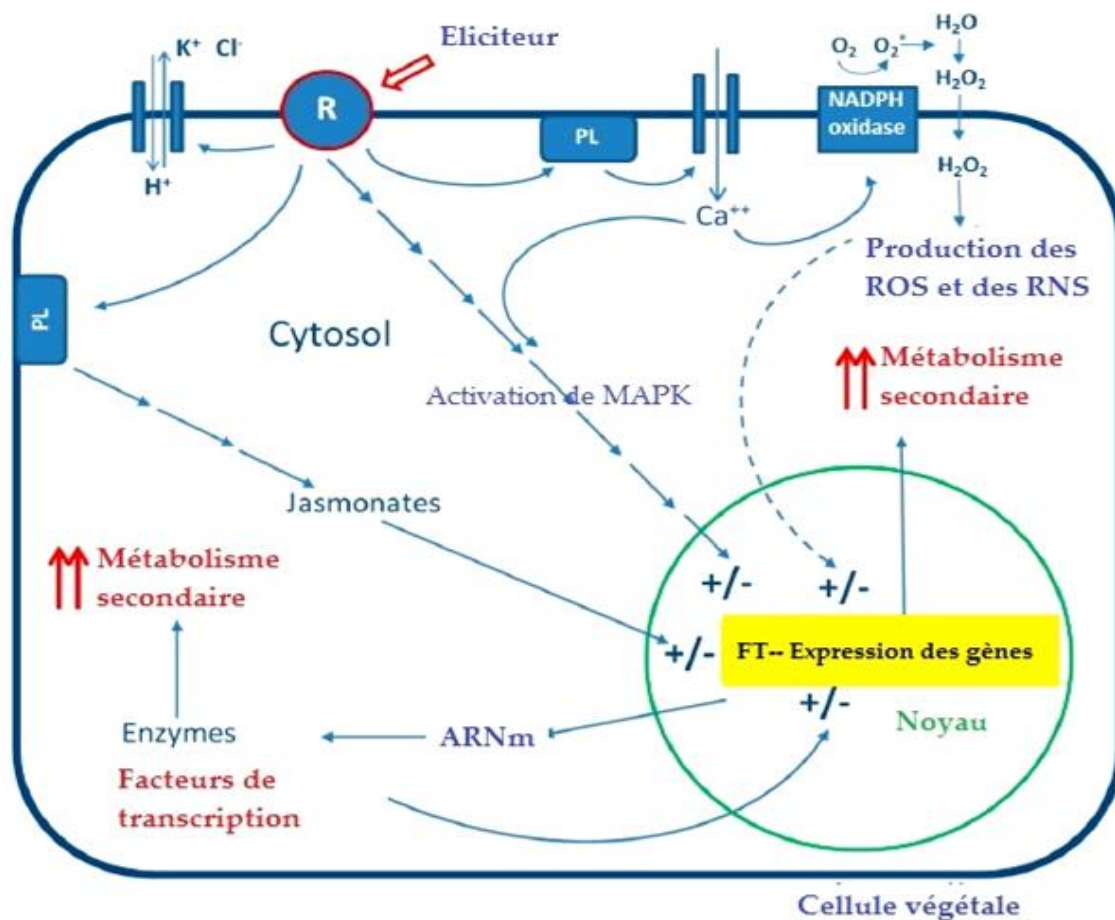


Figure 12. Représentation schématique des réponses possibles des cellules à l'élicitation. R: Récepteur; PL: Phospholipase; MAPK: Mitogen activated protein kinase; ERO / ROS: Espèces réactifs de l'oxygène; ERA / RNS: Espèces réactifs de l'azote; FT: Facteurs de transcription: (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016).

5.1.2 Caractéristiques d'une élicitation efficace

L'amélioration de la production de métabolites secondaires des cultures végétales, *in vitro*, par élicitation a ouvert un nouveau domaine de recherche qui pourrait avoir d'importants avantages économiques pour l'industrie pharmaceutique. Plusieurs paramètres tels que la concentration de l'éliciteur, la durée de l'exposition à l'éliciteur, l'âge de la culture, etc. jouent un rôle important dans l'efficacité de l'élicitation (Namdeo *et al.*, 2007).

a. Concentration optimale de l'éliciteur

L'effet d'un éliciteur sur le rendement du métabolite secondaire dépend énormément des concentrations appliquées sur les cultures. Ces concentrations varient selon la nature de l'éliciteur (biotique ou abiotique). Pour les éliciteurs biotiques, les doses efficaces et optimales sont fréquemment entre 50 à 300 µg / mL de l'extrait brut. Ces doses sont généralement quantifiées par la teneur totale en glucides des cultures traitées. Cependant, pour les composés purifiés, les molécules de signalisation tels que MeJa ou AS, et les éliciteurs abiotiques de composés connus, les doses appropriées sont généralement exprimées en unités molaires, variant dans un large éventail de 0,1 à 100000 µM (Wang and Wu, 2013). Singh *et al.* (1994) ont mesuré la liaison récepteur/ éliciteur afin de prévoir les doses nécessaires de l'éliciteur pour les cultures de tissus végétaux. Le raisonnement de cette méthode est basé sur l'hypothèse que les éliciteurs se lient à des récepteurs spécifiques sur la membrane des cellules végétales, selon une cinétique de saturation et un équilibre entre les éliciteurs liés et libres. D'après ce modèle, la quantité ou la dose de l'éliciteur requise dépend de la biomasse des cultures à traitées.

b. Age de la culture

Le moment de l'application de l'éliciteur est un autre facteur important pour la production des métabolites secondaires. En effet, l'élicitation pendant la phase de croissance accélérée (la phase exponentielle), est généralement la plus favorable. Alors que l'élicitation précoce (pendant la phase de latence) peut arrêter la croissance de la biomasse et l'élicitation tardive (pendant la phase stationnaire) ne permettrait pas un contact suffisant entre l'éliciteur et la culture (Baíza *et al.*, 1998; Hernández-Domínguez *et al.*, 2004; Goklany *et al.*, 2009; Harfi *et al.*, 2015). Selon

Shilpa *et al.* (2010) il est possible que les cellules végétales soient plus aptes à activer les voies de biosynthèse des métabolites secondaires à des stades bien définis de leur développement.

c. Elicitation combinée

De nombreuses études ont indiqué que l'application d'une élicitation combinée, entre plusieurs facteurs de stress biotiques et / ou abiotiques, conduit à une influence synergique sur la synthèse de métabolites secondaires en améliorant leur production. Selon Belchi- Navarro *et al.*(2012), le traitement des cultures de suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* avec la cyclodextrine et le MeJa a amélioré la production du trans-resvératrol de 4,6 fois par rapport au témoin. D'autre part, l'élicitation combinée avec le MeJa (100 μ M) et de L-tyrosine (2 mM) a augmenté la teneur en thébaine dans des cultures cellulaire en suspension de *Papaver bracteatum* (Zare *et al.*, 2014). En outre, l'application combinée de MeJa et de l'acide gibbérellique a amélioré la production de métabolites secondaires dans des cultures cellulaires en suspension de *Artemisia absinthium* (Ali *et al.*, 2015). En outre, l'élicitation des suspensions cellulaires d'*Artemisia annua* avec 22 μ M de MeJa et 200 μ M de miconazole a augmenté la production d'artémisinine de 3 fois (Caretto *et al.*, 2011). Cependant, chez la même espèce, la production d'artémisinine est améliorée de 300 fois, par rapport au témoin, dans des cultures cellulaires en suspension après une élicitation combinée avec 100 μ M de MeJa et 50 mM de β - cyclodextrine (Durante *et al.*, 2011). Par ailleurs, dans des culture de Chevelus racinaires d'*Artemisia annua*, le taux d'artémisinine est augmenté de 2,3 fois après une élicitation combinée avec le cérébroside et le ON (Wang *et al.*, 2009). Chez le *Taxus baccata* , une amélioration de la production du taxane est enregistrée après une élicitation avec 100 μ M de MeJa et différentes concentrations de saccharose (Sykłowska-Baranek *et al.*, 2015).

5.2 Optimisation par des facteurs à effets épigénétiques

Le terme «épigénétique» réunit deux mots «épigénie» et «génétique», inventé par Conrad H. Waddington en 1942 (Waddington , 2012), qui a défini l'épigénétique comme une branche de la biologie qui étudie l'interaction entre les gènes et leurs produits (Waddington, 1952). Récemment, l'épigénétique a été définie comme étant «des modifications héritables des profils

d'expression des gènes qui se produisent sans altération de la séquence de l'ADN» (Wolffe and Matzke, 1999). En outre, l'épigénétique peut être expliquée comme un système qui régule sélectivement l'information génomique par activation ou inactivation de l'expression des gènes. Au niveau moléculaire, les mécanismes épigénétiques peuvent être de plusieurs types, la méthylation de l'ADN, les modifications des histones post-traductionnelles, les facteurs de remodelage de la chromatine, les facteurs de transcription, les ATP- dépendants et les ARNs non-codants (Iwasaki and Paszkowski, 2014).

Bien que les mécanismes de régulation de la chromatine soient moins étudiés chez les plantes, les progrès enregistrés ont montré qu'ils partagent des similitudes avec d'autres eucaryotes dans les facteurs de remodelage de la chromatine, l'acétylation / désacétylation et la méthylation / déméthylation des histones (les modifications post-traductionnelles) et la méthylation / déméthylation de l'ADN (Rodríguez *et al.*, 2012).

5.2.1 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la principale modification épigénétique chez les eucaryotes, considérée comme un mécanisme de régulation et de contrôle des gènes. Cependant, son rôle crucial dans la régulation épigénétique lors de la transcription est mieux documenté chez les champignons et les mammifères. La présence et la quantification de la méthylation de l'ADN ont été décrites pour la première fois chez les mammifères et les plantes dans les années cinquante (Wyatt, 1951).

La méthylation de l'ADN est une modification covalente de l'ADN caractérisée par l'addition d'un groupe méthyle à la position 5 de la cytosine pour former la 5-méthylcytosine (Figure 13). Les groupes méthyle sont transférés de la S-adénosylméthionine aux résidus cytosines par les ADN méthyltransférases (AMTs) dans l'ADN nouvellement répliqué au niveau du dinucléotide CG (Bird and Southern, 1978).

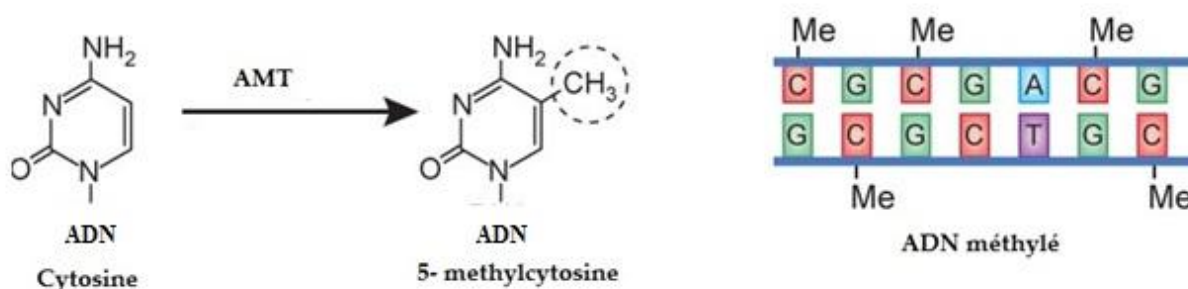


Figure 13. Méthylation de l'ADN par AMT à la position 5 de la cytosine (Korzus, 2010).

Les plantes, contrairement aux mammifères, possèdent une grande quantité de 5-méthylcytosine, ce qui suggère que la méthylation n'est pas limitée qu'à la séquence CpG, mais elle se trouve également dans les séquences CpNpG et CpNpN (Gruenbaum *et al.*, 1981). Chez *Arabidopsis*; la 5-méthylcytosine peut se produire à n'importe quel résidu de cytosine, mais il est probable que la transmission clonale des modèles de méthylation ne se produit que pour les cytosines au niveau des séquences symétriques de brin CpG et CpNpG (Finnegan *et al.*, 1998). Chez les plantes, comme chez les mammifères, la méthylation de l'ADN s'est avérée avoir deux rôles, la régulation de l'expression des gènes et la protection du génome (Gruenbaum *et al.*, 1981).

D'après les recherches moléculaires sur le traitement des cancers, il se trouve, fréquemment, que l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs conduit à l'inhibition de ces gènes inhibiteurs de croissance des cellules cancéreuses (Jones *et al.*, 2016). Autrement dit, une méthylation accrue inhibe généralement la transcription tandis que l'hypométhylation est principalement associée à une transcription accrue (Arase *et al.*, 2012). Afin de comprendre ce phénomène, les agents de déméthylation, qui constituent une classe de médicaments anticancéreux, sont utilisés pour réduire la méthylation de la cytosine en favorisant l'activation transcriptionnelle des gènes anti-tumoraux ou antimitotiques (Griffin *et al.*, 2016). La plupart des composés qui inhibent la méthylation sont des inhibiteurs des ADN méthyltransférases qui sont responsables de la méthylation de résidus de la cytosine sur l'ADN. Trois des agents chimiques

de déméthylation, qui sont des analogues de la cytosine (Figure 14), ont été utilisés pour étudier l'effet de la perte de méthylation de l'ADN dans les plantes; la 5-azacytidine (5-AC), la zebularine (ZBL) et la decitabine (DAB) (Pecinka and Liu, 2014).

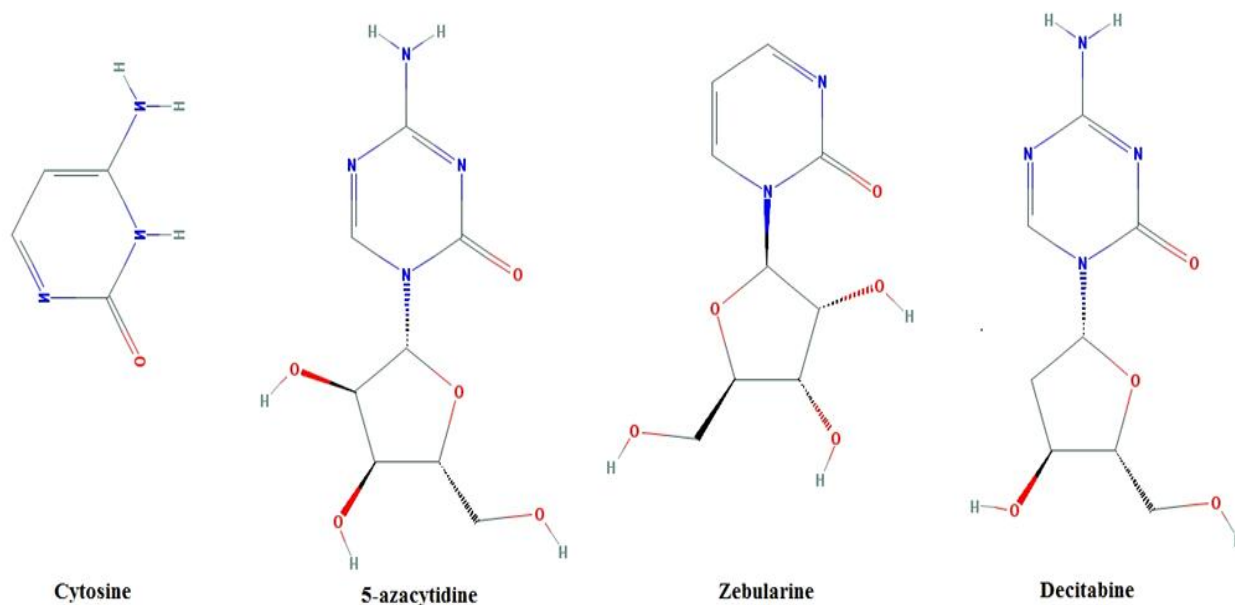


Figure 14. Structure chimique de la cytosine et de ses analogues ; 5-azacytidine, Zebularine et Decitabine (Lachmann et al., 2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé l'agent de déméthylation le plus commun la 5-AC. Cette molécule a été synthétisée pour la première fois par (Sorm *et al.*, 1964), c'est un analogue de la cytosine non méthylable. En outre, cette base modifiée inhibe l'ADN méthyltransférase, ce qui réduit le taux global de méthylation de l'ADN dans la chromatine (Yang *et al.*, 2010). D'une autre manière, cette base modifiée est incorporée dans la double hélice de l'ADN à la place du résidu cytosine lors de la réplication, et empêche la méthylation de l'ADN du fait de la présence d'un groupement nitrogène remplaçant le carbone 5 de la cytosine. Plus précisément, le groupement nitrogène induit la formation d'un complexe covalent irréversible entre la 5-AC et l'ADN méthyltransférase, entraînant la dégradation de l'enzyme par le protéasome (Ghoshal *et al.*, 2005).

Selon plusieurs recherches récentes (Arase *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2012; Iwasaki and Paszkowski, 2014; Chen *et al.*, 2016), la méthylation de l'ADN chez les plantes, a un effet important sur le fonctionnement de leurs gènes. Par exemple, la réduction de la méthylation, par les agents de déméthylation, dans l'*Arabidopsis thaliana* entraîne une perte de dominance apicale, une stature réduite, une modification de la taille et de la forme des feuilles, une réduction de la longueur des racines, une transformation homéotique des organes floraux et une réduction de la fertilité (Ronemus *et al.*, 1996; Finnegan *et al.*, 1998; Soppe *et al.*, 2002). Les traitements avec les agents de déméthylation, tel que la 5-AC, sont connus pour provoquer l'activation de la transcription des gènes silencieux (Gruenbaum *et al.*, 1981; Arase *et al.*, 2012; Baubec *et al.*, 2014)

Selon (Amado *et al.*, 1997), la réduction de la méthylation de l'ADN par la 5-AC au cours du processus de régénération des plantes induit des différences phénotypiques par rapport aux plantes non traitées. Ces nouveaux phénotypes induits dans la première génération peuvent être hérités dans les générations suivantes.

5.2.2 L'acétylation des histones

Les protéines histones sont soumises à diverses modifications covalentes, y compris l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Chez les eucaryotes, l'acétylation des histones est un processus biologique réversible dans la chromatine, contrôlée par l'activité antagoniste de deux groupes d'enzymes; les histones acétyltransférases (HATs) et les histones désacétylases (HDACs) (Waterborg, 2011). De ce fait, l'acétylation des histones considérée comme l'un des principaux facteurs qui facilitent la relaxation de la chromatine et la régulation de la transcription des gènes (Waterborg, 2002; Wang *et al.*, 2014). L'acétylation des résidus lysine des histones a été reconnue comme caractéristique des gènes activement transcrits (Figure 15), en modifiant les interactions histone-ADN et en rendant l'ADN plus accessible à la transcription (Tai *et al.*, 2005). Les extrémités N-terminale des lysines des histones H3 et H4 sont des cibles d'acétylation pour différentes HATs (Waterborg, 2002). Alias, les enzymes HATs catalysent des groupes d'acétyl à partir des molécules d'acétyl-CoA, puis elles les transfèrent aux extrémités N-terminale des résidus de lysines (Cuperlovic-Culf *et al.*,

2014). Tandis que, les histones désacétylases (HDACs) éliminent les groupes d'acétyle des résidus de lysine acétylés, en libérant des molécules d'acétate en présence d'eau (Cuperlovic-Culf *et al.*, 2014). En conséquence, les HATs et les HDACs sont impliqués à de nombreux processus de développement et d'adaptation des plantes (Liu *et al.*, 2014). Par ailleurs, des études sur l'*Arabidopsis thaliana* ont démontré que les HDACs fonctionnent comme des répresseurs de la transcription des gènes (Wu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2004).

Afin de caractériser le rôle de la HDACs, dans la régression de l'expression des gènes, des petites molécules d'antibiotique tapoxine (TPX) et trichostatine A (TSA) ont été utilisées sur des cellules mammifères. Ces molécules ont montré une inhibition contrôlée de l'activité des HDACs. Également, ces inhibiteurs chimiques des HDACs sont efficaces chez les plantes. Spécialement la TSA (Figure 16) qui est inhibiteur hautement spécifique HDAC, identifiée la première fois comme anti-fongique et anti-bactérienne, isolée à partir de la souche bactérienne *Streptomyces hygroscopicus* (Tsuji *et al.*, 1976). Et, depuis, la TSA est connue comme anti-fongique, anti-bactérienne et anti-cancéreuse, qui possède des propriétés de différenciation et cytostatique dans la culture de cellules de mammifères. En outre, c'est un inhibiteur réversible non compétitif, puissant et spécifique de l'activité de l'HDACs. De ce fait, la TSA peut être utilisée pour augmenter l'acétylation des histones, impliquée dans la régulation de l'expression des gènes chez les plantes et les eucaryotes (Yoshida *et al.*, 1995; Vigushin *et al.*, 2001). Chez les plantes, la TSA a un faible potentiel sur l'activation des gènes silencieux (Chang and Pikaard, 2005). En revanche, cette molécule peut activer ou réprimer l'expression de nombreux gènes au cours de la germination des graines, indiquant ainsi que l'acétylation des histones est un signal de développement clé dans le processus de germination (Tai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014).

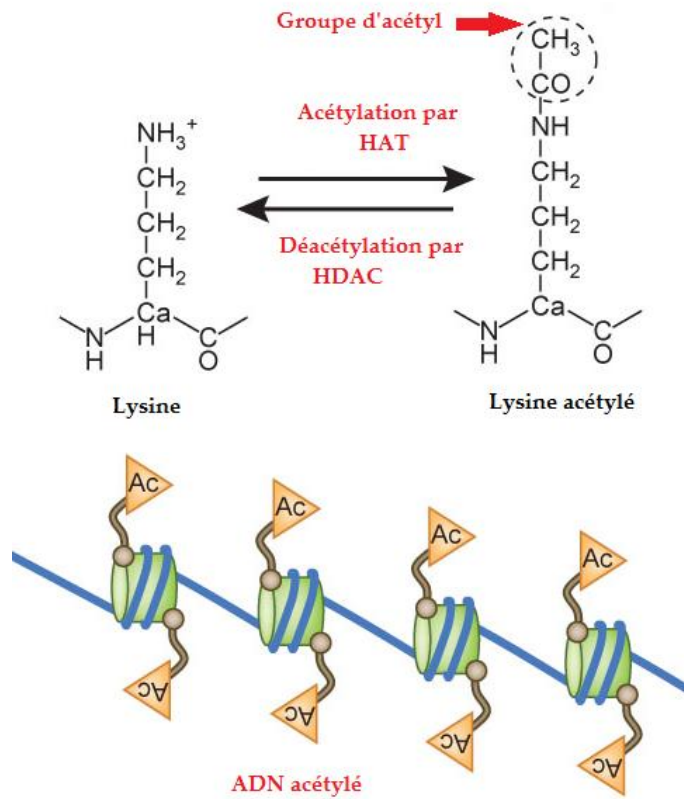


Figure 15. Acétylation et déacétylation des histones de la chromatine, l'addition du groupe acétyl par l'enzyme HAT (Korzus, 2010).

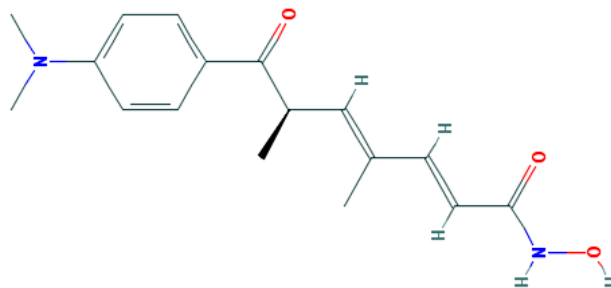


Figure 16. Structure chimique de la trichostatine A (Yoshida et al. 1995).

5.2.3 Effet des agents épigénétiques sur la production de la biomasse et des métabolites secondaires

Plusieurs travaux ont utilisé les agents à effet épigénétiques, ou autrement appelés molécules de régulation épigénétique, pour améliorer la croissance ainsi que la production des métabolites secondaires chez les plantes (Arfmann *et al.*, 1985; Fei Yang *et al.*, 2010; Perrella *et al.*, 2013; Iwasaki and Paszkowski, 2014; Xiao-Long Yang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016). Reste que, l'effet de ces molécules sur le métabolisme secondaire est plus étudié chez les champignons (Göttlicher *et al.*, 2001; Krämer *et al.*, 2003; Tai *et al.*, 2005; Shwab *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008; Fisch *et al.*, 2009; Studt *et al.*, 2013; Zutz *et al.*, 2014) que chez les plantes.

Par ailleurs, l'application de l'agent de déméthylation 5-AC sur les plantes peut conduire à des changements profonds dans le profil des métabolites secondaires, due à l'activation de l'expression des gènes silencieux correspondants à la biosynthèse de ces métabolites secondaires (Zutz *et al.*, 2014). Le traitement avec la 5-AC a donné des effets positifs; sur la production des métabolites secondaires chez certaines espèces végétales telles que *C. roseus* (Arfmann *et al.*, 1985), *Petunia hybrida* (Kanazawa *et al.*, 2007; Arase *et al.*, 2012), *Artemisia annua* (Foley, 2007); ou même l'apparition de nouvelles molécules (Arfmann *et al.*, 1985). Cependant, chez d'autres espèces telles que *Vitis amurensis* (Kiselev *et al.*, 2013), *Brassica napus* (Rodríguez-Sanz *et al.*, 2014) et *Zea mays* (Yang *et al.*, 2010), le traitement avec 5-AC a donné un effet négatif en inhibant l'accumulation des métabolites secondaires et de la biomasse.

En outre, le traitement avec l'agent épigénétique TSA entraîne aussi une augmentation de l'accumulation des métabolites secondaires et surtout de la biomasse chez plusieurs espèces comme *Populus trichocarpa* (Ma *et al.*, 2016), *Zea mays* (Yang *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011), *Fragaria chiloensis* (Yang *et al.*, 2014) et *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2016).

Reste que, de nombreux recherches ont largement étudié le lien étroit entre le métabolisme et l'acétylation des histones chez les champignons (Boyko and Kovalchuk, 2011; Kaelin and McKnight, 2013; Yang *et al.*, 2014; Zutz *et al.*, 2014), où l'acétylation des histones

augmente l'expression des gènes contrôlant la biosynthèse des toxines fongiques. Shwab *et al.* (2007), montrent que le traitement des champignons *Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* avec l'inhibiteur de l'histone désacétylase TSA a entraîné une accumulation accrue de métabolites secondaires constitutifs et/ou une production de nouveaux produits naturels non identifiés chez les deux espèces. Pareillement, Fisch *et al* (2009), ont affirmé que la manipulation des caractéristiques épigénétiques dans les champignons est une méthode efficace pour accéder aux produits naturels à partir de voies de biosynthèse silencieuses. De plus, cette approche peut être facilement incorporée dans les opérations modernes de dépistage microbien (Williams *et al.*, 2008).

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est obtenu à partir des graines matures de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don mises à notre disposition par l'établissement park seed (Hodges, South carolina, USA). Deux variétés ont été utilisées : Cooler lilac et Cooler blush.

1.1 Obtention des vitrosemis

Deux lots de graines de *C. roseus* (Cooler lilac et Cooler blush) scarifiées à l'aide du papier de verre (p 80) et d'autres non scarifiées, ont subi une désinfection qui consiste en : un passage dans l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes puis un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12 % pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile puis séchées sur du papier filtre stérile (Khelifi-Slaoui *et al.*, 2005).

Afin de tester l'effet de l'imbibition des graines dans l'eau sur le taux de germination, les graines scarifiées et celles non scarifiées ont été trempées dans l'eau distillée stérile, pendant 24, 48 et 72 heures après désinfection, puis ensemencées dans des tubes à essai contenant 20 mL de milieu solide MS (Murashige and Skoog, 1962) (Annexe 1), préalablement stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, additionné de 7 g / L d'agar et 20 g / L de saccharose. Le pH du milieu est ajusté à 5,6 – 5,8.

Les cultures sont ensuite placées en chambre de culture à une température de 25 ± 2 °C et sous une photopériode de 16 heures. Les pourcentages de germination sont enregistrés pendant une période de 30 jours. Pour chaque cultivar 100 graines sont ensemencées, à raison d'une graine par tube.

1.2 Induction des pousses par caulogénèse

Les pousses (Ps) sont obtenues à partir de graines immatures récoltées en 2010 à partir des plantes de *C. roseus* (Cooler lilac et Cooler blush) cultivées en pots au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA- El Harrach).

Les siliques de *C. roseus* contenant les graines immatures sont désinfectées selon le protocole de Hernández-Domínguez *et al.* (2006), qui consiste en un passage des siliques dans l'éthanol à 70 %

pendant 5 minutes et un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 20 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile puis séchage sur du papier filtre stérile.

La mise en germination des graines est réalisée dans des tubes à essai contenant 20 mL de milieu MS semi-solide sans hormones de croissance, additionné de 5,5 g d'agar et 30 g / L de saccharose. Les tubes sont placés dans l'obscurité totale en chambre de culture à une température de 25 ± 2 °C pendant 5 jours. Les vitrosemis étiolés sont ensuite exposés à la lumière continue pendant 4 jours (Hernández-Domínguez et al., 2006). Chaque vitrosemis est considéré comme un explant. Les explants sont placés par lot de cinq dans des Erlenmeyers de 250 mL, contenant 50 mL de milieu semi-solide MS, supplémenté de 30 g / L de saccharose, 5,5 g / L d'agar et différentes concentrations de 6-Benzylaminopurine (BAP) (1, 1,5 et 2 mg / L), choisies selon les protocoles de Hernández-Domínguez *et al.*(2006) et Campos-Tamayo *et al.*(2008). Puis, le milieu est ajusté au pH de 5,6 – 5,8.

Pour chaque concentration de BAP, 30 explants sont utilisés. Les cultures sont incubées à une température de 25 ± 2 °C sous une photopériode de 16 heures par jour.

Les observations ont été réalisées durant 3 semaines de culture et elles ont porté sur:

- ✓ Le temps moyen d'apparition des bourgeons axillaires sur les explants.
- ✓ Le taux d'induction de bourgeons axillaires, c'est le pourcentage d'explants ayant formé de nouveaux bourgeons axillaire.
- ✓ Le nombre moyen de bourgeons axillaires par explant après 3 semaines de culture.

1.3 Multiplication des Pousses

Après 3 semaines de culture, les Ps nouvellement formées sont excisées et utilisées individuellement comme explants puis placées sur le même milieu semi-solide MS additionné de 2 mg / L de BAP. Un cycle de multiplication (fragmentation- élongation) est réalisé toutes les trois semaines sur le même milieu de culture.

1.4 Etablissement des chevelus racinaires (CRs)

1.4.1 Origine des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* utilisées

Deux souches virulentes d'*Agrobacterium rhizogenes* ont été utilisées dans notre travail, la première est la souche A4 originaire de la Californie (États-Unis), elle provient du laboratoire de pathologie végétale, université de Madison, Wisconsin, États-Unis. Elle nous a été fournie par le professeur Krimi du laboratoire de microbiologie de l'université de Blida. Alors que, la deuxième est la souche Ar15834 qui provient du laboratoire de biomolécules et biotechnologies végétales, université de François Rabelais, Tours, France.

Les deux souches portent le plasmide Ri de type agropine (White et al., 1985), qui comporte deux régions nécessaires à l'induction de la maladie du chevelu racinaire. La première est la région ADN-T constituée de 2 segments: l'ADN-T_R (Right) et l'ADN-T_L (Left), où l'ADN-T_L contient les gènes *rol* (*root locus*): *rol A*, *rol B*, *rol C* et *rol D*, responsables de la formation des chevelus racinaires et de leur phénotype (Slightom et al., 1986). Tandis que, l'ADN-T_R porte les gènes responsables de la synthèse d'opine, et les gènes responsables de la biosynthèse de l'auxine, appelés AUX1 et AUX2 (Nemoto *et al.*, 2009). La deuxième région du plasmide Ri comprend les gènes de virulence (*vir*) (Giri and Narasu, 2000; Jouanin et al., 1985).

1.4.2 Activation des souches bactériennes et mise en suspension

L'activation des souches bactériennes consiste à ensemencer les bactéries, préalablement conservées dans l'obscurité et à une température de - 4 °C, sur un milieu de culture solide YEM (Vincent, 1970) (Annexe 1) avec 15 g / L d'agar, puis les incubent dans l'obscurité, à une température de 27 ± 1 °C pendant 48 heures. Une partie des bactéries activées est utilisée pour la préparation des suspensions, l'autre partie est remise en conservation pour les prochaines manipulations.

Les souches activées sont mises en suspension dans le milieu de culture liquide YEM, dans l'obscurité à 27 ± 1°C sur un agitateur à une vitesse de 80 rpm pendant 72 heures

correspondant à l'obtention d'une DO_{600} nm égale à 0,6 - 0,8. La suspension bactérienne est alors utilisée à cette concentration pour la transformation génétique des tissus de *C. roseus*.

1.4.3 Transformation génétique par co-culture *C. roseus* - bactérie

L'inoculation est réalisée sur trois types d'explants de *C. roseus*: des bourgeons issus des pousses âgés d'un mois; des hypocotyles et des feuilles issus des vitrosemis âgés de deux mois. Les explants blessés (les hypocotyles, les feuilles et les bourgeons) sont immergés dans la suspension bactérienne pendant 30 minutes. Ils sont ensuite séchés sur du papier filtre, préalablement stérilisé.

Afin d'étudier l'effet de la période de co-culture sur l'induction des chevelus racinaires, une partie de ces explants infectés est déposée directement sur un milieu de culture solide B5 (Gamborg et al., 1968) (Annexe 1) dilué au $\frac{1}{2}$, avec les vitamines B5 et additionné de 30 g / L de saccharose, de 7 g / L d'agar et de 400 mg / L de céfotaxime. Le reste des explants infectés sont déposés sur le même milieu de culture solide B5 dilué au $\frac{1}{2}$ et sans céfotaxime pour une période de co-culture de deux et trois jours. Par la suite, les explants non exposés à l'antibiotique sont placés sur le milieu solide B5 dilué au $\frac{1}{2}$ et additionné de 400 mg / L de céfotaxime afin d'éliminer les bactéries. La co-culture, explants et agro-bactérie, est réalisée dans l'obscurité et à 26 ± 1 °C.

Les explants inoculés sont transférés tous les 15 jours, sur le milieu semi-solide B5 dilué au $\frac{1}{2}$, contenant 30 g / L de saccharose, 5,5 g / L d'agar et 400 mg / L de céfotaxime, et ce, jusqu'à l'apparition des racines transformées. Les explants témoins subissent les mêmes traitements mais sans traitement préalable aux bactéries.

Les observations ont été réalisées durant 60 jours et les paramètres suivants ont été évalués:

- ✓ Temps moyen d'apparition de la première racine;
- ✓ Nombre moyen de racines par explant;
- ✓ Taux d'induction de chevelus racinaires correspondant au pourcentage d'explants ayant donnés des racines.

1.5 Isolement et multiplication des racines obtenues

Les racines obtenues sur les explants inoculés sont excisées lorsqu'elles atteignent environ trois à quatre centimètres de longueur (Amdoun et al., 2009). Ensuite, elles sont transférées sur le milieu semi-solide B5 dilué au ½ et additionné de 250 mg de céfotaxime afin d'éliminer les bactéries qui accompagnent éventuellement ces racines.

Des repiquages sont effectués tous les 20 à 30 jours sur milieu semi-solide B5 dilué au ½. Lorsque les racines atteignent une taille et un degré de ramification jugé suffisant, ces extrémités sont découpées en portions de trois à quatre centimètres, puis cultivées séparément sur un milieu semi-solide B5 dilué au ½. La concentration du milieu en antibiotique est ensuite progressivement réduite jusqu'à son élimination totale après un cycle de culture de 3 mois (Tao and Li, 2006). La culture des racines obtenues est réalisée dans l'obscurité totale à une température de 25 ± 2 °C.

1.6 Sélection des lignées racinaires et adaptation au milieu liquide

Chaque racine induite par l'*Agrobacterium* est supposée issue d'un événement de transformation unique (Batra et al., 2004). Les racines isolées dans notre expérimentation sont donc considérées comme des lignées distinctes.

Après 15 jours de culture sur le milieu semi-solide B5 dilué au ½ sans antibiotique, les racines non callogènes et qui présentent une grande croissance et une bonne ramification sont repérées (Amdoun et al., 2009). Afin de sélectionner les meilleures lignées (celles qui présentent une bonne croissance en milieu liquide) de 4 à 5 fragments racinaires d'environ 5 cm de longueur de chaque lignée obtenue en milieu semi-solide B5 dilué au ½, sont transférés dans des Erlenmeyers contenant 50 mL du milieu liquide B5 dilué au ½ sans antibiotique. Les cultures sont incubées à l'obscurité et à une température de 25 ± 2 °C sur un agitateur à 100 rpm. Trois répétitions sont réalisées pour chaque lignée.

Après 20 jours de culture en milieu liquide, la croissance est estimée par l'indice de croissance qui est calculé pour chaque lignée en utilisant la formule suivante:

$$\text{Indice de croissance} = \frac{\text{poids frais après 20 jours de culture}}{\text{poids frais de l'inoculum initial}}$$

1.7 Confirmation de la nature transgénique des lignées racinaires obtenues

La nature transgénique des lignées racinaires est confirmée par la détection de la présence d'un fragment du gène *rolB* après amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques :

F (Forward): 5'-GCG ACA ACG ATT CAA CCA TAT CG-3'.

R (reverse): 5'-TTT ACT GCA GCA GGC TTC ATG AC-3'.

L'ADN génomique de *C. roseus* a été extrait à l'aide du Mini Kit NucleoSpin DNA Plant II (Macherey-Nagel, Germany) (Annexe 1), à partir de deux lots de racines: des racines obtenues à la suite du traitement par les agrobactéries et des racines témoins (témoin négatif).

L'ADN du plasmide Ri a été extrait par une lyse alcaline Miniprep Kit NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel, Germany) (Annexe 1), à partir de bactéries *A. rhizogenes* (souches AR 15834 et A4), utilisées comme témoin positif.

L'amplification par PCR est effectuée dans un volume de 20 µL de mélange réactionnel contenant: 2 µL de solution d'ADN; 0,8 µL de chaque amorce (Forward and reverse); 2 µL de tampon de polymérisation; 2 µL de 10 × MgCl₂; 2 µL de mélange de dNTP; 0,4 µL de l'ADN Taq polymerase et 10 µL de l'H₂O ultra-pure. La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur à une température de dénaturation initiale de 94 °C pendant 4 minutes, suivie de 30 cycles [dénaturation à 94 °C pendant 1 minutes; hybridation à 57 °C pendant 1 minutes; élongation à 72 °C pendant 1 minutes] suivis d'une élongation finale à 72 °C pendant 7 minutes. Les produits de la PCR ont été séparés en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %), incluant le BET (Bromure d'éthidium) à une concentration finale de 0.5 µg / mL, puis visualisés sous lumière UV pour révéler les fragments d'ADN.

2 Cinétique de croissance

2.1 Cinétique de croissance de Pousses et de l'accumulation des alcaloïdes

Afin d'étudier la cinétique de croissance des pousses et de l'accumulation des alcaloïdes indoliques, les cultures de 30 jours (du cultivar Cooler blush) sont transférées dans des Erlenmeyers de 500 mL, à raison d'une pousse par Erlenmeyer. Chaque Erlenmeyer contient 100 mL de milieu MS liquide additionné de 2 mg / L de BAP et 30 g / L de saccharose. Les Erlenmeyers sont ensuite placés sur un agitateur rotatif à 80 rpm et à une température de 26 ± 1 °C sous une photopériode de 16 heures. L'évaluation du poids sec (g), après un séchage dans l'étuve à 55 °C pendant 48 heures, est réalisée dès le 6^{ème} jour de culture à raison d'une mesure, répétée trois fois, tous les quatre jours. Le matériel végétal sec sera utilisé plus tard pour l'extraction des alcaloïdes cibles et la détermination de leurs teneurs (mg / 100 g de matière sèche).

2.2 Cinétique de croissance des CRs et de l'accumulation des alcaloïdes

De l'ensemble des lignées racinaires transgéniques obtenues, trois lignées caractérisées par une bonne croissance en milieu liquide ont été sélectionnées pour l'étude de la cinétique de croissance de la biomasse des CRs ainsi que pour l'évaluation de leurs teneurs en alcaloïdes.

Environ 200 mg de poids frais (environ 4 à 5 extrémités de 5 cm de longueur) de chaque lignée de CRs (âgé de 20 jours) déjà cultivés sur le milieu solide, sont recueillis et cultivés dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu liquide B5 dilué au 1/2 et additionné de 30 g / L de saccharose, puis ajusté au pH de 5,6 - 5,8. Ces cultures sont maintenues dans une chambre de culture dans obscurité, à une température de 25 ± 2 °C et sous agitation à une vitesse de 100 rpm.

Après 8 jours de culture, les CRs sont récoltés tous les 3 jours, pendant 35 jours de culture, et leur poids sec (g) est évalué après un séchage dans l'étuve à 45 °C (vue leur fragilité) pendant 48 heures. La matière sèche des racines est utilisée, par la suite, pour l'extraction des alcaloïdes et la détermination de leurs teneurs (mg / 100 g de matière sèche).

3 Elicitation du matériel végétal

3.1 Elicitation des chevelus racinaires

3.1.1 Elicitation par l'acide salicylique

Environ 200 mg de chevelus racinaires (CRs) (4 à 5 extrémités de racines de 5 cm de longueur), sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture liquide B5 dilué au ½ et additionné de 30 g / L de saccharose, puis ajusté au pH de 5,6 – 5,8. Les cultures sont placées dans l'obscurité, sous agitation à une vitesse de 100 rpm et à une température de 25 ± 2 °C.

L'élicitation des CRs par l'acide salicylique (AS) est appliquée, pendant la phase exponentielle de croissance, au 27^{ème} jour de culture pour les trois lignées de CRs LP 10, L54 et LP21. Quatre modalités correspondant à quatre concentrations d'AS: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M et deux temps de contact: 24 et 48 heures (Tableau 3), ont été testées. Les CRs ont été récoltés et séchés à 45 °C pendant 48heures. Pour chaque modalité, trois répétitions ont été réalisées.

Les concentration testées dans notre travail, ont été choisies selon plusieurs protocoles (El-Sayed and Verpoorte, 2002; Harfi, 2013; Mustafa et al., 2009; Ruiz-May et al., 2008)

L'effet de l'élicitation par l'AS est évalué sur la base du poids sec (PdS) des lignées des CRs sélectionnées et de leurs teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC).

✓ **Tableau 3. Modalités d'élicitation des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par l'acide salicylique (AS).**

Eliciteur	Temps d'élicitation (Heure)	Concentration (M)
AS	24	10^{-3}
		10^{-4}
		10^{-5}
		10^{-6}
	48	10^{-3}
		10^{-4}
		10^{-5}
		10^{-6}
Témoin	0	0

3.1.2 Elicitation par le chlorure de calcium (CaCl₂)

L'élicitation des CRs par le sel CaCl₂ est réalisée dans le milieu liquide B5 dilué au ½ et additionné de 30 g / L de saccharose puis ajusté au pH de 5,6 – 5,8. L'inoculum initial (environ 200 mg du poids frais) constitué des extrémités racinaires d'environ 5 cm de longueur, est placé dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture liquide B5 dilué au ½. La culture est conduite dans l'obscurité totale avec une agitation de 100 rpm et à une température de 25 ± 2 °C.

Selon les travaux de Lee-Parsons and Ertürk (2005) et Abdul Jaleel *et al.* (2007), trois concentrations de CaCl₂: 3, 5 et 10 mM ont été choisies et testées sur les trois lignées racinaires sélectionnées. Le CaCl₂ est additionné au 27^{ème} jour de culture pour les trois lignées sélectionnées de CRs. Le temps de contact éliciteur-CRs est de 24 et 48 heures. Pour chaque modalité, trois répétitions ont été réalisées (Tableau 4).

L'effet de l'élicitation par le CaCl₂ est évalué sur la base du poids sec (PdS) des lignées de CRs sélectionnées et leurs teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC).

✓ **Tableau 4. Modalités d'élicitation des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par CaCl₂.**

Eliciteur	Temps d'élicitation (Heure)	Concentration (mM)
CaCl ₂	24	3
		5
		10
	48	3
		5
		10
Témoin	0	0

3.1.3 Elicitation combinée par l'AS et le CaCl₂

Les conditions de culture et le matériel végétal de départ, représenté par environ 200 mg du poids frais de CRs, sont les mêmes que pour les essais de l'élicitation par l'AS et le sel CaCl₂.

L'élicitation combinée des CRs, par l'AS et le sel CaCl₂, est réalisée au 27^{ème} jour de culture pour les trois lignées racinaires LP10, L54, et LP21, selon quatre modalités

correspondant à quatre concentrations d'AS: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M, combinées avec une seule concentration de CaCl_2 (3 mM) (Tableau 5). Après un temps de contact de 24 et 48 heures, les CRs sont récoltés. Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

L'effet de l'élicitation combinée est évalué sur la base du poids sec (PdS) des trois lignées de CRs sélectionnées et leurs teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC).

✓ **Tableau 5. Modalités d'élicitation combinée des trois lignées (LP10, LP21 et L54) par l'AS et le CaCl_2 .**

Temps d'élicitation (Heure)		Concentration d'AS (M)	Concentration de CaCl_2 (mM)
24		10^{-3}	3
		10^{-4}	
		10^{-5}	
		10^{-6}	
48		10^{-3}	3
		10^{-4}	
		10^{-5}	
		10^{-6}	
Témoin	0	0	0

3.1.4 Elicitation par des agents épigénétiques

Des extrémités d'environ 5 cm de longueur de CRs issues des lignées racinaires sélectionnées, sont cultivées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture B5 liquide dilué au $\frac{1}{2}$ additionné de 30 g / L de saccharose et ajusté au pH de 5,6 – 5,8. Les conditions de culture sont: l'obscurité, vitesse d'agitation de 100 rpm et température de la chambre de culture de 25 ± 2 °C.

Les deux agents à effet épigénétique, la 5-azacytidine (5-AC) et la trichostatine (TSA),

Après un mois de culture, les effets de la 5-AC et la TSA sont évalués sur la base du poids sec (PdS) des lignées de CRs sélectionnées et leurs teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC). Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

3.2 Elicitation des Pousses

3.2.1 Elicitation par l'acide salicylique

Des pousses (Ps) du cultivar « Cooler blush » âgées de 30 jours, cultivées sur le milieu semi-solide MS, sont transférées dans des Erlenmeyers de 500 mL, à raison d'une pousse par Erlenmeyer, contenant 100 mL de milieu liquide MS additionné de 2 mg / L de BAP, 30 g / L de saccharose. Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Les Erlenmeyers sont placés dans la chambre de culture sur un agitateur rotatif réglé à 80 rpm sous une photopériode de 16 heures et une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

L'élicitation des pousses par l'AS est appliquée, pendant la phase exponentielle de croissance, au 22^{ème} jour du cycle de culture des Ps, selon quatre modalités correspondant à quatre concentrations d'AS: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M. Les concentration testées dans notre travail, ont été choisies selon plusieurs protocoles (El-Sayed and Verpoorte, 2002; Harfi, 2013; Mustafa et al., 2009; Ruiz-May et al., 2008)

Après un temps de contact de 24 heures, les Ps ont été récoltées et séchés à 55°C pendant 48heures. Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

L'effet de l'AS est évalué sur la base du poids sec (PdS) des Ps et leurs teneurs en ajmalicine (TA), en catharanthine (TC) et en vindoline (TV).

3.2.2 Elicitation par le chlorure de calcium (CaCl_2)

L'élicitation des Ps du cultivar « Cooler blush » par le CaCl_2 est réalisée dans le milieu MS liquide additionné de 2 mg / L de BAP et de 30 g / L de saccharose. Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Les Ps âgées de 30 jours sont transférées dans des Erlenmeyers de 500 mL, à raison d'une pousse par Erlenmeyer, contenant 100 mL de milieu MS liquide, précédemment décrit.

Les conditions de culture sont: l'obscurité, vitesse d'agitation de 80 rpm, photopériode de 16 heures et température de la chambre de culture de 25 ± 2 °C.

L'élicitation par le sel CaCl_2 est appliquée au 22^{ème} jour du cycle de culture des Ps selon trois modalités correspondant à trois concentrations: 3, 5 et 10 mM (Abdul Jaleel et al., 2007; Lee-Parsons and Ertürk, 2005). Après un temps de contact de 24 heures, les Ps ont été récoltées et séchées à 55 °C pendant 48 heures. Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

L'effet du sel CaCl_2 est évalué sur la base du poids sec (PdS) des Ps et leurs teneurs en alcaloïdes indoliques (Ajmalicine, catharanthine et vindoline).

3.2.3 Elicitation combinée par l'AS et le CaCl_2

L'élicitation combinée des pousses (Ps) du cultivar « Cooler blush » par l'AS et le CaCl_2 est réalisée dans le milieu MS liquide additionné de 2 mg / L de BAP et de 30 g / L de saccharose, et ajusté au pH de 5,6 et 5,8. Les Ps sont transférées dans des Erlenmeyers de 500 mL, à raison d'une pousse par Erlenmeyer, contenant 100 mL de milieu MS liquide, précédemment décrit.

Les conditions de culture sont: l'obscurité, vitesse d'agitation de 80 rpm, photopériode de 16 heures et température de la chambre de culture de 25 ± 2 °C.

L'élicitation combinée des Ps est réalisée au 22^{ème} jour du cycle de culture des Ps selon quatre modalités correspondant à quatre concentrations d'AS : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M,

combinées avec une seule concentration de CaCl₂ (5 mM). Les Ps sont récoltées après un temps de contact de 24 heures. Pour chaque modalité, trois répétitions sont réalisées.

L'effet de l'élicitation combinée est évalué sur la base du poids sec (PdS) des Ps et leurs teneurs en ajmalicine (TA), en catharanthine (TC) et en vindoline (TV).

3.2.4 Elicitation par des agents épigénétiques

Des pousses (Ps) du cultivar « Cooler blush » âgés de 30 jours sont introduites dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture MS liquide additionné de 2 mg / L de BAP et 30 g / L de saccharose, et ajusté au pH de 5,6 – 5,8. La culture est conduite dans l'obscurité totale avec une agitation de 80 rpm, une photopériode de 16 heures et à une température de 25 ± 2 °C.

Après un mois de culture sur milieu liquide, l'effet de la 5-AC est évalué sur la base du poids sec (PdS) des pousses et leurs teneurs en ajmalicine (TA), en catharanthine (TC) et en vindoline (TV).

4 Extraction des alcaloïdes indoliques à partir des CRs et des Ps

L'extraction des alcaloïdes indoliques ciblés (Ajmalicine, catharanthine et vindoline) est réalisée selon le protocole de Guirimand *et al.*(2010), à partir d'échantillons de chevelus racinaires et des pousses, préalablement séchés dans l'étuve à 45 et 55 °C, respectivement, pendant 48 heures. Le protocole d'extraction consiste en:

- ✓ Broyage des CRs et des Ps séchés à l'aide d'un broyeur à billes;

- ✓ Prélèvement de 25 mg de matière sèche (M.S) broyée dans un microtube (Eppendorf) de 1,5 mL;
- ✓ Addition de 1 mL du méthanol (96°) dans le microtube contenant la M.S;
- ✓ Agitation du microtube, pendant une heure, sur un vortex réglé à une vitesse de 290 rpm;
- ✓ Centrifugation de l'échantillon à 15000 x g pendant 15 minutes;
- ✓ Prélèvement du surnageant (500 µL) puis le remettre dans un nouveau microtube, à l'aide d'une micropipette;
- ✓ Stockage de l'échantillon à -20 °C.

5 Identification et dosage des alcaloïdes indoliques

L'identification et le dosage des alcaloïdes indoliques ciblés (Ajmalicine, catharanthine et vindoline), sont effectués par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS / MS) (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). L'analyse avec la LC-MS / MS a été effectuée sur une colonne C18 (150 mm x 2,1 mm et une porosité 5 µm - Alltima, Alltech, France) avec un débit de 0,2 mL / min, à une température constante de 25 °C. La phase mobile est constituée d'éluant A (Eau avec 0,1 % d'acide formique) et l'éluant B (Méthanol avec 0,1 % d'acide formique) dans le programme de gradient suivant: 30 % de B pendant 30 minute, 80 % B à la 30^{ème} minute, 98 % de B à 30,1 minute pendant 5 minute et 30 % de B à 35,1 minute pendant 6 minute. Les molécules d'intérêt (Ajmalicine, catharanthine et vindoline) ont été identifiées grâce à des analyses par spectrométrie de masse complètes (50 - 1000 m/z) et des analyses MS2 spécifiques. Ensuite, elles ont été quantifiées selon les courbes d'étalonnage (Annexe 2) obtenus à partir des étalons authentiques: Ajmalicine, catharanthine et vindoline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin -Fallavier- France). Les données brutes ont été traitées en utilisant le logiciel Xcalibur (version 2.1 Thermo Scientific). Trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

6 Analyse statistique

L'analyse de la variance à un facteur (Annexe 4) 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 22.0. Aussi, une analyse de la corrélation entre le poids sec et la teneur en alcaloïdes indoliques a été réalisée.

Les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5%.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1 Obtention du matériel végétale

1.1 Germination des graines de *C. roseus*

La graine est considérée germée, dès que la radicule perce le tégument (Figure 17). Ainsi, nos résultats montrent que les graines non scarifiées trempées dans l'eau distillée pendant 48 heures révèlent un taux élevés de germination, 90 % à 100 %, respectivement, pour Cooler lilac et Cooler blush. Cependant, les graines scarifiées trempées ou non trempées dans l'eau distillée, montrent un faible taux de germination variant de 5 % à 30 %, selon le temps d'imbibition (Figure 18).

Les premières germinations se produisent dès le 3^{ème} et le 4^{ème} jour de culture, respectivement, pour les graines de Cooler lilac et Cooler blush non scarifiées et imbibées pendant 48 heures. D'autre part, les graines non scarifiées et non imbibées mettent 8 à 10 jours pour germer, respectivement pour Cooler lilac et Cooler blush.

De ce fait, les graines de *C. roseus* ne nécessitent pas de scarification préalable pour leur germination. Un simple trempage de 48 heures dans l'eau distillée suffirait pour produire une germination rapide avec un taux élevé. Par ailleurs, le facteur variétal ne semble pas non plus jouer un effet important sur le taux de la germination, les taux de germination entre les deux variétés sont assez proches.

Ainsi, les vitrosemis (Figure 19) obtenus sont utilisés pour prélever des hypocotyles et des feuilles pour induire ultérieurement des chevelus racinaires.

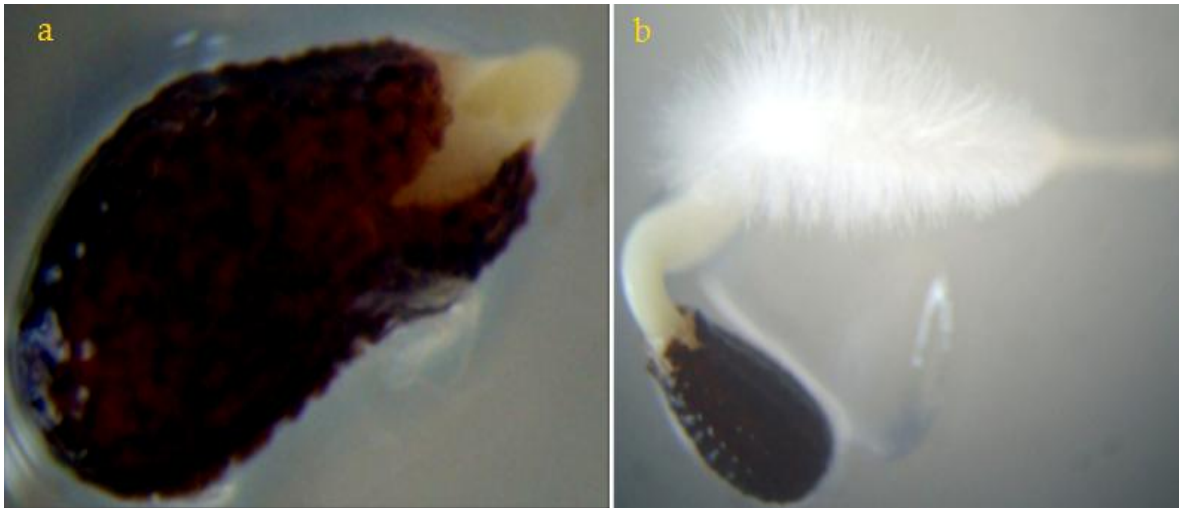


Figure 17. Germination des graines de *C. roseus*. a: Début de la germination (G = 23 X). b: Elongation de la radicule de la graine (G = 8 X).

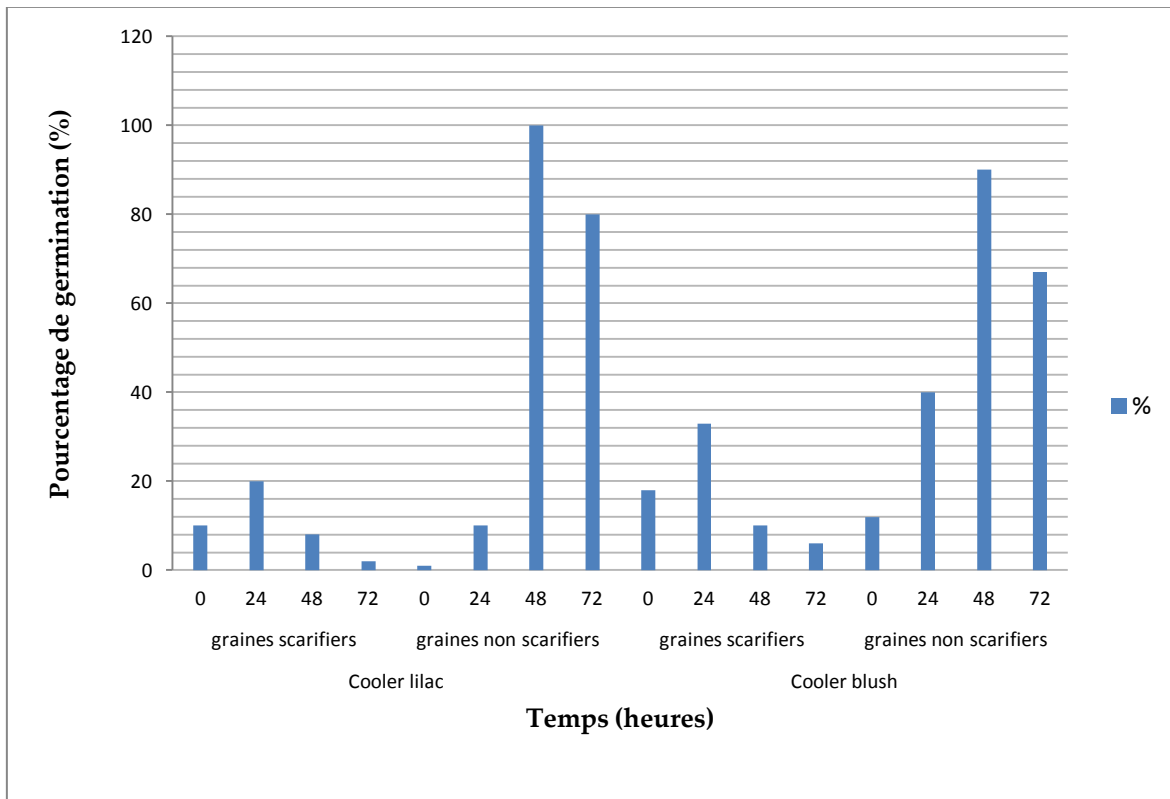


Figure 18. Effet de la scarification et du temps d'imbibition sur la germination des graines de *C. roseus*.



Figure 19. Vitrosemis de *C. roseus*, A: âgés de 12 jours ($G = 1,2 X$), B : âgés de 60 jours ($G = 0,66 X$).

1.2 Induction de la caulogénèse

Nos essais sont menés pour tester différente concentration de BAP sur l'induction de la caulogénèse via les bourgeons axillaires puis la prolifération de Pousses (Ps) (Figure 20). Les temps moyens d'apparition des premiers bourgeons axillaires sur les explants mis en culture sur le milieu MS additionné de 1, 1,5 et 2 mg / L de BAP, sont respectivement de 3,6, 4,3 et 5 jours (Tableau 7).

Les résultats obtenus après trois semaines de culture (Tableau 7), montrent que la concentration de BAP a un effet significatif sur le taux d'induction de bourgeons axillaires sur les explants, le groupe homogène le plus intéressant est représenté par les explants traités par 2 mg / L de BAP permettant un taux d'induction de 91,66 %. En outre, le nombre moyen de bourgeons axillaires formés par explant est également influencé par la concentration de

BAP, et le meilleur résultat est enregistré avec le même traitement de 2 mg / L de BAP, permettant de produire en moyenne de 8,6 bourgeons axillaires par explant.

Les pousses induites à partir des bourgeons axillaires avec les différentes concentrations de BAP, n'ont montré aucune formation de cal. D'autre part, étant donné que la concentration de 2 mg / L de BAP s'est montrée la plus efficace, elle a été retenue comme concentration optimale pour la production de pousses.

✓ **Tableau 7. Effet de différentes concentrations de BAP sur l'induction de bourgeons axillaires.**

Concentration de BAP (mg/L)	Temps d'apparition des bourgeons axillaires (jours)	Taux d'induction de bourgeons axillaires (%)	Nombre moyen de bourgeons axillaires / explant (3 semaines de culture)
0	3	30,33 ^D	1,8 ± 0,63 ^d
1	3,6	69,23 ^C	4 ± 0,66 ^c
1,5	4,3	90,47 ^B	6 ± 1,06 ^b
2	5	91,66 ^A	8,6 ± 1,17 ^a

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents au seuil de 5%.

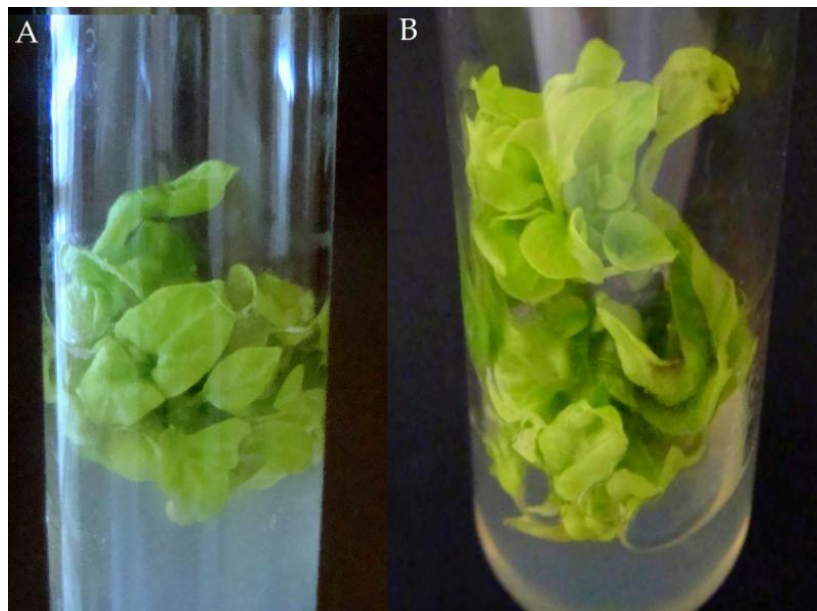


Figure 20. Aspect des pousses sur milieu semi-solide MS avec 2 mg / L de BAP, A: Pousse âgée de 2 semaines (G = 1,1 X), B: Pousse âgée de 4 semaines (G = 1,2 X).

1.3 Etablissement des chevelus racinaires (CRs)

1.3.1 Induction de la rhizogenèse

Tout explant ayant montré une ébauche racinaire est comptabilisée comme chevelu racinaire. Ainsi, les CRs ont été obtenus à partir de différents types d'explant de *C. roseus* (Hypocotyles, feuilles et bourgeons) des deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush », inoculés avec deux souches d'*A. rhizogenes* (A4 et AR 15834).

D'une manière générale, le temps moyen d'apparition de la première racine est plus court, 12 jours, pour les explants bourgeons inoculés pendant 3 jours avec l'*A. rhizogenes*. Ce temps dépasse 14 jours pour les autres types d'explants et pour les autres temps de co-culture.

Après soixante jours de culture, les résultats illustrés dans la figure 21 montrent que le type d'explant utilisé a un effet significatif sur le pourcentage d'induction des CRs (Annexe 4), le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre A qui correspond aux explants bourgeons axillaires pour les deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush », dont les taux d'induction sont, respectivement, de 90 % et 100 %. Cependant, les groupes les moins intéressants sont représentés par les lettres H, K et L qui correspondent aux explants hypocotyles avec des taux d'induction qui ne dépassent pas 5 % pour les deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush ».

Par ailleurs, les résultats obtenus (Figure 21) montrent que la période de co-culture des explants avec les deux souches d'*A. rhizogenes* (A4 et AR 15834), testées dans notre étude, a aussi un effet significatif sur le pourcentage d'induction des CRs (Annexe 4), le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre « a » qui correspond à l'inoculation pendant 3 jours avec l'A4 et l'AR 15834 des deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush », respectivement.

En outre, les résultats illustrés dans la figure 22 montrent que le type d'explant présente un effet significatif (Annexe 4) sur le nombre moyen de racines induites par explant. Le groupe homogène le plus intéressant est représenté par la lettre A qui correspond aux explants bourgeons des deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush » inoculés pendant 3 jours avec la souche A4 et AR 15834, respectivement, dont le nombre moyen de racines par explant est

de 10,27 et 9,55, respectivement. D'autre part, les résultats obtenus (Figure 22) montrent que la période de co-culture a un effet significatif sur le nombre moyen de racines induites par explant, le groupe homogène le plus intéressant « a » est représenté par l'inoculation, pour les deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush », pendant 3 jours avec la souche A4 et AR 15834, respectivement.

Globalement, les explants bourgeons (Figure 23 A, B, C et D) inoculés pendant 3 jours avec l'*A. rhizogenes*, présentent les meilleures aptitudes à l'induction de racines. Cette aptitude est exprimée par le taux d'induction de racines, le temps moyen d'apparition de la première racine et le nombre moyen de racines par explant par rapport aux autres types d'explants (feuilles et hypocotyles).

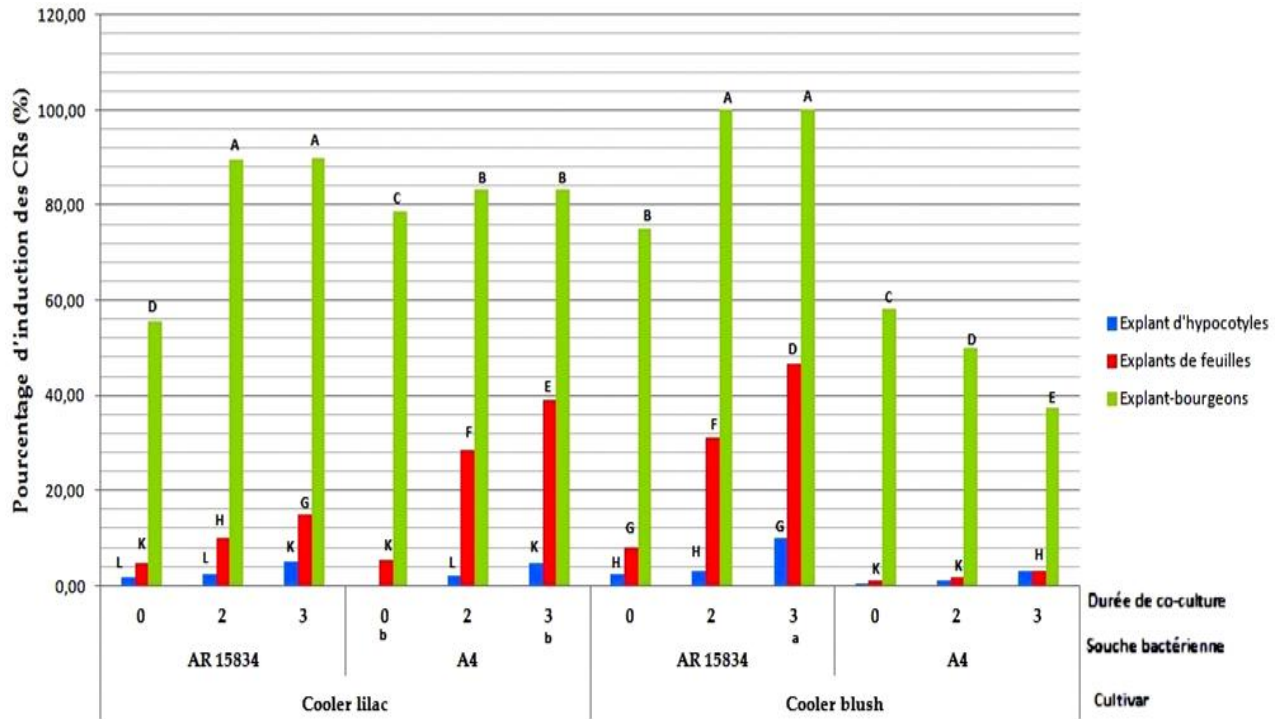


Figure 21. Effets de la variété, du type d'explant, de la souche bactérienne et du temps de co-culture sur la fréquence d'induction des racines de *C. roseus*.

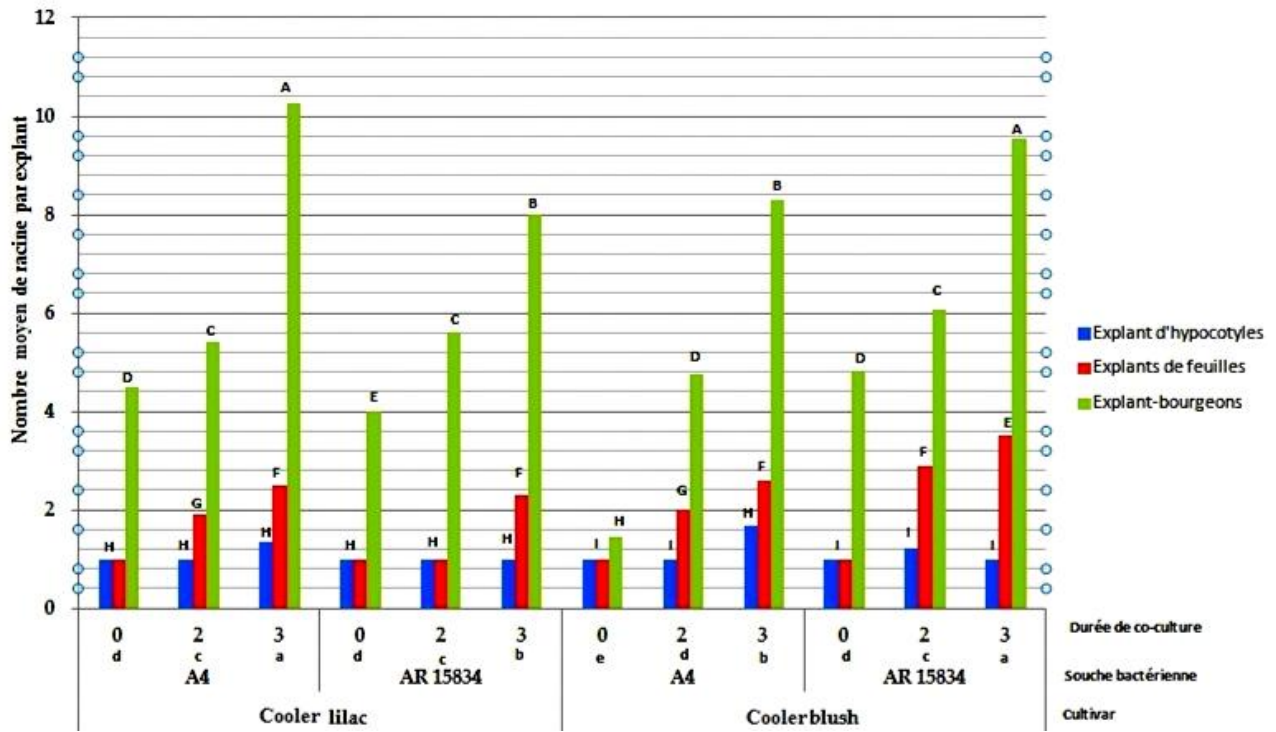


Figure 22. Effets de la variété, du type d'explant, de la souche bactérienne et du temps de co-culture sur le nombre moyen de racines par explant de *C. roseus*.



Figure 23. Racines de *C. roseus* induites sur milieu semi-solide B5 dilué de moitié. A, B, C et D: Racines induites sur les sites blessés des explants bourgeons (A, B, C: G = 3 X et D: G = 8 X). E et F: Racines induites sur les sites blessés des explants feuilles (E: G = 5 X et F: G = 6 X).

1.3.2 Sélection des lignées de CRS performantes

Notre sélection pour les lignées racinaires performantes est effectuée, uniquement, sur les racines transformées issus des explants bourgeons des deux cultivars « Cooler lilac » et « Cooler blush », en raison de leur nombre qui dépassent les 1000 lignées, ainsi que pour leurs survies en présence de l'antibiotique dans le milieu de culture (destiné à éliminer les résidus de bactéries).

Vus leurs nombres limités, aucune lignée racinaire de feuilles ou d'hypocotyles n'a été sélectionnée dans cette partie.

Parmi les 1229 lignées de CRs induites, et cultivées pendant 60 jours sur le milieu semi-solide B5 dilué au 1/2, 40 lignées racinaires ont été sélectionnées sur la base de leur bonne croissance (une longueur moyenne qui dépasse 5 cm) et leur degré de ramification latérale ainsi que pour l'absence de formation de cals, synonyme d'un développement chaotique (tumoral). Une seconde sélection parmi les 40 lignées a été réalisée après 15 jours de culture. Elle a permis d'affiner la sélection et de retenir 10 lignées racinaires performantes, pour leur bonne croissance, leur biomasse et leur degré élevé de ramification.

Afin de déterminer la capacité d'adaptation des CRs et leur potentiel de production de biomasse, dans un milieu liquide, les 10 lignées racinaires sélectionnées ont été cultivées sur le milieu B5 liquide dilué au 1/2 pendant 20 jours. Par la suite, une troisième sélection a eu lieu. Elle a permis de ne retenir que trois lignées racinaires : L54, LP10 et LP21 (Figure 24). Cette dernière sélection est basée sur leur forte production de biomasse (Tableau 8). La lignée LP10 montre la plus forte croissance en termes de biomasse avec un indice de croissance biomasse égale à 24,48 fois l'inoculum initial.

✓ **Tableau 8. Variation de l'indice de croissance (IC) des lignées issues de la deuxième sélection de CRs, après 20 jours de culture dans le milieu liquide B5 dilué de moitié.**

Cultivar	Lignées sélectionnées	Indice de croissance (IC)
	L2	5.49 ± 1.59
	L12	4.39 ± 0.55
Cooler lilac	L14	6.15 ± 0.27
	L17	13.53 ± 1.21
	L54	21.03 ± 1.91 *
	LP10	24.48 ± 1.13 *
	LP15	2.41 ± 0.50
Cooler blush	LP16	2.0 ± 1.38
	LP3	2.49 ± 1.13
	LP21	14.10 ± 1.02 *

* lignées sélectionnées selon un bon indice de croissance..

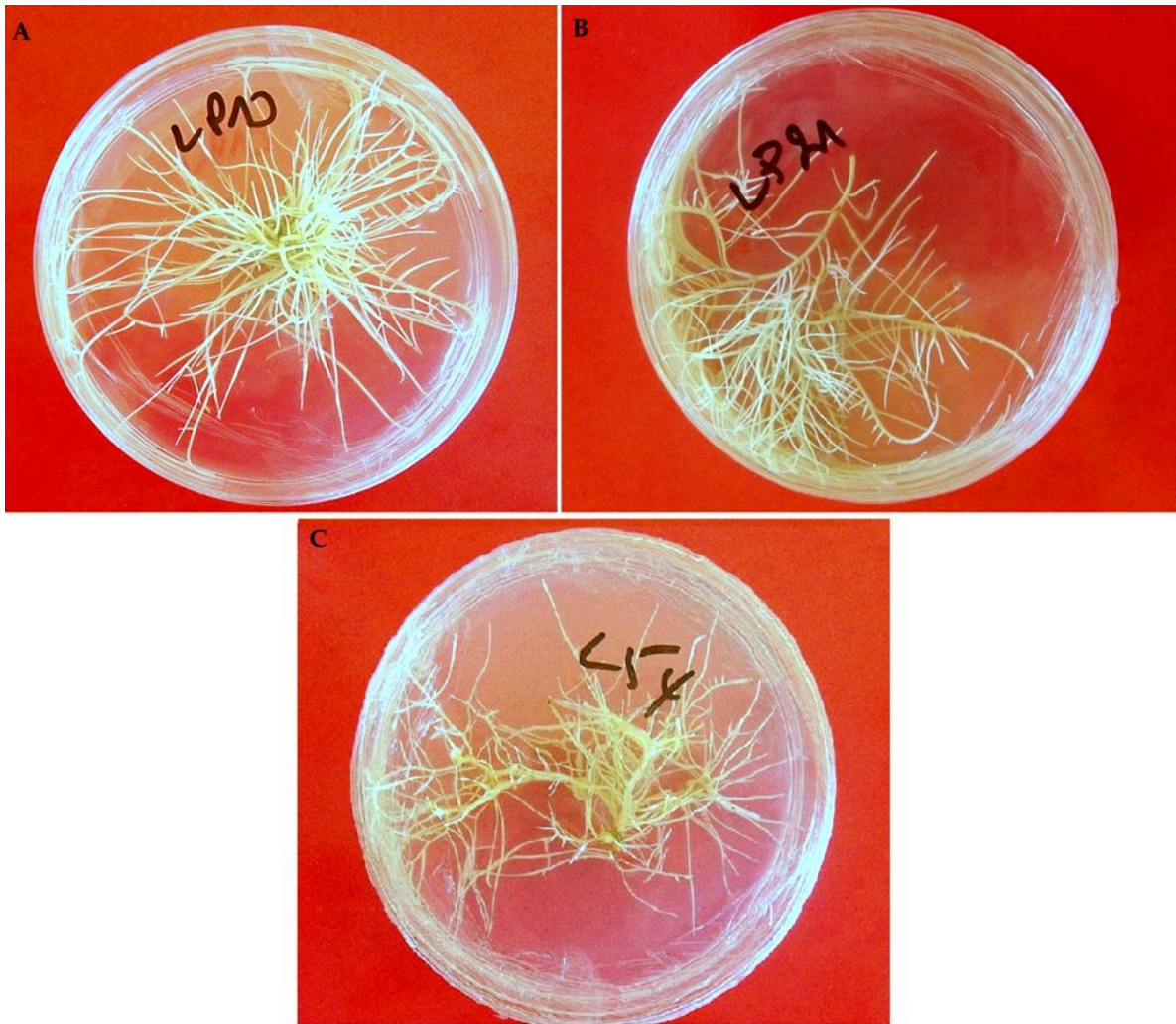


Figure 24. Aspect Morphologique des lignées racinaires de *C. roseus*. Obtenues suites à l'inoculation par *A. rhizogenes*. A: La lignée LP10. B: la lignée LP21. C: La lignée L54 ($G = 0,66 X$). Après 20 jours de culture.

1.3.3 Vérification par PCR de la nature transgénique des racines induites

La Figure 25 montre que l'ADN génomique isolé à partir des racines non transformées des vitrosemis de *C. roseus* (témoin négatif: piste 1) ne montre aucune bande après l'amplification par PCR du gène *rolB*. Cependant, les racines induites inoculées par l'une des deux souches d'*A. rhizogenes* ont révélé la présence d'une bande unique d'ADN après la PCR.

Par ailleurs, cette bande correspondant au gène *rolB* existe dans les trois lignées racinaires sélectionnées (L54, LP21 et LP10: bandes 4, 5 et 6, respectivement). Sachant que le gène *rolB* ne peut provenir que des souches d'*Agrobacterium* sp. (ADN du plasmide Ri des deux souches bactériennes A4 et AR15834: témoins positifs: bandes 2 et 3), on peut considérer que toutes les lignées racinaires qui expriment ce gène sont transgéniques. Ces résultats confirment la nature transgénique de nos trois lignées racinaires sélectionnées. Cette transformation est la conséquence d'une intégration du gène bactérien *rolB* dans le génome des tissus végétaux traités par *A. rhizogenes* (Gelvin, 2009; White et al., 1985). Ainsi, les lignées racinaires qui en découlent peuvent être considérées comme des chevelus racinaires à croissance infinie.

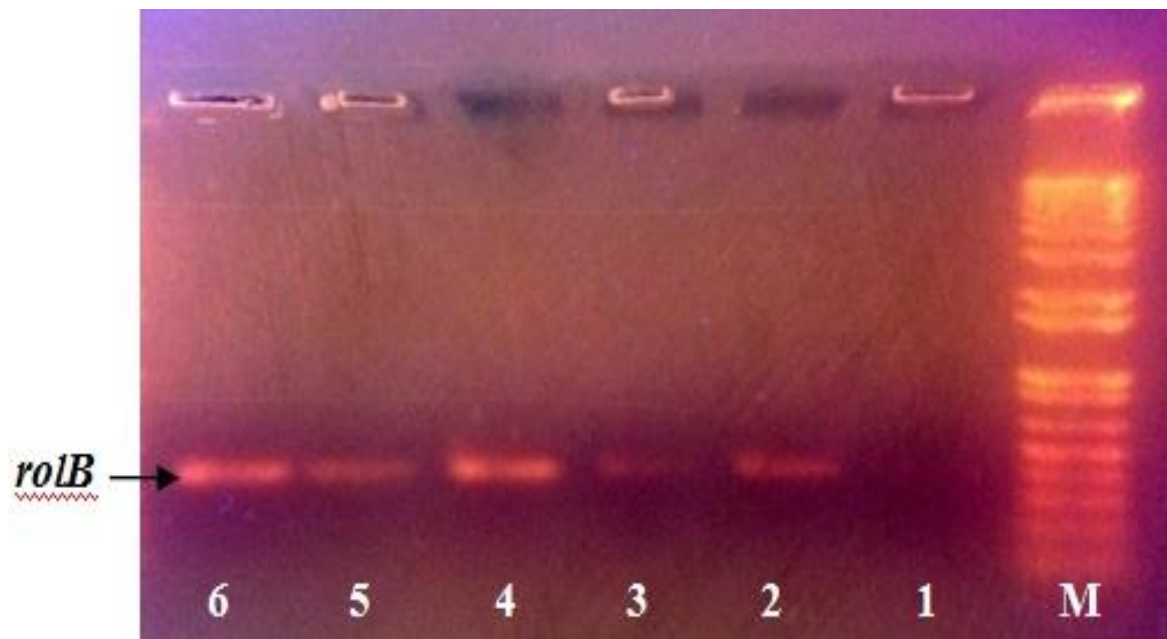


Figure 25. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques du gène *rol B*, des ADN extraits des bactéries d'*A rhizogenes* (A4 et AR15834) et des ADN extraits d'échantillons des lignées de CRs de *C. roseus* après électrophorèse sur gel d'agarose. M: marqueur de poids moléculaire (1 kb plus DNA ladder).

- 1: absence de bande du gène *rolB* dans l'ADN génomique des racines non inoculées par *A. rhizogenes* (témoin négatif);
- 2: bande du gène *rolB* du plasmide Ri de l'A4 (témoin positif 1);
- 3: bande du gène *rolB* du plasmide Ri de l'AR15834 (témoin positif 2);
- 4: bande du gène *rolB* intégré dans la lignée racinaire L54;
- 5: bande du gène *rolB* intégré dans la lignée racinaire LP21;
- 6: bande du gène *rolB* intégré dans la lignée racinaire LP10.

2 Cinétique de croissance

2.1 Cinétique de croissance des pousses

2.1.1 Évolution de la biomasse

Les pousses (Ps), du cultivar « Cooler blush », induites avec les différentes concentrations de BAP sont transférées sur le milieu MS liquide additionné de 2 mg / L de BAP (Figure 26 a), dans lequel ces cultures montrent une prolifération très rapide et une accumulation de la biomasse. La courbe de la cinétique de croissance obtenue (Figure 27), après l'évaluation du poids sec pendant un cycle de culture de 34 jours, peut être décomposée en cinq phases de développement.

Au début du cycle de croissance, du 6^{ème} au 10^{ème} jour, le poids sec des Ps passe de 0,5 g à 0,95 g soit une augmentation de 90 %. Après cette première phase, la croissance de la biomasse se ralentit légèrement où le poids sec est de 1,25 g au 18^{ème} jour, soit une augmentation de 12 %. Après cette phase de ralentissement, c'est la phase de croissance accélérée, qui s'étale jusqu'au 22^{ème} jour, où le pic d'accumulation du poids sec est de 1,96 g, soit une augmentation de 60 %. Par la suite, la croissance de la biomasse présente une baisse de 25 % au 26^{ème} jour, ce qui correspond à la phase de déclin caractérisée par l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. La dernière phase, est la phase stationnaire de croissance caractérisée par un poids sec constant. Elle s'étale de 26^{ème} jour au 34^{ème} jour du cycle de culture.

2.1.2 Évolution de l'accumulation des alcaloïdes indoliques

Dans la présente étude, la présence d'ajmalicine, de catharanthine et de vindoline, à différents stades du cycle de croissance, dans les pousses est révélée et quantifiée par LC-MS / MS.

D'après la figure 28, l'alcaloïde majeur produit par les pousses est la vindoline. L'accumulation de cet alcaloïde indolique monomère s'accélère dès le 10^{ème} jour jusqu'au 22^{ème} jour, à ce point un pic d'accumulation de vindoline est enregistré avec une teneur de 230 mg / 100 g M.S. A partir du 22^{ème} jour une baisse de la teneur en vindoline (TV) de 27 % est

enregistrée au 26^{ème} jour (par rapport à la TV maximale), avec une TV de 166 mg / 100 g M.S. Cette régression continue jusqu'au 34^{ème} jour où la TV est de 74 mg / 100 g M.S.

Par ailleurs, l'évolution de l'accumulation de la catharanthine dans les Ps est similaire à celle de la vindoline mais moins importante. L'accumulation maximale de la catharanthine est enregistré au 22^{ème} jour avec une teneur de 112 mg / 100 g M.S. A partir du 22^{ème} jour une baisse remarquable de la teneur en catharanthine (TC) de 71 % est enregistrée au 26^{ème} jour (par rapport au TC maximale), où la TC est de 79 mg / 100 g M.S.

Cependant, l'évolution de l'accumulation de l'ajmalicine est différente de celle de la vindoline et de la catharanthine. Le pic d'accumulation de l'ajmalicine est noté au 26^{ème} jour du cycle de culture avec une teneur de 169 mg / 100 M.S. Par la suite une légère baisse de 12 % de la TA est remarquée au 30^{ème} jour (par rapport au TA maximale), dont la TA est de 155 mg / 100 M.S.

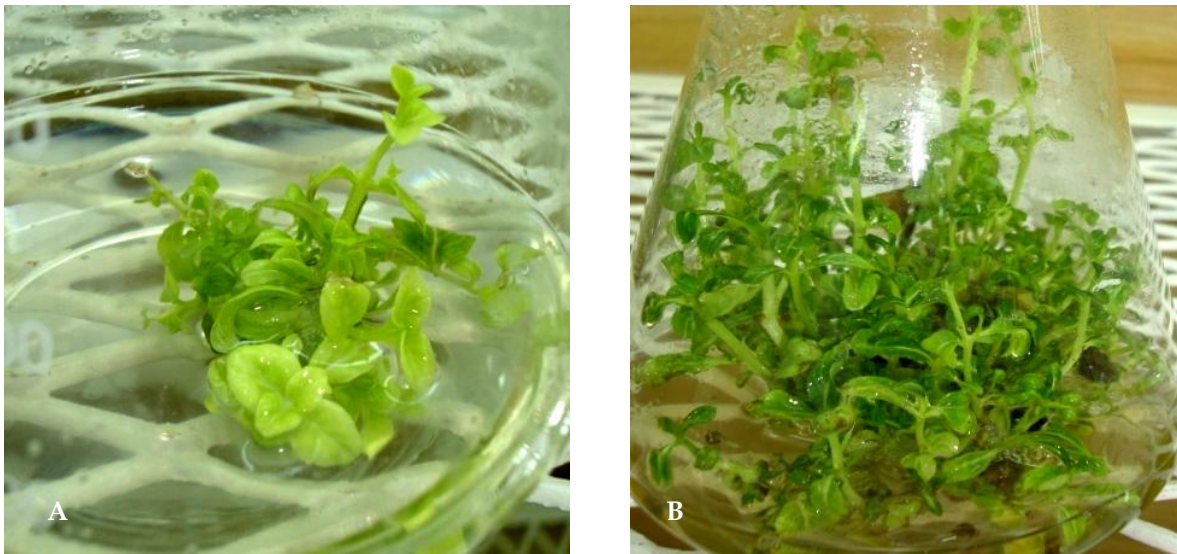


Figure 26. Aspect des pousses de *C. roseus*, du cultivar « Cooler blush », dans le milieu liquide MS additionné de 2 mg / L de BAP.

A: Pousse au premier jour de culture (G= 1,5X); B: Pousse après 22 jours de culture (G = 0,7 X).

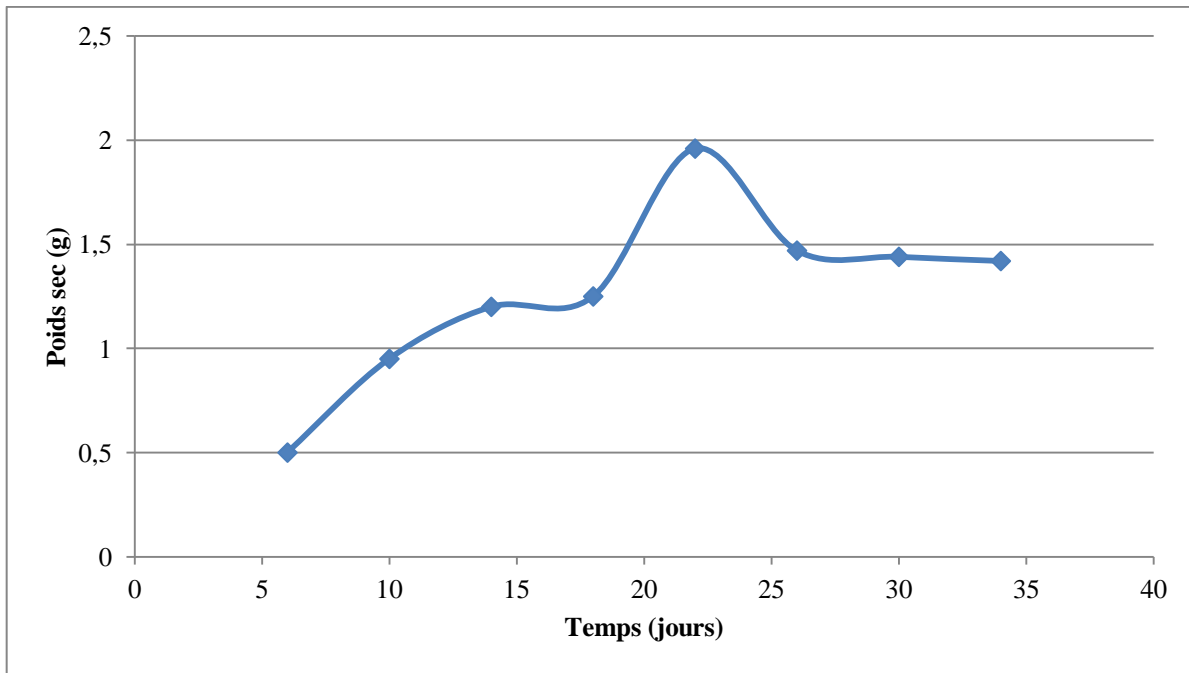


Figure 27. Cinétique de croissance des Ps du cultivar « Cooler blush ».

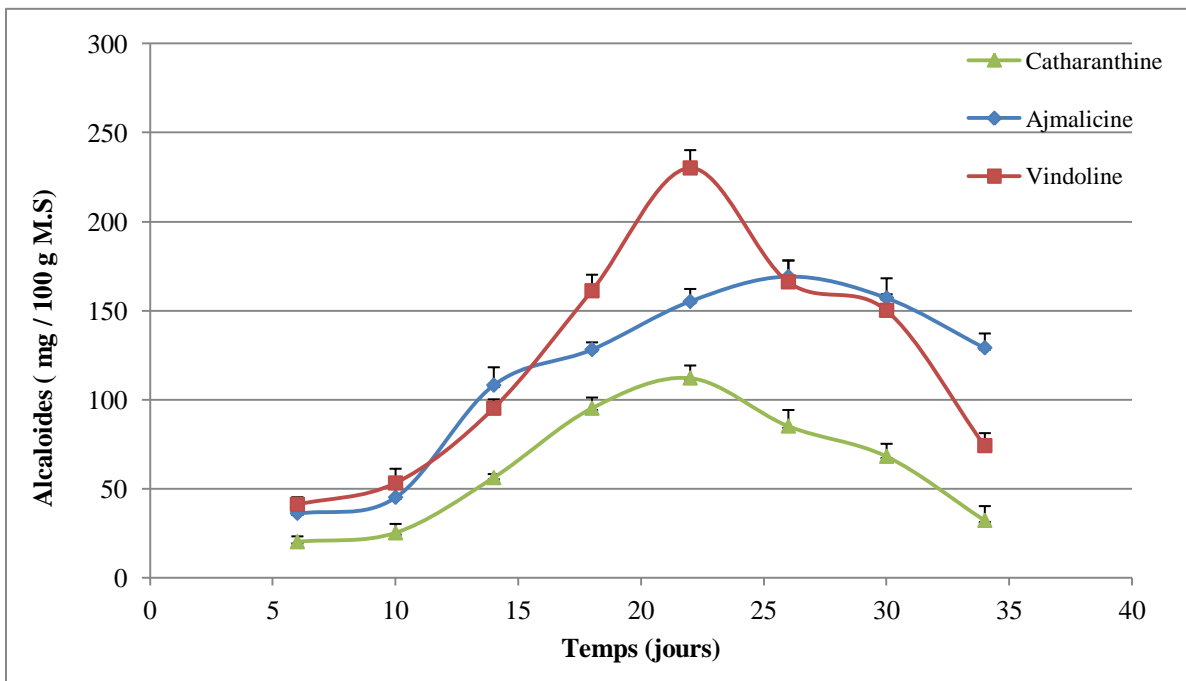


Figure 28. Évolution de la teneur en vindoline, catharanthine et ajmalicine des Ps du cultivar « Cooler blush ».

2.2 Cinétique de croissance des chevelus racinaires (CRs)

2.2.1 Évolution de la biomasse

Afin de déterminer la cinétique de croissance des trois lignées racinaires sélectionnées (LP10, LP21 et L54), le poids sec est utilisé pour mesurer l'accumulation de la biomasse pendant une période de culture de 35 jours. Les courbes de croissance des trois lignées racinaires sélectionnées (Figure 29) sont caractérisées par cinq phases. Les premiers jours de culture correspondent à une phase de latence, caractérisée par une évolution très faible de biomasse des CRs, expliquée par l'adaptation des lignées racinaires aux conditions de culture. Cette phase s'étale du 8^{ème} au 14^{ème} jour pour les trois lignées. La phase suivante est la phase exponentielle allant du 14^{ème} au 21^{ème} jour pour les lignées LP10 (Figure 30. A) et LP21 et du 14^{ème} au 17^{ème} jour pour la lignée L54. C'est une phase exponentielle précoce caractérisée par une faible accumulation de la biomasse.

La troisième phase est une phase stationnaire du 17^{ème} au 23^{ème} jour de culture caractérisée par une faible accumulation de biomasse chez la lignée L54. Alors que pour les lignées LP10 et LP21, la troisième phase est caractérisée par une baisse de biomasse du 21^{ème} au 23^{ème} et du 21^{ème} au 26^{ème} jour pour LP10 et LP21, respectivement.

La quatrième phase représente une croissance accélérée prolongée jusqu'au 32^{ème} jour de culture pour les deux lignées LP10 (Figure 30. B) et L54, et jusqu'au 29^{ème} jour pour la lignée LP21. Au cours de cette phase, les pics d'accumulation du poids sec enregistrés, pour les trois lignées LP10, L54 et LP21, sont respectivement de 0,35, 0,24 et 0,1 g, soit une amélioration de 30, 12 et 10 fois par rapport au poids initial, sachant que le poids initial est le même pour les trois lignées.

La dernière phase de croissance, est une phase de déclin qui commence à la fin de la phase exponentielle et se prolonge jusqu'au 35^{ème} jour de culture. Elle est caractérisée par un ralentissement de la vitesse de croissance pour la lignée de LP10 et par une diminution du poids sec pour les lignées L54 et LP21.

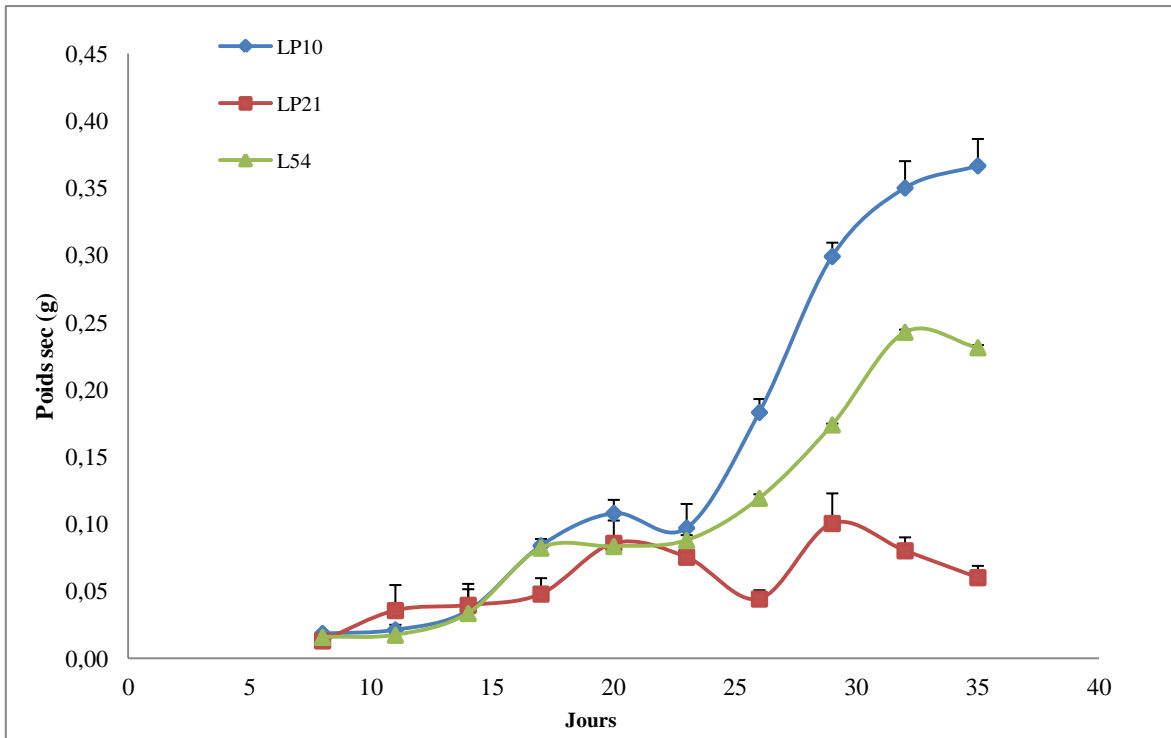


Figure 29. Cinétique d'accumulation du poids sec des trois lignées sélectionnées de CRs de *C. roseus*.

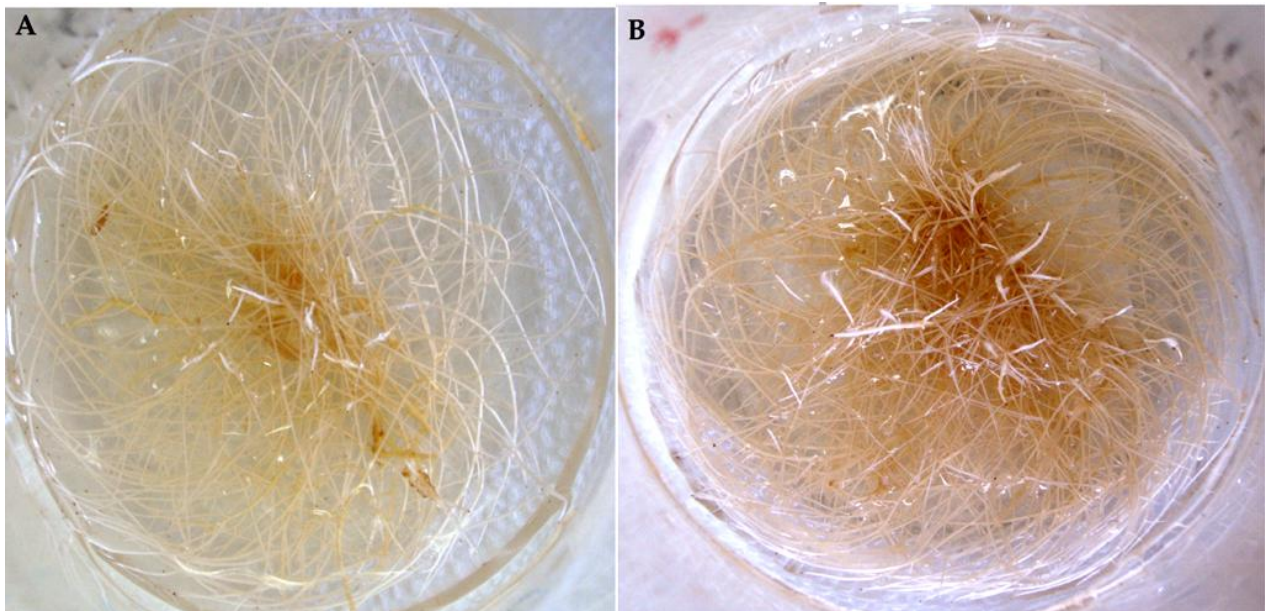


Figure 30. Aspect des CRs de la lignée LP10 sur milieu liquide B5 dilué au $\frac{1}{2}$ ($G = 0,8 X$), A: 14^{ème} jour de culture et B: 29^{ème} jour de culture.

2.2.2 Évolution de l'accumulation des alcaloïdes indoliques

La présence d'ajmalicine et de catharanthine, à différents stades du cycle de croissance, dans les lignées racinaires transformées LP10, LP21 et L54 est révélée et quantifiée par LC-MS / MS.

La lignée LP10 montre une augmentation significative et dynamique des teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC) avec des maximums enregistrés au 29^{ème} et 32^{ème} jour, qui correspondent à des teneurs moyennes de 386,13 et 430,71 mg / 100 g M.S, respectivement (Figure 31 et 32). D'autre part, la lignée LP21 montre un profil d'accumulation sensiblement similaire à celui de la lignée LP10, mais avec des concentrations inférieures, de sorte que les maximums d'accumulation sont enregistrés au 29^{ème} et 32^{ème} jour, avec des teneurs moyennes de 377,94 et 197,20 mg / 100 g M.S, respectivement. Cependant, pour la lignée L54, l'accumulation de la catharanthine et de l'ajmalicine est relativement constante au cours du cycle de culture, la teneur varie entre 125,67 et 166,19 mg / 100 g M.S pour la catharanthine (Figure 31), et entre 220,44 et 262,84 mg / 100 g M.S pour l'ajmalicine (Figure 32). Il est à noter que l'évolution de la TA est légèrement plus importante par rapport à celle de la TC, contrairement aux autres lignées LP10 et LP21 qui sont plus riches en catharanthine.

Les pics d'accumulation de l'ajmalicine et de la catharanthine coïncident avec la phase exponentielle de croissance des CRs, pour les deux lignées LP10 et LP21. Tandis que, pour la lignée L54, les pics d'accumulation de l'ajmalicine et de la catharanthine coïncident avec le début de la phase de déclin de croissance des CRs.

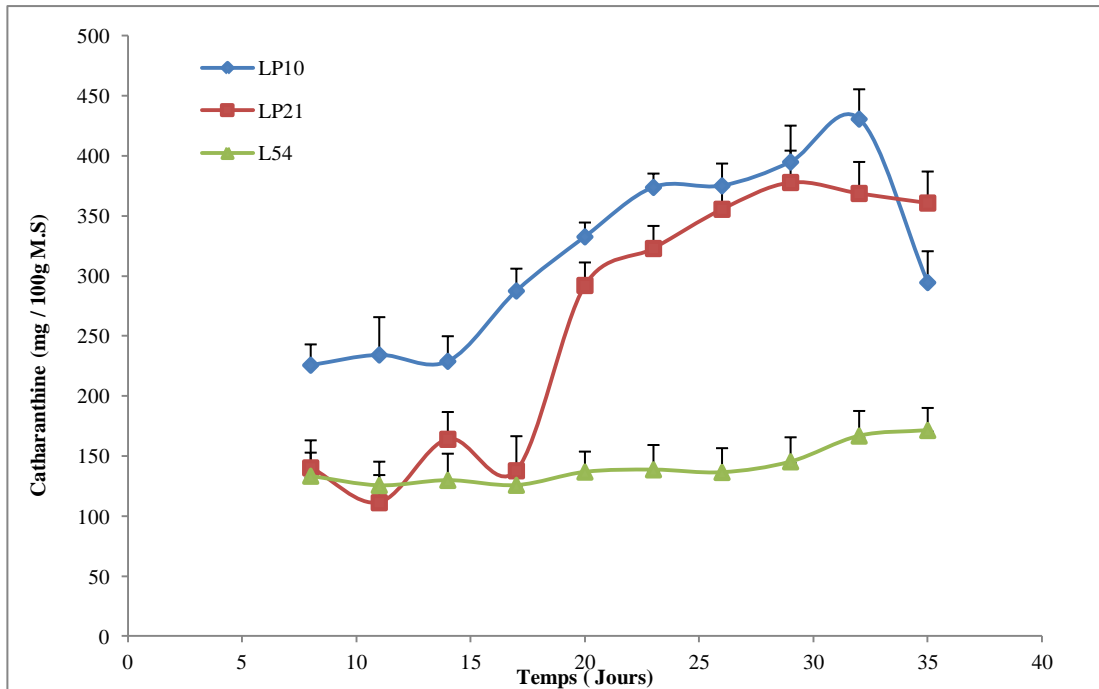


Figure 31. Évolution de l'accumulation de la catharanthine dans les trois lignées sélectionnées de CRs de *C. roseus*.

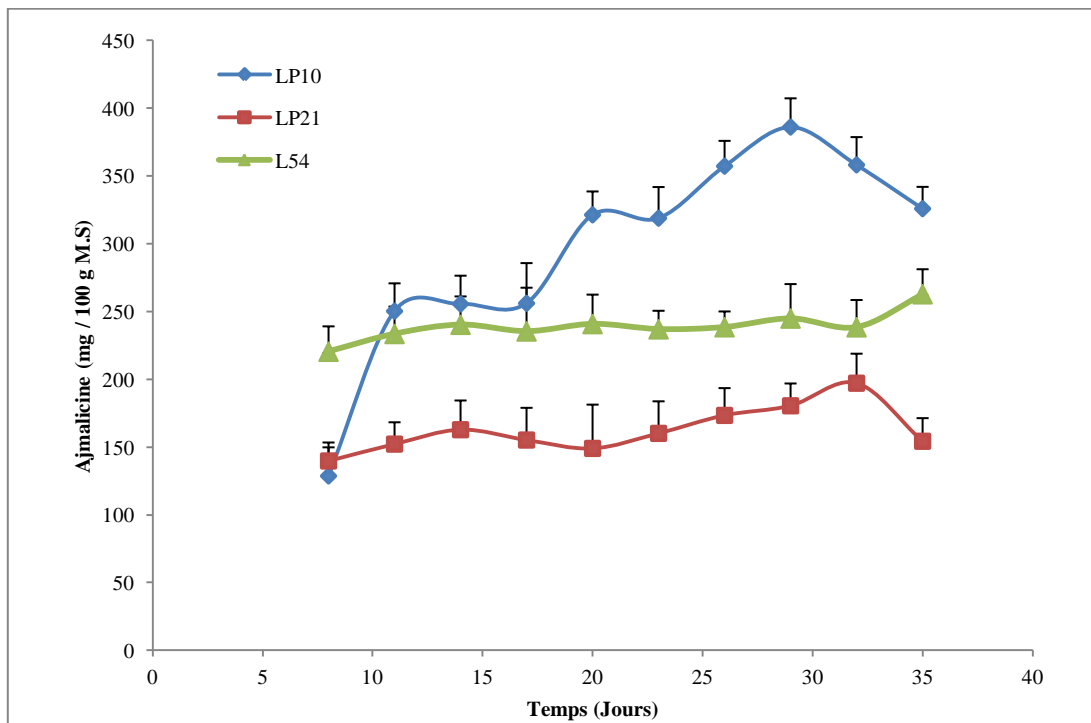


Figure 32. Évolution de l'accumulation d'ajmalicine dans les trois lignées sélectionnées de CRs de *C. roseus*.

2.2.3 Corrélation entre la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes indoliques

La production maximale des deux alcaloïdes, ajmalicine et catharanthine, coïncide avec la phase exponentielle de croissance accélérée des CRs pour les deux lignées LP10 et LP21, et coïncide au début de la phase stationnaire pour L54. Nos résultats montrent une bonne relation entre la production de biomasse et l'accumulation de l'ajmalicine et la catharanthine pour les trois lignées de CRs sélectionnées. Au cours du cycle de culture, nous avons constaté une relation linéaire positive (Annexe 3) entre la croissance de la biomasse et l'accumulation de la catharanthine. Cette relation est significative pour les deux lignées LP10 ($R^2 = 0,4697$) et LP21 ($R^2 = 0,5635$), et elle très significative pour la lignée L54 ($R^2 = 0,8399$) (Tableau 9). D'autre part, la relation entre la croissance de la biomasse et l'accumulation de l'ajmalicine est aussi linéaire positive. Seulement, cette relation est significative pour les deux lignées LP10 ($R^2 = 0,5337$) et L54 ($R^2 = 0,4786$). En revanche, cette relation est peu significative pour la lignée LP21 ($R^2 = 0,2994$) (Tableau 9).

En conséquence, on peut conclure que la biosynthèse de l'ajmalicine et la catharanthine est proportionnelle à la croissance de la biomasse des CRs pour l'ensemble des lignées LP10, LP21 et L54.

✓ **Tableau 9. Niveaux de corrélation entre la croissance de la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes dans les trois lignées sélectionnées de *C. roseus*.**

Lignées de CRs	Coefficient de corrélation d'alcaloïde	
	Catharanthine	Ajmalicine
LP10	0,4697**	0,5337**
LP21	0,5635**	0,2994*
L54	0,8399***	0,4786**

(* , ** et ***: niveau de signification, valeur de $p \leq 0,01$)

3 Effet de l'élicitation

3.1 Effet de l'élicitation des CRs

3.1.1 Elicitation par l'acide salicylique

D'une manière générale, les poids secs des CRs élicitées par l'acide salicylique (AS) sont légèrement plus élevés par rapport aux témoins, ce qui révèle un effet positif de l'AS sur la croissance des trois lignées racinaires (Tableau 10). Les poids sec des CRs les plus élevés, sont de 0,43, 0,20 et 0,26 g obtenus, respectivement, avec les lignées racinaires LP10, LP21 et L54, alors que les témoins sont de 0,12, 0,09 et 0,13 g. Les gains les plus élevés, en fonction de la lignée, sont obtenus avec une élicitation par 10^{-6} M d'AS pendant 24 heures, soient des améliorations de 258,33, 122,22 et 100 %, respectivement.

L'analyse de la variance révèle un effet significatif de l'AS sur La teneur moyenne en catharanthine (TC) et en ajmalicine (TA) des lignées racinaires sélectionnées (Annexe 4). Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique de chaque lignée racinaire montre:

- ✓ Pour la lignée LP10: 7 groupes homogènes pour la TA et 6 groupes homogènes pour la TC;
- ✓ Pour la lignée LP21: 6 groupes homogènes pour la TA et la TC;
- ✓ Pour la lignée L54: 4 groupes homogènes pour la TA et 7 groupes homogènes pour la TC;

Selon le tableau 10, la TA la plus élevée est obtenue avec la lignée LP10 (493,65 mg / 100 g M.S) traitée par 10^{-3} M d'AS pendant 24 heures. Un niveau d'amélioration de 52,66 %, par rapport au témoin est alors enregistré. Quand au TC la plus élevée est, également, enregistrée par la lignée LP10 (568,29 mg / 100 g M.S) après 48 heures de traitement par 10^{-4} M d'AS, soit une amélioration de 57,22 % par rapport au témoin.

Cependant, les niveaux d'améliorations les plus intéressants de la TA et la TC, en fonction de la lignée ; de la concentration d'AS et du temps d'élicitation, sont enregistrés pour la lignée L54 après 48 heures de contact avec 10^{-4} M d'AS, avec des taux d'amélioration de 60,96 % et de 171,83 % pour la TA et la TC, respectivement. De même pour la lignée LP21,

le meilleur niveau d'amélioration est remarqué pour la concentration d'AS de 10^{-4} M et un temps de contact de 48 heures avec des taux d'amélioration respectifs, de 43,20 et 83,87 % pour la TA et la TC.

✓ **Tableau 10. Effet de l'élicitation par l'AS sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.**

Lignée	TE (Heures)	C d'AS (M)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs (mg/100g M.S)		TAALs (%)		
					TA	TC	TA	TC	
LP10	T	0	0,12±0,01	-	323,35±16 ^D	361,45±11 ^D	-	-	
	24	10^{-3}	0,13±0,02	8,33	493,65±10^A	356,31±9,5 ^D	52,67	-1,42	
		10^{-4}	0,15±0,04	25,00	219,76±14 ^G	341,41±23 ^E	-32,04	-5,54	
		10^{-5}	0,31±0,02	158,33	260,37±12 ^F	489,74±12 ^C	-19,48	35,49	
		10^{-6}	0,43±0,01	258,33	251,63±6,7 ^F	281,44±19 ^F	-22,18	-22,14	
	48	10^{-3}	0,10±0,03	-16,67	373,30±21 ^C	544,51±13 ^B	15,45	50,65	
		10^{-4}	0,12±0,06	0,00	454,44±11 ^B	568,29±17^A	40,54	57,23	
		10^{-5}	0,13±0,02	8,33	309,35±22 ^E	389,86±10 ^C	-4,33	7,86	
		10^{-6}	0,15±0,05	25,00	330,71±8,8 ^D	376,37±22 ^C	2,28	4,13	
	T	0	0,09±0,04	-	266,35±13 ^C	279,81±14,5 ^D	-	-	
	LP21	24	10^{-3}	0,10±0,02	11,11	285,65±9 ^B	323,50±10,5 ^C	7,25	15,61
			10^{-4}	0,11±0,04	22,22	223,67±18 ^F	238,53±15 ^E	-16,02	-14,75
10^{-5}			0,17±0,04	88,89	240,50±14 ^E	204,44±10 ^F	-9,71	-26,94	
10^{-6}			0,20±0,01	122,22	231,67±19 ^E	197,48±12 ^F	-13,02	-29,42	
48		10^{-3}	0,08±0,02	-11,11	291,73±14 ^B	490,23±12 ^B	9,53	75,20	
		10^{-4}	0,09±0,03	0,00	381,42±21^A	514,50±9^A	43,20	83,87	
		10^{-5}	0,10±0,03	11,11	254,53±9 ^{DE}	285,22±8 ^D	-4,44	1,93	
		10^{-6}	0,10±0,01	11,11	245,53±15 ^{DE}	287,28±11,5 ^D	-7,82	2,67	
T	0	0,13±0,04	-	244,47±13 ^C	136,61±20 ^G	-	-		
L54	24	10^{-3}	0,11±0,02	-15,38	323,49±11 ^B	185,66±8,5 ^E	32,32	35,91	
		10^{-4}	0,12±0,01	-7,69	209,46±12 ^D	162,51±13 ^F	-14,32	18,96	
		10^{-5}	0,21±0,01	61,54	210,35±10 ^D	183,56±9,5 ^E	-13,96	34,37	
		10^{-6}	0,26±0,06	100,00	244,55±14 ^C	252,33±13 ^C	0,03	84,71	
	48	10^{-3}	0,11±0,02	-15,38	341,73±18 ^B	303,53±13 ^B	39,78	122,19	
		10^{-4}	0,11±0,03	-15,38	393,52±21^A	371,36±11^A	60,97	171,84	
		10^{-5}	0,15±0,02	15,38	248,58±17 ^C	214,40±9,3 ^D	1,68	56,94	
		10^{-6}	0,14±0,04	7,69	251,69±20 ^C	225,61±14 ^D	2,95	65,15	

TE: Temps d'élicitation; C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS: Amélioration du poids sec; TALs: Teneur en alcaloïdes; TAALs : Amélioration en alcaloïdes ; T:Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.1.2 Elicitation par le sel CaCl_2

Le tableau 11 regroupe les résultats obtenus après l'élicitation des trois lignées racinaires sélectionnées, avec le sel (CaCl_2) pendant 24 et 48 heures. Une légère hausse des poids secs des CRs élicitées est enregistrée, par rapport aux témoins correspondants, pour les lignées traitées par 3 mM de CaCl_2 pendant 24 heures. Les poids secs les plus élevés, par lignée, sont de 0,16, 0,12 et 0,17 g obtenus respectivement avec LP10, LP21 et L54, alors que les témoins sont de 0,12, 0,09 et 0,13 g, respectivement. Cependant, des pertes du poids sec des CRs de 33,33 et 30 % sont enregistrées, respectivement pour LP10, LP21 et L54 après un traitement avec 3 mM de CaCl_2 , pendant 24 heures.

Par ailleurs, l'analyse de la variance révèle un effet significatif de CaCl_2 sur la teneur en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC) des CRs (Annexe 4). Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$), réalisé sur la TA et la TC de chaque lignée racinaire révèle:

- ✓ Pour la lignée LP10: 6 groupes homogènes pour la TA et 5 groupes homogènes pour la TC;
- ✓ Pour la lignée LP21: 6 groupes homogènes pour la TA et 4 groupes homogènes pour la TC;
- ✓ Pour la lignée L54: 5 groupes homogènes pour la TA et 3 groupes homogènes pour la TC;

Le groupe le plus intéressant pour la TA est formé par la lignée LP10 élicitée avec 3 mM de CaCl_2 pendant 48 heures avec une teneur est de 435,65 mg / 100 g M.S. En outre, le meilleur groupe pour la TC est obtenu par la lignée LP10 élicitée avec 10 mM de CaCl_2 pendant 24 heures avec une teneur de 435,36 mg / 100 g M.S.

D'autre part, la meilleure évolution de la TA et de la TC est enregistrée par la lignée L54 après un traitement avec 3 mM de CaCl_2 et un temps de contact de 48 heures. Les niveaux d'amélioration de la TA et de la TC sont de 39,36 % et de 99,50 %, respectivement, par rapport aux témoins.

✓ **Tableau 11. Effet de l'élicitation par CaCl₂ sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.**

Lignée	TE (Heures)	C de CaCl ₂ (mM)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs (mg/100g M.S)		TAALs (%)	
					TA	TC	TA	TC
LP10	T	0	0,12±0,01	-	323,35±16 ^C	361,45±11 ^C	-	-
	24	3	0,16±0,06	33,33	412,74±13 ^B	363,55±7 ^C	27,64	0,58
		5	0,13±0,02	8,33	341,28±14 ^C	371,42±10 ^{BC}	5,55	2,76
		10	0,11±0,02	-8,33	259,18±20 ^D	435,36±19^A	-19,85	20,45
	48	3	0,11±0,04	-8,33	435,65±6^A	386,46±5 ^B	34,73	6,92
		5	0,09±0,01	-25,00	217,53±11 ^E	281,42±16 ^D	-32,73	-22,14
		10	0,08±0,01	-33,33	183,48±17 ^F	247,45±20 ^E	-43,26	-31,54
LP21	T	0	0,09±0,04	-	266,35±13 ^B	279,81±14 ^B	-	-
	24	3	0,12±0,02	33,33	345,53±17^A	263,51±5 ^C	29,73	-5,83
		5	0,10±0,02	11,11	180,33±15 ^D	286,76±9 ^B	-32,30	2,48
		10	0,09±0,01	0,00	215,26±7 ^C	362,42±12^A	-19,18	29,52
	48	3	0,08±0,05	-11,11	270,49±17 ^B	285,44±15 ^B	1,55	2,01
		5	0,07±0,02	-22,22	120,31±22 ^E	262,70±9 ^C	-54,83	-6,11
		10	0,05±0,03	-44,44	79,41±16 ^F	249,21±14 ^D	-70,19	-10,94
L54	T	0	0,13±0,04	-	244,47±13 ^C	136,61±20 ^C	-	-
	24	3	0,17±0,02	30,77	287,70±10 ^B	193,36±16 ^B	17,68	31,64
		5	0,14±0,01	7,69	243,56±21 ^C	202,49±13 ^B	-0,37	-0,67
		10	0,12±0,01	-7,69	247,63±17 ^C	259,26±20 ^A	1,29	2,31
	48	3	0,11±0,03	-15,38	340,71±10^A	272,54±7^A	39,37	70,45
		5	0,10±0,02	-23,08	228,56±21 ^D	187,49±13 ^B	-6,51	-11,65
		10	0,09±0,02	-30,77	198,70±27 ^E	146,38±13 ^C	-18,72	-33,50

TE: Temps d'élicitation; C: Concentration; PdS: Poids sec, TAPdS: Amélioration du poids sec; TALs: Teneur en alcaloïdes; TAALs: Amélioration en alcaloïdes; T: Témoin; TA: Teneur en ajmalicine; TC: Teneur en catharanthine.

Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.1.3 Elicitation combinée par CaCl₂ et l'AS

D'après le tableau 12, les poids secs des CRs, d'une manière générale, sont légèrement plus faibles que les témoins. Les poids secs les plus élevés, par lignée, sont de 0,21, 0,15 et 0,18 g obtenus respectivement avec LP10, LP21 et L54, après 24 heures de traitement avec 10⁻⁶ M d'AS et 3 mM de CaCl₂, soit des gains de 75 %, 66,66 % et 38,46 % par rapport aux témoins correspondants. Cependant, des pertes du poids sec des CRs de 41,64, 22,22 et 30,77 % sont enregistrées, respectivement pour LP10, LP21 et L54 après un traitement avec 10⁻³ M d'AS et 3 mM de CaCl₂, pendant 48 heures.

Par ailleurs, l'analyse de la variance révèle un effet significatif (Annexe 4) des traitements sur la TA et la TC des CRs. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique de chaque lignée racinaire révèle:

- ✓ Pour la lignée LP10: 7 groupes homogènes pour la TA et 5 groupes homogènes pour la TC.
- ✓ Pour la lignée LP21: 6 groupes homogènes pour la TA et 5 groupes homogènes pour la TC.
- ✓ Pour la lignée L54: 7 groupes homogènes pour la TA et la TC.

La TA la plus élevée est obtenue avec la lignée LP10 (590,29 mg / 100 g M.S), après un traitement combiné avec 10^{-3} M d'AS et 3 mM de CaCl_2 pendant 24 heures. De plus, le niveau d'amélioration le plus intéressant de la TA est enregistré avec la même modalité précédente qui est supérieur au témoin de 82,55 %.

D'autre part, la TC la plus élevée est enregistrée également pour la même lignée LP10 (597,44 mg / 100 g M.S) après 48 heures d'élicitation avec 10^{-3} M d'AS et 3 mM de CaCl_2 . Seulement, le niveau d'amélioration le plus intéressant de TC est enregistré pour la lignée L54 avec un taux de 175,11 % après une élicitation de 24 heures par 10^{-3} M d'AS et 3 mM de CaCl_2 . De même pour la lignée LP21, une amélioration de TC de 83,82 % est enregistrée en appliquant le même traitement précédent.

✓ **Tableau 12. Effet de l'élicitation combinée par CaCl₂ (3 mM) et l'AS sur la biomasse et la TA et la TC des CRs.**

Lignée	TE (Heures)	C d'AS (M)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs (mg/100g M.S)		TAALs (%)	
					TA	TC	TA	TC
LP10	T	0	0,12±0,01	-	323,35±16 ^E	361,45±11 ^C	-	-
	24	10 ⁻³	0,09±0,02	-25,00	590,29±17^A	597,44±10^A	82,55	65,29
		10 ⁻⁴	0,11±0,04	-8,33	409,29±10 ^C	386,29±15 ^B	26,58	6,87
		10 ⁻⁵	0,15±0,02	25,00	454,68±10 ^B	382,17±10 ^B	40,62	5,73
		10 ⁻⁶	0,21±0,01	75,00	406,67±16 ^C	346,13±12 ^C	25,77	-4,24
	48	10 ⁻³	0,07±0,03	-41,67	240,29±7 ^F	302,56±14 ^E	-25,69	-16,29
		10 ⁻⁴	0,09±0,06	-25,00	228,93±11 ^G	322,69±13 ^D	-29,20	-10,72
		10 ⁻⁵	0,11±0,02	-8,33	364,81±10 ^D	313,74±8 ^{DE}	12,82	-13,20
		10 ⁻⁶	0,13±0,05	8,33	377,84±16 ^D	348,96±13 ^C	16,85	-3,46
	LP21	T	0	0,09±0,04	-	266,35±13 ^E	279,81±14 ^C	-
24		10 ⁻³	0,09±0,02	0,00	378,50±13^A	514,36±14^A	42,11	83,82
		10 ⁻⁴	0,11±0,04	22,22	319,54±11 ^C	289,45±9 ^C	19,97	3,45
		10 ⁻⁵	0,13±0,04	44,44	303,58±6,5 ^D	228,62±14 ^D	13,98	-18,29
		10 ⁻⁶	0,15±0,01	66,67	326,77±12 ^B	217,54±11,5 ^E	22,68	-22,25
48		10 ⁻³	0,07±0,02	-22,22	255,97±10 ^F	230,98±10 ^D	-3,90	-17,45
		10 ⁻⁴	0,08±0,03	-11,11	263,83±11 ^E	221,36±14 ^E	-0,95	-20,89
		10 ⁻⁵	0,09±0,03	0,00	266,26±25 ^E	286,96±10 ^C	-0,03	2,56
		10 ⁻⁶	0,09±0,01	0,00	336,77±12 ^B	322,65±7 ^B	26,44	15,31
L54		T	0	0,13±0,04	-	244,47±13 ^E	136,61±20 ^G	-
	24	10 ⁻³	0,10±0,02	-23,08	432,76±15^A	375,83±15^A	77,02	175,11
		10 ⁻⁴	0,12±0,01	-7,69	386,34±20 ^B	318,51±9,8 ^B	58,03	133,15
		10 ⁻⁵	0,13±0,01	0,00	418,29±10 ^A	260,18±16 ^D	71,10	90,45
		10 ⁻⁶	0,18±0,06	38,46	372,30±16 ^B	214,39±12 ^E	52,29	56,94
	48	10 ⁻³	0,09±0,02	-30,77	200,11±8 ^F	195,24±5 ^F	-18,15	42,92
		10 ⁻⁴	0,11±0,03	-15,38	283,61±6 ^D	208,56±8 ^{EF}	16,01	52,67
		10 ⁻⁵	0,12±0,02	-7,69	299,33±12 ^C	290,88±8,6 ^C	22,44	112,93
		10 ⁻⁶	0,11±0,04	-15,38	311,84±5 ^C	322,36±12 ^B	27,56	135,97

TE: Temps d'élicitation; C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS: Amélioration du poids sec; TALs: Teneur en alcaloïdes; TAALs : Amélioration en alcaloïdes ; T:Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.1.4 Elicitation par des agents à effet épigénétique

3.1.4.1 Elicitation par l'5-Azacytidine

L'addition de la 5-Azacytidine (5- AC) au début de la culture, affecte probablement l'expression des gènes en inhibant la méthylation de l'ADN dans la chromatine. Cela peut avoir un impact sur le taux de l'accumulation de biomasse et de la production des alcaloïdes.

L'analyse de la variance révèle un effet significatif de la 5-AC sur la TA et la TC des CRs (Annexe 4). Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$), réalisé sur le contenu de l'ajmalicine et la catharanthine de chaque lignée sélectionnées de CRs montre:

- ✓ 5 groupes homogènes pour la TA et la TC, pour la lignée LP10.
- ✓ 3 groupes homogènes pour la TA et 6 groupes homogènes pour la TC, pour la lignée LP21.
- ✓ 5 groupes homogènes pour la TA et 3 groupes homogènes pour la TC, pour la lignée L54.

LP21

L54

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS: Taux d'amélioration du poids sec; TALs: Teneur en alcaloïdes ; TAALs: Taux d'amélioration en alcaloïdes ; T: témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.1.4.2 Elicitation par la trichostatine

Tout comme la 5-Azacytidine, la trichostatine (TSA) provoque des modifications sur l'expression des gènes en augmentant l'acétylation des histones dans la chromatine. De ce fait, il est fort possible d'avoir un changement dans l'accumulation de la biomasse et la production des alcaloïdes.

Selon les résultats obtenus (Tableau 14), il est clair que les teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC) sont plus élevées par rapport aux témoins. L'analyse de la variance

révèle un effet significatif de la TSA sur la TA et la TC des CRs (Annexe 4). Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$), réalisé sur le contenu alcaloïdique, révèle:

- ✓ 5 groupes homogènes pour la TA et la TC chez la lignée LP10.
- ✓ 4 groupes homogènes pour la TA et 5 groupes homogènes pour la TC chez la lignée LP21.
- ✓ 5 groupes homogènes pour la TA et 4 groupes homogènes pour la TC chez la lignée L54.

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS: Taux d'amélioration du poids sec; TALs: Teneur en alcaloïdes ; TAALs: Taux d'amélioration en alcaloïdes ; T: témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.2 Effet de l'élicitation des Pousses

3.2.1 Elicitation par l'acide salicylique

Le tableau 15 regroupe les résultats obtenus après élicitation des Pousses avec différentes concentrations d'AS (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M) et un temps d'élicitation de 24 heures. Concernant la biomasse, nous avons enregistré une légère augmentation des poids sec au niveau des Ps traités par rapport aux témoins, surtout avec la concentration de 10^{-5} M d'AS où le poids sec passe de 0,76 g (témoin) à 0,86 g, soit une hausse de 13 %.

Par ailleurs, l'analyse de la variance révèle un effet significatif de l'AS sur les teneurs en ajmalicine (TA), en catharanthine (TC) et en vindoline (TV) des Pousses (Annexe 4). Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique des Ps révèle 3 groupes homogènes pour la TA ainsi pour la TC, et 5 groupes homogènes pour la TV. Les groupes les plus intéressants pour la TA et TC sont formé par les Ps élicitées par 10^{-6} M d'AS avec des teneurs de 238,61 et 221,87 mg / 100 g M.S, respectivement, soit une amélioration de 81,70 % et 110,32 %, respectivement, par rapport aux témoins. Par contre, pour la TV le groupe le plus intéressant est formé par les Ps élicitées par 10^{-5} M d'AS, avec une teneur de 346,44 mg / 100 g M.S, soit une amélioration de 53,55 % par rapport au témoin.

✓ **Tableau 15. Effet de l'élicitation par l'AS sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.**

C de l'AS (M)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs (mg / 100 g M.S)			TAALs (%)		
			TA	TC	TV	TA	TC	TV
T (0)	0,76±0,05		131,32±10 ^B	105,49±14,2 ^C	225,61±13 ^D			
10^{-3}	0,72±0,06	-5,26	101,35±12 ^C	91,90±6,4 ^C	218,51±14 ^E	-22,82	-12,88	-3,15
10^{-4}	0,74±0,05	-2,63	98,00±7 ^C	110,60±13,5 ^C	243,43±13,5 ^C	-25,37	4,84	7,90
10^{-5}	0,86±0,03	13,16	129,58±5,7 ^B	167,50±9,3 ^B	346,44±10^A	-1,33	58,78	53,56
10^{-6}	0,82±0,08	7,89	238,61±10,5^A	221,87±11,7^A	312,34±12 ^B	81,70	110,32	38,44

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS : Taux d'amélioration du poids sec ; TALs : Teneur en alcaloïdes ; TAALs: Taux d'amélioration en alcaloïdes; T: Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine; TC: Teneur en catharanthine; TV : Teneur en Vindoline.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.2.2 Elicitation par CaCl₂

Le tableau 16 représente les résultats obtenus après l'élicitation des Ps avec différentes concentrations de CaCl₂ (3, 5 et 10 mM) pendant 24 heures. Les poids secs des Ps élicitées sont légèrement supérieurs par rapport aux témoins. Le poids sec le plus élevé est de 0,85 g obtenus après le traitement de 24 heures avec 5 mM de CaCl₂, soit 11,84 % d'augmentation.

Pour les teneurs en alcaloïdes, l'analyse de la variance révèle un effet significatif (Annexe 4) des traitements sur la TA, la TC et la TV des Ps élicités. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique des Ps, montre 3 groupes homogènes pour la TA et la TC, et 4 groupes homogènes pour la TV. Les teneurs les plus intéressantes en ajmalicine, catharanthine et en vindoline sont notées par les Ps traités par 5 mM de CaCl₂, avec 244,74, 128,54 et 435,53 mg / 100 g M.S, soit une amélioration de 86,37 %, 21,85 % et 93,05 %, respectivement.

✓ **Tableau 16. Effet de l'élicitation par CaCl₂ sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.**

C du CaCl ₂ (mM)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs(mg / 100g M.S)			TAALs (%)		
			TA	TC	TV	TA	TC	TV
T(0)	0,76±0,05	-	131,32±10 ^C	105,49±14,2 ^B	225,61±13 ^C	-	-	-
3	0,78±0,03	2,63	177,49±12 ^B	102,85±15,7 ^B	185,37±10 ^D	35,16	-2,50	-17,84
5	0,85±0,01	11,84	244,74±9^A	128,54±13,8^A	435,53±12,7^A	86,37	21,85	93,05
10	0,76±0,01	0,00	167,42±13,5 ^B	91,45±8,4 ^C	304,57±11 ^B	27,49	-13,31	35,00

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS : Taux d'amélioration du poids sec ; TALs : Teneur en alcaloïdes ; TAALs : Taux d'amélioration en alcaloïdes; T: Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine; TV : Teneur en Vindoline.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.2.3 Elicitation combinée par CaCl₂ et l'AS

Après l'élicitation combinée des Ps, de légères baisses de biomasse (4 %) sont enregistrées après un traitement de 5 mM de CaCl₂ et 10⁻³ M d'AS. Cependant, une amélioration de 20 % du poids sec est enregistrée avec les Ps traitées avec 5 mM de CaCl₂ et 10⁻⁵ M d'AS.

L'analyse de la variance révèle un effet significatif (Annexe 4) de l'élicitation par les différentes concentrations d'AS combinées avec 5 mM de CaCl₂ sur les teneurs en ajmalicine, catharanthine et vindoline des Ps élicités. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu alcaloïdique des Ps, révèle 3 groupes homogènes pour la TA, 4 groupes homogènes pour la TC et 5 groupes homogènes pour la TV. L'élicitation combinée des Ps avec l'AS et le CaCl₂ a donné des résultats plus intéressants que l'élicitation séparée avec l'une des deux molécules (AS et CaCl₂), et plus spécialement pour la TC et la TV des Ps traitées avec une combinaison de 5mM de CaCl₂ et de 10⁻⁵ M d'AS, avec des teneurs de 244,51 et 527,50 mg / 100 g de M.S, soit une amélioration de 131,79 % et 133,81 % (Tableau 17), respectivement, par rapport aux témoins.

✓ **Tableau 17. Effet de l'élicitation combinée par CaCl₂ (5 mM) et l'AS sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.**

C de l'AS (M)	PdS (g)	TAPdS (%)	TALs (mg / 100 g M.S)			TAALs (%)		
			TA	TC	TV	TA	TC	TV
T (0)	0,76±0,05	-	131,32±10 ^C	105,49±14,2 ^D	225,61±13 ^E	-	-	-
10 ⁻³	0,73±0,03	-3,95	156,45±11 ^B	152,56±11,6 ^C	403,59±13,2 ^C	19,14	44,62	78,89
10 ⁻⁴	0,76±0,05	0,00	116,93±13,2 ^C	162,55±20,5 ^C	347,53±12,4 ^D	-10,96	54,09	54,04
10 ⁻⁵	0,91±0,01	19,74	180,73±14,5^A	244,51±15,9^A	527,50±13,6^A	37,63	131,79	133,81
10 ⁻⁶	0,86±0,02	13,16	151,67±11,4 ^B	215,75±12,8 ^B	439,90±15,7 ^B	15,50	104,52	94,98

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS : Taux d'amélioration du poids sec ; TALs : Teneur en alcaloïdes ; TAALs: Taux d'amélioration en alcaloïdes; T: Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine; TV: Teneur en Vindoline.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

3.2.4 Elicitation par l'agent épigénétique: la 5-Azacytidine

L'analyse de la variance montre un effet significatif de la 5-AC sur la TA, la TC et la TV. Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur le contenu des trois alcaloïdes dans les Ps, montre 4 groupes homogènes pour la TA et la TV, et 3 groupes homogènes pour la TC. Les

✓ **Tableau 18. Effet de l'élicitation par l'5-Azacytidine sur la biomasse et la TA, TC et TV des Ps.**

C: Concentration ; PdS : Poids sec, TAPdS : Taux d'amélioration du poids sec ; TALs : Teneur en alcaloïdes; TAALs: Taux d'amélioration en alcaloïdes; T : Témoin ; TA : Teneur en ajmalicine ; TC : Teneur en catharanthine; TV : Teneur en Vindoline.
Lettres en exposant représentent les groupes homogènes statistiquement différents.

DISCUSSION DES RESULTATS

1 Etablissement du matériel végétale

L'obtention du matériel végétale, à partir de la germination des graines, constitue une étape primordiale dans l'établissement des cultures *in-vitro* afin de produire les métabolites secondaires.

Nos résultats de germination, montrent que les graines de *C. roseus* trempées dans l'eau distillée pendant 48 heures donnent le taux le plus élevé de germination ($\geq 90\%$), par rapport aux graines non imbibées ($\leq 10\%$), ce qui représente une amélioration de la germination de l'ordre de 1300%. Par conséquent, la germination des graines de *C. roseus* ne nécessite qu'un simple trempage dans l'eau distillée pour avoir une germination rapide et à un pourcentage élevé.

Les graines qui présentent une inhibition tégumentaire nécessitent généralement une scarification pour l'obtention d'un grand taux de germination (Reisman-Berman *et al.*, 1991; Tieu and Egerton-Warburton 2000; Abdul Jaleel *et al.*, 2007; Loddo *et al.*, 2013). Cela ne semble pas être le cas pour nos graines de *C. roseus*. Abdul Jaleel *et al.* (2007) notent un taux de germination de 60% après une imbibition de 5 jours, des graines de *C. roseus* dans l'eau distillée. De même, Pandey *et al.* (2007) indiquent que l'imbibition des graines de *C. roseus*, pendant 12 heures dans l'eau distillée, est essentielle pour améliorer le taux de germination, en entraînant une augmentation de 50% par rapport aux graines non imbibées. Cela rejoint nos résultats.

Par ailleurs, les vitrosemis permettent de produire à partir de différents types d'explants (feuilles, tiges, racines, bourgeons ...), divers tissus non différenciés et différenciés tels que les cals, les suspensions cellulaires, les pousses, les chevelus racinaires. L'ensemble de ces tissus permettent à leurs tours d'étudier et d'améliorer le rendement en biomasse et en métabolites secondaires (Mujib *et al.*, 2012).

En effet, un grand intérêt a été accordé à la culture *in vitro* des pousses et des chevelus racinaires pour la production des métabolites secondaires. Ces deux modèles de culture ont été, largement, adoptés par de nombreux chercheurs en raison de leur rythme de croissance rapide ainsi que pour leur profil des métabolites secondaires qui est conforme à celui de la plante entière (Pati *et al.*, 2010; Sivanandhan *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2012; Makhzoum *et al.*, 2013)

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi dans le cadre du présent travail, ces deux modèles afin d'optimiser la production en alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs) de *C. roseus*.

Par ailleurs, l'établissement de la culture des pousses requiert la présence de cytokinine dans le milieu de culture. Dans notre cas, nous avons enregistré un taux élevée d'induction de bourgeons axillaires de 91,66 % sur les explants de *C. roseus*, après 3 semaines de culture, sur le milieu MS semi-solide additionnée de 2 mg / L de BAP. Hernández-Domínguez *et al.* (2006) ont enregistré un taux d'induction de bourgeons axillaires de *C. roseus* de 89 % avec une concentration de 1 mg / L de BAP, après 3 semaines de culture. Avec la même espèce, Pati *et al.* (2010) ont trouvé un taux d'induction de bourgeons axillaires de 85 % sur le milieu MS additionné de 5 mg / L de BAP. L'effet bénéfique de la BAP sur la formation et la prolifération des pousses a été expliqué selon Mok and Mok, (2001) par le contrôle de la division cellulaire, le développement des bourgeons axillaires, l'initiation et la croissance des pousses.

Concernant l'établissement des racines génétiquement transformées, plusieurs recherches (Camilleri, 1991, Batra *et al.*, 2004, Tao and Li, 2006, Tiwari *et al.*, 2008, Chandra, 2012) soulignent la présence de plusieurs facteurs pour assurer une transformation efficace, ces facteurs sont : le génotype végétal; la souche bactérienne, l'explant, la période de co-culture, etc... En effet, les souches à agropine d'*A. rhizogenes* (A4 et AR15834), sont les plus virulentes pour l'induction des CRs (Chandra, 2012, Roychowdhury *et al.*, 2013). L'explant, doit renfermer un tissu méristématique pour entraîner une transformation rapide (Makhzoum *et al.*, 2013). Par ailleurs, les périodes de co-culture longues, assurent la transformation rapide des cellules infectées par les bactéries, ce qui permet un gain de temps considérable pour produire les chevelues racinaires (CRs) (Rai *et al.*, 2012)

Nos recherches confirment l'effet de ces facteurs sur l'induction des CRs. En effet, la fréquence de transformation la plus élevée (100 %) est obtenue sur des bourgeons du cultivar « blush Cooler » inoculés pendant 3 jours avec l'*A. rhizogenes* « AR15834 ». L'efficacité de transformation, par l'*A. rhizogenes*, peut être expliquée par deux éléments: l'hypervirulence de la souche AR15834 qui a été utilisée avec succès pour transformer génétiquement des espèces végétales récalcitrantes tels que *Ginkgo biloba* (Ayadi and Trémouillaux-Guiller, 2003). Aussi, la présence des cellules méristématiques dans les bourgeons peut favoriser la transformation rapide grâce à leur compétence pour le transfert des gènes bactériens (Peña *et al.*, 2004). Cela a

été approuvé par plusieurs travaux (Park *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2004; Sticklen and Oraby, 2005; Nakajima *et al.*, 2013) sur de nombreuses autres espèces végétales très difficiles à transformer génétiquement comme les arbres, les arbustes et les céréales (le maïs, le millet, le blé, le riz, l'orge, l'avoine, le sorgho, le maïs, le lupin jaune et le prunier).

Chez *C. roseus*, de nombreux essais, de transformation par l'*A. rhizogenes* ont été effectuées seulement sur des hypocotyles et des feuilles (Toivonen *et al.*, 1989; Toivonen *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2004; Leduc *et al.*, 2006; Guillon *et al.*, 2008; Makhzoum *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). En outre, Guillon *et al.* (2008) et Batra *et al.* (2004) ont obtenu des taux d'inductions de CRs de 35 et 52 %, respectivement, sur des explants de feuilles de *C. roseus* inoculés avec l'*A. rhizogenes* pendant deux jours. Ces taux d'induction sont, nettement, inférieures aux nôtres, qui sont de 100 et 91 % obtenus sur des explants bourgeons des cultivars « Cooler blush et Cooler lilac », respectivement, après une inoculation de 3 jours avec les souches d'*A. rhizogenes*.

En effet, parmi les 1229 lignées de CRs induites pour nos deux cultivars, dix lignées performantes ont été sélectionnées pour leur bonne croissance de la biomasse et leur degré élevé de ramification sur le milieu semi-solide B5 dilué au 1/2. Nos lignées racinaires ont montré une grande variabilité dans leur morphologie et leur mode de croissance. Cela peut être expliqué par le fait que chaque lignée racinaire est issu d'un événement de transformation unique (Batra *et al.*, 2004). la variation génétique dans les lignées de CRs pourrait, quant à elle, être due aux différents modes d'expression des gènes de l'ADN-T en fonction du site d'intégration ; du nombre de copies et le sens de leur insertion dans le génome de la plante (Chandra, 2012).

Les trois lignées les plus performantes retenues (L54, LP10 et LP21), dans le cadre de la présente thèse, sont sélectionnées sur la base de leur capacité d'adaptation sur un milieu liquide ainsi pour leur forte production de biomasse. Ces trois lignées, ont montré une bonne production de biomasse par rapport au témoin, après 20 jours de culture sur milieu liquide soit : 21,03, 24,48 et 14,10 fois, respectivement. D'autres études sur *C. roseus*, ont stipulé que la croissance des CRs dans un milieu liquide augmente de 20 fois en 30 jours, par rapport aux inoculum initiaux (Ciau-Uitz *et al.*, 1994). Le potentiel de production de biomasse dépend de la lignée de CRs et de son adaptation dans le milieu liquide (Toivonen *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 2004). En effet, Taneja *et al.* (2010) ont également suggéré que la variation du taux de croissance des lignées de CRs est

largement influencée par le site d'intégration de l'ADN-T au niveau de certains locus du génome de la cellule hôte.

2 Croissance des tissus et teneurs en AITs

2.1 Dans les pousses

L'introduction d'un système de culture liquide pour la micropropagation *in-vitro* permet une augmentation de l'échelle de production et une réduction des coûts (Sandal *et al.*, 2001). Bien qu'il existe quelques travaux sur la micropropagation *in-vitro* de *C. roseus* (Hirata *et al.*, 1987; Hernández-Domínguez *et al.*, 2004; Pietrosiuk *et al.*, 2007; Mustafa *et al.*, 2009; Pati *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2012), il n'y a pas eu d'études menées sur l'évaluation globale du potentiel d'un système de culture liquide pour une micropropagation *in-vitro* à grande échelle. De plus, aucune information n'est disponible sur l'effet d'un système de culture liquide sur l'accumulation des alcaloïdes chez cette espèce.

En outre, la littérature indique que les constituants pharmacologiques actifs, la vinblastine et la vincristine, sont produits en petites quantités par la plante (Noble, 1990), et il y a un besoin urgent de développer des stratégies pour une production constante au niveau du matériel végétal en qualité améliorée et à grande échelle.

Pour relever ces défis, le présent travail se propose d'étudier la cinétique de croissance des pousses de *C. roseus* sur un milieu liquide pendant un cycle de culture de 34 jours, afin d'évaluer l'évolution de la biomasse et l'accumulation des AITs.

Au début du cycle de culture l'évolution de la biomasse est lente, ce qui serait dû à la lenteur des divisions cellulaires des tissus méristématiques (Sandal *et al.*, 2001). A partir du 18^{ème} jour de culture, l'évolution de la biomasse s'accélère jusqu' au 22^{ème} jour, où un pic d'accumulation du poids sec est enregistré (1,96 g). Plusieurs travaux qualifient cette étape d'évolution de phase exponentielle de croissance par une forte et rapide accumulation de biomasse (Ciau-Uitz *et al.*, 1994; Sandal *et al.*, 2001; Kawiak *et al.*, 2003; Sivanandhan *et al.*, 2012).

Cette amélioration de biomasse serait due à l'élongation et la différenciation des méristèmes dans les bourgeons ce qui augmente le poids sec des pousses. Lorsque le milieu liquide s'appauvrit en nutriments et en régulateurs de croissance, il conduit inéluctablement vers une baisse d'accumulation de la biomasse. Cette phase se produit dans notre cas entre le 22^{ème} et le 26^{ème} jour de culture. La même explication a été donnée par d'autres auteurs (Sandal *et al.*, 2001; Hernández-Domínguez *et al.*, 2004).

La culture des pousses *in-vitro* a été établie pour de nombreuses plantes médicinales, qui ont montré une accumulation des métabolites secondaires d'un degré plus grand que celui des plantes d'origine (Hirata *et al.*, 1987; Woerdenbag *et al.*, 1993; Sandal *et al.*, 2001; Kawiak *et al.*, 2003; Mithila *et al.*, 2003; Hernández-Domínguez *et al.*, 2006; Pati *et al.*, 2010; Sivanandhan *et al.*, 2012). Les pousses de *C. roseus* semblent être une source prometteuse pour la production des AITs. Hirata *et al.* (1994) rapportent que le modèle de production des AITs dans les pousses correspond qualitativement à celui des feuilles provenant des plantes natives, où les pousses accumulent la vindoline, la catharanthine et l'ajmalicine mais avec des quantités plus élevées par rapport à la plante mère. St-pierre *et al.* (1999) suggèrent que la participation des racines dans la synthèse de la vindoline n'est pas nécessaire pour les tissus aériens. Cela peut être expliqué par le fait que la biosynthèse de la vindoline est restreinte aux jeunes feuilles où l'activité des enzymes NMT (Guirimand *et al.*, 2011), D4H (Pan *et al.*, 2015) et DAT (St-Pierre *et al.*, 1999) est élevée (Vázquez-Flota *et al.*, 2002).

Nos résultats montrent une accumulation importante de la vindoline dans les pousses, par rapport à la catharanthine et l'ajmalicine. L'accumulation maximale de la vindoline a été observée au 22^{ème} jour du cycle de culture, avec une teneur de 230 mg / 100 g M.S. Cette teneur en vindoline (TV) est largement supérieure à celle de la plante naturelle qui n'est que de 38 mg / 100 g M.S (Hirata *et al.*, 1994), soit une amélioration de 505,26 %. Par ailleurs, Hernández-Domínguez *et al.*(2004) ont enregistré un pic d'accumulation de la vindoline, dans des pousses de *C. roseus*, au 27^{ème} jour du cycle de culture, avec une teneur de 193 mg / 100 g M.S.

Quant à l'évolution de la catharanthine dans les pousses, elle montre un profil d'accumulation similaire à celui de la vindoline, mais avec de valeurs plus faibles. L'accumulation maximale de la catharanthine est enregistrée au 22^{ème} jour avec une teneur de

112 mg / 100 g M.S. Cette teneur est plus élevée de 433,33 % par rapport à celle de plante entière (21 mg / 100 g M.S) (Hirata *et al.*, 1994).

La similarité du profil de la vindoline avec celui de la catharanthine peut être expliquée par le fait que ces deux substances sont synthétisées à partir du même précurseur « la stemmadénine », qui est une molécule dérivée du précurseur principale des AITs « la strictosidine ».

D'autre part, le profil d'accumulation de l'ajmalicine est différent de celui des deux molécules précédentes avec un pic d'accumulation au 26^{ème} jour du cycle de culture et une teneur de 169 mg / 100 M.S. Selon Hirata *et al.* (1994), le profil d'accumulation de l'ajmalicine des pousses de *C. roseus* est similaire à celui des feuilles provenant de la plante d'origine. Seulement, la teneur en ajmalicine dans les pousses est plus élevée de 463,33 % par rapport à la plante entière (30 mg / 100 g M.S.). Toutefois, ces résultats restent en deçà de nos résultats.

2.2 Dans les chevelus racinaires (CRs)

Les lignées racinaires transformées peuvent être une source prometteuse pour une production continue de métabolites secondaires. Cette production peut être durable et constante au fil des générations successives sans perte de leur stabilité biosynthétique (Giri and Narasu 2000). Les racines transformées de *C. roseus*, sont connues pour leur accumulation d'un grand nombre d'alcaloïdes indoliques terpénique monomères tels que la serpentine, l'ajmalicine, la vindoline et la catharanthine (Guillon *et al.*, 2008).

Afin d'étudier la cinétique de croissance des CRs, nous avons opté pour un système de culture liquide. Les trois lignées de CRs sélectionnées (LP10, LP21 et L54) ont montré presque le même profil d'accumulation de biomasse tout au long de leur cycle de culture (35 jours). Le profil de croissance de biomasse est divisé en 5 phases : phase de latence; phase exponentielle précoce, phase de chute, phase de reprise accélérée de la croissance (phase exponentielle prolongée) et enfin la phase de déclin.

Selon Baíza *et al.* (1998), la phase de latence est déterminée par une faible augmentation de la biomasse, qui est due au début du développement des racines latérales induites par les

divisions cellulaires des zones des méristèmes intercalaires. Alors que la phase de chute de croissance peut être expliquée par la nécrose de quelques chevelus racinaires (observés à l'œil nu), cela est déjà signalé par plusieurs auteurs (Toivonen *et al.*, 1990; Leduc *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2010). D'après Baíza *et al.* (1998), pendant la phase de croissance exponentielle, les cellules déjà entrées en pleine activité mitotique s'allongent suite à l'absorption d'eau, expliquant la forte croissance de la biomasse. Concernant notre étude, les pics d'accumulation de biomasse enregistrés sont de 0,35, 0,24 et 0,1 g, respectivement pour les lignées LP10, L54 et LP21, ce qui reflète une grande variation des réponses de nos 3 lignées. Taneja *et al.* (2010), suggèrent que la variation du taux de croissance des lignées de CRs est largement influencée par le site d'intégration de l'ADN-T à certains locus du génome de la cellule hôte.

Finalement, la phase de déclin est caractérisée par un ralentissement de la vitesse de croissance pour la lignée LP10 et / ou par une régression du poids sec comme pour les lignées L54 et LP21. D'après Mathur *et al.* (2010), la biomasse n'évolue plus lorsque les racines latérales ont la même taille que les racines principales. En plus, les racines latérales ne se ramifient plus. En outre, la régression de la biomasse est une conséquence de l'épuisement des substances nutritives dans le milieu de culture (Harfi *et al.*, 2013).

Dans la présente étude, les profils d'évolution d'ajmalicine et de catharanthine pour les trois lignées sélectionnées changent quantitativement et qualitativement selon les lignées racinaires sélectionnées. La variabilité génétique entre les lignées de CRs pourrait être due aux différents modes d'expression des gènes de l'ADN-T Ri en fonction de leur lieu d'intégration; leur nombre de copies et le sens de leur insertion dans le génome de la plante (Chandra, 2012), mais aussi, aux influences génétiques du matériel végétal d'origine (Ruiz-May *et al.*, 2008).

Les profils d'accumulation d'ajmalicine et de catharanthine des deux lignées LP10 et LP21 sont similaires, où les pics d'accumulation, sont enregistrés au 29^{ème} et 32^{ème} jour, respectivement. Cependant, les taux d'accumulation sont différents entre les deux lignées, la LP10 montre des teneurs supérieures en ajmalicine et en catharanthine (386,13 et 430,71 mg/100 g M.S, respectivement). Ces pics d'accumulation coïncident avec la fin de la phase exponentielle de croissance prolongée des CRs. Ferreres *et al.* (2010), ont trouvé des résultats similaires, où la teneur en catharanthine (TC) et la teneur en ajmalicine (TA) maximale sont de 160 et 320 mg / 100 g M.S, respectivement, à la fin de la phase exponentielle de croissance des CRs. En

revanche, d'autres équipes de recherche ont noté des niveaux optimaux d'accumulation en ajmalicine et en catharanthine au début de la phase de déclin de croissance des CRs de *C. roseus*, avec des TA et TC de 125 et 10 mg / 100 g M.S (Guillon *et al.*, 2008) et de 70 et 10 mg / 100 g M.S (Vázquez-Flota *et al.*, 1994), respectivement.

La coïncidence du pic de production en alcaloïdes est corrélée avec la phase de croissance exponentielle de la biomasse des CRs. Cette relation a également été notée chez d'autres espèces végétales tel que *Panax quinquefolium* (Mathur *et al.*, 2010), *Datura sp.* (Baíza *et al.*, 1998), *Hyoscyamus niger* (Zhang *et al.*, 2007) et *Scutellaria baicalensis* (Tiwari *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014), où le plus haut niveau de production en métabolites secondaires est corrélé avec la pleine activité mitotique correspondant à la phase exponentielle de croissance (Hirano and Komamine 1994). Cependant, Harfi *et al.* (2013), ont rapporté une relation inverse pour les CRs du *Datura*, chez lesquels la production maximale d'alcaloïdes coïncide avec la phase de déclin de croissance des CRs.

3 Effet de l'élicitation

3.1 Effet de l'élicitation des CRs

3.1.1 Elicitation par l'acide salicylique

L'acide salicylique est un simple acide phénolique, qui possède une fonction hormonale. Il est synthétisé à partir de l'acide aminé phénylalanine ou chorismate en fonction de l'espèce végétale, du stade de développement ou des conditions de croissance (Tounekti *et al.*, 2013). L'AS est connu comme étant une importante molécule de signalisation impliquée dans la résistance systémique acquise (SAR : systemic acquired resistance) en réponse aux effets des facteurs de stress abiotiques et biotiques (Ryals *et al.*, 1996). Cette signalisation peut conduire 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 (Wang and Wu, 2013). Dans le cas de la *C. roseus*, l'AS peut être impliqué dans la production des métabolites secondaires dérivés de la voie chorismate (Mustafa *et al.*, 2009), tels que le tryptophane qui est connu comme précurseur de la biosynthèse des alcaloïdes indoliques (Ramani *et al.*, 2013).

D'une manière générale, les éliciteurs sont classés comme des composés de signaux extracellulaires (exogènes) et intracellulaires (endogènes) chez les cellules végétales, et peuvent déclencher des réponses de résistance physiologique et morphologique chez les plantes et initier l'accumulation de phytoalexine (Zhao *et al.*, 2005). Certaines molécules, synthétisées par les cellules végétales suite à une réponse contre un stress biotique et abiotique, telles que l'AS, l'acide jamonique (AJ), le méthyl jasmonate (MeJa) et l'oxyde nitrique (ON) (Creelman and Mullet, 1995; Ryals *et al.*, 1996; Tounekti *et al.*, 2013; An and Mou, 2014) sont considérées et utilisées comme éliciteurs endogènes et exogènes pour améliorer la production en alcaloïdes ainsi que la biomasse chez différentes espèces (Catinot *et al.*, 2008; el Jaber-Vazdekis *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2010; Khelifi *et al.*, 2011; Schluttenhofer *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Y compris l'espèce utilisée dans ce travail, la *C. roseus* (Rijhwani and Shanks, 1998; Zhao *et al.*, 2001; Lee-Parsons *et al.*, 2004; Vázquez-Flota *et al.*, 2009; Siddiqui *et al.*, 2013).

a. Effet de l'élicitation par l'AS sur la biomasse

L'efficacité de l'effet de l'éliciteur sur l'accumulation de la biomasse et la production des métabolites secondaires, dans les CRs, est basée sur deux critères, le premier c'est la concentration optimale de l'éliciteur; et le deuxième c'est le moment de son application durant le cycle de culture (Wang and Wu, 2013). Selon Singh *et al.* (1994), la quantité ou la dose de l'éliciteur nécessaire dépend de la biomasse des CRs. La justification de cet auteur est basée sur l'hypothèse selon laquelle les éliciteurs se lient à des récepteurs spécifiques sur les cellules végétales conformément à une cinétique de saturation et, à un équilibre entre les molécules d'éliciteurs liées et celles qui sont libres. Rijhwani and Shanks (1998), rapportent que les doses optimales de l'éliciteur appliquées sur les CRs de *C. roseus* varient entre 0,1 μM et $10^5 \mu\text{M}$ pour les phytohormones et les molécules signales comme le MeJa et l'AS.

D'autre part, le moment de l'application de l'éliciteur et l'âge des CRs sont des facteurs très importants, qui influencent l'accumulation de la biomasse et la production des métabolites secondaires. De nombreuses recherches sur l'élicitation des CRs (Rijhwani and Shanks, 1998; Zhang *et al.*, 2007; Ruiz-May *et al.*, 2008; Amdoun *et al.*, 2009; Goklany *et al.*, 2009; Khelifi *et al.*, 2011; Harfi *et al.*, 2015), affirment que l'addition de l'éliciteur au milieu ou à la fin de la phase de croissance exponentielle est généralement la plus favorable, ce timing se situe approximativement entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour du cycle de croissance des CRs. Alors qu'une

élicitation précoce (pendant la phase de latence), peut arrêter la croissance de la biomasse, et une élicitation tardive (pendant la phase de déclin), ne permettrait pas d'avoir un contact suffisant entre l'éliciteur et les cellules végétales.

En effet, beaucoup d'éliciteurs induisent une inhibition de la croissance de la biomasse des CRs (Wang and Wu, 2013). Selon Jeong *et al.* (2005), l'élicitation des CRs de *Panax ginseng* avec 10^{-3} d'AS inhibe de 50 % la croissance par rapport au témoin. D'autre part, le traitement des CRs de *Cichorium intybus* avec 10^{-4} d'AS ne montre aucun effet sur l'accumulation de la biomasse (Malarz *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Rijhwani et Shanks (1998) montrent que l'élicitation des CRs de *C. roseus* avec le MeJa ne donne aucun effet significatif sur l'accumulation de la biomasse. Kang *et al.* (2004), rapportent que le traitement des CRs de *Scopolia parviflora* avec l'AS ne présente pas d'effet négatif sur leur croissance et n'induit pas leur brunissement comme c'est le cas avec le MeJa.

Cependant, le traitement des CRs de *Datura stramonium* avec 1 g / L de NaCl conduit à l'augmentation de la biomasse de 62% (Khelifi *et al.*, 2011). Par contre, Harfi *et al.*, (2015) enregistrent, avec la même espèce, une diminution de la biomasse de 42 % après un traitement de 48 heures avec 1 g / L de KCl (Harfi *et al.*, 2015).

Nos résultats montrent que l'élicitation, pendant 24 heures, avec une faible dose d'AS (10^{-6} M) augmente l'accumulation de la biomasse de 258,33 %, 122,22 % et de 100 % par rapport au témoin, respectivement, pour les lignées LP10, LP 21 et L54. Cependant, l'élicitation avec des concentrations un peu plus élevées d'AS (10^{-3} et 10^{-4} M) pendant 48 heures montre un effet négatif sur l'accumulation de la biomasse induisant des pertes qui sont respectivement, de 16,67 %, 11 % et de 15 % pour les trois lignées LP10, LP 21 et L54.

Selon plusieurs recherches, le moment de l'application de l'éliciteur, durant le cycle de culture, peut avoir un impact sur l'accumulation de la biomasse (Rijhwani and Shanks, 1998; Wang and Wu, 2013). L'élicitation pendant la phase de latence ou bien au début de la phase exponentielle de croissance inhibe l'accumulation de la biomasse (Zhao *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2004; Harfi *et al.*, 2015). En outre, l'application des doses relativement fortes d'éliciteurs

biotiques ou abiotiques, diminue la biomasse (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000). Nos résultats confirment ces conclusions. En effet, l'application des faibles doses d'AS à la fin de la phase exponentielle de croissance des CRs de *C. roseus* a montré un effet positif sur l'accumulation de la biomasse.

b. Effet de l'élicitation par l'AS sur les teneurs en alcaloïdes

Le tableau 19 représente nos résultats les plus significatifs de l'effet de l'élicitation, des CRs (pendant 24 et 48 heures) avec l'acide salicylique (AS), sur les teneurs en alcaloïdes. Ces résultats sont comparés aux teneurs en l'ajmalicine (TA) et aux teneurs en catharanthine (TC) des trois lignées non élicitées (le témoin expérimental: T1), aux TA et aux TC des CRs citées par d'autres auteurs (témoins bibliographiques : T2), et aux TA et aux TC des plantes entières correspondantes (T3) rapportées également par d'autres auteurs (Hirata *et al.*, 1987; Vázquez-Flota *et al.*, 2009).

En comparant nos meilleurs résultats avec les différents témoins, on constate que le taux d'amélioration le plus élevé en TA et en TC par rapport aux témoins bibliographiques (T2) sont respectivement de 298,40 % et de 601,59 %, obtenus avec la lignée LP10 après élicitation avec la concentration de 10^{-3} M (pendant 24 heures) et 10^{-4} M (pendant 48 heures) d'AS, respectivement. D'autre part, les taux d'amélioration les plus élevés par rapport aux TA et TC de la plante entière (T3) sont respectivement de 1545,50 % et 2606,14 %, obtenus également avec la même lignée LP10 et avec les mêmes concentrations d'AS.

Selon El-Sayed and Verpoorte (2002), lorsque les cellules en suspension de *C. roseus* sont traitées par 10^{-3} M d'AS pendant 48 heures, la teneur en ajmalicine obtenue est de 704,84 mg / 100 g M.S, soit une augmentation de 50% par rapport au témoin. De même, Godoy- Hernández and Loyola Vargas (1997), montrent que l'addition de 5.10^{-4} M d'AS à la suspension cellulaire fait augmenter le taux d'ajmalicine de 505 % par rapport au témoin. D'autre part, Pan *et al.* (2010) ont noté une augmentation de 42 % du contenu en catharanthine dans les vitrosemis de *C. roseus*, après un traitement de 24 heures avec 10^{-4} M d'AS.

Cependant, Vázquez-Flota *et al.* (2009), rapportent que l'élicitation des lignées de CRs de *C. roseus* avec 10^{-3} M d'AS, pendant 12, 24 et 48 heures, ne produit aucun effet significatif sur l'accumulation en ajmalicine et en catharanthine.

Par ailleurs, la teneur en alcaloïdes des racines non transgéniques des plantes de *C. roseus* âgées de deux mois, augmente de 880 % (4,4 mg/ 100 g de M.S), par rapport au témoin, après un traitement avec 5.10^{-5} M d'AS (Misra *et al.*, 2014).

D'autres éliciteurs, qui ont la même propriété que l'AS, comme l'AJ et le MeJa sont largement utilisés pour augmenter la production et l'accumulation des alcaloïdes dans CRs de *C. roseus* (Batra *et al.*, 2004; Guillon *et al.*, 2008; Goklany *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). D'après Ruiz-May *et al.* (2008), l'élicitation des CRs de *C. roseus* avec 250 μ M de MeJa fait augmenter, respectivement, la TA et TC de 2,90 mg / g M.S. à 6,34 mg / g M.S. après 48 heures de contact, et de 1,42 mg / g M.S. à 4,34 g M.S. après 72 heures de contact, soit une augmentation de 218,62 % et 305,63 % par rapport au témoin, respectivement pour la TA et la TC. En outre, Vázquez-Flota *et al.* (2009), indiquent que l'exposition des CRs de *C. roseus* à 10 μ M de MeJa améliore la TA et la TC de 100 % (18 mg / 100 g M.S) et 120 % (23 mg / 100 g M.S), respectivement, par rapport au témoin, après 24 et 48 heures de contact.

Dans notre cas, l'application de l'AS sur les CRs est très intéressante. Ceci nous a permis d'avoir des améliorations très élevées de la teneur en ajmalicine et en catharanthine (Tableau 19), ce qui concorde avec les résultats des auteurs précédemment cités. Cependant, les teneurs en ajmalicine et en catharanthine de nos lignées (LP10, LP21 et L54) sont déjà plus élevées comparativement aux témoins bibliographiques (124 et 81 mg / 100 g M.S, respectivement) et comparativement à la plante entière (30 et 21 mg / 100 g M.S, respectivement).

Ruiz-May *et al.* (2008), rapportent que l'élicitation des CRs de *C. roseus* au 15^{ème} jour de culture, période qui se situe au milieu de la phase de croissance exponentielle, induit une augmentation de la TA et de la TC de plus de 200 %. En outre, Goklany *et al.* (2009) indiquent que le traitement des CRs de *C. roseus* avec MeJa à la fin de la phase exponentielle de croissance (21^{ème} jour) donne une augmentation du taux de l'ajmalicine de plus de 400 %. Cependant, Vázquez-Flota *et al.* (2009), trouvent que l'élicitation des CRs de *C. roseus* à la fin de la phase

de latence (10^{ème} jour) montre un effet non significatif sur l'accumulation de l'ajmalicine et la catharanthine.

La présente étude révèle que l'élicitation pendant la phase de croissance exponentielle, pour les trois lignées sélectionnées, et avec des doses très faibles de l'AS (inférieure à 1mM), donne des résultats très prometteurs. Ces résultats corroborent ceux des auteurs précédemment cités.

✓ **Tableau 19. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs moyennes en ajmalicine et en catharanthine des CRs de *C. roseus*, élicitées par l'AS.**

Alcaloïdes	lignée	CE: AS (M)	TE (H)	MTA (mg / 100 g MS)	T (mg / 100 g MS)			TAALS (%)		
					T1	T2	T3	T1'	T2'	T3'
TA	LP10	10 ⁻³	24	493,65 ± 10	323,35	124 [1]	30[2]	52,67	298,10	1545,50
	LP21	10 ⁻⁴	48	381,42 ± 21	266,35			43,20	207,60	1171,40
	L54	10 ⁻⁴	48	393,52 ± 21	244,47			61,02	217,35	1211,73
TC	LP10	10 ⁻⁴	48	568,29 ± 17	361,45	81[1]	21[2]	57,23	601,59	2606,14
	LP21	10 ⁻⁴	48	514,50 ± 9	279,81			83,87	535,19	2350,00
	L54	10 ⁻⁴	48	371,36 ± 11	136,61			171,84	358,47	1668,38

CE: Concentration d'éliciteur ; TE: Temps d'élicitation ; MTA : Meilleurs teneurs en alcaloïdes ; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS : Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3;TA: Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.1.2 Elicitation par le CaCl₂

Le sel est un éliciteur abiotique très efficace pour stimuler l'accumulation de biomasse et la production des métabolites secondaires dans les cultures de CRs. Selon Lee-Parsons and Ertürk (2005), le traitement de la suspension cellulaire de *C. roseus* avec 3 mM de CaCl₂ pendant 72 heures augmente la biomasse de 14,28 %. En outre, Thakore *et al.* (2012), montrent que l'élicitation des CRs de *C. roseus* avec 53 mM (4 g / L) de KCl augmente l'accumulation de biomasse de 200%.

D'autres travaux indiquent que l'application du stress salin avec des concentrations qui dépassent 1 g / L conduit à une diminution de la croissance de la biomasse des CRs (Lee-Parsons and Ertürk , 2005; Abdul Jaleel *et al.*, 2007; Khelifi *et al.*, 2011; Harfi *et al.*, 2015). Par ailleurs, d'autres recherches affirment que l'effet du stress abiotique sur la biomasse dépend énormément du moment de son application (Rijhwani and Shanks, 1998; Wang and Wu, 2013). Le facteur génétique des CRs semble jouer aussi un rôle important sur l'efficacité du stress abiotique et sur l'amélioration de la biomasse (Guillon *et al.*, 2008).

Nos résultats montrent un effet significatif de CaCl_2 sur la biomasse, ce qui concorde avec les auteurs précités. Nous notons une amélioration de 33 % pour les lignées LP10 et LP21, et de 30 % pour la lignée L54, après un traitement de 24 heures avec 3 mM de CaCl_2 . Cependant, l'application des concentrations de CaCl_2 plus élevées (5 et 10 mM) et pendant un temps plus long (48 heures) entraîne une régression de plus de 20 % de la biomasse. Les pertes les plus importantes sont de 33,33, 44,44 et 30,77 % pour nos trois lignées LP10, LP21 et L54, respectivement, après un temps de contact de 48 heures avec 10 mM de CaCl_2 .

Concernant l'effet du stress salin sur la production des alcaloïdes, Harfi *et al.* (2015), rapportent que le traitement des CRs de *Datura tatula* avec une concentration de 2 g / L (= 18 mM) de CaCl_2 pendant 24 heures augmente l'accumulation de l'hyoscyamine de 200 % (2,07 fois) par rapport au témoin. En outre, Pitta-Alvarez *et al.* (2000) montrent que l'élévation des CRs de *Brugmansia candida* avec 50 mM de CaCl_2 pendant 24 heures améliore la production en hyoscyamine de 200 % par rapport au témoin.

Par ailleurs, selon Abdul Jaleel *et al.* (2007), le traitement des racines non transformées de *C. roseus* avec 5 mM de CaCl_2 , pendant 10 jours, conduit à une augmentation des alcaloïdes indoliques de 52 % par rapport au témoin. Aussi, Lee-Parsons and Ertürk (2005), montrent que le traitement de suspensions cellulaires de *C. roseus* avec 3 mM de CaCl_2 pendant 72 heures améliore la teneur en ajmalicine de 100 % par rapport au témoin.

Nos teneurs obtenues en TA et TC suite à l'élévation des CRs avec 3,5 et 10 mM de CaCl_2 , confirment ceux des auteurs précédemment cités. Notre meilleur résultat est enregistré pour la TC. Il est obtenu avec la lignée LP10 traitée avec une concentration 10 mM de CaCl_2 pendant 24 heures, avec une teneur de 435,36 mg / 100 g de M.S en catharanthine. Tandis que,

le meilleur résultat pour la TA (435,65 mg / 100 g M.S) est enregistré avec la lignée LP10 après un traitement de 48 heures avec 3 Mm de CaCl₂. Cependant, les meilleurs taux d'amélioration sont de 39,37 % et 99,50 % pour la TA et la TC, respectivement, obtenus avec la lignée L54 à la concentration de 3 Mm de CaCl₂ après 48 heures de contact. Cependant, des pertes de la TA de 43,26 %, 70,19 % et de 18,72 % sont enregistrées, respectivement, avec les trois lignées après un traitement de 48 heures avec la concentration 10 Mm de CaCl₂. Aussi, avec le même traitement des pertes de la TC de 31,54 %, 10,94 % et 33,50 % sont enregistrées, respectivement, avec les trois lignées.

Les meilleures valeurs des TA et des TC obtenues après élicitation de nos trois lignées sélectionnées, avec le CaCl₂, sont plus élevées et supérieures à celles citées dans la bibliographie (Tableau 20), soit une hausse qui dépasse les 250 % et 400 %, respectivement, pour la TA et la TC par rapport aux témoins bibliographiques (Vázquez-Flota *et al.*, 2009), et les 1300 % et 1900 %, respectivement, pour la TA et la TC par rapport aux teneurs dans la plante entière (Hirata *et al.*, 1987).

✓ **Tableau 20. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs moyennes en ajmalicine et catharanthine des CRs de *C. roseus*, élicitées par CaCl₂.**

Alcaloïdes	lignée	CE: CaCl ₂ (mM)	TE (H)	MTA (mg / 100 g MS)	T (mg / 100 g MS)			TAALS (%)		
					T1	T2	T3	T1'	T2'	T3'
TA	LP10	3 mM	48	435,65±0,6	323,35	124 [1]	30 [2]	34,73	251,33	1352,17
	LP21	3 mM	24	345,53±2,2	266,35			29,73	178,65	1051,77
	L54	3 mM	48	340,71±1,8	244,47			39,37	174,77	1035,70
TC	LP10	10 mM	24	435,36±1,9	361,45	81 [1]	21[2]	20,45	437,48	1973,14
	LP21	10 mM	24	362,42±2,4	279,81			29,52	347,43	1625,81
	L54	3 mM	48	272,54±2,7	136,61			99,50	236,47	1197,81

CE: Concentration d'éliciteur ; TE: Temps d'élicitation ; MTA : Meilleurs teneurs en alcaloïdes ; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS : Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3;TA: Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.1.3 Elicitation combinée par le CaCl₂ et l'AS

De nombreuses études ont montré que l'application de l'élicitation combinée entre plusieurs facteurs de stress biotiques et / ou abiotiques, conduit à une influence synergique de la synthèse de métabolites secondaires et l'accumulation de la biomasse chez *C. roseus* (Saenz *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2011; Thakore *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2013).

Selon Lee-Parsons and Ertürk (2005), l'élicitation des cellules en suspension de *C. roseus* avec différentes concentration en combinaisons de CaCl₂ (3, 23 et 43 mM) et de MeJa (0, 10 et 100 µM), pendant 7 jours, ne produit aucun effet significatif sur la biomasse. En outre, Zhao *et al.* (2001b), montrent que les suspensions cellulaires de *C. roseus* élicitées avec 20 mg / L d'*Aspergillus niger* et 120 mg / L de tetramethyl ammonium bromide, pendant 3 jours, diminue la biomasse de 40 % par rapport au témoin.

Concernant nos lignées de CRs, nous avons appliqué l'élicitation combinée avec une seule concentration de CaCl₂ et différentes concentration d'AS. En effet, les améliorations de biomasse les plus élevés, par lignée, sont de 75 %, 66,66 % et 38,46 %, respectivement, pour LP10, LP21 et L54, après 24 heures de traitement avec 10⁻⁶ M d'AS et 3 mM de CaCl₂. Cependant, les pertes du poids sec des CRs les plus importantes sont de 41,64, 22,22 et 30,77 % enregistrées, respectivement, pour LP10, LP21 et L54 après un traitement avec 10⁻³ M d'AS et 3 mM de CaCl₂, pendant 48 heures.

Selon Xing *et al.* (2011), le traitement des vitrosemis de *C. roseus* avec 10⁻⁴ M d'AS et 10⁻⁴ M d'éthylène pendant 72 heures, augmente la production des alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs) de 100%. En outre, Abdul Jaleel *et al.* (2007), indiquent que l'élicitation des vitrosemis de *C. roseus* avec 5 mM de CaCl₂ et 80 mM de NaCl donne un effet très significatif sur la production des AITs par rapport aux vitrosemis traitées avec chaque éliciteur séparément. D'autre part, Lee-Parsons and Ertürk (2005) montrent que la teneur en ajmalicine des cellules en suspension de *C. roseus* traitées avec 3 mM de CaCl₂ combiné avec 100 µM de MeJa, augmente de 150 % par rapport aux cellules traitées seulement avec 3 mM de CaCl₂.

D'autre part, Almagro *et al.* (2014) trouvent que l'élicitation combinée des cellules en suspension de *C. roseus* avec 50 mM de cyclodextrine (CDs) et 100 µM de MeJa pendant 7

jours, augmente l'accumulation de l'ajmalicine de 329,66 % et 595,07 % et de la catharanthine de 202,5% et 291,36 %, respectivement, par rapport aux cultures élicitées seulement avec le CDs ou le MeJa.

Nos résultats montrent un effet significatif de l'élicitation combinée sur la production des alcaloïdes pour nos trois lignées, par rapport aux résultats obtenus avec l'élicitation par un seul agent. La lignée LP10 élicitée avec 3 mM de CaCl₂ et 10⁻³ M d'AS, pendant 24 heures, montre une remarquable amélioration de la teneur en ajmalicine (TA) (82,55 %) et de la teneur en catharanthine (TC) (65,28 %), par rapport aux CRs non élicités. Aussi, l'amélioration de la TA et de la TC est élevée par rapport au CRs traitées séparément avec l'AS ou la CaCl₂, avec des taux d'amélioration, respectivement, de 19,73 % et 35,69 % pour la TA et de 5,12 % et 37,22% pour la TC.

Nos résultats sont en concordance avec d'autres (Zhao *et al.*, 2001b; Lee-Parsons and Ertürk, 2005), qui affirment que l'effet de l'élicitation combinée est considéré comme synergique. Par ailleurs, si nous comparons nos meilleurs résultats (Tableau 21) par rapport aux témoins bibliographiques (T2), nous notons une amélioration des AITs de 376,64 % et 637,58 %, respectivement, pour la TA et TC. Cette hausse des taux d'amélioration est due aussi aux teneurs des AITs déjà élevées dans les CRs de nos lignées non élicitées.

✓ **Tableau 21. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs en ajmalicine et en catharanthine des CRs de *C. roseus*, élicitée par CaCl₂ (3 mM) et l'AS.**

Alcaloïdes	lignée	CE: AS (M) + CaCl ₂ (mM)	TE (H)	MTA (mg / 100 g MS)	T (mg / 100 g MS)			TAALS (%)		
					T1	T2	T3	T1'	T2'	T3'
TA	LP10	10 ⁻³ M+ 3mM	24	590,29±1,7	323,35	124 [1]	30 [2]	82,55	376,04	1867,63
	LP21	10 ⁻³ M+ 3mM	24	378,50±2,4	266,35			42,11	205,24	1161,67
	L54	10 ⁻³ M+ 3mM	24	432,76±1,5	244,47			77,02	249,00	1342,53
TC	LP10	10 ⁻³ M+ 3mM	24	597,44± 2,4	361,45	81[1]	21[2]	65,29	637,58	2744,95
	LP21	10 ⁻³ M+ 3mM	24	514,36±1,4	279,81			83,82	535,01	2349,33
	L54	10 ⁻³ M+ 3mM	24	375,83±1,5	136,61			175,11	363,99	1689,67

CE: Concentration d'éliciteur ; TE: Temps d'élicitation ; MTA : Meilleurs teneurs en alcaloïdes ; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS : Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3;TA: Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.1.4 Elicitation par des agents épigénétiques

3.1.4.1 Elicitation par la 5-Azacytidine

L'agent de déméthylation, la 5-azacytidine (5-AC) est utilisé dans cette étude. Cet agent conduit à une diminution rapide de l'activité de l'ADN méthyltransférase, et par la suite à la synthèse de l'ADN hypométhylé dans les systèmes animaux et végétaux (Creusot *et al.*, 1982). Il peut aussi se lier de manière covalente aux méthyltransférases, ce qui permet de les inactiver (Jüttermann *et al.*, 1994).

L'altération de la méthylation par la 5-AC affecte l'expression des gènes et la morphogénèse chez les plantes (King, 1995). Chez le sorgho, la 5-azacytidine s'est révélée efficace dans la réactivation des gènes rendus silencieux par la méthylation (Emani *et al.*, 2002). Etant donné que la 5-AC est un agent de déméthylation non spécifique, il a également été montré qu'il provoque un certain nombre d'altérations morphologiques similaires à celles des mutations, trouvées chez des plantes, suite à une hypométhylation induite (Tyunin *et al.*, 2012). Récemment, de nombreuses études considèrent la 5-AC comme un inducteur de la différenciation cellulaire via l'inhibition de la méthylation de l'ADN de la plante (King, 1995; Yang *et al.*, 2010; Kiselev *et al.*, 2011; Fraga *et al.*, 2012; Tyunin *et al.*, 2012; Solís *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2016). L'affectation de l'expression des gènes, par la 5-AC, a un impact très important non seulement sur la différenciation et la croissance cellulaire mais aussi sur la production des métabolites secondaires chez différentes espèces (Arfmann *et al.*, 1985; Kanazawa *et al.*, 2007; Kiselev *et al.*, 2011; Tyunin *et al.*, 2012; Kiselev *et al.*, 2013; Iwasaki and Paszkowski, 2014).

Selon Prakash and Kumar (1997), le poids frais des pousses de *Petunia hybrida* diminue de 60 % et 80 % après l'application de 5 μ M et 10 μ M de 5-AC, respectivement. Tandis que, Arase *et al.*, (2012) montrent que le taux de la germination des graines de *Petunia hybrida*, sur un milieu qui contient 20 μ M de 5-AC, augmente de 50% par rapport au témoin. L'activation de la germination des graines serait due à l'application de la 5-AC qui améliore le pouvoir mitotique lors de la germination (Yang *et al.*, 2010). Cependant, le traitement de CRs d'*Artemisia annua* avec des concentrations de 10, 20 et 50 μ M de 5-AC inhibe la croissance des racines, lorsque la 5-AC est éliminée des cultures, les racines grandissent normalement (Foley, 2007). De même,

Tyunin *et al.* (2012) enregistrent une baisse de 17,5 % du poids sec des cals de *Vitis amurensis*, après le traitement avec 200 μ M de 5-AC.

D'autre part, le traitement des pousses d'*Artemisia annua* avec 12 μ M et 24 μ M de la 5-AC donne un effet négatif sur la production d'artémisinine ainsi que sur la croissance des pousses (Woerdenbag *et al.*, 1993). Cependant, le traitement des CRs d'*Artemisia annua* avec 10 μ M de 5-AC fait augmenter la production d'artémisinine de 50 %, par rapport au témoin (Foley, 2007).

Par ailleurs, l'application de 200 μ M de 5-AC permet d'améliorer de 100 % la production du polyphénol resvératrol dans les cultures des cals de *Vitis amurensis*, par rapport au témoin (Kiselev *et al.*, 2011). De même, Tyunin *et al.* (2012) enregistrent une augmentation de 92 % du taux de resvératrol dans les cals de *Vitis amurensis*, après le traitement avec 200 μ M de 5-AC. En outre, Arfmann *et al.* (1985), montrent que le traitement de la suspension cellulaire de *C. roseus* pendant 14 jours avec 0,5 μ M de 5-AC améliore la production de catharanthine et d'ajmalicine.

✓ **Tableau 22. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs en ajmalicine et en catharanthine des CRs de *C. roseus*, élicitées par la 5-AC.**

CE: Concentration d'éliciteur; MTA: Meilleurs teneurs en alcaloïdes; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS: Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3;TA: Teneur en ajmalicine; TC: Teneur en catharanthine. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.1.4.1 Elicitation par la trichostatine

La trichostatine A (TSA) est un antibiotique antifongique possédant des propriétés de différenciation dans la culture de cellules de mammifères, c'est un inhibiteur réversible non compétitif, puissant et spécifique de l'activité des histones désacétylases (HDACs) (Tsuji *et al.*, 1976; Vigushin *et al.*, 2001). De ce fait, la TSA peut être utilisée aussi pour augmenter l'acétylation des histones, s'impliquant ainsi dans la régulation de l'expression des gènes chez les animaux et les plantes (Yoshida *et al.*, 1995; Vigushin *et al.*, 2001). Chez les plantes, la TSA peut activer ou réprimer l'expression de nombreux gènes au cours de la germination des graines, indiquant ainsi que l'acétylation des histones est un signal de développement clé dans le processus de germination (Tai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014).

Vue l'effet de la TSA dans la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes, en inhibant la désacétylation des histones dans la chromatine, nous l'avons utilisée pour élucider son effet en tant que régulateur d'expression sur la production des alcaloïdes et l'accumulation de la biomasse dans nos CRs de *C. roseus*.

- ✓ **Tableau 23. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs en ajmalicine et catharanthine des CRs de *C. roseus*, élicitées par la TSA.**

CE: Concentration d'éliciteur ; MTA : Meilleurs teneurs en alcaloïdes ; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS : Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3' : Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3;TA: Teneur en ajmalicine ; TC: Teneur en catharanthine. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.2 Effet de l'élicitation des pousses

3.2.1 Elicitation par l'acide salicylique

Selon Siddiqui *et al.* (2013), la croissance de la biomasse des pousses connaît une régression après l'élicitation avec des concentrations très élevées d'éliciteur biotique ou abiotique, qui dépassent 10^{-2} M. Le traitement des cellules de *C. roseus* avec de fortes concentrations d'acide artémisinique (30 et 50 mg / L) donne une baisse de biomasse de 22% (Liu *et al.*, 2013). En outre, El-Sayed and Verpoorte (2004) rapportent que le traitement des vitrosemis de *C. roseus* avec $14,5 \cdot 10^{-6}$ et $29 \cdot 10^{-6}$ M d'AS, pendant 24 heures, diminue l'accumulation de la biomasse de 24,5 % et 9,5 %, respectivement, par rapport au témoin.

Tandis que, Idrees *et al.* (2013) trouvent que l'élicitation des vitrosemis de *C. roseus* avec 10^{-5} M d'AS améliore la biomasse de 30 %. D'autre part, l'élicitation des vitrosemis de *C. roseus* avec 100 μ M de MeJa améliore la croissance de 3,03 %, après 24 heures de contact (El-Sayed and Verpoorte, 2004).

Nos résultats, s'accordent avec les résultats obtenus par les auteurs précités. Nous avons noté une baisse de l'accumulation de la biomasse de 5 % et 2,63 %, pour les pousses traitées avec 10^{-3} et 10^{-4} M d'AS respectivement. En revanche, les pousses traitées avec des concentrations d'AS, plus faibles, de 10^{-5} et 10^{-6} M montrent une amélioration de 13 et 7,89 %, respectivement, par rapport au témoin (0,76 g).

La vindoline est l'alcaloïde indolique terpénique le plus fréquent et le plus accumulé dans les parties aériennes de *C. roseus*. El- Sayed and Verpoorte (2007) rapportent que la régulation de la biosynthèse de la vindoline est réalisée principalement grâce à cinq enzymes, la tabersonine 16-hydroxylase (T16H), la O-méthyltransférase (16OMT), la N-méthyltransférase (NMT), la deacetoxyvindoline4-hydroxylase (D4H) et la deacetylvindoline acétyl CoA acétyltransférase (DAT). Cependant, l'enzyme NMT, constitue la clé de la biosynthèse de la vindoline. Elle est localisée au niveau de la membrane des thylakoïdes des chloroplastes, ainsi cette enzyme est plus active dans les tissus juvéniles que dans les tissus vieillissants (St-Pierre *et al.*, 1999). Par conséquent, la production de la vindoline nécessite une organisation cellulaire (différenciation) ainsi que la présence de la lumière.

El-Sayed and Verpoort (2004), rapportent que la teneur en vindoline (TV) augmente de 37,93 % dans les vitrosemis de *C. roseus* traités avec $3 \cdot 10^{-5}$ d'AS. Alors que, les teneurs en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC) augmentent de 250 % et 300 %, respectivement, avec le même traitement. En outre, Vázquez-Flota *et al.* (2009) montrent que l'élicitation des pousses de *C. roseus* avec 10^{-5} M de MeJa (pendant 12 heures) améliore la TV, TC et TA de 450 %, 110 % et 100 %, respectivement, par rapport au témoin (0,62, 0,37 et 0,16 mg / g M.S., respectivement). Par ailleurs, Hernández-Domínguez *et al.* (2004) trouvent que l'élicitation des pousses de *C. roseus* avec des concentrations plus faibles en MeJa (10^{-7} M) augmente la TV de 1000 % par rapport au témoin (0,4 mg / g).

Cependant, Pan *et al.* (2010), montrent que le traitement des vitrosemis de *C. roseus*, âgés de 15 jours, avec une concentration de 10^{-2} M de MeJa donne un effet négatif sur l'amélioration des alcaloïdes, avec une régression de la TV et la TC de 12,5 % et 14 %, respectivement, par rapport aux témoins (0,70 et 1,20 μ g / g M.S). Par contre, dans cette même recherche, l'élicitation des vitrosemis avec 10^{-4} M d'AS conduit à une hausse de la teneur en TC et en TV de 33,33 % et 43 %, respectivement.

Nos résultats sur l'effet de l'AS sur la TA, la TC et la TV dans les pousses de *C. roseus*, sont très intéressants et s'accordent avec les résultats des recherches précitées. Nous obtenons des niveaux d'amélioration de 81,70 %, 110,32 % et 53,55 %, respectivement, par rapport aux témoins expérimentaux, après un temps de contact de 24 heures avec 10^{-6} et 10^{-5} M d'AS. Par ailleurs, les teneurs en alcaloïdes de notre matériel végétal non traité sont, déjà, très élevées par rapport aux témoins bibliographiques (Tableau 24), ce qui représente des niveaux d'amélioration de la TA, TC et la TV très supérieurs à ceux de la bibliographie (Vázquez-Flota *et al.*, 2009), soient 1391,31 %, 499,64 % et 458,77 %, respectivement.

3.2.2 Elicitation par CaCl_2

Chez *C. roseus*, peu de travaux ont utilisé le stress salin sur la partie aérienne de la plante, pour améliorer l'accumulation des alcaloïdes. Wang *et al.* (2008) ont traité des vitrosemis de *C. roseus*, pendant 7 jours, avec 50 mM de NaCl, ils ont obtenu une teneur en vindoline (TV) de 461 mg / 100 g M.S. Ce résultat est très proche du notre, obtenu après une élicitation des pousses avec

5 mM de CaCl₂ (pendant 24 heures), avec une TV de 435,53 mg / 100 g M.S. Cette teneur est supérieure de 25 % à celle enregistrée après élicitation avec l'AS (346,44 mg / 100 g M.S). Par contre, la teneur en catharanthine (128,54 mg / 100 g M.S) des pousses élicitées avec le CaCl₂, est inférieure de 72 % par rapport aux celles traitées avec l'AS (221,87 mg / 100 g M.S).

Par ailleurs, les teneurs en alcaloïdes de notre matériel végétal (pousses) non traité sont, déjà, supérieures à celles enregistrées en bibliographie. Les améliorations enregistrées sont donc très importantes, surtout, pour la vindoline et l'ajmalicine après un traitement avec 5 mM de CaCl₂, soit une augmentation de 602,46 % et de 1429,62 %, respectivement, par rapport au témoin bibliographique (Vázquez-Flota *et al.*, 2009) (Tableau 24). Avec la même concentration, Abdul Jaleel *et al.*(2007) enregistrent, chez les vitrosemis de *C. roseus* âgés de deux semaines, une augmentation des teneurs en alcaloïdes de 50 %, ce qui est largement inférieur à notre résultat.

Concernant la croissance de la biomasse, nous avons enregistré une légère amélioration de 11,83 % et 2,63 %, après le traitement des pousses avec 3 et 5 mM de CaCl₂, respectivement. Tandis que Abdul Jaleel *et al.*(2007) indiquent que le traitement des vitrosemis de *C. roseus*, âgées de deux semaines, avec 5 mM de CaCl₂ limite l'amélioration de la croissance de la biomasse. De même, Wang *et al.*(2008) notent une baisse de biomasse après élicitation des vitrosemis de *C. roseus* avec 50 mM de NaCl.

3.2.3 Elicitation combinée par l'AS et le CaCl₂

Dans la présente étude, l'effet de l'élicitation combinée est démontré sur l'amélioration de l'accumulation des alcaloïdes indoliques au niveau des CRs et des pousses de *C. roseus*, par rapport aux cultures traitées avec un seul éliciteur. La production de la vindoline et la catharanthine est clairement améliorée par l'élicitation combinée avec l'AS (10⁻⁵ M) et le CaCl₂ (5 mM). Ainsi les teneurs en TV et la TC produites sont respectivement, de 527,50 et 244,51 mg / 100 g M.S., soit une amélioration de 133,81 % et 131,79 %, respectivement, par rapport au témoin. Ces teneurs sont supérieures, à celles des pousses traitées seulement avec l'AS ou le CaCl₂, soient 10,20 % et 90 % pour la catharanthine et 52,26 % et 20,42 % pour la vindoline, respectivement. Comparativement aux témoins bibliographiques (Vázquez-Flota *et al.*, 2009),

l'amélioration de la TV et la TC est, encore, plus intéressante avec 750 % et 560 %, respectivement.

Selon Misra *et al.* (2014), l'élicitation des plantes de *C. roseus* avec 0,1 M de NaCl combinée avec 10^{-5} M de l'AS, augmente le taux des alcaloïdes indoliques de 620 % par rapport au témoin (250 mg / mg / 100 g M.S). En outre, Xing *et al.* (2011) montrent que l'élicitation des vitrosemis de *C. roseus* avec 10^{-4} d'AS et 10^{-4} de chlorure de chloméquat augmente respectivement la TC et la TV de 177 % et 200 % par rapport au témoin (90 et 30 mg / 100 g M.S). Par ailleurs, Zhou *et al.* (2015) indiquent que les pousses de *C. roseus* traitées avec une combinaison de 150 μ M de MeJa et de 10^{-2} M de β - cyclodextrine, montrent une amélioration des teneurs en alcaloïdes de 142,5 % et 89 % pour la TC, de 116,66 % et 160 % pour la TV et de 85 % et 67 % pour la TA, par rapport aux pousses traitées seulement avec 150 μ M de MeJa ou 10^{-2} M de β -cyclodextrine. D'autre part, les mêmes auteurs trouvent que les pousses traitées avec une combinaison de 150 μ M de MeJa et de 10^{-2} M de β - cyclodextrine donnent une amélioration de la biomasse de 25 % et 7 % par rapport aux pousses traitées uniquement avec MeJa ou β - cyclodextrine.

Nos résultats s'accordent avec ceux de ces auteurs. En effet, nous avons noté que les pousses traitées par 10^{-5} M d'AS combinée avec 5 mM de CaCl_2 , présentent une hausse de la biomasse de 19,74 % par rapport au témoin, et de 5,81 % et 16,66 % par rapport à celles des pousses traitées par l'AS ou le CaCl_2 séparément.

- ✓ **Tableau 24. Comparaison avec différents témoins (T1, T2 et T3) des meilleures teneurs en ajmalicine, en catharanthine et en vindoline des pousses de *C. roseus*, élicitées avec l'AS et le CaCl₂.**

Alcaloïdes	Eliciteur	CE: AS (M)	TE (H)	MTA (mg / 100 g M.S)	T (mg / 100 g M.S)			TAALS (%)		
					T1	T2	T3	T1'	T2'	T3'
TA	AS	10 ⁻⁶ M	24	238,61	131,32	16 [1]	30 [2]	81,70	1391,31	695,37
	CaCl ₂	5 mM	24	244,74				86,37	1429,63	715,80
	AS+CaCl ₂	10 ⁻⁵ M+ 5mM	24	180,73				37,63	1029,56	502,43
TC	AS	10 ⁻⁶ M	24	221,87	105,49	37 [1]	21[2]	110,32	499,65	956,52
	CaCl ₂	5mM	24	128,54				21,85	247,41	512,10
	AS+CaCl ₂	10 ⁻⁵ M+ 5mM	24	244,51				131,79	560,84	1064,33
TV	AS	10 ⁻⁵ M	24	346,44	225,61	62[1]	38[2]	53,56	458,77	811,68
	CaCl ₂	55mM	24	435,53				93,05	602,47	1046,13
	AS+CaCl ₂	10 ⁻⁵ M+ 5mM	24	527,50				133,81	750,81	1288,16

CE: Concentration d'éliciteur; MTA: Meilleurs teneurs en alcaloïdes; T: Les témoins; T1: Témoins expérimentaux; T2: Témoins Bibliographiques; T3: La plante entière; TAALS: Taux d'amélioration en alcaloïdes; T1': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T1; T2': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T2, T3': Taux d'amélioration en alcaloïdes par rapport au T3; TA: Teneur en ajmalicine; TC: Teneur en catharanthine; TV: Teneur en vindoline. [1]: (Vázquez-Flota *et al.*, 2009); [2]: (Hirata *et al.*, 1987).

3.2.4 Elicitation par la 5-azacytidine

Fraga *et al.* (2012) affirment que l'utilisation de la 5-azacytidine (5-AC) augmente la formation des embryons somatiques chez *Acca sellowiana*. Néanmoins, Lee *et al.* (2008) trouvent que la 5-AC a des effets négatifs sur la formation normale des embryons somatiques et sur la régénération des pousses. Cela suggère que la méthylation de certains gènes dans l'ADN est nécessaire pour la dédifférenciation cellulaire. Ainsi, l'utilisation de la 5-AC montre l'influence de la déméthylation et de la méthylation de l'ADN sur la division cellulaire et la morphogénèse végétale en activant ou désactivant les gènes (Yang *et al.*, 2010).

CONCLUSION GENERALE

La *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. a une valeur thérapeutique très importante grâce à ses alcaloïdes indoliques terpéniques qui ont des propriétés anticancéreuses (vinblastine et vincristine) et antihypertenseurs (ajmalicine) (van Der Heijden *et al.*, 2004). Cependant, les faibles rendements de ces alcaloïdes chez *C.roseus* justifient le recours à l'utilisation des techniques de la culture *in vitro* et des méthodes de génie génétiques afin d'accroître la production de ces molécules (Hughes *et al.*, 2004).

Les deux modèles de culture *in vitro* retenus dans le cadre du présent travail, les pousses et les chevelus racinaires (CRs), présentent une excellente alternative pour optimiser la production des alcaloïdes indoliques terpéniques de *C. roseus*. Ce choix se justifie par leur rythme de croissance rapide, leur stabilité génétique et biosynthétique ainsi que leurs profils des métabolites secondaires, qui sont conformes à ceux de la plante entière (Giri and Narasu, 2000; Vázquez-Flota *et al.*, 2009; Pati *et al.*, 2010).

L'étude de la cinétique de croissance, des pousses et des trois lignées de CRs sélectionnées (L54, LP10 et LP21), sur un milieu liquide a permis d'évaluer l'évolution de la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes indoliques. La meilleure période pour éliciter les pousses et les CRs, en vue d'accroître la production en alcaloïdes indoliques coïncide avec la fin de la phase exponentielle de croissance prolongée.

L'élicitation stimule et améliore la biosynthèse des composés spécifiques lorsqu'ils sont ajoutés en petite quantité à un système cellulaire en culture *in vitro* (Angelova *et al.*, 2006). Dans cette présente étude, l'application de l'AS sur les CRs, en tant qu'éliciteur exogène, nous a permis d'avoir des niveaux d'amélioration très intéressants de la teneur en ajmalicine (TA) et en catharanthine (TC). La TA la plus élevée est obtenue avec la lignée LP10 (493,65 mg / 100 g M.S) traitée par 10^{-3} M d'AS pendant 24 heures. Quand au TC la plus élevée est, pareillement, enregistrée pour la lignée LP10 (568,29 mg / 100 g M.S) après 48 heures de traitement par 10^{-4} M d'AS. L'amélioration de la TA et la TC par rapport aux témoins expérimentaux et aux témoins bibliographiques (Vázquez-Flota *et al.*, 2009) est de 52,66 % et 298,10%, respectivement, pour la TA et de 57,22 % et 601,59 %, respectivement, pour la TC.

Le CaCl_2 exerce un effet statistiquement significatif sur la production de l'ajmalicine et de la catharanthine des CRs. Les meilleurs taux d'amélioration de la TA (39,37 %) et la TC (99,50 %) sont obtenus avec la lignée L54 élicitee par 3 mM de CaCl_2 .

L'application de l'élicitation combinée sur les CRs a révélé un effet synergique positif sur l'accumulation des alcaloïdes. La lignée LP10 élicitée avec 3 mM de CaCl₂ et 10⁻³ M d'AS, pendant 24 heures, montre une remarquable amélioration de la TA (82,55 %) et la TC (65,28 %), par rapport aux CRs non élicités. Par ailleurs, nous notons une amélioration de la TA et la TC de 1867,63 % et de 2744,95 %, respectivement, par rapport aux teneurs de la plante entière (Hirata *et al.*, 1987). Cette hausse des taux d'amélioration est due aux teneurs des AITs déjà élevées dans les CRs de nos lignées non élicitées.

Quant à l'élicitation des pousses de *C. roseus*, l'application de l'AS a montré un effet statistiquement significatif sur la TA, la TC et la TV. Les niveaux d'amélioration sont de 81,70 %, 110,32 % et 53,55 %, respectivement, par rapport aux témoins expérimentaux, après un temps de contact de 24 heures avec 10⁻⁶ M et 10⁻⁵ M d'AS. Cependant, les teneurs en alcaloïdes de notre matériel végétal non traité sont, déjà, très élevées par rapport aux témoins bibliographiques (Vázquez-Flota *et al.*, 2009), ce qui représente des niveaux d'amélioration de la TA, TC et la TV très importants, soient 1391,31 %, 499,64 % et 458,77 %, respectivement.

Nos meilleurs résultats issus de l'élicitation des pousses avec le CaCl₂, sont, respectivement, de 435,53, 244,74 et 128,54 mg / 100 g M.S pour la TV, la TA et la TC, obtenus après 24 heures de

contact avec 5 mM de CaCl₂. Des améliorations très importantes sont enregistrées, surtout, pour la vindoline et l'ajmalicine (602,46 % et 1429,62 %, respectivement) comparées au témoin bibliographique (Vázquez-Flota *et al.*, 2009).

L'élicitation combinée des pousses de *C. roseus* montre un effet synergique sur l'amélioration de la production des alcaloïdes. La TV et la TC sont clairement améliorées par l'élicitation combinée avec l'AS (10⁻⁵ M) et le CaCl₂ (5 mM), avec respectivement 133,81 % et de 131,79 % par rapport au témoin expérimental, et avec 750 % et 560 % par rapport au témoin bibliographique (Vázquez-Flota *et al.*, 2009),

Nos expériences ont rapporté une contribution originale à l'étude de matériel végétal performant (les chevelus racinaires et les pousses) destiné à l'optimisation de l'accumulation d'alcaloïdes indoliques chez *C.roseus*. Ainsi, les solutions proposées dans notre thèse, concernant l'augmentation de production des alcaloïdes indoliques chez *C. roseus*, fournissent un degré élevé de nouveauté. Ceci résulte de la mise au point de méthodes originales consistant à appliquer des élicitations et surtout par les agents épigénétiques sur des CRs et des pousses en voix de développement.

Afin de compléter notre recherche, il est important de poursuivre et d'approfondir cette étude pour détecter l'effet des agents épigénétiques au niveau moléculaire, vue leurs effet régulateur sur les gènes.

L'impact de notre recherche est appuyé par le fait que les résultats obtenus ont un intérêt économique certain pour la production d'alcaloïdes indoliques valorisables en pharmacologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, J.A., Medina-Bolivar, F., Martin, E.M., Engelberth, A.S., Villagarcia, H., Clausen, E.C., Carrier, D.J.,** (2010) Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Biotechnology Progress* 26(5): 1344–1351.
- Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Panneerselvam, R.,** (2007) Calcium chloride effects on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. *Comptes Rendus Biologies* 330(9): 674–683.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., D'Alessandro, U.,** (2011) Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal* 10: 144.
- Ali, M., Abbasi, B.H. and Ali, G.S.,** (2015) Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 120(3): 1099–1106.
- Almagro, L., Gutierrez, J., Pedreño, M.A., Sottomayor, M.,**(2013) Bioproduction of Terpenoid Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus* Cell Cultures. In: Ramawat KG and Mérillon J-M (eds), *Natural Products*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–117. Available from: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-22144-6_4 (accessed 12 October 2016).
- Almagro L, Gutierrez J, Pedreño MA.,** (2014) Synergistic and additive influence of cyclodextrins and methyl jasmonate on the expression of the terpenoid indole alkaloid pathway genes and metabolites in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 119(3): 543–551.
- Amado, L., Abranches, R., Neves, N., Viegas, W.,** (1997) Development-dependent inheritance of 5-azacytidine-induced epimutations in triticales: analysis of rDNA expression patterns. *Chromosome Research* 5(7): 445–450.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Benyoussef, E.-H., Thi, D.V., 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, Khelifi-Slaoui 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.
- An, C., Mou, Z.,** (2014) Salicylic Acid and Defense Responses in Plants. In: Tran L-SP and Pal S (eds), *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications*, Springer New York, pp. 191–219. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-0491-4_7 (accessed 18 August 2016).
- Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W.,** (2006) Elicitation of Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20(2): 72–83.

- Aniszewski, T.**, (2007) Alkaloids - Secrets of Life: *Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier. 350 P.
- An, W.**, (2007) Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Sub-Cellular Biochemistry* 41: 351–369.
- Arase, S., Kasai, M., Kanazawa, A.**, (2012) In planta assays involving epigenetically silenced genes reveal inhibition of cytosine methylation by genistein. *Plant Methods* 8: 10.
- Arfmann, H.A., Kohl, W., Wray, V.**, (1985) Effect of 5-Azacytidine on the Formation of Secondary Metabolites in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Zeitschrift für Naturforschung B* 21-25.
- Aslam, J., Khan, S.H., Siddiqui, Z.H., Fatima, Z., Maqsood, M., Bhat, M.A., Nasim, S.A., Ilah, A., Ahmad, I.Z., Khan, S.A.**, (2010) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. *Pharmacie Globale (IJCP)* 4(12): 1–16.
- Ayadi, R., Trémouillaux-Guiller, J.**, (2003) Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*. *Tree Physiology* 23(10): 713–718.
- Backert, S., Fronzes, R., Waksman, G.**, (2008) VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems? *Trends in Microbiology* 16(9): 409–413.
- Baíza, A.M., Quiroz, A., Ruíz, J.A., Maldonado-Mendoza, I.**, (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.
- Bajaj, Y.P.S.**, (1994) *Medicinal and Aromatic Plants VI: 6*. Springer Science & Business Media. 450 P.
- Barz, W., Daniel, S., Hinderer, W., Jaques, U., Kessmann, H., Köster, J., Tiemann, K.**, (1988) Elicitation and Metabolism of Phytoalexins in Plant Cell Cultures. In: Pais MSS, Mavituna F, and Novais JM (eds), *Plant Cell Biotechnology*, NATO ASI Series, Springer Berlin Heidelberg, pp. 211–230. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-73157-0_20 (accessed 28 October 2016).
- Batra, J., Dutta, A., Singh, D., Kumar, S., Sen, J.**, (2004) Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. *Plant Cell Reports* 23(3): 148–154.
- Baubec, T., Finke, A., Mittelsten Scheid, O., Pecinka, A.**, (2014) Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Reports* 15(4): 446–452.
- Beijerinck M.W. van Delden A.**, (1902) Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. 9th, 3rd–43rd ed. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II*.
- Belchí-Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R., Pedreño, M.A.**, (2012) Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Reports* 31(1): 81–89.

- Benyammi, R., Khelifi-Slaoui, M., Bakiri, N., Harfi, B., Khelifi, L.,** (2011) Micropropagation of *Catharanthus roseus* in order to produce monoterpenoid indole alkaloids in vitro. *Advances in Environmental Biology*: 254–257.
- Benyammi, R., Paris, C., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., Belabbassi, O., Bakiri, N., Aci, M.M., Harfi, B., Malik, S., Makhzoum, A., Desobry, S., Khelifi, L.,** (2016) Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Pharmaceutical Biology* 0(0): 1–11.
- Bergen, M.A. van, Snoeijer, W.,** (1996) *Revision of Catharanthus G. Don, series of revisions of Apocynaceae XLI*. Distribution, Backhuys Publishers. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300014743> (accessed 20 October 2016).
- Besseau, S., Kellner, F., Lanoue, A., Thamm, A.M.K., Salim, V., Schneider, B., Geu-Flores, F., Höfer, R., Guirimand, G., Guihur, A., Oudin, A., Glevarec, G., Foureau, E., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Werck-Reichhart, D., Burlat, V., De Luca, V., O'Connor, S.E., Courdavault, V.,**(2013) A pair of tabersonine 16-hydroxylases initiates the synthesis of vindoline in an organ-dependent manner in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 163(4): 1792–1803.
- Birch, R.G.,** (1997) PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 297–326.
- Bird, A.P., Southern, E.M.,** (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *Journal of Molecular Biology* 118(1): 27–47.
- Blom, T.J.M., Sierra, M., van Vliet, T.B., Franke-van Dijk, M.E.I., de Koning, P., van Iren, F., Verpoorte, R., Libbenga, K.R.,** (1991) Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta* 183(2): 170–177.
- Bolton, G.W., Nester, E.W., Gordon, M.P.,** (1986) Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science (New York, N.Y.)* 232(4753): 983–985.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E.,** (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161(5): 839–851.
- Boyko, A., Kovalchuk, I.,** (2011) Genetic and epigenetic effects of plant-pathogen interactions: an evolutionary perspective. *Molecular Plant* 4(6): 1014–1023.
- Brencic, A., Winans, S.C.,** (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(1): 155–194.
- Bruneton, J.,** (1999) *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*. Technique et documentation Lavoisier. 1120 P.

- Calvo, A.M., Cary, J.W.,** (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329819/> (accessed 22 December 2016).
- Camilleri, C.,** (1991) The TR-DNA Region Carrying the Auxin Synthesis Genes of the *Agrobacterium rhizogenes* Agropine-Type Plasmid pRiA4: Nucleotide Sequence Analysis and Introduction into Tobacco Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4(2): 155.
- Campos-Tamayo, F., Hernández-Domínguez, E., Vázquez-Flota, F.,** (2008) Vindoline Formation in Shoot Cultures of *Catharanthus roseus* is Synchronously Activated with Morphogenesis Through the Last Biosynthetic Step. *Annals of Botany* 102(3): 409–415.
- Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., Nisi, R., De Paolis, A., Blando, F., Mita, G.,** (2011) Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 13(1): 51–58.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., Métraux, J.-P.,** (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS letters* 582(4): 473–478.
- Chandra, S.,** (2012) Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters* 34(3): 407–415.
- Chang, S., Pikaard, C.S.,** (2005) Transcript profiling in *Arabidopsis* reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *The Journal of Biological Chemistry* 280(1): 796–804.
- Chen, Y., Müller, F., Rieu, I., Winter, P.,** (2016) Epigenetic events in plant male germ cell heat stress responses. *Plant Reproduction* 29(1-2): 21–29.
- Chilton, M.-D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., Tempé, J.,** (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295(5848): 432–434.
- Choi, P.S., Kim, Y.D., Choi, K.M., Chung, H.J., Choi, D.W., Liu, J.R.,** (2004) Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* 22(11): 828–831.
- Christie, P.J.,** (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Protein Export/Secretion in Bacteria* 1694(1–3): 219–234.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., Cascales, E.,** (2005) Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annual review of microbiology* 59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872966/> (accessed 30 March 2017).
- Ciau-Uitz, R., Miranda-Ham, M.L., Coello-Coello, J., Chí, B., Pacheco, L.M., Loyola-Vargas, V.M.,** (1994) Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 30(1): 84–88.

- Conn, H.J.**, (1942) Validity of the Genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology* 44(3): 353–360.
- Costa, M.M.R., Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, L.G., Almeida, I., Leech, M., Memelink, J., Barceló, A.R., Sottomayor, M.**, (2008) Molecular Cloning and Characterization of a Vacuolar Class III Peroxidase Involved in the Metabolism of Anticancer Alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 146(2): 403–417.
- Courdavault, V., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Burlat, V.**, (2014) A look inside an alkaloid multisite plant: the *Catharanthus* logistics. *Current Opinion in Plant Biology* 19: 43–50.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.**, (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(10): 4114–4119.
- Creusot, F., Acs, G., Christman, J.K.**, (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *The Journal of Biological Chemistry* 257(4): 2041–2048.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S., Duke, J.A., Brielmann, H.L.**, (2016) Natural Products from Plants, *Second Edition*. CRC Press. 644 P.
- Cuperlovic-Culf, M., Culf, A.S., Cuperlovic-Culf, M., Culf, A.S.**, (2014) Role of Histone Deacetylases in Fungal Phytopathogenesis: A Review. *International Journal of Modern Botany* 4(2): 48–60.
- Daniel, M.**, (2016) Medicinal Plants: *Chemistry and Properties*. CRC Press. 268 P.
- Dhandapani, M., Kim, D.H., Hong, S.-B.**, (2007) Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 44(1): 18–25.
- Durante, M., Caretto, S., Quarta, A., De Paolis, A., Nisi, R., Mita, G.**, (2011) β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(6): 1905–1913.
- Eder, J., Cosio, E.G.**, (1994) Elicitors of Plant Defense Responses. In: Jarvik KWJ and J (ed.), *International Review of Cytology*, Academic Press, pp.1–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608624043> (accessed 27 October 2016).
- el Jaber-Vazdekis, N., Barres, M.L., Ravelo, A.G., Zarate, 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.
- El-Sayed, M., Verpoorte, R.**, (2002) Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68(3): 265–270.

- El-Sayed, M., Verpoorte, R.,** (2004) Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* 44(1): 53–58.
- El-Sayed, M., Verpoorte, R.,** (2007) *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochemistry Reviews* 6(2-3): 277–305.
- Emani, C., Sunilkumar, G., Rathore, K.S.,** (2002) Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Science* 162(2): 181–192.
- Farahanikia, B., Akbarzadeh, T., Jahangirzadeh, A., Yassa, N., Shams Ardekani, M.R., Mirnezami, T., Hadjiakhoondi, A., Khanavi, M.,** (2011) Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 10(4): 777–785.
- Ferreres, F.,** (2010) Simple and reproducible HPLC–DAD–ESI-MS/MS analysis of alkaloids in *Catharanthus roseus* roots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51(1): 65–69.
- Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Duarte, P., Barceló, A.R., Sottomayor, M.,** (2011) Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany* 62(8): 2841–2854.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., Dennis, E.S.,** (1998) DNA METHYLATION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 223–247.
- Fisch, K.M., Gillaspay, A.F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najjar, F.Z., Wägele, H., Cichewicz, R.H.,** (2009) Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36(9): 1199–1213.
- Foley, J.,** (2007) Increasing Production of Artemisinin by Demethylation of *Artemisia annua* Hairy Root Cultures. Degree of Bachelor of Science, Worcester Polytechnic Institute.
- Fraga, H.P.F., Vieira, L.N., Caprestano, C.A., Steinmacher, D.A., Micke, G.A., Spudeit, D.A., Pescador, R., Guerra, M.P.,** (2012) 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports* 31(12): 2165–2176.
- Friedrich, C., von Domarus, C.,** (1998) [Carl Friedrich Wilhelm Meissner (1792-1853)--pharmacist and alkaloid researcher]. *Die Pharmazie* 53(1): 67–73.
- 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.
- Gao, R., Lynn, D.G.,** (2005) Environmental pH Sensing: Resolving the VirA/VirG Two-Component System Inputs for *Agrobacterium* Pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 187(6): 2182–2189.

- Gaudin, V., Camilleri, C., Jouanin, L.,** (1993) Multiple regions of a divergent promoter control the expression of the *Agrobacterium rhizogenes* aux1 and aux2 plant oncogenes. *Molecular & general genetics: MGG* 239(1-2): 225–234.
- Geerlings, A., Ibañez, M.M., Memelink, J., van Der Heijden, R., Verpoorte, R.,** (2000) Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *The Journal of Biological Chemistry* 275(5): 3051–3056.
- Gelvin, S.B.,** (2003) *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the ‘Gene-Jockeying’ Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(1): 16–37.
- Gelvin, S.B.,** (2009) *Agrobacterium* in the Genomics Age. *Plant Physiology* 150(4): 1665–1676.
- Gelvin, S.B.,** (2012) Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA’s Journey to the Host Genome. *Frontiers in plant science* 3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355731/> (accessed 20 March 2017).
- 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.
- Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Kutay, H., Motiwala, T., Jacob, S.T.,** (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and Cellular Biology* 25(11): 4727–4741.
- Giddings, L.-A., Liscombe, D.K., Hamilton, J.P., Childs, K.L., DellaPenna, D., Buell, C.R., O’Connor, S.E.,** (2011) A Stereoselective Hydroxylation Step of Alkaloid Biosynthesis by a Unique Cytochrome P450 in *Catharanthus roseus*. *The Journal of Biological Chemistry* 286(19): 16751–16757.
- Giri, A., Narasu, M.L.,** (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18(1): 1–22.
- Giri, C.C., Zaheer, M.,** (2016) Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 126(1): 1–18.
- Godoy-Hernández, G., Loyola-Vargas, V.M.,** (1997) Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell Reports* 16(5): 287–290.
- Goklany, S., Loring, R.H., Glick, J., Lee-Parsons, C.W.T.,** (2009) Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding. *Biotechnology Progress* 25(5): 1289–1296.
- Gorelick, J., Bernstein, N.,** (2014) Chapter Five - Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. In: Sparks DL (ed.), *Advances in Agronomy*, Academic Press, pp. 201–230. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012800138700005X> (accessed 28 October 2016).

- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Coco, F.L., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzl, T.,** (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal* 20(24): 6969–6978.
- Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., Morgenstern, Y.,** (2011) The stem cell state in plant development and in response to stress. *Frontiers in Plant Science* 2: 53.
- Griffin, P.T., Niederhuth, C.E., Schmitz, R.J.,** (2016) A Comparative Analysis of 5-Azacytidine- and Zebularine-Induced DNA Demethylation. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 6(9): 2773–2780.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., Razin, A.,** (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292(5826): 860–862.
- Gruissem, W.,** (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons. 1280 P.
- Guillon, S., Gantet, P., Thiersault, M., Rideau, M., Trémouillaux-Guiller, J.,** (2008) *Hairy Roots of Catharanthus roseus: Efficient Routes to Monomeric Indole Alkaloid Production*. In: Ramawat KG and Merillon JM (eds), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 285–295. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74603-4_15 (accessed 23 December 2014).
- Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., Burlat, V.,** (2010) Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a. *BMC Plant Biology* 10(1): 182.
- Guirimand, G., Courdavault, V., St-Pierre, B., Burlat, V.,** (2010) Biosynthesis and Regulation of Alkaloids. In: Pua EC and Davey MR (eds), *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 139–160. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-04670-4_8 (accessed 19 April 2017).
- Guirimand, G., Guihur, A., Poutrain, P., Héricourt, F., Mahroug, S., St-Pierre, B., Burlat, V., Courdavault, V.,** (2011) Spatial organization of the vindoline biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology* 168(6): 549–557.
- Hao, W., Richardson, P.A., Hong, C.X.,** (2010) Foliar Blight of Annual Vinca (*Catharanthus roseus*) Caused by *Phytophthora tropicalis* in Virginia. *Plant Disease* 94(2): 274–274.
- Harfi, B.,** (2013) Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscyamine chez *Datura* sp. Phd thesis, Algiers, Algeria: ENSA.
- Harfi, B., Khelifi, L., Bekhouche, M., Khelifi-Slaoui, M.,** (2013) Study of biomass growth kinetic's and hyoscyamine accumulation in hairy roots of three species of *Datura*. *Wulfenia Journal*.

- Harfi, B., Khelifi-Slaoui, M., Bekhouche, M., Benyammi, R., Hefferon, K., Makhzoum, A., Khelifi, L.,** (2015) Hyoscyamine production in hairy roots of three *Datura* species exposed to high-salt medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*: 1–7.
- Hassan, A.,** (2011) In vivo antidiarrheal activity of the ethanolic leaf extract of *Catharanthus roseus* Linn. (Apocyanaceae) in Wistar rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(15): 1797–1800.
- Hernández-Domínguez, E., Campos-Tamayo, F.,** (2004) Vindoline synthesis in in vitro shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Letters* 26(8): 671–674.
- Hernández-Domínguez, E., Carrillo-Pech, M., Vázquez-Flota, F.,** (2006) *Catharanthus roseus* Shoot Cultures for the Production of Monoterpenoid Indole Alkaloids. In: Loyola-Vargas V and Vázquez-Flota F (eds), *Plant Cell Culture Protocols*, Methods in Molecular Biology™, Humana Press, pp. 349–355. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-959-1%3A349> (accessed 11 January 2016).
- Hicks, G.S.,** (1980) Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *The Botanical Review* 46(1): 1–23.
- Hill, K., Schaller, G.E.,** (2013) Enhancing plant regeneration in tissue culture. *Plant Signaling & Behavior* 8(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4091070/> (accessed 27 October 2016).
- Hirano, H., Komamine, A.,** (1994) Correlation of betacyanin synthesis with cell division in cell suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum* 90(2): 239–245.
- Hirata, K., Miyamoto, K., Miura, Y.,** (1994) *Catharanthus roseus* L. (Periwinkle): Production of Vindoline and Catharanthine in Multiple Shoot Cultures. In: Bajaj PDYPS (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants VI*, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer Berlin Heidelberg, pp. 46–55. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-57970-7_3 (accessed 13 October 2016).
- Hirata, K., Yamanaka, A., Kurano, N., Miyamoto, K., Miura, Y.,** (1987) Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP8902159> (accessed 3 October 2016).
- Hirsch, A.M.,** (1999) Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2(4): 320–326.
- Hughes, E.H., Hong, S.-B., Gibson, S.I., Shanks, J.V., San, K.-Y.,** (2004) Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. *Metabolic Engineering* 6(4): 268–276.
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., Saeed, M.,** (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 4(1): 10–20.

- Hu, Y., Zhang, L., Zhao, L., Li, J., He, S., Zhou, K., Yang, F., Huang, M., Jiang, L., Li, L.,** (2011) Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize. *PloS One* 6(7): e22132.
- Hwang, H.-H., Gelvin, S.B.,** (2015) *Agrobacterium* biology and its application to transgenic plant production. Frontiers Media SA.
- Hwang, I., Sheen, J., Müller, B.,** (2012) Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology* 63(1): 353–380. 167 P.
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M.M.A.,** (2013) Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). *Journal of Hazardous Materials* 252-253: 367–374.
- Ishikawa, H., Colby, D.A., Seto, S., Va, P., Tam, A., Kakei, H., Rayl, T.J., Hwang, I., Boger, D.L.,** (2009) Total Synthesis of Vinblastine, Vincristine, Related Natural Products, and Key Structural Analogues. *Journal of the American Chemical Society* 131(13): 4904–4916.
- Iwasaki, M., Paszkowski, J.,** (2014) Epigenetic memory in plants. *The EMBO journal* 33(18): 1987–1998.
- Jeong, G.-T., Park, D.-H., Ryu, H.-W., Hwang, B., Woo, J.-C., Kim, D., Kim, S.-W.,** (2005) Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy roots: Enhanced production of secondary metabolite in hairy root cultures by elicitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121-124: 1147–1157.
- Ji, H.-F., Li, X.-J., Zhang, H.Y.,** (2009) Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports* 10(3): 194–200.
- Jones, P.A., Issa, J.-P.J., Baylin, S.,** (2016) Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics* 17(10): 630–641.
- Jouanin, L., Vilaine, F., d’Enfert, C., Casse-Delbart, F.,** (1985) Localization and restriction maps of the replication origin regions of the plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Molecular and General Genetics MGG* 201(3): 370–374.
- Joy, P.P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, B.P.,** (1998) Medicinal plants. *Tropical horticulture* 2: 449–632.
- Jüttermann, R., Li, E., Jaenisch, R.,** (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(25): 11797–11801.
- Kado, C.I., Crosa, J.H.,** (2012) *Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence*. Springer Science & Business Media. 676 P.
- Kaelin, W.G., McKnight, S.L.,** (2013) Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell* 153(1): 56–69.

- Kanazawa, A., O'Dell, M., Hellens, R.P.,** (2007) Epigenetic inactivation of chalcone synthase-A transgene transcription in petunia leads to a reversion of the post-transcriptional gene silencing phenotype. *Plant & Cell Physiology* 48(4): 638–647.
- 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*. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300938088> (accessed 28 September 2016).
- Katz, V., Fuchs, A., Conrath, U.,** (2002) Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Letters* 520(1-3): 53–57.
- Kawiak, A., Królicka, A., Lojkowska, E.,** (2003) Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75(2): 175–178.
- 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*: 329–335.
- 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. In: Alger: Khelifi, pp. 114–118.
- Kim, J.A., Baek, K.-H., Son, Y.M., Son, S.H., Shin, H.,** (2009) Hairy Root Cultures of *Taxus cuspidate* for Enhanced Production of Paclitaxel. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52(2): 144–150.
- Kim, S.-I., Veena, null, Gelvin, S.B.,** (2007) Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 51(5): 779–791.
- King, G.J.,** (1995) Morphological development in *Brassica oleracea* is modulated by in vivo treatment with 5-azacytidine. *Journal of Horticultural Science* 70(2): 333–342.
- Kiselev, K.V., Tyunin, A.P., Manyakhin, A.Y., Zhuravlev, Y.N.,** (2011) Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 105(1): 65–72.
- Kiselev, K.V., Tyunin, A.P. and Karetin, Y.A.,** (2013) Influence of 5-azacytidine and salicylic acid on demethylase gene expression in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(6): 1843–1851.
- Korzus, E.,** (2010) Manipulating the brain with epigenetics. *Nature Neuroscience* 13(4): 405–406.
- Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., Göttlicher, M.,** (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO Journal* 22(13): 3411–3420.

- Kumar, S., Jaggi, M., Sinha, A.K.,** (2011) Ectopic overexpression of vacuolar and apoplastic *Catharanthus roseus* peroxidases confers differential tolerance to salt and dehydration stress in transgenic tobacco. *Protoplasma* 249(2): 423–432.
- Lachmann, N., Brenning, S., Phaltane, R., Flasshove, M., Dilloo, D., Moritz, T.,** (2013) Myeloprotection by Cytidine Deaminase Gene Transfer in Antileukemic Therapy. *Neoplasia* 15(3): 239–248.
- Lacroix, B., Citovsky, V.,** (2013) The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *International Journal of Developmental Biology* 57(6-7-8): 467–481.
- Laxalt, A.M., Munnik, T.,** (2002) Phospholipid signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 5. Available from: <http://dare.uva.nl/search?identifier=c6081205-ad88-4b26-b25f-522495d48835> (accessed 1 May 2017).
- Lebrun-Garcia, A., Bourque, S., Binet, M.-N., Ouaked, F., Wendehenne, D., Chiltz, A., Schäffner, A., Pugin, A.,** (1999) Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* 81(6): 663–668.
- Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., Jolicoeur, M.,** (2006) Development of a kinetic metabolic model: application to *Catharanthus roseus* hairy root. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28(5): 295–313.
- Lee, K., Dudley, M.W., Hess, K.M., Lynn, D.G., Joerger, R.D., Binns, A.N.,** (1992) Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: identification of phenol-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(18): 8666–8670.
- Lee, K., Park, O.-S., Jung, S.-J., Seo, P.J.,** (2016) Histone deacetylation-mediated cellular dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 191: 95–100.
- Lee-Parsons, C.W.T., Ertürk, S.,** (2005) Ajmalicine production in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on Ca²⁺ level. *Plant Cell Reports* 24(11): 677–682.
- Lee-Parsons, C.W.T., Ertürk, S., and Tengtrakool, J.,** (2004) Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology Letters* 26(20): 1595–1599.
- Lee, Y.H., Lee, J.S., Kim, S.Y., Sohn, S.H., Kim, D.Y., Yoon, I.S., Kweon, S.J., Suh, S.C.,** (2008) Effects of 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor, on embryogenic callus formation and shoot regeneration from rice mature seeds. *Journal of Plant Biotechnology*. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2009002507> (accessed 15 March 2017).
- Li, H., Wylie, S.J., Jones, M.G.K.,** (2000) Transgenic yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Cell Reports* 19(6): 634–637.

- Soriano, M., Cordewener, J., Muiño, J.M., Riksen, T., Fukuoka, H., Angenent, G.C., Boutilier, K.,** (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell* 26(1): 195–209.
- Liu, J., Zhu, J., Tang, L., Wen, W., Lv, S., Yu, R.,** (2013) Enhancement of vindoline and vinblastine production in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* by artemisinic acid elicitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(1): 175–180.
- Liu, X., Yang, S., Zhao, M., Luo, M., Yu, C.-W., Chen, C.-Y., Tai, R., Wu, K.,** (2014) Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. *Molecular Plant* 7(5): 764–772.
- Loberant, B., Altman, A., Flickinger, M.C.,** (2009) Micropropagation of Plants. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470054581.eib442/abstract> (accessed 21 April 2017).
- Lobert, S., Vulevic, B., Correia, J.J.,** (1996) Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* 35(21): 6806–6814.
- Loddo, D., Sousa, E., Masin, R., Calha, I., Zanin, G., Fernández-Quintanilla, C., Dorado, J.,** (2013) Estimation and Comparison of Base Temperatures for Germination of European Populations of Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Jimsonweed (*Datura stramonium*). *Weed Science* 61(3): 443–451.
- Magnus, P., Thurston, L.S.,** (1991) Synthesis of the vinblastine-like antitumor bis-indole alkaloid navelbine analog desethylhydronavelbine. *The Journal of Organic Chemistry* 56(3): 1166–1170.
- Mahroug, S., Burlat, V., St-Pierre, B.,** (2007) Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews* 6(2-3): 363–381.
- Makhzoum, A.B., Sharma, P., Bernardis, M.A., Trémouillaux-Guiller, J.,** (2013) Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications. In: Gang DR (ed.), *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*, Recent Advances in Phytochemistry, Springer New York, pp. 95–142. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-4066-6_6 (accessed 16 December 2014).
- Malarz, J., Stojakowska, A., Kisiel, W.,** (2007) Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(2): 127–132.
- Malik, S., Bība, O., Grúz, J., Arroo, R.R.J., Strnad, M.,** (2014) Biotechnological approaches for producing aryltetralin lignans from *Linum* species. *Phytochemistry Reviews* 13(4): 893–913.
- Mano, Y., Matsushashi, M.,** (1995) A novel life cycle arising from leaf segments in plants regenerated from horseradish hairy roots. *Plant Cell Reports* 14(6): 370–374.
- Manske, R.H.F.,** (2014) *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Elsevier. P 399.

- Mathur, A., Gangwar, A., Mathur, A.K., Verma, P., Uniyal, G.C., Lal, R.K.,** (2010) Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy roots of *American ginseng*—*Panax quinquefolium* L. *Biotechnology Letters* 32(3): 457–461.
- Matthysse, A.G.,** (2014) Attachment of *Agrobacterium* to plant surfaces. *Frontiers in Plant Science* 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046570/> (accessed 7 April 2017).
- Matthysse, A.G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B.E., Fuqua, C., White, A.R.,** (2005) The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(9): 1002–1010.
- Ma, X., Zhang, C., Zhang, B., Yang, C., Li, S.,** (2016) Identification of genes regulated by histone acetylation during root development in *Populus trichocarpa*. *BMC genomics* 17: 96.
- Mehrotra, S., Goel, M.K., Srivastava, V., Rahman, L.U.,** (2014) Hairy root biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: a potent approach for the production of pharmaceutically important terpenoid indole alkaloids. *Biotechnology Letters*: 1–11.
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J.W.,** (2001) ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* 6(5): 212–219.
- Misra, N., Misra, R., Mariam, A., Yusuf, K., Yusuf, L.,** (2014) Salicylic Acid Alters Antioxidant and Phenolics Metabolism in *Catharanthus roseus* Grown Under Salinity Stress. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 11(5): 118–125.
- Mithila, J., Hall, J.C., Victor, J.M.R., Saxena, P.K.,** (2003) Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of *African violet* (*Saintpaulia ionantha* Wendl). *Plant Cell Reports* 21(5): 408–414.
- Mok, D.W., Mok, and M.C.,** (2001) Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1): 89–118.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sabatini, S.,** (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* 14(10): 557–562.
- Mujib, A., Ilah, A., Aslam, J., Fatima, S., Siddiqui, Z.H., Maqsood, M.,** (2012) *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regulation* 68(2): 111–127.
- Muniz, M.N.,** (2006) *Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine*. Université Joseph Fourier (Grenoble). Available from: <http://www.theses.fr/2006GRE10082> (accessed 21 October 2016).
- Murashige, T.,** (1974) Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25(1): 135–166.
- Murashige, T., Skoog, F.,** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–497.

- Murata, J., De Luca, V.,** (2005) Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-O-methyltransferase to leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 44(4): 581–594.
- Mustafa, N.R., Verpoorte, R.,** (2007) Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews* 6(2-3): 243–258.
- Mustafa, N.R., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R.,** (2009) Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. *Biotechnology Letters* 31(12): 1967.
- Nakajima, I., Sato, Y., Saito, T., Moriguchi, T., Yamamoto, T.,** (2013) Agrobacterium-mediated genetic transformation using cotyledons in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science* 63(3): 275–283.
- Namdeo, A.G.,** (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews* 1(1): 69–79.
- Nam, J., Mysore, K.S., Zheng, C., Knue, M.K., Matthyse, A.G., Gelvin, S.B.,** (1999) Identification of T-DNA tagged Arabidopsis mutants that are resistant to transformation by Agrobacterium. *Molecular & general genetics: MGG* 261(3): 429–438.
- Naseem, M., Dandekar, T.,** (2012) The Role of Auxin-Cytokinin Antagonism in Plant-Pathogen Interactions. *PLoS Pathogens* 8(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510258/> (accessed 22 April 2017).
- Nejat, N., Valdiani, A., Cahill, D., Tan, Y.-H., Maziah, M., Abiri, R.,** (2015) Ornamental Exterior versus Therapeutic Interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): The Two Faces of a Versatile Herb. *The Scientific World Journal* 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312627/> (accessed 15 October 2016).
- Nemoto, K., Hara, M., Suzuki, M., Seki, H., Oka, A., Muranaka, T., Mano, Y.,** (2009) Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro. *Plant Signaling & Behavior* 4(12): 1145–1147.
- Noble, R.L.,** (1990) The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 68(12): 1344–1351.
- Nomura, T., Kutchan, T.M.,** (2010) Three New O-Methyltransferases Are Sufficient for All O-Methylation Reactions of Ipecac Alkaloid Biosynthesis in Root Culture of *Psychotria ipecacuanha*. *The Journal of Biological Chemistry* 285(10): 7722–7738.
- Oka, A.,** (2003) New insights into cytokinins. *Journal of Plant Research (Japan)*. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP2005001182> (accessed 22 April 2017).
- Owens, G., Javid, R., Belmusto, L., Bender, M., Blau, M.,** (1965) Intra-arterial vincristine therapy of primary gliomas. *Cancer* 18(6): 756–760.

- Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C., Pinol, M.T.,** (1997) Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* (France). Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR9702596> (accessed 26 October 2016).
- Pandey, S., Gupta, K., Mukherjee, A.K.,** (2007) Impact of cadmium and lead on *Catharanthus roseus*--a phytoremediation study. *Journal of Environmental Biology* 28(3): 655–662.
- Pang, H., Feng, T., Lu, H., Meng, Q., Chen, X., Shen, Q., Dong, X., Cai, L.,** (2016) Efficacy and Safety of Nedaplatin in Advanced Breast Cancer Therapy. *Cancer Investigation* 34(4): 167–172.
- Pan, Q., Chen, Y., Wang, Q., Yuan, F., Xing, S., Tian, Y., Zhao, J., Sun, X., Tang, K.,** (2010) Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regulation* 60(2): 133–141.
- Pan, Q., Mustafa, N.R., Tang, K., Choi, Y.H., Verpoorte, R.,** (2015) Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. *Phytochemistry Reviews* 15(2): 221–250.
- Park, S.H., Pinson, S.R.M., Smith, R.H.,** (1996) T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology* 32(6): 1135–1148.
- Pati, P.K., Kaur, J., Singh, P.,** (2010) A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 105(3): 299–307.
- Pecinka, A., Liu, C.-H.,** (2014) Drugs for plant chromosome and chromatin research. *Cytogenetic and Genome Research* 143(1-3): 51–59.
- Pedras, M.S.C., Nycholat, C.M., Montaut, S., Xu, Y., Khan, A.Q.,** (2002) Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry* 59(6): 611–625.
- Peña, L., Pérez, R.M., Cervera, M., Juárez, J.A., Navarro, L.,** (2004) Early Events in *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Citrus Explants. *Annals of Botany* 94(1): 67–74.
- Peng W-T, Lee Y-W and Nester EW** (1998) The Phenolic Recognition Profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA Protein Are Broadened by a High Level of the Sugar Binding Protein ChvE. *Journal of Bacteriology* 180(21): 5632–5638.
- Perrella, G., Lopez-Vernaza, M.A., Carr, C., Sani, E., Gosselé, V., Verduyn, C., Kellermeier, F., Hannah, M.A., Amtmann, A.,** (2013) Histone deacetylase complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(9): 3491–3505.
- Pettit, R.K.,** (2011) Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology* 4(4): 471–478.

- Pietrosiuk, A., Furmanowa, M., Lata, B.,** (2007) *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews* 6(2-3): 459–473.
- 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.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M.,** (2000) Scopolamine and hyoscyamine production by hairy root cultures of *Brugmansia candida*: influence of calcium chloride, hemicellulase and theophylline. *Biotechnology Letters* 22(20): 1653–1656.
- Pitzschke, A., Hirt, H.,** (2010) New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* 29(6): 1021–1032.
- Prakash, A.P., Kumar, P.P.,** (1997) Inhibition of shoot induction by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in *Petunia* involves DNA hypomethylation. *Plant Cell Reports* 16(10): 719–724.
- Rai, G.K., Rai, N.P., Kumar, S., Yadav, A., Rathaur, S., Singh, M.,** (2012) Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on Agrobacterium-mediated transformation of tomato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48(5): 565–578.
- Ramani, D.S., Patil, N., Nimbalkar, S., Jayabaskaran, C.,** (2013) Alkaloids Derived from Tryptophan: Terpenoid Indole Alkaloids. In: Ramawat KG and Mérillon J-M (eds), *Natural Products*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 575–604. Available from: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-22144-6_21 (accessed 18 December 2014).
- Ramawat, K.G.,** (2007) *Biotechnology, Second Edition: Secondary Metabolites*. CRC Press. 580 P.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M., Palazon, J.,** (2016) Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21(2): 182.
- Reisman-Berman, O., Kigel, J., Rubin, B.,** (1991) Dormancy patterns in buried seeds of *Datura ferox* and *D. stramonium*. *Canadian Journal of Botany* 69(1): 173–179.
- Rijhwani, S.K., Shanks, J.V.,** (1998) Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnology Progress* 14(3): 442–449.
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Keitt, G.W., Sagen, H.E., Wright, W.H.,** (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. agric. res. (Wash. D.C.). Journal of agricultural research*. 41(7): 507–540.
- Rodríguez, J.L., Pascual, J., Viejo, M., Valledor, L., Meijón, M., Hasbún, R., Yrei, N.Y., Santamaría, M.E., Pérez, M., Fernández Fraga, M., Berdasco, M., Rodríguez Fernández,**

- R., Cañal, M.J.,** (2012) Basic procedures for epigenetic analysis in plant cell and tissue culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 877: 325–341.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., Ruíz-Saínz, J.E.,** (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters* 272(2): 127–136.
- Rodríguez-Sanz, H., Moreno-Romero, J., Solís, M.-T., Köhler, C., Risueño, M.C., Testillano, P.S.,** (2014) Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with Bn HKMT and Bn HAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in *Brassica napus*. *Cytogenetic and Genome Research* 143(1-3): 209–218.
- Romeis, T.,** (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology* 4(5): 407–414.
- Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J., Dellaporta, S.L.,** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)* 273(5275): 654–657.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P.,** (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18(2): 91–120.
- Roychowdhury, D., Majumder, A., Jha, S.,** (2013) Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges. In: Chandra S, LATA H, and Varma A (eds), *Biotechnology for Medicinal Plants*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 29–68. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-29974-2_2 (accessed 17 August 2016).
- Ruiz-May, E., Galaz-Ávalos, R.M., Loyola-Vargas, V.M.,** (2008) Differential Secretion and Accumulation of Terpene Indole Alkaloids in Hairy Roots of *Catharanthus roseus* Treated with Methyl Jasmonate. *Molecular Biotechnology* 41(3): 278.
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H., Hunt, M.,** (1996) Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* 8(10): 1809–1819.
- Saenz, L., Santamaria, J.M., Villanueva, M.A., Loyola-Vargas, V.M., Oropeza, C.,** (1993) Changes in the alkaloid content of plants of *Catharanthus roseus* L. (Don). as a result of water stress and treatment with abscisic acid. *Journal of plant physiology* 142(2): 244–247.
- Saika, H., Nishizawa-Yokoi, A., Toki, S.,** (2014) The non-homologous end-joining pathway is involved in stable transformation in rice. *Frontiers in Plant Science* 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201092/> (accessed 7 April 2017).
- Sandal, I., Bhattacharya, A., Ahuja, P.S.,** (2001) An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65(1): 75–80.
- Satdive, R.K., Fulzele, D.P., Eapen, S.,** (2003) Studies on Production of Ajmalicine in Shake Flasks by Multiple Shoot Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress* 19(3): 1071–1075.

- Schluttenhofer, C., Pattanaik, S., Patra, B., Yuan, L.,** (2014) Analyses of *Catharanthus roseus* and *Arabidopsis thaliana* WRKY transcription factors reveal involvement in jasmonate signaling. *BMC Genomics* 15(1): 502.
- Seki, H., Nishizawa, T., Tanaka, N., Niwa, Y., Yoshida, S., Muranaka, T.,** (2005) Hairy Root-activation Tagging: a High-throughput System for Activation Tagging in Transformed Hairy Roots. *Plant Molecular Biology* 59(5): 793–807.
- Shahzad, A., Shaheen, A., Kozgar, M.I., Sahai, A., Sharma, S.,** (2013) Phytoactive Compounds from In Vitro Derived Tissues. In: Shahid M, Shahzad A, Malik A, et al. (eds), *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*, Springer Netherlands, pp. 1–23. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6603-7_1 (accessed 17 August 2016).
- Sharma, S., Shahzad, A., Sahai, A.,** (2013) Hairy Root Culture: An Efficient System for Secondary Metabolite Production. In: Shahid M, Shahzad A, Malik A, et al. (eds), *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*, Springer Netherlands, pp. 51–78. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6603-7_3 (accessed 17 August 2016).
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S.,** (2010) An alternative method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=c9570e73-c9bb-47fd-bb46-0b4b2e4a147a> (accessed 3 May 2017).
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., Machida, Y.,** (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(17): 6684–6688.
- Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N.P.,** (2007) Histone Deacetylase Activity Regulates Chemical Diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* 6(9): 1656–1664.
- Siddiqui, Z.H., Mujib, A., Mahmooduzzafar, Aslam, J., Hakeem, K.R., Parween, T.,** (2013) In vitro Production of Secondary Metabolites Using Elicitor in *Catharanthus roseus*: A Case Study. In: Hakeem KR, Ahmad P, and Ozturk M (eds), *Crop Improvement*, Springer US, pp. 401–419. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-7028-1_14 (accessed 16 August 2016).
- Singh, G., Reddy, G.R., Curtis, W.R.,** (1994) Use of Binding Measurements To Predict Elicitor Dosage Requirements for Secondary Metabolite Production from Root Cultures. *Biotechnology Progress* 10(4): 365–371.
- Sivanandhan, G., Rajesh, M., Arun, M., Jeyaraj, M., Dev, G.K., Arjunan, A., Manickavasagam, M., Muthuselvam, M., Selvaraj, N., Ganapathi, A.,** (2012) Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(3): 715–728.

- Skoog, F., Miller, C.O.**, (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118–130.
- Slightom, J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D.**, (1986) Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *The Journal of Biological Chemistry* 261(1): 108–121.
- Solís, M.-T., El-Tantawy, A.-A., Cano, V., Risueño, M.C., Testillano, P.S.**, (2015) 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Frontiers in Plant Science* 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4479788/> (accessed 10 March 2017).
- Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., Fransz, P.F.**, (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 21(23): 6549–6559.
- Sorm, F., Pískala, A., Cihák, A., Veselý, J.**, (1964) 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20(4): 202–203.
- Sottomayor, M., Cardoso, I.L., Pereira, L.G., Barceló, A.R.**, (2004) Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Reviews* 3(1-2): 159–171.
- Stachel, S.E., Zambryski, P.C.**, (1986) *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* 46(3): 325–333.
- Stepanova, A.N., Alonso, J.M.**, (2011) Bypassing Transcription: A Shortcut in Cytokinin-Auxin Interactions. *Developmental Cell* 21(4): 608–610.
- Stewart, F.C., Hall, F.H., Rolfs, F.M.**, (1900) *A fruit-disease survey of western New York in 1900*. Bulletin / New York Agricultural Experiment Station; no. 191, Geneva, N.Y.: New York Agricultural Experiment Station. Available from: <https://catalog.hathitrust.org/Record/011464942> (accessed 17 April 2017).
- Sticklen, M.B., Oraby, H.F.**, (2005) Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41(3): 187–200.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F., De Luca V.**, (1999) Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *The Plant Cell* 11(5): 887–900.
- Studt, L., Schmidt, F.J., Jahn, L., Sieber, C.M.K., Connolly, L.R., Niehaus, E.-M., Freitag, M., Humpf, H.-U., Tudzynski, B.**, (2013) Two Histone Deacetylases, FfHda1 and FfHda2, Are Important for *Fusarium fujikuroi* Secondary Metabolism and Virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 79(24): 7719–7734.

- Sugimoto, K., Meyerowitz, E.M.,** (2013) Regeneration in Arabidopsis tissue culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 959: 265–275.
- Syklowska-Baranek, K., Pilarek, M., Bonfill, M., Kafel, K., Pietrosiuk, A.,** (2015) Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy root cultures of *Taxus x media* var. Hicksii carrying a taxadiene synthase transgene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 120(3): 1051–1059.
- Tai, H.H., Tai, G.C.C., Beardmore, T.,** (2005) Dynamic Histone Acetylation of Late Embryonic Genes during Seed Germination. *Plant Molecular Biology* 59(6): 909–925.
- Tanaka, F., Yoneda, K.,** (2015) Adjuvant therapy following surgery in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Surgery Today* 46(1): 25–37.
- Taneja, J., Jaggi, M., Wankhede, D.P., Sinha, A.K.,** (2010) Effect of loss of T-DNA genes on MIA biosynthetic pathway gene regulation and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Reports* 29(10): 1119–1129.
- Tao, J., Li, L.,** (2006) Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany* 72(2): 211–216.
- Thakore, D., Srivastava, A.K., Sinha, A.,** (2012) Enhanced Production of Antihypertensive Drug Ajmalicine in Transformed Hairy Root Culture of *Catharanthus roseus* by Application of Stress Factors in Statistically Optimized Medium. In: Khemani LD, Srivastava MM, and Srivastava S (eds), *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 39–42. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-23394-4_8 (accessed 17 November 2014).
- Thomson, R.H.,** (2012) *The Chemistry of Natural Products*. Springer Science & Business Media. 462 P.
- Tian, L.,** (2015) Using Hairy Roots for Production of Valuable Plant Secondary Metabolites. In: Krull R and Bley T (eds), *Filaments in Bioprocesses*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer International Publishing, pp. 275–324. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2014_298 (accessed 17 August 2016).
- Tieu, A., Egerton-Warburton, L.M.,** (2000) Contrasting seed morphology dynamics in relation to the alleviation of dormancy with soil storage. *Canadian Journal of Botany* 78(9): 1187–1198.
- Tinland, B., Koukolíková-Nicola, Z., Hall, M.N., Hohn, B.,** (1992) The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(16): 7442–7446.
- Tiong, S.H., Looi, C.Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W.F., Cheah, S.-C., Mustafa, M.R., Awang, K.,** (2013) Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules* 18(8): 9770–9784.
- Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang, Z.-C., Guo, G.-Q., Zheng, G.-C.,** (2008) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. *Biologia Plantarum* 52(1): 26–35.

- Toivonen, L., Balsevich, J., Kurz, W.G.W.,** (1989) Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18(1): 79–93.
- Toivonen, L., Ojala, M., Kauppinen, V.,** (1990) Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Growth kinetics and fermentation. *Biotechnology Letters* 12(7): 519–524.
- Tomlinson, A.D., Fuqua, C.,** (2009) Mechanisms and Regulation of Polar Surface Attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Current opinion in microbiology* 12(6): 708–714.
- Tounekti, T., Hernández, I., Munné-Bosch, S.,** (2013) Salicylic Acid Biosynthesis and Role in Modulating Terpenoid and Flavonoid Metabolism in Plant Responses to Abiotic Stress. In: Hayat S, Ahmad A, and Alyemeni MN (eds), *SALICYLIC ACID*, Springer Netherlands, pp. 141–162. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6428-6_8 (accessed 18 August 2016).
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., Koizumi, K.,** (1976) A new antifungal antibiotic, trichostatin. *The Journal of Antibiotics* 29(1): 1–6.
- Tyunin, A.P., Kiselev, K.V., Zhuravlev, Y.N.,** (2012). Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 111(1): 91–100.
- Tzfira, T., Citovsky, V.,** (2006) Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17(2): 147–154.
- van Der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R.,** (2004) The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11(5): 607–628.
- Vázquez-Flota, F., Moreno-Valenzuela, O., Miranda-Ham, M.L., Coello-Coello, J., Loyola-Vargas, V.M.,** (1994) Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38(2-3): 273–279.
- De Luca, V., Carrillo-Pech, M., Canto-Flick, A., de Lourdes Miranda-Ham, M.,** (2002) Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Molecular Biotechnology* 22(1): 1–8.
- Vázquez-Flota, F., Hernández-Domínguez, E., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-González, M.,** (2009) A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. *Biotechnology Letters* 31(4): 591–595.
- Veena, V., Taylor, C.G.,** (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43(5): 383–403.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuïnk, T.J., Hooykaas, P.J.,** (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science (New York, N.Y.)* 290(5493): 979–982.

- Verma, P., Mathur, A.K., Shanker, K.,** (2012) Increased Availability of Tryptophan in 5-Methyltryptophan-Tolerant Shoots of *Catharanthus roseus* and Their Postharvest in vivo Elicitation Induces Enhanced Vindoline Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168(3): 568–579.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., Memelink, J.,** (2000) Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9(4-5): 323–343; discussion 321.
- Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C.,** (2001) Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clinical Cancer Research* 7(4): 971–976.
- Vincent, J.M.,** (1970) A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. International Biological Programme by Blackwell Scientific. 202 P.
- Waddington, C.H.,** (1952) Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169(4302): 625–626.
- Waddington, C.H.,** (2012) The epigenotype. 1942. *International Journal of Epidemiology* 41(1): 10–13.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., Waksman, G.,** (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology* 12(9): 1203–1212.
- Waller, G.R., Nowacki, E.K.,** (1978) Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Basic Books. 316 P.
- Wang, J.W., Wu, J.Y.,** (2013) Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. In: Doran PM (ed.), *Biotechnology of Hairy Root Systems*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer Berlin Heidelberg, pp. 55–89. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2013_183 (accessed 17 August 2016).
- Wang, J.W., Zheng, L.P., Zhang, B., Zou, T.,** (2009) Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(2): 285–292.
- Wang, J.-Y., Liu, Z.-P., Liu, L., Liu, C.,** (2008) [Effects of NaCl on the growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus* seedlings]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology / Zhongguo Sheng Tai Xue Xue Hui, Zhongguo Ke Xue Yuan Shenyang Ying Yong Sheng Tai Yan Jiu Suo Zhu Ban* 19(10): 2143–2148.
- Wang, P., Zhao, L., Hou, H., Zhang, H., Huang, Y., Wang, Y., Li, H., Gao, F., Yan, S., Li, L.,** (2015) Epigenetic Changes are Associated with Programmed Cell Death Induced by Heat Stress in Seedling Leaves of *Zea mays*. *Plant & Cell Physiology* 56(5): 965–976.
- Wang, Z., Cao, H., Chen, F., Liu, Y.,** (2014) The roles of histone acetylation in seed performance and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 84: 125–133.

- Waterborg, J.H.**, (2002) Dynamics of histone acetylation *in vivo*. A function for acetylation turnover. *Biochemistry and Cell Biology* 80(3): 363–378.
- Waterborg, J.H.**, (2011) Plant histone acetylation: in the beginning. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1809(8): 353–359.
- White, F.F., Nester, E.W.**, (1980) Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 141(3): 1134–1141.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P., Nester, E.W.**, (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* 164(1): 33–44.
- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., Cichewicz, R.H.**, (2008) Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. 6(11): 1895–1897.
- Winans, S.C., Kerstetter, R.A., Nester, E.W.**, (1988) Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 170(9): 4047–4054.
- Wink, M., Alfermann, A.W., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhövel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzadeh, A., Wildi, E., Ripplinger, P.**, (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resources* 3(2): 90–100.
- Woerdenbag, H.J., Lüers, J.F.J., Uden, W. van, Pras, N., Malingré, T.M., Alfermann, A.W.**, (1993) Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32(2): 247–257.
- Wolanin, P.M., Thomason, P.A., Stock, J.B.**, (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* 3(10): REVIEWS3013.
- Wolfe, A.P., Matzke, M.A.**, (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science (New York, N.Y.)* 286(5439): 481–486.
- Wright, J.R.**, (2002) Almost famous: E. Clark Noble, the common thread in the discovery of insulin and vinblastine. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 167(12): 1391–1396.
- Wu, K., Malik, K., Tian, L., Brown, D., Miki, B.**, (2000) Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 44(2): 167–176.
- Wyatt, G.R.**, (1951) Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochemical Journal* 48(5): 581–584.
- Xing, S., Pan, Q., Tian, Y., Wang, Q., Liu, P., Zhao, J., Wang, G., Sun, X., Tang, K.**, (2011) Effect of plant growth regulator combinations on the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(9): 1692–1700.
- Yang, F., Zhang, L., Li, J., Huang, J., Wen, R., Ma, L., Zhou, D., Li, L.**, (2010) Trichostatin A and 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize. *BMC plant biology* 10: 178.

- Yang, X.-L., Huang, L., Ruan, X.-L.,** (2014) Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis*. *Journal of Asian Natural Products Research* 16(4): 412–417.
- Yoshida, M., Horinouchi, S., Beppu, T.,** (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 17(5): 423–430.
- Yoshida, S., Mandel, T., Kuhlemeier, C.,** (2011) Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes & Development* 25(13): 1439–1450.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H.,** (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(1): 89–103.
- Yu, F., Luca, V.D.,** (2014) Transport of Monoterpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus*. In: Geisler M (ed.), *Plant ABC Transporters, Signaling and Communication in Plants*, Springer International Publishing, pp. 63–75. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06511-3_5 (accessed 17 August 2016).
- Zare, N., Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R., Farjaminezhad, M.,** (2014) Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Natural Product Research* 28(10): 711–717.
- Zhang, J.-J., Li, X.-Q., Sun, J.-W., Jin, S.-H.,** (2014) Nitric Oxide Functions as a Signal in Ultraviolet-B-Induced Baicalin Accumulation in *Scutellaria baicalensis* Suspension Cultures. *International Journal of Molecular Sciences* 15(3): 4733–4746.
- Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W., Tang, K.,** (2007) Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta* 225(4): 887–896.
- Zhan, Y.-G., Zeng, F.-S., Xin, Y.,** (2005) Progress on molecular mechanism of T-DNA transport and integration. *Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica* 32(6): 655–665.
- Zhao, J., Zhu, W.-H., Hu, Q., Guo, Y.-Q.,** (2000) Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock. *Biotechnology Letters* 22(15): 1227–1231.
- Zhao, J., Zhu, W.-H., Hu, Q.,** (2001a) Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Plant Growth Regulation* 33(1): 43–49.
- Zhao, J., Zhu, W.-H., Hu, Q.,** (2001b) Enhanced ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment: from shake-flask to 20-l airlift bioreactor. *Biotechnology Letters* 22(6): 509–514.

- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23(4): 283–333.
- Zhao, L., Sander, G.W., Shanks, J.V., (2013) Perspectives of the Metabolic Engineering of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Hairy Roots. In: Doran PM (ed.), *Biotechnology of Hairy Root Systems*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer Berlin Heidelberg, pp. 23–54. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2013_182 (accessed 16 November 2014).
- Zhou, C., Labbe, H., Sridha, S., Wang, L., Tian, L., Latoszek-Green, M., Yang, Z., Brown, D., Miki, B., Wu, K., (2004) Expression and function of HD2-type histone deacetylases in Arabidopsis development. *The Plant Journal* 38(5): 715–724.
- Zhou, M.-L., Zhu, X.-M., Shao, J.-R., Wu, Y.-M., Tang, Y.-X., (2010) Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(3): 737–750.
- Zhou, P., Yang, J., Zhu, J., He, S., Zhang, W., Yu, R., Zi, J., Song, L., Huang, X., (2015) Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(17): 7035–7045.
- Zhu, W., Yang, B., Komatsu, S., Lu, X., Li, X., Tian, J., (2015) Binary stress induces an increase in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Frontiers in Plant Science* 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4516820/> (accessed 21 October 2016).
- Zhu, X., Zeng, X., Sun, C., Chen, S., (2014) Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Frontiers of Medicine* 8(3): 285–293.
- Zhu, Y., Nam, J., Carpita, N.C., Matthyse, A.G., Gelvin, S.B., (2003) Agrobacterium-Mediated Root Transformation Is Inhibited by Mutation of an Arabidopsis Cellulose Synthase-Like Gene. *Plant Physiology* 133(3): 1000–1010.
- Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B., Rossi, L., (2001) Import of Agrobacterium T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *The Plant Cell* 13(2): 369–383.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., Müller-Röber, B., (1999) Ion channels in plant signaling. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 55(2): 183–203.
- Zupan, J.R., Citovsky, V., Zambryski, P., (1996) Agrobacterium VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(6): 2392–2397.
- Zutz, C., Bandian, D., Neumayer, B., Springer, F., Gorfer, M., Wagner, M., Strauss, J., Rychli, K., (2014) Fungi Treated with Small Chemicals Exhibit Increased Antimicrobial Activity against Facultative Bacterial and Yeast Pathogens. *BioMed Research International* 2014: e540292.

ANNEXES

ANNEXE 1: COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Composition du milieu de culture MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962)

Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1650
	K NO ₃	1900
	Mg SO ₄ ,7H ₂ O	440
	Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	370
	K H ₂ PO ₄	170
Microéléments	H ₃ BO ₃	6,20
	Mn SO ₄ , 4H ₂ O	22,30
	Zn SO ₄ , 4H ₂ O	8,60
	KI	0,83
	Na ₂ 2Mo O ₄ , 2H ₂ O	0,25
	Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,025
	CO Cl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Fer EDTA	Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27,85
	Na ₂ EDTA	37,25
Vitamines	Glycine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Thiamine HCl	0,1
	Myo inositol	100

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


































Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
	K NO ₃	2500
	Mg SO ₄ , 7H ₂ O	250
	Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	150
	Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
Microéléments	H ₃ BO ₃	3
	Mn SO ₄ , 4H ₂ O	10
	Zn SO ₄ , 4H ₂ O	2
	KI	0,75
	Na ₂ 2Mo O ₄ , 2H ₂ O	0,25
	Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,025
	CO Cl ₂ , 6H ₂ O	0,0125
Fer EDTA	Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27,85
	Na ₂ EDTA	37,25
Vitamines	Acide nicotinique	1
	Pyridoxine HCl	1
	Thiamine HCl	10
	Myo inositol	100

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





















Genomic DNA from plant

Protocol-at-a-glance (Rev. 09)

NucleoSpin® Plant II		Mini	Midi	Maxi		
1 Homogenize samples		100 mg		400 mg		1500 mg
2 Cell lysis		400 µL PL1 10 µL RNase A 65°C, 10 min	1.7 mL PL1 25 µL RNase A 65°C, 15 min	6 mL PL1 100 µL RNase A 65°C, 20 min	ALTERNATIVELY	
		300 µL PL2 10 µL RNase A 65°C, 10 min	1.5 mL PL2 25 µL RNase A 65°C, 15 min	5.3 mL PL2 100 µL RNase A 65°C, 20 min	ALTERNATIVELY	
		75 µL PL3 on ice, 5 min	200 µL PL3 on ice, 5 min	700 µL PL3 on ice, 5 min	ALTERNATIVELY	
3 Filtration / Clarification of lysate		 ≥11,000 x g, 2 min		 4,500 x g, 10 min		 4,500 x g, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions		450 µL PC	2.3 mL PC	10 mL PC		
5 Bind DNA		 ≥11,000 x g, 1 min		 4,500 x g, 2 min		 4,500 x g, 2 min
6 Wash and dry silica membrane		1st 400 µL PW1  ≥11,000 x g, 1 min	1st 1 mL PW1  4,500 x g, 2 min	1st 4 mL PW1  4,500 x g, 2 min		
		2nd 700 µL PW2  ≥11,000 x g, 1 min	2nd 3 mL PW2  4,500 x g, 2 min	2nd 10 mL PW2  4,500 x g, 2 min		
		3rd 200 µL PW2  ≥11,000 x g, 2 min	3rd 1 mL PW2  4,500 x g, 10 min	3rd 2 mL PW2  4,500 x g, 10 min		
7 Elute DNA		50 µL PE 65°C, 5 min  ≥11,000 x g, 1 min Repeat elution step		200 µL PE 65°C, 5 min  4,500 x g, 2 min Repeat elution step		1000 µL PE 65°C, 5 min  4,500 x g, 2 min Repeat elution step

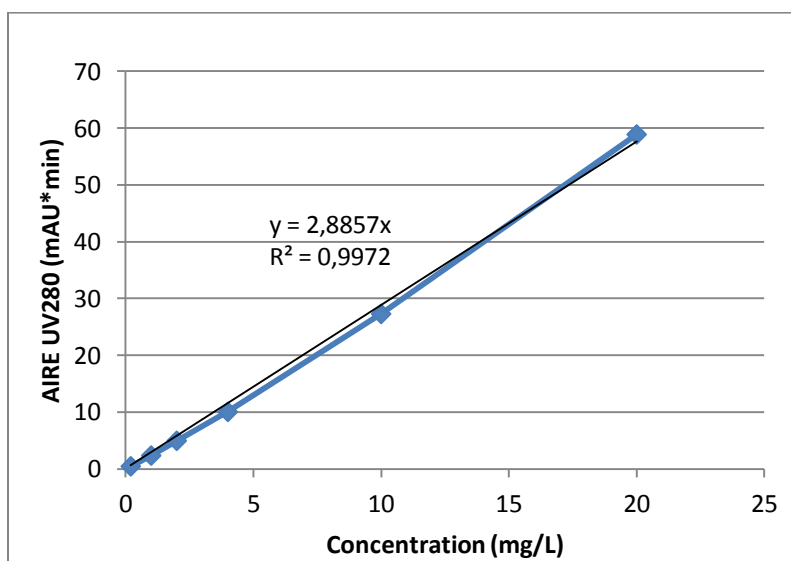
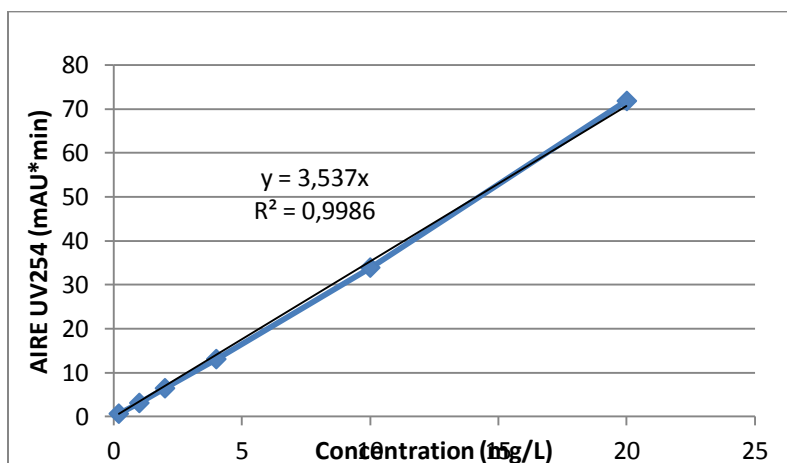
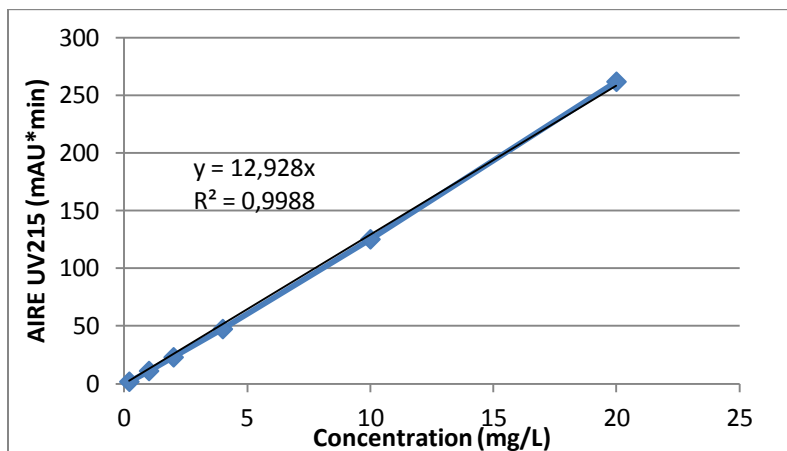
Plasmid DNA purification

Protocol-at-a-glance (Rev. 08)

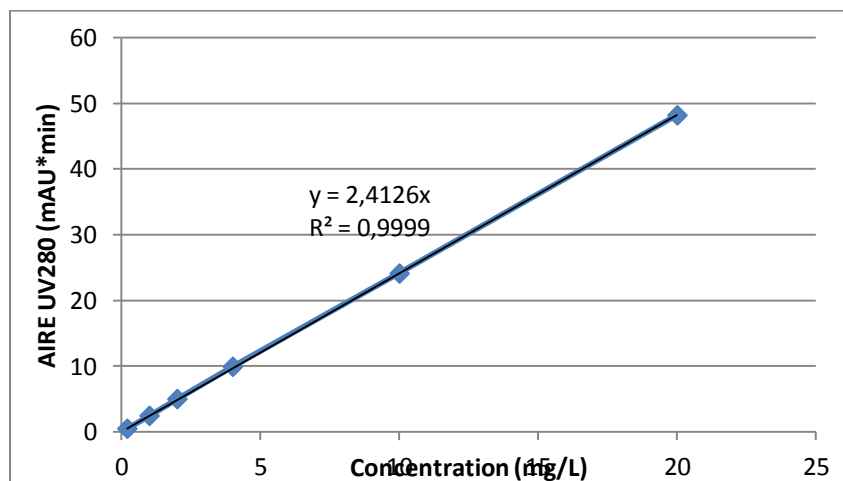
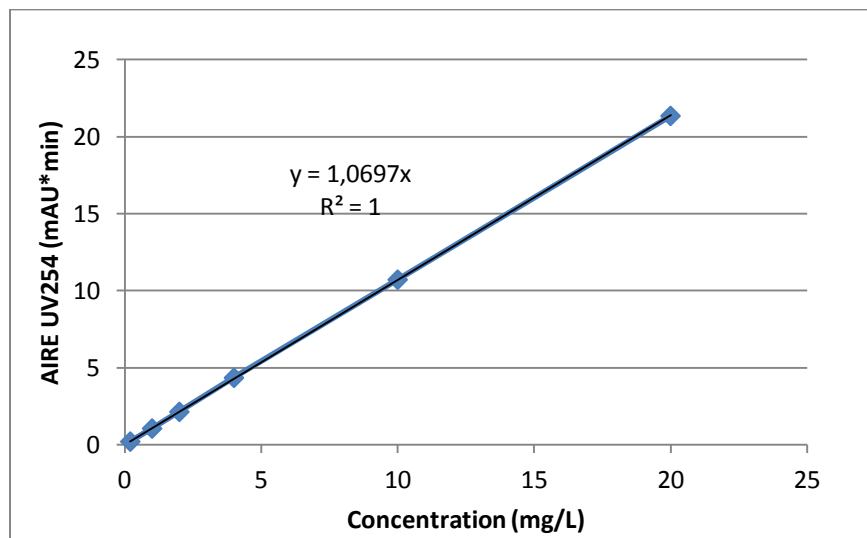
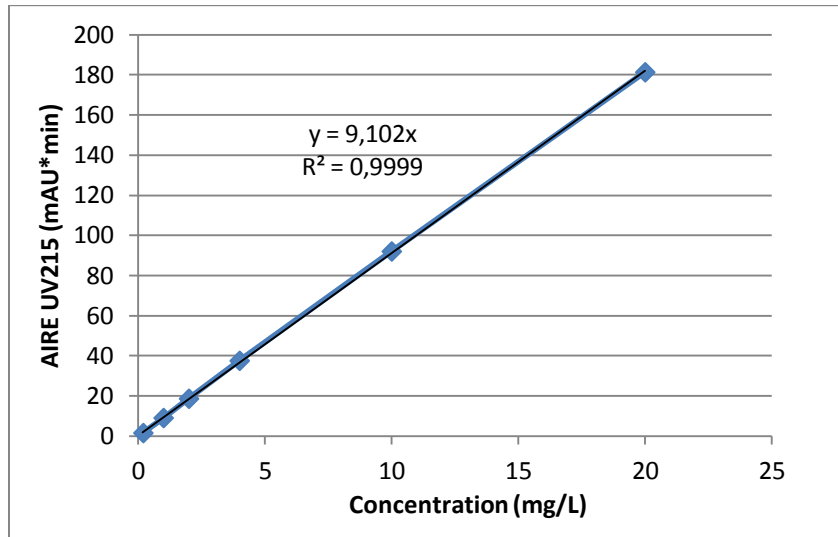
	NucleoSpin® Plasmid	NucleoSpin® Plasmid (NoLid)		NucleoSpin® Plasmid QuickPure
1 Cultivate and harvest bacterial cells			11,000 x g, 30 s	
2 Cell lysis			250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3	
3 Clarification of the lysate			11,000 x g, 5–10 min	
4 Bind DNA			Load supernatant 11,000 x g, 1 min	
5 Wash silica membrane			<i>(Optional: 500 µL Buffer AW: RT or 50 °C)</i> 600 µL Buffer A4 11,000 x g, 1 min	
6 Dry silica membrane			11,000 x g, 2 min	Drying is performed during centrifugation of the single washing step
7 Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min	

ANNEXE 2: COURBES D'ETALONNAGES

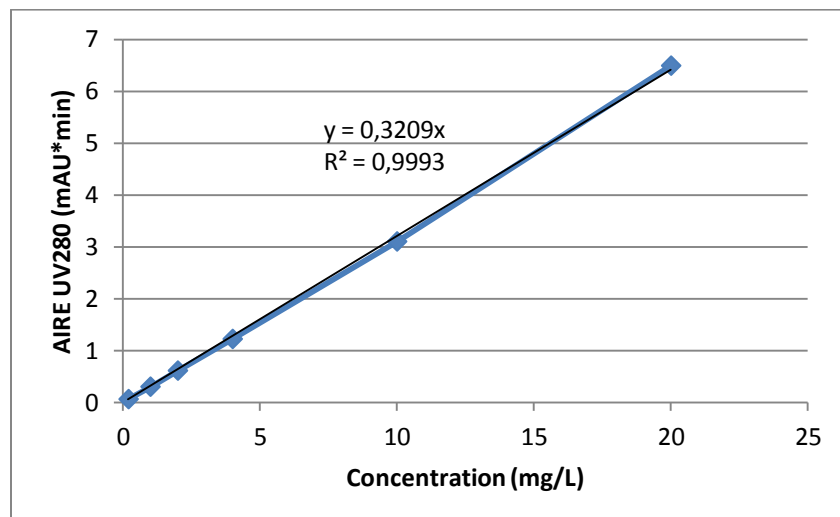
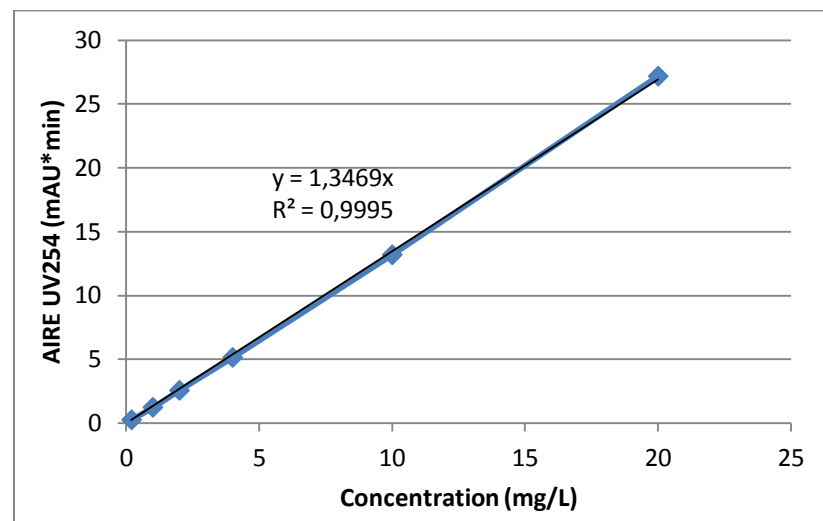
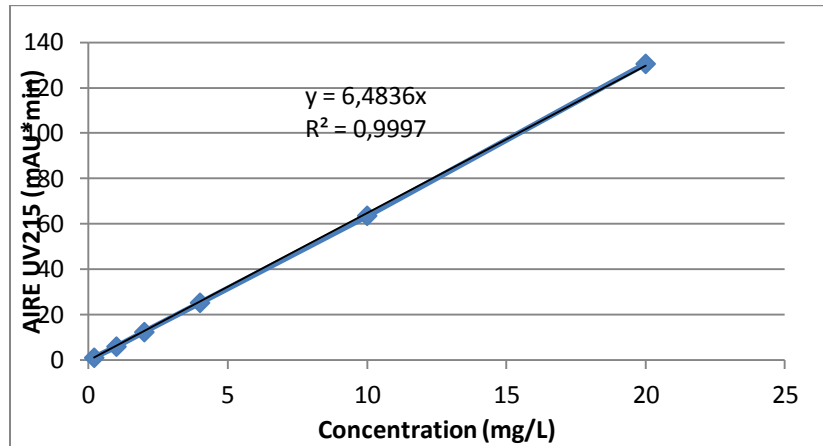
Ajmalicine



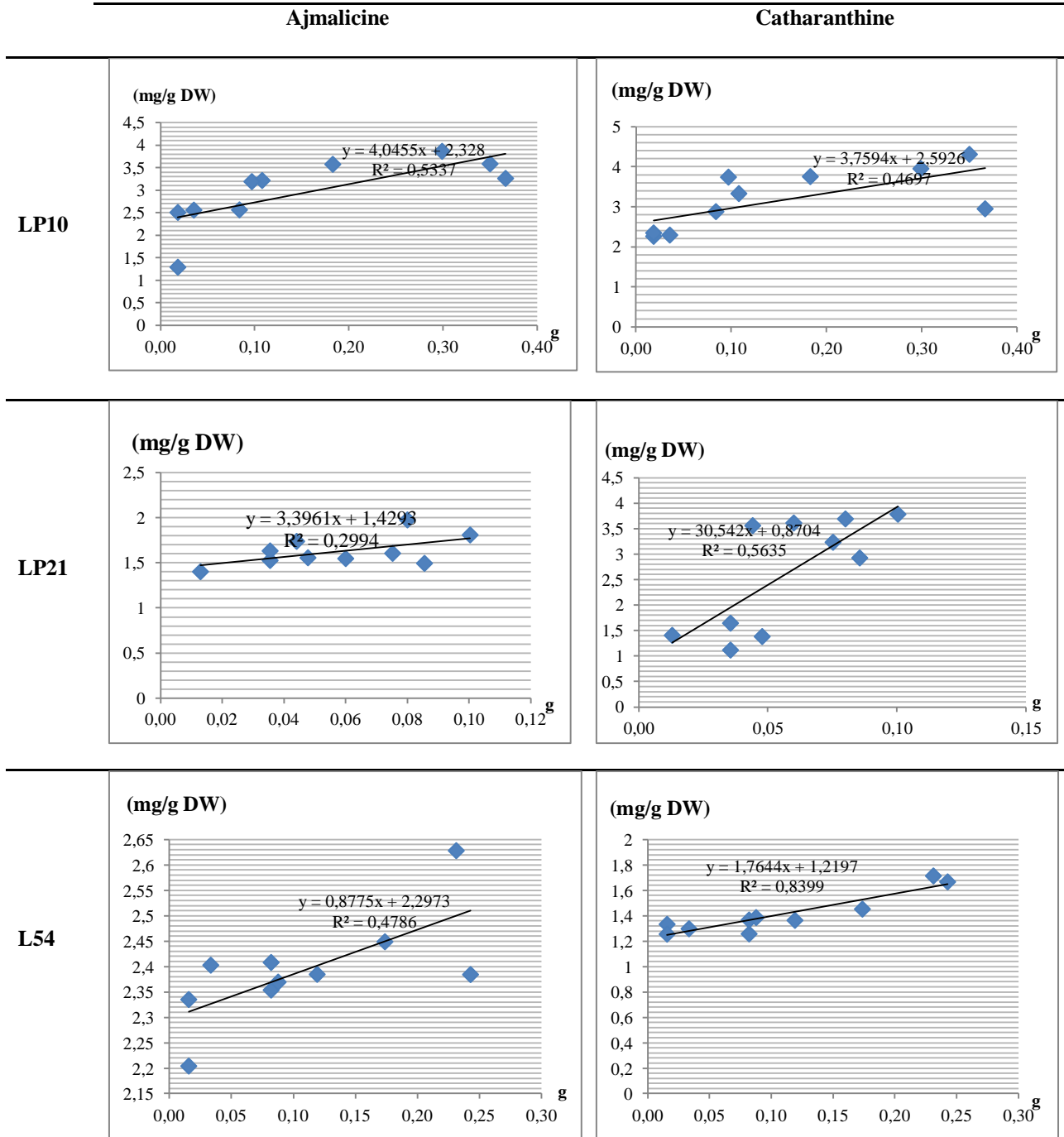
Catharanthine



Vindoline



**ANNEXE 3: Corrélations entre la biomasse et le contenu
en Alcaloides des CRs**



ANNEXE 4: ANALYSES STATISTIQUES (ANOVA)

Effet du temps de co-culture sur la fréquence d'induction des racines de *C. roseus*.

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	472,500	5	94,500	94,500	,000
Intragroupes	12,000	12	1,000		
Total	484,500	17			

Effet du type d'explant sur la fréquence d'induction des racines de *C. roseus*.

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	66181,515	17	3893,030	694,268	,000
Intragroupes	201,866	36	5,607		
Total	66383,381	53			

Effet du type d'explant sur le nombre de racines par explant

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	472,500	5	94,500	94,500	,000
Intragroupes	12,000	12	1,000		
Total	484,500	17			

Niveaux de corrélation entre la croissance de la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes dans les CRs de *C. roseus*.

		biomasse	Teneur en Ajmalicine
biomasse	Corrélation de Pearson	1	1,000**
	Sig. (bilatérale)		,000
	N	30	30
Teneur en Ajmalicine	Corrélation de Pearson	1,000**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	
	N	30	30

** . La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

		biomasse	Teneur en catharanthine
biomasse	Corrélation de Pearson	1	1,000**
	Sig. (bilatérale)		,000
	N	30	30
Teneur en Catharanthine	Corrélation de Pearson	1,000**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	
	N	30	30

** . La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

Elicitation des CRs

Elicitation par AS

Teneur en ajmalicine

LP10

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	201188,482	8	25148,560	254,104	,000
Intragroupes	1781,450	18	98,969		
Total	202969,932	26			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	55563,175	8	6945,397	37,986	,000
Intragroupes	3291,116	18	182,840		
Total	58854,291	26			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	97083,327	8	12135,416	94,355	,000
Intragroupes	2315,052	18	128,614		
Total	99398,378	26			

Elicitation par AS
Teneur en catharanthine

LP10

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	233484,477	8	29185,560	128,728	,000
Intragroupes	4081,024	18	226,724		
Total	237565,501	26			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	316484,454	8	39560,557	514,667	,000
Intragroupes	1383,594	18	76,866		
Total	317868,048	26			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	130509,509	8	16313,689	124,384	,000
Intragroupes	2360,813	18	131,156		
Total	132870,322	26			

Elicitation par CaCl₂
Teneur en ajmalicine

LP10

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	163815,064	6	27302,511	142,128	,000
Intragroupes	2689,371	14	192,098		
Total	166504,435	20			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	153397,186	6	25566,198	118,088	,000
Intragroupes	3031,013	14	216,501		
Total	156428,199	20			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	37606,449	6	6267,741	62,643	,000
Intragroupes	1400,769	14	100,055		
Total	39007,217	20			

Teneur en catharanthine**LP10**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	73716,529	6	12286,088	65,085	,000
Intragroupes	2642,786	14	188,770		
Total	76359,315	20			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	24873,154	6	4145,526	45,205	,000
Intragroupes	1283,864	14	91,705		
Total	26157,018	20			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	49313,766	6	8218,961	82,674	,000
Intragroupes	1391,791	14	99,414		
Total	50705,557	20			

Elicitation combinée par l'AS et le CaCl₂**Teneur en ajmalicine****LP10**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	293859,815	8	36732,477	504,896	,000
Intragroupes	1309,546	18	72,753		
Total	295169,362	26			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	40632,966	8	5079,121	45,079	,000
Intragroupes	2028,090	18	112,672		
Total	42661,056	26			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	151545,511	8	18943,189	253,573	,000
Intragroupes	1344,691	18	74,705		
Total	152890,202	26			

Teneur en catharanthine**LP10**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	189743,826	8	23717,978	205,470	,000
Intragroupes	2077,790	18	115,433		
Total	191821,616	26			

LP21

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	206320,174	8	25790,022	262,323	,000
Intragroupes	1769,652	18	98,314		
Total	208089,826	26			

L54

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	137726,953	8	17215,869	176,762	,000
Intragroupes	1753,126	18	97,396		
Total	139480,078	26			

1

2

3

4

5

Elicitation des pousses**Elicitation par AS****Teneur en ajmalicine**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	39379,388	4	9844,847	117,755	,000
Intragroupes	836,048	10	83,605		
Total	40215,436	14			

Teneur en catharanthine

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	39379,388	4	9844,847	117,755	,000
Intragroupes	836,048	10	83,605		
Total	40215,436	14			

Teneur en vindoline

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	38781,999	4	9695,500	91,969	,000
Intragroupes	1054,208	10	105,421		
Total	39836,207	14			

Elicitation par CaCl₂**Teneur en ajmalicine**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	19668,001	3	6556,000	45,838	,000
Intragroupes	1144,203	8	143,025		
Total	20812,204	11			

Teneur en catharanthine

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	2187,568	3	729,189	5,329	,026
Intragroupes	1094,667	8	136,833		
Total	3282,235	11			

Teneur en vindoline

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	109361,810	3	36453,937	364,946	,000
Intragroupes	799,109	8	99,889		
Total	110160,919	11			

Elicitation combinée par l'AS et le CaCl₂**Teneur en ajmalicine**

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	7161,467	4	1790,367	16,497	,000
Intragroupes	1085,276	10	108,528		
Total	8246,743	14			

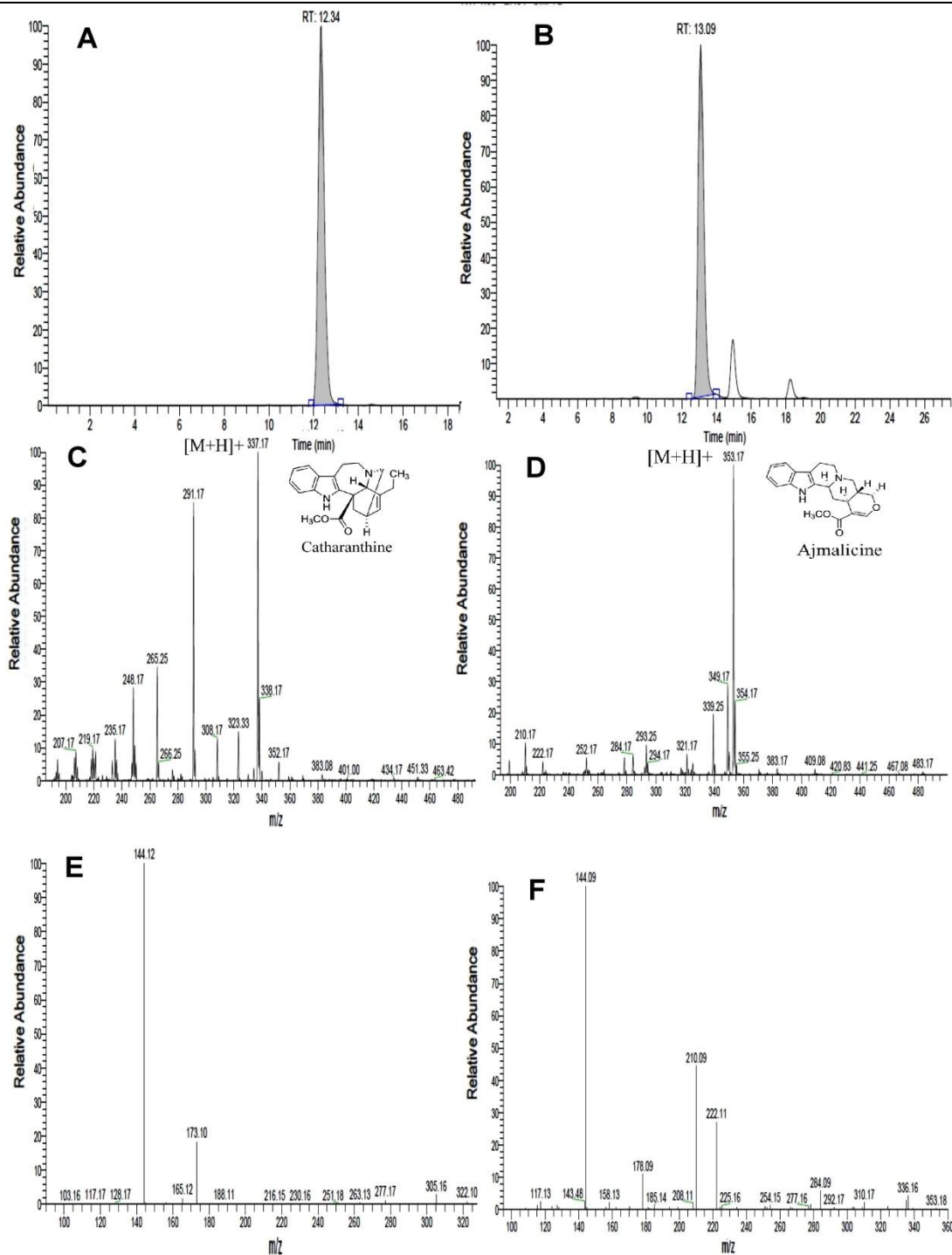
Teneur en catharanthine

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	35989,734	4	8997,433	38,788	,000
Intragroupes	2319,655	10	231,966		
Total	38309,389	14			

Teneur en vindoline

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	150465,502	4	37616,376	249,294	,000
Intragroupes	1508,916	10	150,892		
Total	151974,418	14			

ANNEXE 5: CHROMATOGRAMMES



LCMS / MS des alcaloïdes de l'extrait méthanolique des racines de *Catharanthus roseus*. A, B: chromatogramme d'ion unique (SIC) de catharanthine [M + H]⁺ ion parent (m / z = 143,50 à 144,50 + 172,50 à 173,50) et ajmalicine [M + H]⁺ ion parent (m / z = 143,50- 144,50 + 177,50-178,50 + 209,50-210,50 + 221,50-222,50), respectivement. C, D: Spectre MS de la catharanthine et de l'ajmalicine, respectivement. E, F: Spectre MS2 de la catharanthine et de l'ajmalicine, respectivement.

RESUMES

Résumé : La *Catharanthus roseus* (L.) G. Don a une valeur thérapeutique très importante grâce à ses alcaloïdes indoliques terpéniques (AITs). Cependant, les faibles rendements en ces alcaloïdes justifient le recours à l'utilisation des techniques des cultures *in vitro* et de la transgénèse végétale afin d'accroître leur production. Cela pour mettre à la disposition de l'industrie pharmaceutique un procédé de production de ces AITs (Ajmalicine, catharanthine et vindoline).

Le matériel végétal utilisé est obtenu par l'induction des pousses (Ps) et par l'établissement des cultures de chevelus racinaires (CRs). Afin d'optimiser la production de la biomasse et des AITs, différents éliciteurs sont utilisés (l'acide salicylique, le CaCl₂, la 5-azacytidine et la trichostatine). L'effet des ces éliciteurs est évalué par le poids sec et la teneur en AITs (après extraction, identification et dosage par LC-MS / MS).

Trois lignées de CRs sont sélectionnées (LP10, LP21 et L54) selon leur degré de ramification et leur bonne croissance. Aussi, une confirmation de leur nature transgénique par la détection de la présence d'un fragment du gène *rolB* par PCR, est réalisée. L'étude de la cinétique de croissance des Ps et des trois lignées sélectionnées de CRs a montré que l'accumulation importante des AITs coïncide avec la phase exponentielle prolongée de croissance de la biomasse.

L'élicitation des CRs par l'acide salicylique (AS) a permis d'avoir des améliorations très intéressantes des teneurs en ajmalicine et en catharanthine. La teneur en ajmalicine la plus élevée est obtenue avec la lignée LP10 (493,65 mg / 100 g M.S) traitée par 10⁻³ M d'AS pendant 24 heures. En outre, la teneur en catharanthine la plus élevée est enregistrée pour la lignée LP10 (568,29 mg / 100 g M.S) après 48 heures de contact avec 10⁻⁴ M d'AS. Par ailleurs, l'élicitation des pousses par l'AS a montré des améliorations importantes pour la teneur en ajmalicine (238,61 mg / 100 g M.S), en catharanthine (221,87 mg / 100 g M.S) et en vindoline (346,44 mg / 100 g M.S) après un temps de contact de 24 heures avec 10⁻⁶ et 10⁻⁵ M d'AS.

L'application de CaCl₂, a engendré des résultats moins intéressants par rapport à l'AS; chez les CRs et chez les Ps. Par contre, l'élicitation combinée par l'AS et le CaCl₂, a donné des résultats très intéressants. Pour les CRs, la lignée LP10 a enregistré les meilleures teneurs en ajmalicine (590,29 mg/ 100 g M.S) et en catharanthine (597,44 mg/ 100 g de M.S), soit une amélioration de la teneur en ajmalicine et en catharanthine de 82,55 % et 65,28 %, respectivement, après un traitement de 10⁻³ M d'AS et de 3 mM de CaCl₂. Chez les Ps, la teneur en vindoline (527,50 mg/ 100 g M.S) et en catharanthine (244,51 mg/100 g) ont été clairement améliorées après un traitement combiné de 10⁻⁵ M d'AS et de 5 mM de CaCl₂, soit une amélioration de 133,81 % et de 131,79 % par rapport au témoin expérimental.

Mots clés : Plante médicinale, *Catharanthus roseus* (L.) G, alcaloïdes indoliques terpéniques, micropropagation, chevelus racinaires transgéniques, PCR, éliciteurs, acide salicylique, CaCl₂, épigénétique, biomasse, LC-MS / MS, ajmalicine, catharanthine et vindoline.

Summary: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don has a very important therapeutic value due to its terpenoid indole alkaloids (TIAs). However, the low yields of these alkaloids justify the use of techniques of *in vitro* culture and plant transgenesis in order to increase their production. This is to provide the pharmaceutical industry a process for producing these for producing these TIAs (Ajmalicin, catharanthine and vindoline).

The plant material used is obtained by the induction of shoots and by establishment of hairy roots cultures (HRs). In order to optimize the production of biomass and TIAs, different elicitors are used (Salicylic acid, CaCl₂, 5-azacytidine and trichostatin). The effect of these elicitors is evaluated by the dry weight and the TIAs content (After extraction, identification and determination by LC-MS / MS).

Three lines of HRs were selected (LP10, LP21 and L54) according to their degree of branching and their good growth. Also, a confirmation of their transgenic nature by detection of the presence of a *rolB* gene fragment by PCR is performed. The study of the growth kinetics for shoots and for and the three selected lines of HRs showed that the large accumulation of TIAs coincides with the prolonged exponential growth phase of the biomass.

The elicitation of HRs by salicylic acid (SA) allowed to have a very interesting improvements contents of ajmalicine and catharanthine. The highest ajmalicine content is obtained with the LP10 line (493,65 mg / 100 g DW) treated with 10⁻³ M of SA during 24 hours. In addition, the highest catharanthine content is recorded for the LP10 line (568,29 mg / 100 g DW) after 48 hours contact with 10⁻⁴ M of SA. Moreover, shoot elicitation of shoots by SA showed significant improvements in the content of ajmalicine (238,61 mg / 100 g DW), catharanthine (221,87 mg / 100 g DW) and vindoline (34644 mg / 100 g DW) after a 24 hours contact time with 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M of SA.

The application of CaCl₂, has generated less interesting results compared to SA; in CRs and shoot. On the other hand, combined elicitation by SA and CaCl₂, gave a very interesting results of TIAs accumulation in HRs and shoots. For HRs, the LP10 line recorded the highest levels of ajmalicine (590,29 mg / 100g DW) and catharanthine (597,44 mg / 100g DW, which the improvement levels were about 82,55 % and 65,28 %, respectively, after a treatment of 10⁻³ M AS and 3 mM CaCl₂. In shoot culture the content of vindoline (527,50 mg / 100 g DW) and catharanthine (244,51 mg / 100g DW) was clearly improved after a combined treatment by 10⁻⁵ M of SA and 5 mM of CaCl₂, an improvement were about 133,81% and 131,79%, respectively, compared to the experimental control.

Key words: Medicinal plant, *Catharanthus roseus* (L.) G, terpenoid indole alkaloids, micropropagation, transgenic hairy roots, PCR, elicitors, salicylic acid, CaCl₂, epigenetic, biomass, ajmalicine, catharanthine and vindoline.

ملخص: يتميز نبات عناقية مدغشقر (*Catharanthus roseus*) بقيمة علاجية هامة جدا بفضل محتواه من القلويدات الإندولية التيريبينية. إن النسبة المنخفضة لهذه القلويدات في نبات *C. roseus* تبرر اللجوء إلى استخدام تقنيات الزراعة النسيجية وطرق الهندسة الوراثية لزيادة إنتاجها. وهذا من أجل تزويد الصناعة الصيدلانية بنظام نموذجي لإنتاج هذه المواد الأيضية (الأجمالسين، الكتاراننتين والفندولين)

تم الحصول على المادة النباتية عن طريق إستحثاث الفسائل الخضرية وإنشاء مزارع لشعيرات جذرية. استخدمت علاجات مختلفة (حمض الساليسيلك، $CaCl_2$ ، 5-أزاسيتيدين و تريكوساتين) من أجل تحسين تراكم الكتلة الحيوية وإنتاج القلويدات. قمنا بتقييم تأثير هذه العلاجات على أساس الوزن الجاف للمادة النباتية ومحتوياتها من القلويدات (بعد الاستخلاص، التحديد والقياس بجهاز LC-MS / MS).

تم انتقاء ثلاثة سلالات من الشعيرات الجذرية (LP10، LP21 و L54) على أساس درجة تفرعها ونموها الجيد. وتم التحقق من طبيعتها المعدلة وراثيا عن طريق الكشف عن وجود جزء من المورثة *roIB* بطريقة التفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR). أظهرت دراسة حركية النمو وتراكم القلويدات، بالنسبة لمزارع الفسائل وكذا بالنسبة للسلالات الجذرية المنتقاة، أن التراكم الكبير للقلويدات يتزامن مع مرحلة النمو الأسي المطولة للكتلة الحيوية.

إن معاملة الشعيرات الجذرية بواسطة حمض الساليسيلك (SA) يؤدي إلى تحسين محتوى الأجمالسين والكتاراننتين. حيث تم الحصول على أعلى مستوى للأجمالسين (493.65 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) من طرف السلالة LP10 وهذا بعد معاملها لمدة 24 ساعة ب 10^{-3} مول من ال SA. أما بالنسبة لأعلى محتوى للكتاراننتين (568.29 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) ، فإنه تم تسجيل كذلك مع السلالة LP10 بعد 48 ساعة من المعاملة ب 10^{-4} مول من ال SA. بالمقابل فإن معاملة الفسائل بحمض الساليسيلك أبدى تأثيرا كبيرا على مستويات الأجمالسين (238.61 ملغ / 100 غرام وزن الجاف)، الكتاراننتين (221.87 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) والفندولين (346.44 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) بعد 24 ساعات من المعالجة ب 10^{-5} و 10^{-6} مول من ال SA.

إن تطبيق $CaCl_2$ أعطى نتائج أقل أهمية مقارنة مع نتائج تطبيق SA، غير أن عند جمع المحفزين $CaCl_2$ و SA منح نتائج جد مهمة لتراكم القلويدات الإندولية في الفسائل والشعيرات الجذرية. بالنسبة لهذه الأخيرة، السلالة LP10 أظهرت أعلى مستويات الأجمالسين (590.29 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) والكتاراننتين (597.44 ملغ / 100 غرام وزن الجاف)، حيث نسبة التحسين تقدر ب 82.55% و 65.28%، على التوالي بعد معاملتها ب 10^{-3} من SA و 3 ميلي مول من $CaCl_2$. أما بالنسبة للفسائل، فإن محتوى الفندولين (527.50 ملغ / 100 غرام وزن الجاف) والكتاراننتين (244.51 ملغ / 100 غرام من وزن الجاف) تحسن بشكل واضح بعد العلاج المشترك ب 10^{-5} مول من SA و 5 ميلي مول $CaCl_2$ وهذا بنسبة 133.81% و 131.79% مقارنة مع الشاهد.

الكلمات المفتاحية: نبات طبي، *Catharanthus roseus* (L.) G، القلويدات الإندولية التيريبينية، التكاثر الدقيق، الشعيرات جذرية معدلة وراثيا، التفاعل البوليميراز المتسلسل، المحفزات، حمض الساليسيلك، $CaCl_2$ ، التخلق الوراثي، الكتلة الحيوية، LC-MS / MS، أجمالسين، كاتاراننتين والفندولين.

PUBLICATIONS

This is a refereed journal and all articles are professionally screened and reviewed

ORIGINAL ARTICLE

Micropropagation of *Catharanthus roseus* in order to produce Monoterpenoid Indole Alkaloids *in vitro*

Benyammi R., Khelifi-Slaoui M., Bakiri N., Harfi B., Khelifi L.

Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Algiers, Algeria.

ABSTRACT

The *Catharanthus roseus* produces monoterpenoid indole alkaloids, which have high therapeutic interest. The biotechnological approach with *in vitro* shoot cultures remains an alternative to the field culture of *Catharanthus roseus* for the production of such compounds. In this investigation, *Catharanthus roseus* shoot were induced from a cotyledons of seedlings, on semisolid MS containing various concentrations of 6-benzyladenine (BA) : 1.0, 1.5 or 2mg/L. The concentration of 2 mg BA/L enhanced a shoot formation (7 shoots / explant). After shoot formation, liquid cultures are induced by transferring clusters into MS liquid media. Shoots showed a quick proliferation and biomass accumulation during a culture cycle (34 days). Maximal biomass values were reached around day 22 of the culture cycle.

Key words: *Catharanthus roseus*, *in vitro*, shoot cultures, monoterpenoid indole alkaloids, 6-benzyladenine

Introduction

The Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) is an important source of terpenoid indole alkaloids. Currently, this group includes about 200 different alkaloids[12]. Any other plant species is reported to produce such a large number of complex alkaloids[1]. The leaves of *Catharanthus roseus* are the sole source of bisindole alkaloids antineoplastics, vinblastine and vincristine, which are formed by the condensation of vindoline and catharanthine subunits[11,8]. A production of these bisindole alkaloids is related to the cell organization found in the leaves[10]. Therefore, the *in vitro* shoot cultures have been proposed as an adequate system to produce these alkaloids[5].

In order to generate the plant material required to produce the monoterpenoid indole alkaloids, several concentrations of cytokinin were tested to select the optimal concentration for induction and

multiplication of shoots. On the other hand, the evaluation of the biomass accumulation in shoot during a culture cycle was carried out to define the different phases of growth.

Materials and methods

Establishment of the shoot culture

Induction and multiplication of shoots

Immature seeds of *Catharanthus roseus* are disinfected by a passage in 70% ethanol for 5 min, then in sodium hypochlorite 3% for 20 minutes, and rinsed three times with sterile distilled water[3]. Seeds were germinated in test tubes containing 20 ml of semisolid MS media[7] without growth regulators. Test tubes should be kept in the dark and at a temperature of 25 ° C for 5 days. The etiolated seedlings are exposed to continuous light for 4 days.

Corresponding Author

Benyammi R., Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Algiers, Algeria.
E-mail: benyammiroukia@yahoo.fr

Rootless seedlings were placed in 250-ml flask, containing semisolid MS media, supplemented with 3% sucrose and different concentrations of 6-benzyladenine (1.0, 1.5 and 2 mg/L). Cultures are incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 16 h photoperiod. After 3 weeks, shoots formed from seedling were excised, and individually used as explants. Then they are transferred on the semisolid MS media with BA (1.0, 1.5 and 2 mg /L).

Kinetics of growth

To study the kinetics of growth, clusters of 40 days are transferred to 500-ml flasks containing 100 ml of liquid MS media with 2 mg / L BA and 30 g of sucrose. Flasks are maintained at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 16 h photoperiod on a rotary shaker set at 80 rpm. After 6 days of culture, fresh weight and dry weight of clusters are evaluated at different points through out a culture cycle. Drying is performed at 60°C for 48 hours.

Results and discussion

Establishment of the shoot culture

The average time of appearance of the first shoots is 5 days for the concentration of 2 mg/L. whereas; the average time is 3.6 and 4.3 days respectively for concentrations 1 and 1.5 mg/l BA (Table 1). The results showed the influence of the concentration of BA on the induction rate of

shoots. The highest rate (91.66%) is obtained with the concentration 2 mg/L (Table 1).

After 3 weeks of culture, the average number of shoots formed per explant was 8.6 for the concentration 2 mg /L BA. However, for concentrations 1 and 1.5 mg/L BA the average number of shoots is limited to 4 and 6 shoots per explant, respectively. Hernandez *et al.* [2] recorded at the *Catharanthus roseus* an interesting result with an average induction of eight shoots per explant after 3 weeks of culture. The positive effect of 6-benzyladenine result from control Carried on by this substance on cell division, buds development, initiation and growth of shoots[6].

The shoots cultured with different concentrations of BA did not form callus tissue. Thus, the concentration of 2mg/L BA was chosen as optimal for multiplication on liquid and semisolid media.

Kinetics of growth

The shoots transferred on the liquid media (Fig.2a) showed a proliferation and an accumulation of the biomass in a continuous way between the 6th and the 22nd day of culture. Indeed, the kinetics of growth (Fig. 1) shows an important phase of accumulation of the biomass reaching a FW of 19.62 g in the 22nd day (Fig.1 and Fig. 2b).

The multiplication of shoots in liquid media to enhance biomass was reported for other species, such as *Camelia sinensis*[9], *Drosera anglica* and *D. binata* [5]. This improvement would be due to immersion of shoots in liquid media which facilitate the adsorption of nutrients and growth regulators.

Table 1: Effect of different concentrations of 6-benzyladenine on the formation of shoots.

Concentration of BA (mg / L)	Number of explants cultured	The average time of appearance of the first shoots	Induction rate of shoots	Average number of shoots / explant after 3 wk of culture
0	10	3	30.33%	1.8±0.63
1	10	3.6	69.23%	4±0.66
1.5	10	4.3	90.47%	6±1.06
2	10	5	91.66%	8.6±1.17

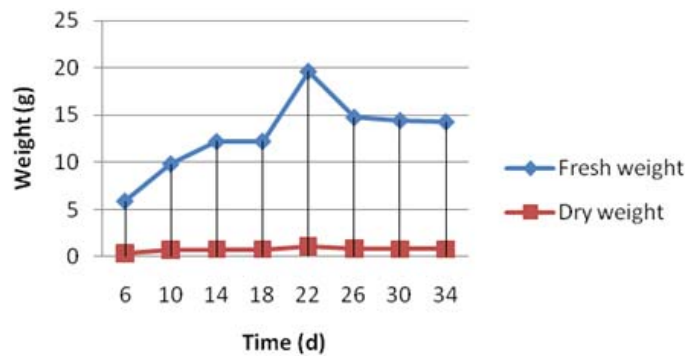


Fig. 1: Evolution of the biomass accumulation in shoots during a 34-d culture cycle in liquid media.

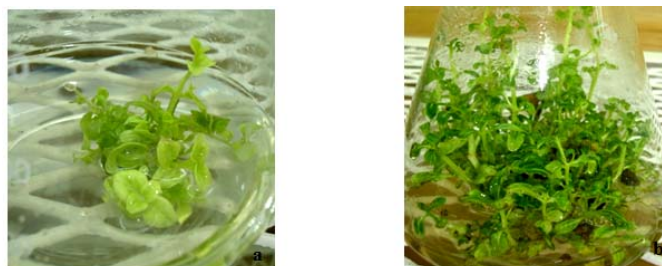


Fig. 2: Appearance of shoots of *Catharanthus roseus* on MS liquid media with 2mg /L BA a: shoots at first day of culture, b: shoots proliferation after 22-d of culture

Conclusion

Our study shows that the excised cotyledons cultured on MS media supplemented with 2m /L BA react favorably to the induction, the proliferation and the development of shoots of *Catharanthus roseus*. Consequently, this dose could be chosen for the propagation of shoots in liquid media. The assessment of biomass is an important parameter to determine the exponential phase of growth during the culture cycle. This phase is especially suitable for optimizing the production of monoterpenoid and terpenoids indole alkaloids by elicitation.

References

- Blasko, G. and G.A. Cordell, 1990. Isolation, structure elucidation, and biosynthesis of the bisindole alkaloids of *Catharanthus*. In Brossi A and Suffness M (Eds.). The alkaloids. Academic press, San Diego, CA., pp: 1-76.
- Hernández-Domínguez, E., F. Campos-Tamayo, M. Carrillo-Pech, F. Vázquez-Flota, 2006. *Catharanthus roseus* shoot cultures for the production of monoterpenoid indole alkaloids. In: Methods in Molecular Biology. 2nd Eds., Loyola-Vargas V M and Vázquez-Flota F. Humana Press, New Jersey, pp: 349-355.
- Hernández-Domínguez, E., F. Campos-Tamayo, F. Vázquez-Flota, 2004. Vindoline synthesis in vitro shoot cultures of *Catharanthus roseus*; Biotechnology Letters, 26: 671-674.
- Kawiak, A., A. Królicka, E. Łojkowska, 2003. Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips, Plant Cell Tissue Organ Culture, 75: 175-178.
- Krueger, R.J., D.P. Carew, J.H.C. Lui, E.J. Staba, 1982. Initiation, maintenance and alkaloid content of *Catharanthus roseus* leaf organ cultures. Planta Medica, 45: 56-57.
- Mok, D.W.S., M.C. Mok, 2001. Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 52: 89-118.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962. A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology, 15: 473-497.
- Neuss, N., 1980. The spectrum of biological activities of indole alkaloids. In Phillipson JD and Zenk MH (Eds.). Indole and biogenetically related alkaloids (Academic Press, London), pp: 293-313.
- Sandal, I., A. Bhattarchaya, P.S. Ahuja, 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation, Plant Cell Tissue Organ Culture, 65: 75-80.
- St-Pierre, B., F.A. Vazquez-Flota, V. De Luca, 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. The Plant Cell., 11: 887-900.
- Svoboda, G.H., D.A. Blake, 1975. The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L) G. Don. In Taylor WI and Farnsworth NR (Eds.). The *Catharanthus* alkaloids. Marcel Dekker, New York, NY., pp: 45-83.
- Van Der Heijden, R., D.I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, R. Verpoorte, 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry, 11(5): 607-28.



Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots

Roukia Benyammi, Cédric Paris, Majda Khelifi-Slaoui, Djamila Zaoui, Ouarda Belabbassi, Nouara Bakiri, Myassa Meriem Aci, Boualem Harfi, Sonia Malik, Abdullah Makhzoum, Stéphane Desobry & Lakhdar Khelifi

To cite this article: Roukia Benyammi, Cédric Paris, Majda Khelifi-Slaoui, Djamila Zaoui, Ouarda Belabbassi, Nouara Bakiri, Myassa Meriem Aci, Boualem Harfi, Sonia Malik, Abdullah Makhzoum, Stéphane Desobry & Lakhdar Khelifi (2016): Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots, *Pharmaceutical Biology*

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2016.1140213>



Published online: 17 Mar 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots

Roukia Benyammi^a, Cédric Paris^b, Majda Khelifi-Slaoui^a, Djamila Zaoui^a, Ouarda Belabbassi^a, Nouara Bakiri^a, Myassa Meriem Aci^a, Boualem Harfi^a, Sonia Malik^c, Abdullah Makhzoum^d, Stéphane Desobry^b and Lakhdar Khelifi^a

^aLRGB, ENSA (ES1603), Algiers, Algeria; ^bLIBio, Université De Lorraine – ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ^cHealth Sciences Graduate Program, Biological and Health Sciences Centre, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil; ^dDepartment of Biology, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

ABSTRACT

Context *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) is still one of the most important sources of terpene indole alkaloids including anticancer and hypertensive drugs as vincristine and vinblastine. These final compounds have complex pathway and many enzymes are involved in their biosynthesis. Indeed, ajmalicine and catharanthine are important precursors their increase can lead to enhance levels of molecules of interest.

Objective This study aims at selecting the highest yield of hairy root line(s) and at identifying best times for further treatments. We study kinetics growth and alkaloids (ajmalicine and catharanthine) accumulation of three selected hairy root lines during the culture cycle in order to determine the relationship between biomass production and alkaloids accumulation.

Materials and methods Comparative analysis has been carried out on three selected lines of *Catharanthus roseus* hairy roots (LP10, LP21 and L54) for their kinetics of growth and the accumulation of ajmalicine and catharanthine, throughout a 35-day culture cycle. The methanolic extract for each line in different times during culture cycle is analyzed using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Results Maximum accumulation of the alkaloids is recorded for LP10 line in which the peak of ajmalicine and catharanthine accumulation reached to 3.8 and 4.3 mg/g dry weight (DW), respectively. This increase coincides with an exponential growth phase.

Discussion and conclusion Our results suggest that the evolution of accumulation of ajmalicine and catharanthine are positively correlated with the development of the biomass growth. Significantly, for LP10 line the most promising line to continue optimizing the production of TIAs. Additionally, the end of exponential phase remains the best period for elicitor stimuli.

ARTICLE HISTORY

Received 20 August 2015
Accepted 6 January 2016
Revised 19 December 2015
Published online 10 March 2016

KEYWORDS

Agrobacterium rhizogenes; growth kinetics; medicinal plant; secondary metabolites; terpene indole alkaloids

Introduction

Catharanthus roseus (L.) G. Don (Apocynaceae) is an important medicinal and ornamental plant. Its therapeutic benefit (value) is due to the presence of terpenoid indole alkaloids (TIAs), such as antihypertensive, ajmalicine and serpentine, and antitumoural alkaloids, vincristine and vinblastine, which have been used in chemotherapy since 1960s (van Der Heijden et al. 2004; Fernández-Pérez et al. 2013). The great pharmacological importance of vinblastine and vincristine is related with their low availability in *C. roseus*. A total of 1000 kg of dry leaves is required to produce 1 g of both of these alkaloids (Noble 1990). This presents a serious challenge to improve the performance and reduce the unit cost. Recently, it has been shown that vinblastine and

vincristine can be semi-synthesized by using catharanthine and vindoline as precursors (Ishikawa et al. 2009).

For several years, plant tissue culture has been considered as a promising biotechnological approach to improve the secondary metabolites production (Malik et al. 2011, 2014). Organized cultures, especially transgenic hairy root cultures induced by *Agrobacterium rhizogenes*, represent a reliable alternative to undifferentiated tissue cultures, such as cell suspensions, for the production of valuable secondary metabolites (Mujib et al. 2012; Malik et al. 2016). The greatest advantage of hairy roots lies in their genotypic and biochemical stability as well as fast growth in hormone-free medium

(Baíza et al. 1999; Giri & Narasu 2000; Georgiev et al. 2007; Makhzoum et al. 2013). In *C. roseus*, hairy roots have been reported to produce a high level of mono-terpenoid indole alkaloids, mainly catharanthine, serpentine and ajmalicine (Vázquez-Flota et al. 1994; Moreno-Valenzuela et al. 2003; Batra et al. 2004). However, there is a lack of vindoline due to the absence of chloroplasts in the roots. Hence, neither vincristine nor vinblastin can be found in the roots of *C. roseus* (Ferrerres et al. 2010).

In this paper, we report the induction and the establishment of different hairy root lines in *C. roseus* by using *A. rhizogenes*. Subsequently, the growth kinetics and accumulation of two monoterpenoid indole alkaloids (ajmalicine and catharanthine) of the three selected hairy root lines were measured. The objective was to determine the relationship between biomass production and alkaloids accumulation for choosing the high-performance line. In addition, our work also helps in identifying the ideal time to apply the elicitors' treatment in the following steps of our research.

Materials and methods

Plant materials

Two cultivars of *C. roseus* (Cooler lilac and Cooler blush) were selected for genetic transformation assays. To establish aseptic cultures, seeds were disinfected with ethanol (75%, w/v) for 30 s, followed by a treatment with sodium hypochlorite (12%, w/v) for 10 min. The disinfected seeds were then rinsed three times with sterile distilled water before inoculating in test tubes containing 20 mL of Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige & Skoog 1962) supplemented with 30 g/L sucrose and 5.5 g/L agar. Test tubes were kept in dark for 5 d at 25 °C and then the etiolated seedlings were exposed to continuous light for 4 d. The 9-d old seedlings were placed on MS medium supplemented with 2 mg/L benzyl amino purine (BAP). Cultures are incubated at 25 ± 2 °C under a 16 h photoperiod. After 3 weeks, shoots obtained from seedlings were excised and used as explants for transformation studies.

Bacterial strains and culture conditions

Agrobacterium rhizogenes wild-type strains AR15834 and A4 were used to induce hairy roots in *C. roseus*. *Agrobacterium* strains were cultured for 2 d on yeast extract mannitol (YEM) medium (Wise et al. 2006) with 15 g/L agar and incubated at 28 °C under dark conditions. The bacterial cultures growing in YEM liquid

medium at 28 °C for 72 h (with OD₆₀₀ nm – 0.6–0.8) were used for transformation.

Induction and establishment of hairy root cultures

The buds of 3-week-old micro-propagated shoots were wounded and immersed into the bacterial suspension and incubated for 30 min. Shoots were then blotted dry using sterile filter paper. Infected explants were transferred on MS medium and co-cultivated for 2 and 3 d. But, the other part is directly transferred onto half strength B5 medium and used as the control (Gamborg et al. 1968) supplemented with 30 g/L sucrose, 8 g/L agar and 400 mg/L cefotaxime, without passing through the co-culture period. The inoculated explants showing hairy root induction were subcultured two times at 15-d intervals on half-strength B5 semi-solid medium, containing 5.5 g/L agar and 400 mg/L cefotaxime to eliminate the bacteria. After 2-weeks, at the last subculture, hairy root induction frequency was evaluated and expressed as the number of explants with hairy root/the number of the infected explants × 100. The emerging hairy roots were cut (length higher than 2.5 cm) and transferred onto semi-solid half strength B5 medium supplemented with 250 mg/L of cefotaxime. The antibiotic concentration was gradually lowered and finally removed completely after 3 months. All the cultures were maintained in complete darkness at 25 ± 2 °C.

Selection of hairy root lines and liquid adaptation

The selection of hairy root lines was done after the passage of regenerated roots on half strength B5 semi-solid medium without antibiotic. The hairy root lines characterized by a better growth and proliferation after 15 d of culture were selected and sub-cultured in half strength B5 liquid medium. Approximately, 4–5 root tips (4–5 cm of length) for each line were collected from solid culture and transferred in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid B5/2 medium without cefotaxime. The cultures were incubated in orbital shaker set at 100 rpm and 25 ± 2 °C under dark conditions. After 20 d of liquid culture, the growth index was calculated for each line using the following formula:

$$\text{Growth index (GI)} = \frac{\text{fresh weight (after 20 days of culture)}}{\text{inoculum fresh weight}}$$

PCR analysis

The transgenic nature of hairy roots was confirmed by detecting the presence of *rolB* gene by PCR amplification

using the specific primers (F: 5'-GCG ACA ACG ATT CAA CCA TAT CG-3', and R: 5'-TTT ACT GCA GCA GGC TTC ATG AC-3'). Total DNA was isolated from transformed and non-transformed roots using NucleoSpin DNA Plant Mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Plasmid DNA isolated from *A. rhizogenes* cells (strains AR15834 and A4) was used as a positive control. The Ri plasmid was isolated with an alkaline lysis Miniprep. PCR amplification was carried out in a 20 μ L reaction volume containing 2 μ L DNA solution, 0.8 μ L of each primer (forward and reverse), 2 μ L of 10 \times Taq polymerase buffer, 0.4 μ L dNTP mix and 0.4 μ L of Taq DNA polymerase. PCR reaction was performed at an initial denaturing temperature of 94 $^{\circ}$ C for 4 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, annealing at 57 $^{\circ}$ C for 1 min and extension at 72 $^{\circ}$ C for 1 min and ended with a final extension of 72 $^{\circ}$ C for 7 min. The PCR products were separated using electrophoresis on 1.2% agarose gel including DNA marker and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Growth kinetics of selected hairy root lines

The three best lines of hairy roots showing good growth on liquid medium were selected to study the biomass growth kinetics and alkaloids accumulation. About 200 mg fresh weight (approximately five root tips of 4–5 cm) of each hairy root line (20-d-old) maintained onto B5/2 semi-solid medium, was collected and inoculated into 50 mL of liquid B5/2 medium in 250 mL Erlenmeyer flasks. The cultures were kept on shaker (set at 100 rpm) in a growth chamber under dark conditions at 25 \pm 2 $^{\circ}$ C. After 8 d of culture, the hairy roots were harvested after every third day during 35 d of culture, and their dry weight were recorded. The harvested roots were dried in an incubator (60 $^{\circ}$ C, for 48 h), and then used later for extraction and determination of alkaloids content.

Extraction and analysis of alkaloids

Alkaloids extraction from the dry plant biomass was carried out according to protocol given by Guirimand et al. (2010). Dry hairy roots (25 mg) were taken for alkaloids extraction. Catharanthine and ajmalicine were identified and quantified using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). LC-MS/MS analysis was performed on a C18 column (150 mm \times 2.1 mm and 5 μ m porosity – Alltima, Alltech, Saint Jean de Gonville, France) with a flow rate of 0.2 mL/min at a constant temperature of 25 $^{\circ}$ C. The mobile phase made up of eluent A (0.1% formic acid in water) and eluent B

(0.1% formic acid in methanol) in the following gradient program: 30% B for 30 min, 80% B at 30 min, 98% B at 30.1 min until 5 min and 30% B at 35.1 min until 6 min. The compounds of interest were identified through specific MS2 scans in the addition of MS full scan (50–1000 m/z). Then, they were quantified according UV absorption at 254 nm and retention times of reference which are obtained based on authentic standards of ajmalicine and catharanthine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific, Waltham, MA).

Statistical analyses

The statistical analyses were performed by one-way ANOVA and completed with the Tukey *post hoc* test. The correlation between biomass growth and ajmalicine and/or catharanthine contents in hairy root lines was determined and quantified by correlation factor. The difference between samples was considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

Induction of *C. roseus* hairy roots

Putative transformants were obtained by co-culturing the explants with *A. rhizogenes* for 0–3 d. After 12 d of culture (Table 1), the hairy root started appearing from wounded sites of explants co-cultured for 3 d with both the bacterial strains (Figure 1A and B), while in other explants co-cultured for 0 and 2 d, the hairy root appeared after more than 12 d. The increase in the co-culture period ensures the rapid transformation of cells infected by the bacteria, which allowed the induction of hairy roots within less time (Rai et al. 2012). Both the *A. rhizogenes* strains used in our study showed a good transformation frequency (Table 1). The strain AR15834 was most efficient for Cooler blush showing 91% of transformation frequency. For Cooler lilac, the strain A4 was more active than AR15834 in inducing the hairy root (81% of root induction). Earlier report on co-cultivation of *C. roseus* explants with strain A4 showed an induction rate of 52% (Batra et al. 2004), which is less than our results. The transformation efficiency is affected by plant genotype, bacterial strain as well as type of explant. The agropine strains are the most virulent of *A. rhizogenes* for the hairy root induction (Batra et al. 2004; Tao & Li 2006). The choice of buds as the type of explants in our research was due to the efficient transformation of meristem regions by *A. rhizogenes* as reported earlier by Makhzoum et al. (2015).

The statistical analysis demonstrates a significant effect ($p < 0.05$) of co-culture time on the induction frequency that increased progressively with the increase in co-culture period particularly with the AR 15834 strain. Indeed, the frequency of root induction reached 90 and 100% for Cooler lilac and Cooler blush, respectively, in case of 3-d co-culture period. The effect of co-culture period on induction frequency is highly significant in the cultivar cooler blush, which showed an increase of 20% and 25% of root induction on explants with strains A4 and AR15834, respectively.

On the other hand, the co-culture period showed a strongly significant effect on the number of induced hairy roots per explant (Table 1). Indeed, this number increased two times as compared to the non-infected explants. The best results were recorded for Cooler lilac co-cultured for 3 d with strain A4 (an average of 10.27 hairy roots per explants; Table 1), showing that period of co-culture was a very important step in the transformation by *A. rhizogenes*. This step ensures the attachment of bacteria, and then the transfer and integration of T-DNA in the plant genome (Herath et al. 2005).

Genetic transformation for some recalcitrant plant species can be achieved *in vitro* by co-cultivating *A. rhizogenes* with wounded tissue (Makhzoum et al. 2011). Our research showed that the period of co-culture was very important in order to complete the transformation process and enhancing the induction frequency, especially for cooler blush cultivar. Our studies are consistent with several studies on *C. roseus*, which have confirmed the effect of co-culture period (Choi et al. 2004; Taneja et al. 2010; Wang et al. 2012).

Selection of efficient hairy root lines

Among the 1229 hairy root lines induced in two cultivars, 40 hairy root lines were selected on the basis of their degree of lateral ramification and without callus

formation. After 15 d of culture on B5/2 semi-solid medium; 10 efficient lines (line for each cultivar) were selected for their good biomass growth and high ramification degree. There was considerable variability in the morphology and growth patterns of each individual hairy root lines, which can be explained by the fact that each root clone was resulting from an independent transformation event (Batra et al. 2004). This genetic variation in hairy root lines could possibly be due to the various modes of expression of *Ri* bacterium genes according to their integration place, number of copies and the sense of insertion in the plant genome (Chandra 2012).

In order to determine the ability to adapt and potential productivity of selected lines in terms of biomass, the hairy root lines were cultured on liquid medium. After 20 d of culture, the established hairy root cultures increased in biomass between 2 and 24 times of the initial inoculums. Three lines L54, LP10 and LP21 (Figure 1C, D and E) were selected on the basis of their high biomass production (Table 2). Among three selected lines, the fastest growing line was LP10, which showed 24.48 times increase in biomass production as compared with control. Other studies in *C. roseus* have observed that hairy root growth rate increased 20 times compared with the initial inoculums in a period of 30 d (Ciau-Uitz et al. 1994). The potential of biomass production was found to be dependent on hairy root line and its adaptation to liquid medium (Toivonen et al. 1989; Hughes et al. 2004). Taneja et al. (2010) also suggested that the variation in growth rate of hairy root lines was largely influenced by the site of integration of T-DNA at certain loci of host genome.

Confirmation of transgenic hairy root lines

PCR results (Figure 2) revealed the presence of a single PCR band corresponding to the *rolB* gene in the three

Table 1. Response of explants of *C. roseus* cultivars infected with *Agrobacterium rhizogenes* strains A4 and AR15834 after different co-cultured period.

Cultivars	Bacterial strain	Periods of co-culture: explants-bacteria (days)	Hairy root induction (%)	Number of roots per explants	Average time for the appearance of the first root (days)
Cooler lilac	A4	0	78.57	4.5 ^H	14.23
		2	83.33	5.41 ^F	12.5
		3	83.33	10.27 ^A	11.94
	AR15834	0	55.5	4 ^I	17.22
		2	89.5	5.6 ^F	15.46
		3	90.0	8 ^D	12.55
Cooler blush	A4	0	37.5	1.44 ^J	16.13
		2	50.0	4.77 ^G	14.23
		3	58.33	8.29 ^C	11.82
	AR15834	0	75.0	4.83 ^G	15.11
		2	95.0	6.08 ^E	14.5
		3	100	9.55 ^B	12.03

Letters (A–J) indicate the homogenous groups (Tukey test).

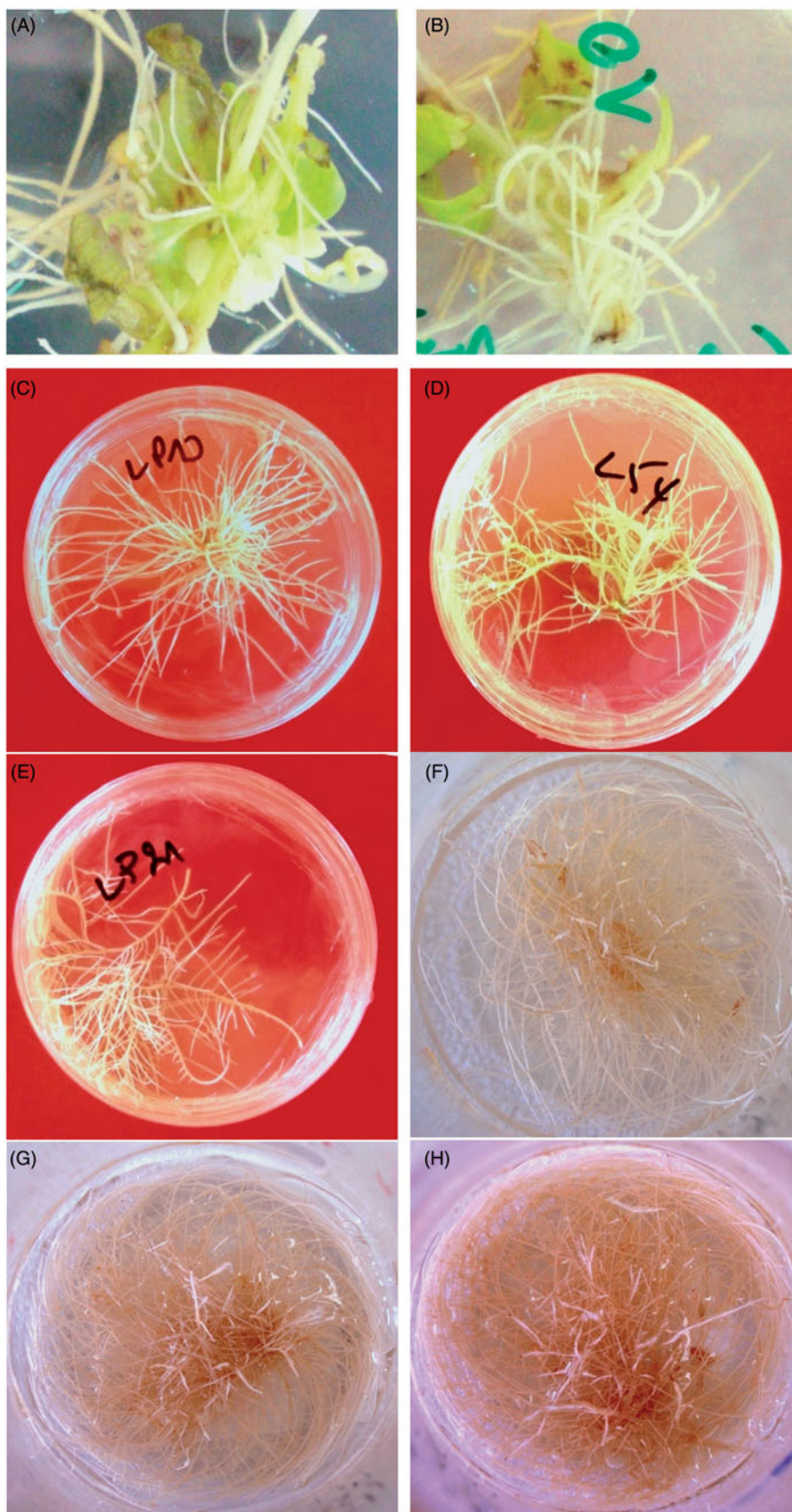


Figure 1. Morphology of induced hairy roots. (A and B) Induction of hairy root on the wounded site of explants after the 30th day of culture in half-strength B5 semi-solid medium; (C, D and E) the selected hairy root lines; (F, G and H) growth of the LP10 hairy roots line after the 14th, 29th and 32nd days of culture in half-strength B5 liquid medium, respectively.

selected hairy root lines (lanes 4–6) and in *Ri* plasmid DNA (positive control, lanes 2 and 3). On the other hand, the genomic DNA isolated from the

Table 2. Variation of growth index in selected hairy root lines after 20 d of culture in half-strength B5 liquid medium.

Cultivar	Selected Lines	Growth index (GI) ^a
Cooler lilac	L2	5.49 ± 1.59
	L12	4.39 ± 0.55
	L14	6.15 ± 0.27
	L17	13.53 ± 1.21
	L54	21.03 ± 1.91 ^b
Cooler blush	LP10	24.48 ± 1.13 ^b
	LP15	2.41 ± 0.50
	LP16	2.0 ± 1.38
	LP3	2.49 ± 1.13
	LP21	14.10 ± 1.02 ^b

^aGrowth index (GI) = $\frac{\text{fresh weight}}{\text{inoculum fresh weight}}$

^bSelected lines according to good growth index.

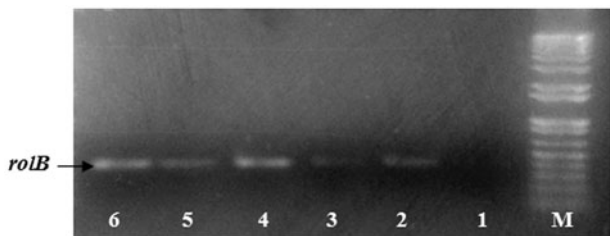


Figure 2. PCR amplification of *rolB* gene in hairy root lines of *C. roseus*. Lane M, molecular weight marker (1000 bp ladder); lane 1, DNA from non-transformed roots; lane 2, DNA from the plasmid A4 (positive control (1)); lane 3, DNA from the plasmid 15834 (positive control (2)); lane 4, DNA from HR line L54; lane 5, DNA from HR line LP21; lane 6, DNA from HR line LP10.

non-transformed roots (control) of the sterile seedlings (negative control, lane 1) did not show any amplification of *rolB* gene. These results confirmed the transgenic nature of the three selected hairy root lines. This transformation was a consequence of an integration of the bacterial *rolB* gene into the plant genome (White et al. 1985; Gelvin 2009).

Growth kinetics of hairy root lines

In order to determine the growth kinetics for three selected lines, the dry weight (DW) was used as a measure of biomass accumulation after the culture period of 35 d. As shown in Figure 3, the hairy root growth was characterized by three development phases. The first days of culture, ranging from 8 to 14 d for LP10 and L54 and from 8 to 11 d for LP21, corresponds to a lag phase, during which the hairy roots adapt to liquid medium and are characterized by a weak and constant dry weight evolution.

The following phase is an exponential phase which can be decomposed into two sub-phases; the first one (ranging from the 14 to 23 d for lines LP10 and L54 and from 11 to 21 d for line LP21) was a weak exponential phase with a small-scale of biomass accumulation. The second one was a true exponential phase with a large-scale biomass accumulation, which was represented by an expedited growth extended until the 32nd day for lines LP10 and L54 and to the 29th day for line LP21. Within this phase, the LP10 line showed a quick and high growth in which the dry weight reached 0.35 g (30-fold the initial weight) at 32 d of culture. The line

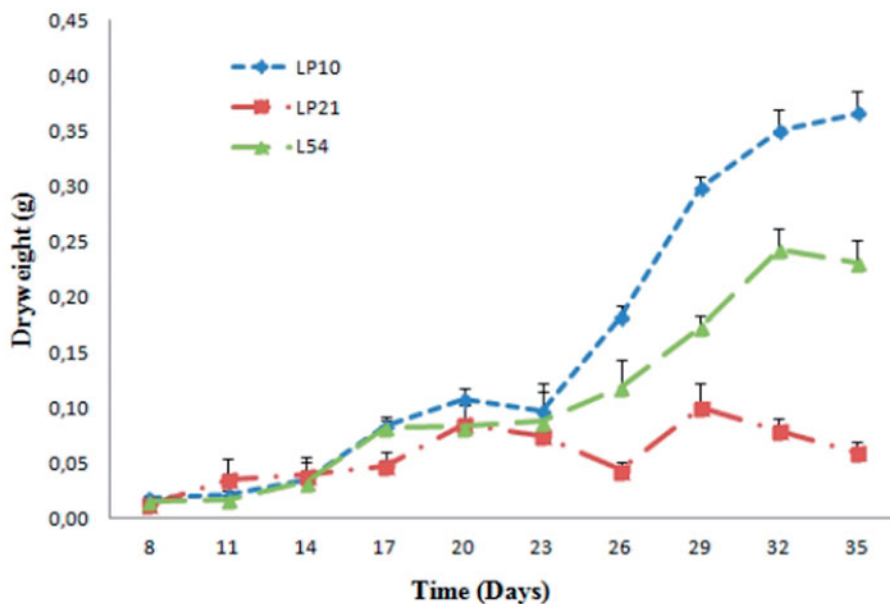


Figure 3. Dry weight accumulation kinetics in three selected hairy root lines.

L54 showed lesser biomass accumulation 0.24 g DW at the 32th day (12-fold the initial weight), whereas the LP21 line showed the lowest dry weight of 0.1 g at the 29th day (10-fold the initial weight) as compared with control. According to Baíza et al. (1998), during the first phase, the low increase in biomass was due to the beginning of the development of lateral roots induced by cell division of intercalary meristematic zones. According to the same authors', in the second phase, the divided cells were elongated due to the absorption of water, which explained the large growth of biomass.

The last phase was the stationary phase and it reached the 32nd day for LP10 and L54 lines and on the 29th day for the LP21. This phase was characterized by a constant DW for the LP10 line or by a decrease in DW for L54 and LP21 lines. Constancy of growth biomass in stationary phase occurred when the lateral roots had the same size as the main roots. Further, the lateral roots no longer form new lateral roots. Furthermore, the biomass growth stability in the stationary phase can be explained by the exhaustion of nutrients in the culture medium (Harfi et al. 2013).

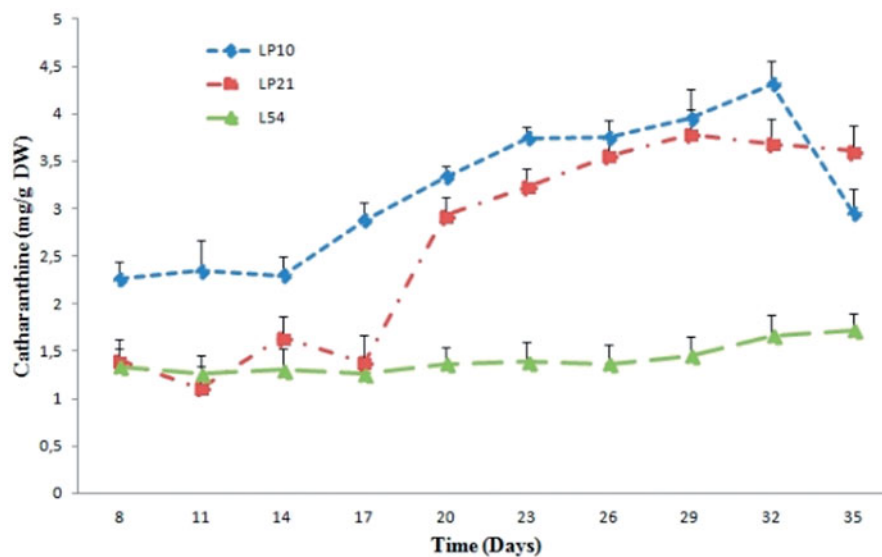


Figure 4. Evolution of the catharanthine accumulation in the three selected hairy root lines of *C. roseus*.

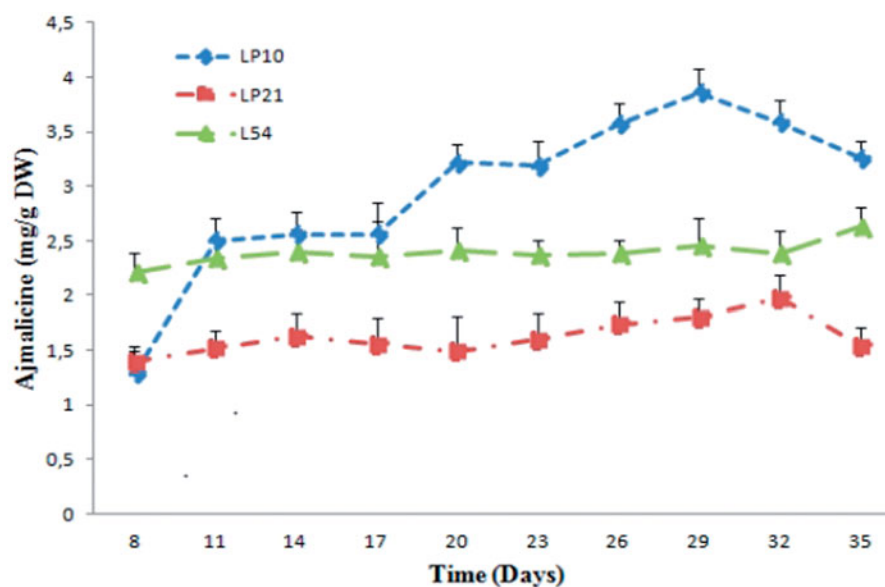


Figure 5. Evolution of ajmalicine accumulation in three selected hairy root lines in *C. roseus*.

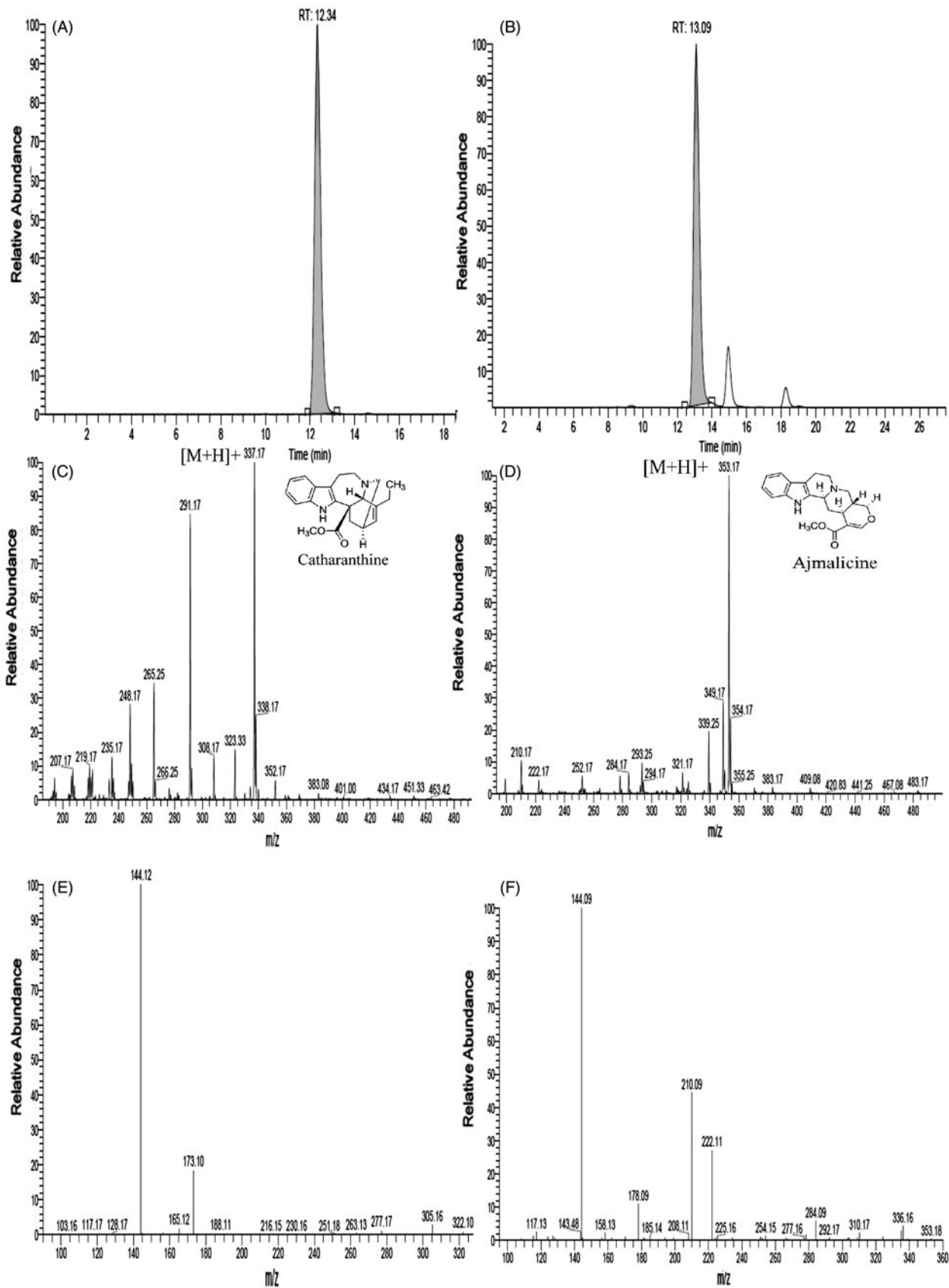


Figure 6. LCMS/MS of the alkaloids of methanolic extract of *Catharanthus roseus* roots. (A and B) Single ion chromatogram (SIC) of catharanthine [M + H]⁺parent ion ($m/z = 143.50-144.50 + 172.50-173.50$) and ajmalicine [M + H]⁺parent ion ($m/z = 143.50-144.50 + 177.50-178.50 + 209.50-210.50 + 221.50-222.50$), respectively. (C and D) MS spectrum of catharanthine and ajmalicine, respectively. (E and F) MS² spectrum of catharanthine and ajmalicine, respectively.

Evolution of catharanthine and ajmalicine accumulation

Transformed root lines can be a promising source for a continuous production of secondary metabolites. This production can be lasting over successive generations without the loss of biosynthetic stability (Giri & Narasu 2000). Transformed roots of *C. roseus* are known to accumulate a large number of monomer alkaloids such as serpentine, ajmalicine and catharanthine (Guillon et al. 2008). In the present study, the presence of ajmalicine and catharanthine at all the stages of growth cycle (Figures 4 and 5) in LP10, LP21 and L54 lines were revealed and quantified by LC-MS/MS (Figure 6).

The time for the fastest growing changes in the hairy root LP10 line (Figure 1F, G and H) during the 36 d culture period showed that ajmalicine and catharanthine contents are significantly increased up to 17 d and then reached to maximum level at days 29 and 32, respectively. The accumulation of ajmalicine and catharanthine stopped at the end of exponential phase. A peak of ajmalicine and catharanthine accumulation in the line LP10 reached 3.8 and 4.3 mg/g DW, respectively.

On the other hand, the LP21 line showed an alkaloid accumulation profiles similar to that of the LP10 line, but with a slight lower concentration of ajmalicine and catharanthine, so that the maximum level of accumulation was recorded at days 29th and 32nd with a content of 1.97 and 3.7 mg/g DW, respectively.

However, for the L54 line, ajmalicine and catharanthine accumulation was relatively constant during the culture cycle, the content varied between 1.4 and 1.5 mg/g DW for ajmalicine, and from 2.2 to 2.6 mg/g DW for catharanthine. We observed that in the line L54, the content of the ajmalicine was slightly higher than the catharanthine. Nevertheless, the production of catharanthine was higher than that of the ajmalicine in LP10 and LP21 lines. Ferreres et al. (2010) found similar results, wherein the content of catharanthine was higher than that of ajmalicine, in which the concentrations of ajmalicine and catharanthine were 1.6 and 3.2 mg/g DW, respectively. In contrast, other research groups noted a higher concentration of the ajmalicine than that catharanthine in hairy roots of *C. roseus*. Although their production yields were 0.1–1.25 mg/g DW (Guillon et al. 2008) and 0.1–0.7 mg/g DW (Vázquez-Flota et al. 1994), respectively, for catharanthine and ajmalicine. The previous results reveal the importance of our results, in which the concentrations of catharanthine and ajmalicine are significantly higher especially for the LP10, with a content of 3.8 and 4.3 mg/g DW, respectively.

Table 3. Relationship between biomass growth and alkaloids accumulation of the three selected lines in *C. roseus*.

DW of hairy root line	Coefficient of correlation in alkaloid	
	Catharanthine	Ajmalicine
LP10	0.4697**	0.5337**
LP21	0.5635**	0.2994*
L54	0.8399***	0.4786**

*, ** and *** significance level at 0.5; 0.1 and 0.1 value of p , respectively.

Correlation between biomass and alkaloids accumulation

Our results showed a good relationship between the biomass production and the accumulation of ajmalicine and catharanthine in three selected hairy root lines (Table 3). During the culture cycle, we noticed a linear relationship between the biomass growth and the accumulation of catharanthine. This relationship was stronger for the three lines LP10 ($R_2 = 0.4697$) LP21 ($R_2 = 0.5635$) and L54 ($R_2 = 0.8399$). Similarly, for the relationship of the accumulation of ajmalicine with the growth of biomass but just for lines LP10 ($R_2 = 0.5337$) and L54 ($R_2 = 0.4786$). In contrast, for the LP21 line, this relationship is weak ($R_2 = 0.2994$). In addition, the maximum production of both alkaloids coincides with the late exponential biomass growth phase. This direct correlation between biomass growth and production of alkaloids is also noted in other plant species (Ciau-Uitz et al. 1994; Almagro et al. 2011), where the highest level of secondary metabolite production was correlated with the cell division activity (Hirano & Komamine 1994). However, Harfi et al. (2013) reported an inverse relationship in *Datura* hairy root lines, in which the maximum production of alkaloids was observed in the stationary phase of hairy root growth.

Conclusion

Many hairy root lines have been induced from the buds of *C. roseus*, which show the efficiency of transformation process. Our results obtained from three selected hairy root lines suggest that the evolution of accumulation of ajmalicine and catharanthine is positively correlated with the development of the biomass growth. In addition, production peak of both TIAs is synchronized with the maximum accumulation of biomass; this leads us to conclude that there is a linear correlation between the kinetics of biomass growth and accumulation of ajmalicine and catharanthine. Moreover, our study shows that LP10 line is the most effective and promising line to continue optimizing the production of TIAs. In addition, the end of exponential phase, from the 23rd

day until the 32th day, remains the best period to apply elicitation.

In order to significantly reduce the cost of pharmacologically important alkaloids obtained from this plant species, more studies are required to be focused on increasing the content by using new elicitors (in hairy root culture) in combination with other techniques like immobilization, two phase culture, etc. Interestingly, it will also be very useful to study the effects of locus and the chromatin structure on the level of *rol* genes or other TIAs' genes and target the best loci with more open chromatin positioning and accessible for transcription and activation and less repressive states.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Funding information

The authors wish to thank the Algerian ministry of high education and scientific research (Algeria) and the ENSAIA of Nancy (France) for supporting this study.

References

- Almagro L, Perez AJL, Pedreño MA. 2011. New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins. *Biotechnol Lett.* 33:381–385.
- Baíza AM, Quiroz A, Ruíz JA, Maldonado-Mendoza I. 1998. Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54:123–130.
- Baíza AM, Quiroz-Moreno A, Ruíz JA, Loyola-Vargas VM. 1999. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 59:9–17.
- Batra J, Dutta A, Singh D, Kumar S, Sen J. 2004. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left-and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration. *Plant Cell Rep.* 23:148–154.
- Chandra S. 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol Lett.* 34:407–415.
- Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR. 2004. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* 22:828–831.
- Ciau-Uitz R, Miranda-Ham ML, Coello-Coello J, Chí B, Pacheco LM, Loyola-Vargas VM. 1994. Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 30:84–88.
- Fernández-Pérez F, Almagro L, Pedreño MA, Gómez Ros LV. 2013. Synergistic and cytotoxic action of indole alkaloids

- produced from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Pharm Biol.* 51:304–310.
- Ferrerres F, Pereira DM, Valentão P, Oliveira JMA, Faria J, Gaspar L, Sottomayor M, Andrade PB. 2010. Simple and reproducible HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of alkaloids in *Catharanthus roseus* roots. *J Pharm Biomed Anal.* 51:65–69.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50:151–158.
- Gelvin SB. 2009. *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiol.* 150:1665–1676.
- Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T. 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:1175–1185.
- Giri A, Narasu ML. 2000. Transgenic hairy roots. *Recent trends and applications.* *Biotechnol Adv.* 18:1–22.
- Guillon S, Gantet P, Thiersault M, Rideau M, Trémouillaux-Guiller J. 2008. Hairy roots of *Catharanthus roseus*: efficient routes to monomeric indole alkaloid production. In: Ramawat KG, Merillon JM, editors. *Bioactive molecules and medicinal plants.* Heidelberg, Berlin: Springer. p. 285–295.
- Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guhur A, Blanc N, Giglioli-Guivarçh N, St-Pierre B, Burlat V. 2010. Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a “nuclear time bomb”? *BMC Plant Biol.* 10:182.
- Harfi B, Khelifi L, Bekhouche M, Khelifi-Slaoui M. 2013. Study of biomass growth kinetic's and hyoscyamine accumulation in hairy roots of three species of *Datura*. *Wulfenia J.* 20:306–313.
- Herath SP, Suzuki T, Hattori K. 2005. Factors influencing *Agrobacterium* mediated genetic transformation of kenaf. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82:201–206.
- Hirano H, Komamine A. 1994. Correlation of betacyanin synthesis with cell division in cell suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiol Plant.* 90:239–245.
- Hughes EH, Hong S-B, Gibson SI, Shanks JV, San KY. 2004. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine. *Metab Eng.* 6:268–276.
- Ishikawa H, Colby DA, Seto S, Va P, Tam A, Kakei H, Rayl TJ, Hwang I, Boger DL. 2009. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. *J Am Chem Soc.* 131:4904–4916.
- Makhzoum A, Bjelica A, Petit-Paly G, Bernards MA. 2015. Novel plant regeneration and transient gene expression in *Catharanthus roseus*. *Results J Biol.* 6:1–9.
- Makhzoum A, Petit-Paly G, St Pierre B, Bernards MA. 2011. Functional analysis of the DAT gene promoter using transient *Catharanthus roseus* and stable *Nicotiana tabacum* transformation systems. *Plant Cell Rep.* 30:1173–1182.
- Makhzoum AB, Sharma P, Bernards MA, Trémouillaux-Guiller J. 2013. Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. In: Gang DR, editor. *Phytochemicals, plant growth, and the environment, recent advances in phytochemistry.* NewYork: Springer. p. 95–142.
- Malik S, Bhushan S, Sharma M, Ahuja PS. 2011. Physicochemical factors influencing the shikonin derivatives production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma*

- (Royle) Johnston, a medicinally important plant species. *Cell Biol Int.* 35:152–157.
- Malik S, Bība O, Grúz J, Arroo RRJ, Strnad M. 2014. Biotechnological approaches for producing aryltetralin lignans from *Linum* species. *Phytochem Rev.* 13:893–913.
- Malik S, Bhushan S, Sharma M, Ahuja PS. 2016. Biotechnological approaches to the production of shikonins: a critical review with recent updates. *Crit Rev Biotechnol.* 36: 327–340.
- Moreno-Valenzuela OA, Minero-García Y, Chan W, Mayer-Geraldo E, Carbajal E, Loyola-Vargas VM. 2003. Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Lett.* 25:1345–1349.
- Mujib A, Ilah A, Aslam J, Fatima S, Siddiqui ZH, Maqsood M. 2012. *Catharanthus roseus* alkaloids: application of biotechnology for improving yield. *Plant Growth Regul.* 68:111–127.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473–497.
- Noble RL. 1990. The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol.* 68:1344–1351.
- Rai GK, Rai NP, Kumar S, Yadav A, Rathaur S, Singh M. 2012. Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Vitro Cell Dev Biol Plant.* 48:565–578.
- Taneja J, Jaggi M, Wankhede DP, Sinha AK. 2010. Effect of loss of T-DNA genes on MIA biosynthetic pathway gene regulation and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell Rep.* 29:1119–1129.
- Tao J, Li L. 2006. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South Afr J Bot.* 72:211–216.
- Toivonen L, Balsevich J, Kurz WGW. 1989. Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 18:79–93.
- Van Der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W, Hallard D, Verpoorte R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem.* 11:607–628.
- Vázquez-Flota F, Moreno-Valenzuela O, Miranda-Ham ML, Coello-Coello J, Loyola-Vargas VM. 1994. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 38:273–279.
- Wang Q, Xing S, Pan Q, Yuan F, Zhao J, Tian Y, Chen Y, Wang G, Tang K. 2012. Development of efficient *Catharanthus roseus* regeneration and transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* and hypocotyls as explants. *BMC Biotechnol.* 12:12.
- White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol.* 164:33–44.
- Wise AA, Liu Z, Binns AN. 2006. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains: *Agrobacterium* protocols. In: Wang K, editor. *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Springer, Humana Press Inc. vol. 343. p. 3–13.