



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Département : Productions végétale

قسم إنتاج النبات

Spécialité : Ressources Génétiques et Amélioration des Productions Végétales

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT 3^{ème} cycle en Sciences Agronomiques

Thème

**Effet de l'élicitation sur la croissance et la production d'alcaloïdes tropaniques
des chevelus racinaires de *Datura sp.***

Présenté par : **MOUSSOUS Asma**

Soutenu Publiquement le 29 /05/2019

Devant le jury composé de :

Président de jury	:	HAZZIT M.	Pr.-E.N.S.A. El Harrach, Alger
Directeur de thèse	:	KHELIFI L.	Pr.-E.N.S.A. El Harrach, Alger
Co-Directeur de thèse	:	KHELIFI-SLAOUI M	Pr.-E.N.S.A. El Harrach, Alger
Examineurs	:	AMDOUN R.	MR. - I.N.R.F. Bouchaoui, Alger
		HARFI B.	MRA.- C.R.B.T, Constantine
		MORSLI A.	MCA.-E.N.S.A. El Harrach, Alger

Remerciement

Je remercie avant tout, Dieu qui m'a donné la volonté et l'énergie pour finir ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à **M. KHELIFI L.** Professeur et Directeur de l'ENSA de m'avoir encadré pendant les années du doctorat.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Mme KHELIFI – SLAOUI M.** professeur à l'ENSA et ma co-directrice de thèse pour son suivi et sa disponibilité et ses encouragements précieux.

Il m'est très agréable de pouvoir présenter ici mon plus profond remerciement à **M. HAZIT. Pr** à l'ENSA, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je remercie **M. Morsli A. MC** à l'ENSA d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie **HARFI B. MRA.** au CRBT d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements vont à **M. AMDOUNE R.** à l'INRF d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir examiné mon travail.

Je remercie aussi **Djamila** l'ingénieur du laboratoire de ressources génétiques et de biotechnologie pour sa disponibilité et son précieux soutien tout le long de mon travail.

Merci à toutes mes amies pour leur soutien moral tout le long de la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents

Mes frères, ma tante Fatma et à toute ma famille

Mes amies

Et à toute la communauté scientifique

Asma

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

I. Origine, description botanique et usages des Datura 3

1. Datura stramonium,..... 3

2. Datura tatula,..... 4

3. Datura innoxia..... 5

4. Utilisations ancienne et récente des Datura..... 6

II. Les Alcaloïdes tropaniques des végétaux 7

1. Nature, Distribution et rôle des alcaloïdes tropaniques..... 7

2. Importance économique et pharmaceutique des alcaloïdes tropaniques 8

3. Alcaloïdes tropaniques des Datura..... 9

4. Niveaux de concentration des alcaloïdes tropaniques dans la plante : cas des Datura 10

5. Extraction, identification, quantification et purification des alcaloïdes 11

6. Formulation de médicaments 12

III. Productions des alcaloïdes tropaniques d'origine végétale 13

1. Production en plein champs 13

2. Production par hydroponie/aéroponie 13

3. Production par voie biotechnologique 14

3.1. Par simple culture *in-vitro* de tissus et cellules 14

3.2. Après transformations génétiques par *Agrobacterium rhizogenes* 15

3.3. Intérêt des chevelus racinaires 15

IV. Optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques par élicitation 18

1. Eliciteurs abiotiques 18

2. Eliciteurs biotiques	19
3. Utilisation des PGPRs comme éliciteurs	19
4. Utilisation des Pseudomonas comme éliciteurs	21
5. Synthèse de quelques travaux d'élicitation chez les Datura	21

Matériel et méthode

1. Matériel végétal : induction des chevelus racinaires ; sélection et mise en culture	23
1.1. Obtention des vitrosemis	23
1.2. Inoculation des hypocotyles par Agrobacterium rhizogenes A4	23
2. Confirmation moléculaire de l'état transgénique des lignées racinaires	24
2.1. Choix des amorces	24
2.2. Extraction des ADNs, PCR et électrophorèse	25
a. Extraction	25
b. PCR	25
c. Electrophorèse	25
3. Suivi de l'évolution de la biomasse moyenne et de la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques pendant cinq années de culture	26
4. Élicitation des chevelus racinaires	26
4.1. Élicitation biotique	26
4.1.1. Origine des souches de Pseudomonas	26
4.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien	27
4.1.3. Elicitation biotique	27
4.2. Élicitation chimique (abiotique) par le nitrate d'argent (AgNO ₃)	28
5. Paramètres mesurés	29
6. Extraction des alcaloïdes	29
7. Dosage des alcaloïdes tropaniques par LC-MS-MS	30

8. Analyse statistique	30
------------------------------	----

Résultats et interprétations

1. Confirmation par PCR de la transformation génétique des lignées racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	31
2. Analyse quantitative des taux des alcaloïdes majeurs des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI à la première année de culture	34
3. Evolution des lignées racinaires transgéniques pendant cinq années de culture	35
3.1.Evolution de la biomasse moyenne	35
3.2.Evolution de la teneur moyenne en hyoscyamine	37
4. Effet de l'éllicitation biotique par les quatre souches de <i>Pseudomonas</i>	39
4.1.Biomasse moyenne des racines transgéniques	39
4.2.Teneur moyenne en hyoscyamine des racines transgéniques	43
4.3.Teneur moyenne en scopolamine des racines transgéniques	46
5. Effet de l'éllicitation chimique (abiotique) par l'AgNO ₃	48
5.1.Biomasse moyenne des racines transgéniques	48
5.2.Teneur moyenne en hyoscyamine des racines transgéniques	49
5.3.Teneur moyenne en scopolamine des racines transgéniques	50
6. Comparaison des meilleurs traitements biotiques « PGPRs » à celui abiotique AgNO ₃ ...	52
6.1.Biomasse moyenne	52
6.2.Teneur moyenne en hyoscyamine	52
5.3.Teneur moyenne en scopolamine	54

Discussion

1. Culture de racines transgéniques pour la production à long terme d'alcaloïdes tropaniques	55
2. Effet de l'éllicitation biotique par les PGPRs sur la biomasse racinaire	57

3. Effet de l'élucitation biotique par les PGPRs sur la teneur en alcaloïdes des racines transgéniques	59
4. Effet de l'élucitation par le nitrate d'argent (AgNO_3) sur la biomasse des racines transgéniques	61
5. Effet de l'élucitation par le nitrate d'argent (AgNO_3) sur la teneur en alcaloïdes	61
6. Comparaison des deux types d'élucitation	62
Conclusion générale	64
Références bibliographiques	65
Annexes	
Publication	

Liste des figures

Figure 1 : <i>Datura stramonium</i> , T : tige, F : feuille, Fl : fleurs, Fr : Fruit, Gr : graines	4
Figure 2 : <i>Datura tatula</i>	5
Figure 3 : <i>Datura Innoxia</i>	6
Figure 4 : Alcaloïdes tropaniques du <i>Datura</i>	9
Figure 5 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.....	10
Figure 6 : Différentes applications biotechnologiques des cultures de racines transgéniques	17
Figure 7 : Profile électrophorétique après PCR d'un fragment du gène <i>rolB</i> (400Pb). MM : marqueur moléculaire 1 kb plus ; 1 : témoin positif (ADN plasmidique d' <i>A.rhizogenes</i>) ; 2 : témoin négatif (ADN de racines de <i>Datura</i> non transformées) ; 3, 4 et 5 : ADNs extraits à partir de chevelus racinaires de DS, DT et DI respectivement	33
Figure 8 : Teneur moyenne en hyoscyamine et scopolamine des lignées DS, DT et DI induites en (2009) par <i>A. rhizogenes</i> , en première année de culture.....	35
Figure 9 : Evolution de la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques DS DT et DI induite en 2009 par <i>A. rhizogenes</i> , en fonction des années de culture.	37
Figure 10 : Evolution de la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées DS, DT et DI induites en 2009 par <i>A. rhizogenes</i> en fonction des années de culture.	39
Figure 11 : Biomasse moyenne (poids sec) des chevelus racinaires des trois lignées transgéniques de <i>Datura</i> (DS, DT et DI) élicitées par les souches bactériennes de <i>Pseudomonas</i> après 5 et 10 jours de contact.	40
Figure 12 : Effet des souches de <i>Pseudomonas</i> sur le pourcentage d'amélioration/réduction de la biomasse moyenne des trois lignées racinaires par rapport au témoin ; après 5 et 10 jours de contact.	43
Figure 13 : Effet de l'élicitation chimique par une concentration d' 1 mM de nitrate d'argent pendant 24 et 48 heures sur la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI.	49
Figure 14 : Effet de l'élicitation chimique par une concentration de 1 mM de nitrate d'argent pendant 24 et 48 heures sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées DS, DT et DI.	50
Figure 15 : Effet de l'élicitation chimique par une concentration de 1mM de nitrate d'argent pendant 24 et 48 heures sur la teneur moyenne en scopolamine des lignées DS, DT et DI.	51

Figure 16 : Biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenue après élicitation biotique et chimique.	52
Figure 17 : Teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenue après élicitation biotique et chimique.	53
Figure 18 : Teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenue après élicitation biotique et chimique.	54
Planche 1: Aspect morphologique des lignées racinaires	32
Planche 2 : Meilleurs résultats de biomasse obtenus après élicitation biotique	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé de quelques travaux d'élicitation de la production des alcaloïdes tropaniques chez <i>Datura</i>	22
Tableau 2 : Origine des souches de <i>Pseudomonas</i>	27
Tableau 3 : Elicitation biotique des chevelus racinaires	28
Tableau 4 : Elicitation des chevelus racinaires avec 10^{-3} M d' AgNO_3	29
Tableau 5 : Effet de l'élicitation par les quatre souches de <i>Pseudomonas</i> sur la teneur en hyoscyamine (mg/g MS).....	45
Tableau 6 : Effet de l'élicitation par les quatre souches de <i>Pseudomonas</i> sur la teneur en scopolamine (mg/g MS)	47

Liste des abréviations

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

CPG : Chromatographie Phase Gaz

LC –MS-MS : Chromatographie Liquide en double Spectrométrie de Masse

Gr : Grossissement ;

DI : Lignée issue de la transformation de *Datura innoxia* ;

DS : Lignée issue de la transformation de *Datura stramonium* ;

DT : Lignée issue de la transformation de *Datura tatula* ;

KB : Milieu de culture B de King *et al.*, 1954 ;

M : Mole

Ms : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962) ;

MS : matière sèche (g)

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PS : Poids sec

rpm : Round per minute (tour par minute) ;

YEM : Yeast Extract Mannitol (Vincent, 1970).

Les végétaux représentent une source inépuisable de substances naturelles exploitées par l'Homme dans divers domaines. De nos jours, des molécules extraites de plantes entrent dans la composition de produits cosmétiques, d'additifs alimentaires, de colorants et médicaments destinés aux traitements de plusieurs maladies humaines (**Gorelick et Bernstein, 2014a**). Ces molécules proviennent du métabolisme secondaire des plantes et sont cependant produites en infimes quantités et ont une valeur ajoutée très élevée (**Bruneton, 2005**).

La production de métabolites secondaires par cultures de plantes médicinales en plein champs rencontre des obstacles ne permettant pas de répondre aux besoins en ces molécules. En effet, les conditions environnementales, les ravageurs et parasites de cultures font que les rendements soient instables et insuffisants (**Gontier et al., 2002**).

Ainsi, Les besoins croissants en molécules pharmaceutiques ont permis le développement de nouvelles voies biotechnologiques plus rentables. En effet, les cultures de suspensions cellulaires et les racines transgéniques constituent les deux voies biotechnologiques essentielles adoptées dans l'industrie pharmaceutique moderne. Néanmoins l'instabilité génétique des suspensions cellulaires et leurs faibles taux de synthèse de métabolites font que cette voie soit moins recherchée (**Pitta Alvarez et al., 2000**). En outre, les systèmes des cultures de tissus spécialisés *in-vitro* comme les cultures de racines pour la production de métabolites secondaires sont préférées et forment une alternative aux cultures de plantes entières. Elles assurent la continuité de production et la possibilité de control des conditions de culture et de l'optimisation de la quantité produite. En comparaison avec la production chimique de molécules bioactives, qui est à la fois complexe et coûteuse, les voies biotechnologiques sont économiquement plus rentables et de plus en plus étudiées (**Srivastava et Srivastava, 2007**).

Ainsi, nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques qui constituent un groupe de métabolites secondaires chez les espèces appartenant à la famille des Solanacées particulièrement les *Datura*. Ces molécules ont des applications dans le domaine pharmaceutique en tant qu'analgésiques, antispasmodiques et calmants musculaires (**Alabri et al., 2014**). Par ailleurs, ce type de métabolites sont importés et ne sont jusqu'à présent pas produits en Algérie (**Houmani, 1999**).

Par ailleurs, **Harfi (2013)**, a proposé un procédé biotechnologique pour la production des alcaloïdes tropaniques par cultures de racines transgéniques de *Datura* basé sur l'induction de la biosynthèse des métabolites secondaires par l'application de molécules « éliciteurs » biotiques et/ou abiotiques en vue d'élever le pouvoir synthétique des tissus (**Vanhull et al., 2007**). En effet l'avantage des racines transgéniques est leur stabilité génétique et la production accrue en métabolites secondaires (**Oksman-Caldentey, 2007**). En outre, l'élicitation a donné des résultats positifs d'optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques, mais une faible stimulation de la biomasse des tissus (**Harfi et al., 2016; Shakeran et al., 2015**).

Cela nous a poussés à chercher des éliciteurs pouvant à la fois promouvoir la croissance des tissus et leur pouvoir synthétique et ainsi les questions auxquelles nous nous sommes intéressés dans cette étude sont les suivantes :

Peut-on utiliser les racines transgéniques de *Datura* induites depuis 2009 pour une production accrue et stable à long terme d'alcaloïdes tropaniques sans avoir recours à l'induction de nouvelles lignées racinaires ? Aussi, Ya-t-il des éliciteurs pouvant stimuler à la fois la production des métabolites secondaires et la croissance des tissus végétaux ?

Pour répondre aux problématiques précédemment posés, nous avons étudié :

- L'évolution de la biomasse et de la production d'alcaloïdes tropaniques de lignées racinaires transgéniques sélectionnées de trois espèces de *Datura* (*D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia*) induites par *A.rhizogenes* A4, durant cinq années de culture.
- L'effet de l'élicitation biotique par des souches de *Pseudomonas ssp fluorescens* et *Pseudomonas putida* sur la production des lignées racinaires, afin d'optimiser la biomasse et la production des alcaloïdes.
- L'effet de l'élicitation abiotique par le nitrate d'argent sur la productivité des lignées racinaires, afin d'optimiser la biomasse et la production des alcaloïdes.
- La comparaison des deux types d'élicitation biotique et abiotique.

I. Origine, description botanique et usages des *Datura*

Le *Datura* forme un genre de plantes médicinales appartenant à la famille des solanacées distribuées à travers le monde, elles sont très répandues dans les régions chaudes, tempérées et tropicales (Aehle et Dräger, 2010). En Algérie, cinq espèces sont identifiées (*Datura ferox* L, *Datura innoxia* Mill, *Datura quercifolia* Humb, *Datura stramonium* L et *Datura tatula* L), Ces dernières sont cosmopolites et poussent à l'état sauvage ou des adventices de cultures (Houmani, 1999).

Les auteurs ne s'accordent pas tous quant à l'origine du mot *Datura*, plusieurs propositions sont suggérées. Selon Bianchini et Pantanole le nom *Datura* est d'origine arabe dérivant du mot « tatorah ». Poletti (1988), le terme « *datura* » provient de « *datura* » qui est le nom indien de la plante et qui signifie « pomme épineuse » ou « pomme de la mort ». En Algérie, les espèces de *Datura* sont connues sous plusieurs noms selon les régions, en Kabylie « *bourandjouf* » et aux Aurès « *netina* » (Dambri, 1998). Alors qu'au Maroc, le nom local est « *Chdeqej-jmel* » (El Bazaoui et al., 2009).

1. *Datura stramonium*

Considérée comme la plus fréquente et la plus décrite, la stramoine est d'origine américaine (Bruneton, 2005). Bruneton, 2005 précise que le *Datura stramonium* est originaire de l'Amérique du sud et du nord.

La stramoine est une plante herbacée, annuelle, à port dressé (Ricard et al., 2012). La tige est arrondie porte des feuilles ovales aiguës profondément découpées en lobes inégaux pointus et marquées par des nervures saillantes, axillaires et grandes. Le calice des fleurs est à 5 sépales et la corolle est tubuleuse, plissée, blanche et évasée en entonnoir. Le fruit est une capsule fortement épineuse, à 4 valves épaisses, contenant de nombreuses graines noires, réniforme et à surface réticulée (Bruneton, 2005) (Figure :1) . La racine est fusiforme et ramifiée (Pelikan et Claretie, 1988).

Le *Datura stramonium* possède douze paires de chromosomes, soit diploïde ($2n=2x=24$) ou tétraploïde ($2n=4x=48$) (Baizaet al.1999).

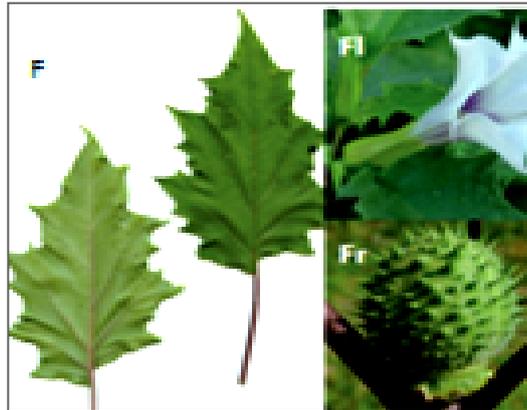


Figure 1 : *Datura stramonium*, F : feuille, Fl : fleurs, Fr : Fruit (Gaire et Subedi, 2013).

2. *Datura tatula*

Datura tatula (Figure : 2) est une plante annuelle à port dressé pouvant atteindre 1,5 m de hauteur. La tige est dichotome, mince et plus ou moins ridée, de couleur brunpourpre. La feuille présente un limbe acuminé de 8 à 25 cm de long et de 7 à 15 cm de large, de forme ovale dentelée, le pétiole est cylindrique de couleur violette. La fleur est solitaire à l'aisselle de chaque ramification, elle présente un court pédoncule, elle est pentagone à ovaire super, le calice est gamosépale, d'une couleur verte avec des stries violacées. La corolle est infundibuliforme de couleur pourpre lavande. Les racines sont de couleur pâle et portent de nombreuses radicelles.

Le caryotype est de $2x=2n=24$ chromosomes (Gros-Lebon, 1971). Certains auteurs considèrent que *Datura tatula* est une espèce à part. D'autres la considèrent comme une variété de *Datura stramonium* et pensent que le *Datura stramonium* et le *Datura tatula* ne diffèrent que par une seule paire d'allèles, l'allèle responsable de la coloration violette des fleurs qui domine l'allèle responsable de la coloration blanche (Mino et al., 1993; Berkov et al., 2005).



Figure 2 : *Datura tatula*(Csapody, 1961)

3. *Datura innoxia* Mill.

Datura innoxia (Figure : 3) est une plante herbacée annuelle dressée, robuste et invasive, présentant des poils glandulaires. Ses feuilles matures sont grossièrement ovoïdes et découpées. La fleur blanche, dressée, possède un calice de 5 à 11 cm de long, 3 à 6 lobes de 13 à 20 mm de long, quelquefois incomplètement séparés. La corolle, de 12 à 19 cm de long, est blanche avec des veines vertes. Le limbe est ondulé et comporte une dizaine de lobes grossièrement triangulaires (Barguil *et al.*, 2006). Le fruit est une capsule épineuse, ovoïde ou globuleuse de (3 à 5) x (4 à 6) cm tordue vers le bas. Lors de la formation à maturité, le fruit s'ouvre de manière irrégulière pour libérer des graines de 3 à 5 mm réniformes, rugueuses de couleur marron (Amdoun *et al.*, 2006). L'espèce est autogame et présente un caryotype de $2x = 2n = 24$ chromosomes (Ducrocq *et al.*, 1994).



Figure 3 : *Datura Innoxia* (Jouzier , 2005).

4. Utilisations ancienne et récente des *Datura*

Les *Datura* sont connus pour leurs propriétés médicinales intéressantes depuis fort longtemps. Les graines ont été utilisées comme aphrodisiaques et ont également été indiquées comme sédatives pour les maux de tête et comme narcotiques pour l'insomnie. Alors que les feuilles et les fleurs sont séchées et fumées ou fumigées dans le traitement de l'asthme. De façon générale, toutes les parties de la plante sont utilisées dans la médecine traditionnelle, afin de provoquer une sédation ou faire disparaître la fatigue (El Bazaoui *et al.*, 2009).

Les propriétés médicinales des *Datura* sont dues à la synthèse des alcaloïdes tropaniques ; principalement l'hyoscyamine et la scopolamine produites dans toutes les parties et qui provoquent chez l'Homme diverses réponses physiologiques. Elles interfèrent avec les neurotransmetteurs en inhibant de façon compétitive et réversible le neurotransmetteur d'acétylcholine, qui ne peut pas ainsi se lier à ses récepteurs muscariniques, et cet antagonisme crée des effets sympathomimétiques dans les organes. En conséquence, la fréquence cardiaque augmente, et il y a une provocation du relâchement et une inhibition motrice des muscles lisses (Baldini *et al.*, 1993).

A forte dose, la plupart des alcaloïdes sont très toxiques (Hopkins, 2003). Par contre à faibles doses, ils traitent l'asthme, les quintes de toux de la coqueluche, les spasmes musculaires et les symptômes de la maladie de Parkinson (Isérin *et al.*, 2001).

Les alcaloïdes tropaniques ou des extraits qui en renferment sont utilisés comme médicaments, relaxants musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes (**Hopkins, 2003**). L'hyoscyamine entraîne le ralentissement de l'activité de l'appareil digestif et urinaire et une mydriase (**Wink, 1998**). La scopolamine est une molécule antispasmodique, antidépressive et sédatrice et anti parkinsonienne utilisée pour prévenir les maux de transport (**Podkowa et al., 2016**).

De nos jours, les *Datura* sont cultivés à grande échelle pour leur contenu alcaloïdique utilisé en industrie pharmaceutique pour la formulation de médicaments anti-inflammatoires (**Gaire et Subedi, 2013**).

Les *Datura* trouvent plusieurs autres applications dans d'autres domaines. En agriculture et dans le cadre de la lutte biologique, le *D. stramonium* figure parmi les plantes qui peuvent diminuer les populations de nématodes à galle de la tomate, et même pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre (**Li et al., 2006**). D'après **Wao et al. (2014)** les *Datura* peuvent être aussi utilisés dans le domaine écologique, dans la bioremédiation des sols et des eaux polluées par les métaux lourds. Ainsi, ces derniers seront concentrés sur les parois cellulaires de la plante.

II. Les Alcaloïdes tropaniques des végétaux

Au cours de l'évolution, le règne végétal a développé plusieurs métabolites secondaires pour se défendre des herbivores, des microorganismes et des virus. Parmi plus de 85.000 molécules connues aujourd'hui, environ 16.000 sont des alcaloïdes (**Verpoorte, 2000**).

1. Nature, rôle et distribution des alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques forment une classe d'alcaloïdes caractérisée par un cycle de tropane. Ce sont des esters d'alcools tropaniques et d'acides de structure variable, aliphatique ou aromatique et ont en commun un élément structural bicyclique azoté, l'azabicyclo 3,2,1 octane appelé tropanique. Selon la nomenclature IUPAC, ce sont des 8-méthyl-8-azabicyclo 3,2,1 octanes (**Bruneton, 1999**) (Figure :4). On recense environ 200 alcaloïdes dans ce groupe dont les principaux sont l'atropine (forme racémique d'hyoscyamine), l'hyoscyamine et la scopolamine (**Bruneton, 1999**). Ces deux dernières constituent des agents antimuscariniques et ont été le point de départ de la synthèse chimique de la plupart des anticholinergiques utilisés dans les méthodes thérapeutiques modernes (**Barguil et al., 2006**).

Ces alcaloïdes ont des propriétés antispasmodiques dans le système gastro intestinal et également des propriétés anti sécrétrices (utiles au cours des interventions chirurgicales).

Les alcaloïdes tropaniques constituent une série de métabolites secondaires qui ont été principalement décrits dans plusieurs familles des dicotylédones ; principalement chez la famille des Solanacées (*Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Mandragora officinarum* et *Datura sp*), les Protéacées, Brassicacées, Moracées, Convolvulacées, Phyllanthacées, Erythroxylacées et Rhizophoracées (**Jirschitzka et al., 2013**). Ils ont également été observés dans d'autres familles, comme les *Orchidaceae*, *Euphorbiaceae*, et chez le champignon *Amanitamuscaria*. (**Zhang et al., 2004**). Les métabolites secondaires se comportent comme des signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement (**Chaudhary et al., 1985**). Certains alcaloïdes jouent un rôle dans la défense de la plante contre les herbivores, les pathogènes, les parasites et l'inhibition de la germination et de la croissance des plantes concurrentes (**Hale et al., 2004**).

2. Importance économique et pharmaceutique des alcaloïdes tropaniques

Aujourd'hui, la demande en produits d'origine végétale est en forte croissance et la production de métabolites secondaires par culture en plein champs est parfois insuffisante à cause des rendements limités (problèmes climatiques, ravageurs, maladies) d'où la nécessité d'importer ces produits à cout très élevé (**Boitel-Conti et al., 1995**).

En 1988 on a recensé près de 85.000 métabolites secondaires, dont 16000 alcaloïdes et plus de 33000 terpénoïdes (**Bruneton, 1999**). Ces composés présentent un intérêt économique notable. On estime en effet qu'au moins 25% des produits pharmaceutiques mis sur le marché proviennent de plantes médicinales (**Verpoorte, 2000**). Environ 75% des médicaments prescrits dérivent de produits naturels (**Farnsworth et Soejarto, 1991**).

Les alcaloïdes tropaniques forment un groupe de métabolites secondaires d'origine végétale qui peuvent aussi être synthétisés chimiquement. Comparativement aux métabolites primaires, l'extraction de ces composés est souvent difficile à cause de leur teneur faible dans la plante, ce qui rend leur cout très cher (**Oksman-Caldentey, 2007**). En outre, la synthèse chimique des alcaloïdes tropaniques est un procédé complexe et plus chère que leur extraction directe à partir des plantes (**Huang et al., 2005**). En effet, Dans certains cas, quand la

molécule à synthétiser est complexe et est composée de plusieurs carbones asymétriques, la synthèse chimique est difficile, ainsi la production à partir des ressources naturelles de plantes apparaît comme la meilleure option (Nguyen *et al.*, 2015).

3. Alcaloïdes tropaniques des *Datura*

Parmi les Solanacées, les *Datura* sont connus par la synthèse d'alcaloïdes tropaniques, essentiellement l'hyoscyamine et la scopolamine (Figure : 4). Ces deux dernières sont caractérisées par un noyau tropane hérité de la tropinone, qui porte le noyau azoté et d'un noyau benzène hérité de la phénylalanine (Gontier, 1993; Gryniewicz et Gadzikowska, 2008).

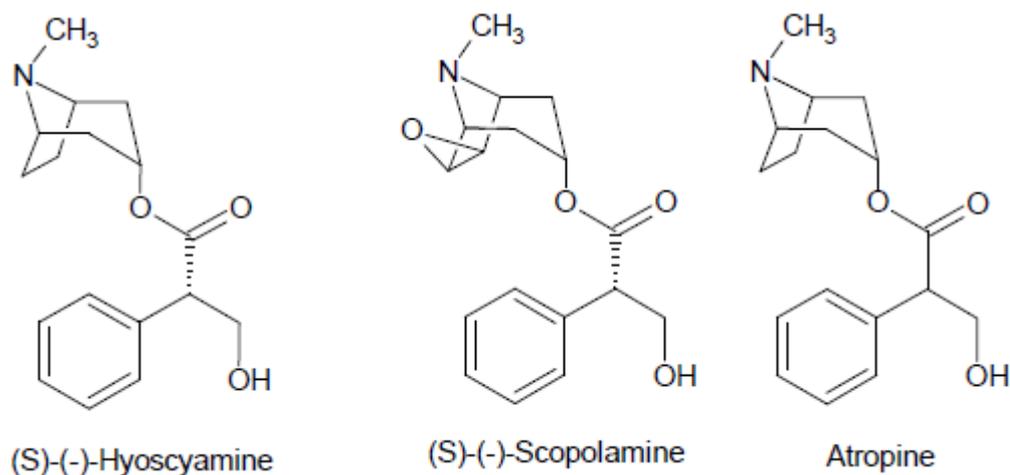


Figure 4 : Alcaloïdes tropaniques du *Datura* (Mauro, 2006).

Le processus de biosynthèse de l'hyoscyamine se fait essentiellement dans les racines de la plante (Nakanishi *et al.*, 2000). Une partie est ensuite transportée vers les parties aériennes et l'autre est convertie en scopolamine au cours de la translocation (Lanoue *et al.*, 2004). La voie de biosynthèse de la scopolamine étudiée par de nombreux chercheurs est complexe et fait intervenir plusieurs précurseurs et différents enzymes (Boitel-Conti *et al.*, 2000). La figure 5 résume les principales étapes de la biosynthèse de l'hyoscyamine et de la scopolamine.

La première étape de la chaîne de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est catalysée par l'ornithinedécarboxylase (ODC) en donnant une molécule de putrescine qui forme grâce à l'enzyme N-Méthyltransferase (PMT) la tropinone ; qui est le premier intermédiaire avec un noyau tropane. Deux réactions de réduction de la tropinone via les

tropinone réductases TR-I et TR-II en tropine et γ -tropine respectivement. L'hyoscyamine est produit par condensation de la tropine et de l'acide tropique et est converti en scopolamine par hydroxylation de l'anneau tropane (Zhang *et al.*, 2004) (Figure : 5).

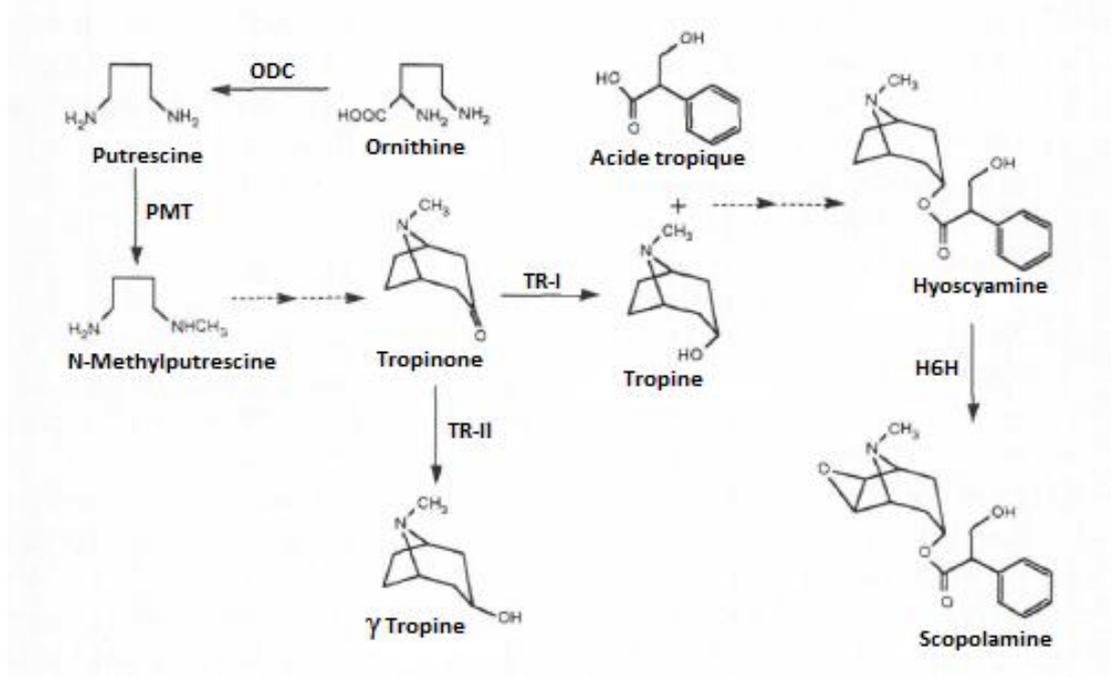


Figure 5 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Fachinni, 2001).

ODC : Ornithinedecarboxylase ; PMT : Putrescine N-methyltransferase ; TR- I et II : Tropinonereductases I et II ; H6H : Hyoscyamine-6 β -Hydroxylase.

4. Niveaux de concentration des AT dans la plante : Cas des *Datura*

Le profil alcaloïdique ainsi que la concentration des alcaloïdes tropaniques varient selon l'organe, le stade de développement et l'origine de la plante (Berkov *et al.*, 2005). En effet de nombreuses études basées sur les méthodes d'analyse modernes ont montré que l'hyoscyamine est l'alcaloïde le prédominant chez les *Datura* (Jakabová *et al.*, 2012). La quantité des alcaloïdes totaux varie de 0.01% à 3% du poids sec dépendant de l'espèce et de l'organe (Oksman-Caldentey, 2007).

Les racines sont en générale plus riches en hyoscyamine que les feuilles et les tiges. En effet, au niveau des racines ; la réaction d'époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine est faiblement remarquée contrairement au reste des organes de la plante d'où la prédominance de ce dernier dans les racines des *Datura* (Romeike, 1961). En outre, La teneur

en alcaloïdes de la plante est influencée par les conditions culturales, en effet ; la température et la photopériode influent sur la productivité des alcaloïdes chez les *Datura* (Vu, 2008).

En outre, la teneur en hyoscyamine des parties aériennes du *D. stramonium* est de $0,67 \pm 0,15$ mg/g MS. Elle est environ 2,5 fois plus importante que celle de la scopolamine. La production moyenne d'alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine) est de 105 mg / plante (Houmani et Cosson, 2000). Les tiges du *D. tatula* produisent $0,73 \pm 0,19$ mg/g MS d'hyoscyamine. Cette production est environ 3,5 fois plus élevée que celle de scopolamine. Les racines sont également dominées par l'hyoscyamine avec une teneur de 0,38 mg/g MS. La production moyenne en alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine) est de 53 mg / plante sèche (Houmani et Cosson, 2000).

Selon Houmani et Cosson, (2000), les parties aériennes du *D. innoxia* renferment une teneur de $1,03 \pm 0,24$ mg/g MS d'alcaloïdes (scopolamine + hyoscyamine), ayant un rapport de scopolamine / hyoscyamine de 2,81. Ces organes sont dominés par la scopolamine, contrairement aux racines qui renferment 7 fois plus d'hyoscyamine que de scopolamine. La production moyenne d'alcaloïdes majeurs est de 109 mg/ plante sèche. Il a été prouvé que le traitement des *Datura* avec différents composants chimiques peut varier la teneur en alcaloïdes (Gorelick et Bernstein, 2014b).

5. Extraction, identification, quantification et purification des alcaloïdes

Plusieurs méthodes d'extraction des alcaloïdes sont proposées, basées sur la solubilité de ces derniers dans l'eau ou dans les solvants et la méthode d'analyse chimique à envisager. Les alcaloïdes tropaniques à l'exception de la cocaïne, l'apoa tropine et les truxilines sont hydrosolubles ce qui permet une extraction sélective avec une solution aqueuse acide (Brachet *et al.*, 1999). La poudre végétale est généralement lyophilisée puis traitée par des solvants chimiques afin d'en extraire les alcaloïdes tropaniques (Kursinszki *et al.*, 2005).

Une extraction sélective est fortement recommandée en général, parce qu'elle peut accélérer toute autre opération d'analyse de l'extrait, c'est-à-dire simplifier la préparation de l'échantillon et permettre l'analyse chromatographique directe dans beaucoup de cas. En pratique, on évalue toujours la méthode d'extraction choisie en éluant le matériel plusieurs fois et en examinant les extraits individuellement afin de confirmer après combien de répétitions une extraction est totale (Dräger, 2002). En général l'extraction à partir de tissus

végétaux est faite avec du méthanol. L'extrait sec est ensuite dissout dans du chloroforme ou du dichlorométhane et lavé plusieurs fois avec de l'eau alcalinisée. L'extrait est évaporé puis repris dans un solvant compatible avec la chromatographie utilisée pour l'analyse ; les solvants les plus utilisés sont le méthanol et l'hexane (Aehle et Dräger, 2010).

En effet, l'identification des alcaloïdes tropaniques est possible grâce aux techniques de séparation chromatographiques. En effet, La chromatographie sur couche mince a pour longtemps été utilisée dans la caractérisation des extraits phytochimiques. En effet, dans l'optique d'une mise en œuvre à des fins analytiques : identification, séparation et quantification, l'utilisation de chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) s'avère de plus en plus utile (Dräger, 2002). L'HPLC est la méthode la plus utilisée actuellement pour la caractérisation des extraits d'alcaloïdes, elle peut être couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) pouvant ainsi donner des informations sur la structure de différents composés d'un complexe de métabolites. L'accès à une haute résolution de spectre de masse est nécessaire pour avoir le maximum d'informations sur le poids moléculaire et la formule générale des métabolites. Dépendant du type d'extraction et de molécules extraites, l'utilisation d'autres techniques analytiques est possible. En effet, les composés volatiles ou semi volatiles peuvent être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS qui a des avantages grâce aux bases de données intégrées comme le NIST et WILEY qui ont un large potentiel d'identification basé sur la similarité des spectres de masse de l'extrait à analyser et les spectres de la base de données (Kopka, 2006).

6. Formulation de médicaments

Les alcaloïdes tropaniques entrent actuellement dans la formulation de nombreux analgésiques. Les alcaloïdes isolés à partir des *Datura* sont utilisés comme mydriatique. La scopolamine est utilisée pour le mal des transports, mais aussi comme sédatif et anesthésique (Baran, 2000). Selon la dose ; l'atropine, l'hyoscyamine et la scopolamine diminuent voire inhibent les sécrétions des glandes salivaires et sudoripares. Ces composées influencent le rythme cardiaque ; ainsi en faible dose ils diminuent le rythme du cœur, alors qu'en dose élevée ils provoquent une tachycardie. Ils sont aussi des dilatateurs des bronches et de la pupille, l'atropine est utilisée régulièrement en ophtalmologie. De plus ces médicaments causent le relâchement de la tension des muscles du pharynx (Kosieradzka, 2010). En Chine, une méthode de dépistage des carcinomes hépatocellulaires à partir d'agglutinines à base de *Datura stramonium* a démontré son efficacité (Huang, 1994).

III. Productions des alcaloïdes tropaniques d'origine végétale

1. Production en plein champs

Beaucoup de plantes médicinales sont cultivées en plein champs pour en extraire les molécules d'alcaloïdes constituant le principe actif de plusieurs médicaments (**Gorelick et Bernstein, 2014b**). Cependant, la productivité de ce type de cultures reste faible vue la dépendance du métabolisme secondaire des espèces et aux fluctuations du rendement notamment celles liées aux contraintes climatiques (**Guinardet al., 1985**). Une production rentable, stable et indépendante permettant de répondre aux besoins croissants en biomolécules en industrie pharmaceutique est fortement recherchée, cela a créé des voies de recherche visant l'amélioration des rendements (**Vanisree et al., 2004**). Des efforts considérables ont été fournis pour élaborer des méthodes plus efficaces en terme de production d'hyoscyamine et de scopolamine en utilisant : les cultures hydroponiques et des méthodes biotechnologiques en utilisant des cultures *in-vitro* (**Gontier et al., 2002; Souret, 2003**).

2. Production par hydroponie/ aéroponie

Les cultures hors sol en hydroponie et aéroponie sont largement utilisées sur plusieurs hectares de serres pour la production maraichère et la production de fleurs (**Morard, 1995**).

Pendant ces dernière années pour améliorer la production en métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutiques ; des techniques culturales basées sur le semis de graines de plantes médicinales sur un substrat inerte avec alimentation par une solution nutritive renouvelable ont été développées (**Nguyen et al., 2015**).

En hydroponie les racines des plantes plantées sont en contact partiel avec la solution nutritive qui traverse le substrat pour éviter l'asphyxie. Le contrôle du pH de la solution nutritive ainsi que son électro-conductivité permettent de gérer le milieu selon les besoins de la plantes à chaque stade de sa croissance (**Vu, 2008**).

A l'échelle expérimentale, des cultures hydroponiques de *Datura innoxia* combinées à la perméabilisation ont montré leurs efficacités en termes de production de biomasse et d'alcaloïdes tropaniques (**Gontier et al., 2002; Rahmoune et al., 2017**). Un système de production appelé : Plantes à traire « PAT » a été développé. Il consiste à cultiver des plantes

en hydroponie avec l'utilisation de produits pouvant améliorer la synthèse des métabolites secondaires et leur libération dans la solution nutritive afin de les récolter plus facilement (**Bourgaud et al., 2013**).

En culture aéroponique, une bonne croissance de la plante est assurée par une bonne oxygénation. Les racines sont alimentées par un brouillard d'une solution nutritive dans une enceinte close avec un flux de pulvérisation qui peut être continu ou intermittent par cycles de temps d'un quart d'heure ou d'une demi-heure avec un arrêt de quelques minutes en fin de journée (**Vu, 2008**). Cette technique est coûteuse et par conséquent moins recherchée et de plus en plus remplacée par des stratégies biotechnologiques plus efficaces.

3. Production par voie biotechnologique

Différentes stratégies biotechnologiques basées sur les cultures *in-vitro* de tissus végétaux et l'introduction de vecteurs recombinants ont révélé des taux de production élevés par rapport aux cultures en plein champs qui deviennent moins recherchées en industrie pharmaceutique (**Nguyen et al., 2015**).

3.1. Par culture *in-vitro* de tissus et/ou de cellules

Les cultures *in-vitro* de tissus et/ou de pousses racinaires sont préférées du fait de la possibilité du contrôle des conditions du milieu, ce qui leur permet de pousser dans de meilleures conditions permettant ainsi l'augmentation des rendements en alcaloïdes (**Nguyen et al., 2015**).

La culture des suspensions cellulaires forme aussi une voie biotechnologique de production de métabolites secondaires à destination pharmaceutique. Cette voie est utilisée même à l'échelle industrielle. Cependant l'inconvénient des cultures cellulaires est que la production des métabolites secondaires reste faible et certaines molécules ne sont pas produites. De plus, avec le temps, les cellules en suspensions perdent partiellement ou totalement leur pouvoir d'accumuler les métabolites secondaires (**Kim et al., 2002**). En effet, la stabilité génétique des tissus est un facteur important pour éviter les fluctuations de biosynthèse de molécules phytochimiques. La production de métabolites secondaires nécessite un tissu spécialisé pour certaines molécules, la production se fait dans un organe

précis de la plante. C'est pourquoi l'utilisation des racines transgéniques prend de plus en plus de l'ampleur (Oksman, 2007).

3.2. Après transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes*

Les racines représentent généralement, le siège de la biosynthèse des alcaloïdes. La production de ce type de métabolites secondaires nécessite donc un tissu spécialisé du fait qu'elle est liée à la différenciation cellulaire (Fliniaux *et al.*, 2004). Les chevelus racinaires induits par *Agrobacterium rhizogenes* constituent une voie biotechnologique prometteuse, ces derniers sont génétiquement stables et productifs (Giri et Narasu, 2000). A la base, les chevelus racinaires forment une maladie que développe une plante infectée par *A. rhizogenes* et plus spécifiquement les *loci rol* portés par le plasmide RI qui sont directement incorporés au génome engendrant ainsi une prolifération des racines néo-plastiques (Ono et Tian, 2011). Les gènes *rol* affectent directement la croissance des racines transformées et induisent la synthèse des métabolites secondaires grâce à l'activation de la transcription des gènes de défense (Bulgakov, 2008; Meyer *et al.*, 2000).

Le processus d'infection par *Agrobacterium rhizogenes* se produit en trois étapes : adhésion de la bactérie au tissu de la plante, activation des gènes de virulence *vir* et transfert du T-DNA vers la cellule hôte. L'activation des gènes *vir* se fait grâce aux signaux chimiques émis par la plante blessée : les monosaccharides (glucose), le pH acide et les composés phénoliques dont l'acétosyringone. Cette dernière augmente la fréquence des transformations de façon significative (Giri et Narasu, 2000).

3.3. Intérêt des chevelus racinaires

Les chevelus racinaires induits par transformation génétique sont généralement très productifs et donnent des rendements élevés en métabolites secondaires notamment en alcaloïdes tropaniques (Giri et Narasu, 2000; Oksman-Caldentey, 2007). Ils sont très denses et dotés d'une croissance rapide pouvant atteindre les 2,5 cm/jour (Souret *et al.*, 2003; Amdoun *et al.*, 2006). Leur croissance est plagiotrope et ils ont la capacité de croître sans addition d'hormones au milieu de culture (Giri et Narasu, 2000; Ono et Tian, 2011). Les racines transgéniques forment une source alternative attractive de production de molécules phytochimiques grâce à leur stabilité génétique et la capacité biosynthétique en comparaison

avec les racines de plantes ,les cultures cellulaires et les cultures de cals contenant des cellules indifférenciées (**Ono et Tian, 2011**).

L'un des intérêts le plus important des cultures de racines transgéniques réside dans la facilité de l'étude de voies de biosynthèse de molécules phytochimiques dédiées à l'industrie pharmaceutique (alcaloïdes, terpènes et phénols) ainsi que la production des protéines thérapeutiques recombinées (vaccins, anticorps et enzymes) produits ou convertis dans les racines ainsi que l'étude de la physiologie des racines et la toxicité de certaines molécules et métaux lourds en contact des racines des plantes. Pour certaines espèces ornementales les chevelus racinaires sont utilisés pour la régénération de plantes entières avec des phénotypes désirés en introduisant de nouveaux caractères grâce à la recombinaison génétique (Figure : 6) (**Ono et Tian, 2011**).

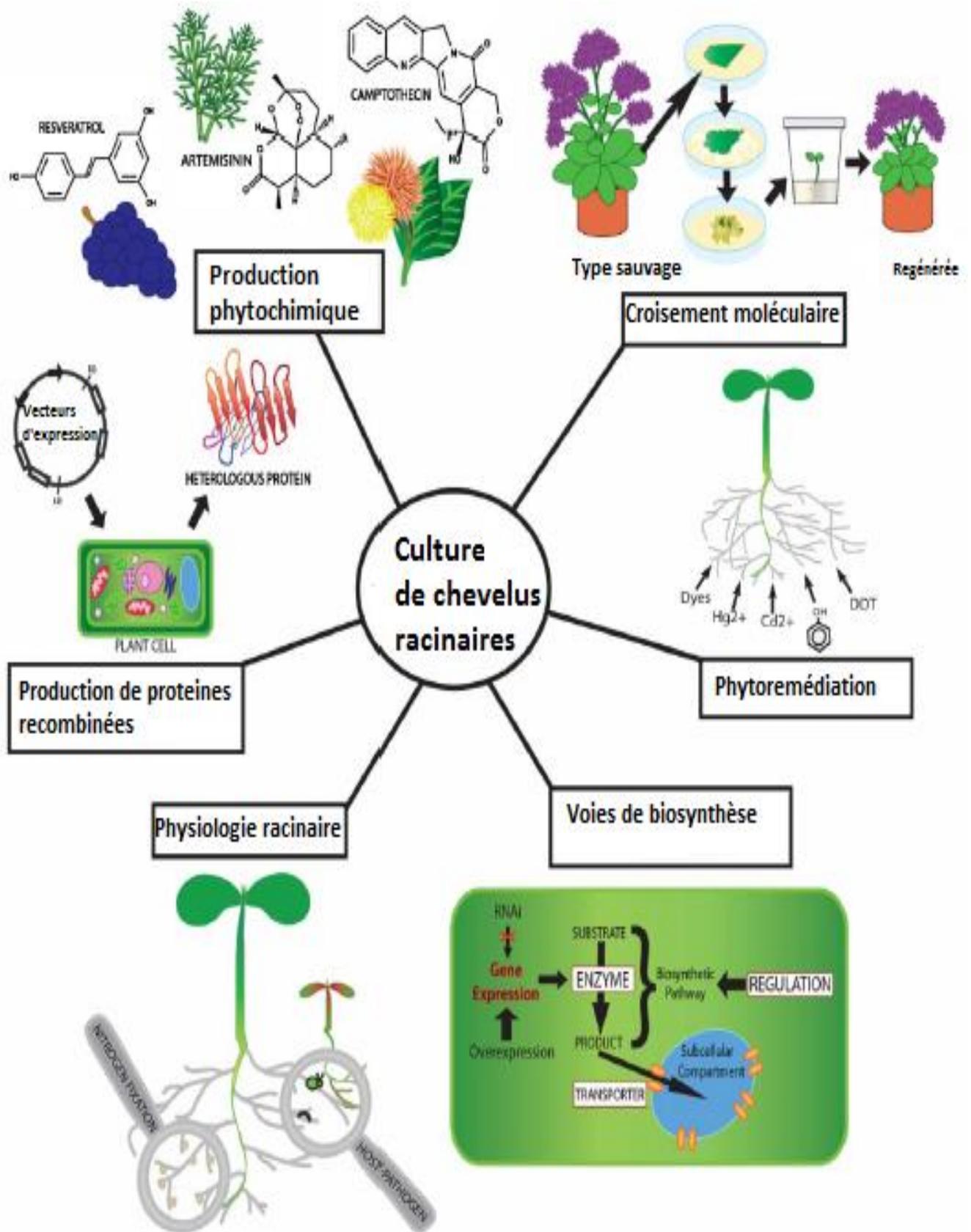


Figure 6 : Différentes applications biotechnologiques des cultures de racines transgéniques (Ono et Tian, 2011).

IV. Optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques par élicitation

Les plantes répondent à l'attaque des pathogènes, des ravageurs ainsi qu'aux agressions occasionnées par les conditions du milieu environnant, par l'activation d'une série de mécanismes de défense qui amènent au déclenchement de la biosynthèse des métabolites secondaires dont les phytoalexines et les alcaloïdes (**Hutcheson, 1999 ; He *et al.*, 2002 ; Vasconsuelo et Boland, 2007**). Le stress biotique ou abiotique est donc un facteur important dans la détermination de la composition chimique et de l'activité thérapeutique des plantes médicinales. La stimulation active de la réponse au stress dans le but de produire une réponse chimique désirée est appelée : Elicitation ; produisant une connexion entre le stress des plantes et leur phytochimie(**Ono et Tian, 2011**).

Le terme « éliciteur » s'appliquait à l'origine aux molécules susceptibles d'induire la production de métabolites secondaires (**Gadzaska *et al.*, 2004**). Il est maintenant utilisé pour l'ensemble des molécules qui induisent des réactions de défense chez les plantes (**Montesano *et al.*, 2003**).

1. Éliciteurs abiotiques

Les éliciteurs abiotiques sont des substances dont l'origine n'est pas biologique et dont les sels inorganiques sont les plus dominants. Ces derniers, présentent des facteurs physiques agissant en tant qu'éliciteurs comme le Cu, les ions Cd et le Ca²⁺ (**Veersham, 2004**).

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

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

2. Eliciteurs biotiques

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

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

- Directement libérés par des micro-organismes et reconnus par la cellule de la plante (enzymes, fragments de paroi cellulaire) ;
- Formés par l'action des micro-organismes sur la paroi cellulaire de la plante (fragments de pectines et autres) ;
- Formés par l'action des enzymes de la plante sur les parois des cellules microbiennes (chitosane, glucane) ;

Dans de nouvelles approches en vue d'améliorer les rendements agricoles ; des micro-organismes fongiques (Yu *et al.*, 2016) et bactériens (Glick, 1995), qui en interaction avec les plantes peuvent provoquer une réponse défensive de ces dernières et accélérer leur croissance, sont utilisés comme éliciteurs en alternative aux produits chimiques. En effet, Certains champignons tels que *Gliocladium*, *Trichoderma* et *Ampelomyces* avirulents, symbiotiques et antagonistes de champignons phytopathogènes, sont capables de stimuler la croissance racinaire et provoquer la synthèse de molécules de défense de la plante (Vinale *et al.*, 2008).

Les rhizobactéries comme les PGPRs « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (tels que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Streptomyce*) ayant le pouvoir de coloniser les racines des végétaux et exercer des effets bénéfiques sur ces dernières (par divers mécanismes qui se traduisent en une phytostimulation), représentent actuellement le groupe de bactéries le plus utilisé en élicitation biotique (Antoun et Kloepper., 2001, Nelson, 2004).

3. Utilisation des PGPRs

Les effets positifs des PGPRs sur la plante se réalisent par des mécanismes d'action directs ou indirects (Glick, 1995). Bien que la différence entre les deux n'est pas toujours

évidente. En général, les mécanismes indirects se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs interagissent avec la plante et affectent directement son métabolisme (**Iqbal et al., 2008**). Parmi les effets bénéfiques des PGPRs sur les plantes figure la stimulation de la germination des graines et du développement végétal ainsi que l'amélioration de l'absorption des éléments minéraux et l'utilisation de l'eau (**Jacoud et al., 1999 ; Dobbelaereet al., 2002**). Un autre aspect de l'effet direct des PGPRs est l'induction de la résistance de la plante à divers agents de stress biotiques tels que les bactéries, les champignons et les nématodes phytopatogènes, ainsi qu'aux agents de stress abiotiques tels que la sécheresse, le froid, la salinité et les polluants (**Sturzet al., 2000**).

Les PGPRs peuvent stimuler la croissance végétale par le biais de la production de signaux chimiques ou de phytohormones telles que les auxines, cytokinines et gibbérellines (**Lambrecht et al., 2000**). Cette stimulation touche la plante entière ou parfois les racines uniquement en produisant de nouvelles racines et par conséquent l'amélioration de la nutrition (**Yang et Crowley, 2000**). L'architecture des racines peut être influencée par l'effet des PGPRs. Ces dernières peuvent induire une ramification très prononcée des racines leur permettant de prospecter un volume du sol plus important, et par conséquent assurer une meilleure nutrition à la plante (**Rolfe et al., 1997**). En général, les PGPRs peuvent améliorer l'acquisition des éléments nutritifs majeurs (N, P, K) par la plante (**Wu et al., 2005 ; Shaharoon et al., 2007**), l'assimilation et la solubilisation du phosphate organique et l'absorption du nickel (Ni) (**Zaidi et al., 2006**).

Certaines PGPRs peuvent stimuler ces mécanismes et amènent la plante toute entière à un état de résistance appelée la résistance systémique induite, RSI (Induced Systemic Resistance ISR) (**Pieterse et al., 1996 ; Van Loon et al., 1998**). Par opposition, la résistance systémique acquise RSA (Systemic Acquired Resistance SAR) est induite par les pathogènes (**Ryals et al., 1997**). Dans le cas de l'RSI, certaines études ont démontré l'initiation de réactions de défense étroitement liées à l'établissement de barrières chimiques et/ou physiques pour empêcher l'entrée des pathogènes. Les réactions induites incluent non seulement la formation de barrières structurales enrichies en lignines et en callose, mais aussi l'accumulation de composés phénoliques à potentiel antifongique direct (**Albert et al., 1987**). Les barrières structurales se forment souvent dans des zones bien délimitées entre la membrane plasmique et la paroi végétale, aux sites de pénétration potentielle de l'agent pathogène (**Benhamou et al., 2000**). Les enzymes associées à l'effet RSI participent dans le renforcement des potentialités de défense de la plante sur le plan physique (lignification), ou

sur le plan chimique (quinones) en consolidant les barrières de défense naturelle de la plante (Silva *et al.*, 2003).

La bactérisation des plantes, par les PGPRs, provoquerait des modifications physiologiques et biochimiques chez diverses espèces végétales (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Parmi les modifications, il a été noté un profond changement métabolique (Jeun *et al.*, 2004), incluant l'accumulation des protéines PR (ProteineRelated), l'accumulation des β -1.3-glucanases, la synthèse de phytoalexines (Van Loon *et al.*, 1999) et d'autres métabolites secondaires (Van peer *et al.*, 1991).

4. Utilisation des *Pseudomonas*

Des travaux réalisés dans des conditions de culture *in-vitro*, ont mis en évidence l'effet éliciteur des *Pseudomonas* sur la croissance et le développement de vitro-plants (Digat, 1989 ; Van Loon *et al.*, 2003). D'autres travaux de Kloepper *et al.*, (1980) ont rapporté effets favorables sur le développement racinaire, sur l'initiation foliaire et l'allongement des entre-nœuds des vitro-plants. Les effets positifs de ces rhizobactéries restent aussi perceptibles après les phases d'acclimatation où les conséquences sont notables, particulièrement sur la vigueur des plants (Budi *et al.*,1997 ; Mellomacello., 2002).

Par ailleurs, Rahmoun *et al.* (2017) ont étudié l'effet des PGPRs dont *Pseudomonas* sur la production d'hyoscyamine au niveau des racines (entretenues en hydroponie) de *Datura stramonium*.

Les effets bénéfiques des *Pseudomonas fluorescens* sur la plante sont associés à la production de métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, phytohormones), dont la synthèse est influencée par le métabolisme basal. Ces métabolites représentent des éliciteurs pour la plante (Latour, 1997).

Le contrôle de l'expression des gènes est un mécanisme essentiel pour la modulation de la production des métabolites secondaires (Sarniguet *et al.*, 1995 ; Schnider *et al.*, 1995). Des activateurs et des répresseurs spécifiques sont nécessaires pour la régulation de la transcription des gènes des métabolites de bio-contrôle (Delany *et al.*, 2000).

5. Synthèse de quelques travaux d'élicitation chez les *Datura* :

Plusieurs protocoles basés sur l'élicitation ont été développés pour améliorer le rendement en alcaloïdes tropaniques (Moharrami *et al.*, 2017). Le tableau 1 résume quelques

recherches ayant abouti à des taux de production d'alcaloïdes tropaniques importants chez les différentes espèces de *Datura* :

Tableau 1 : Résumé de quelques travaux d'élicitation de la production des alcaloïdes tropaniques chez *Datura*.

Espèce	Organe de production	Eliciteurs	Alcaloïdes Extraits	Référence
<i>D. stramonium</i>	Racines de la plante entière	Acide salicylique Lysinibacillus fusiformis Pseudomonas plecoglossicida	Hyoscyamine	Rahmounet <i>et al.</i> , 2017
<i>D. stramonium</i> <i>D. tatula</i> <i>D. innoxia</i>	Racines transgéniques	Stress salin (CaCl ₂ , KCl)	Hyoscyamine	Harfi <i>et al.</i> , 2015
<i>D. metel</i>	Racines transgéniques	AgNO ₃ Staphylococcus aureus Bacillus cereus Nanoparticules de cuivre	Atropine	Shakeran <i>et al.</i> , 2015
<i>D. stramonium</i>	Suspensions cellulaires	Nitrates d'ammonium CaCl ₂ Kinetine	Hyoscyamine	Iranbakhsh <i>et al.</i> , 2007
<i>D. stramonium</i>	Racines de la plante entière	Chlorsulfuron Glyphosate MeJa	Tropine	Fan Deng, 2005
<i>D. stramonium</i>	Racines transgéniques	Methyljasmonate (MeJa) Extrait de levure Oligogalacturonide	Littorine Hyoscyamine Scopolamine	Zabetakis <i>et al.</i> , 1998
<i>D. stramonium</i>	Racines transgéniques	Cellulase CuSO ₄ CdCl ₂ Pb(NO ₃) ₂ HAuCl ₄	Hyoscyamine Lubimine 3-Hydroxy lubimine	Jutith <i>et al.</i> , 1990

1. Matériel végétal : induction des chevelus racinaires ; sélection et mise en culture

Le matériel végétal de base utilisé pour cette étude a été obtenu par Harfi (2009) et entreteu en culture jusqu'à 2011. Il est constitué de racines transgéniques (chevelus racinaires) de *D.stramonium*, *D.tatula* et *D.innoxia* induits par inoculation d'*A. rhizogenes* souche A4 sur des hypocotyles issus de *vitro-semis*.

1.1.Obtention des *vitro-semis*

Les graines des trois espèces utilisées pour l'induction ont été récoltées d'Oran, de Sikda et de Tizi-Ouzou pour *D.stramonium*, *D.tatula* et *D.innoxia* respectivement par le Pr H. Abdelkrim et maintenues en collection depuis l'année 2007. Elles sont préalablement scarifiées à l'aide du papier verre 80 points.Elles sont ensuite désinfectées dans de l'Ethanol 70% pendant 30 secondes puis trempées dans l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10minutes. Ces étapes sont suivies par plusieurs rinçages dans de l'eau distillée stérile puis un séchage avec du papier filtre avant la mise en culture (**Khelifi-Slaoui et al., 2005**).

Les graines sont semées dans des tubes contenant 20ml de milieu de culture MS (Annexe 1) (**Murashige et Skoog, 1962**) contenant 7g/l d'agar et 20g/l de saccharose. Le semi est placé dans une chambre de culture à une température de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ et sous une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité.

1.2.Inoculation des hypocotyles par *Agrobacterium rhizogenes* A4

Les hypocotyles des vitrosemis âgés de deux mois subissent une inoculation avec *Agrobacteriumrhizogenes* souche A4.Cette dernière est originaire de la Californie (Etat-Unis), elle est obtenue par **Dubrin (Bouzar, 1983)**. C'est une souche à agropine (**Lambert et al., 1989**). L'inoculum bactérien préalablement préparé à partir de cultures activées incubées pendant 72h sur milieu YEM (Annexe 1), est déposé à l'aide d'une seringue au niveau de la section des fragments d'hypocotyles de 1cm. Ces derniers sont ensuite mis en culture sur milieu MS avec une polarité inversée dans l'obscurité à $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (**Amdoun et al., 2005**).

Les racines qui apparaissent après inoculation des hypocotyles sont coupées en fragments de 2cm de longueur puis transférés dans des boites de pétri contenant 20ml de milieu MS additionné de 250 mg/l d'antibiotique (Céfotaxime) afin d'éliminer la bactérie. Les lignées racinaires qui résultent de la transformation génétique par *Agrobacterium*sont

entretenues dans des boîtes contenant 20ml de milieu de culture B5 semi solide additionné de 5g d'agar et de 20g/l de saccharose (**Gamborg et al., 1968**). Le maintien des cultures des racines transformées est assuré grâce au transfert de ces dernières chaque trois semaines sur du milieu B5 solide fraîchement préparé après excision de l'extrémité des racines.

Chaque racine isolée est considérée comme une lignée unique. Les racines induites par *A. rhizogenes* sont issues d'événements de transformation différents (**Dhakulkar et al., 2005**). Selon la quantité de biomasse et d'hyoscyamine produite par les lignées, une sélection est réalisée, certaines de ces dernières sont sélectionnées et conservées, les racines à faible croissance ou qui produisent des cals sont systématiquement éliminées. Une lignée de chaque espèce est gardée pour obtenir à la fin trois lignées DS ; DT et DI sélectionnées par **Harfi** (2009) et qui serviront comme matériel végétal de base de notre étude.

2. Confirmation moléculaire de l'état transgénique des lignées racinaires

2.1. Choix des amorces

L'ADN-T de l'*Agrobacterium* est constitué de deux segments le TR-DNA (Right DNA) qui porte les gènes de synthèse de l'auxine et le TL-DNA (Left DNA) qui porte les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* responsables de la différenciation des cellules racinaires sous l'influence des auxines (**Tao and Li, 2006**). L'ADN-T (TL et TR), le gène de virulence (*Vir*) et le gène chromosomique de virulence (*Chv*) constituent les trois éléments nécessaires pour le transfert de l'ADN-T d'*A. rhizogenes* aux cellules de la plante. Les 04 loci root (*rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD*) fournis par le TL-DNA différencient le plasmide RI du plasmide TI d'*A. tumefaciens* (**Chavarri et al., 2010**). Les segments TR-DNA et TL-DNA peuvent être transférées aux cellules hôtes séparément ou ensemble, avec un nombre variable de copies (**Martins et al., 2015**).

Le choix de l'amplification du gène *rolB* pour la confirmation de la transformation génétique des trois lignées racinaires DS, DT et DI est basée sur son rôle essentiel dans la sécrétion des auxines et donc dans l'induction des racines transgéniques, tandis que les *rolA*, *C* et *D* agissent en synergie pour promouvoir la transformation (**Welander et Zhu, 2006**).

La transformation génétique est normalement effectuée pour les trois lignées DS, DT et DI (sélectionnées selon la biomasse et la teneur en hyoscyamine). Ainsi, pour confirmer le

transfert des gènes bactériens vers les chevelus racinaires sélectionnés une amplification du gène *rolB* est réalisée par PCR, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Les amorces utilisées pour amplifier le gène *RolB* sont :

Amorce F (Forward): 5'- ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA -3'

Et l'amorce R (Reverse) : 5'- TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC - 3'

2.2.Extraction des ADNs, PCR et électrophorèse

a. Extraction

Les ADNs sont extraits des trois lignées, de la bactérie qui sert de témoin positif et des racines qui n'ont pas subi la transformation et qui représentent le témoin négatif. L'extraction de l'ADN à partir de 100mg des chevelus racinaires et du témoin négatif (racines non transformés) a été réalisée selon la méthode fournie avec le kit Nucleospin plant II (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Germany). Pour l'extraction de l'ADN bactérien : un choc thermique a été appliqué dans un thermocycler suivi d'une centrifugation ; le surnageant a été récupéré (**Sambrook, 1989**).

b. PCR

Le mélange réactionnel de PCR est composé de 20 µl contenant 2 µl de dNTP (10mM), 2 µl d'ADN (100ng), 0.4 µl de Green Taq Polymérase (2U/ µl), 2 µl du tampon Taq polymérase (10X), 0.8µl de chaque amorce (10 µM), 2 µl de Mg Cl₂ (10X) et 10 µl d'eau ultra pure. Une dénaturation initiale dans le thermo-cycler à 94°C pendant 4minutes puis 30 cycles de PCR ont été réalisés, (chacun avec dénaturation à 94°C/ 1minute, hybridation à 57°C/1minute et élongation à 72°C/1minute) et en fin une élongation finale à 72°C/ 10minutes.

c. Electrophorèse

La concentration du gel d'agarose est de 1.2%, le révélateur est le BET (0,5 µg/ml) mélangé dans l'agarose avant polymérisation. La révélation se fait dans un transilluminateur sous UV. La durée de l'électrophorèse est de 90 minutes. Le marqueur moléculaire est le 1Kilo base plus.

3. Suivi de l'évolution de la biomasse moyenne et de la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques pendant cinq années de culture

Les lignées racinaires DS, DT et DI sélectionnées par **Harfi (2009)** sont maintenues en culture sur un milieu B5 depuis leur induction en 2009 jusqu'à 2011. Le milieu est renouvelé chaque 20 jours pour conférer aux lignées racinaires des conditions de croissance stables dans un milieu riche et neuf.

Une étude comparative de l'évolution de la biomasse et de la production d'hyoscyamine sur une période de cinq ans (2011, 2012, 2013, 2014 et 2015) a été réalisée (présente étude). Une récolte est effectuée tous les 6 mois.

Les paramètres mesurés sont : la biomasse moyenne et la teneur moyenne en hyoscyamine. Le nombre de répétitions est de 3 pour chaque lignée ; pour chaque paramètre.

4. Elicitation des chevelus racinaires

Les élicitations biotique et abiotique ont été réalisées pendant les deux années 2013 et 2014.

4.1. Elicitation biotique

4.1.1. Origine des souches de *Pseudomonas*

Les souches bactériennes de *Pseudomonas* utilisées dans notre travail, font partie de la collection microbienne du laboratoire de phytopathologie. Elles nous ont été fournies par le Professeur Benchabane M. (Laboratoire de protection et de valorisation des ressources agrobiologiques. Département d'Agronomie, Université Saad Dahlab — Blida). L'origine des souches est mentionnée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Origine des souches de *Pseudomonas*

	Référence	Origine d'isolement	Origine géographique	Année d'isolement
<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Fluorescens</i>	C7R12	Lin <i>Linum usitassinum</i>	France	1989
	P64	Tomate <i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i>	Algérie	1992
	P66	Tomate <i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i>	Algérie	1992
<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	<i>P.putida</i>	Pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	Algérie	1992

4.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien

A partir de cultures conservées sur milieu King B (Annexe 1) (King *et al.*, 1954). Les souches bactériennes ont été activées en effectuant plusieurs repiquages à 30 °C pendant 24h. A l'aide d'une anse stérile, la crème bactérienne âgée de 48 h est raclée délicatement et mise en suspension dans 100 ml d'eau distillée stérile, puis bien homogénéisée.

Pour déterminer la concentration de cette suspension, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de $\lambda = 600$ nm (Vijayan *et al.*, 2000). Cette suspension a été ajustée par l'eau distillée stérile à une concentration de 10^8 ufc/ml. Une quantité de 5 ml dans 50 ml de milieu de culture a été prélevée pour l'élicitation afin d'avoir une concentration entre 10^7 et 10^8 ufc/ml de milieu B5.

4.1.3. Elicitation

Les essais de l'élicitation par les inoculum bactériens sont réalisés sur le milieu B5 liquide additionné de 30 g/l de saccharose. Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave (121 °C pendant 20 mn) dans des Erlenmeyer de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de culture par Erlenmeyer.

Le matériel végétal primaire est constitué des extrémités de trois racines transgéniques d'environ 3 cm de longueur pour chacune des lignées racinaires sélectionnées des trois espèces étudiées (DS, DT et DI). Les essais sont conduits dans l'obscurité à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sous agitation à une vitesse de 100 rpm et pendant 20 jours de culture.

L'étude est réalisée en factoriel complet combinant les trois lignées racinaires retenues avec les quatre souches bactériennes (C7R12, Pf64, Pf66 et *P.putida*) et deux temps de contact (5 jours et 10 jours) comme le montre le tableau 3.

Tableau 3: Elicitation biotique des chevelus racinaires

Lignées racinaires	Temps de contact (jours)	Souches
L _{DS}	5 et 10	Pf64
		Pf66
		C7R12
		<i>P.putida</i> PP01
L _{DT}	5 et 10	P64
		P66
		C7R12
		<i>P.putida</i>
L _{DI}	5 et 10	P64
		P66
		C7R12
		<i>P.putida</i> PP01

4.2. Elicitation chimique (abiotique) par le nitrate d'argent AgNO₃

La solution d'AgNO₃ d'une concentration de 10^{-3} M (Pita alvarez, 2000) est préparée dans de l'eau distillée, puis le pH est ajusté à 5.6. La préparation est stérilisée par autoclavag à 120°C pendant 20 minutes. Le volume utilisé pour l'élicitation de chaque échantillon est de 5ml. L'éliciteur est appliqué en deux temps de contact de 24h et de 48h, cela avant la récolte des chevelus racinaires.

Tableau 4 : Elicitation des chevelus racinaires avec 10^{-3} M d'AgNO₃.

Lignées racinaires	Temps de contact (h)
L _{DS}	24
	48
L _{DT}	24
	48
L _{DI}	24
	48

5. Paramètres mesurés

Les paramètres mesurés, après 20 jours de culture sont :

_ Biomasse moyenne qui correspond au poids sec (g MS) pour estimer l'effet des éliciteurs (bactériens (PGPRs) ou chimique (AgNO₃) sur la croissance des chevelus racinaires. Le poids sec est obtenu après séchage des chevelus racinaires dans l'étuve à 60°C pendant 24 heures.

_ La teneur moyenne en hyoscyamine et en scopolamine (mg/g MS). Afin d'évaluer l'effet des éliciteurs sur la production de ces alcaloïdes, ces derniers ont été extraits puis dosés par LC-MS-MS.

Les moyennes sont calculées sur la base de 3 répétitions aussi bien pour la biomasse moyenne que pour la teneur moyenne en hyoscyamine et en scopolamine (3 copies de chaque lignée racinaire). Le témoin correspond à la culture des lignées racinaires sur le milieu B5 et dans les mêmes conditions, avec un ajout de 5 ml d'eau distillée stérile au même temps que l'élicitation par l'inoculum bactérien et la solution d'AgNO₃.

6. Extraction des alcaloïdes tropaniques

Pour extraire les alcaloïdes contenus dans lignées racinaires ; nous avons adopté le protocole de **Amdoun et al. (2009)** qui est basé sur le principe que les alcaloïdes se comportent comme des sels dans une solution acide et sont sous forme organique dans une solution basique. Le protocole d'extraction est le suivant :

- Broyage dans un broyeur (Geeno-Grinder) des chevelus racinaires afin de récupérer la poudre ;

- Dissoudre 50 mg de matière sèche de chevelus racinaires dans une solution acide d'HCl 0,1N et agitation pendant 10 minutes, suivie d'une filtration du mélange ;

- Ajustement du pH à une valeur proche de 10 par une solution d'ammoniac (NH_3) ;
- Extraction avec du chloroforme (CHCl_3) à volume double (2v CHCl_3 :1v) suivie d'une agitation pendant 20 minute;
- Séparation des deux phases (chloroforme et solution minérale) dans une ampoule à décanter;
- Addition d'une pincée de sel anhydre (Na_2SO_4) pour absorber les dernières microgouttelettes d'eau qui restent ;
- Filtration ;
- Evaporation partielle de la solution du chloroforme à l'aide du rotavapor réglé à 80 °C. Dans ces conditions l'évaporation partielle se fait après environ 5 min ;
- Evaporation complète du chloroforme dans un bain marie réglé à 60°C jusqu'à séchage complet.
- les échantillons sont repris dans 1 ml de méthanol.

7. Dosage des alcaloïdes tropaniques par LC-MS-MS

Pour chaque échantillon 10 μ l sont injectés dans une colonne de silice C18 (150 mm \times 2.1 mm) (Grace/Alltech, USA). Les deux phases mobiles sont : la phase mobile (A) constituée d'eau distillée acidifiée d'acide formique à 1% et la phase mobile (B) constituée d'acétonitril. Le débit des phases mobiles est de 0.1 ml min⁻¹.

L'atropine et la scopolamine pures servent comme standards et sont fournies par Sigma-Aldrich, USA.

8. Analyses statistiques

❖ L'analyse de la variance 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 Statistica 11.0.

❖ Les barres sur les graphiques correspondent à l'écart par rapport à la moyenne pour chaque échantillon au seuil de 5%. Les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5 %.

1. Confirmation par PCR de la transformation génétique des lignées racinaires par *Agrobacteriumrhizogenes* A4

De point de vue morphologique, les aspects des lignées (Planche1) montrent bien que les racines obtenues chez les trois lignées et par rapport au témoin sont transgéniques.

Par ailleurs, l'amplification (PCR) montre la présence d'une bande de 400 Pb spécifique au *rolB* (**white et al., 1985**) dans les trois puits du gel d'électrophorèse correspondant à l'ADN des lignées racinaires, ce qui confirme que le *rolB* qui est un marqueur de la transformation est bien transféré de l'*A.rhizogenes* aux cellules de la plante induisant ainsi la formation des racines transgéniques chez DS, DT et DI. La comparaison avec le témoin négatif (racines de la plante) révèle un taux de transformation de 100% (figure : 7).

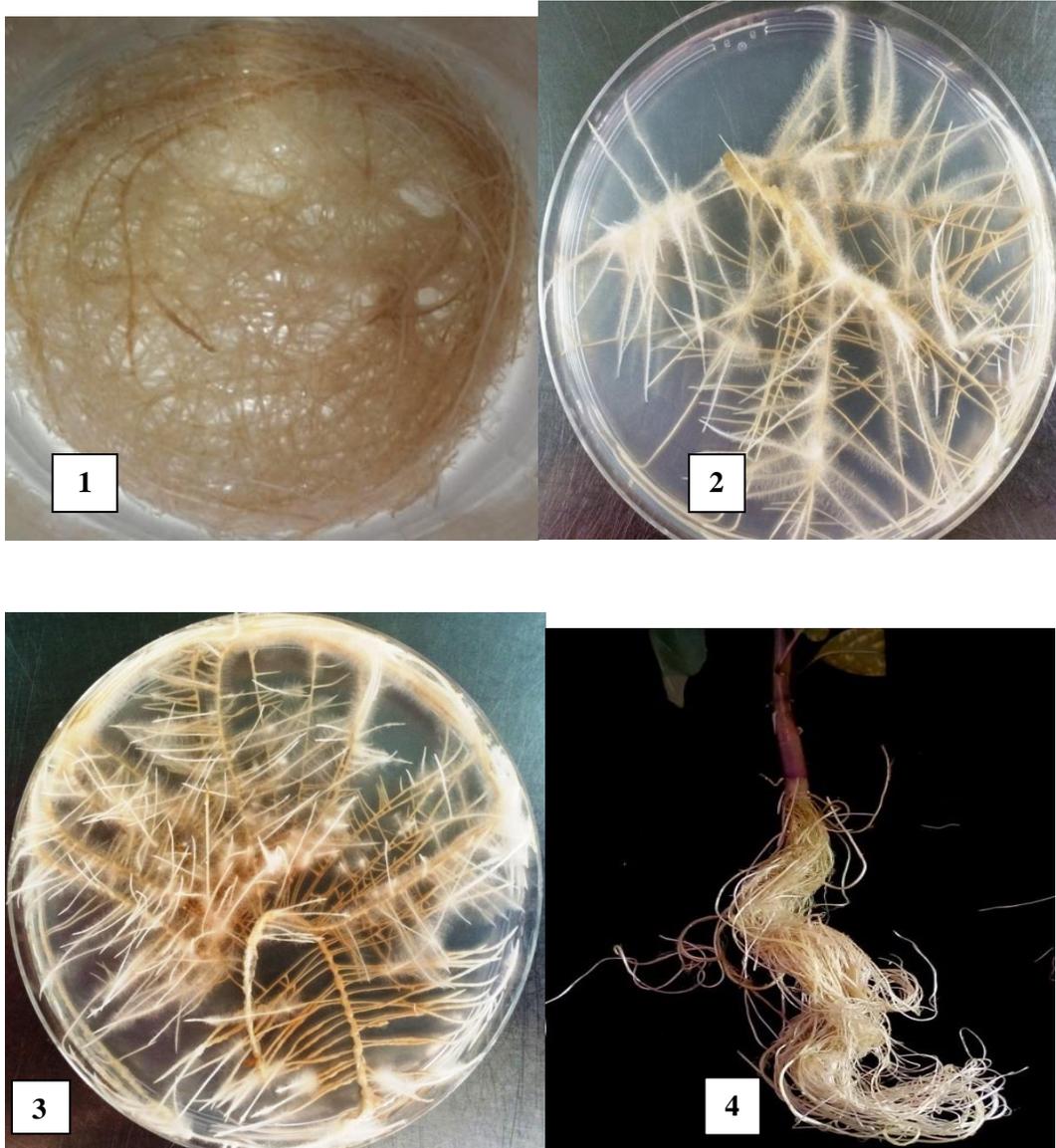


Planche 1: Aspect morphologique des lignées racinaires de *Datura* induites par transformation génétique via la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*, après 20 jours de culture sur milieu B5. 1 : lignée DS G : 0,66, 2 : lignée DT G : 0,66, 3 : DI G : 0,66 et 4 : racines non transformées de *Datura tatula*.

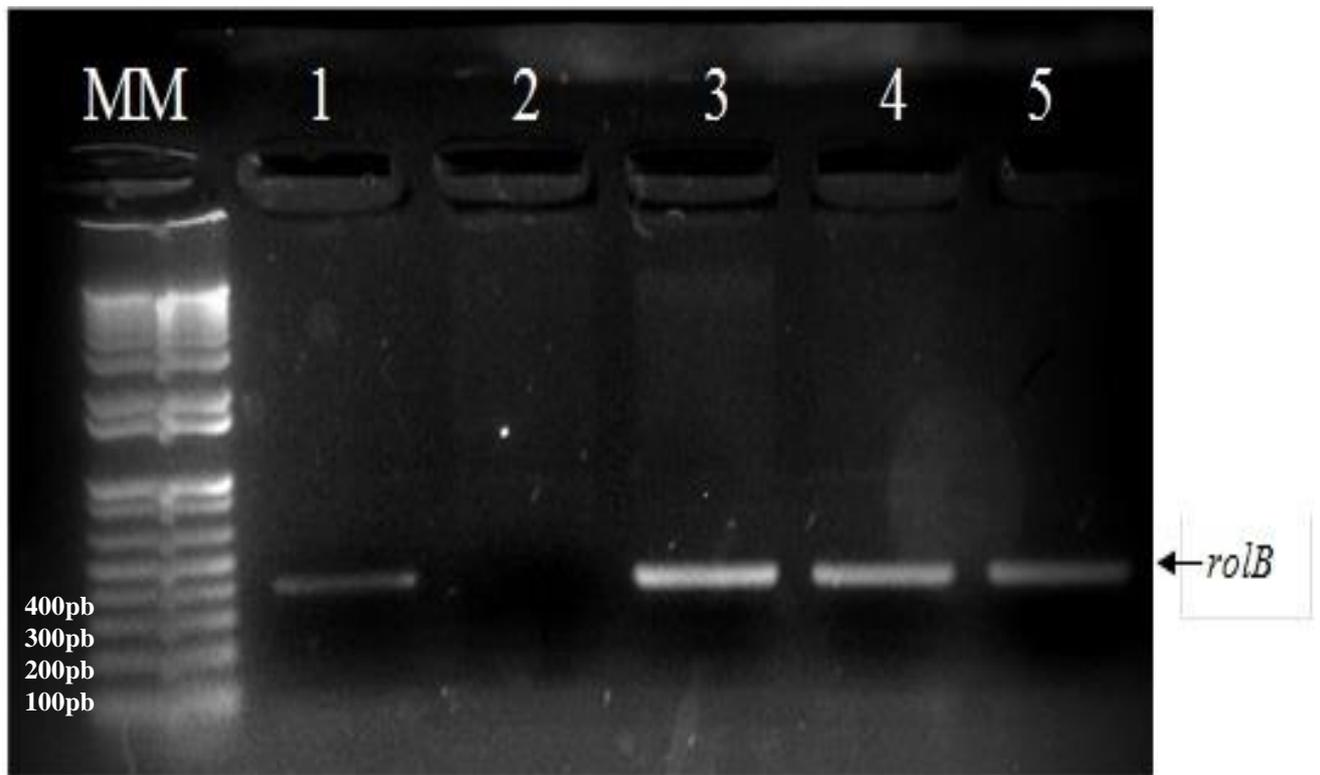


Figure 7 : Profile électrophorétique aprèsPCR d'un fragment du gène *rolB*(400Pb). MM : marqueur moléculaire 1 kb plus ; 1 : témoin positif (ADN plasmidique d'*A.rhizogenes*) ; 2 : témoin négatif (ADN de racines de *Datura* non transformées) ; 3, 4 et 5 : ADNs extraits à partir de chevelus racinaires de DS, DT et DI respectivement.

2. Analyse quantitative des taux des alcaloïdes majeurs des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI à la première année de culture

L'analyse statistique révèle un effet très hautement significatif des lignées sur la teneur moyenne en alcaloïdes. La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre l'existence de trois groupes homogènes (Annexe 3). La lignée DT est la plus riche en hyoscyamine (groupe A).

L'analyse quantitative des deux principaux alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine) (en 2010) des trois lignées racinaires DS, DT et DI illustrée dans la figure 8, montre que l'hyoscyamine est le principal alcaloïde chez les trois lignées racinaires. En effet, sa teneur moyenne est nettement supérieure à celle de la scopolamine pour les trois espèces. La teneur moyenne (8,570 mg/g MS) la plus élevée est enregistrée chez DT. Pour cette lignée ; la teneur moyenne de scopolamine est 175 fois moins importante que celle de l'hyoscyamine (0.049 mg/ g MS). Les teneurs moyennes d'hyoscyamine des deux lignées DS et DI sont de 8,16 mg /g MS chez DS et 3,15 mg/g MS chez DI. Cette dernière est plus productive en scopolamine (0.179 mg/g MS) que DT (0.049 mg/g MS) et DS (0,098mg/g MS).

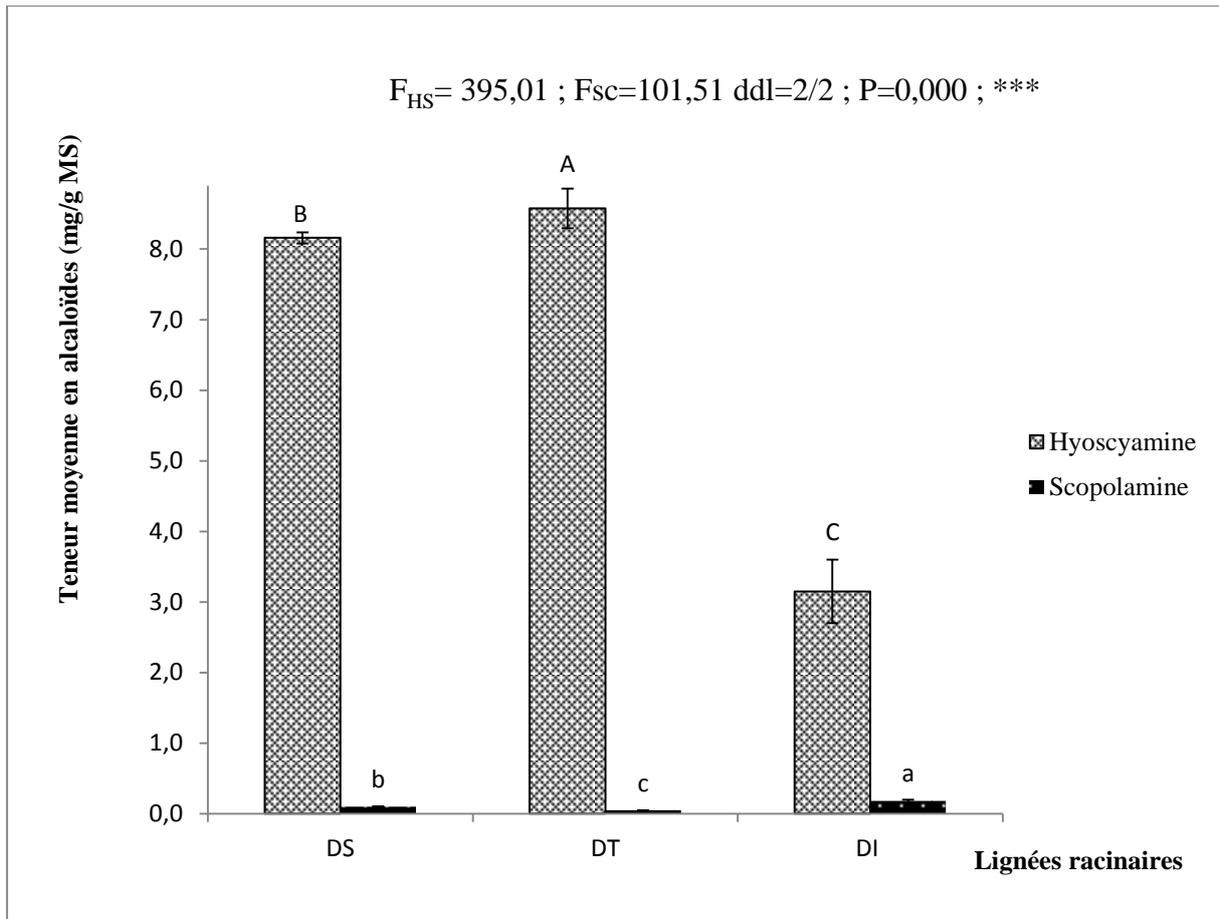


Figure 8 : Teneur moyenne en hyoscyamine et scopolamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI induites en (2009) par *A. rhizogenes*, en première année de culture (Harfi, 2009).

3. Evolution des lignées racinaires transgéniques pendant cinq années de culture

Les trois lignées racinaires DS, DT et DI ont été maintenues en culture sur milieu B5 (Annexe 1) qui a été renouvelé chaque 20 jour.

3.1. Evolution de la biomasse moyenne

Les lignées racinaires sélectionnées par Harfi en 2009 produisaient en moyenne une biomasse de $0,205 \pm 0,002$ g MS pour la lignée DS, $0,295 \pm 0,006$ g MS pour la lignée DT et $0,229 \pm 0,004$ g MS pour la lignée DI (Harfi, 2009).

Le suivi de la biomasse (figure : 9) pendant la période de culture montre qu'elle varie en fonction de la lignée et de l'année de culture. Les résultats montrent que la lignée racinaire DT est la plus performante en terme de croissance, pour les 5 années de culture. Cependant, d'année en année la biomasse varie pour chaque lignée. Les meilleurs résultats sont obtenus à la première année de sélections des trois lignées racinaires. Pour cette première année 2009, la lignée DT a produit 0.295 g MS par rapport aux deux autres lignées DS et DI avec respectivement 0.205g MS et 0.229 g MS.

A la deuxième année de culture, une chute de croissance a été remarquée pour les trois lignées. En effet des pertes de poids de 42%, 12% et de 62% ont été enregistrées pour DS, DT et DI respectivement en comparaison avec les valeurs de la première année. La croissance des trois lignées est donc moins importante qu'à la première année de leur induction.

La chute de croissance continue en troisième, quatrième et cinquième année de culture pour les lignées racinaires DS DT et DI pour atteindre les minimums de 0,200g MS chez la lignée DT, 0,088g chez DI et 0,076g MS chez DS à la dernière année, soient des pertes de 47%, 195% et de 172% chez DT, DI et DS respectivement. Ainsi plus les lignées prennent de l'âge plus leur croissance diminue.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de l'année de culture sur la biomasse moyenne des racines transgéniques. Le teste du Tukey au seuil de 5% révèle 3 groupes homogènes.

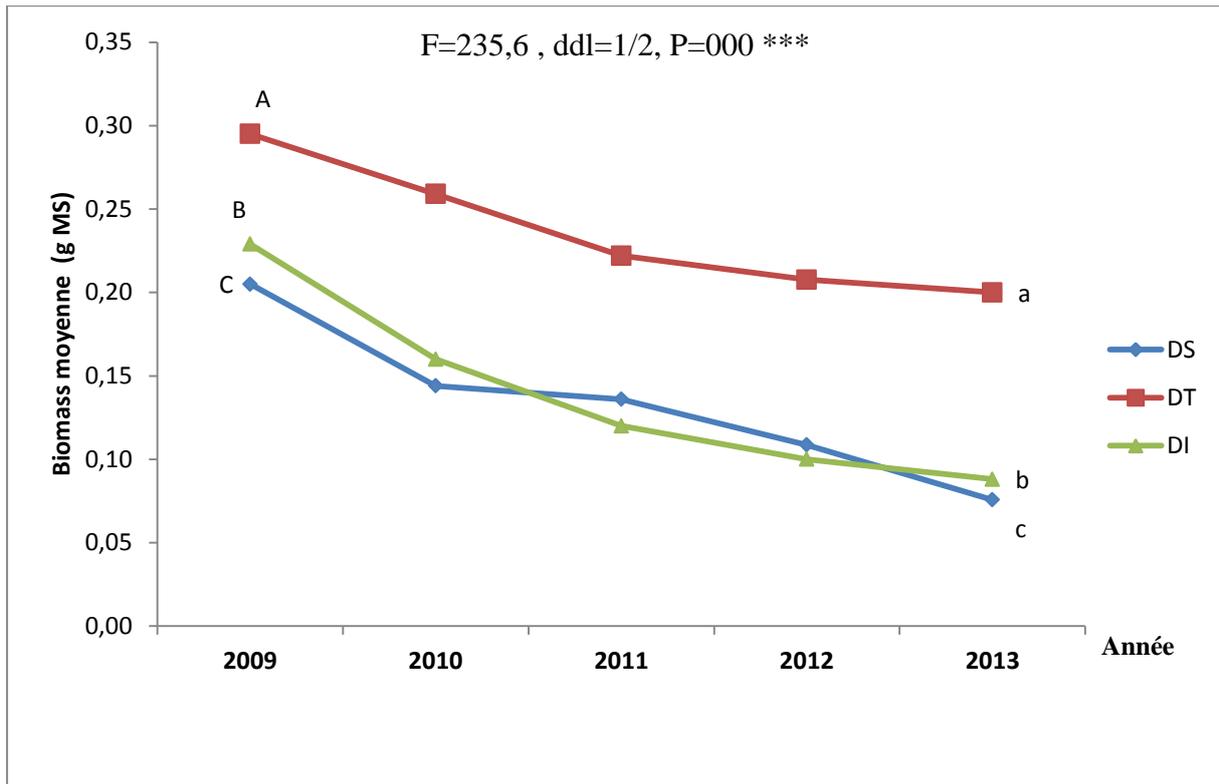


Figure 9 : Evolution de la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques DS DT et DI induite en 2009 par *A. rhizogenes*, en fonction des années de culture (2009, 2010, 2011, 2012, 2013).

3.2. Evolution de la teneur moyenne en hyoscyamine

La teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires sélectionnées varie en fonction de la lignée et de l'année de culture (figure : 10). La lignée DT est la plus performante en terme de production d'hyoscyamine pour les trois premières années avec un maximum à la première année 8,575 mg/ g MS. Ce résultat est proche de celui de la lignée DS qui a produit 8,159 mg/g MS. Alors que DI a enregistré la teneur moyenne en hyoscyamine la plus faible à la première année de production avec 3,153 mg/g MS.

Une chute de production d'hyoscyamine a été remarquée à la deuxième année chez les deux lignées racinaires DS et DT avec des pertes de 36% et de 4% respectivement. Cependant une hausse de production d'hyoscyamine remarquable a été enregistrée chez la lignée DI où la teneur moyenne en hyoscyamine est passée de 3,153 mg/g MS à 6,856 mg/g MS soit une augmentation de 117 %.

A la troisième année de culture des lignées racinaires, la synthèse d'hyoscyamine a diminué encore chez les trois lignées avec des pertes de 11% chez DS, 12% chez DT et 12% chez DI. Pour cette dernière et malgré la diminution de la teneur moyenne en hyoscyamine par rapport à l'année précédente ; celle-ci est restée plus élevée de 92% en comparaison avec la première année de mise en culture.

Après quatre ans de culture, la teneur moyenne en hyoscyamine a baissé encore de 31 % chez DS, 102% chez DT et 30% chez DI.

Une stabilisation de la teneur moyenne en hyoscyamine chez la lignée DT a été enregistrée durant la cinquième année de production. Tandis que pour DS et DI, la teneur a chuté encore pour atteindre 3,594 mg/g MS chez DI soit une perte de 14% et 1,137 mg/g MS chez DS, soit une perte de 64%.

A partir de la deuxième année de culture, la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI chute au fur et à mesure des années de culture suivantes.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de l'année de culture sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires. Le test de Tukey au seuil de 5% révèle trois groupes homogènes pour la première et la cinquième année de culture (Annexe 3).

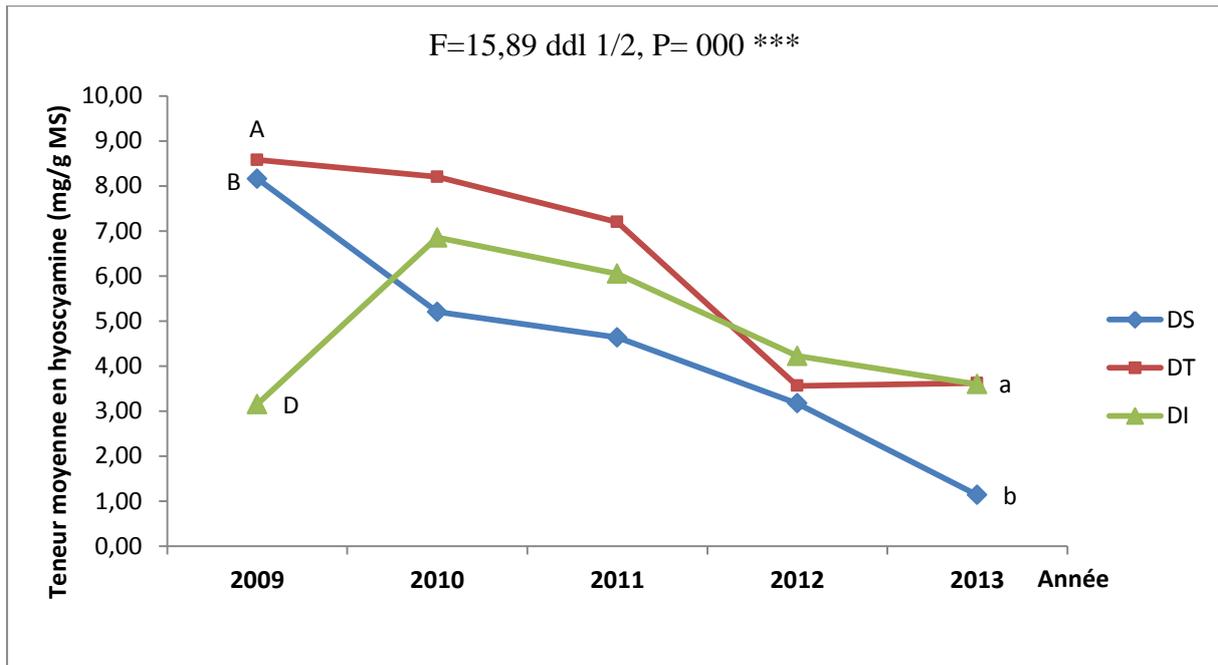


Figure 10: Evolution de la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI induites en 2009 par *A. rhizogenes* en fonction des années de culture.

4. Effet de l'élicitation biotique par les quatre souches de *Pseudomonas*

4.1. Biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques

Les résultats obtenus (figure : 11) montrent que la biomasse moyenne varie en fonction des lignées. Sans élicitation, la lignée DT est la plus performante en terme de production de biomasse. Par ailleurs, l'effet de la souche bactérienne sur la biomasse dépend de la durée de l'élicitation. Ainsi, la bactérie durant 5 jours de contact, exerce un effet stimulateur sur le développement de la biomasse des chevelus racinaires des trois lignées DS, DT et DI puisqu'elle entraîne une augmentation du poids sec par rapport aux témoins. Ceci est valable pour toutes les combinaisons souche-lignée. Avec un meilleur résultat obtenu avec la lignée DI élicitée par la souche C7R12.

Cependant, pour un temps d'élicitation plus long (10 jours de contact souche-lignée), certaines combinaisons donnent un faible rendement de biomasse. Notamment la souche de *P. putida* pour toutes les lignées racinaires.

L'analyse de la variance au seuil de 5% révèle des effets très hautement significatifs des souches bactériennes sur la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey révèle l'existence de :

- 03 groupes homogènes pour la lignée DS avec la meilleure biomasse de 0,121 g MS obtenue avec la souche P66 pendant 5 jours de contact (groupe A)
- 07 groupes homogènes pour la lignée DT avec la meilleure biomasse de 0,326 g MS obtenue avec P.putida pendant 5 jours de contact (groupe a)
- 04 groupes homogènes pour la lignée DI avec la meilleure biomasse de 0,443 g MS obtenue avec la souche C7R12 pendant 10 jours de contact (groupe a')

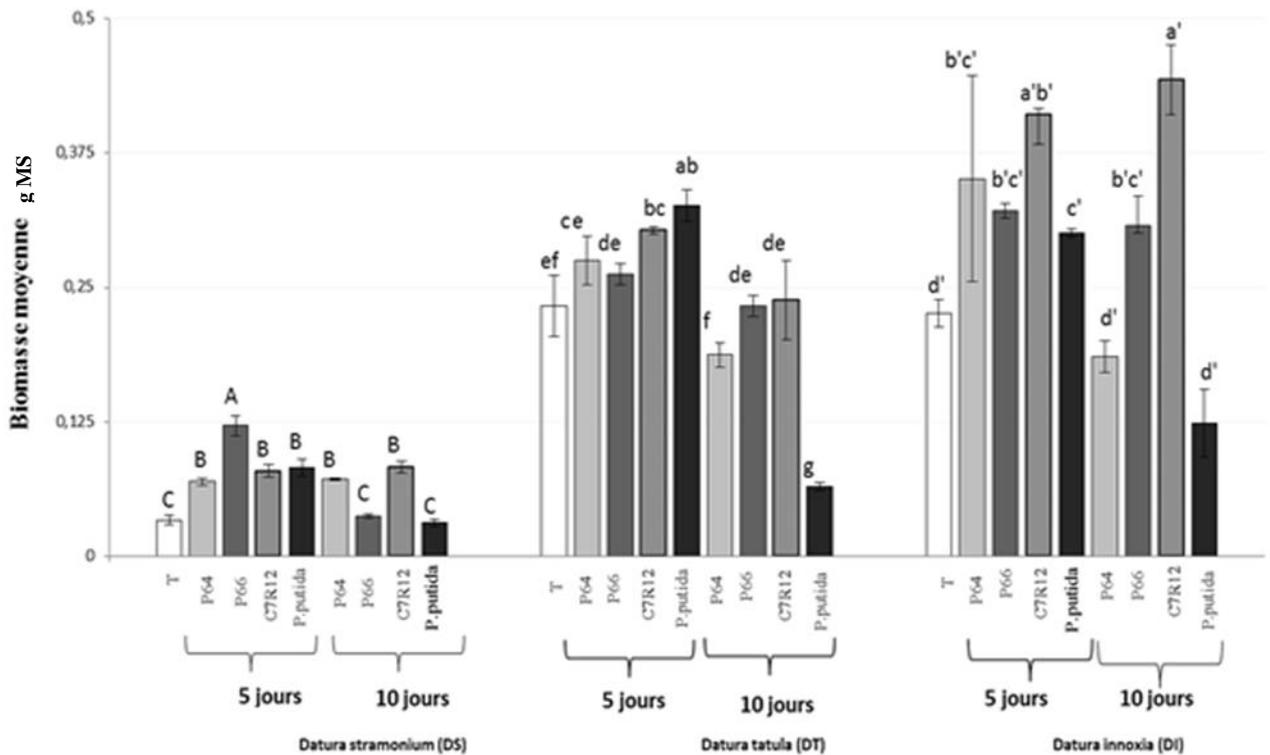
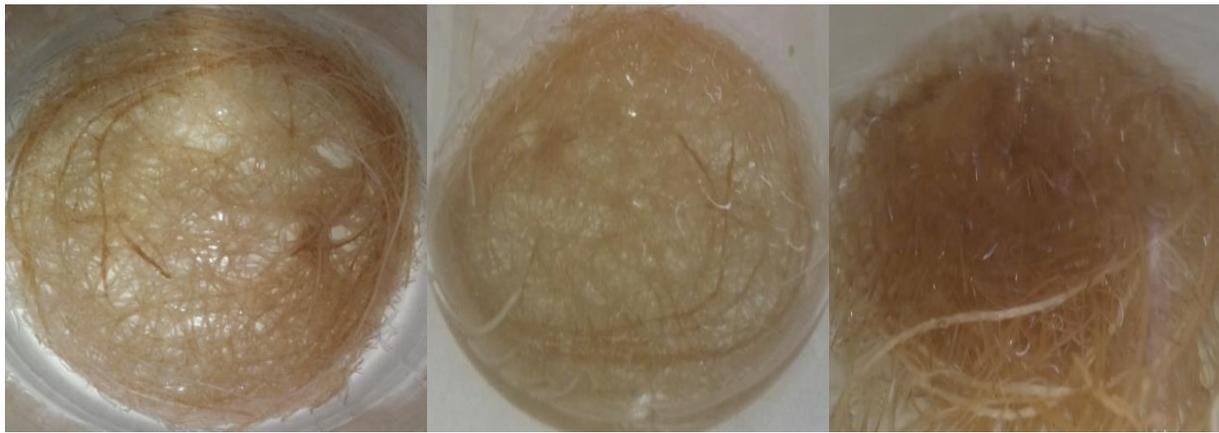


Figure 11 : Biomasse moyenne (poids sec) des chevelus racinaires des trois lignées transgéniques de Datura (DS, DT et DI) élicitées par les souches bactériennes de Pseudomonas après 5 et 10 jours de contact (les valeurs ayant des lettres différentes représentent les groupes homogènes classés selon le test de tukey à $p < 0,05$).

Aussi, la figure 12 illustre les pourcentages d'amélioration de la biomasse moyenne des chevelus racinaires des lignées transgéniques des trois espèces, comparés aux témoins non élicités. D'après les résultats une amélioration atteignant les 260% est le meilleur pourcentage d'amélioration obtenu chez la lignée DS élicité par la souche P66 pendant 5 jours. Chez la lignée DT 39 % est le meilleur pourcentage d'amélioration de la biomasse obtenu après élicitation avec *Pseudomonas putida* pendant 5 jours. Pour la lignée DI, l'élicitation par la souche C7R12 pendant 10 jours permet d'obtenir une amélioration de la biomasse atteignant 177% par rapport au témoin.

Par ailleurs, *P.putida* a diminué la croissance des trois lignées entraînant une réduction de la biomasse moyenne de l'ordre de 8 % chez la lignée DS, de 22% chez la lignée DI et de 72% chez la lignée DT, après élicitation pendant 10 jours.



A1

A2

A3



B1

B2

B3



C3

C2

C1

Planche 2 : Meilleurs résultats de biomasse obtenus après élicitation biotique ; A : chevelus racinaires de la lignée DS (A1 : témoin, A2 et A3 : traitement par la souche P66 pendant 5 jours et 10 jours respectivement). B1 (témoin), B2 et B3 : chevelus racinaires de la lignée DT élicités pendant 5 et 10 jours par *P.putida* respectivement. C1 : témoin, C2 et C3 chevelus racinaires de la lignée DI après élicitation pendant 5 et 10 jours par la souche C7R12 respectivement.

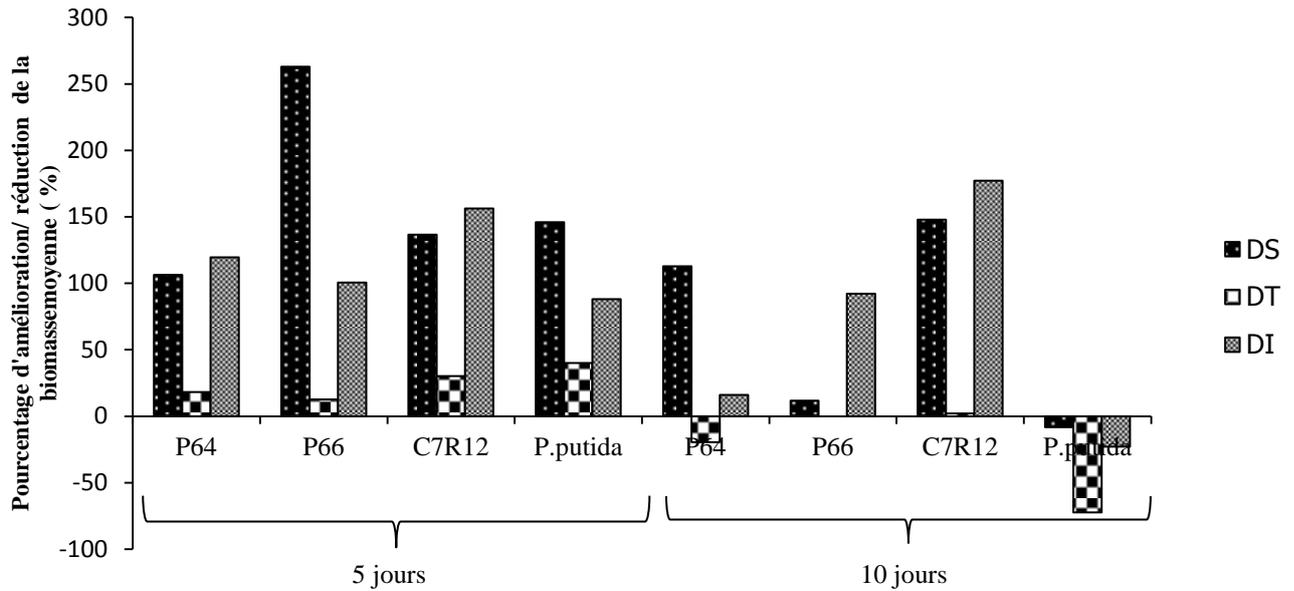


Figure 12 : Effet des souches de *Pseudomonas* sur l'index de croissance de la biomasse moyenne des trois lignées racinaires par rapport au témoin ; après 5 et 10 jours de contact.

4.2. Teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques :

De tous les témoins, c'est la lignée DI qui est la plus riche en hyoscyamine. La teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires sélectionnées, varie de 1,01 à 16,63 mg/g MS (Tableau 5).

Chez la lignée DT la teneur moyenne en hyoscyamine passe de 3,13 mg/g MS chez le témoin à 16,63 mg/g MS avec la souche C7R12 pour une élicitation de 5 jours (meilleur résultat), soit une augmentation de 431 %. En outre, le pourcentage d'amélioration n'est que de 227% après 10 jours de contact avec la même souche. Alors qu'une diminution de la teneur en hyoscyamine chez cette lignée est enregistrée après élicitation pendant 5 jours par *P.putida* où le pourcentage de perte est de 22%.

Pour la lignée DS, la teneur en hyoscyamine passe de 1,01 mg/g MS chez le témoin à 6,89 mg/g MS après élicitation par la souche C7R12 pendant 10 jours de contact ; soit une amélioration de 583% par rapport au témoin, (meilleur résultat). Tandis que la plus faible teneur en hyoscyamine pour cette lignée 1,748 mg/g MS est obtenue avec *p. putida* pendant 5 jours de contact, soit une amélioration de 71% par rapport témoin. Chez DS, tous les traitements d'élicitation par les bactéries donnent une augmentation de la teneur en

hyoscyamine par rapport au témoin avec de meilleures améliorations pour le temps de contact de 10 jours.

Pour la lignée DI, la meilleure teneur en hyoscyamine 10,26 mg/g MS est obtenue après élicitation par la souche P66 pendant 10 jours, avec une amélioration de 138% par rapport au témoin (4,31 mg/g MS). Pour cette lignée, le temps d'élicitation de 10 jours donne des teneurs en hyoscyamine meilleures que celles obtenues après 5 jours de contact.

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif des souches bactériennes sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey révèle l'existence de :

- 06 groupes homogènes pour la lignée DS avec le groupe A (meilleure teneur en hyosyamine 6.896 mg/g MS) représenté par la souche C7R12 avec un temps de contact de 10 jours.
- 07 groupes homogènes pour la lignée DT avec le groupe a (meilleure teneur en hyosyamine 16,633 mg/g MS) représenté par la souche C7R12 avec un temps de contact de 05 jours.
- 06 groupes homogènes pour la lignée DI avec le groupe a' (meilleure teneur en hyosyamine 10,260 mg/g MS) représenté par la souche P66 avec un temps de contact de 10 jours.

Le pourcentage d'amélioration de la teneur moyenne en hyoscyamine par rapport au témoin a été calculé comme suit :

Pourcentage d'amélioration = $(\text{teneur moyenne en hyoscyamine obtenu après élicitation} - \text{teneur en hyoscyamine du témoin}) / \text{teneur moyenne en hyoscyamine du témoin} * 100$

Tableau 5 : Effet de l'élicitation par les quatre souches de *Pseudomonas* sur la teneur moyenne en hyoscyamine (mg/g MS) et le pourcentage d'amélioration par rapport aux témoins non élicités. Les valeurs ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Temps de contact (jours)	Souche de <i>Pseudomonas</i>	Teneur moyenne en HS (mg/g MS)			Pourcentage d'amélioration de la teneur en HS (%)		
		DS	DT	DI	DS	DT	DI
5	P64	2.888±0.139 ^D	8.919±0.401 ^e	7.353±0.683 ^{c'd'}	182	185	70
	P66	4.869±0.325 ^C	12.755±0.508a ^b	8.602±0.407 ^{b'c'}	376	307	99
	C7R12	4.316±0.314 ^C	16.633±0.456^a	6.629±0.339 ^{d'e'}	322	431	54
	<i>P.putida</i>	1.748±0.074 ^E	2.455±0.006 ^g	3.525±0.117 ^{f'}	71	-22	-18
	Témoin	1.023±0.021 ^F	3.131±0.256 ^{f'g}	4.315±0.673 ^{f'}	-	-	-
10	P64	6.173±0.000 ^B	13.286±0.291 ^b	9.414±0.201 ^{a'b'}	511	264	118
	P66	6.041±0.272 ^B	10.798±0.010 ^d	10.260±0.371^{a'}	498	196	138
	C7R12	6.896±0.481^A	11.932±0.128 ^c	6.717±0.300 ^{d'e'}	583	227	56
	<i>P.putida</i>	4.532±0.104 ^C	3.882±0.197 ^f	5.705±0.311 ^{e'}	349	7	32
	Témoin	1.010±0.070 ^F	3.645±0.335 ^f	4.313±0.676 ^{f'}	-	-	-

4.3.Teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques

Selon le tableau 6, la teneur moyenne en scopolamine des lignées DS, DT et DI après élicitation bactérienne en deux temps de traitement de 5 et 10 jours ; varie de 0,004 mg/g MS à 0,754 mg/g MS. Certains traitements bactériens augmentent la production en scopolamine des trois lignées racinaires. En effet, l'élicitation par la souche P66 pendant 5 jours permet d'améliorer la teneur moyenne en scopolamine pour les trois lignées racinaires par rapport aux teneurs des témoins. Cela surtout pour la lignée DI où cette souche donne la meilleure teneur moyenne 0,754 mg/g MS, soit une amélioration de 321%. En outre, la lignée DS enregistre un maximum de production de scopolamine après 10 jours de traitement par *P.putida* avec en moyenne 0,161 mg/g MS, soit une amélioration de 64%. Alors que la lignée DT atteint le maximum 0,278 mg/ g MS après élicitation pendant 5 jours par la souche C7R12, soit une amélioration de 471%.

Les lignées répondent différemment aux traitements bactériens, La lignée DI est la plus productive en scopolamine et répond plus positivement aux traitements bactériens par rapport aux deux autres lignées. En effet, tous les traitements d'élicitation pendant 10 jours donnent une amélioration de la teneur moyenne en scopolamine de la lignée DI. Tandis que pour les lignées DS et DT le temps d'élicitation de 5 jours donne de meilleurs résultats que ceux de 10 jours.

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif des souches bactériennes sur la teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre l'existence de :

- 06 groupes homogènes pour la lignée DS où le groupe A (meilleur teneur en scopolamine 0,161 mg/g MS) est représenté par *P.putida* avec un temps de contact de 10 jours.
- 07 groupes homogènes pour la lignée DT où le groupe a (meilleur teneur en scopolamine 0,278 mg/g MS) est représenté par C7R12 avec un temps de contact de 5 jours.
- 06 groupes homogènes pour la lignée DI où le groupe a' (meilleur teneur en scopolamine 0,754 mg/g MS) est représenté par P66 avec un temps de contact de 5 jours.

Tableau 6 : Effet de l'élicitation par les quatre souches de *Pseudomonas* sur la teneur moyenne en scopolamine (mg/g MS) et le pourcentage d'amélioration par rapport aux témoins non élicités. Les valeurs ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Teneur moyenne en scopolamine (mg/g MS)		Pourcentage d'amélioration de la teneur en scopolamine (%)					
Temps de contact (jours)	Souche de <i>Pseudomonas</i>	DS	DT	DI	DS	DT	DI
5	P64	0.021±0.001 ^F	0.041±0.002 ^e	0.653±0.021 ^{b'}	-78	-15	265
	P66	0.136±0.002 ^{BC}	0.058±0.001 ^d	0.754±0.031^{a'}	42	20	321
	C7R12	0.151±0.011 ^{AB}	0.278±0.007^a	0.240±0.020 ^{c'}	56	471	34
	<i>P.putida</i>	0.025±0.002 ^F	0.099±0.00 ^{5b}	0.166±0.012 ^{f'}	-74	104	-7
	Témoin	0.096±0.006 ^D	0.049±0.002 ^e	0.179±0.019 ^{ef'}	-	-	-
10	P64	0.024±0.003 ^F	0.082±0.001 ^c	0.352±0.004 ^{d'}	-75	69	109
	P66	0.130±0.004 ^C	0.004±0.000 ^g	0.634±0.046 ^{b'}	32	-91	277
	C7R12	0.087±0.007 ^E	0.022±0.001 ^f	0.434±0.010 ^{c'}	-12	-55	158
	<i>P.putida</i>	0.161±0.002^A	0.104±0.004 ^b	0.340±0.022 ^{c'}	64	114	102
	Témoin	0.098±0.008 ^{DE}	0.049±0.002 ^e	0.168±0.005 ^{f'}	-	-	-

5. Effet de l'élicitation chimique (abiotique) par le nitrate d'argent AgNO₃

5.1. Biomasse moyenne des chevelus racinaires

Selon les résultats résumés dans la figure 13, le traitement des lignées racinaires par l'éliciteur chimique AgNO₃ influence leurs croissances en faisant diminuer la biomasse pour les deux lignées DS et DT. En effet, le traitement de la lignée DS par le nitrate d'argent donne le même résultat pour les deux temps d'élicitation de 24h et de 48h avec 0,015 g MS, soit une perte de la biomasse moyenne de 57% par rapport au témoin. Tandis que pour la lignée DT, les pertes en biomasse moyenne sont moins importantes ; 4% pour un temps d'élicitation de 24h et 12% pour 48h.

Par contre, la lignée DI répond positivement au même éliciteur pour les deux temps d'élicitation 24h et 48h. En effet, une amélioration de la biomasse est enregistrée avec une biomasse moyenne la plus élevée de 0,174 g MS obtenue après 48h de contact, soit une amélioration de 74% par rapport au témoin. En outre, l'amélioration de la biomasse moyenne de DI pour 24 h de traitement par le nitrate d'argent atteint 25%.

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du nitrate d'argent sur la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre l'existence de 7 groupes homogènes où le groupe b (meilleure biomasse obtenue après élicitation 0,200 g MS) obtenue chez la lignée DT pendant 24 heures.

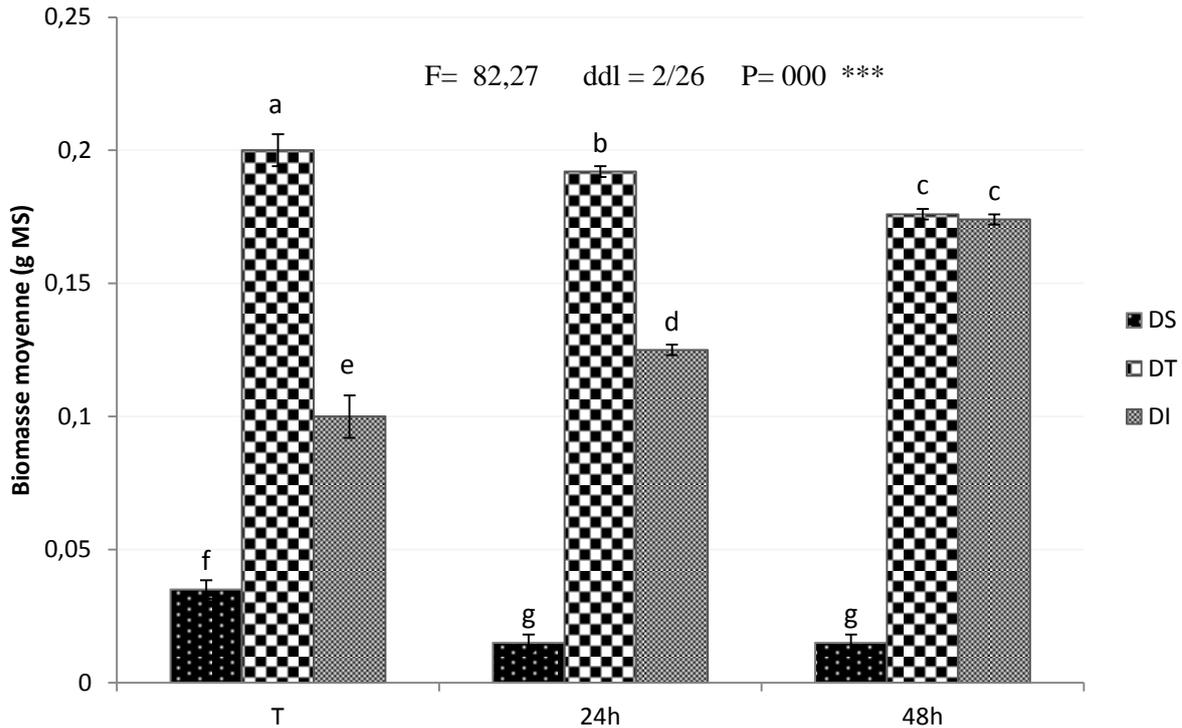


Figure 13 : Effet de l’éllicitation chimique par le nitrate d’argent pendant 24 et 48 heures sur la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI.

5.2.Teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques

L’éllicitation des lignées racinaires par le nitrate d’argent $AgNO_3$ en deux temps de contact 24h et 48h donne des teneurs moyennes en hyoscyamine entre 0,887 mg/g MS et 7,89 mg/g MS (figure 14). Les meilleurs résultats sont obtenus avec un temps de contact de 48h pour les deux lignées DS et DT. Cette dernière donne le meilleur résultat 7,89 mg/g MS, représentant ainsi une amélioration de 117 % par rapport au témoin non élicité (3,64 mg/g MS). Le temps d’éllicitation de 24 heures ne permet pas d’améliorer la teneur moyenne en hyoscyamine pour les trois lignées racinaires où on enregistre des pertes de 13%, 32 % et 31% par rapport aux témoins DS, DT et DI respectivement. Par contre, quand le temps de contact avec l’élliciteur est plus long (48h) on enregistre une augmentation de 196%, 117% pour DS et DT respectivement. Tandis que pour la lignée DI une perte de 30% est notée. Pour cette dernière le traitement par l’ $AgNO_3$ ne permet pas d’améliorer la teneur en hyoscyamine pour les deux temps d’éllicitation (figure 14).

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du nitrate d'argent sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre l'existence de 9 groupes homogènes où le groupe a (meilleure teneur en hyoscyamine 7,89 mg/g MS) est obtenue chez la lignée DT pendant 48 heures de contact.

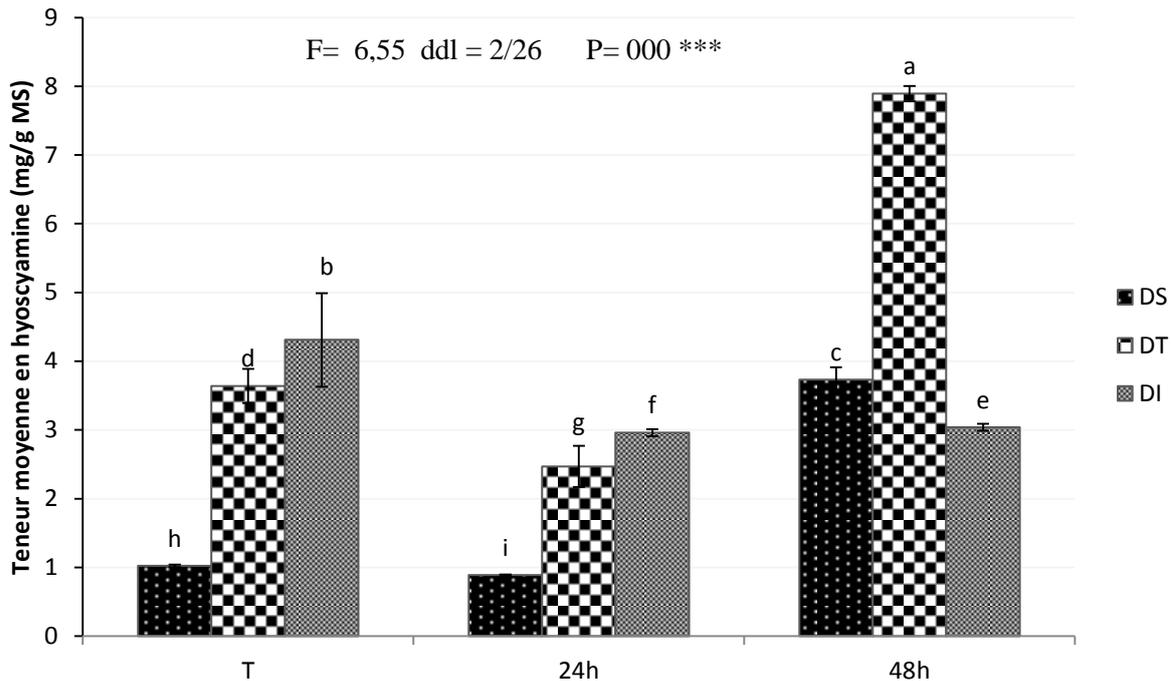


Figure 14 : Effet de l'élicitation chimique par le nitrate d'argent pendant 24 et 48 heures, sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI.

5.3. Teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques

L'élicitation par une concentration de 1mM d'AgNO₃ permet d'améliorer la production en scopolamine des deux lignées racinaires DS et DT, quel que soit le temps de contact 24h ou 48h. En effet, pour la lignée DT les augmentations atteignent jusqu'à 1000% par rapport au témoin, c'est le meilleur résultat entre tous les traitements où la teneur moyenne en scopolamine atteint 0,536 mg/g MS pour un temps de contact de 24h. Ce résultat est proche de celui obtenu pour un temps de contact de 48h.

Le meilleur résultat d'élicitation chez la lignée DS est obtenu après 48h de contact où la teneur moyenne en scopolamine atteint 0,486 mg/g MS, soit une amélioration de 406% par rapport au témoin. En outre, l'amélioration est de 382% pour un temps de contact de 24h.

Tandis que pour la lignée DI le traitement par le nitrate d'argent fait diminuer la teneur moyenne en scopolamine par rapport au témoin pour les deux temps d'élicitation. En effet, des diminutions de 81% et de 88% sont obtenues pour les deux temps d'élicitation de 24h et de 48h respectivement (figure 15).

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du nitrate d'argent sur la teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques. La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre l'existence de 9 groupes homogènes où le groupe a (meilleure teneur en hyoscyamine 0,539 mg/g MS) obtenue chez la lignée DT pendant 24 heures de contact.

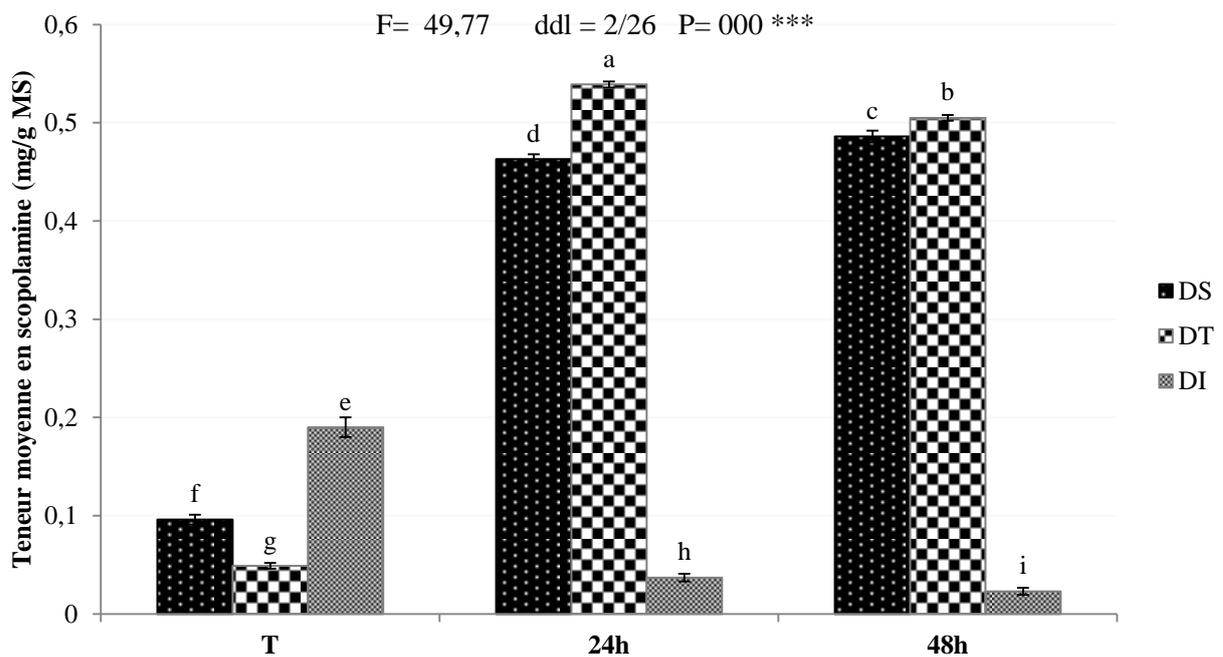


Figure 15 : Effet de l'élicitation chimique par le nitrate d'argent pendant 24 et 48 heures, sur la teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI.

6. Comparaison des meilleurs traitements biotiques (PGPRs) à ceux abiotique (AgNO₃)

6.1. Biomasse moyenne

Les meilleurs résultats de biomasse obtenus après l'élicitation biotique et chimique regroupé dans la figure 16 montrent que les éliciteurs biotiques ont amélioré la croissance des lignées racinaires plus que le traitement par le nitrate d'argent et cela pour les trois espèces de *Datura*. Par ailleurs, le meilleur résultat de biomasse moyenne entre tous les traitements biotiques est de 0,443 g MS obtenu chez la lignée DI après 10 jours d'élicitation par la souche C7R12. Tandis que pour l'élicitation par l'AgNO₃, le meilleur résultat de biomasse moyenne ne dépasse pas 0,192 g MS obtenu après 24 heures d'élicitation de la lignée DT.

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du type d'élicitation sur la biomasse moyenne des lignées racinaires transgéniques (l'élicitation biotique est meilleure).

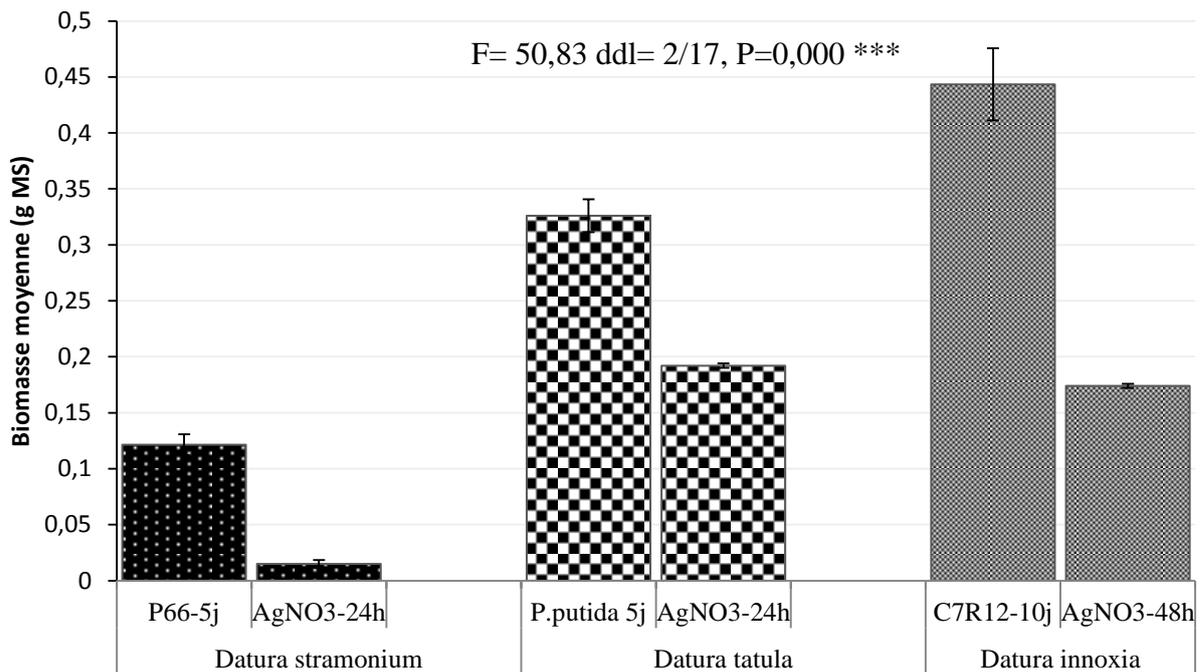


Figure 16 : Biomasses moyennes des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenues après élicitation biotique et chimique.

6.2. Teneur moyenne en hyoscyamine

En générale et pour les trois lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI, les teneurs moyennes en hyoscyamine obtenues après élicitation biotiques sont supérieures à

celles obtenues par élicitation chimique. En effet le meilleur résultat est de 16,63 mg/g MS obtenu après cinq jours d'élicitation de la lignée DT par la souche C7R12 contre 7,89 mg/g MS obtenu par l'élicitation chimique avec le nitrate d'argent.

Aussi pour la lignée DI, l'élicitation pendant dix jours par la souche P66 donne 10,26 mg/g MS contre 3,03 mg/g MS obtenu par l'élicitation avec le nitrate d'argent. Pour la lignée DS, l'élicitation biotique donne 6,89 mg/g MS d'hyoscyamine après 10 jours d'élicitation par la souche C7R12 contre 3,73 mg/g MS obtenu après l'élicitation par le nitrate d'argent (figure 17).

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du type d'élicitation sur la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques (l'élicitation biotique est meilleure).

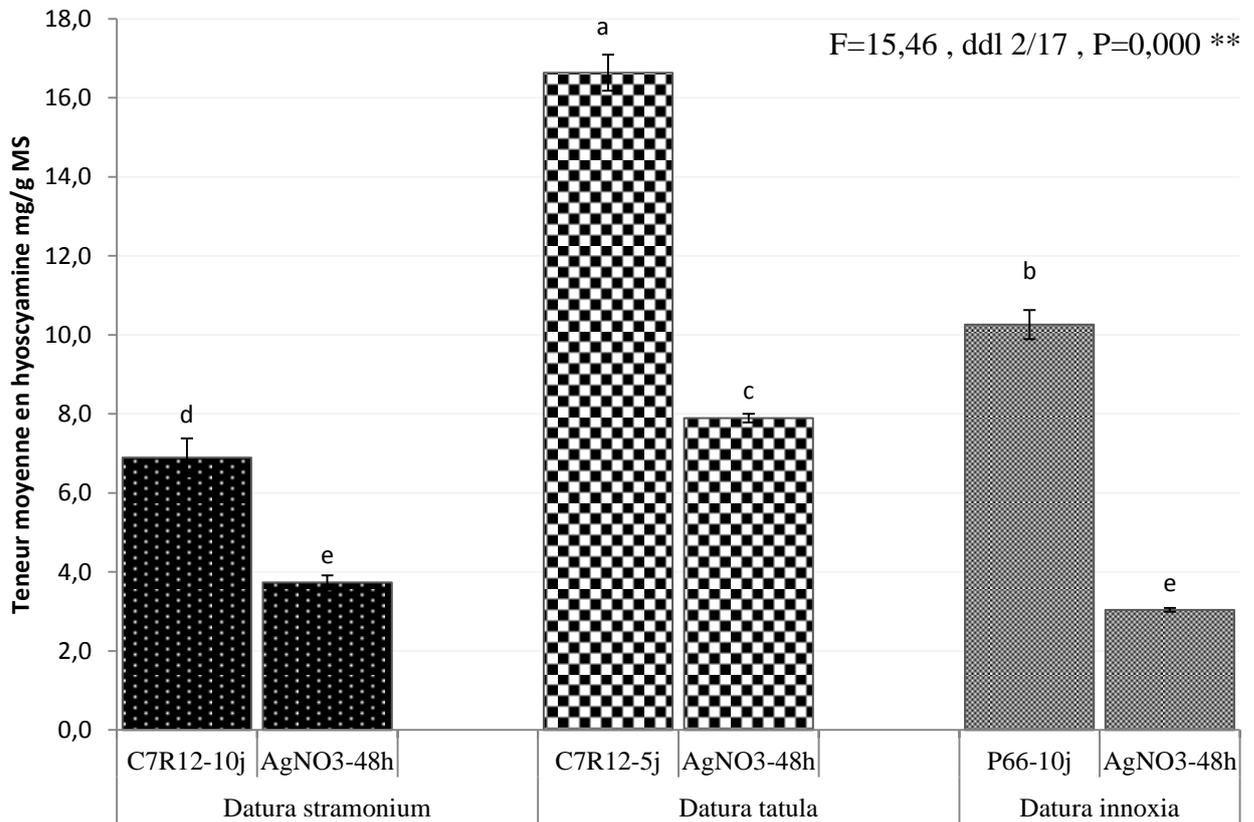


Figure 17 : Teneurs moyennes en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenues après élicitation biotique et chimique.

6.3. Teneur moyenne en scopolamine

Contrairement aux résultats obtenus précédemment, pour les teneurs moyennes en scopolamine l'élicitation chimique par le nitrate d'argent donne des résultats meilleurs que celle biotique pour les deux lignées DS et DT. En effet, chez DT l'élicitation par le nitrate d'argent permet d'obtenir 0,539 mg/g contre 0,278 mg/g MS après 5 jours d'élicitation par la souche C7R12.

Par contre, chez la lignée DI, l'élicitation biotique se révèle plus efficace pour l'amélioration de la teneur en scopolamine où elle a atteint 0,754 mg/g MS après 10 jours d'élicitation par la souche P66 contre à 0,037 mg/g MS obtenus après élicitation par le nitrate d'argent (figure 18).

En effet, l'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du type d'élicitation sur la teneur moyenne en scopolamine des lignées racinaires transgéniques : l'élicitation par l'AgNO₃ est meilleure pour DS et DT, alors que celle biotique (P66-5j) est très bénéfique pour DI.

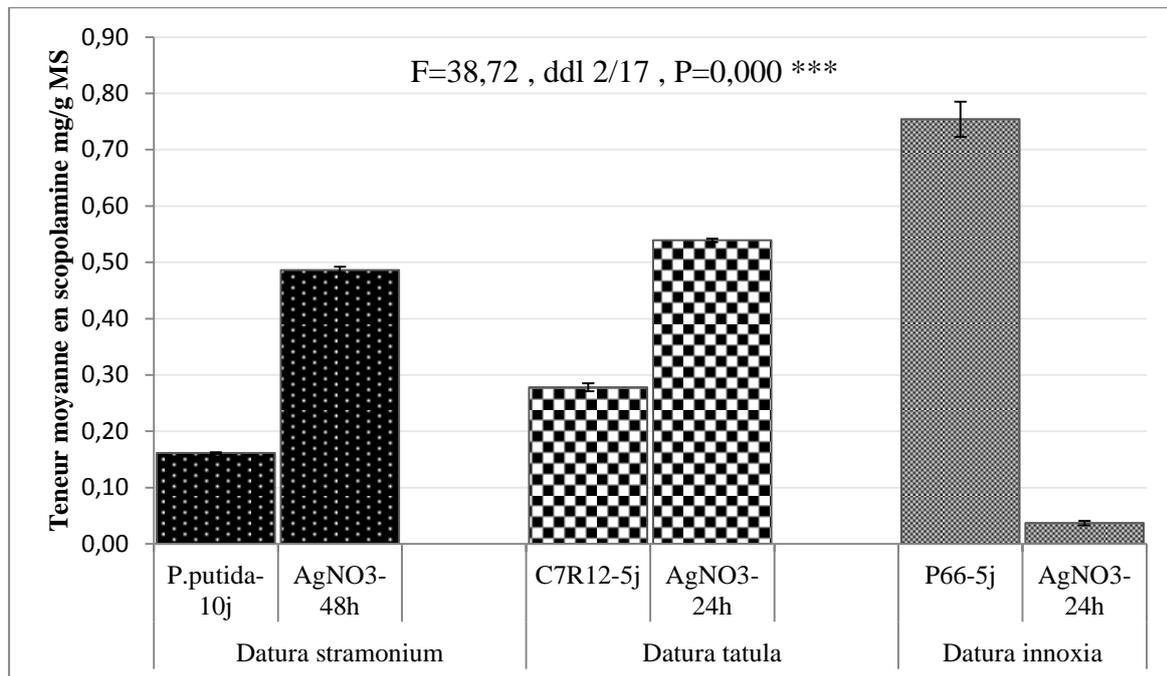


Figure 18 : Teneurs moyennes en scopolamine des lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI obtenues après élicitation biotique et chimique.

1. Culture de racines transgéniques pour la production à long terme d'alcaloïdes tropaniques

Les cultures de racines transgéniques constituent une voie biotechnologique très utilisée pour la production de substances végétales à destination pharmaceutique (**Lanoué et al., 2004**).

En effet, la stabilité génétique et biochimique de ce type de tissus et la production accrue en métabolites secondaires les rend économiquement profitables (**Ono, 2011 ;Oksman-Caldentey, 2007**). **Primorse (2003)** affirme que les chevelus racinaires induits par *A. rhizogenes* peuvent être maintenus en cultures avec la capacité de produire des métabolites secondaires à un niveau plus élevé par rapport aux cultures de suspensions cellulaires et à la plante entière. En outre, ce type de cultures associé à différents types d'élicitations permet l'amélioration de la production de la biomasse et l'accumulation des alcaloïdes tropaniques considérées comme un but majeur pour la production industrielle d'analgésiques à base d'alcaloïdes tropaniques.

L'élicitation induit l'expression de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (**Robberts et Shuler, 1997**) en particulier ceux impliqués dans la défense des plantes tels que les alcaloïdes (**Herbert, 2001**). De nombreux éliciteurs abiotiques (chimiques) provoquent l'accumulation de métabolites secondaires dans les cellules des plantes (**Ajunglaet al., 2009**). Par ailleurs, l'effet stimulateur biotiques tel que des PGPRS sur la production des métabolites secondaires des plantes a attiré considérablement l'attention des chercheurs (**Abdul Jaleelet al., 2007**).

Selon Houmani et Cosson (2000) les plantes entières spontanées de *D.stramonium*, *D. tatula* et *D.innoxia*, produisent des teneurs moyennes en hyoscyamine de 0,67 0,73 et 0,27mg/g MS respectivement. Les teneurs moyennes en hyoscyamine des racines transgéniques de ces mêmes espèces sont 5,6 mg/g chez *D. stramonium* (**Antabellaet al., 1994**), 1,72 mg/g MS chez *D.innoxia* (**Shimomuraet al., 1991**) et 8,16 chez *D.stramonium*, 8,57 mg/g MS chez *D. tatulaet* 3,15 chez *D. innoxia*(**Harfiet al., 2009**).

Nous avons suivi l'évolution de la biomasse et de la production d'hyoscyamine des chevelus racinaires de DS, DT et DI cinq années après leur induction afin d'étudier la possibilité de production industrielle d'hyoscyamine pendant une telle période de temps à partir des mêmes lignées racinaires.

En effet, les lignées racinaires transgéniques DS, DT et DI ont été sélectionnées par Harfi en 2009 et maintenues en culture jusqu'à 2011 sur un milieu de culture B5 renouvelé tous les 20 jours.

Le suivi de ces lignées durant cinq années nous a révélé une différence de croissance et de production en alcaloïdes à la première année de culture. La lignée DT est la plus performante et produit des taux d'hyoscyamines plus élevés que ceux de DS et DI.

Cette variation de production est illustrée par **Maldonado et al (1993)**, qui affirment que la différence des taux de croissance et de production en alcaloïdes chez les lignées racinaires transgéniques induites par *A. rhizogenes* est liée à un facteur génétique qui serait due à l'insertion aléatoire du nombre de copies d'ADN-T et du site d'intégration dans le génome de la plante hôte. Ceci se traduirait par des différences considérables aussi bien au niveau de la croissance des lignées racinaires qu'au niveau de l'accumulation des alcaloïdes même lorsqu'elles sont issues d'un même événement de transformation (**Zhi-Bi et Min 2006**).

La croissance rapide et la productivité élevée d'alcaloïdes des racines transgéniques induites par transformation génétique via *Agrobacterium rhizogenes* est confirmée. Bien qu'elle soit liée aux facteurs génétiques connus comme source majeure de la variation de production; la croissance des racines transgéniques est optimisée *in-vitro* par les conditions nutritionnelles du milieu de culture (**Giri et Narasu, 2000**). En effet, la composition du milieu de culture influence la stabilité biosynthétique des chevelus racinaires. **Hirofumi (2000)** confirme que la viabilité de ces derniers et leur taux de reprise sont directement influencés par la concentration du saccharose dans le milieu de culture. Une concentration adéquate de saccharose favorise la croissance des chevelus racinaires et le maintien de leur contenu alcaloïdique pour une période de 600 jours, après cette période le nombre de ramifications secondaires et une perte notable d'alcaloïdes est remarquée.

Les facteurs physiques influencent aussi la croissance des chevelus racinaires cultivés *in-vitro*. Le maintien d'une température de 25° C permet de prolonger la durée de vie des chevelus racinaires de tabac (**Hirofumi, 2000**).

Par ailleurs, nos résultats montrent que les trois lignées racinaires DS DT et DI induites sont plus performantes à leur deux premières années de croissance. Après cette période la perte en croissance peut être expliquée par la fragilité des tissus racinaire et leur sensibilité.

2. Effet de l'éllicitation biotique par les PGPRs sur la biomasse

La capacité des *Pseudomonas* à stimuler la croissance des plantes a été largement signalée (**Leinhos, 1994**). L'éllicitation biotique par bactéries considérées comme des PGPRs augmente la hauteur des plants, le nombre de feuilles, la longueur et la biomasse des racines de *Catharanthus roseus* sous stress hydrique (**Abdul Jaleel et al., 2007**).

Selon les résultats obtenus dans notre étude, l'éllicitation des trois lignées racinaires DS, DT et DI par des souches de *Pseudomonas* a stimulé leur croissance par rapport au témoin de 262% chez la lignée DS, 40% et 177% chez DT et DI respectivement. Les quatre souches utilisées ont déjà été utilisées comme promoteurs de croissance (PGPRs) dans des études précédemment effectuées (**Benchabane, 2000, Boukerma et al., 2017**). La biomasse obtenue a augmenté de (262%) de la lignée DS en comparant avec le témoin (meilleur résultat obtenu de tous les traitements). Nos résultats sont similaires à shakeran et ses collaborateurs (**2015**) qui ont obtenu des résultats de stimulation de la croissance chez des racines transgéniques de *D. metel* après éllicitation biotique par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Aussi **Bano et fatima, 2009** ont confirmé l'effet stimulateur des *Pseudomonas* sur la croissance racinaire sous stress salin des plants d'arachide cultivés en hydroponie.

Baset Mia et ses collaborateurs (**2010**) affirment que l'inoculation en culture hydroponique des PGPRs stimule la formation, l'élongation et l'augmentation du poids sec des racines, également l'augmentation de la longueur de la tige, la surface foliaire et la matière sèche totale chez les plants de *Musa sp.* Une étude réalisée par **Ameur (2009)**, sur des explants de pomme de terre montre l'effet phytostimulateur de l'éllicitation bactérienne par des souches de *Pseudomonas ssp fluorescens* où l'amélioration de la biomasse a été corrélée avec l'adhésion des populations bactériennes autour des ébauches racinaires différenciées des vitro-plants. Les essais de **Boukerma (2011)** et ses collaborateurs ont

démontré l'implication de *P. fluorescens* C7R12 et *P. putida* DS131 dans la biostimulation de la matière fraîche et sèche de la partie aérienne des plants de tomate (une augmentation du nombre et du poids des fruits par plant). Des essais effectués sur le maïs en utilisant des souches de *Pseudomonas* : *P. putida* R-168, *P. putida* DSM291, *P. fluorescens* R-93 et *P. fluorescens* DSM 50090 ont montré que l'inoculation des graines par ces rhizobactéries améliorent nettement le poids sec des feuilles et de la partie aérienne (**Gholamiet al., 2009**). **Rahmounet al., (2017)** confirment l'effet stimulateur de la souche Bt04 de bacillus sp. sur la croissance des plants (tige+racine) de *Datura stramonium* et *Datura tatula* en hydroponie atteignant 35% par rapport aux témoins.

L'effet phytostimulateur exercé par les *Pseudomonas* est associé à des mécanismes de promotion directs et indirects (**yang et al., 2009 ;Gomaa M, 2012**). Ces dernières facilitent directement la prolifération racinaire par la production de sidérophores (Fe-III) qui solubilisent le fer et le met à la disposition des racines de la plante ainsi que la production de phytohormones tels que les auxines, (indole 3-acétique : AIA), l'acide gibbéréllique et les cytokinines (**Aslantaset al., 2007**) induisant une augmentation de la croissance (**Mayak et al., 2004b**). L'implication de l'AIA bactérien dans la promotion de la croissance des plantes a été démontrée dans l'interaction entre le canola et *P. putida* GR122. Les racines inoculées avec un mutant ipdC (un gène clé pour la synthèse de l'AIA), se sont moins développées que les racines bactérisées avec la souche sauvage (**Patten et Glick, 2002**). En plus de leur capacité à produire des phytohormones ces rhizobactéries sont capables d'améliorer le niveau endogène en cytokinines et en auxines des plantes inoculées (**Barazani et Freidman, 1999**).

SaravonaKumar et Samiyappan (2007) associent la stimulation des plants cultivés sous stress salin co-inoculés par des *Pseudomonas* à la production d'ACC déaminase, enzyme régulateur de la biosynthèse de l'éthylène chez les plantes supérieures.

Les *Pseudomonas* phytostimulateurs de croissance produisent des métabolites secondaires à effet éliciteur tel que les phytoalexines et l'acide salicylique (AS). En outre, L'application de l'acide salicylique et de l'acide acétylsalicylique sur des plants de maïs et de soja accélère leur production en matière sèche mais ne présente pas d'effet sur le développement racinaire (**Khan et al., 2003**). Par ailleurs **Harfi (2009)** montre que le traitement pendant 12 jours de chevelus racinaires de *Datura tatula* par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique entraîne une amélioration de la biomasse à la concentration de 10^{-8} M, et une inhibition aux concentrations de 10^{-4} M et plus.

3. Effet de l'élicitation par les PGPRs sur la teneur en alcaloïdes des racines transgéniques

Les métabolites secondaires sont présents dans les plantes en quantités infimes et souvent produits et libérés suite au déclenchement d'une réponse défensive de la plante contre les changements environnementaux (**Wu et al., 2005**). L'accumulation de métabolites secondaires induite par l'élicitation a fait l'objet de plusieurs travaux en raison de sa capacité à améliorer la productivité des systèmes de cellules végétales de manière significative (**Singh et al., 2010**).

L'élicitation induit l'expression de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (**Robberts et Shuler, 1997**) en particuliers ceux impliqués dans la défense des plantes tels que les alcaloïdes (**Herbert, 2001**). De nombreux éliciteurs abiotiques (chimiques) provoquent l'accumulation des métabolites secondaires dans les cellules des plantes (**Ajunglaet et al., 2009**). Cependant, l'effet stimulateur des PGPRs (éliciteurs biotiques) sur la production des métabolites secondaires des plantes a attiré considérablement l'attention des chercheurs (**Abdul Jaleel et al., 2007**).

Selon **Selvaraj et al. (2008)**, L'inoculation avec *Glomus mosseae* en association avec des PGPRs (*Bacillus coagulans* et *Trichoderma viride*), a augmenté de manière très significative la production des métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, alcaloïdes et tannins) de *Begonia malabarica* Lam. De plus, le traitement des racines de *Catharanthus roseus* par *Pseudomonas fluorescens* sous stress hydrique a fortement amélioré le taux d'ajmalicine (**Abdul Jaleel et al., 2007**).

Rahmounet et al., (2017) précisent que l'élicitation par des souches de bacillus isolées en Algérie améliore la teneur en hyoscyamine des racines de *Datura stramonium* cultivées en hydroponie.

L'inoculation par *Pseudomonas fluorescens*, déclenche ou active les mécanismes de défense latents chez la plante (**Ramamoorthy, 2002**). L'application des *Pseudomonas fluorescens* chez les plants de tomate augmente la teneur en proline et en protéines totales dès le 4^{ème} jour de l'inoculation (**Boukerma, 2011**). L'application de PGPR comme éliciteur provoque l'accumulation de l'acide salicylique chez l'hôte et d'autres métabolites secondaires (**Van wees, 2000**). Les acides salicylique, acétylsalicylique sont utilisés pour l'élicitation des alcaloïdes tropaniques des chevelus racinaires (**Zabetakis et al.,**

1999 ; Pitta-Alvarez *et al.*, 2000 ; Spollansky *et al.*, 2000 ; Zayed et Wink, 2004). L'étude de Harfi (2009) sur l'élicitation de chevelus racinaires par l'acide salicylique aboutit à un résultat intéressant et une amélioration de la teneur en hyoscyamine de 100% par rapport au témoin.

Par ailleurs, la première étape dans les voies de signalisation de l'élicitation est la perception de l'éliciteur. Pour les éliciteurs biotiques, Il a été suggéré des récepteurs membranaires capables de reconnaître les différents éliciteurs produits par le microorganisme. Cette théorie a été supportée par la découverte des récepteurs només 'Récepteurs d'éliciteurs'. Un nombre de site d'affinité élevée pour les peptides, les glycopeptides et glycosaccharides a été identifié sur la surface des cellules de tissus végétaux (Basse *et al.*,1993 ; Ito *et al.*, 1997 ; Mithofer *et al.*, 2000). Les récepteurs d'éliciteurs les plus étudiés qui ont été identifiés sont les proteines kinases ayant une affinité aux protéines comme les récepteurs de flagélines(Vasconsuelo et Borland.,2007). D'autres récepteurs tels les histidines kinases ; qui sont inclus dans le processus de signalisation des cytokinines.

Après la perception initiale de l'éliciteur, un nombre de processus de signalisation est effectué par la plante. Cela incluant la G-protein et les proteines-kinase et les canaux des ions. Ces transmetteurs de signal transmettent le signal jusqu'à induire la production de molécules d'oxygènes, de signaux d'hormones tel que le jasmonate et éventuellement les métabolites secondaires (Blum *et al.*, 2000).

Les résultats de notre étude corroborent avec les travaux précédemment évoqués. En effet l'élicitation par différentes souches de *Pseudomonas* permet d'améliorer la teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires transgéniques atteignant 583% chez DS élicitée pendant 10 jours par la souche P66, 431 % chez la lignée DT élicitée par la souche C7R12 pendant 5jours et 138% chez DI élicitée par la souche P66 pendant 10 jours. Aussi, la teneur en scopolamine des lignées racinaires s'améliore après élicitation biotique et on enregistre 64% d'amélioration chez la lignée DS après élicitation par *P.putida* pendant 10 jours, 471% chez la lignée DT après élicitation par la souche C7R12 pendant 5 jours et 321 % chez la lignée DI après élicitation par la souche P66 pendant 5 jours.

4. Effet de l'élicitation par le nitrate d'argent (AgNO₃) sur la biomasse des racines transgéniques

Le nitrate d'argent (AgNO_3) est utilisé comme régulateur de croissance et des altérations des caractères morphologiques des plantes, avec une concentration spécifique, stable et soluble dans l'eau (**Pitta Alvarez, 2015**). L'ion Ag^+ est inclus dans différentes voies comme celle de l'éthylène, des polyamines et des voies de signalisation du calcium..

Les polyamines entrent dans différentes procédures cellulaires telle que la réplication de l'ADN, la prolifération des cellules, la synthèse des protéines qui sont liés à la voie de signalisation de l'ion Ca^{++} . Cela indique que l' AgNO_3 favorise la synthèse des polyamines, inhibe l'activation de l'éthylène et fait diminuer la production de l'éthylène (**Zhao et al., 2002, Kumar et al., 2009**).

Dans notre cas, l' AgNO_3 favorise la croissance des racines transgéniques de la lignée DI (soit 74% d'amélioration). Par contre il a eu une action inhibitrice sur les lignées racinaires DS et DT soit 57% et 12% de perte respectivement. Cette inhibition de la croissance peut être due à la concentration de l' AgNO_3 dans le milieu de culture qui est déterminante. De plus, La réponse des tissus aux éliciteurs est liée également aux facteurs génétiques de chaque lignée.

5. Effet de l'élicitation par les nitrates d'argent (AgNO_3) sur la teneur en alcaloïdes

Les tissus végétaux répondent différemment aux éliciteurs. En effet certains éliciteurs modifient la voie de biosynthèse d'une partie des molécules bioactives d'un tissu induisant une augmentation de la production (**Pitta Alvarez, 2000**).

Plusieurs chercheurs ont testé l'effet éliciteur du nitrate d'argent sur la croissance et la production des alcaloïdes tropaniques. **Pitta Alvarez, 2000** confirme que selon le temps d'élicitation exprimé par le nombre d'heures de contact des chevelus racinaires avec le nitrate d'argent, la réponse du tissu est différente. En effet, la concentration de 1 mM, l' AgNO_3 pendant un temps d'élicitation de 24 heures, fait diminuer la production des chevelus racinaires en hyoscyamine et en scopolamine.

Cette diminution est interprétée par la libération des alcaloïdes dans le milieu de culture due au stress osmotique produit par les sels d' Ag^+ . Une deuxième suggestion de la raison de la diminution du taux d'hyoscyamine et de scopolamine dans les chevelus racinaires

est la lyse cellulaire causée par l'Ag⁺ connu par sa toxicité aux cellules végétales (**Shakeran et al., 2000, Pitta alvarez, 1999**).

Ces derniers expliquent que cette augmentation est due à l'inhibition de la production de l'éthylène provoquée par les cations Ag⁺. De plus, l'AgNO₃ élicite la production des phytoalexines induisant ainsi une augmentation de la production des alcaloïdestropaniques (**Angelova et al., 2006 in shakeran et al., 2015**).

L'ion Ag⁺ entre dans la surexpression du gène de la PMT (Méthyle putrescine transférase) incluse dans la première étape de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques. La régulation de ce gène favorise la synthèse de la N-méthyl putrescine, le précurseur des alcaloïdes tropaniques (**Kai et al., 2012**).

Les résultats de notre étude sur l'effet de l'élicitation par AgNO₃ sur la teneur en hyoscyamine et la scopolamine des chevelus racinaires corroborent avec les travaux précédemment cités pour les deux lignées racinaires DT et DS. En effet, une augmentation jusqu'à 117% de la teneur en hyoscyamine et 1000% de la scopolamine sont obtenue après un temps d'élicitation de 48h.

Par ailleurs, pour la scopolamine, l'amélioration de la production est remarquée chez les deux lignées racinaires DS et DT pour un temps d'élicitation de 24h accompagnée d'une diminution de la teneur en hyoscyamine,

Pitta alvarez et al, (2000) interprètent l'augmentation de la teneur en scopolamine par la diminution du taux d'éthylène qui régule l'activité de l'enzyme hyoscyamine-6- β -hydroxylase qui est responsable de la bioconversion de l'hyoscyamine en scopolamine.

6. Comparaison des deux types d'élicitation

Plusieurs méthodes d'élicitation sont appliquées afin de déclencher les mécanismes de défense des plantes permettant d'augmenter leur production en métabolites secondaires (**He et al., 2002**). La réponse à l'élicitation varie selon le type de l'éliciteur ; sa concentration et le temps d'élicitation (**Harfi et al., 2016 ; Pitta alvarez et al., 2000**).

Plusieurs travaux confirment l'efficacité des éliciteurs dans l'augmentation de la croissance des plantes ainsi que la régulation de leur métabolisme secondaire. **Harfi, 2013**

confirme l'efficacité du traitement des lignées racinaires transgéniques de *Datura sp* par des éliciteurs organiques (acide salicylique et acétyle salicylique) par rapport aux sels (KCl et CaCl₂) où l'amélioration de la teneur en hyoscyamine a atteint 156% par rapport au témoin non élicité.

Les résultats de notre étude corroborent avec ceux obtenus par Harfi (2013). En effet des améliorations (par rapport aux témoins) de la teneur en hyoscyamine atteignant 583% par rapport au témoin chez la lignée DS et 471% de la teneur en scopolamine sont obtenues.

Dans notre cas ; l'élicitation biotique avec des *Pseudomonas ssp.* a donné des résultats meilleurs par rapport à celle avec le nitrate d'argent pour la croissance ainsi que la production d'hyoscyamine. Cependant, le nitrate d'argent s'avère plus efficace que les bactéries dans la favorisation de la biosynthèse de la scopolamine ; cela parce que le nitrate d'argent favorise la bioconversion de l'hyoscyamine en scopolamine (**Pitta alvarez et al., 2000**).

Considérés comme des métabolites secondaires à haute valeur ajoutée, les alcaloïdes tropaniques sont d'une importance économique et leur production en quantité suffisante est très recherchée en industrie pharmaceutique. Les études visant l'amélioration de la production de ces métabolites secondaires par des cultures de tissus spécialisées *in-vitro* ont donné des résultats motivants méritant d'être poursuivies.

En effet, plusieurs chercheurs ont confirmés que les cultures racinaires sont très avantageuses et donnent des quantités plus importantes que celles synthétisées *in-vivo* par la plante mère. De plus, des méthodes d'élicitation pouvant améliorer la production des alcaloïdes tropaniques au sein des chevelus racinaires ont été développés.

Le suivi de la biomasse moyenne et la production d'hyoscamine des trois lignées racinaires transgéniques induites par transformation génétique par l'*Agrobacterium rhizogenes* pour une période de cinq ans a permis de comparer leur capacités de production. Les résultats obtenus montrent que les lignées racinaires DS et DT sont plus productives durant leur première année d'induction tandis que la lignée DI n'atteint ses capacités maximales de production d'hyoscyamine qu'à sa deuxième année de culture. De plus, la lignée DT semble la plus performante du point de vue production d'hyoscyamine.

Par ailleurs, nous avons noté des chutes aussi bien de la biomasse moyenne que de la teneur moyenne en hyoscyamine au fur et à mesure des années de culture.

Nous avons aussi, testé deux méthodes d'élicitation biotique et abiotique en vue de l'optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques et la biomasse de tissus racinaires transgéniques de trois espèces de *Datura*.

L'élicitation biotique par des PGPRs (quatre souches de *Pseudomonas*) se révèle positive pour l'optimisation de la biomasse, d'hyoscyamine et de scopolamine. L'élicitation pendant un temps de contact (éliciteur – chevelus racinaires) de 5 jours est plus efficace que celle de 10 jours. Elle permet une amélioration de la teneur en hyoscyamine jusqu'à 582% par rapport au témoin (lignée DS avec C7R12 pendant 10 jours d'élicitation). L'élicitation biotique améliore aussi la production de la scopolamine jusqu'à 471% par rapport au témoin non élicité.

L'élicitation par le nitrate d'argent ne permet pas d'optimiser la biomasse des deux lignées racinaires DS et DT après les deux temps de contact de 24 et 48 heures d'élicitation. En revanche, une amélioration de la biomasse de 74 % est enregistrée chez la lignée DI élicitée pendant 48h par une solution de 1mM d'AgNO₃.

La teneur moyenne en hyoscyamine des lignées racinaires DS et DT est optimisée par l'élicitation avec le nitrate d'argent pendant 48 heures et le meilleur résultat est obtenu

chez la lignée DT (7,89 mg/g MS). La teneur en scopolamine a augmenté chez ces deux lignées par rapport aux témoins après 24 et 48 heures d'élicitation par le nitrate d'argent et le meilleur résultat de scopolamine est obtenu chez la lignée DT élicitee pendant 24h (0,539 mg/g MS).

Au terme de cette recherche et en se basant sur les résultats obtenus, nous pouvons confirmer que l'élicitation biotique et abiotique représentent deux méthodes efficaces pour l'optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques à partir de racines transgéniques de *Datura*. En effet l'élicitation biotique permet d'optimiser à la fois la croissance des tissus et la production en métabolites secondaires. Tandis que celle abiotique (chimique par le nitrate d'argent) seulement certaines combinaisons qui sont révélée efficaces pour l'amélioration des teneurs en métabolites secondaires des racines transgéniques.

Dans la perspective d'approfondir cette étude, il serait judicieux de :

- Tester de nouveaux éliciteurs biotiques tels que les éliciteurs fongiques ;
- Etudier les signaux entre les racines transgéniques et les PGPRs permettant d'améliorer la croissance racinaire et la production d'alcaloïdes;
- Combiner des éliciteurs biotiques et abiotiques ;
- Utiliser des précurseurs de biosynthèse des alcaloïdes tels que les acides aminés.

- Aehle, E., and Dräger, B. (2010). Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of chromatography B* **878**, 1391-1406.
- Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B., & Nikam, T. D. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L.
- Alabri, T. H. A., Al Musalami, A. H. S., Hossain, M. A., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2014). Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *Journal of King Saud University-Science*, 26(3), 237-243.
- Albert, F., & Anderson, A. J. (1987). The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. *Plant physiology*, 85(2), 537-541.
- Altabella, T., Palazón, J., Ribó, M., Angel, E., & Pifiol, M. T. (1994). Comparative study of tropane alkaloid production in transformed roots of *Datura stramonium* and *Scopolia carniolica*. *Plant Physiol*, 13, 113-123.
- Amdoun, R., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., & Khelifi, L. (2005). Ressources génétiques des *Datura* en Algérie. *Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi*, 212-213.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Zarouri, B., Amroun, S., and Khelifi-Slaoui, M. (2006). Production de chevelus racinaires par transformation génétique in vitro de deux espèces de *Datura*. *Biotechnologie végétale. Khelifi. Alger, vol. 0*, 83-85.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Benyoussef, E.-H., Thi, D. V., Assaf-Ducrocq, C., and 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**, 81-87.
- Ameer D., (2009). Effets de la biotisation des semences et des plants de pomme de terre par *Pseudomonas* ssp. Fluorescents sur la promotion de sa croissance et sa protection. Mémoire de magister. Blida, Université de Saad Dahleb. 149.
- Anand, T., Prakasam, V., Chandrasekaran, A., Samiyappan, R., Karthikeyan, G., & Saravanan, A. (2007). Compatibility of azoxystrobin (Amistar 25 SC) with biocontrol agents.
- Antoun, H., & Kloepper, J. (2001). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

- Aslantaş, R., Cakmakçi, R., & Şahin, F. (2007). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia horticultrae*, 111(4), 371-377.
- Baíza A.M., Quiroz-Moreno A., Ruíz J.A., Loyola-Vargas V.M., 1999. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol.59, n.1, p.p: 9-17.
- Baldini, M., Ghelardini, C., Gualtieri, F., Teodori, E., Giotti, A., and Bartolini, A. (1993). Affinity of R-(+)- and S(-)-hyoscyamine for the muscarinic receptors mediating contractions of rabbit peripheral lung strips. *Journal of the Autonomic Nervous System* 43, Supplement, 59-60.
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405-413.
- Baran, J.-M. (2000). *Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde*, Thèse de doctorat en médecine.
- Barguil, Y., Mermond, S., Kintz, P., Villain, M., Choblet, E., Cirimele, V., Cabalion, P., Duhet, D., and Charlot, J.-Y. (2006). L'abus de *Daturas* et de *Kava* en Nouvelle Calédonie: une pratique inquiétante. In "Annales de toxicologie analytique", Vol. 18, pp. 33-43. EDP Sciences.
- Baset M., Shamsuddin ZH., Wahab Z., and marzia M. (2010). Effect PGPR inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissues- cultured of *Musa plantel*ts. *Australian Journal of Crop science*.
- Basse, C. W., Fath, A., & Boller, T. (1993). High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14724-14731.
- Benchabane, M., Bakour, R., Toua, D., & Boutekrabort, A. (2000). Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30(2), 243-246.
- Benhamou, N., Gagné, S., Le Quéré, D., & Dehbi, L. (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1), 45-56.

- Berkov, S., Doncheva, T., Philipov, S., and Alexandrov, K. (2005). Ontogenetic variation of the tropane alkaloids in *Datura stramonium*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 1017-1029.
- Bianchini F., Pantano A C., 1986. Guide vert des plantes et des fleurs. Édition Solar.125P.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., & Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell*, *12*(8), 1425-1440.
- Boitel-Conti, M., Gontier, E., Laberche, J., Ducrocq, C., and Sangwan-Norreel, B. (1995). Permeabilization of *Datura innoxia* hairy roots for release of stored tropane alkaloids. *Planta medica* **61**, 287-290.
- Boitel-Conti, M., Laberche, J., Lanoue, A., Ducrocq, C., and Sangwan-Norreel, B. (2000). Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant cell, tissue and organ culture* **60**, 131-137.
- Boukerma, L., 2011. Effet des (*Pseudomonas* spp. Fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. ENSA-ALGER.159P.
- Boukerma, L., Benchabane, M., Charif, A., & Khelifi, L. (2017). Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. *Plant Protection Science*, *53*(2).
- Bourgaud, F., Mignard, B., Hannewald, P., Laine, J.-M., Gontier, E., and Fevre, J.-P. (2013). Développement d'un nouveau procédé de production d'actifs pharmaceutiques à partir de plantes médicinales: la technologie des plantes à traire. In "Les Rencontres du Végétal. 2013-01-142013-01-15, Angers, FRA".
- Bouzar, H., Moore, L. W., & Schaad, N. W. (1983). Crown gall of pecan: A survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. *Plant Disease*, *67*(3), 310-312.
- Brachet, A., Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Gauvrit, J.-Y., Lanteri, P., and Veuthey, J.-L. (1999). Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analisis* **27**, 772-778.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. *Phytochimie. Plantes médicinales, Paris, Ed. Tec-Doc*.

- Bruneton, J. (2005). "Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'homme et les animaux," Lavoisier Tec & Doc.
- Budi, S., Cordier, C., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Lemoine, M., & Blal, B. (1997, May). Arbuscular mycorrhiza as a way of promoting sustainable growth of micropropagated plants. In *Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Lands 457* (pp. 71-78).
- Bulgakov, V. P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology advances* **26**, 318-324.
- Chaudhary, S. K., Ceska, O., Warrington, P. J., and Ashwood-Smith, M. J. (1985). Increased furocoumarin content of celery during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 1153-1157.
- Chavarri, M., Vegas García, A., Zambrano, A. Y., Gutiérrez, Z., & Demey, J. R. (2010). Insertion of *Agrobacterium rhizogenes* rolB gene in Mango. *Interciencia*, 35(7).
- Csapody V., 1961. Magyarország kulturflórája. Budapest, 92 P.
- Dambri M., 1998.Évaluation de la composition alcaloïdique des plantes de *Datura innoxia* Mill et *Datura tatula* L poussant à l'état sauvage. Thèse. Ing. Sc. Agr.Blida.81P.
- Delany, I., Sheehan, M. M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S., & O'Gara, F. (2000). Regulation of production of the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of phlF as a transcriptional repressor. *Microbiology*, 146(2), 537-546.
- Deng, F. (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1), 16-26.
- Dhakulkar, S., Ganapathi, T., Bhargava, S., and Bapat, V. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant science* **169**, 812-818.
- Digat B., 1989. strategie for seed bacterization. *Acta . hortic.* 253, p.p : 121-130.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4), 284-297.

- Dräger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **978**, 1-35.
- Ducrocq, C. (1994). Transformation génétique d'une plante médicinale: le datura innoxia mill., par l'intermédiaire d'agrobacterium tumefaciens et agrobacterium rhizogenes; et évaluation de la production de métabolites secondaires, Amiens.
- El Bazaoui, A., Stambouli, H., Bellimam, M. A., and Soulaymani, A. (2009). Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du Datura stramonium L. par CPG/SM et CL/SM. In "Annales de toxicologie analytique", Vol. 21, pp. 183-188. EDP Sciences.
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
- Farnsworth, N. R., and Soejarto, D. (1991). Global importance of medicinal plants. *The conservation of medicinal plants*, 25-51.
- Fliniaux, O., Mesnard, F., Raynaud-Le Grandic, S., Baltora-Rosset, S., Bienaimé, C., Robins, R. J., and Fliniaux, M. A. (2004). Altered nitrogen metabolism associated with de-differentiated suspension cultures derived from root cultures of Datura stramonium studied by heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) NMR spectroscopy. *Journal of experimental botany* **55**, 1053-1060.
- Furze, J. M., Rhodes, M. J., Parr, A. J., Robins, R. J., Witthead, I. M., & Threlfall, D. R. (1991). Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of Datura stramonium. *Plant cell reports*, 10(3), 111-114.
- Gadzovska S., Maury S., Hano C., Lamblin F., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D., 2004. Influence de différents éliciteurs sur la production de métabolites secondaires de divers explants d'*Hespericum perforatum* L. Culture in vitro. Acte du 17^{ème} colloque biotechnologique. France, 72P.
- Gaire, B. P., and Subedi, L. (2013). A review on the pharmacological and toxicological aspects of Datura stramonium L. *J Integr Med* **11**, 73-9.
- Gamborg, O. L. c., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* **50**, 151-158.

- Gholami, A., Biari, A., & Nezarat, S. (2009). Effect of seed priming with growth promoting rhizobacteria at different rhizosphere condition on growth parameter of maize.
- Giri, A., and Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* **18**, 1-22.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, *41*(2), 109-117.
- Mohamed, H. I., & Gomaa, E. Z. (2012). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, *50*(2), 263-272.
- Gontier, E. (1993). Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé in vitro: impact physiologique de l'immobilisation des cellules au sein d'une matrice d'alginate de calcium.
- Gontier, E., Clément, A., Tran, T., Gravot, A., Lievre, K., Guckert, A., and Bourgaud, F. (2002). Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Science* **163**, 723-732.
- Gorelick, J., and Bernstein, N. (2014a). Elicitation. **124**, 201-230.
- Gorelick, J., and Bernstein, N. (2014b). Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in Agronomy* **124**, 201-230.
- Gros-Lebon, C. (1971). "Datura stramonium L-Datura tatula L.: etude comparée sur les plans botanique, chimique et pharmacodynamique: thèse pour le," Université.
- Gryniewicz, G., and Gadzikowska, M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol Rep* **60**, 439-463.
- Hale, A. L., Meepagala, K. M., Oliva, A., Aliotta, G., and Duke, S. O. (2004). Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 3345-3349.
- Harfi, B. (2009). Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp* : Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Magister. ENSA-Alger.109P.

- Harfi., 2013. Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscuamine chez *Datura* sp. ENSA-ALGER. 79p.
- 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.
- Harfi, B., Khelifi-Slaoui, M., Bekhouche, M., Benyammi, R., Hefferon, K., Makhzoum, A., and Khelifi, L. (2016). Hyoscyamine production in hairy roots of three *Datura* species exposed to high-salt medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52, 92-98.
- He C.Y., Hsiang T., Wolyn D.J., 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.*, vol. 51, p.p. : 225–230.
- Herbert, R. B. (2001). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural product reports*, 18(1), 50-65.
- Hopkins, W. G. (2003). "Physiologie végétale," De Boeck Supérieur.
- Houmani, Z. (1999). Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. *Th. Doctorat, INA, Alger*, 124.
- Houmani, Z., and Cosson, L. (2000). Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. *Ethnopharmacology. Genova, Italy*, 205-214.
- Hu, Zhi-Bi, and Min Du. "Hairy root and its application in plant genetic engineering." *Journal of integrative plant biology* 48.2 (2006): 121-127.
- Huang, F., Dai, X., Hu, Y., Chen, C., and Zhu, G. (2005). Progress in synthesis of tropane alkaloids. *Chem. Reagent* 27, 141-144.
- Huang, Y. (1994). A method for the diagnosis of early hepatocellular carcinoma by analysis of serum transferrin with *datura stramonium* agglutinin. *ACTA-ACADEMIAE MEDICINAE SHANGHAI* 21, 249-249.
- Hutcheson, S. W. (1999). The hrp Cluster of *Pseudomonas syringae*: aPathogenicity Island Encoding a Type III Protein Translocation Complex?. In *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements* (pp. 309-329). American Society of Microbiology.
- Iqbal A., John P., Shamsul H. (2008). *Plant-Bacteria Interactions*. Copyright, Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 310P.

- Iranbakhsh, A. R., Oshagi, M. A., & Ebadi, M. (2007). Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(8), 1236-1242.
- Isérin, P., Masson, M., and Kedellini J. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*.
- Ito, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P., & Bally, R. (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(4), 339-342.
- Jakabová, S., Vincze, L., Farkas, Á., Kilár, F., Boros, B., and Felinger, A. (2012). Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* **1232**, 295-301.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2007). *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(1), 7-11.
- Jeun, Y. C., Park, K. S., Kim, C. H., Fowler, W. D., & Kloepper, J. W. (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, 29(1), 34-42.
- Jirschitzka, J., Dolke, F., and D'Auria, J. C. (2013). Increasing the pace of new discoveries in tropane alkaloid biosynthesis. *Adv. Bot. Res* **68**, 39-72.
- Jouzier, E. (2005). Solanacées médicinales et philatélie. *BULLETIN-SOCIETE DE PHARMACIE DE BORDEAUX*, 144(3/4), 311.
- Kai, G., Zhang, A., Guo, Y., Li, L., Cui, L., Luo, X., ... & Xiao, J. (2012). Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase I and hyoscyamine-6 β -hydroxylase. *Molecular BioSystems*, 8(11), 2883-2890.
- Khelifi-Slaoui, M., Rezine, R., Amroun, S., Amdoun, R., and Khelifi, L. (2005). Embryons somatiques et bourgeons néoformés induit sur explants issus de vitrosemis

de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. *Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions*.

- Kim Y.J., Wyslouzil B.E., Weathers R.J., 2002. Invited review : secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 38, p.p. : 1 – 10.
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Translational Research*, 44(2), 301-307.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885.
- Kopka, J. (2006). Gas chromatography mass spectrometry. *In "Plant Metabolomics"*, pp. 3-20. Springer.
- Kosieradzka, K. (2010). Mesure des effets isotopiques cinétiques lors de la dégradation d'alcaloïdes tropaniques par les souches de bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2.
- Kumar V., Sharma A., Prasad B.C.N., Gururaj H.B., Ravishankar G.A., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of biotechnology* , Vol. 9, n. 4, p.p. : 349-357.
- Kursinszki, L., Hank, H., László, I., and Szöke, É. (2005). Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A* **1091**, 32-39.
- Lambert, C., Thomas, G., Leger, D., Pamboukdjian, N., and Tepfer, D. (1989). Use of genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* to improve fruit tree rooting. *Colloques sur les Recherches Fruitières (France)*.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, 8(7), 298-300.
- Lanoue, A., Shakourzadeh, K., Marison, I., Laberche, J. C., Christen, P., Sangwan-Norreel, B., and Boitel-Conti, M. (2004). Occurrence of circadian rhythms in hairy root cultures grown under controlled conditions. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 722-729.

- Latour, X., & Lemanceau, P. (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 9(17), 427-443.
- Leinhos, V. (1994). Effects of pH and glucose on auxin production of phosphate-solubilizing rhizobacteria in vitro. *Microbiological research*, 149(2), 135-138.
- Li, L.-n., Ji, M.-s., and Su, Z.-y. (2006). Research advances in use of the agricultural fungicide *Sophora flavescens*. *PESTICIDES-SHENYANG*- **45**, 581.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Ayora-Talavera, T., & Loyola-Vargas, V. M. (1993). Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant cell, tissue and organ culture*, 33(3), 321-329.
- Martins, T., Domingos, A., Novo, C., and Lourenco, P. (2015). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on in vitro rooting of *Vitis vinifera*. *VITIS-Journal of Grapevine Research* **42**, 159.
- Mauro, N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (+/-)-camptothécine. *Th. Doctorat, universite Joseph Fourier--GRENOBLE 1*.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.
- Mello marcelo R.F., Mariano Rosa L.R., Menezes M, Camara Terezenha R., Assis Sayonara M.P., 2002. Screening of bacteria and bacterization methods for growth promotion of micropropagated pineapple plantlets. Vol.28, (3), pp 222-228.
- Meyer, A., Tempe, J., and Costantino, P. (2000). Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Plant-microbe interactions* **5**, 93-139.
- Mino, Y., Usami, H., Inoue, S., Ikeda, K., and Ota, N. (1993). Protein chemotaxonomy of genus *Datura*: identical amino acid sequence of ferredoxin from two varieties of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* **33**, 601-605.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., & Ebel, J. (2000). The Hepta-?-Glucoside Elicitor-Binding Proteins from Legumes Represent a Putative Receptor Family. *Biological chemistry*, 381(8), 705-713.
- Moharrami, F., Hosseini, B. B., Sharafi, A., and Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture

of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1-8.

- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79.
- Morard, P. (1995). *Les cultures végétales hors sol*. SARL Publications Agricoles.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-497.
- Nagatome, H., Yamamoto, T., Taya, M., & Tanaka, N. (2000). Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar medium kept at ambient temperature. *Biochemical engineering journal*, 6(1), 75-80.
- Nakanishi, F., Sasaki, K., and Shimomura, K. (2000). Kinetics of littorine content in various developing stages of regenerates of *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* **19**, 1021-1026.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nguyen, T.-K.-O., Jamali, A., Lanoue, A., Gontier, E., and Dauwe, R. (2015). Unravelling the architecture and dynamics of tropane alkaloid biosynthesis pathways using metabolite correlation networks. *Phytochemistry* **116**, 94-103.
- Oksman-Caldentey, K.-M. (2007). Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis-novel approaches towards biotechnological production of plant-derived pharmaceuticals. *Current pharmaceutical biotechnology* **8**, 203-210.
- Ono, N. N., and Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* **180**, 439-446.
- Patten C.L., Glick B.R., (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 68, pp 3795-3801
- Pelikan, W., and Claretie, G. (1988). "L'homme et les plantes médicinales," Centre Triades.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225-1237.

- Primrose S., Twyman R., Old R., 2003. Principes de génie génétique. 6ème édition, Ed. De Boeck Université. 400 P.
- Pitta–Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giuliatti, 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.
- Podkowa, K., Podkowa, A., Sałat, K., Lenda, T., Pilc, A., and Pałucha-Poniewiera, A. (2016). Antidepressant-like effects of scopolamine in mice are enhanced by the group II mGlu receptor antagonist LY341495. *Neuropharmacology* **111**, 169-179.
- Poletti A., 1988. Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Neislé S.A. Paris, 222 P.
- Rahmoune, B., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Khelifi, L., Strueh, A., Erban, A., ... & van Dongen, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of plant interactions*, 12(1), 1-6.
- Ramadan M.F., Zayed R., El-Shamy H., 2007. Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants. *Food Chemistry*, vol. 103, n. 3, p.p. : 885 - 890.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.
- Ricard, F., Abe, E., Duverneuil-Mayer, C., Charlier, P., de la Grandmaison, G., and Alvarez, J. C. (2012). Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC–MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. *Forensic Science International* **223**, 256-260.
- Roberts, S. C., & Shuler, M. L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current opinion in Biotechnology*, 8(2), 154-159.
- Rolfe, B. G., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Mathesius, U., Pittock, C., Gärtner, E., ... & McIver, J. (1997). Root morphogenesis in legumes and cereals and the effect of bacterial inoculation on root development. In *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* (pp. 131-144). Springer, Dordrecht.
- Romeike, A. (1961). Sur un hybride de *Datura* riche en scopolamine. *Bulletin de la Société Botanique de France* **108**, 47-50.

- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., ... & Uknes, S. (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell*, 9(3), 425-439.
- Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M., & Loper, J. E. (1995). The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), 12255-12259.
- Selvaraj, T., Rajeshkumar, S., Nisha, M. C., Wondimu, L., & Tesso, M. (2008). Effect of *Glomus mosseae* and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on growth, nutrients and content of secondary metabolites in *Begonia malabarica* Lam. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2(3), 516-525.
- Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Défago, G., & Haas, D. (1995). Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *Journal of Bacteriology*, 177(18), 5387-5392.
- Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2971-2975
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G., and Ghanadian, M. (2015). Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turkish Journal of Biology* 39, 111-118.
- Shimomura, K., Sauerwein, M., & Ishimaru, K. (1991). Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochemistry*, 30(7), 2275-2278.
- Silva, H. S. A., da Silva Romeiro, R., Macagnan, D., de Almeida Halfeld-Vieira, B., Pereira, M. C. B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29(2), 288-295.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669.

- Souret, F. F., Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Wobbe, K. K., and Weathers, P. J. (2003). Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering* **83**, 653-667.
- Spollansky, T. C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, *3*(1), 31-32.
- Srivastava S., Srivastava A.K., 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol 27, p.p: 29 – 43.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, *19*(1), 1-30.
- Tao, J., and Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany* **72**, 211-216.
- Vanhulle, S., Radman, R., Parra, R., Cui, T., Bols, C. M., Tron, T., ... & Keshavarz, T. (2007). Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(7), 1712-1718.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, *36*(1), 453-483.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A., 1999. «The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins». *Mol. plant Pathol.* Vol 55, N°2 pp 85-9.
- Van Loon, L., & Bakker, P. A. H. M. (2003). Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In *Root ecology* (pp. 297-330). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Van Peer, R., & Schippers, B. (1992). Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *98*(2), 129.
- Vanisree, M., Lee, C.-Y., Lo, S.-F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., and Tsay, H.-S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin* **45**, 1-22.
- Vasconsuelo A., Boland R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sciences*, *172*, p.p: 861-875.

- Veersham C., (2004). In Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology, C.B.S. Publisher, India, p.p. : 270-293.
- Verpoorte, R. (2000). Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology* **52**, 253-262.
- Vijaya, D., Bavani, S., & Veena, M. (2000). Prevalence of nonfermenters in clinical specimens. *Indian journal of medical sciences*, *54*(3), 87-91.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 1-10.
- Vu, T. D. (2008). Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs biotiques et abiotiques, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Waoo, A. A., Khare, S., and Ganguly, S. (2014). Evaluation of Phytoremediation Potential of *Datura innoxia* for Heavy Metals in an Industrially Polluted Area in Bhopal, India. *Evaluation* **2**, 3.
- Welander, M., and Zhu, L. H. (2006). Rol genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses. *Plant breeding reviews* **26**, 79-97.
- 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.
- Wink, M. (1998). Modes of action of alkaloids. In "Alkaloids", pp. 301-326. Springer.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, *125*(1-2), 155-166.
- Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and environmental microbiology*, *66*(1), 345-351.
- Yu, Y., Zhang, W.-B., Li, X.-Y., Piao, X.-C., Jiang, J., and Lian, M.-L. (2016). Pathogenic fungal elicitors enhance ginsenoside biosynthesis of adventitious roots in *Panax quinquefolius* during bioreactor culture. *Industrial Crops and Products* **94**, 729-735.

- Zabetakis, I., Edwards, R., & O'Hagan, D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1), 53-56.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., & Musarrat, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.
- 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.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.-M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., and Zhang, H. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **101**, 6786-6791.

- Aehle, E., and Dräger, B. (2010). Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of chromatography B* **878**, 1391-1406.
- Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B., & Nikam, T. D. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L.
- Alabri, T. H. A., Al Musalami, A. H. S., Hossain, M. A., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2014). Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *Journal of King Saud University-Science*, 26(3), 237-243.
- Albert, F., & Anderson, A. J. (1987). The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. *Plant physiology*, 85(2), 537-541.
- Altabella, T., Palazón, J., Ribó, M., Angel, E., & Pifiol, M. T. (1994). Comparative study of tropane alkaloid production in transformed roots of *Datura stramonium* and *Scopolia carniolica*. *Plant Physiol*, 13, 113-123.
- Amdoun, R., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., & Khelifi, L. (2005). Ressources génétiques des *Datura* en Algérie. *Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi*, 212-213.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Zarouri, B., Amroun, S., and Khelifi-Slaoui, M. (2006). Production de chevelus racinaires par transformation génétique in vitro de deux espèces de *Datura*. *Biotechnologie végétale. Khelifi. Alger, vol. 0*, 83-85.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Benyoussef, E.-H., Thi, D. V., Assaf-Ducrocq, C., and 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**, 81-87.
- Ameer D., (2009). Effets de la biotisation des semences et des plants de pomme de terre par *Pseudomonas* ssp. Fluorescents sur la promotion de sa croissance et sa protection. Mémoire de magister. Blida, Université de Saad Dahleb. 149.
- Anand, T., Prakasam, V., Chandrasekaran, A., Samiyappan, R., Karthikeyan, G., & Saravanan, A. (2007). Compatibility of azoxystrobin (Amistar 25 SC) with biocontrol agents.
- Antoun, H., & Kloepper, J. (2001). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

- Aslantaş, R., Cakmakçi, R., & Şahin, F. (2007). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia horticulturae*, 111(4), 371-377.
- Baíza A.M., Quiroz-Moreno A., Ruíz J.A., Loyola-Vargas V.M., 1999. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol.59, n.1, p.p: 9-17.
- Baldini, M., Ghelardini, C., Gualtieri, F., Teodori, E., Giotti, A., and Bartolini, A. (1993). Affinity of R-(+)- and S(-)-hyoscyamine for the muscarinic receptors mediating contractions of rabbit peripheral lung strips. *Journal of the Autonomic Nervous System* 43, Supplement, 59-60.
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 45(4), 405-413.
- Baran, J.-M. (2000). *Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde*, Thèse de doctorat en médecine.
- Barguil, Y., Mermond, S., Kintz, P., Villain, M., Choblet, E., Cirimele, V., Cabalion, P., Duhet, D., and Charlot, J.-Y. (2006). L'abus de *Daturas* et de *Kava* en Nouvelle Calédonie: une pratique inquiétante. In "Annales de toxicologie analytique", Vol. 18, pp. 33-43. EDP Sciences.
- Baset M., Shamsuddin ZH., Wahab Z., and marzia M. (2010). Effect PGPR inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissues- cultured of *Musa* plantlets. *Australian Journal of Crop science*.
- Basse, C. W., Fath, A., & Boller, T. (1993). High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14724-14731.
- Benchabane, M., Bakour, R., Toua, D., & Boutekratt, A. (2000). Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. *EPPO Bulletin*, 30(2), 243-246.
- Benhamou, N., Gagné, S., Le Quéré, D., & Dehbi, L. (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1), 45-56.

- Berkov, S., Doncheva, T., Philipov, S., and Alexandrov, K. (2005). Ontogenetic variation of the tropane alkaloids in *Datura stramonium*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 1017-1029.
- Bianchini F., Pantano A C., 1986. Guide vert des plantes et des fleurs. Édition Solar.125P.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., & Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell*, *12*(8), 1425-1440.
- Boitel-Conti, M., Gontier, E., Laberche, J., Ducrocq, C., and Sangwan-Norreel, B. (1995). Permeabilization of *Datura innoxia* hairy roots for release of stored tropane alkaloids. *Planta medica* **61**, 287-290.
- Boitel-Conti, M., Laberche, J., Lanoue, A., Ducrocq, C., and Sangwan-Norreel, B. (2000). Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant cell, tissue and organ culture* **60**, 131-137.
- Boukerma, L., 2011. Effet des (*Pseudomonas* spp. Fluorescents) sur le biocontrôle et l'induction de la résistance systémique (IRS) chez la tomate vis-à-vis de la fusariose vasculaire. ENSA-ALGER.159P.
- Boukerma, L., Benchabane, M., Charif, A., & Khelifi, L. (2017). Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) in the Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. *Plant Protection Science*, *53*(2).
- Bourgaud, F., Mignard, B., Hannewald, P., Laine, J.-M., Gontier, E., and Fevre, J.-P. (2013). Développement d'un nouveau procédé de production d'actifs pharmaceutiques à partir de plantes médicinales: la technologie des plantes à traire. In "Les Rencontres du Végétal. 2013-01-142013-01-15, Angers, FRA".
- Bouzar, H., Moore, L. W., & Schaad, N. W. (1983). Crown gall of pecan: A survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. *Plant Disease*, *67*(3), 310-312.
- Brachet, A., Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Gauvrit, J.-Y., Lanteri, P., and Veuthey, J.-L. (1999). Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analisis* **27**, 772-778.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. *Phytochimie. Plantes médicinales, Paris, Ed. Tec-Doc*.

- Bruneton, J. (2005). "Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'homme et les animaux," Lavoisier Tec & Doc.
- Budi, S., Cordier, C., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Lemoine, M., & Blal, B. (1997, May). Arbuscular mycorrhiza as a way of promoting sustainable growth of micropropagated plants. In *Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Lands 457* (pp. 71-78).
- Bulgakov, V. P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology advances* **26**, 318-324.
- Chaudhary, S. K., Ceska, O., Warrington, P. J., and Ashwood-Smith, M. J. (1985). Increased furocoumarin content of celery during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 1153-1157.
- Chavarri, M., Vegas García, A., Zambrano, A. Y., Gutiérrez, Z., & Demey, J. R. (2010). Insertion of *Agrobacterium rhizogenes* rolB gene in Mango. *Interciencia*, 35(7).
- Csapody V., 1961. Magyarország kulturflórája. Budapest, 92 P.
- Dambri M., 1998.Évaluation de la composition alcaloïdique des plantes de *Datura innoxia* Mill et *Datura tatula* L poussant à l'état sauvage. Thèse. Ing. Sc. Agr.Blida.81P.
- Delany, I., Sheehan, M. M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S., & O'Gara, F. (2000). Regulation of production of the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of phlF as a transcriptional repressor. *Microbiology*, 146(2), 537-546.
- Deng, F. (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1), 16-26.
- Dhakulkar, S., Ganapathi, T., Bhargava, S., and Bapat, V. (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant science* **169**, 812-818.
- Digat B., 1989. strategie for seed bacterization. *Acta . hortic.* 253, p.p : 121-130.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4), 284-297.

- Dräger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A* **978**, 1-35.
- Ducrocq, C. (1994). Transformation génétique d'une plante médicinale: le datura innoxia mill., par l'intermédiaire d'agrobacterium tumefaciens et agrobacterium rhizogenes; et évaluation de la production de métabolites secondaires, Amiens.
- El Bazaoui, A., Stambouli, H., Bellimam, M. A., and Soulaymani, A. (2009). Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du Datura stramonium L. par CPG/SM et CL/SM. In "Annales de toxicologie analytique", Vol. 21, pp. 183-188. EDP Sciences.
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
- Farnsworth, N. R., and Soejarto, D. (1991). Global importance of medicinal plants. *The conservation of medicinal plants*, 25-51.
- Fliniaux, O., Mesnard, F., Raynaud-Le Grandic, S., Baltora-Rosset, S., Bienaimé, C., Robins, R. J., and Fliniaux, M. A. (2004). Altered nitrogen metabolism associated with de-differentiated suspension cultures derived from root cultures of Datura stramonium studied by heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) NMR spectroscopy. *Journal of experimental botany* **55**, 1053-1060.
- Furze, J. M., Rhodes, M. J., Parr, A. J., Robins, R. J., Witthead, I. M., & Threlfall, D. R. (1991). Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of Datura stramonium. *Plant cell reports*, 10(3), 111-114.
- Gadzovska S., Maury S., Hano C., Lamblin F., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D., 2004. Influence de différents éliciteurs sur la production de métabolites secondaires de divers explants d'*Hespericum perforatum* L. Culture in vitro. Acte du 17^{ème} colloque biotechnologique. France, 72P.
- Gaire, B. P., and Subedi, L. (2013). A review on the pharmacological and toxicological aspects of Datura stramonium L. *J Integr Med* **11**, 73-9.
- Gamborg, O. L. c., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* **50**, 151-158.

- Gholami, A., Biari, A., & Nezarat, S. (2009). Effect of seed priming with growth promoting rhizobacteria at different rhizosphere condition on growth parameter of maize.
- Giri, A., and Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* **18**, 1-22.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, *41*(2), 109-117.
- Mohamed, H. I., & Gomaa, E. Z. (2012). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, *50*(2), 263-272.
- Gontier, E. (1993). Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé in vitro: impact physiologique de l'immobilisation des cellules au sein d'une matrice d'alginate de calcium.
- Gontier, E., Clément, A., Tran, T., Gravot, A., Lievre, K., Guckert, A., and Bourgaud, F. (2002). Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Science* **163**, 723-732.
- Gorelick, J., and Bernstein, N. (2014a). Elicitation. **124**, 201-230.
- Gorelick, J., and Bernstein, N. (2014b). Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in Agronomy* **124**, 201-230.
- Gros-Lebon, C. (1971). "Datura stramonium L-Datura tatula L.: etude comparée sur les plans botanique, chimique et pharmacodynamique: thèse pour le," Université.
- Gryniewicz, G., and Gadzikowska, M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol Rep* **60**, 439-463.
- Hale, A. L., Meepagala, K. M., Oliva, A., Aliotta, G., and Duke, S. O. (2004). Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 3345-3349.
- Harfi, B. (2009). Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp* : Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Magister. ENSA-Alger.109P.

- Harfi., 2013. Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscuamine chez *Datura* sp. ENSA-ALGER. 79p.
- 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.
- Harfi, B., Khelifi-Slaoui, M., Bekhouche, M., Benyammi, R., Hefferon, K., Makhzoum, A., and Khelifi, L. (2016). Hyoscyamine production in hairy roots of three *Datura* species exposed to high-salt medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52, 92-98.
- He C.Y., Hsiang T., Wolyn D.J., 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.*, vol. 51, p.p. : 225–230.
- Herbert, R. B. (2001). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural product reports*, 18(1), 50-65.
- Hopkins, W. G. (2003). "Physiologie végétale," De Boeck Supérieur.
- Houmani, Z. (1999). Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. *Th. Doctorat, INA, Alger*, 124.
- Houmani, Z., and Cosson, L. (2000). Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. *Ethnopharmacology. Genova, Italy*, 205-214.
- Hu, Zhi-Bi, and Min Du. "Hairy root and its application in plant genetic engineering." *Journal of integrative plant biology* 48.2 (2006): 121-127.
- Huang, F., Dai, X., Hu, Y., Chen, C., and Zhu, G. (2005). Progress in synthesis of tropane alkaloids. *Chem. Reagent* 27, 141-144.
- Huang, Y. (1994). A method for the diagnosis of early hepatocellular carcinoma by analysis of serum transferrin with *datura stramonium* agglutinin. *ACTA-ACADEMIAE MEDICINAE SHANGHAI* 21, 249-249.
- Hutcheson, S. W. (1999). The hrp Cluster of *Pseudomonas syringae*: aPathogenicity Island Encoding a Type III Protein Translocation Complex?. In *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements* (pp. 309-329). American Society of Microbiology.
- Iqbal A., John P., Shamsul H. (2008). *Plant-Bacteria Interactions*. Copyright, Wiley-vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 310P.

- Iranbakhsh, A. R., Oshagi, M. A., & Ebadi, M. (2007). Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(8), 1236-1242.
- Isérin, P., Masson, M., and Kedellini J. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*.
- Ito, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356.
- Jacoud, C., Job, D., Wadoux, P., & Bally, R. (1999). Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(4), 339-342.
- Jakabová, S., Vincze, L., Farkas, Á., Kilár, F., Boros, B., and Felinger, A. (2012). Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* **1232**, 295-301.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2007). *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(1), 7-11.
- Jeun, Y. C., Park, K. S., Kim, C. H., Fowler, W. D., & Kloepper, J. W. (2004). Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control*, 29(1), 34-42.
- Jirschitzka, J., Dolke, F., and D'Auria, J. C. (2013). Increasing the pace of new discoveries in tropane alkaloid biosynthesis. *Adv. Bot. Res* **68**, 39-72.
- Jouzier, E. (2005). Solanacées médicinales et philatélie. *BULLETIN-SOCIETE DE PHARMACIE DE BORDEAUX*, 144(3/4), 311.
- Kai, G., Zhang, A., Guo, Y., Li, L., Cui, L., Luo, X., ... & Xiao, J. (2012). Enhancing the production of tropane alkaloids in transgenic *Anisodus acutangulus* hairy root cultures by over-expressing tropinone reductase I and hyoscyamine-6 β -hydroxylase. *Molecular BioSystems*, 8(11), 2883-2890.
- Khelifi-Slaoui, M., Rezine, R., Amroun, S., Amdoun, R., and Khelifi, L. (2005). Embryons somatiques et bourgeons néoformés induit sur explants issus de vitrosemis

de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. *Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions*.

- Kim Y.J., Wyslouzil B.E., Weathers R.J., 2002. Invited review : secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 38, p.p. : 1 – 10.
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Translational Research*, 44(2), 301-307.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885.
- Kopka, J. (2006). Gas chromatography mass spectrometry. *In "Plant Metabolomics"*, pp. 3-20. Springer.
- Kosieradzka, K. (2010). Mesure des effets isotopiques cinétiques lors de la dégradation d'alcaloïdes tropaniques par les souches de bactéries *Pseudomonas* AT3 et MS2.
- Kumar V., Sharma A., Prasad B.C.N., Gururaj H.B., Ravishankar G.A., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of biotechnology* , Vol. 9, n. 4, p.p. : 349-357.
- Kursinszki, L., Hank, H., László, I., and Szöke, É. (2005). Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A* **1091**, 32-39.
- Lambert, C., Thomas, G., Leger, D., Pamboukdjian, N., and Tepfer, D. (1989). Use of genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* to improve fruit tree rooting. *Colloques sur les Recherches Fruitières (France)*.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, 8(7), 298-300.
- Lanoue, A., Shakourzadeh, K., Marison, I., Laberche, J. C., Christen, P., Sangwan-Norreel, B., and Boitel-Conti, M. (2004). Occurrence of circadian rhythms in hairy root cultures grown under controlled conditions. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 722-729.

- Latour, X., & Lemanceau, P. (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 9(17), 427-443.
- Leinhos, V. (1994). Effects of pH and glucose on auxin production of phosphate-solubilizing rhizobacteria in vitro. *Microbiological research*, 149(2), 135-138.
- Li, L.-n., Ji, M.-s., and Su, Z.-y. (2006). Research advances in use of the agricultural fungicide *Sophora flavescens*. *PESTICIDES-SHENYANG*- 45, 581.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Ayora-Talavera, T., & Loyola-Vargas, V. M. (1993). Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant cell, tissue and organ culture*, 33(3), 321-329.
- Martins, T., Domingos, A., Novo, C., and Lourenco, P. (2015). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on in vitro rooting of *Vitis vinifera*. *VITIS-Journal of Grapevine Research* 42, 159.
- Mauro, N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+)-anatoxine-a et la (+/-)-camptothécine. *Th. Doctorat, universite Joseph Fourier--GRENOBLE 1*.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-572.
- Mello marcelo R.F., Mariano Rosa L.R., Menezes M, Camara Terezenha R., Assis Sayonara M.P., 2002. Screening of bacteria and bacterization methods for growth promotion of micropropagated pineapple plantlets. Vol.28, (3), pp 222-228.
- Meyer, A., Tempe, J., and Costantino, P. (2000). Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Plant-microbe interactions* 5, 93-139.
- Mino, Y., Usami, H., Inoue, S., Ikeda, K., and Ota, N. (1993). Protein chemotaxonomy of genus *Datura*: identical amino acid sequence of ferredoxin from two varieties of *Datura stramonium*. *Phytochemistry* 33, 601-605.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., & Ebel, J. (2000). The Hepta-?-Glucoside Elicitor-Binding Proteins from Legumes Represent a Putative Receptor Family. *Biological chemistry*, 381(8), 705-713.
- Moharrami, F., Hosseini, B. B., Sharafi, A., and Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture

of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1-8.

- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79.
- Morard, P. (1995). *Les cultures végétales hors sol*. SARL Publications Agricoles.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-497.
- Nagatome, H., Yamamoto, T., Taya, M., & Tanaka, N. (2000). Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar medium kept at ambient temperature. *Biochemical engineering journal*, 6(1), 75-80.
- Nakanishi, F., Sasaki, K., and Shimomura, K. (2000). Kinetics of littorine content in various developing stages of regenerates of *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* **19**, 1021-1026.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nguyen, T.-K.-O., Jamali, A., Lanoue, A., Gontier, E., and Dauwe, R. (2015). Unravelling the architecture and dynamics of tropane alkaloid biosynthesis pathways using metabolite correlation networks. *Phytochemistry* **116**, 94-103.
- Oksman-Caldentey, K.-M. (2007). Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis-novel approaches towards biotechnological production of plant-derived pharmaceuticals. *Current pharmaceutical biotechnology* **8**, 203-210.
- Ono, N. N., and Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* **180**, 439-446.
- Patten C.L., Glick B.R., (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 68, pp 3795-3801
- Pelikan, W., and Claretie, G. (1988). "L'homme et les plantes médicinales," Centre Triades.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225-1237.

- Primrose S., Twyman R., Old R., 2003. Principes de génie génétique. 6ème édition, Ed. De Boeck Université. 400 P.
- Pitta–Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giuliatti, 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.
- Podkowa, K., Podkowa, A., Sałat, K., Lenda, T., Pilc, A., and Pałucha-Poniewiera, A. (2016). Antidepressant-like effects of scopolamine in mice are enhanced by the group II mGlu receptor antagonist LY341495. *Neuropharmacology* **111**, 169-179.
- Poletti A., 1988. Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Neislé S.A. Paris, 222 P.
- Rahmoune, B., Morsli, A., Khelifi-Slaoui, M., Khelifi, L., Strueh, A., Erban, A., ... & van Dongen, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of plant interactions*, 12(1), 1-6.
- Ramadan M.F., Zayed R., El-Shamy H., 2007. Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants. *Food Chemistry*, vol. 103, n. 3, p.p. : 885 - 890.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.
- Ricard, F., Abe, E., Duverneuil-Mayer, C., Charlier, P., de la Grandmaison, G., and Alvarez, J. C. (2012). Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC–MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. *Forensic Science International* **223**, 256-260.
- Roberts, S. C., & Shuler, M. L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current opinion in Biotechnology*, 8(2), 154-159.
- Rolfe, B. G., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Mathesius, U., Pittock, C., Gärtner, E., ... & McIver, J. (1997). Root morphogenesis in legumes and cereals and the effect of bacterial inoculation on root development. In *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* (pp. 131-144). Springer, Dordrecht.
- Romeike, A. (1961). Sur un hybride de *Datura* riche en scopolamine. *Bulletin de la Société Botanique de France* **108**, 47-50.

- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., ... & Uknes, S. (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell*, 9(3), 425-439.
- Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M., & Loper, J. E. (1995). The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), 12255-12259.
- Selvaraj, T., Rajeshkumar, S., Nisha, M. C., Wondimu, L., & Tesso, M. (2008). Effect of *Glomus mosseae* and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on growth, nutrients and content of secondary metabolites in *Begonia malabarica* Lam. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2(3), 516-525.
- Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Défago, G., & Haas, D. (1995). Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *Journal of Bacteriology*, 177(18), 5387-5392.
- Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2971-2975
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G., and Ghanadian, M. (2015). Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turkish Journal of Biology* 39, 111-118.
- Shimomura, K., Sauerwein, M., & Ishimaru, K. (1991). Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochemistry*, 30(7), 2275-2278.
- Silva, H. S. A., da Silva Romeiro, R., Macagnan, D., de Almeida Halfeld-Vieira, B., Pereira, M. C. B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29(2), 288-295.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669.

- Souret, F. F., Kim, Y., Wyslouzil, B. E., Wobbe, K. K., and Weathers, P. J. (2003). Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering* **83**, 653-667.
- Spollansky, T. C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, *3*(1), 31-32.
- Srivastava S., Srivastava A.K., 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol 27, p.p: 29 – 43.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, *19*(1), 1-30.
- Tao, J., and Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany* **72**, 211-216.
- Vanhulle, S., Radman, R., Parra, R., Cui, T., Bols, C. M., Tron, T., ... & Keshavarz, T. (2007). Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(7), 1712-1718.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, *36*(1), 453-483.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A., 1999. «The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins». *Mol. plant Pathol.* Vol 55, N°2 pp 85-9.
- Van Loon, L., & Bakker, P. A. H. M. (2003). Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In *Root ecology* (pp. 297-330). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Van Peer, R., & Schippers, B. (1992). Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *98*(2), 129.
- Vanisree, M., Lee, C.-Y., Lo, S.-F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., and Tsay, H.-S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin* **45**, 1-22.
- Vasconsuelo A., Boland R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sciences*, *172*, p.p: 861-875.

- Veersham C., (2004). In Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology, C.B.S. Publisher, India, p.p. : 270-293.
- Verpoorte, R. (2000). Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology* **52**, 253-262.
- Vijaya, D., Bavani, S., & Veena, M. (2000). Prevalence of nonfermenters in clinical specimens. *Indian journal of medical sciences*, *54*(3), 87-91.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 1-10.
- Vu, T. D. (2008). Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs biotiques et abiotiques, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Waoo, A. A., Khare, S., and Ganguly, S. (2014). Evaluation of Phytoremediation Potential of *Datura innoxia* for Heavy Metals in an Industrially Polluted Area in Bhopal, India. *Evaluation* **2**, 3.
- Welander, M., and Zhu, L. H. (2006). Rol genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses. *Plant breeding reviews* **26**, 79-97.
- 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.
- Wink, M. (1998). Modes of action of alkaloids. In "Alkaloids", pp. 301-326. Springer.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, *125*(1-2), 155-166.
- Yang, C. H., & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and environmental microbiology*, *66*(1), 345-351.
- Yu, Y., Zhang, W.-B., Li, X.-Y., Piao, X.-C., Jiang, J., and Lian, M.-L. (2016). Pathogenic fungal elicitors enhance ginsenoside biosynthesis of adventitious roots in *Panax quinquefolius* during bioreactor culture. *Industrial Crops and Products* **94**, 729-735.

- Zabetakis, I., Edwards, R., & O'Hagan, D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1), 53-56.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., & Musarrat, J. (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.
- 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.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.-M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., and Zhang, H. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **101**, 6786-6791.

Annexe1 : composition chimique des milieux de culture :

Composition chimique du milieu de culture MS (pH ajusté à 5,6-5,8) (Murashige et Skoog 1962).

Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
Macroélément	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
	Ca Cl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Fer EDTA	Fe SO ₄ , 7H ₂ O	27,85
	Na ₂ EDTA	37,25
Vitamines	Glucine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Myo inositol	100

Composition chimique du milieu de culture YEM (pH ajusté à 7) (Vincent, 1970).

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

(Composition chimique du milieu B5 (pH ajusté à 5,6-5,8) (Gamborg et al., 1968)

Composition chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	
KNO ₃	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
Na ₂ H ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
Microelements	
H ₃ BO ₃	3
Ki	0,75
MnSO ₄ .H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0125
Na ₂ EDTA	37,25
FeSO ₄ , 7(H ₂ O)	27,85

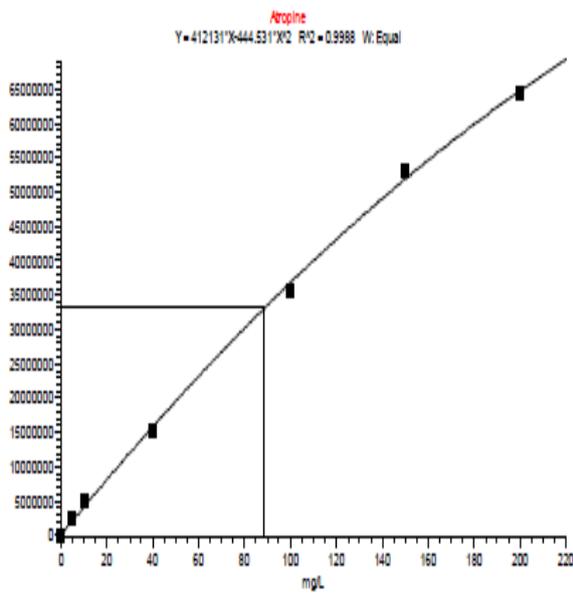
Composition chimique du milieu de culture King B (pH ajusté à 7) (**King et al., 1954**)

Produit chimique	Concentration (g/l)
K ₂ HPO ₄	1,5
MgSO ₄ , 7(H ₂ O)	1,5
Peptone	20
Glycérol	15 ml/l

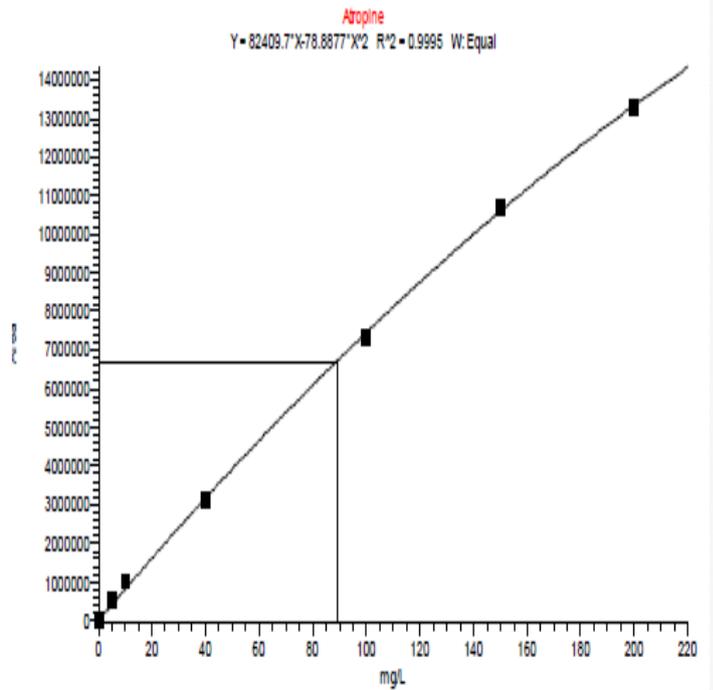
Annexe 2

Courbes d'étalonnage pour les standards : Atropine et scopolamine

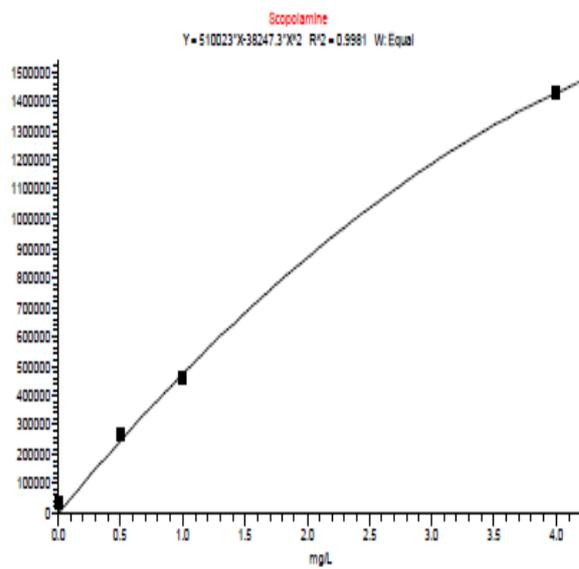
Gamme MS



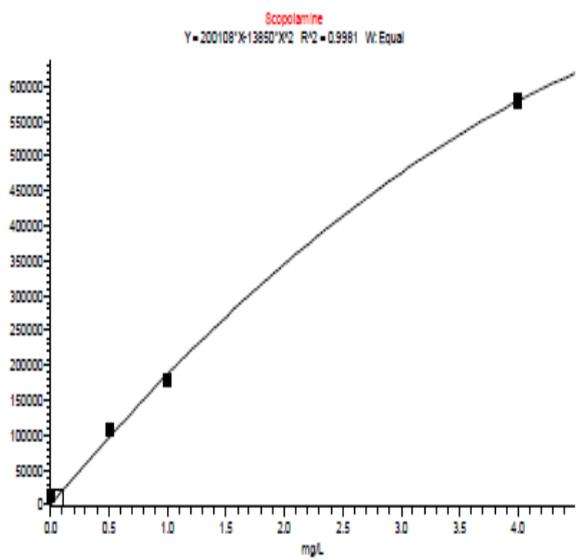
Gamme MS2



Gamme MS



Gamme MS2



Annexe 3

Analyse statistiques des données (ANOVA)

Production d'hyoscyamine des trois lignées à leur induction

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupe	257,3225	2	257,3225	395,0122	0,000000
Intragroupe	3,9282	6	1,9641		
Total	261,2507	8	259,2866		

Production de scopolamine des trois lignées à leur induction

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupes	0,025968	2	0,012984	101,5149	0,000000
Intra-groupes	0,06202	6	0,106202		
Total	0,087988	8	0,119186		

Production de biomasse pour la première et la cinquième année

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Année	0,039960	1	0,019980	5449,1	0,000000
espèce	0,066734	2	0,066734	18200,2	0,000000
Espèce*année	0,001727	2	0,000864	235,6	0,000000
Intra-groupes	0,000044	12	0,000004		
Totale	0,108465	17	0,087582		

Production d'hyoscyamine pour la première et la cinquième année

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupes	66,5070	1	66,5070	15,89333	0,001061
Intra-groupes	0,066	16	4,1846		
Totale	66,573	17	70,6916		

Effet de la souche sur la biomasse des racines transgéniques

	SS	ddl	CM	F	Signification
Temps	0.07743	1	0.07743	142.71472	0.00000
Espèce	0.76585	2	0.38293	705.80234	0
Souche	0.15545	4	0.03886	71.63097	0
Temps*Espèce	0.01305	2	0.00652	12.02565	0.00004
Temps*Souche	0.08458	4	0.02114	38.97222	0.00000
Espèce*Souche	0.12010	8	0.01501	27.67058	0.00000
Temps*Espèce*Souche	0.05700	8	0.00712	13.13241	9.72267E-11
Intra-groupes	0.03255	60	0.00054		
Total	1.30600	89	0.01467		

Effet de la souche sur la teneur moyenne en hyoscyamine des racines transgéniques

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Temps	23.85336	1	23.85336	202.75441	0
Espèce	347.00114	2	173.50057	1,474.76098	0
Souche	622.55155	4	155.63789	1,322.92756	0
Temps*Espèce	15.79479	2	7.89740	67.12814	0.00000
Temps*Souche	46.31752	4	11.57938	98.42513	0
Espèce*Souche	218.32539	8	27.29067	231.97169	0
Temps*Espèce*Souche	42.48175	8	5.31022	45.13705	0
Intra-groupes	7.05879	60	0.11765		
Total	1,323.38429	89	14.86949		

Effet de la souche sur la teneur moyenne en scopolamine des racines transgéniques

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Temps	0.00655	1	0.00655	35.86896	1.28143E-07
Espèce	1.87871	2	0.93935	5,145.26621	0
Souche	0.32425	4	0.08106	444.02024	0
Temps*Espèce	0.01706	2	0.00853	46.72554	0.00000
Temps*Souche	0.10034	4	0.02509	137.40605	0
Espèce*Souche	0.81511	8	0.10189	558.08878	0
Temps*Espèce*Souche	0.27507	8	0.03438	188.33684	0
Intra-groupes	0.01095	60	0.00018		
Total	3.42805	89	0.03852		

Effet du nitrate d'argent sur la biomasse moyenne des racines transgéniques

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Espèce	0,131127	2	0,066734	16493,16	0,000000
AgNo3	0,000650	2	0,000864	82,27	0,000000
Espèce*AgNo3	0,009446	4	0,000004	594,07	
Intra-groupes	0,000072	18	0,000004		
Totale	0,141295	26	0,067606		

Effet du nitrate d'argent sur la teneur moyenne en hyoscyamine des racines transgéniques

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupe	36,3340	2	18,1670	6,5569	0,005347
Intra-groupes	0,04963	24	2,7707		
Total	36,38203	26	20,9377		

Effet du nitrate d'argent sur la teneur moyenne en scopolamine des racines transgéniques

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupes	0,317366	2	0,158683	4,14011	0,028530
Intra-groupes	0,919876	24	0,038328		
Totale		26	0,197011		

Comparaison des deux types d'élicitation biotique et abiotique (Biomasse)

	SCE	ddl	CM	F	Signification
Espèce	0,193363	2	0,096681	431,005	0,000000
Traitement	0,129931	1	0,129931	579,232	0,000000
Espèce*Traitement	0,022806	2	0,11403	50,83	0,000000
Intra-groupes	0,002692	12	0,000224		
Totale		17	0,340866		

Comparaison des deux types d'élicitation biotique et abiotique (hyoscyamine)

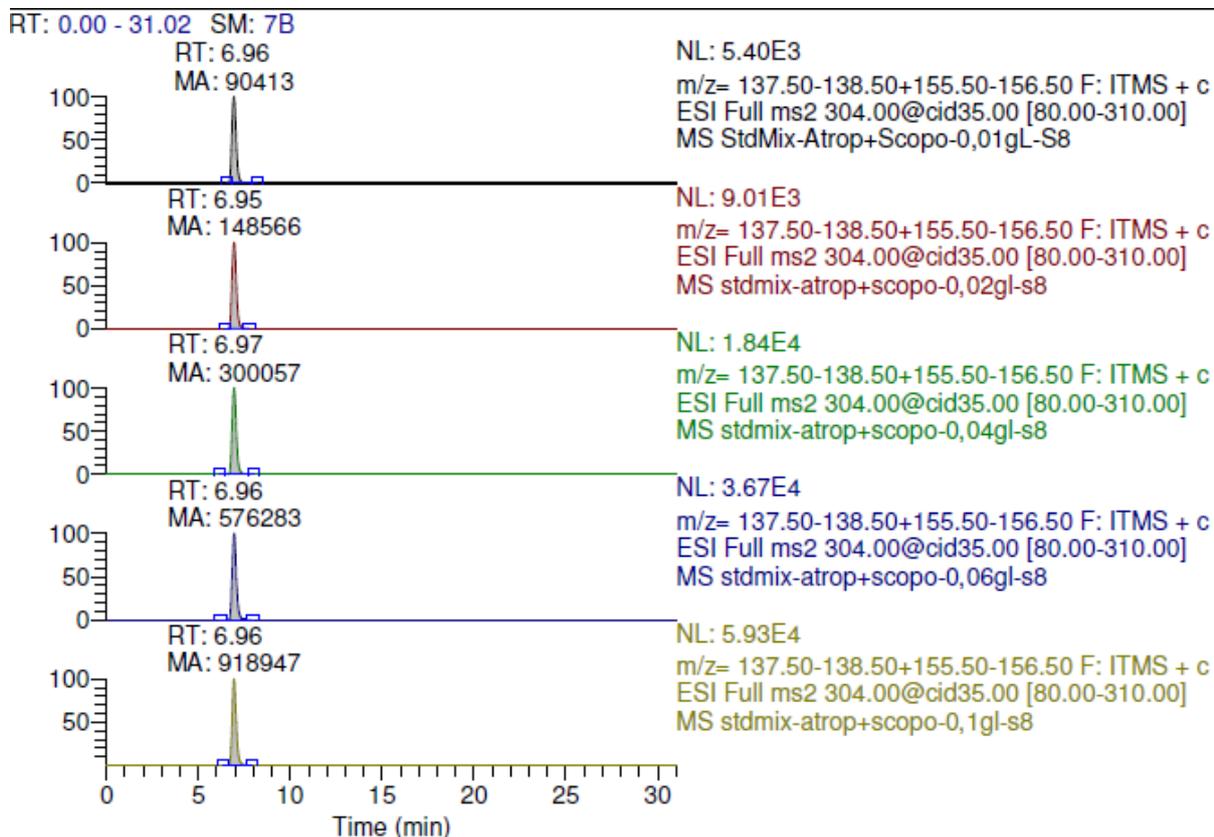
	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupes	182,962	2	182,962	15,46707	0,001189
Intra-groupes	1,266	16	11,829	189,266	
Totale	184,228	17	194,791		

Comparaison des deux types d'élicitation biotique et abiotique (Scopolamine)

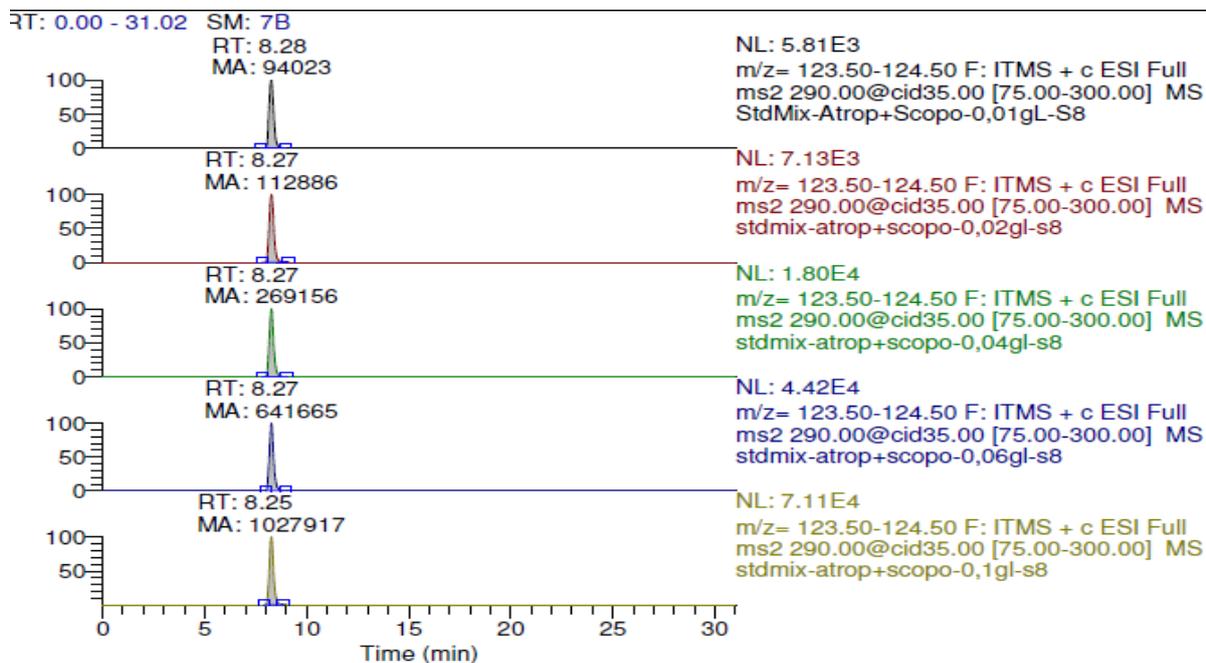
	SCE	ddl	CM	F	Signification
Inter-groupes	2,544542	1	2,544542	38,72539	0,000000
Intra-groupes	1,051317	16	0,065707		0,000000
Totale	3,595859	17	2,610249		

Annexe 4 Pics (MS) des standards d'atropine et de scopolamine

Scopolamine



hyoscyamine



Résumé :

Les chevelus racinaires de *Datura* ; induits par transformation génétique via la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* sont connus par des taux de production d'hyoscyamine et de scopolamine plus intéressants que les racines de plantes. Ces deux molécules ont un intérêt dans la médecine humaine grâce à leurs effets analgésique et antispasmodique.

L'objectif de cette étude est de suivre pendant cinq années de culture, l'évolution de la biomasse moyenne et de la teneur moyenne en hyoscyamine de chevelus racinaires de trois espèces de *Datura* ; DS (*Datura stramonium*), DT (*Datura tatula*) et DI (*Datura innoxia*) induits en 2009 par *Agrobacterium rizogenes* (souche A4), aussi est étudié l'effet de différents éliciteurs biotiques de type PGPRs (*Pseudomonas fluorescens* : souche P64, P66 et CR12 et *Pseudomonas putida* : PP01) appliquées en deux temps d'élicitation de 5 et 10 jours, et d'éliciteur abiotique (chimique : le nitrate d'argent) ;pendant 24 et 48 heures, sur la biomasse moyenne , la production d'hyoscyamine et de scopolamine. Pour ce faire, une analyse LC-MS-MS est réalisée.

Le suivi de la biomasse moyenne et de la teneur moyenne en hyoscyamines des trois lignées racinaires montre que la lignée DT est la plus performante en terme de biomasse (0,294g) et de teneur en hyoscyamine(8,576 mg/g MS)en première année de production. De plus, les trois lignées sont plus productives, en leurs premières années de culture. En outre, une chute de production est enregistrée au fur et à mesure des années de culture.

Les résultats de l'élicitation biotique montrent que cette dernière augmente la biomasse moyenne des lignées racinaires jusqu'à 262 % chez DS élicitée pendant 5 jours par P 66, la teneur moyenne d'hyoscyamine jusqu'à 583% par rapport au témoin chez la lignée DS avec la souche C7R12 pendant 10 jours d'élicitation et celle de la scopolamine jusqu'à 471% par rapport au témoin non élicité chez la lignée DT élicitée par la souche C7R12 pendant 5 jours.

Par ailleurs, le nitrate d'argent améliore la biomasse moyenne de la lignée DI jusqu'à 74% pour une élicitation de 48 heures, mais inhibe la croissance de DS et DT. Ce même éliciteur permet une amélioration de la teneur moyenne en hyoscyamine jusqu'à 117% pour 24 heure d'élicitation et celle de la scopolamine jusqu'à 1000% pour 48 heures d'élicitation, par rapport au témoin chez la lignée DT.

Summary

Transgenic hairy roots of *Datura* induced using strain A4 of *Agrobacterium rhizogenes* produce a high amount of tropane alkaloids scopolamine and hyoscyamine compared to normal roots which produces these molecules in very small quantities. These last are important in human medicine as they are used like antispasmodic and analgesic.

In this thesis we study biomass, hyoscyamine and scopolamine production in transgenic hairy roots of three *Datura* lines; DS (*Datura stramonium*), DT (*Datura tatula*) and DI (*Datura innoxia*) induced in 2009. Also the study of the effect of *Pseudomonas* (P64, P66, C7R12 and *P. putida* PP01) used as biotic elicitors (PGPRs) in two times of contact (five and ten days) and AgNO₃ as chemical elicitor (abiotic) on biomass, hyoscyamine and scopolamine content. LC-MS-MS was used to analyze alkaloids.

The growth kinetic data show that DT produces more biomass and Hyoscyamine than DS and DI with a peak of biomass of (0,294g DW) and hyoscyamine (8,576 mg/g DW) at the first year of lines induction. In addition, after the first year hairy root biomass and hyoscyamine content decline for the three lines.

Biotic elicitation results show that the four strains of *Pseudomonas* (P64, P66, C7R12 and *P. putida* PP01) enhance hairy root biomass to 262% obtained with DS elicited by the strain P66 for 5 days and hyoscyamine content to 583% obtained with DS elicited with C7R12 strain for 10 days. *Pseudomonas* enhance also hairy root scopolamine content to 471 compared to the control obtained with DT elicited with C7R12 for 5 days.

The use of AgNO₃ in 24 and 48 hours increase DI biomass to 74% compared to the control but inhibited DS and DT. AgNO₃ enhance hyoscyamine content of DT to 117% for 24 hours of elicitation and scopolamine to 1000% for 48 hours of elicitation.

ملخص

تعرف الجذور المشعرة لنبات الداتورة المحصل عليها باستخدام *Agrobacterium rhizogene* بالتصنيع المكثف للهيوستيامين و السكوبولامين مقارنة بالجذور العادية . لهذين المركبين أهمية في الطب نظرا لاستخدامهما كمهدات . الهدف من هذه الدراسة هو تتبع إنتاج المادة الحية و الهيوستيامين للجذور المشعرة لثلاث فصائل من الداتورة DS (*Datura stramonium*), DT (*Datura tatula*) et DI (*Datura innoxia*), لمدة خمس سنوات بعد إنتاجها سنة 2009 ودراسة تأثير تحفيزها حيويًا عن طريق بكتيريا *Pseudomonas* لمدة 5 و 10 أيام و نترات الفضة لمدة 24 و 48 ساعة على إنتاج المادة الحية, الهيوستيامين و السكوبولامين. لهذا الغرض استعملت طريقة التحليل LC-MS-MS. تتبع إنتاج المادة الحية و الهيوستيامين للفصائل الثلاث للجذور المشعرة يبين أن DT أكثر إنتاجًا بمعدل (0,294g) للمادة الحية و (8,576 mg/g MS) للهيوستيامين . تظهر النتائج أن الجذور المشعرة تعطي أحسن النتائج في العام الأول و تتناقص قدراتها الإنتاجية حيث يتناقص وزنها مع الأعوام. تظهر نتائج التحفيز الحيوي أن هذا الأخير يؤثر إيجابيًا على الجذور المشعرة حيث يرتفع إنتاج المادة الحية إلى 262 % عند تحفيز DS لمدة 5 أيام ب P66 و الهيوستيامين إلى 583 % عند تحفيز DT لمدة 10 أيام ب C7R12 مقارنة بالشاهد. كذلك إزدادت كمية السكوبولامين المنتجة للجذور المشعرة لتصل 471 % عند تحفيز DT ب C7R12 لمدة 5 أيام. يؤثر التحفيز بنترات الفضة لمدة 24 ساعة إيجابيًا على إنتاج المادة الحية لـ DI بنسبة 74% مقارنة بالشاهد بينما لا يحفز هذا الأخير DS وDT. يسمح نترات الفضة برفع كمية إنتاج الهيوستيامين بنسبة 117 % عند تطبيقه لمدة 24 ساعة على DT و إنتاج السكوبولامين بنسبة 1000 % عن تطبيقه لمدة 48 ساعة على DT.

Pseudomonas spp. increases root biomass and tropane alkaloid yields in transgenic hairy roots of *Datura* spp.

A. Moussous¹ · C. Paris² · M. Khelifi-Slaoui¹ · M. Bekhouche¹ · D. Zaoui¹ · S. M. Rosloski¹ · A. Makhzoum³ · S. Desobry² · L. Khelifi¹

Received: 6 February 2017 / Accepted: 25 September 2017 / Editor: Prakash Lakshmanan
© The Society for In Vitro Biology 2017

Abstract Transgenic hairy roots of *Datura* spp., established using strain A4 of *Agrobacterium rhizogenes*, are genetically stable and produce high levels of tropane alkaloids. To increase biomass and tropane alkaloid content of this plant tissue, four *Pseudomonas* strains, *Pseudomonas fluorescens* P64, P66, C7R12, and *Pseudomonas putida* PP01 were assayed as biotic elicitors on transgenic hairy roots of *Datura stramonium*, *Datura tatula*, and *Datura innoxia*. Alkaloids were extracted from dried biomass, and hyoscyamine and scopolamine were quantified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *D. stramonium* and *D. innoxia* biomass production was stimulated by all *Pseudomonas* spp. strains after a 5-d treatment. All strains of *P. fluorescens* increased hyoscyamine yields compared to untreated cultures after both 5 and 10 d of treatment. Hyoscyamine yields were highest in *D. tatula* cultures exposed to a 5-d treatment with C7R12 (16.633 + 0.456 mg g⁻¹ dry weight, a 431% increase) although the highest yield increases compared to the control were observed in *D. stramonium* cultures exposed to strains P64 (511% increase) and C7R12 (583% increase) for 10 d. *D. innoxia*

showed the highest scopolamine yields after elicitation with *P. fluorescens* strains P64 for 5 d (0.653 + 0.021 mg g⁻¹ dry weight, a 265% increase) and P66 for 5 and 10 d (5 d, 0.754 + 0.0031 mg g⁻¹ dry weight, a 321% increase; 10 d 0.634 + 0.046 mg g⁻¹ dry weight, a 277% increase). These results show that the *Pseudomonas* strains studied here can positively and significantly affect biomass and the yields of hyoscyamine and scopolamine from transgenic roots of the three *Datura* species.

Keywords Hyoscyamine · Scopolamine · *Datura* · LC-MS-MS · Elicitation

Introduction

Several tropane alkaloids (TAs) are considered important medicinal compounds for the treatment of central and peripheral nervous system diseases and disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, irritable bowel syndrome, and motion sickness, as a result of their muscarinic cholinergic receptor antagonist activity (Wu *et al.* 1993; Bagri *et al.* 1999; Pendleton *et al.* 2002; Gryniewicz and Gadzikowska 2008). TAs are synthesized in the Solanaceae genera *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, and *Scopolia* (Kanegae *et al.* 1994). Hyoscyamine and scopolamine (Fig. 1a) are two medically interesting TAs that figure prominently in the TA profile of plants from the genus *Datura* (Parr *et al.* 1990).

Hairy roots have been extensively employed to study plant secondary metabolism and plant molecular pharming (Makhzoum *et al.* 2014, 2015, 2016; Moustafa *et al.* 2015). Cell suspension culture and hairy roots are the two main biotechnological methods for increasing TA levels, but genetic instability and low TA yield of cell suspension cultures render

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11627-017-9862-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ L. Khelifi
lakhdar.khelifi@gmail.com

¹ Laboratoire de Ressources Génétiques et Biotechnologies, ENSA (ES1603), Algiers, Algeria

² Laboratoire d'Ingénierie des Bio-Molécules, ENSAIA, Nancy, France

³ Department of Biological Sciences and Biotechnology, Botswana International University of Science and Technology, Palapye, Botswana

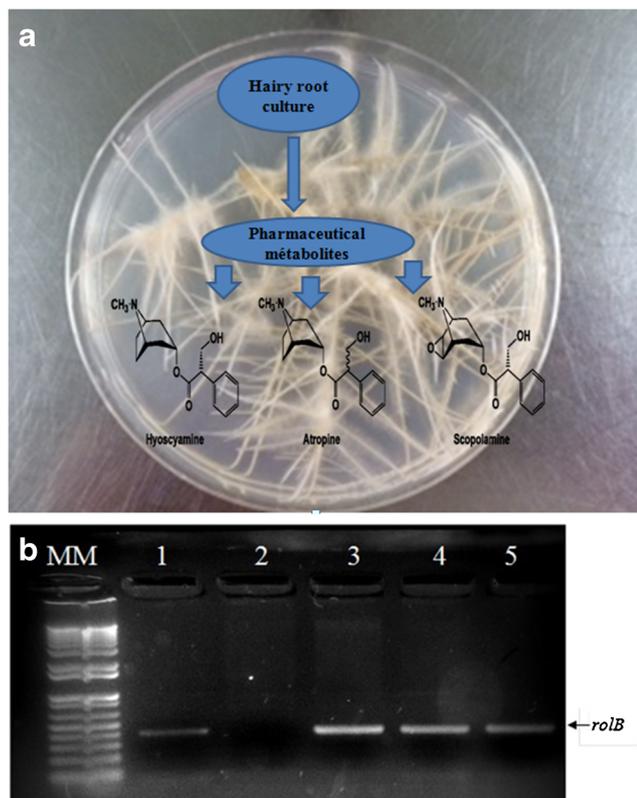


Figure 1. (a) Hairy root structure overlaid with structural diagrams of hyoscyamine, atropine, and scopolamine. (b) PCR amplification of *rolB* (400 bp). MM, DNA marker; 1, positive control (DNA plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*); 2, negative control from non-transformed roots; 3, 4, and 5, amplification of *rolB* in hairy roots of DS, DT, and DI, respectively.

this technique unreliable (Robins *et al.* 1991; Weathers *et al.* 2010; Nguyen *et al.* 2013). Hairy roots resulting from *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation are preferred for their fast growth and high TA accumulation (Flores *et al.* 1987; Hamill *et al.* 1987; Makhzoum *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2013). Hairy root transformation has also been shown to positively affect culture biomass and hyoscyamine and scopolamine yields (Maldonado-Mendoza *et al.* 1993; Bonhomme *et al.* 2000). Moreover, the use of hairy roots in conjunction with elicitors such as various biochemical molecules, metals, and ultraviolet radiation can further improve the yield of secondary metabolites such as alkaloids, possibly through the induction of plant defense mechanisms (Benhamou 1996; Shakeran *et al.* 2015). Salicylic acid (SA), a component of defense signaling, also significantly improves TA yields in hairy roots of *Datura* spp. (el Jaber-Vazdekis *et al.* 2008; Khelifi *et al.* 2011).

Bacterial elicitors from plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can increase scopolamine yield in *Scopolia parviflora* (Jung *et al.* 2003). The scopolamine and hyoscyamine contents of black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) hairy roots are increased when treated with elicitors from strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*

under water deficit stress (Ghorbanpour *et al.* 2010; Ghorbanpour and Hatami 2013). Harfi *et al.* (2015) found that a CaCl_2 or KCl treatment improved hyoscyamine accumulation in hairy roots of *Datura stramonium* L., *Datura tatula* L., and *Datura innoxia* Mill.

The aim of this research was to study the effect of four strains of PGPR *Pseudomonas* on biomass and tropane alkaloid content of *D. stramonium* (DS), *D. tatula* (DT), and *D. innoxia* (DI) hairy roots established via genetic transformation using the strain A4 of *A. rhizogenes*.

Materials and Methods

Plant transformation and hairy root cultivation *Datura* seeds were obtained from the Laboratoire de Recherche sur les Ressources génétiques et Biotechnologies (LRGB) laboratory, Algiers, Algeria, from a collection maintained since 2007. After scarification using glass paper, grit size P80 (ISO/FEPA grit designation SAITAC, Bann, Germany), seeds were then sterilized in 70% (v/v) ethanol for 30 s followed by a 12% (v/v) sodium hypochlorite (1.6 N solution, Entreprise Nationale de Detergents et Produits d'Entretien, Bouïra, Algeria) treatment for 10 min followed by three rinses with sterile water. Seeds were placed in glass tubes with sterile Murashige and Skoog (1962) (MS) medium, pH 5.0–5.8, adjusted with 1 N HCl using HANNA HI221-HI223 pH meter (HANNA® Instruments, Woonsocket, RI), supplemented with 7 g L⁻¹ agar powder (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf, Germany) and 20 g L⁻¹ sucrose (Eden Labs, Algiers, Algeria), at 120°C for 20 min under 100 kPa and placed in a culture chamber at 26°C with a 16-h photoperiod and an irradiance of 490 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by fluorescent lamp standard NL-T8 36 W/765/G13 EX bulbs (Radium Lampenwerk GmbH, Wipperfürth, Germany).

Transgenic hairy roots were created as described by Amdoun *et al.* (2009) by inoculation of DS, DT, and DI explants with the A4 strain of *A. rhizogenes*. Roots that had emerged from inoculation sites were isolated when they reached 2 cm in length. At this time, roots were transferred to MS solid medium with 250 mg L⁻¹ of cefotaxime to eliminate strain A4 (Khelifi *et al.* 2011). Hairy root cultures were repeatedly sub-cultured for 4 yr prior to conducting subsequent experiments.

To confirm genetic transformation of the cultured roots, *rolB* was amplified by PCR using the following oligonucleotide primers: F 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCTTCCACGA-3' and R 5'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACT-3'. Genomic DNA was extracted from hairy roots using the NucleoSpin® Plant II Kit following the kit manual (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Genomic DNA of untransformed roots was used as a negative control, and *A. rhizogenes* plasmid DNA isolated via thermal shock was

used as a positive control. PCR amplification was performed in a thermal cycler (210-1CE thermal cycler, Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL) using the following PCR program: denaturation at 94°C for 4 min followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C, 1 min at 72 °C, followed by a final extension step at 72°C for 10 min (Harfi *et al.* 2015). Amplified products were fractionated by electrophoresis in 1.2% (w/v) agarose gels (BioReagent agarose, Sigma-Aldrich®, Hamburg, Germany) buffered in 1 × TBE buffer stained with ethidium bromide. Band sizes were estimated using the 1000 bp Kb Plus DNA Logical Ladder, ready to use (Genescript®, Piscataway, NJ).

Preparation of PGPR cultures and hairy root culture inoculation *P. fluorescens* strains P64 and P66 and *P. putida* strain PP01 were kindly provided by Professor Benchabane (Laboratory of Protection and Valorisation of Agro-Biological Resources, Saad Dahleb University, Blida, Algeria). These strains were isolated from the rhizosphere of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in the Ain Defla region of northern Algeria in 2011. The identification of the three strains was established through morphological and biochemical testing after collection and monitored during routine laboratory work by colony fluorescence under ultraviolet light (Stanier *et al.* 1966; Digat and Gardan 1987; Lelliott and Stead 1987; Benchabane 1992; Bossis 1995; Dalila *et al.* 2013). The fourth strain, C7R12, is a spontaneous, rifampicin resistant mutant of the wild-type C12 that was isolated in the rhizosphere of *Linum usitatissimum* L. from Chateaufort soil in France, in 1989 (Eparvier and Lemanceau 1991).

Prior to PGPR inoculation, 0.1 g of each transgenic hairy root was added to 50 mL aliquots of sterile, hormone-free Gamborg liquid medium (Gamborg *et al.* 1968) consisting of 30 g L⁻¹ sucrose (Eden Lab), 100 mg L⁻¹ myoinositol (Merck, Lyon, France), 1 mg L⁻¹ nicotinic acid (Merck), 10 mg L⁻¹ thiamine HCl (Merck), 1 mg L⁻¹ of pyridoxine (Merck), and 7 g L⁻¹ of agar powder (Sigma-Aldrich®). The flasks were incubated in darkness on a rotatory shaker at 100 rpm for 20 d at 26°C.

Pseudomonas spp. strains were cultivated in King B nutrient medium containing 20 g L⁻¹ peptone (Biochem Chemopharma, Loire, France), 15 ml L⁻¹ glycerol (Scharlau, Sentmenat Spain), 1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, (Sigma-Aldrich®), 1.5 g L⁻¹ MgSO₄ (Sigma-Aldrich®), and 15 g L⁻¹ of agar powder (Sigma-Aldrich®) for 72 h at 27°C under shaking at 100 rpm (King *et al.* 1954). The bacterial cultures were diluted in 100 mL of sterile distilled water to obtain an optical density of 1 at 660 nm. The concentration of bacteria in King B medium was measured as 10⁹ cfu mL⁻¹. Five milliliters of bacterial suspension from each of the four strains of *Pseudomonas* spp. was added to 50 mL of the hairy root cultures of DS, DT, and DI. Uninoculated hairy root cultures of DS, DT, and DI served as controls for the effect of

Pseudomonas spp. elicitation on biomass and tropane alkaloids. Prior to tissue harvest, the PGPR treatments were applied for 5 and 10 d under darkness on a rotatory shaker at 100 rpm at 26°C, as before. The effects of the PGPR strains on biomass and hyoscyamine and scopolamine contents were measured. All experiments were repeated in triplicate.

Hairy root growth determination, alkaloid extraction, and total alkaloid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis Control and treated cultures were harvested after 20 d of cultivation. Samples were dried at 60°C for 48 h, cooled gradually at room temperature, 27°C, and dry weights were recorded. Alkaloids were extracted from 50 mg of dried, powdered hairy roots according to (Amdoun *et al.* 2009).

Quantitative analysis of alkaloids was carried out in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) system based on a pump connected to a photodiode array detector (PDA) and an linear trap quadrupole (LTQ) Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific®, Courtaboeuf Cedex, France) with an atmospheric pressure ionization interface working in electrospray mode (ESI). After dilution of the extract in 1 mL of MeOH, 10 µL of each sample was separated on a C18 (150 × 2.1 mm) column (Grace®-Alltech®, Columbia, MD) using a gradient of mobile phase A (1% v/v) in water acidified with formic acid and mobile phase B composed of acetonitrile. The flow rate of 0.1 mL min⁻¹ was used (Larbat *et al.* 2014). Scopolamine and atropine standards were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO).

Data analysis The effects of three *Datura* spp., five *Pseudomonas* spp. treatments (four strains + one control), and two treatment times on biomass and hyoscyamine and scopolamine accumulation in three replicates were analyzed by a factorial ANOVA in StatPlus:mac Pro Version 6 (AnalystSoft Inc., Walnut, CA) with post hoc Tukey tests to analyze differences among means with a significance level of 0.05.

Results

Verification of root transformation by *A. rhizogenes* Roots induced by *A. rhizogenes* emerged after approximately 15 d of culture from explants of DS, DT, and DI. The *rolA*, *rolB*, *rolC*, and *rolD* genes included in TL-DNA are transferred to the plant during the infection phase (Chavarrri 2004). The *rolB* gene stimulates auxin secretion and the induction of hairy roots, whereas *rolA*, *rolC*, and *rolD* function cooperatively to stimulate root induction (Altamura 2004; Welander and Zhu 2006). PCR amplification of DNA extracted from DS, DT, and DI hairy root cultures revealed the presence of a

400 bp band specific to the *rolB* gene. This result confirmed that *rolB*, a marker of transformation, was stably transferred from *A. rhizogenes* A4 to DS, DT, and DI roots (Fig. 1b).

Effects of *Pseudomonas* spp. inoculation on hairy root biomass Following inoculation of hairy root cultures of DS, DT, and DI with four strains of *Pseudomonas* spp., the effects on the dry weight (dw) of hairy root biomass after 5 and 10 d of treatment were observed (Fig. 2). ANOVA uncovered significant effects of *Datura* spp., strain, time, and their interactions on biomass (Table S1). Overall, DI was the most productive plant species for biomass (DI 0.276 ± 0.113 gdw > DT 0.238 ± 0.071 gdw > DS 0.064 ± 0.029 gdw, all comparisons $p < 0.001$). Strain C7R12 treatment resulted in the highest biomass (C7R12 0.259 ± 0.148 gdw vs controls 0.146 ± 0.089 gdw, $p < 0.001$), and 5 d was the most productive treatment time (0.222 ± 0.120 gdw vs 0.163 ± 0.117 gdw). Post hoc analysis revealed that all bacterial treatments of DI cultures significantly increased biomass compared to the control at 5 d (Fig. 2). Five- and 10-d DI cultures treated with P66 (5 d, 0.321 ± 0.007 gdw; 10 d, 0.307 ± 0.028 gdw) and C7R12 (5 d, 0.410 ± 0.026 gdw;

10 d, 0.443 ± 0.032 gdw) were more productive than the control (0.163 ± 0.006 gdw, $p < 0.001$). Five- and 10-d treatments of DS with strain P64 (5 d, 0.069 ± 0.004 gdw, 10 d, 0.071 ± 0.001) and C7R12 (5 d, 0.079 ± 0.006 gdw, 10 d, 0.083 ± 0.005 gdw) had more biomass than the control (0.033 ± 0.004 gdw, $p < 0.001$). Increase in treatment time did not result in a significantly higher biomass yield with any strain, however.

The biomass yield increases observed after 5-d treatments were occasionally lost after 10 d. This phenomenon was observed most clearly with *P. putida* treatments. *P. putida* stimulated biomass production at 5 d in all *Datura* spp. ($p < 0.01$) and either did not stimulate (DS and DI) or suppressed growth at 10 d (DT 0.064 ± 0.004 gdw vs control 0.233 ± 0.029 gdw, $p < 0.001$). Despite an inconsistent performance and growth suppression in 10-d DT cultures, *P. putida* was the only strain that showed significant biomass stimulation of DT cultures in the 5-d treatment (5 d 0.326 ± 0.015 gdw vs control 0.233 ± 0.029 gdw, $p < 0.001$).

Effect of bacterial treatments on hyoscyamine and scopolamine yield The atropine (racemic isomer of hyoscyamine) and scopolamine yields in hairy roots were analyzed through

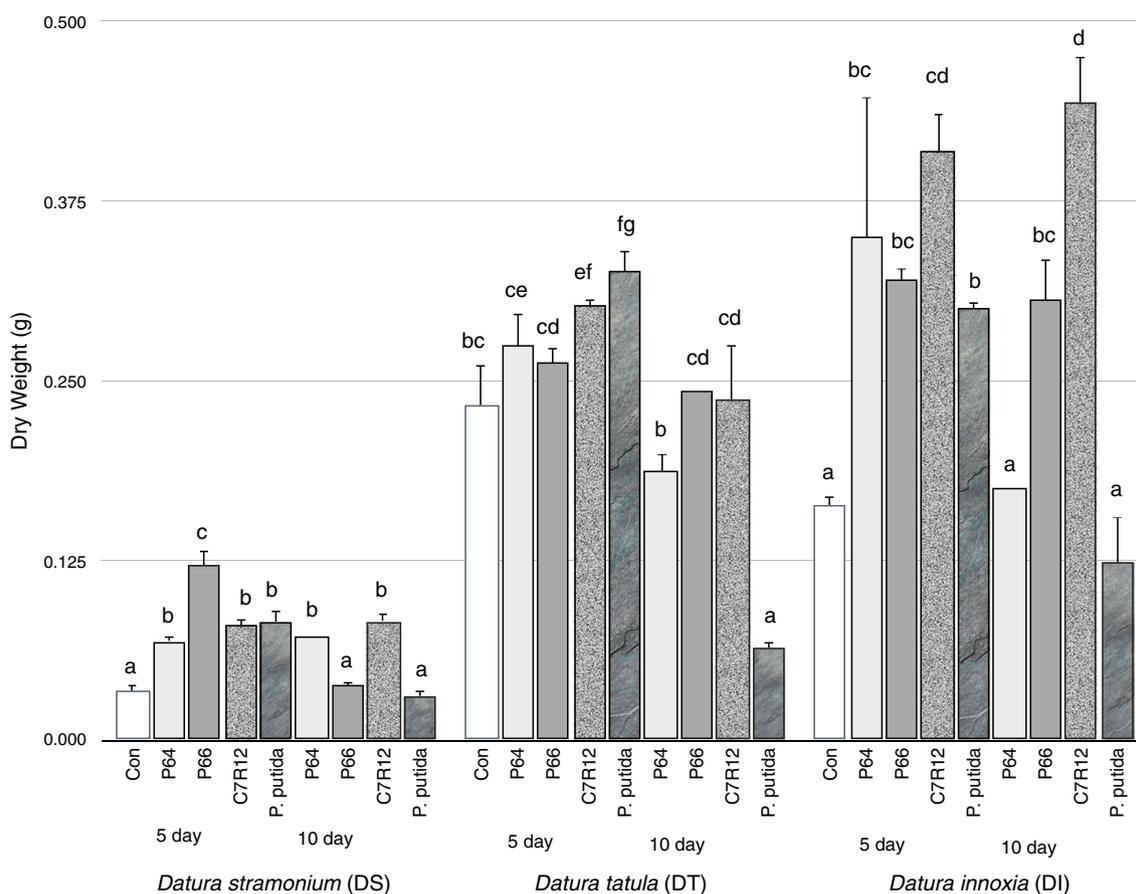


Figure 2. Effect of *Pseudomonas fluorescens* spp. P64, P66, and C7R12, and *P. putida* PP01 treatments on dry weights of *Datura stramonium* (DS), *Datura tatula* (DT), and *Datura innoxia* (DI) hairy roots treated for 5 or 10 d. Control cultures are transformed hairy roots

that were not treated with a bacterial culture. Error bars represent the standard deviation. Values of bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

LC-MS-MS after treatment with *Pseudomonas* strains for 5 and 10 d. The standard samples were analyzed in 5, 10, 40, 100, and 250 mg L⁻¹ concentrations for atropine and 0.5, 1, 2, and 4 mg L⁻¹ concentrations for scopolamine. The R² value method was used for measurement of correlation connecting concentration to the standard peak area (Figs. 3 and 4). The obtained equation was $\gamma=82409.7*\chi-78.8877*\chi^2$ with R² = 0.9995 for hyoscyamine; and $\gamma=200108*\chi-13850*\chi^2$ with R² = 0.9981 for scopolamine (Fig. 5).

Hairy root cultures were treated with strains of *Pseudomonas* spp. to determine if hyoscyamine yields of *Datura* spp. were increased through biotic elicitation (Table 1). ANOVA uncovered significant effects of *Datura* spp., strain, time, and their interactions on hyoscyamine yield (Table S2). Overall, DT was the most productive plant species (DT 8.744 ± 4.93 mg gdw⁻¹ > DI 6.683 ± 2.226 mg gdw⁻¹ > DS 3.950 ± 4.43 mg gdw⁻¹, all comparisons $p < 0.001$), P66 and C7R12 were the most productive treatment strains (8.888 ± 2.83 mg gdw⁻¹, 8.854 ± 4.293, $p = 0.998$ ns), and 10 d was the most productive treatment time (5.944 ± 4.24 vs 7.00 ± 3.00 mg gdw⁻¹). Post hoc analysis revealed that all strains resulted in higher hyoscyamine yields than the controls in all *Datura* spp. at both time points ($p < 0.001$), with the exception of the *P. putida* treatments which were not different from controls in the 5- and 10-d DT cultures and the 5-d DI culture. The most stimulatory treatments were C7R12 and P64 in the 10-d DS cultures (583 and 511% increase). The highest yields were observed in DT cultures after 5 d of treatment with strain C7R12 (16.633 mg gdw⁻¹, 431% increase) and after 10 d with P64 (13.286 ± 0.291 mg gdw⁻¹, 264% increase). DI, the species with the highest biomass yields, produced the highest

hyoscyamine yields at 10 d with the P64 and P66 strains (P64, 9.414 ± 0.201 mg gdw⁻¹, 118% increase; P66, 10.260 ± 0.371 mg gdw⁻¹, 138% increase). The bacterial treatments studied, especially *P. fluorescens* strains, were found to consistently increase the yields of hyoscyamine in hairy root cultures of DS, DT, and DI at both treatment times.

Scopolamine extraction and analysis were performed on DS, DT, and DS hairy root cultures (Table 2). ANOVA uncovered significant effects of *Datura* spp., strain, time, and their interactions on scopolamine yield (Table S3). DI was the most productive plant species (DI 0.392 ± 0.213 mg gdw⁻¹ > DS 0.093 ± 0.052 mg gdw⁻¹ > DT 0.079 ± 0.074 mg gdw⁻¹, all comparisons $p < 0.001$), P66 was the most productive treatment strain (0.286 ± 0.303 mg gdw⁻¹ vs control 0.107 ± 0.054 mg gdw⁻¹, $p < 0.001$), and 5 d was the most productive time (0.196 ± 0.216 mg gdw⁻¹ vs 0.179 ± 0.177 mg gdw⁻¹). Post hoc analysis showed the highest scopolamine yields were obtained in the 5-d, strain-P66 DI cultures (P66 0.754 ± 0.031 mg gdw⁻¹, $p < 0.001$, 321% increase), and the stimulatory effect of strain P66 persisted in the 10-d DI cultures (0.634 ± 0.046 mg gdw⁻¹, $p < 0.001$, 277% increase). The 5-d treatment of DI with P64 showed a similar promising yield and percentage increases (0.653 ± 0.021 mg gdw⁻¹, $p < 0.001$, 265% increase). P66 resulted in a reduced yield of scopolamine in 10-d DT cultures (0.004 ± 0.00 mg gdw⁻¹ vs control 0.049 ± 0.20 mg gdw⁻¹, $p = 0.0001$, 91% decrease) but this was the only incidence where P66 significantly reduced scopolamine yield compared to controls. The highest percentage increase over the control was observed in DT exposed to a 5-d treatment of strain C7R12 (471% increase), although the 10-d, strain-C7R12 DT treatment showed a 55% yield loss (C7R12,

Figure 3. Calibration curve of atropine using the LC-MS-MS method and acetonitrile/water modified by formic acid (0.1% v/v) as mobile phases.

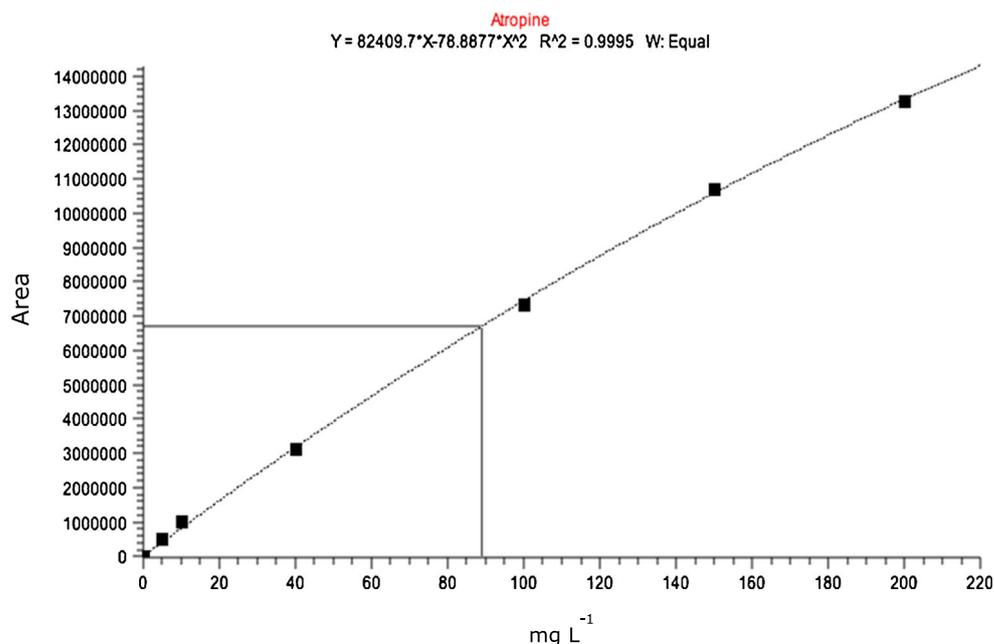
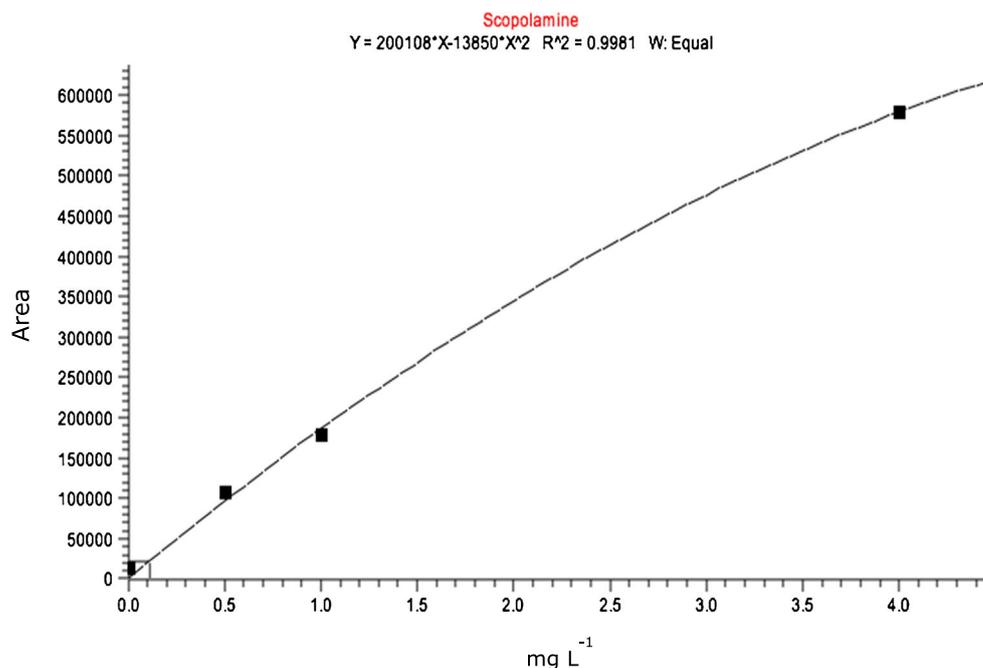


Figure 4. Calibration curve of scopolamine using LC-MS-MS method and acetonitrile/water modified by formic acid (0.1% v/v) as mobile phases.



$0.022 \pm 0.001 \text{ mg gdw}^{-1}$ vs control $0.049 \pm 0.002 \text{ mg gdw}^{-1}$, $p = 0.0001$). *P. putida* was the only strain found to significantly increase the biomass of DT (above), and it also showed scopolamine yield enhancement of DT after 5 d (104% increase).

Discussion

Increased extractable plant biomass and accumulation of TAs are desirable goals for the industrial production of valuable medicinal TAs derived from *Datura* spp. To this end, the effects of biotic elicitors (*Pseudomonas* spp.) on the biomass of transgenic hairy roots of *Datura* spp. induced by *A. rhizogenes* were studied. All studied *Pseudomonas* spp. strains stimulated hairy root biomass; however, no strain showed consistent growth stimulation effects across all

Datura spp. or at all treatment times. For instance, this study identified several promising *P. fluorescens* strains that showed high biomass stimulation regardless treatment time, i.e., C7R12, P64, and P66, but the growth effects of these strains were only observed in DS and DI. Also, prolonged treatments were occasionally found to be useless or counter-productive in terms of biomass stimulation. For instance, *P. putida* was either ineffective at stimulating biomass or decreased hairy root dry weights for the three *Datura* spp. after 10 d of elicitation, though it was effective after a 5-d treatment in all species. Overall, these results indicated that the use of PGPR to stimulate hairy root biomass should be optimized for both *Datura* spp. and time of treatment. Biomass yield was greatest in DI and this effect was constant in P66 and C7R12 treatments, making these species and treatment combinations good candidates for biomass stimulation in industrial applications.

Figure 5. Scopolamine and atropine peaks detected with MS detector at 6.96 and 8.28 min, respectively.

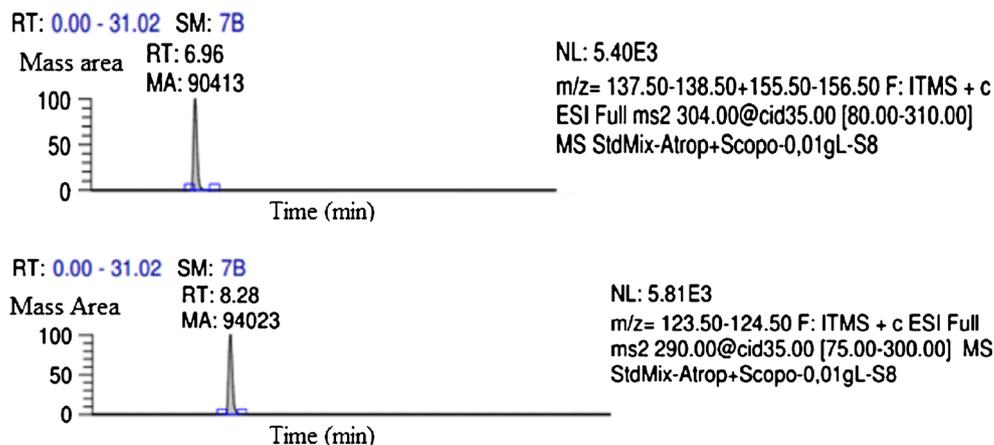


Table 1. Effect of bacteria *Pseudomonas fluorescens*: P64, P66, C7R12, and *Pseudomonas putida* PP01 on hyoscyamine yield (mg gdw⁻¹ ± SD) and yield increase compared to the control in hairy roots of roots *Datura stramonium* (DS), *Datura tatula* (DT), and *Datura innoxia* (DI) treated for 5 or 10 d. Control cultures are transformed hairy roots that were not treated with a bacterial culture. The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$

Time (days)	<i>Pseudomonas</i> strain	Hyoscyamine yield (mg gdw ⁻¹)			Hyoscyamine yield increase (%)		
		DS	DT	DI	DS	DT	DI
5	P64	2.888 ± 0.139 c	8.919 ± 0.401 c	7.353 ± 0.683 cd	182	185	70
	P66	4.869 ± 0.325 d	12.755 ± 0.508 fg	8.602 ± 0.407 de	376	307	99
	C7R12	4.316 ± 0.314 d	16.633 ± 0.456 g	6.629 ± 0.339 bc	322	431	54
	<i>P. putida</i>	1.748 ± 0.074 b	2.455 ± 0.006 a	3.525 ± 0.117 a	71	- 22	- 18
	Control	1.023 ± 0.021 a	3.131 ± 0.256 ab	4.315 ± 0.673 a	-	-	-
10	P64	6.173 ± 0.000 e	13.286 ± 0.291 f	9.414 ± 0.201 ef	511	264	118
	P66	6.041 ± 0.272 e	10.798 ± 0.010 d	10.260 ± 0.371 f	498	196	138
	C7R12	6.896 ± 0.481 f	11.932 ± 0.128 e	6.717 ± 0.300 bc	583	227	56
	<i>P. putida</i>	4.532 ± 0.104 d	3.882 ± 0.197 b	5.705 ± 0.311 b	349	7	32
	Control	1.01 ± 0.070 a	3.645 ± 0.335 b	4.313 ± 0.676 a	-	-	-

There are several factors that could account for the positive and negative growth effects of the PGPR treatments observed in this study. Plant growth stimulation by the *P. fluorescens* treatments may be partially explained by the production of phytohormones (Meena *et al.* 2000; Patten and Glick 2002; Gamalero and Glick 2011). Indole-3-acetic acid (IAA) is a signal molecule that positively influences many physiological processes including growth and development (Tsavkelova *et al.* 2006). *Pseudomonads* are efficient producers of IAA (Patten and Glick 2002). *P. fluorescens* also produces cytokinins, which have been implicated in root system growth, cell division, and elongation (de Salamone and Hynes 2001; Glick 2012).

The *P. putida* treatment, however, showed positive and then negative growth effects over the 5- and 10-d treatment period. Bacterial population dynamics that result in hormone

excess or deficiency, competition with roots for nutritive substances, accumulation of waste products, or a population size-dependent switch from mutualism to pathogenesis may cause growth suppression or destruction of root tissue (Jung *et al.* 2003). Some rhizobacteria have a deleterious effects on plant root surfaces and are able to suppress plant growth by releasing hydrogen cyanide (HCN), a gas that can have a negative influence on root metabolism and growth (Saharan and Nehra 2011). *P. putida* is known to generate more HCN than other PGPR (Suslow and Schroth 1982). Industrial production of medicinal compounds requires cost-effective and consistent inputs. While bacterial cultures are inexpensive growth stimulants, gains in production consistency may be made through discovery, purification, and addition of discrete, plant growth promoting metabolites to hairy root cultures such as DT that have an inconsistent response to strains such as *P. putida*.

Table 2. Effect of bacteria (*Pseudomonas fluorescens*: P64, P66, C7R12, and *Pseudomonas putida*) on scopolamine yield and yield increase compared to the control (mg gdw⁻¹ ± SD) in hairy roots of *Datura stramonium* (DS), *Datura tatula* (DT), and *Datura innoxia* (DI) treated for 5 or 10 d. Error bar represents the standard deviation value. The values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Control cultures are transformed hairy roots that were not treated with a bacterial culture

Time (days)	<i>Pseudomonas</i> strain	Scopolamine yield (mg gdw ⁻¹)			Scopolamine yield increase (%)		
		DS	DT	DI	DS	DT	DI
5	P64	0.021 ± 0.001 a	0.041 ± 0.002 c	0.653 ± 0.021 e	- 78	- 15	265
	P66	0.136 ± 0.002 de	0.058 ± 0.001 d	0.754 ± 0.031 f	42	20	321
	C7R12	0.151 ± 0.011 ef	0.278 ± 0.007 g	0.240 ± 0.020 b	56	471	34
	<i>P. putida</i>	0.025 ± 0.002 a	0.099 ± 0.005 f	0.166 ± 0.012 a	- 74	104	- 7
	Control	0.096 ± 0.006 c	0.049 ± 0.002 c	0.179 ± 0.019 ab	-	-	-
10	P64	0.024 ± 0.003 a	0.082 ± 0.001 e	0.352 ± 0.004 c	- 75	69	109
	P66	0.130 ± 0.004 d	0.004 ± 0.000 a	0.634 ± 0.046 e	32	- 91	277
	C7R12	0.087 ± 0.007 b	0.022 ± 0.001 b	0.434 ± 0.010 d	- 12	- 55	158
	<i>P. putida</i>	0.161 ± 0.002 f	0.104 ± 0.004 f	0.340 ± 0.022 c	64	114	102
	Control	0.098 ± 0.008 bc	0.049 ± 0.002 c	0.168 ± 0.005 a	-	-	-

A. rhizogenes-transformed hairy roots of *Datura* spp. are known to produce more TAs compared with untransformed roots (Nguyen *et al.* 2013). The present study builds upon this advance by asking if further gains could be made through elicitation with *Pseudomonas* spp. strains. Hyoscyamine accumulation was increased in hairy roots of all *Datura* spp., and the yields were highest in DT cultures inoculated with *P. fluorescens* strains C7R12 and P64. The 5-d C7R12 treatment of DT also had the highest scopolamine yield increase over the control (471% increase). Unfortunately, *P. putida* was the only strain to stimulate biomass yield in DT, and therefore use of strains C7R12 or P64 to increase TA yields may come with a trade-off for biomass production. Because DI cultures had high biomass and scopolamine yields and also produced high levels of hyoscyamine when stimulated by *P. fluorescens* strains P64 (5 d, 265% increase) and P66 (5 d, 321%; 10 d 277% increase), DI may be the optimal species for medicinal extraction of TAs from elicited, hairy root cultures of *Datura* spp.

To establish a mutually beneficial protection of host-plant health, elicitor molecules from PGPR may initiate a defense response that is accompanied by increased secondary metabolite accumulation (Jaleel *et al.* 2007). Tropane alkaloids have shown toxicity towards herbivores and therefore may be responsive to defense pathways (Alves *et al.* 2007). Both *P. fluorescens* and *P. putida* induce physiological modifications that result in a reduction of disease severity in the presence of pathogens, a phenomenon termed induced systemic resistance (Leeman *et al.* 1995; Hoffland *et al.* 1996; M'piga *et al.* 1997; Ramamoorthy *et al.* 2002). Membrane components, flagellar proteins, and lipopolysaccharides from *P. fluorescens* and *P. putida* act as elicitor-like compounds to activate plant defense response genes (Leeman *et al.* 1995; Meziane *et al.* 2005). Strains of *P. fluorescens* and *P. putida* effect the expression of genes involved in defense-related hormone and metabolite pathways in some plants (Ramamoorthy *et al.* 2002; Ongena *et al.* 2004). Induced systemic resistance associated with the hormones methyl jasmonate, ethylene, and/or SA has been observed after *P. fluorescens* and *P. putida* inoculation (Iavicoli *et al.* 2003; Verhagen and Trotel-Aziz 2010). The fact that SA and jasmonic acid (JA) can be used as elicitors to improve TA yields, and specifically hyoscyamine yield, in the nightshade family supports a model of hyoscyamine and scopolamine accumulation that is mediated by defense pathways (Zhao *et al.* 2000; Zayed and Wink 2004). However, when SA and JA were used to increase hyoscyamine accumulation in hairy roots, a decrease in the dry biomass was observed (Kang *et al.* 2004). Thus, the use of PGPRs as elicitors of TA accumulation and hairy root biomass stimulation maybe superior to previously described chemical treatments.

Conclusions

Transgenic hairy root cultures of the medicinal plants DS, DT, and DI were established that produced hyoscyamine and scopolamine. Elicitation of transgenic hairy roots by *Pseudomonas* spp. enhanced the biomass and TA concentration in DS, DT, and DI. *P. fluorescens* and *P. putida* positively affected root dry weight and enhanced the yields of hyoscyamine and scopolamine. This is the first known report that demonstrates the influence of PGPRs used as biotic elicitors of TA production on *Datura* spp. transgenic hairy roots. The observed effects on biomass and TA yields show the treatments described here may be useful during industrial-scale production of secondary metabolites.

Funding information The authors acknowledge the Algerian High Ministry of Education and Research (MESRS) for financing the present study.

References

- Altamura M (2004) *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:89–101
- Alves M, Sartoratto A, Trigo J (2007) Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs, and induced response. *J Chem Ecol* 33:297–309
- Amdoun R, Khelifi L, Khelifi-Slaoui M et al (2009) Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Sci* 177:81–87
- Bagri A, Di Scala G, Sandner G (1999) Myoclonic and tonic seizures elicited by microinjection of cholinergic drugs into the inferior colliculus. *Therapie* 54:589–594
- Benchabane M (1992) Le dépérissement bactérien des rosacées à noyaux: identification de l'agent causal, dynamique des populations bactériennes épiphytes et mise en évidence de l'activité glaço-gène *in vitro* et *in vivo*. Thèse Magister, Université Blida (DZ)
- Benhamou N (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1:233–240
- Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Lacoux J et al (2000) Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rolA*, *B*, *C* genes only. *J Biotechnol* 81:151–158
- Bossis E (1995) Les *Pseudomonas fluorescens* de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. Doctoral dissertation, Université de Nantes, France
- Chavarri M (2004) Transformación de embriones somáticos de mango por biobalística. *Interciencia* 29:261–266
- Dalila T, Benchabane M, Bensaid F (2013) Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of fusarium wilt in tomato and flax. *Afr J Microbiol Res* 7:5449–5458
- Digat B, Gardan L (1987) Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*. *OEPP/EPPO Bull* 17:559–568

- Eparvier A, Lemanceau P (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol* 86:177–184
- Flores HE, Hoy MW, Pickard JJ (1987) Secondary metabolites from root cultures. *Trends Biotechnol* 5:64–69
- Gamalero E, Glick B (2011) Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiology: plant nutrient management*. Springer, Heidelberg, pp 17–46
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Ghorbanpour M, Hatami M (2013) Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish J* 37:350–360
- Ghorbanpour M, Hosseini N, Rezazadeh S, Omidi M, Khavazi K, Etmnian A (2010) Hyoscyamine and scopolamine production of black henbane (*Hyoscyamus niger*) infected with *Pseudomonas putida* and *P. fluorescens* strains under water deficit stress. *Planta Med* 76:167
- Glick B (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Grynkiewicz G, Gadzikowska M (2008) Tropane alkaloids as medicinal-ly useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol Rep* 60:439–463
- Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ (1987) New routes to plant secondary products. *Bio/Technology* 5:800–804
- Harfi B, Khelifi-Slaoui M, Bekhouche M et al (2015) Hyoscyamine production in hairy roots of three *Datura* species exposed to high-salt medium. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52:92–98
- Hoffland E, Hakulinen J, Van Pelt J (1996) Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86:757–762
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 851–858
- el Jaber-Vazdekis N, Barres ML, Ravelo AG, Zárate R (2008) Effects of elicitors on tropane alkaloids and gene expression in *Atropa baetica* transgenic hairy roots. *J Nat Prod* 71:2026–2031
- Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R (2007) *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 60:7–11
- Jung HY, Kang SM, Kang YM, Kang MJ, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK, Choi MK (2003) Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Enzym Microb Technol* 33:987–990
- Kanegae T, Kajiya H, Amano Y, Hashimoto T, Yamada Y (1994) Species-dependent expression of the hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene in the pericycle. *Plant Physiol* 105:483–490
- Kang SM, Jung HY, Kang YM, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK, Choi MS (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 Sci* 166:745–751
- Khelifi L, Zarouri B, Amdoun R, Harfi B, Morsli A, Khelifi-Slaoui SM (2011) Effects of elicitation and permeabilization on hyoscyamine content in *Datura Stramonium* hairy roots. *Adv Environ Biol* 5: 329–334
- King E, Ward M, Raney D (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44:301–307
- Larbat R, Paris C, Le Bot J, Adamowicz S (2014) Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Sci* 224: 62–73
- Leeman M, Van Pelt J, Ouden F Den (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85:1021–1027
- Lelliott RA, Stead DE (1987) *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- M'piga P, Belanger R, Paulitz T (1997) Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiol Mol Plant Pathol* 50:301–320
- 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 (ed) *Phytochemicals, plant growth, and the environment*. Springer New York, New York, pp 95–142
- Makhzoum A, Benyammi R, Moustafa K, Trémouillaux-Guiller J (2014) Recent advances on host plants and expression cassettes' structure and function in plant molecular pharming. *BioDrugs* 28:145–159
- 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, Venkataraman S, Tremouillaux-Guiller J, Hefferon K (2016) Recent patents in agricultural biotechnology; focus on health. *Recent Pat Food Nutr Agric* 8:82–90
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:321–329
- Meena B, Radhajejalakshmi R, Marimuthu T (2000) Induction of pathogenesis-related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia-lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*. *J Plant Dis Prot* 514–527
- Meziane H, Van Der Sluis I, Van Loon L (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol* 6:177–185
- Moustafa K, Makhzoum A, Trémouillaux-Guiller J (2015) Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Crit Rev Biotechnol* 1–11
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nguyen T, Dauwe R, Bourgaud F, Gontier E (2013) From bioreactor to entire plants: development of production systems for secondary metabolites. *Adv Bot Res* 68:205–232
- Ongena M, Duby F, Rossignol F (2004) Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1009–1018
- Parr AJ, Payne J, Eagles J, Chapman BT, Robins RJ, Rhodes MJC (1990) Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochemistry* 29:2545–2550
- Patten C, Glick B (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801
- Pendleton RG, Parvez F, Sayed M, Hillman R (2002) Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Pharmacol Exp Ther* 300:91–96
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R (2002) Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Soil* 239:55–68
- Robins RJ, Parr AJ, Walton NJ (1991) Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures. *Planta* 183:196–201

- Saharan B, Nehra V (2011) Assessment of plant growth promoting attributes of cotton (*Gossypium hirsutum*) rhizosphere isolates and their potential as bio-inoculants. *J Environ Res Dev* 5:575–583
- de Salamone IG, Hynes R (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47:404–411
- Shakeran Z, Keyhanfar M, Asghari G (2015) Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. *Turk J Biol* 39:111–118
- Stanier R, Palleroni N, Doudoroff M (1966) The aerobic pseudomonads a taxonomic study. *Microbiology* 43:159–271
- Suslow T, Schroth M (1982) Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* 72:111–115
- Tsavkelova E, Klimova S, Cherdyntseva T (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42:117–126
- Verhagen B, Trotel-Aziz P (2010) *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J Exp Bot* 61:249–260
- Weathers PJ, Towler MJ, Xu J (2010) Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1339–1351
- Welander M, Zhu L (2006) *Rol* genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses. *Plant Breed Rev* 26:79–97
- Wu M, Jenden DJ, Fairchild MD, Siegel JM (1993) Cholinergic mechanisms in startle and prepulse inhibition: effects of the false cholinergic precursor N-aminodeanol. *Behav Neurosci* 107:306–316
- Zayed R, Wink M (2004) Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Z Naturforsch C* 59:863–867
- Zhao J, Zhu W, Hu Q, He X (2000) Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett* 22:1221–1226