

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة, الحراش, الجزائر  
Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger



**Ecole Doctorale de Biotechnologies Végétales**

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** en  
Biotechnologies végétales

**Option : Biotechnologie végétale**

**Thème**

**Production par voie biotechnologique de métabolites  
secondaires d'intérêt à partir de *Calotropis procera* :  
application en protection des végétaux.**

**Présentée par : Mme. Amina DJERDJOURI**

**Jury :**

<b>Président :</b>	M. Morsli A.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
<b>Directeur de Thèse :</b>	M. Khelifi L.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
<b>Examineurs :</b>	Mme. Bouregghda H.	Prof.- E.N.S.A. El-Harrach, Alger
	M. Amdoun R.	D.R. - I.N.R.F. Bouchaoui, Alger
	M. Boukhatem M.N.	Prof.- Université Blida1, Blida
	M. Harfi B.	D.R. - C.R.B.T, Constantine

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail aux deux personnes qui méritent  
amplement ma reconnaissance*

*A mon père ♡ A ma mère*

*Ameena*

## Remerciements

Louange à **Allah**, le miséricordieux, pour m'avoir donné la santé, le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail, sans lui rien de tout cela n'aurait pu être. Merci à Allah de m'avoir orienté au chemin du savoir et les portes de la science...

Je voudrais commencer comme il est l'usage par remercier **Mr. Khelifi L.**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'intégrer dans son équipe de recherche en tant que doctorante. J'aimerais également le remercier qui a pris la direction de mon projet de doctorat, et qui s'est assuré de notre bien être tout au long de ces années. Vous m'avez permis Mr. de travailler en autonomie tout en me dirigeant, en me faisant confiance. Je vous remercie également pour les nombreuses relectures et corrections apportées à mes essais de rédaction.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères et mon grand respect aux membres du jury qui m'ont honoré par l'examen de mon travail malgré leurs charges et occupations :

Au président du jury : **Mr. Morsli A.**, professeur à l'ENSA. Je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider mon jury et de bien vouloir étudier avec attention mon travail.

Aux examinateurs :

**Mme. Boureghda H.**, professeur à l'ENSA. Je vous remercie Madame pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury et d'évaluer ce travail.

**Mr. Amdoun R.**, directeur de recherche à l'INRF, Bainem. Je tiens tout d'abord à vous remercier Monsieur pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail en acceptant de faire partie de ce jury.

**Mr. Boukhatem M. N.**, professeur à Université de Blida1. Je vous remercie Monsieur de m'avoir honoré en acceptant de faire partie du jury de ma thèse et pour votre lecture attentive de ce manuscrit.

**Mr. Harfi B.**, directeur de recherche au CRBt, Constantine. Je vous remercie Monsieur d'avoir accepté de juger ce travail et aussi pour le déplacement afin d'assister à la soutenance.

Je profite l'occasion aussi pour remercier **Mr. Berroumana S.-A.**, Ex-Directeur général de l'Institut National de Criminalistique et Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC /GN). Merci de m'avoir accueillie au sein de l'institution dont vous dirigez, pour tout l'aide que vous m'avez apporté. Pour vos encouragements et la confiance que vous m'avez attribué.

Un grand merci au **Dr. Boumrah Y.**, sous-directeur de l'INCC /GN, Bouchaoui, qui a pris le temps pour m'expliquer, m'initier dans le monde de la chromatographie et l'analytique. Votre contribution a été marquante dans cette thèse.

Un grand Merci à **Mme. Bouanani S.**, chef de département de Toxicologie au sein de l'INCC /GN, merci pour vos conseils judicieux, pour vos conversations enrichissantes.

J'aimerais remercier également les membres du laboratoire de Toxicologie et particulièrement **Mr. Drardji**, pour leur travail sur la GC-MS, l'extraction et aussi pour leur gentillesse.

J'exprime mes profonds remerciements à **Mme. Nebih-Hadj Sadouk Dhaouya**, Maître de conférences à l'Université de Blida 1 pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser la partie évaluation de l'activité nématocide au sein du laboratoire de phytopharmacie et protection des végétaux à l'Université Blida 1. Je remercie également les étudiantes Hamaidi Zineb et Stambouli Souhila pour l'aide qu'elles ont apporté à l'égard de mon travail.

**Mr. Boudeffeur**, Merci pour la provision des graines de *Calotropis procera*. Merci pour les photos de la plante dans son habitat naturel.

Merci à toi **Miyassa**, pour ton aide à l'extraction de l'ADN et le test de confirmation par PCR, Merci également pour tes conversations enrichissantes, mais également pour ces bons moments que nous avons partagés durant le déplacement sur la route.

Merci à toi **Djamila**, pour les discussions autour de la manip, des méthodes, de la vie...

Merci à toi **Hadjer**, à toi **Yasmine**, des ingénieurs du laboratoire LRGB.

Merci à toi **Imène**, d'avoir entretenue mes lignées racinaires (mes bébés comme j'aime les appeler) suite à mon absence pour l'accouchement.

Merci à toutes les personnes rencontrées dans le laboratoire LRGB.

Mon remerciement doit surtout aller à la personne qui a suivi de près le déroulement de cette thèse. A toi **Mohamed** je dis merci, tu n'as pas hésité d'être à mes côtés, à m'aider, à maintenir la motivation dans les moments de doute et de fatigue.

Je remercie ma princesse **Nouha** pour tous les cœurs que tu m'as dessiné sur mes brouillons, ça m'a donné tant de force pour poursuivre que de longs discours...

Merci à toi mon champion **Saad** pour tes petits conseils à l'âge de 3 ans « *Mama, va terminer ta thèse !!!* »

Merci à mes frères et à ma sœur, pour leur aide et leur présence dans ma vie.

Le plus grand remerciement et le plus sincère va à mes chers parents : à toi mon **PERE** et à toi ma **MERE** pour l'aide, la confiance en moi, les encouragements et la motivation dans les périodes les plus difficiles....

## SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Glossaire	
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
1. <i>Calotropis procera</i>	4
1.1. Description et historique de la plante	4
1.1.1. Description botanique	6
1.1.2. Historique de la plante	7
1.2. Classification taxonomique	7
1.3. Métabolites secondaires	8
1.3.1. Stéroïdes	9
1.3.2. Glycosides cardiaques	13
1.4. Importance médicinale de <i>C. procera</i>	18
2. Culture de tissus végétaux	18
2.1. Culture de chevelus racinaires	20
2.2. Transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	21
2.2.1. Maladie de chevelu racinaire ou hairy root	21
2.2.2. Principales étapes du processus de transformation génétique des plantes par <i>A. rhizogenes</i>	25
2.3. Stratégies d'amélioration des rendements en métabolites secondaires	27
2.3.2. Utilisation des éliciteurs	28
2.3.2.1. Utilisation des éliciteurs abiotiques	30
2.3.2.2. Utilisation des éliciteurs biotiques	30
3. Profilage phytochimique de <i>Calotropis procera</i>	31
3.1. Analyse phytochimique qualitative	31
3.2. Analyse phytochimique quantitative	31
3.3. Techniques chromatographiques	32
3.3.1. GC-MS	32
3.3.1.1. Principe et description	32
3.3.1.2. Appareillage	34
3.3.2. UHPLC-QTOF/MS	37
3.3.2.1. Principe et description de l'UHPLC	37
3.3.2.2. Détection par l'UHPLC-QTOF/MS	37
4. Potentialité nématocide de <i>C. procera</i> contre les nématodes phytoparasites	39
4.1. Généralités sur les nématodes phytoparasites	39
4.2. Systématique et morphologie des nématodes à galles	39
4.3. Biologie et cycle de développement des nématodes à galles	42
4.4. Lutte contre les nématodes à galles	42
4.5. Nématocide d'origine végétale	43
4.6. Activité nématocide de <i>C. procera</i>	44

<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>46</b>
1. Matériel végétal et conditions de croissance	46
1.1. Matériel végétal	46
1.1.1. Désinfection des graines	47
1.1.2. Test de germination	47
1.2. Source de racines et de feuilles naturelles (Essai <i>in vivo</i> )	47
1.3. Source d'explants pour l'induction de CRs (Essai <i>in vitro</i> )	47
2. Souches bactériennes utilisées et milieu de culture	48
2.1. Origine des souches bactériennes	48
2.1.1. Souche A4 de <i>A. rhizogenes</i>	48
2.1.2. Souche ATCC 15834 de <i>A. rhizogenes</i>	48
2.2. Culture et maintenance des souches bactériennes	49
2.3. Préparation de l'inoculum bactérien	49
3. Initiation des CRs	49
3.1. Co-culture des bactéries - tissus végétal blessé	49
3.1.1. Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs	49
3.1.2. Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs	50
3.1.3. Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs	50
3.2. Détermination du pourcentage d'induction de CRs	51
3.3. Détermination du nombre moyen de racines par explant	51
3.4. Subculture des CRs en culture	51
4. Vérification moléculaire de la nature transgénique des CRs induits	52
5. Analyse phytochimique de <i>C. procera</i> par GC-MS	53
5.1. Profilage chimique (screening)	53
5.1.1. Préparation des extraits	53
5.1.2. Conditions de la GC-MS	54
5.2. Quantification des phytostérols majeurs	54
5.2.1. Préparation des extraits	55
5.2.2. Conditions de la GC-MS	55
6. Profilage chimique des glycosides cardiaques chez <i>Calotropis procera</i> par UHPLC-QTOF/MS	56
6.1. Préparation des extraits	56
6.2. Analyse par UHPLC-QTOF/MS	58
6.2.1. Conditions chromatographiques	58
6.2.2. Spectrométrie de masse	58
7. Sélection des lignées racinaires performante pour la production des métabolites secondaires cibles	58
8. Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée et sa production en phytostérols	59
9. Etude de l'activité nématocide de <i>Calotropis procera</i>	59
9.1. Matériel végétal	59
9.2. Préparation de l'extrait aqueux	60
9.3. Préparation de la gamme de concentration	60

9.4	Extraction et préparation des larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	60
9.5	Test <i>in vitro</i> de l'efficacité nématocide de <i>C. procera</i> sur les larves L2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	61
9.6.	Test de revitalisation des larves L2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	61
10.	Analyse statistique	61
<b>RESULTATS ET INTERPRÉTATIONS</b>		<b>62</b>
1.1.	Obtention du matériel végétal	62
1.2.	Obtention de racines et de feuilles naturelles (Essai <i>in vivo</i> )	62
1.3.	Obtention des vitrosemis pour l'induction de CRs (Essai <i>in vitro</i> )	62
2.	Initiation des CRs	63
2.1.	Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	63
2.2.	Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	64
2.3.	Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i>	65
2.4.	Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le nombre moyen de CRs par explant chez <i>C. procera</i>	68
3.	Subculture et multiplications des CRs transgéniques	69
4.	Confirmation par PCR de la nature transgénique des CRs	71
5.	Profilage chimique (screening) des CRs de <i>C. procera</i> par GC-MS	71
6.	Profilage chimique des glycosides cardiaques chez <i>C. procera</i> par UHPLC-QTOF/MS	80
7	Sélection des lignées racinaires	92
7.1.	Indice de croissance des lignées de <i>C. procera</i>	92
7.2.	Teneur en phytostérols (campesterol, stigmastérol et $\beta$ -sitostérol) des lignées de <i>C. procera</i>	93
8.	Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée HR4	99
8.1.	Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée	99
8.2.	Cinétique de production de phytostérols (campesterol, stigmastérol et $\beta$ -sitostérol) de la lignée sélectionnée	100
9.	Effet nématocide de l'extrait aqueux de <i>C. procera</i>	101
a.	Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux à partir de <i>C. procera</i> sur les larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	101
b.	Etude de la réversibilité de l'effet des extraits aqueux de <i>C. procera</i> appliqués sur les larves (L2) de <i>Meloidogyne</i> spp	106
<b>DISCUSSION DES RESULTATS</b>		<b>107</b>
1.	Obtention du matériel végétal	107
2.	Initiation des CRs	107
3.	Profilage chimique	110
3.1.	Profilage chimique par GC-MS	110
3.2.	Profilage chimique des glycosides cardiaques par UHPLC-QTOF/MS	111
4.	Croissance des CRs et production de phytostérols	114

5.	Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée	116
6.	Effet nématocide de l'extrait aqueux de <i>C. procera</i>	118
	<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>121</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>124</b>
	<b>ANNEXES</b>	
	<b>PUBLICATIONS</b>	
	<b>RESUME</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN-T :</b>	ADN de transfert
<b>ADN-TL:</b>	ADN de transfert gauche
<b>ADN-TR:</b>	ADN de transfert droit
<b>AUX:</b>	Auxine
<b>B5:</b>	Milieu de culture de Gamborg et al., (1968)
<b>ChCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme
<b>CI :</b>	Concentration Inhibitrice
<b>CRs :</b>	Chevelus Racinaires
<b>DO</b>	Densité optique
<b>ESI+ :</b>	Ionisation Electro-Spray positive
<b>HR :</b>	Lignée racinaire transgénique
<b>IC :</b>	Indice de croissance
<b>GC-MS :</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>m/z :</b>	Rapport masse sur charge
<b>MeOH :</b>	Méthanol
<b>M.S. :</b>	Matière sèche
<b>MS :</b>	Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962)
<b>RI :</b>	Root inducing
<b>rol :</b>	Root Oncogenic Loci
<b>ROS :</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>SIM :</b>	Selected Ion Monitoring
<b>TIC :</b>	Total Ion Chromatogram
<b>tr/min :</b>	Tour par minute
<b>UHPLC-QTOF/MS :</b>	Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse quadripôle à temps de vol
<b>vir :</b>	Gène de virulence
<b>Vir :</b>	Protéine de virulence
<b>YAP</b>	Yes-associated protein
<b>YEM :</b>	Yeast Extract Mannitol (Vincent, 1970)

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Noms botaniques des espèces végétales productrices de glycosides cardiaques.....	13
<b>Tableau 2</b> : Liste et formules des composés chimiques identifiés à partir des extraits de CRs de <i>C. procera</i> par analyse GC-MS (TIC = <i>Total Ion Chromatogram</i> ).....	79
<b>Tableau 3</b> : Glycosides cardiaques détectés par UHPLC-QTOF/MS en mode ESI positif chez les CRs de <i>C. procera</i> .....	81
<b>Tableau 4</b> : Effet des extraits aqueux de <i>C. procera</i> sur le taux de mortalité des larves (L2) des <i>Meloidogyne</i> spp.....	103
<b>Tableau 5</b> : Modèle G.L.M. appliqué à l'activité nématocide des différents traitements à différentes doses utilisées.....	104

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Photographie de <i>C. procera</i> dans son habitat naturel.....	5
<b>Figure 2 :</b> Distribution mondiale de <i>C. procera</i> .....	5
<b>Figure 3 :</b> Voie de biosynthèse des phytostérols.....	12
<b>Figure 4 :</b> Voie putative de biosynthèse des glycosides cardiaques chez <i>C. procera</i> ...	17
<b>Figure 5 :</b> Schéma des méthodes actuelles employées pour la production à grande échelle de composés bioactifs à l'aide de la culture de tissus végétaux <i>in vitro</i> .....	19
<b>Figure 6 :</b> Induction de CRs et ses applications biotechnologiques.....	21
<b>Figure 7 :</b> Structure du plasmide Ri de <i>A. rhizogenes</i> .....	25
<b>Figure 8 :</b> Principales étapes du processus de la transformation génétique d'une cellule végétale par <i>Agrobacterium</i> .....	26
<b>Figure 9 :</b> Différentes catégories d'éliciteurs abiotiques et biotiques.....	29
<b>Figure 10 :</b> Schéma d'un système GC-MS.....	33
<b>Figure 11 :</b> Morphologie de <i>Meloidogyne</i> sp.....	41
<b>Figure 12 :</b> Photographie de graines de <i>C. procera</i> .....	46
<b>Figure 13 :</b> Photographie de l'équipement de GC-MS utilisé.....	53
<b>Figure 14 :</b> Courbe d'étalonnage de l'estriol (standard).....	56
<b>Figure 15 :</b> Photographie d'équipement UHPLC-QTOF/MS.....	57
<b>Figure 16 :</b> Plants de <i>C. procera</i> obtenus en serre.....	62
<b>Figure 17 :</b> Aspect de vitrosemis de <i>C. procera</i> obtenus <i>in vitro</i> .....	63
<b>Figure 18 :</b> Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i> .....	64
<b>Figure 19 :</b> Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction des CRs de <i>C. procera</i> .....	65
<b>Figure 20 :</b> Racines induites au niveau des sites d'infection par <i>A. rhizogenes</i> à partir d'hypocotyles (a), de cotylédons (b) et de feuilles (c).....	66
<b>Figure 21 :</b> Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez <i>C. procera</i> .....	68
<b>Figure 22 :</b> Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le nombre moyen de racines induites par explant chez <i>C. procera</i> .....	69
<b>Figure 23 :</b> Aspect morphologique de lignées racinaires issus de la transformation de <i>C. procera</i> par <i>A. rhizogenes</i> .....	70
<b>Figure 24 :</b> Analyse moléculaire des CRs (Amplification par PCR du gène <i>rolB</i> ).....	71

<b>Figure 25</b> : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de <i>C. procera</i> obtenu en mode full scan.....	73
<b>Figure 26</b> : Partie A : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de <i>C. procera</i> obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 4.00-8.00 min).....	74
<b>Figure 27</b> : Partie B : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de <i>C. procera</i> obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 8.00-10.00 min).....	75
<b>Figure 28</b> : Partie C : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de <i>C. procera</i> obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 10.00-14.00 min).....	76
<b>Figure 29</b> : Partie D : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de <i>C. procera</i> obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 14.00-25.00 min).....	77
<b>Figure 30</b> : Structure chimique des composés majeurs identifiés à partir de CRs de <i>C. procera</i> par GC-MS.....	78
<b>Figure 31</b> : Chromatogramme d'ionisation par UHPLC-QTOF/MS des CRs de <i>C. procera</i> en mode positif.....	80
<b>Figure 32</b> : Spectre de masse de calotropagénine.....	82
<b>Figure 33</b> : Spectre de masse de calotoxine.....	83
<b>Figure 34</b> : Spectre de masse du frugoside.....	84
<b>Figure 35</b> : Spectre de masse de la coroglaucigénine.....	85
<b>Figure 36</b> : Spectre de masse de la calotropine.....	86
<b>Figure 37</b> : Spectre de masse de la calactine.....	87
<b>Figure 38</b> : Spectre de masse de l'uzarigénine.....	88
<b>Figure 39</b> : Spectre de masse de l'asclépine.....	89
<b>Figure 40</b> : Spectre de masse de l'uscharidine.....	70
<b>Figure 41</b> : Spectre de masse de l'uscharine.....	91
<b>Figure 42</b> : Indice de croissance des sept lignées de <i>C. procera</i> sur la base du poids frais après 20 jours de culture.....	92
<b>Figure 43</b> : Croissance des lignées racinaires HR3 et HR4 de <i>C. procera</i> sur le milieu liquide ½ B5 additionné de 3 % (p/v) de saccharose après 20 jours de culture.....	93
<b>Figure 44</b> : Teneur en phytostérols (campesterol, stigmastérol et $\beta$ -sitostérol) en $\mu\text{g/g}$ MS des sept lignées CRs de <i>C. procera</i> et des racines et feuilles naturelles non transformées sur la base d'une analyse GC-MS.....	94
<b>Figure 45</b> : Chromatogramme GC/MS obtenu en mode SIM de campesterol, de stigmastérol et de $\beta$ -sitostérol.....	95

<b>Figure 46</b> : Spectre de masse du A : campesterol, B : stigmasterol et C : $\beta$ -sitostérol...	98
<b>Figure 47</b> : Cinétique de croissance de la lignée HR4 sur milieu liquide $\frac{1}{2}$ B5.....	100
<b>Figure 48</b> : Cinétique d'accumulations de phytostérols (campesterol, stigmasterol et $\beta$ -sitostérol) de la lignée HR4.....	101
<b>Figure 49</b> : Diagramme de toxicité des extraits de <i>C. procera</i> en fonction du type de traitement et de la dose appliquée.....	105

## Glossaire

<b>A549</b>	Lignée cellulaire dérivée d'un cancer pulmonaire humain
<b>A2780</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un cancer ovarien
<b>Analgésique</b>	Substance utilisée pour soulager la douleur
<b>Anti-nociceptive</b>	Substance utilisée pour soulager la douleur
<b>Anti-fertilité</b>	Substance utilisée pour prévenir la grossesse ou réduire la fertilité
<b>Antipyrétique</b>	Substance utilisée pour réduire la fièvre
<b>Immunomodulatrice</b>	Agent qui modifie ou régule la réponse immunitaire de l'organisme
<b>HCT116</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un cancer du côlon
<b>HT29</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un cancer du côlon
<b>HeLa</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un cancer du col de l'utérus.
<b>Hépatoprotectrice</b>	Substance qui aide à protéger le foie et à maintenir sa fonction hépatique normale
<b>HepG2</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un cancer du foie
<b>MCF-7</b>	Lignée cellulaire dérivée d'un cancer du sein humain
<b>MDA-MB-231</b>	Lignée cellulaire dérivée d'un cancer du sein humain
<b>Purgative</b>	Substance utilisée pour induire une évacuation rapide et complète des selles de l'intestin
<b>Raji</b>	Lignée cellulaire humaine dérivée d'un lymphome de Burkitt, un type de cancer du système lymphatique
<b>Schizonticide</b>	Substance qui tue les schizontes (stades de développement de certains parasites)
<b>Spasmolytique</b>	Substance qui agit pour soulager les spasmes musculaires involontaires
<b>T47D</b>	Lignée cellulaire dérivée d'un cancer du sein humain

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les plantes synthétisent un large éventail de métabolites secondaires qui sont importants pour leur survie dans la nature. Les métabolites secondaires jouent un rôle important dans les interactions plantes-microbes, notamment dans les défenses des plantes contre les attaques par les pathogènes et les ravageurs. D'autre part, les métabolites secondaires des plantes représentent une source majeure de produits naturels bioactifs en tant que produits pharmaceutiques et nutraceutiques potentiels (Newman & Cragg, 2016).

Au cours des dernières décennies, un intérêt considérable a été porté à la production *in vitro* de métabolites secondaires via les cultures de cellules végétales. Le succès de ces techniques reste modéré, principalement, parce que leurs voies de biosynthèse ainsi que les mécanismes génétiques de régulation les régissant sont en grande partie mal connus. La biogenèse des métabolites secondaires est souvent faible et instable dans les cultures de cals et de suspensions indifférenciées ; le métabolisme des métabolites secondaires serait corrélé au degré d'organisation des structures cellulaires (tissus différenciés). Les racines sont plus aptes à produire une large gamme de métabolites secondaires reflétant ainsi leur capacité de biosynthèse (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002).

Le problème majeur associé à la culture *in vitro* de racines conventionnelles est généralement le faible taux de croissance, en plus du phénomène de nécroses. En revanche, les chevelus racinaires (CRs) médiées par *Agrobacterium rhizogenes* présentent une croissance rapide sans régulateurs de croissance et sont génétiquement et biochimiquement stables. Ces propriétés font des CRs un matériel biologique de choix pour leur culture en bioréacteurs à grande échelle. En effet, les CRs cultivés en conditions artificielles sont capables de produire des métabolites secondaires à des niveaux souvent comparables, sinon, largement supérieurs à ceux des plantes intactes. Les rendements en métabolites secondaires des CRs peuvent aussi être améliorés par la sélection de lignées efficaces, l'élicitation et/ou la manipulation des conditions de culture (Giri *et al.*, 2001). Les CRs constituent donc, d'une part, un excellent modèle pour étudier le métabolisme et la physiologie des plantes (Stiles & Liu, 2013), et d'autre part, la production de métabolites secondaires d'intérêt en conditions contrôlées (Amdoun *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2020; Bathoju *et al.*, 2017; Benyammi *et al.*, 2016; Gai *et al.*, 2019; Harfi *et al.*, 2013).

Les cultures de CRs (transgéniques) ont été utilisées chez plusieurs espèces végétales en vue de produire des composés d'intérêt médicinal, tels que la digoxine (glycoside cardiaque) de *Digitalis lanata*, (Toivonen, 1993), l'artémisinine (alcaloïde) de *Artemisia*

*annua* (Giri et al., 2001), les ginsénosides de *Panax vietnamensis* (Ha et al., 2016), les phytostérols de *Arabidopsis thaliana* (Jozwiak et al., 2013), la réserpine de *Rauwolfia serpentina* (Mehrotra et al., 2015), l'hyoscyamine et la scopolamine (alcaloïdes) de *Datura* spp. (Amdoun et al., 2009; Amdoun et al., 2018, 2019, 2020; Harfi et al., 2013, 2018; Moussous et al., 2018), le withanolide A de *Withania somnifera* (Murthy et al., 2008), les dérivés de l'acide caféique de *Rhaponticum carthamoides* (Skala et al., 2015), l'azadirachtine de *Azadirachta indica* (Srivastava & Srivastava, 2014), les cardénolides de *Calotropis gigantea* (Sun et al., 2012) et la camptothécine de *Ophiorrhiza alata* (Ya-ut et al., 2011).

*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Famille : *Apocynaceae*) est potentiellement une espèce médicinale car elle est riche en métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique (Hassan et al., 2015). C'est donc une espèce qui pourrait présenter une réelle importance économique, malgré sa marginalisation actuelle dans les zones d'existence en Algérie (Kaur et al., 2021; Parihar & Balekar, 2016). Cependant, cette espèce est largement utilisée en Asie et en Afrique dans la médecine traditionnelle (Hassan et al., 2015; Murti et al., 2010). Plusieurs propriétés biologiques sont attribuées à l'utilisation des différentes parties de la plante, et ce, en raison de sa teneur en métabolites secondaires tels que les stérols, les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, les triterpènes, les coumarines, les saponines et surtout les glycosides cardiaques (Chandrawat & Sharma, 2016; Kumari & Chaudhary, 2021; Nadeem et al., 2019; Nenaah, 2013; Rohit et al., 2012).

En effet, la calotropine et les glycosides cardiaques apparentés isolés de *C. procera* présentent des propriétés cardiaques (Petschenka et al., 2018) similaires à certains médicaments comme la digitoxine et digoxine (Koch, et al. 2020), ainsi que des activités cytotoxiques contre différentes lignées cellulaires cancéreuses, et ce, par l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Huang et al., 2018; Li et al., 2009).

Par ailleurs, les dégâts considérables occasionnés par les nématodes sur le rendement des cultures peuvent atteindre jusqu'à 80 milliards de dollars US par an (Nicol et al., 2011). De nombreuses espèces végétales présentent des propriétés nématicides (Farzana et al., 2022) tels que *C. procera* qui est connu pour sa richesse en composés bioactifs à activité nématicide (Costa & Santos, 2022; Eunice et al., 2013; Hussain et al., 2011). En effet, les métabolites secondaires de *C. procera* pourraient être utilisés avec succès dans la protection des cultures contre les ravageurs tels que les nématodes phytoparasites qui sont des vers microscopiques capables d'altérer la physiologie des plantes.

Dans ce contexte et en réponse aux différentes problématiques posées ci-dessus (besoin en molécules d'intérêt médicinal ou en tant que pesticide), la présente étude vise à atteindre les objectifs suivants :

- Développer un protocole d'induction de chevelus racinaires efficace pour *C. procera*, en utilisant différents milieux de co-culture, différents types d'explants à différents âges et différentes souches bactériennes et sélectionner la lignée racinaire la plus performante en métabolites secondaires
- Faire le screening phytochimique par GC-MS des extraits de chevelus racinaires qui en dérivent
- Caractériser à l'aide d'une UHPLC-QTOF/MS les glycosides cardiaques synthétisés par les CRs de *C. procera*
- Evaluer le potentiel nématocide des extraits aqueux des CRs de *C. procera*.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. *Calotropis procera***

### **1.1. Description et historique de la plante**

Le genre *Calotropis* appartenant à la famille des apocynacées (*Apocynaceae*) est largement distribué dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique et d'Asie (Rahman & Wilcock, 1991). Deux espèces communes de *Calotropis* ont été rapportées en littérature : *C. procera* et *C. gigantea* (Chandrawat & Sharma, 2016 ; Parihar & Balekar, 2016).

*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Famille: *Apocynaceae* ; Figure 1) connu localement sous le nom de Kranka (arabe algérien) et Tourha (Tamahaq) en Algérie (Hammiche & Maiza, 2006), mais connu aussi dans le monde entier sous divers noms tels que Asclépiade, Pommier de Sodome, Madar, Calotrope ou Uchar (Kumari & Chaudhary, 2021). Cette plante est un arbuste vivace xérophyte qui pousse dans de nombreuses régions arides et semi-arides (Boutraa, 2010). Il est originaire d'Afrique tropicale et subtropicale et d'Asie. Il est aussi répondu au Moyen-Orient et en Amérique latine (Hassan et al., 2015). Il a été également introduit en Australie (Rahman & Wilcock, 1991) (Figure 2).

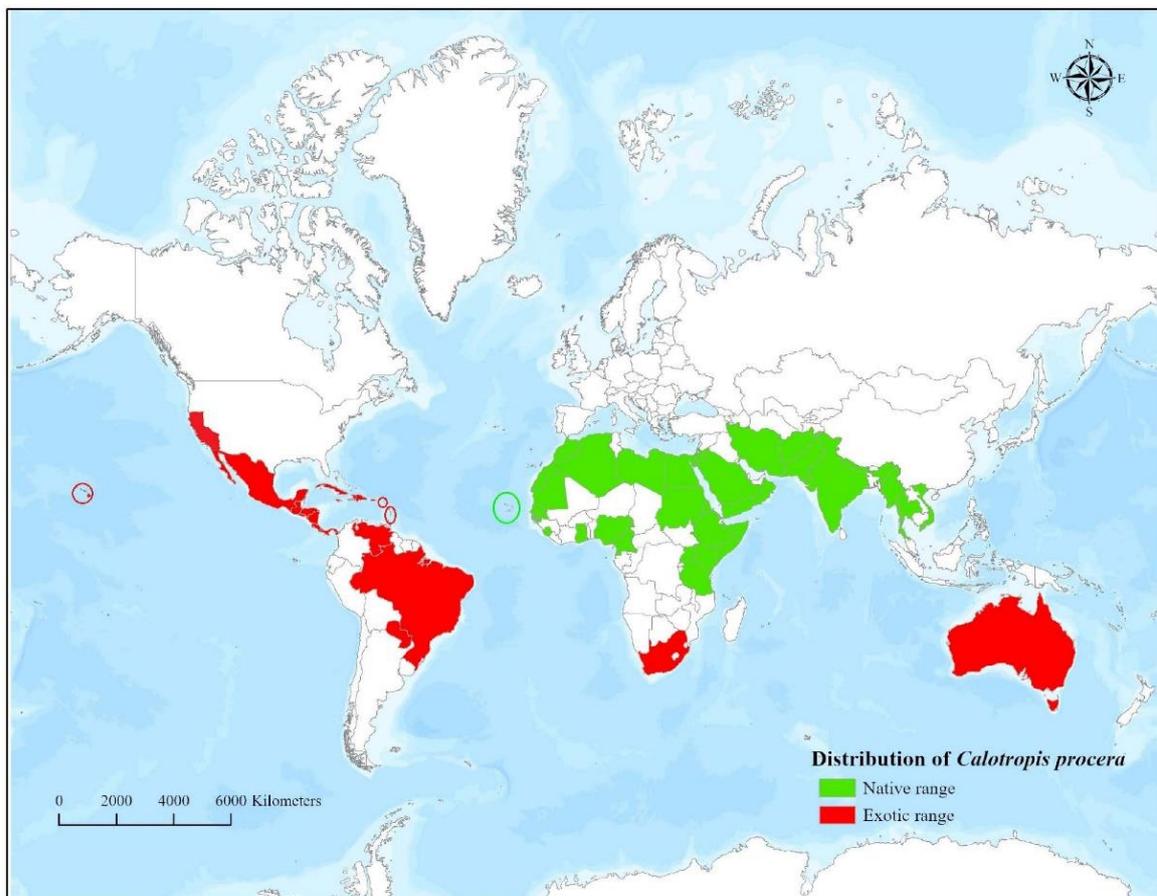
Cette plante est largement cultivé dans ces régions sans irrigation, sans engrais chimiques, sans pesticides ou autres pratiques agronomiques (Erdman, 1983). Il peut être considéré comme une espèce intéressante pour occuper les terrains pauvres sablonneux, trop épuisés pour supporter des cultures. A ce titre il est appelé à rendre des services dans les régions désertiques (Gillet, 1968).

Cette plante pousse dans des habitats secs où les précipitations sont limitées à 150 à 1000 mm. On la trouve sur les bords de routes, les dunes en bord de mer, et même dans les zones urbaines. *C. procera* se trouve également dans les zones élevées jusqu'à 1000 m. Parce que la plante est facile à propager et à gérer et peut pousser dans des conditions xérophytes, elle est parfois cultivée comme plante ornementale dans les zones sèches ou côtières (Parihar & Balekar, 2016).



**Figure 1:** Photographie de *C. procera* dans son habitat naturel (Photo originale)

a : Pied de *C. procera* ; b : Fleurs de *C. procera*



**Figure 2 :** Distribution mondiale de *C. procera* (Kaur et al., 2021)

### 1.1.1. Description botanique

*C. procera* est un arbuste ou petit arbre qui peut atteindre une hauteur de 2 à 6 m, sa tige est généralement simple, rarement ramifié. Les jeunes tiges sont de couleur vert grisâtre, les branches sont légèrement succulentes, alors qu'elles sont recouvertes d'une écorce liégeuse lorsqu'elles sont matures. Toutes les parties de la plante dégagent un latex blanc lorsqu'elle est coupée ou cassée (Hassan et *al.*, 2015; Orwa et *al.*, 2009). Le latex a été toujours considéré comme un poison. Il est d'une grande toxicité où parfois il est capable de provoquer la cécité s'il est en contact directe avec l'œil (Gillet, 1968).

*C. procera* a une racine pivotante de 3 à 4 m de profondeur et un système racinaire secondaire avec des racines latérales ligneuses, qui peuvent rapidement régénérer des pousses adventices lorsque les plantes sont blessées. Les racines pivotantes de *C. procera* ont des sommets proéminents avec une tête arrondie, le reste de la partie étant courbé en spirale ; ils forment de gros tubercules (Grace, 2006).

Ces racines dures sont de couleur blanc grisâtre et présentent des exsudats de sève si l'écorce est coupée. La partie supérieure du liège est spongieuse et rugueuse, tandis que la partie interne de l'écorce est lisse et mucilagineuse (Hassan et *al.*, 2015).

Les feuilles de *C. procera* sont opposées, simples, subsessiles, ne présentant pas de stipule, les limbes sont oblong-obovales à largement obovales, de couleur vert clair à vert foncé avec des veines presque blanches, légèrement coriaces, et ont une fine couche de poils doux qui s'effacent. L'apex est acuminé à apiculé, les feuilles ont une base embrassante en forme de cœur. Elles sont pubescentes lorsqu'elles sont jeunes et glabres des deux côtés à maturité. Elles ont un aspect cireux et contiennent une sève laiteuse blanche (Murti et *al.*, 2010).

La maturité de l'appareil reproducteur de *C. procera* est atteinte après 190 jours de germination environ. La floraison a lieu tout au long de l'année et la pollinisation est effectuée par des insectes, essentiellement des abeilles et des papillons (Bebawi et *al.*, 2015).

Les fleurs sont régulières, bisexuées. Elles sont portées en grappes de boutons floraux ovoïdes dans les fourches des feuilles les plus hautes (c'est-à-dire dans les inflorescences axillaires) ; chaque grappe contient 3–15 fleurs. Le calice et la corolle sont à 5 lobes ; les sépales de 7–8 mm de long ; ovales aigus, poilus à l'extérieur ; tandis que les pétales de 2–3 cm de large sont blancs avec des pointes violettes à l'intérieur ; Les fleurs ont un centre en forme de couronne (Hassan et *al.*, 2015).

Le fruit de *C. procera* est présenté sous forme de follicule simple charnu, gonflé et subglobuleux à ovoïde de 10 cm ou plus de diamètre. Son apex est arrondi, vert, spongieux et lisse, qui se fend et s'inverse à maturité pour libérer les graines (Rohit et al., 2012). Les graines sont nombreuses (350–500 par fruit), plates, obovales, de 6 x 5 mm, avec un pappus blanc soyeux de 3 cm de longueur ou plus (Orwa et al., 2009). La fructification a lieu tout au long de l'année (Bebawi et al., 2015).

### **1.1.2. Historique de la plante**

Dans l'ancienne littérature, il a été rapporté que *C. procera* a une très ancienne histoire d'utilisation comme traitement de choix en médecine traditionnelle africaine, chinoise et indienne pour traiter différentes maladies. Il a été utilisé pour la première fois comme plante médicinale vers 800-900. Ses différentes formules ont été trouvées dans les anciens livres védiques de l'Inde. Son importance a été décrite aussi dans les anciennes croyances et rituels populaires (Bhatti et al., 1998; Seignobos, 2016). Ses diverses propriétés thérapeutiques lui confèrent une grande utilisation en médecine traditionnelle à travers le monde (Rohit et al., 2012) et en Algérie (Hammiche & Maiza, 2006; Telli et al., 2022).

Toutes les parties de la plante comme les racines, les feuilles, les fleurs et le latex ont été utilisées pour prévenir de sévères maladies (El-Ghazali et al., 2010). Il a été utilisé pour le traitement de la lèpre, des ulcères, des tumeurs, des hémorroïdes et des maladies de la rate, du foie et de l'abdomen (Ibrahim et al., 2012). En outre, plusieurs études suggèrent également ses utilisations potentielles dans les industries alimentaires, textiles et papetières, ce qui lui confère une valeur socio-économique importante (Kaur et al., 2021).

### **1.2. Classification taxonomique**

*Calotropis procera* est une plante médicinale populaire de la famille des *Apocynaceae* (Amini et al., 2021). Sur la base de données moléculaires, la classification des *Apocynaceae* a subi des révisions considérables. Selon l'Angiosperm Phylogeny Group III, la famille des *Asclepiadaceae* est maintenant incluse dans les *Apocynaceae*. Cette révision est également mise à jour dans Angiosperm Phylogeny Group IV (APGIV, 2016).

La famille, telle qu'elle est actuellement reconnue, comprend quelque 1500 espèces réparties en environ 424 genres et cinq sous-familles : *Apocynoideae*, *Rauvolfioideae*, *Asclepiadoideae*, *Periplocoideae* et *Secamonoideae*. Les deux premières sous-familles faisaient partie des *Apocynaceae* sensu stricto, tandis que les trois dernières sous-familles appartenaient aux *Asclepiadaceae* (Madani et al., 2017).

La classification de *C. procera* selon APGIV (2016) est la suivante :

Règne : *Plantae*

Phylum : *Tracheophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Gentianales*

Famille : *Apocynaceae*

Genre : *Calotropis*

Espèce : *procera*

### **1.3. Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires synthétisés par les plantes constituent un moyen de leur adaptation à leurs environnements, mais représentent aussi une importante source de molécules pharmaceutiques. Ces molécules contribuent largement à l'interaction des plantes avec leurs environnements. Ils ont été décrits comme étant antibiotiques, antifongiques et antiviraux, et donc capables de protéger les plantes des agents pathogènes (phytoalexines), et aussi antigerminatifs ou toxiques pour les autres plantes (allélopathie). En outre, ils constituent d'importants composés absorbant les UV, empêchant ainsi de graves dommages aux feuilles causés par la lumière. Par ailleurs, ils agissent sur les animaux, comme les insectes (propriétés anti-nutritives), ou encore les bovins pour lesquels les graminées fourragères comme le trèfle ou la luzerne peuvent exprimer des propriétés oestrogéniques et interagir avec la fertilité. Les métabolites secondaires végétaux sont généralement classés en fonction de leurs voies de biosynthèse. (Bourgaud et *al.*, 2001)

Plusieurs rapports dans la littérature indiquent que *C. procera* contient diverses classes de métabolites secondaires, notamment des glycosides cardiaques, des stérols, des alcaloïdes, des tanins, des triterpènes, et des flavonoïdes (Nenaah, 2013; Rohit et *al.*, 2012). L'accumulation des glycosides cardiaques dans la plante à des teneurs importantes comme la calotropagénine, la calotoxine, le frugoside, la coroglaucigénine, la calotropine, l'uzarigénine, l'asclépine, l'uscharidine et l'uscharine ainsi que leurs précurseurs (stérols) a été déjà démontrée par les études antérieures (Pandey et *al.*, 2016; Ramadan et *al.*, 2019).

### 1.3.1. Stérols

- **Description et intérêts**

Les stérols sont un groupe de métabolites dérivés de la vaste famille des isoprénoïdes (terpénoïdes) avec des fonctions essentielles chez les eucaryotes (Edwards & Ericsson, 1999).

Contrairement aux cellules animales et fongiques, qui contiennent un seul stérol majeur, les cellules végétales synthétisent une gamme complexe de mélanges de stérols, communément appelés phytostérols (Benveniste, 2004).

Les phytostérols jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes, y compris la division cellulaire, l'élongation cellulaire, l'embryogenèse, la biosynthèse de la cellulose et la formation de la paroi cellulaire (He et *al.*, 2003).

Un grand nombre d'études sur des mutants du gène synthétique de stérol de *Arabidopsis* ont montré que les stérols jouent un rôle important dans le développement des embryons et des graines des plantes. La squalène époxydase (SQE) convertit le squalène en oxydosqualène au stade précoce de la synthèse des phytostérols, et les mutants *sqa1-3* et *sqa1-4* produisent des graines non viables. Les mutants de *Arabidopsis* *smt1* (stérol méthyltransférase 1), *fackel* (*fk*) et *hyd1* (*hydra 1*) présentent des défauts embryonnaires. De même, les doubles mutants *cvp1 smt1* étaient létaux pour les embryons, indiquant la sensibilité du développement embryonnaire aux balances de stérols (Suo et *al.*, 2021).

Parmi les divers phytostérols synthétisés chez les plantes, trois sont majoritaires (le campestérol, le sitostérol et le stigmastérol) et présentent de grands rôles de structure et de fonction pour leur croissance et leur développement (Clouse, 2002; Hartmann, 1998).

Le campestérol sert comme précurseur de synthèse des brassinostéroïdes (BRs) : des molécules agissant comme signaux hormonaux, il influence le niveau de BRs actifs ; et régule un certain nombre d'activités physiologiques dans le développement de la plante comme l'élongation cellulaire, le développement de l'étamine et du pollen, la différenciation du xylème, la tolérance au stress, et la résistance aux agents pathogènes (Deng et *al.*, 2016).

Le sitostérol est un composant important de la bicouche lipidique membranaire, qui interagit avec les phospholipides ou les sphingolipides pour réguler la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique, notamment pour réguler les propriétés

physicochimiques des microdomaines lipidiques appelés radeaux (Laloi et *al.*, 2007; Schaller, 2004).

Le stigmastérol pourrait être spécifiquement requis pour la prolifération cellulaire (Hartmann, 1998). En plus des rôles importants des phytostérols pour la croissance et le développement des plantes, ils sont bénéfiques pour la santé humaine (Yang et *al.*, 2009). Récemment, il a été rapporté la modulation positive des récepteurs GABAA, le potentiel anxiolytique et anticonvulsivant du stigmastérol. Ainsi, le stigmastérol est considéré comme un médicament stéroïdien candidat pour le traitement des troubles neurologiques en raison de sa modulation positive des récepteurs GABAA (Karim et *al.*, 2021). L'activité antioxydante, anti-inflammatoire et anti-cancéreuse du stigmastérol a été aussi montrée par (Ahamed et *al.*, 2022).

Les stérols ont donc une importance croissante dans la l'industrie pharmaceutique et alimentaire en raison de leurs bienfaits pour la santé représentant ainsi un marché de plusieurs milliards de dollars (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011).

D'autre part les stérols sont des substrats pour la synthèse d'un large éventail de métabolites secondaires tels que les cardénolides (famille des glycosides cardiaques), les glycoalcaloïdes, les dérivés du prégnane et les saponines (Hartmann, 1998).

- **Voie de biosynthèse des stérols**

Les phytostérols sont synthétisés via la voie mévalonate de la formation des terpénoïdes et proviennent de la cyclisation initiale du 3S-squalène-2,3-époxyde (Kreis & Müller-Uri, 2010).

Tous les tissus végétaux sont capables de former leurs propres stérols. La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse des stérols à partir de la formation du squalène sont associées aux membranes du réticulum endoplasmique, mais la participation de la membrane plasmique aux étapes finales de la voie (par exemple dans la synthèse du stigmastérol) ne peut être exclue (Hartmann, 1998).

Généralement, la voie de biosynthèse des phytostérols (Figure 3) va du cycloarténol au campestérol et au stigmastérol. Il existe un point de branchement au 24-méthylènelophénol, défini comme deux segments biosynthétiques : l'un produit du campestérol (une sorte de 24-méthyl stérol), et l'autre produit du sitostérol et du stigmastérol (deux sortes de 24-éthyl stérols) (Benveniste, 2004; Carland et *al.*, 2010).

Il y a 12 enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse, et celles-ci sont divisées en deux groupes : un groupe intervient dans les premières étapes de la voie, comme les C24-stérol méthyltransférases 1 (SMT1), les stérol-méthyl oxydases 1 (SMO1), la cyclopropyle stérol isomérase (CPI), Obtusifoliol-14 $\alpha$ -déméthylase (CYP51), Fackel (FK) et hydral (HYD1); l'autre groupe intervient dans les dernières étapes de la voie, comme les C24-stérol méthyltransférases 2 (SMT2), les stérol-méthyl oxydases 2 (SMO2), la  $\Delta$ 7-stérol-C5-désaturase (DWF7/STE1),  $\Delta$ 5, 7-stérol  $\Delta$ 7-réductase (DWF5),  $\Delta$ 5-stérol  $\Delta$ 24-réductase (DWF1) et C22-stérol désaturase (CYP710A1) (Benveniste, 2004).

SMT2 est l'enzyme clé contrôlant un point de ramification qui définit deux voies de biosynthèse. L'une de ces voies produit des 24-méthyl stérols comme le campestérol, et l'autre produit des 24-éthyl stérols comme le sitostérol et le stigmastérol (Benveniste, 2004; Carland et *al.*, 2010).

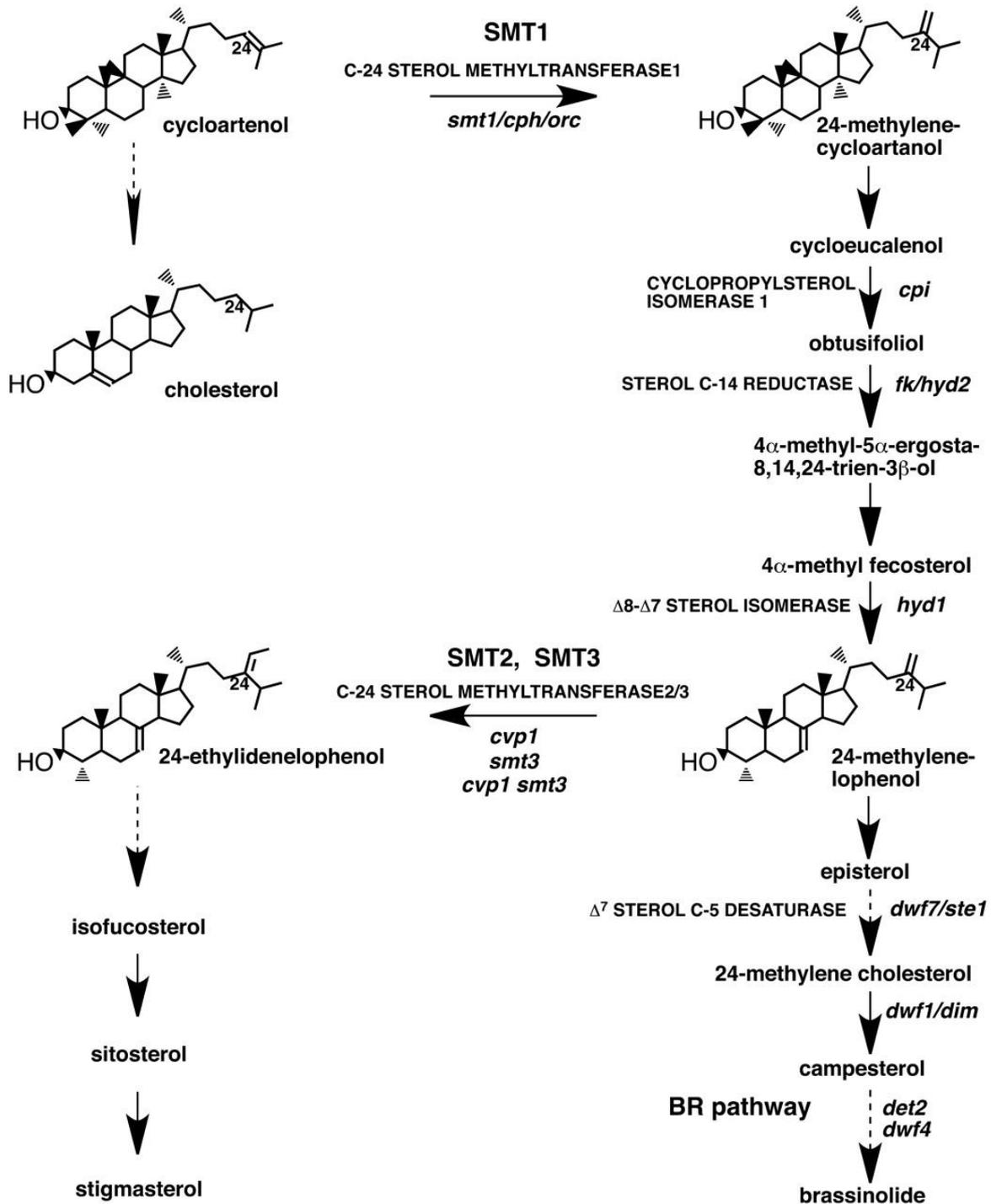


Figure 3 : Voie de biosynthèse des phytostérols (Carland *et al.*, 2010)

Les principaux intermédiaires sont affichés. C-24, le site des additions de méthyle SMT, est indiqué. Plusieurs étapes sont désignées par des lignes pointillées. Les mutants sont indiqués en italique avec les enzymes correspondantes en majuscules. *dwf1/dim* a une homologie avec l'oxydase liée au FAD et devrait avoir une activité C-24 réductase.

### 1.3.2. Glycosides cardiaques

- **Description et intérêts**

Les glycosides cardiaques sont des métabolites secondaires d'origine végétale répandus chez plusieurs familles d'angiospermes non apparentées comme la famille des *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Asparagaceae*, *Convallariaceae*, *Crassulaceae*, *Fabaceae*, *Hyacinthaceae*, *Plantaginaceae*, *Ranunculaceae* et *Scrophulariaceae* (Voir tableau 1) (Kreis & Müller-Uri, 2010; Patel, 2016).

**Tableau 1:** Noms botaniques des espèces végétales productrices de glycosides cardiaques (Patel, 2016).

<b>Espèce</b>	<b>Famille/Classe</b>	<b>Glycoside cardiaque</b>
<i>Antiaris toxicaria</i>	<i>Moraceae</i>	Antiaritoxioside
<i>Asclepias sp.</i>	<i>Asclepiadaceae</i>	–
<i>Bowiea volubilis</i>	<i>Asparagaceae</i>	
<i>Calotropis sp.</i>	<i>Apocynaceae</i>	Calactine, Calotxine, Calotropine
<i>Convallaria majalis</i>	<i>Asparagaceae</i>	Convallatoxine
<i>Digitalis purpurea</i>	<i>Plantaginaceae</i>	Digoxine, Gitoxine, Digitonine,
<i>Drimia maritima</i>	<i>Asparagaceae</i>	–
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	<i>Crassulaceae</i>	Lanceotoxins
<i>Nerium oleander</i>	<i>Apocynaceae</i>	Oleandrine, Oleandroside, Nerioside
<i>Thevetia peruviana</i>	<i>Apocynaceae</i>	Oleandrine
<i>Strophanthus</i>	<i>Apocynaceae</i>	Strophanthidine, Periplogenine

Les glycosides cardiaques appartiennent aux hybrides stéroïdes-sucres. Ils sont composés d'aglycone stéroïdien avec un anneau lactone à 5 chaînons et agissent sur les muscles cardiaques. Ceux-ci sont également connus sous le nom de glycosides cardiotoniques et l'activité cardiaque dépend à la fois de l'aglycone et de la molécule de sucre. L'activité réside dans l'aglycone mais le sucre rend les composés plus solubles, ce qui augmente le pouvoir de fixation du glycoside sur les muscles cardiaques. Ceux-ci sont divisés en deux sous-groupes : Les cardénolides : ont un cycle lactone à 5 chaînons en position C-17 et les bufadénolides qui ont un cycle lactone à 6 membres en position C-17 des cycles stéroïdiens (Sayeed, 2007).

Toutefois, les aglycones peuvent être liés à un ou plusieurs sucres ou oligosaccharides tels que l'arabinose, le galactose, le glucose, le mannose, le rhamnose et le xylose. L'unité d'aglycone peut être en outre décorée par une série d'étapes d'adaptation, qui contribuent considérablement à la diversité des glycosides cardiaques naturels. Les aglycones dans les glycosides cardiaques sont essentiels pour l'activité biologique, et une modification rationnelle de la fraction aglycone peut améliorer l'activité anticancéreuse par exemple (Hou et *al.*, 2021).

Ils sont utiles en médecine comme agent cardiotonique, antiprolifératif, immunomodulateur, dépresseur du système nerveux central, anti-inflammatoire et antiviral (Nimoriya et *al.*, 2021).

Une analyse réalisée par Van Quaquebeke et son équipe sur l'extrait méthanolique d'écorces de racine de *C. procera* a permis d'identifier un cardénolide (2"-oxovoruscharine). Ce composé s'est révélé très intéressant en termes de rendement chimique hémisynthétique, son activité antitumorale *in vitro*, son influence inhibitrice *in vitro* sur l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, et sa tolérance *in vivo*. Le composé présente une activité antitumorale *in vitro* sur 57 lignées de cellules cancéreuses humaines, rendant ainsi son activité antimétabolique similaire à celle du taxol et dont l'efficacité est supérieure au SN-38 (le métabolite actif de l'irinotécan), deux des médicaments les plus puissants utilisés pour lutter contre le cancer (Van Quaquebeke et *al.*, 2005).

L'excellente activité anticancéreuse des glycosides cardiaques par l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, l'induction de l'apoptose cellulaire et de l'autophagie, la régulation du cycle cellulaire ainsi que l'influence de la transduction du signal cellulaire a attiré beaucoup l'attention ces dernières années pour ces composés (Hou et *al.*, 2021). De ce fait, ils peuvent

constituer des plateformes utiles pour la découverte de nouveaux métabolites anticancéreux surtout qu'ils permettent un contrôle sélectif des tumeurs sans affecter la croissance et la division cellulaires normales.

Une activité antifongique prononcée de composés cardénolides contre les champignons telluriques *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* a été aussi rapportée par (Abbassy et al., 2012), ce qui indique que ces composés peuvent être utilisés comme fongicides.

Des glycosides cardiaques tels que la calotropagénine, la calotoxine, le frugoside, la coroglaucigénine, la calotropine, la calactine, l'uzarigénine, l'asclépine, l'uscharidine et l'uscharine ont été identifiés dans les organes de *C. procera*. La calotropine et les glycosides cardiaques apparentés montrent des propriétés cardiaques par l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Farr et al., 2002; Petschenka et al., 2018) similaires aux médicaments digitoxine et digoxine largement commercialisés et utilisés dans le traitement des insuffisances cardiaques (Koch et al., 2020), ainsi que des activités cytotoxiques contre un certain nombre de lignées cellulaires cancéreuses (Huang et al., 2018; Li et al., 2009; Zheng et al., 2021) et des maladies auto-immunes médiées par les lymphocytes Th17 et/ou Th1 (Liu et al., 2019).

Les glycosides cardiaques sont actuellement récoltés à partir des tissus de plantes naturelles, une source limitée de métabolites secondaires. Il est donc crucial de déterminer la voie de biosynthèse complète de ces molécules pour concevoir la production des glycosides cardiaques dans d'autres organismes à usage pharmaceutique (Hoopes et al., 2018).

- **Voie de biosynthèse des glycosides cardiaques**

La biosynthèse des glycosides cardiaques dans les plantes vasculaires peut ne pas être séparée de la biosynthèse des stérols (Figure 4) (Kreis & Müller-Uri, 2010). Toutefois, les ressources génomiques de *C. procera* sont limitées. Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des glycosides cardiaques chez cette plante restent largement inconnus à ce jour.

Les glycosides cardiaques seraient synthétisés chez les plantes à partir des prégnanes intermédiaires (Stuhlemmer & Kreis, 1996). Ces dernières molécules sont supposées dérivées de l'acide mévalonique via des triterpénoïdes et des phytostérols intermédiaires. La prédominance des précurseurs de la voie terpénoïde (voie mévalonate MVA ou voie 2-C-méthylérythritol-4-phosphate MEP) dans la synthèse du cardénolide intermédiaire n'est pas encore claire (Faust et al., 1992).

Les données du transcriptome ont révélé un total de 47 unigènes associés à la production du squelette terpénoïde. Ces unigènes représentent ensemble 16 familles de gènes de la biosynthèse du squelette terpénoïde (McGarvey & Croteau, 1995).

L'identification des transcrits liés aux enzymes des deux sous-voies terpénoïdes suggère que les précurseurs des deux voies sont utilisés dans la synthèse de différents intermédiaires chez *C. procera* (Figure 4) (Pandey et al., 2016).

La formation du squalène englobe le début du squelette stéroïdien qui, par la formation de plusieurs intermédiaires aboutit à la prégnéolone (Benveniste, 2002). Ces étapes sont catalysées par 13 familles de gènes associés à la biosynthèse des stéroïdes, comprenant principalement des réductases, des oxydases et des méthylases (Pandey et al., 2016).

La formation de la prégnéolone est le point de branchement pour la biosynthèse du squelette des glycosides cardiaques. Au total, 11 familles de gènes sont supposées impliquées dans la conversion de la prégnéolone en glycoside cardiaque, parmi lesquelles, seules cinq familles de gènes ont été identifiées par (Pandey et al., 2016). La conversion de la prégnéolone en progestérone est catalysée par l'enzyme 3 $\beta$ -HSD (Herl et al., 2007). Une fois la progestérone est synthétisée, elle est immédiatement réduite en l'un des intermédiaires Prégnane-dione avec l'enzyme 5 $\beta$ POR (Herl et al., 2006). Quatre transcrits présentant des similitudes avec les enzymes glucohydrolases ont été identifiés chez *C. procera* et pourraient avoir une activité similaire aux enzymes cardénolides 16-O-glucohydrolases. Jusqu'à ce jour, un seul gène, à savoir 5 $\beta$ POR, progestérone 5 $\beta$ -réductase a été caractérisé à partir de cette plante (Pandey et al., 2016).

Des enzymes spécifiques impliquées dans les dernières étapes de la biosynthèse des glycosides cardiaques telles que des glycosyl transférases, des glucuronosyl transférases, des UDP-glycosyl transférases et des glucuronosyl transférases ont été identifiées déjà chez *C. procera*. La présence de ces enzymes catalysant la glycosylation des unités de génine en glycosides donnera une nouvelle direction à l'étude de la voie de biosynthèse des glycosides cardiaques et de ses gènes associés chez cette plante (Pandey et al., 2016).

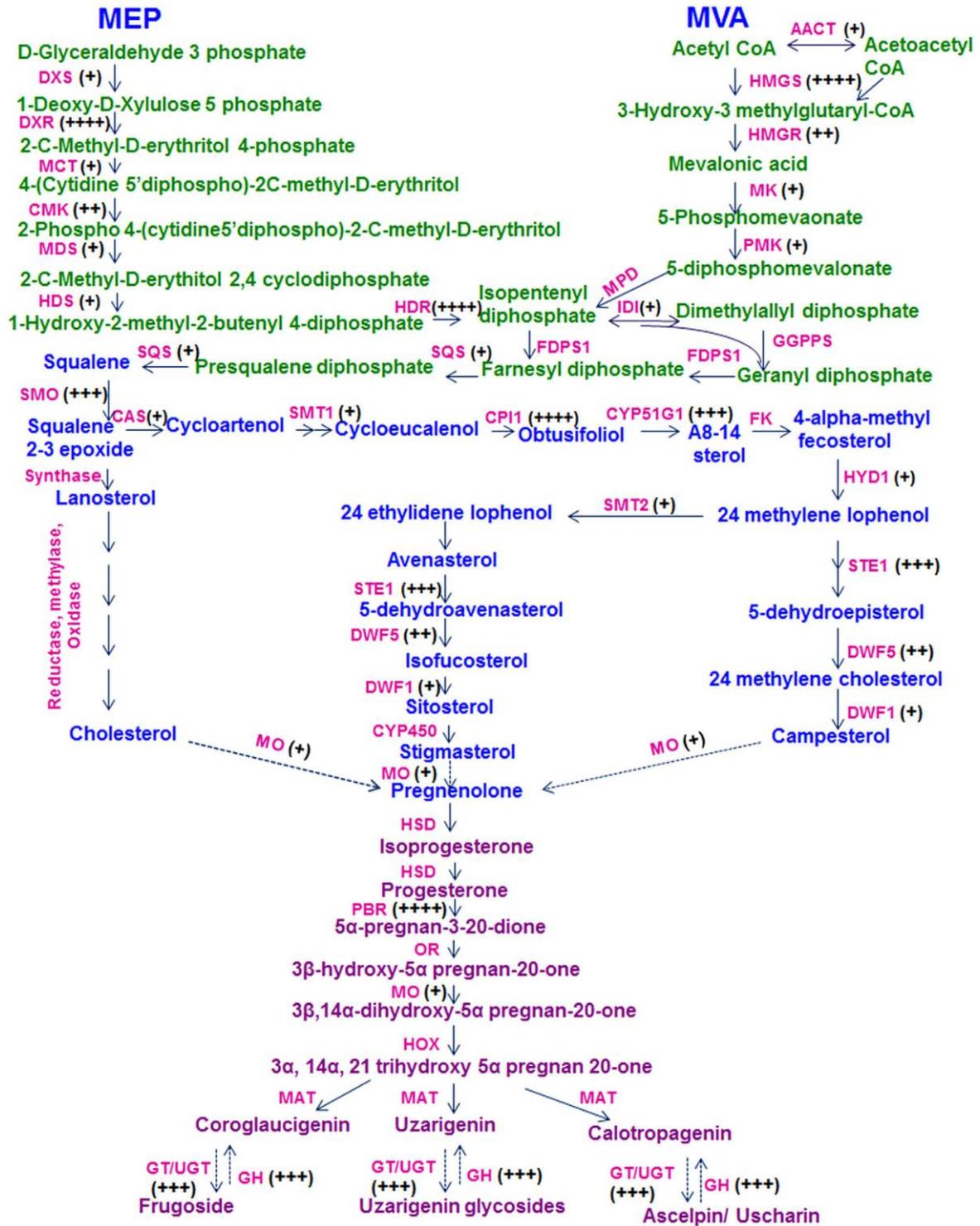


Figure 4 : Voie putative de biosynthèse des glycosides cardiaques chez *C. procera* (Pandey et al., 2016)

#### **1.4. Importance médicinale de *C. procera***

Ces dernières années, la médecine traditionnelle et naturelle est largement utilisée pour prévenir et guérir diverses maladies, notamment les problèmes cardiovasculaires et cancéreux (Patel, 2016).

Les différentes parties de *C. procera* sont connues pour leurs vertus thérapeutiques contre plusieurs maladies. Les racines, l'écorce des racines, les feuilles, les fleurs, les fruits, le latex ou parfois même la plante entière ont été utilisés pour prévenir : les maladies de la peau, les dermatoses, les plaies infectées, la syphilis, les maladies respiratoires (toux), l'amygdalite, la jaunisse, les helminthiases, la bilharziose, la dysenterie, la constipation, la fièvre, le rhumatisme, l'asthme, l'épilepsie, les douleurs, les hémorragies, les plaies infectées, le psoriasis, la leishmaniose, les céphalées, les troubles digestifs, les maladies oculaires et peuvent être aussi utilisées comme antiseptique où parfois abortive (El-Ghazali et al., 2010; Hammiche & Maiza, 2006; Kumari & Chaudhary, 2021; Lal & Yadav, 1983).

Jusqu'à présent, plusieurs études ont prouvé l'effet biologique des extraits des différentes parties de *C. procera*, telle que l'activité antibactérienne (Mako et al., 2012), larvicide (Markouk et al., 2000), vermifuge (Iqbal et al., 2005), acaricide (Al-Rajhy et al., 2003), schizontocide (Sharma & Sharma, 2000), anti-nociceptive (Soares et al., 2005), antioxydante (Kumar et al., 2013), spasmolytique (Iwalewa et al., 2005), immunomodulatrice (Seddek et al., 2009), antipyrétique, analgésique, purgative (Mossa et al., 1991), cicatrisante (Rasik et al., 1999), hépato-protectrice (Ramachandra Setty et al., 2007), antiulcéreuse (Basu et al., 1997), anti-fertilité (Kamath & Rana, 2002), anti-inflammatoire (Teixeira et al., 2011), anti-diarrhéique (Kumar et al., 2001) et anticancéreuse (Sweidan et al., 2021).

Aujourd'hui, le *C. procera* est considéré comme une source prometteuse de molécules pharmacologiquement actives qui pourraient être chimiquement modifiées pour améliorer leur efficacité (Van Quaquebeke et al., 2005). En revanche, bien que son potentiel pharmacologique ait été bien prouvé, seules quelques molécules actives ont été identifiées, ce qui nécessite l'approfondissement des recherches sur cette voie (Parihar & Balekar, 2016).

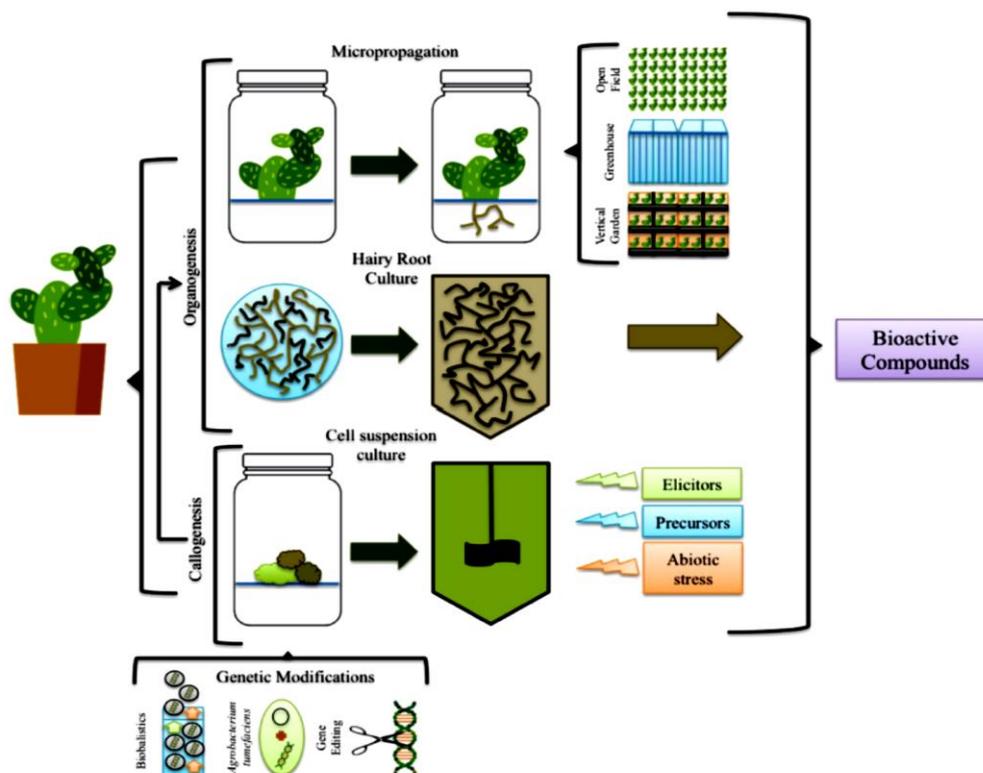
## **2. Culture de tissus végétaux**

Les plantes présentent une source riche en métabolites secondaires souvent utilisés comme produits pharmaceutiques. Néanmoins, l'approvisionnement constant et uniforme en

produits pharmaceutiques à partir des végétaux a souvent été compromis. Une alternative pour la production de composés végétaux actifs est la culture *in vitro* de tissus végétaux, car elle assure l'indépendance vis-à-vis des conditions environnementales en éliminant le besoin de s'appuyer sur des plantes sauvages. La transformation des plantes permet également leur utilisation ultérieure pour la production de composés divers, tels que les vaccins et de multiples produits pharmaceutiques (Espinosa-Leal et al., 2018).

Une autre raison d'utiliser ces approches biotechnologiques pour produire des métabolites secondaires *in vitro*, est que ces derniers ne sont pas essentiels à la croissance des plantes et sont produits en petites quantités. Ces composés présents à de faibles taux possèdent parfois des centres chiraux ce qui les rends difficiles à synthétiser chimiquement et donc coûteux pour la production commerciale (Zhou et al., 2011).

Plusieurs méthodes sont actuellement employées pour obtenir la matière végétale qui sert à fournir les métabolites secondaires à grande échelle (Figure 5), à savoir la culture de cellules, la culture de cals, l'organogenèse, l'embryogenèse, la culture de racines et l'induction de chevelus racinaires ou *hairy root* (Stiles & Liu, 2013).



**Figure 5 :** Schéma des méthodes actuelles employées pour la production à grande échelle de composés bioactifs à l'aide de la culture de tissus végétaux *in vitro* (Espinosa-Leal et al., 2018)

## **2.1. Culture de chevelus racinaires**

Durant plusieurs années, la culture de tissus végétaux, en particulier les cultures de suspensions cellulaires et de CRs a été considéré comme une source alternative de composés biologiquement actifs (Amdoun et *al.*, 2008; Benyammi et *al.*, 2016; Huang et *al.*, 2014; Moussous et *al.*, 2018).

La transformation génétique des plantes à l'aide de *Agrobacterium rhizogenes* est plus prometteuse par rapport aux cultures cellulaires pour la production de métabolites secondaires. Ceci est dû au principal facteur limitant dans l'utilisation des cultures cellulaires qui est leur instabilité génétique au cours des cultures à long terme, ce qui entraîne de faibles rendements en produits d'intérêt. À cet égard, les CRs offrent des avantages uniques dans leur stabilité génétique et biosynthétique (Singh et *al.*, 2018).

La préférence pour les CRs est également due à une autre caractéristique majeure du fait qu'ils sont capables de produire des métabolites secondaires en même temps que leur croissance illimitée sous réserve de leur réunir les conditions favorables du milieu de culture. Il est donc possible d'obtenir une source continue de métabolites secondaires d'intérêt à partir de CRs (Figure 6) en pleine croissance (Bourgaud et *al.*, 2001).

De même, les CRs se caractérisent par un taux de croissance élevé, une bonne stabilité génétique et une croissance continue dans des milieux de culture sans régulateurs de croissance. La culture de racines génétiquement modifiées peuvent produire des quantités de métabolites secondaires comparables ou parfois même supérieures à celle produites par les plantes à l'état naturel (Chandra & Chandra, 2011).

Ils ont été également utilisés avec succès dans le cas où les métabolites secondaires se trouvent uniquement dans la partie aérienne de la plante. L'artémisinine et la lawsone à titre d'exemples s'accumulent au principe uniquement dans la partie aérienne de la plante, mais il a été démontré que les CRs les produisent (Singh et *al.*, 2018).

Les caractéristiques de croissance et de biosynthèse ont fait des CRs un outil largement utilisé pour la production de métabolites secondaires, l'étude de la fonction des gènes et aussi l'étude de la biologie des racines en général (Veena & Taylor, 2007). Ils sont considérés actuellement comme une importante source pour la production de molécules bioactives comme les métabolites secondaires et les protéines recombinantes (Gutierrez-Valdes et *al.*, 2020; Zhou et *al.*, 2011).

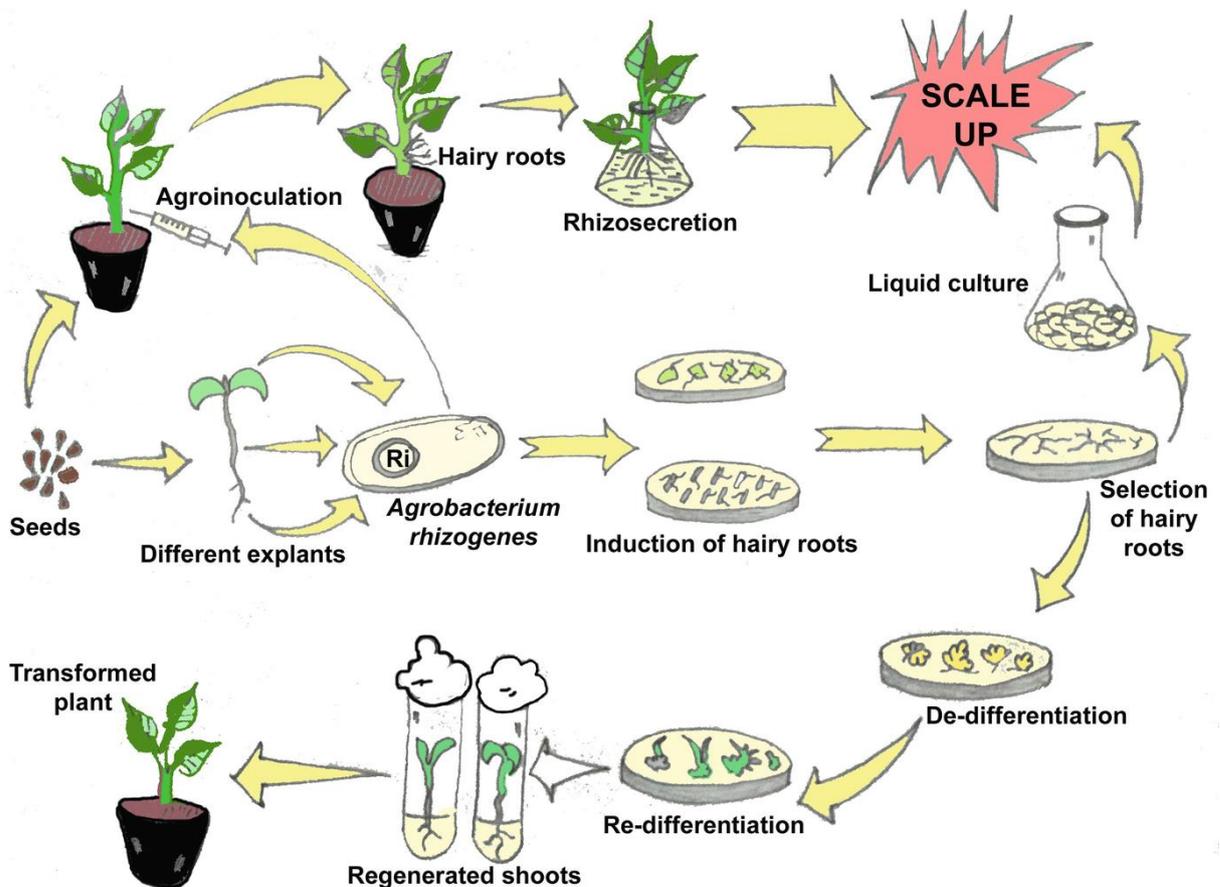


Figure 6: Induction de CRs et ses applications biotechnologiques (Singh et al., 2018)

## 2.2. Transformation par *Agrobacterium rhizogenes*

### 2.2.1. Maladie de chevelu racinaire ou *hairy root*

Les CRs sont issus de l'infection des plantes par *A. rhizogenes*, une bactérie de sol à Gram négatif appartenant à la famille des Rhizobiacées. Cette bactérie provoque naturellement chez les plantes supérieures la maladie de chevelu racinaire (Rawat et al., 2019).

La plupart des tissus et organes végétaux, y compris les hypocotyles, les feuilles, les tiges, les pétioles, l'apex, les cotylédons, les protoplastes, les racines et les tubercules, ont montré leur capacité à être infectés et génétiquement transformés par *A. rhizogenes* conduisant à la formation de CRs (Veena & Taylor, 2007).

An niveau des parties blessées des plantes, la bactérie se déplace par chimiotaxie pour provoquer une infection suivie du transfert et intégration de son matériel génétique (ADN-T) dans le génome de la plante, entraînant le développement de CRs dans la partie

infectée. Le développement de ces CRs adventifs est la manifestation de l'intégration et l'expression génétique du plasmide de *A. rhizogenes* appelé plasmide Ri (*Root Inducing*) d'environ 250 Kpb (Figure 7). Ce plasmide est responsable de l'infection de la plante et l'induction des racines transformées (Singh et al., 2018; White & Nester, 1980).

Un segment d'ADN du plasmide Ri connu sous le nom d'ADN de transfert (ADN-T) est transféré de la cellule bactérienne et inséré dans le génome de la plante (Nemoto et al., 2009).

En fonction du type d'opines synthétisées dans les racines transformées, les plasmides Ri sont divisés en deux classes principales. La première classe est représentée par les souches de *A. rhizogenes* de type agropine (A4, 15834, 1855, LBA 9402) ; qui stimulent les racines transformées pour synthétiser l'agropine, la mannopine et d'autres acides apparentés. Alors que la deuxième classe est représentée par les souches de type mannopine, cucumopine, qui incitent les racines à synthétiser une seule opine (Bensaddek et al., 2008).

Chez les souches de type agropine du plasmide Ri, il existe deux régions d'ADN-T distinctes appelées ADN-TL et ADN-TR qui sont transférées indépendamment au génome de la plante, tandis que les souches de type mannopine ne transfèrent qu'un seul ADN-T (Rawat et al., 2019).

L'ADN-TL s'est avéré contenir quatre loci impliqués dans l'induction des CRs nommés *rol* (*root oncogenic loci*), à savoir *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* (Estramareix et al., 1986; White et al., 1985). Alors que l'ADN-TR contient les gènes compromis dans la biosynthèse des auxines et des opines, semblant jouer un rôle auxiliaire dans le développement des CRs (Christey, 2001). L'intégration de l'ADN-TL dans le génome de la plante est essentielle pour l'induction des CRs (Singh et al., 2018).

Des études antérieures, ont démontré que les gènes *rol* sont nécessaires et suffisants pour induire des racines transformées, particulièrement le *rolB* qui semble être le plus pertinent dans l'induction de CRs. Tandis que les gènes aux (auxines) ne jouent pas un rôle majeur dans la maladie de chevelu racinaire (Cardarelli et al., 1987; Gutierrez-Valdes et al., 2020).

- **Région ADN-TL**

L'ADN-TL du plasmide Ri des souches de type agropine a été examiné pour révéler la présence de 18 cadres de lecture ouverts ORF (*Open Reading Frames*). Parmi ces ORF :

les ORF10, les ORF11 et les ORF12 qui sont respectivement les gènes *rolA*, *rolB* et *rolC*. L'ORF15 correspond au gène *rolD*, qui se trouve uniquement dans l'ADN-T du plasmide Ri des souches de type agropine (Christey, 2001). Une plus grande attention a été portée aux gènes *rolA*, *rolB* et *rolC*, car ils ont été signalés comme étant essentiels au développement des CRs (White et al., 1985).

Le gène *rolA* semble jouer un rôle important dans la formation de CRs. Sa taille varie entre 279 pb à 423 pb (Meyer et al., 2000). Son expression chez des plantes transgéniques aboutie à la formation de phénotype hautement aberrant, des feuilles ridées d'un vert intense, de longs entre-nœuds, un nanisme ou un semi-nanisme et une sénescence retardée (Sinkar et al., 1988). Il est impliqué dans des modifications de la physiologie hormonale, notamment une interférence avec la gibbérelline et la polyamine (Veena & Taylor, 2007). Ce gène est associé à la stimulation de la croissance (Zafar et al., 2019).

La taille du gène *rolB* est comprise entre 762 pb et 837 pb, codant pour une protéine de 259 à 279 acides aminés (Meyer et al., 2000). Il a été rapporté que les fonctions des gènes *rolA* et *rolB* sont antagonistes l'un sur l'autre. Des études sur la surexpression transgénique du gène *rolB* ont montré la suppression de l'induction des racines adventives et la nécrose (Mauro & Bettini, 2021). De même, il a été prouvé que la protéine *rolB* possède une activité  $\beta$ -glucosidase, qui pourrait jouer un rôle dans la libération d'auxines actives par hydrolyse de  $\beta$ -glucosides inactifs. L'expression de *rolB* modifie considérablement la perception et la sensibilité de l'auxine (Singh et al., 2018). Ce gène serait donc capable de réguler la voie de transduction du signal de l'auxine en raison de son activité tyrosine phosphatase (Zafar et al., 2019).

Le gène *rolC* est d'une taille d'environ de 540 pb qui code pour une protéine de 179-181 acides aminés (Meyer et al., 2000). Son expression présente une activité cytokinine glucosidase. En revanche, l'expression transgénique du *rolC* n'a pas été démontré comme réducteur du taux de cytokinine chez les plantes (Casanova et al., 2003; Zafar et al., 2019). Il a été déjà signalé que le gène *rolC* affecte la balance des régulateurs de croissance et les polyamines chez les cellules végétales. De plus, il conduit à un meilleur enracinement des arbres, ce qui indique qu'il peut exercer une activité comparable à l'auxine (Priscilla Bettini et al., 2010).

Le gene *rolD* est constitué de 1032 pb qui code pour une protéine de 344 résidus d'acides aminés (Meyer et al., 2000), il s'agit de l'ornithine cyclodéaminase, une enzyme impliquée dans la conversion de l'ornithine en proline (Trovato et al., 2001). De ce fait, il

peut être considéré comme gène candidat pour lutter contre les stress biotique et abiotique chez les plantes. L'expression de ce gène entraîne une induction florale précoce et un nombre accru de fleurs (Bettini et *al.*, 2003).

Jusqu'à présent, les gènes *rol* ont été décrits comme modulateur de la croissance des plantes et de la différenciation cellulaire. En plus, ils pourraient induire des voies de transduction de signal inhabituelles chez les plantes. Des études complémentaires sont encore nécessaires pour comprendre tous les événements de l'induction de CRs (Gutierrez-Valdes et *al.*, 2020).

- **Région ADN-TR**

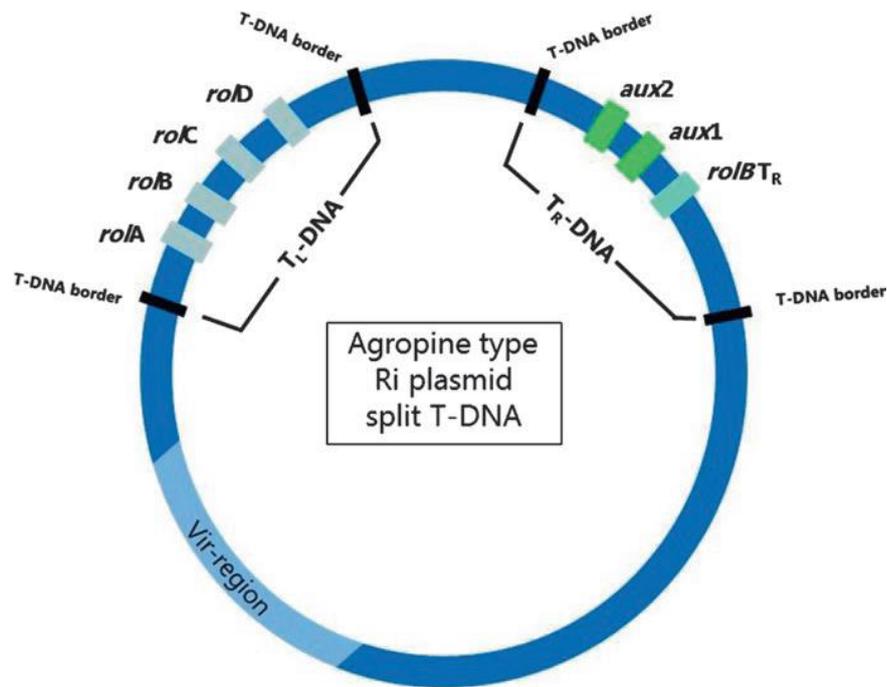
La région de l'ADN-TR contient les gènes (*ags*, *mas1*, *mas2*, *rolB* TR, *aux1* et *aux2*) pour la synthèse de l'agropine et la biosynthèse des auxines (Nemoto et *al.*, 2009).

Le gène *ags* code pour l'agropine synthétase, une enzyme responsable de la catalyse de la production d'agropine (Inoguchi et *al.*, 1996). Les gènes *mas1* et *mas2* sont aussi impliqués pour la synthèse de l'agropine. Le gène *Mas2* catalyse la conjugaison entre la glutamine et le fructose pour former la désoxyfructosyl-glutamine (DFG) et entre le glutamate et le fructose pour former le désoxyfructosyl-glutamate (DFGA), tandis que *Mas1* réduit ces deux opines en mannopine et acide mannopinique respectivement (Bouchez & Tourneur, 1991).

Le produit du gène *rolB* TR a une activité morphogénique mais n'est pas un homologue fonctionnel de la protéine *rolB* (Lemcke & Schmülling, 1998).

Le gène *aux1* code pour une oxygénase qui catalyse la première étape de la voie de biosynthèse de l'auxine qui est la conversion du tryptophane en indole-3-acétamide. Le gène *aux2* code pour une hydrolase qui catalyse la deuxième étape de la voie de biosynthèse de l'auxine qui est la conversion de l'indole-3-acétamide en acide 3-indoleacétique. La production des régulateurs de croissance endogènes par l'expression de gènes biosynthétiques d'auxine est importante pour la formation de CRs et leur croissance continue. L'expression des gènes biosynthétiques d'auxine dans la plante hôte élimine le besoin d'ajouter des régulateurs de croissance aux milieux utilisés pour la croissance des CRs (Nemoto et *al.*, 2009).

Les outils moléculaires nécessaires à la production de l'ADN-T et à son transfert dans la cellule végétale sont constitués de protéines codées par les gènes de virulence (vir) et de gènes chromosomiques bactériens.



**Figure 7:** Structure du plasmide Ri de *A. rhizogenes* (Lütken et al., 2017)

### 2.2.2. Principales étapes du processus de transformation génétique des plantes par *A. rhizogenes*

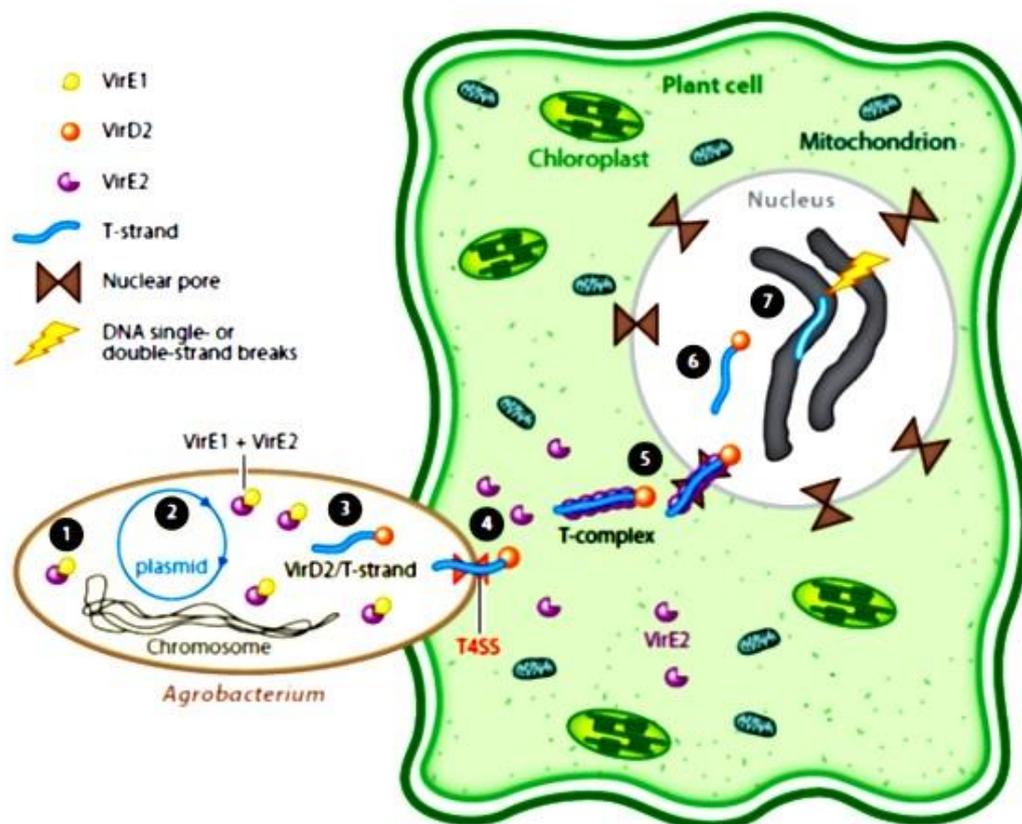
La transformation génétique médiée par *Agrobacterium* est largement utilisée comme technologie de base pour les études génétiques et l'amélioration des plantes. Dans des conditions de laboratoire, presque toutes les plantes peuvent être transformées via cette technologie (Wang et al., 2018).

Le transfert et l'intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule hôte repose sur un ensemble de protéines de virulence codées par les gènes vir du plasmide Ri et leur interaction avec les protéines hôtes (Mauro & Bettini, 2021).

Le processus de transformation génétique d'une cellule végétale par *A. rhizogenes* comporte plusieurs étapes hypothétiques qui sont illustrées dans la figure 8. Les principales étapes sont cités ci-dessous selon la revue systématique de Gelvin (2017) :

1. Les molécules phénoliques et saccharidiques sont détectées par le système de régulation VirA-VirG, ce qui induit les gènes vir à produire les protéines Vir (Winans, 1992).

2. Les protéines VirD1 et VirD2 coupent la région ADN-T au niveau des séquences répétées de bordure.
3. La protéine VirD2 s'attache à l'extrémité 5' d'un brin d'ADN-T d'une manière covalente pour former le complexe VirD2/brinT.
4. Les brins VirD2/T et les protéines Vir sortent de la bactérie à l'aide d'un T4SS. La protéine VirE2 est transportée seule vers la plante malgré qu'elle s'associe à son chaperon VirE1.
5. A l'intérieur du cytoplasme de la cellule végétale, la protéine VirE2 peut s'associer aux brins T. Le complexe T pénètre à l'intérieur du noyau.
6. Une fois arrivée, la protéine VirE2 se dissocie des brins T.
7. Les transgènes T s'intègrent aux chromosomes de la plante, et ils peuvent être exprimer.



**Figure 8:** Principales étapes du processus de la transformation génétique d'une cellule végétale par *Agrobacterium* (Gelvin, 2017)

**T-complex** : complexe VirD2/T-strand/ VirE2 ; **T-DNA**, ADN de transfert ; **T-strand**, ADN de transfert simple brin ; **T4SS**, système de sécrétion de type IV ; **vir**, gène de virulence; **Vir**, protéine de Virulence.

### **2.3. Stratégies d'amélioration des rendements en métabolites secondaires**

Le besoin en nouvelles molécules pharmacologiquement actives, à haute efficacité et à faible toxicité ne cesse d'augmenter. Cependant, leur extraction à partir de sources naturelles ou leur synthèse chimique présente plusieurs enjeux (Heinrich et *al.*, 2021). Par conséquent, les études aujourd'hui sont dirigées vers l'utilisation des biotechnologies telle que l'emploi des CRs (Baek et *al.*, 2020).

Les cultures de CRs présentent des taux de croissance élevés sans avoir besoin des régulateurs de croissance exogènes. Ils sont génétiquement et biochimiquement stables et présentent souvent des capacités de biosynthèse identiques, voire supérieures, pour la production de métabolites secondaires en comparaison avec la plante mère d'origine (Figlan & Makunga, 2017). La stimulation du métabolisme secondaire par les gènes *rolC* et *rolB* est un phénomène bien connu. Ces gènes sont des activateurs potentiels du métabolisme secondaire dans les cellules transformées de plusieurs familles de végétaux telles que la famille des apocynacées, des solanacées, des araliacées, des rubiacées, des vitacées et des rosacées (Akhgari et *al.*, 2015; Bulgakov, 2008).

Actuellement, les recherches sur la production de glycosides cardiaques (Sun et *al.*, 2012), de phytostérols (Mottaki et *al.*, 2019), d'alcaloïdes (Amdoun et *al.*, 2009; Moussous et *al.*, 2018) et de flavonoïdes (Gai et *al.*, 2019) par les CRs ont montré clairement que des systèmes optimisés de culture de CRs peuvent être utilisés pour la production biotechnologique de molécules bioactives.

L'utilisation des CRs pour produire les métabolites secondaires bioactifs présente un faible rendement de production, ce qui conduit à des coûts élevés de production. Il est donc nécessaire d'améliorer la productivité des CRs en termes de métabolites secondaires grâce à différentes stratégies biotechnologiques. Ceci peut être effectué par la sélection des lignées les plus performantes à haut rendement en métabolite d'intérêt, l'application des éliciteurs, et l'optimisation des milieux de culture tels que l'optimisation des taux de sucre, de sel, d'azote, de phosphate mais aussi les conditions de culture tels que la température, l'éclairage, le pH, l'agitation et l'aération (Baek et *al.*, 2020; Benyammi et *al.*, 2016; Chandra & Chandra, 2011; Halder et *al.*, 2018).

D'autres méthodes pour améliorer le rendement des CRs en métabolites sont aussi utilisés telle que le renouvellement des milieux de cultures, l'enrichissement des milieux en nutriments et en précurseurs, l'application des régulateurs de croissance, l'ingénierie

métabolique, la perméabilisation membranaire des CRs pour améliorer la sécrétion des métabolites secondaires et la culture à l'échelle préindustrielle ou industrielle en bioréacteurs. Certaines méthodes peuvent être combinées en un seul traitement pour générer l'effet synergique donnant parfois de meilleurs rendements (Habibi et *al.*, 2018; Halder et *al.*, 2018; Srivastava & Srivastava, 2014). L'addition des éliciteurs au milieu de culture est l'une des techniques privilégiées d'amélioration des rendements en métabolites secondaires.

### **2.3.2. Utilisation des éliciteurs**

Lorsque les plantes et les cellules végétales cultivées *in vitro* sont soumises à des facteurs physiques, chimiques ou microbiens appelés souvent éliciteurs, elles déploient des réponses physiologiques et morphologiques importantes. Un éliciteur peut être défini comme substance introduite en faible concentration dans un système cellulaire vivant. Il est capable d'initier ou d'améliorer la biosynthèse d'un composé spécifique par réponses induites face à un stress quelconque. L'induction de la synthèse accrue des métabolites secondaires par l'élicitation est l'un des mécanismes de survie, d'adaptation et de compétitivité chez les plantes (Halder et *al.*, 2019; Namdeo, 2007).

Les éliciteurs sont efficaces pour induire ou augmenter la production de précieux métabolites secondaires dans les cultures de CRs (Benyammi et *al.*, 2016; Moussous et *al.*, 2018). Ils peuvent affecter la production de métabolites secondaires des plantes en modulant les taux de biosynthèse, d'accumulation et/ou de transit vacuolaire, de renouvellement et aussi de dégradation (Chandra & Chandra, 2011).

L'effet des éliciteurs dépend de la concentration de l'éliciteur, du stade de croissance des cultures de CRs au moment de l'élicitation, de la période de contact entre l'éliciteur et le tissu végétal et de la durée de l'élicitation (Wang & Wu, 2013).

Les éliciteurs sont classés selon leur nature comme éliciteurs abiotiques et éliciteurs biotiques (Rawat et *al.*, 2019), ou selon leur origine comme éliciteurs exogènes et éliciteurs endogènes (Halder et *al.*, 2019).

La figure 9 résume l'ensemble des éliciteurs abiotiques et biotiques utilisées jusqu'aujourd'hui dans les cultures des cellules végétales et de CRs.

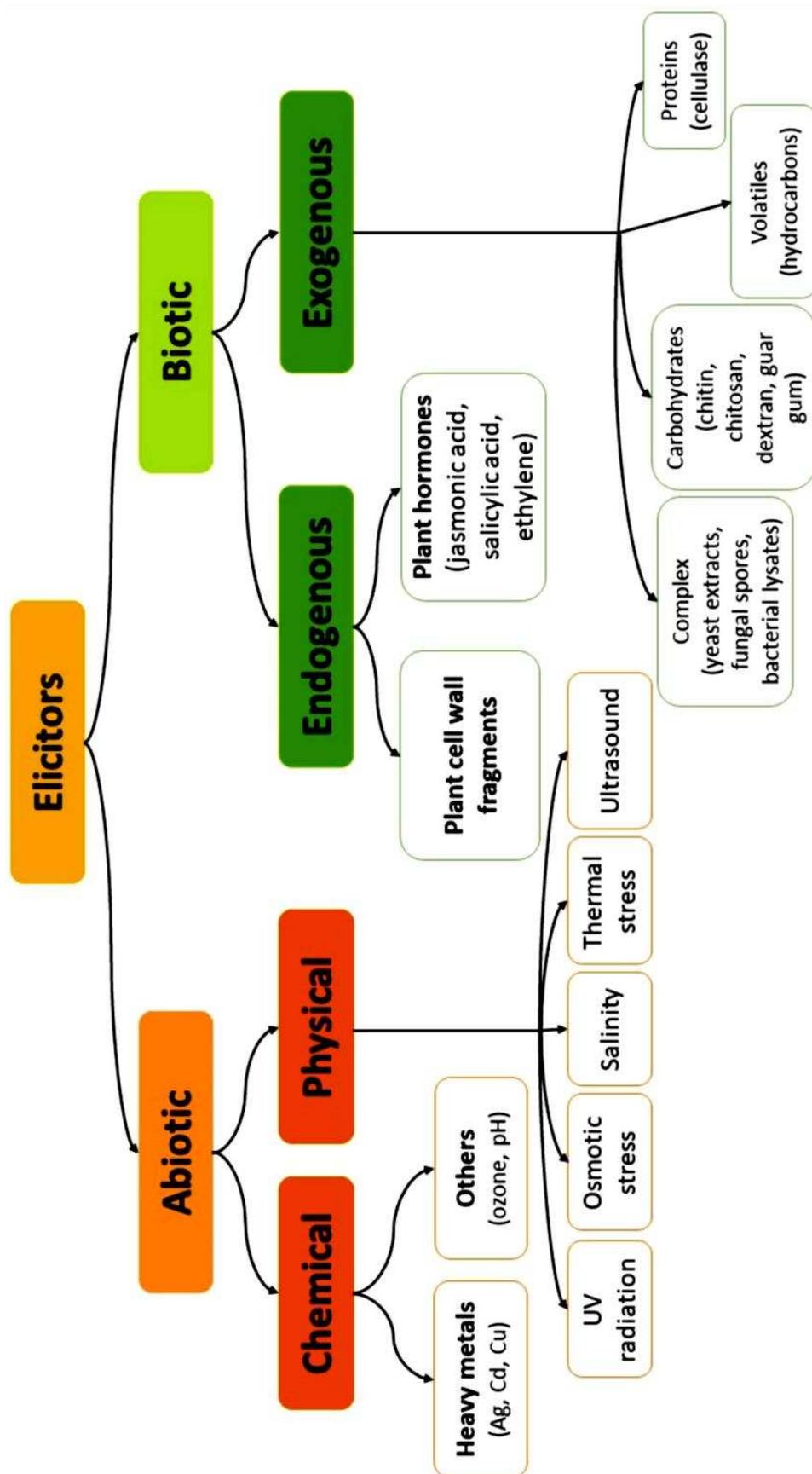


Figure 9 : Différentes catégories d'éliciteurs abiotiques et biotiques (Guru et al., 2021)

### **2.3.2.1. Utilisation des éliciteurs abiotiques**

Les éliciteurs abiotiques peuvent être considérés comme des substances d'origine non biologique, ils peuvent être des composés inorganiques tels que des sels ou des facteurs physiques et parfois des molécules signal (Zhao et *al.*, 2005).

Des études antérieures ont déjà mis en évidence l'utilisation des produits chimiques inorganiques tels que les sels et les ions métalliques (à savoir AgNO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, VOSO<sub>4</sub> et les ions de Zn), de la lumière et des rayons UV, des contraintes mécaniques et aussi des molécules signal pour augmenter la production de molécules bioactives chez les CRs issus de diverses espèces végétales (Ramirez-Estrada et *al.*, 2016; Wongshaya et *al.*, 2020).

### **2.3.2.2. Utilisation des éliciteurs biotiques**

Les éliciteurs biotiques peuvent être des substances d'origine pathogène (éliciteurs exogènes) ou des composés produits par les plantes après l'action de l'agent pathogène (éliciteurs endogènes) (Kim et *al.*, 2001; Souza Silva et *al.*, 2022).

L'application d'éliciteurs biotiques dans les cultures de cellules végétales constitue un excellent système pour améliorer la production de composés secondaires aux propriétés phytoalexiniques (Ramirez-Estrada et *al.*, 2016), ainsi que pour mieux comprendre la régulation de leurs voies de biosynthèse et aussi pour étudier le système de défense des plantes (Verpoorte et *al.*, 2002).

Les éliciteurs biotiques exogènes comprennent les composés libérés par les microorganismes et d'autres agents pathogènes, ou formés suite à l'action des enzymes végétales sur les parois cellulaires microbiennes comme les enzymes microbiennes, les lysats fongiques et bactériens, les extraits de levure, et les polysaccharides des parois cellulaires des microorganismes tels que la chitine et les glucanes (Chamkhi et *al.*, 2021).

Tandis ce que les éliciteurs d'origine endogène englobent les polysaccharides issus de la dégradation de la paroi cellulaire végétale et les protéines intracellulaires et les molécules synthétisées par la cellule végétale en réponse aux différents types d'attaques pathogènes ou face au stress (Doran, 2013; Ramirez-Estrada et *al.*, 2016).

### **3. Profilage phytochimique de *Calotropis procera***

Le terme profilage phytochimique des métabolites chez les plantes désigne les analyses qualitatives et quantitatives de mélanges complexes d'origine physiologique (Sumner et *al.*, 2003). Ces analyses sont très importantes dans l'identification des phytoconstituants aux propriétés médicinales (Yadav & Agarwala, 2011). Ainsi, de nombreuses technologies sont utilisées pour l'analyse phytochimique des plantes afin d'isoler, de purifier et d'analyser les principes actifs, notamment la spectroscopie optique, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse (Sumner et *al.*, 2003).

L'analyse d'échantillons complexes dans des matrices environnementales représente un défi extrême pour les chercheurs car le nombre de composés connus et inconnus est important et dont les propriétés physiques et chimiques variables (Vaye et *al.*, 2022). La sélection de la méthode analytique adéquate à cet égard dépend de plusieurs facteurs tels que la sélectivité et la sensibilité des différentes technologies.

L'analyse des mélanges complexes requière des méthodes de séparation comme la chromatographie gazeuse et liquide pour la sélectivité. La GC/MS et l'UHPLC-QTOF/MS sont des techniques déjà utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative des extraits de différentes parties de *C. procera* (Nadeem et *al.*, 2019; G. Parihar & Balekar, 2016; Waheed et *al.*, 2016).

#### **3.1. Analyse phytochimique qualitative**

L'analyse phytochimique qualitative des extraits végétaux nécessite des techniques avancées comme les différents types de chromatographie pour la détection de l'existence de métabolites secondaires tels que les stérols, les glycosides cardiaques, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les saponines et les tanins (Bhat & Sharma, 2013; Burdziej et *al.*, 2019; Noui et *al.*, 2018; Rajamohan et *al.*, 2014; Ravi et *al.*, 2020) afin de déterminer leur présence au niveau des différents organes et de déterminer leur lieu de biosynthèse.

#### **3.2. Analyse phytochimique quantitative**

L'analyse phytochimique quantitative des extraits végétaux est réalisée par les méthodes de séparation chromatographique couplées aux instruments d'analyse quantitative, avec l'utilisation des composés de référence authentiques qui servent comme standards pour le calibrage de la spectrométrie de masse (Jenner & Brown, 2017).

### 3.3. Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique biophysique importante qui permet la séparation, l'identification et la purification des composants d'un mélange pour une analyse qualitative et quantitative. Les techniques chromatographiques sont basées sur l'interaction des composants du mélange avec les phases mobile et stationnaire du système chromatographique. Cela se traduit par la division des composants du mélange entre les deux phases. De plus, l'interaction des phases mobiles et stationnaires est également importante dans le processus de séparation (Ettre, 2000; Juszczak et *al.*, 2019). La base de la technique de chromatographie comprend trois composants à savoir (Coskun, 2016) :

**Phase stationnaire :** Cette phase est toujours composée d'une phase solide ou une couche d'un liquide adsorbé à la surface d'un support solide.

**Phase mobile :** Cette phase est toujours composée de liquide ou d'un gaz.

**Molécules séparées :** Le type d'interaction entre la phase stationnaire, la phase mobile et les substances contenues dans le mélange est le composant de base efficace pour séparer les molécules les unes des autres.

#### 3.3.1. GC-MS

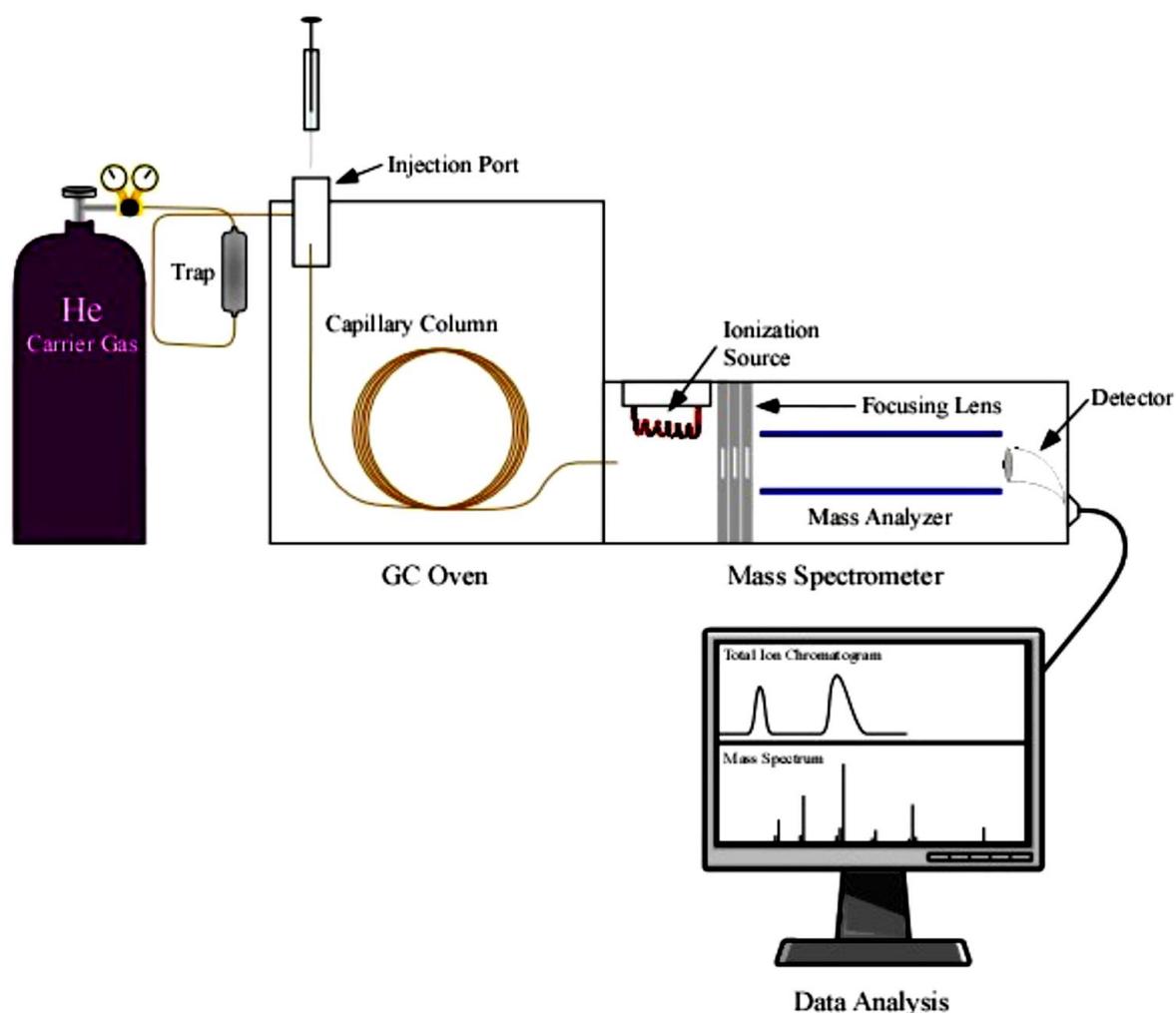
##### 3.3.1.1. Principe et description

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS est considérée comme l'un des outils les plus puissants pour l'identification des composants chimiques volatiles (ou non volatils après leur dérivation) possédant une stabilité thermique dans un mélange complexe. Cela est dû à sa robustesse, son excellente capacité de séparation, sa sélectivité, sa sensibilité et sa reproductibilité (Beale et *al.*, 2018). La GC permet de séparer les différents composants et la spectrométrie de masse permet de les identifier sur la base de différents rapports masse sur charge  $m/z$  d'analytes et de leur ions fragments (Vaye et *al.*, 2022) par référence à des bibliothèques de spectres.

La GC peut séparer les composants volatils des mélanges par migration différentielle à travers une colonne contenant une phase stationnaire liquide ou solide. Les solutés sont transportés à travers la colonne par une phase mobile gazeuse et sont détectés lors de leur élution. Les solutés sont généralement élués par ordre croissant de point d'ébullition, sauf lorsqu'il existe des interactions spécifiques avec la phase stationnaire. Une température allant de 50 à 350° C est généralement utilisée pour éluer les solutés de la manière la plus rapide (Wu et *al.*, 2012).

La GC peut être couplée à divers instruments de détection telles que la GC combinée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la GC combinée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) ou la GC combinée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC-TOF-MS (Nolvachai & Marriott, 2013).

Toute analyse par GC-MS commence par la préparation de l'échantillon, son injection et sa séparation dans colonne GC. Une fois les différentes molécules du composé séparé, on passe à la détection via un spectromètre de masse. Les données obtenues sont enregistrées et analysées pour déterminer la masse et la structure moléculaire afin d'identifier et/ou de quantifier les composants constituant l'échantillon (Lovestead & Urness, 2019). La figure 10 illustre le schéma d'un système de GC-MS.



**Figure 10 :** Schéma d'un système GC-MS (Wu et al., 2012)

### **3.3.1.2. Appareillage**

Les principaux composants d'une chromatographie en phase gazeuse sont un injecteur, une colonne capillaire logée dans un four et un détecteur.

- **Le gaz vecteur (phase mobile)**

La phase mobile ou le gaz vecteur peut être un gaz inerte tel que l'hélium ou l'azote, parvenue d'un cylindre sous pression ou bien d'un générateur. Le choix du gaz vecteur est basé sur l'efficacité, la disponibilité, le coût et la sécurité ainsi que la compatibilité avec le détecteur. Ce gaz a pour fonction principale le transport de l'échantillon à travers la colonne. Il doit être très pure, dépourvu de toute traces d'impuretés qui peuvent nuire à certaines phases stationnaires polaires et abouti donc à la réduction de la sensibilité des détecteurs. Pour conserver une vitesse constante et optimale au gaz vecteur, il est nécessaire de maintenir dans la colonne une pression stable. Ceci assure une analyse plus fiable et augmente la longévité des colonnes (Poole, 2003; Rouessac & Rouessac, 2004).

- **Le système d'injection**

Le système d'injection est le système qui permet d'introduire l'échantillon à analyser qui est déjà dissout dans un solvant organique. Ce système est le plus souvent automatisé pour mieux contrôler les mouvements de la seringue qui introduit l'échantillon et éviter ainsi les différences de manipulation (Rouessac & Rouessac, 2004). La température de l'injecteur doit être supérieure à la température du produit le moins volatile d'environ 20° C. Généralement, un volume très faible est injecté dans la colonne (quelques microlitres) par un injecteur couramment utilisé dit split ou splitless (Humbert & Lhermitte, 2005).

- **La colonne (phase stationnaire)**

La colonne constitue un élément important du chromatographe en phase gazeuse. Elle constitue le facteur clé dans la réussite de la séparation. Il existe deux principaux types de colonnes généralement utilisées en GC, les colonnes remplies et les colonnes tubulaires ouvertes (capillaires). Les colonnes remplies contiennent un matériau de support solide inerte, généralement de la silice recouverte de la phase stationnaire liquide. Aujourd'hui, elles sont remplacées par les colonnes capillaires fabriquées à base de silice fondue, d'acier inoxydable ou de verre. Elles possèdent un pouvoir de résolution supérieur (Poole, 2003).

La taille d'une colonne capillaire est très variable. Une colonne capillaire typique utilisée pour la GC est un tube capillaire d'une longueur de 25 à 150 m et de 0,25 à 0,75 mm

de diamètre, enroulé à base de silice fondue avec un revêtement interne de phase stationnaire (McMaster, 2008).

Il existe une ligne de transfert très chauffée (300° C) qui raccorde la colonne capillaire au spectromètre de masse. Son rôle est d'éviter la recondensation des analytes entre le chromatographe et le spectromètre de masse (Bouchonnet & Libong, 2004).

- **Le four**

Le four est une enceinte thermostatée dont la température peut être programmée jusqu'à environ 450°C et contient une colonne reliée à l'injecteur d'une part et au détecteur d'autre part. Un facteur limitant dans cette programmation est la nature de la phase stationnaire contenue dans les colonnes analytiques. En fait, suivant la nature de la phase stationnaire la stabilité thermique du greffage est distincte. Il est recommandé des températures maximales de 320-350°C pour la phase stationnaire de type apolaire et 200-250°C pour la phase polaire (Humbert & Lhermitte, 2005).

- **Le détecteur**

Le détecteur est l'élément primordial pour l'identification des molécules séparées par le chromatographe. Il repose sur différentes techniques de mesure. Plusieurs types de détecteurs sont utilisés à savoir : Le détecteur à ionisation de flamme, le détecteur thermo-ionique, le détecteur à capture d'électrons et le spectromètre de masse. Ce dernier a pris une ampleur d'utilisation en couplage avec la GC (Lovestead & Urness, 2019).

### **3.3.1.3. Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique dans laquelle les ions gazeux formés à partir des molécules ou des atomes d'un échantillon sont séparés dans l'espace ou dans le temps et détectés en fonction de leur rapport masse sur charge,  $m/z$ . Elle est généralement utilisée pour déterminer les masses de particules, pour déterminer la composition élémentaire d'un échantillon ou d'une molécule et pour élucider les structures chimiques des molécules (Wu et *al.*, 2012).

Dans sa forme originale, la spectrométrie de masse effectue trois fonctions principales, à savoir l'ionisation des molécules, la séparation de ces molécules selon leur rapport masse sur charge, et la détermination de l'abondance respective de chaque ion ainsi produit (Jocelyn Paré & Yaylayan, 1997).

Les nombres d'ions de chaque masse détectée constituent un spectre de masse. Le spectre fournit des informations structurales et souvent une masse moléculaire relative précise à partir de laquelle un composé inconnu peut être identifié ou une structure confirmée (Lovestead & Urness, 2019).

Il existe plusieurs modes d'analyse du spectromètre de masse: (Bouchonnet & Libong, 2004)

- **Analyses en balayage ou « fullscan »**

Le mode balayage ou fullscan est utilisé lors l'enregistrement de tous les spectres de source dont tous les ions formés dans la source sont présents. Ce mode d'analyse permet l'identification instantanée des analytes en faisant recours à des bases de données qui contiennent au préalable des spectres de masse. Au cas où le composé étudié n'est pas répertorié dans les bases de données, l'identification est faite par déduction à partir des ions observés.

- **Analyses en « SIM »**

En mode d'analyse SIM (*Single Ion Monitoring*), le spectromètre de masse est utilisé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques uniquement (1 à 4) des molécules ciblées. Ceci augmente considérablement la sensibilité de détection. La détection dans ce mode est donc sélective et permet d'éliminer le bruit de fond issu des ions indésirables originaires des impuretés de l'échantillon et de la phase stationnaire.

- **Analyses en MS/MS**

Le mode d'analyse MS/MS ou en tandem combine les avantages du mode fullscan et le mode SIM. Elle consiste en premier lieu à isoler un ion caractéristique de l'analyte étudié appelé communément ion précurseur, puis fragmenter cet ion précurseur en ions fragments par collision. A la fin un balayage est effectué.

### **3.3.2. UHPLC-QTOF/MS**

#### **3.3.2.1. Principe et description de l'UHPLC**

Au fil du temps, la performance de la chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (LC-MS) a été significativement améliorée par l'utilisation de la chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) en raison de sa meilleure séparation et de son meilleur débit. L'UHPLC constitue un outil très efficace pour l'identification et la quantification des biomolécules (Denoroy et *al.*, 2013).

Cette méthode d'analyse présente une application plus étendue que la GC puisqu'elle permet l'analyse des substances sous leur forme liquide ou solide soluble. En plus, elle peut être réalisée à basses températures. Elle est donc adéquate pour l'analyse des substances thermolabiles (Ernst et *al.*, 2014).

Le principe de l'UHPLC repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire formée par des particules inférieures à 2,5  $\mu\text{m}$  (alors que les colonnes HPLC sont typiquement remplies de particules de 3 à 5  $\mu\text{m}$ ) et aussi des débits plus élevés. Par conséquent, en utilisant des particules plus petites et des phases mobiles à des vitesses linéaires plus élevées et une instrumentation qui fonctionne à des pressions plus élevées que celles utilisées en HPLC, des augmentations surprenantes de la résolution chromatographique, de la sensibilité et de la vitesse d'analyse peuvent être obtenues. Ceci permet de gagner du temps et de réduire la consommation de solvant (Kaufmann, 2020; Naresh et *al.*, 2014).

#### **3.3.2.2. Détection par l'UHPLC-QTOF/MS**

Afin de détecter et de déterminer la quantité des analytes, il y a recours à la spectrométrie de masse à raison de sa sélectivité (Rathod et *al.*, 2019). Les spectromètres de masse sont tous constitués par quatre composantes principales à savoir (Mellon, 2003) :

- 1/ Une source d'ions, par laquelle les molécules de l'échantillon peuvent être ionisés par différents moyens ;
- 2/ Un analyseur de masse, qui sépare les ions en fonction de leur rapport mass/charge ( $m/z$ ) ;
- 3/ Un détecteur, qui mesure l'abondance des ions séparés sous forme de signal électrique ;
- 4/ Un dispositif d'enregistrement, qui convertit le signal du détecteur en une forme adaptée au traitement ultérieur.

Parmi toutes les techniques d'ionisation en spectrométrie de masse, l'ionisation par électrospray (ESI) est largement utilisée (Rathod et *al.*, 2019). L'emploi des analyseurs de

masse comme le quadripôle (Q) et le tube à temps de vol (TOF, *Time of Flight*) est très répandue dans la détection des analytes d'intérêt tels que les métabolites secondaires synthétisés par les plantes et les CRs (Ha et *al.*, 2016; Zhao et *al.*, 2020).

- **Le quadripôle**

Les analyseurs de masse de type quadripôle sont largement utilisés pour leur facilité d'utilisation, leur coût relativement abordable, leur taille compressée et leur capacité à être adaptés avec les systèmes GC ou LC. Ils sont constitués par quatre tiges métalliques cylindriques parallèles (électrodes) positionnées à une distance égale sur un axe central et chargées par un courant continu. Seuls les ions avec une valeur  $m/z$  sélectionnée sont capables d'atteindre une trajectoire stable, ce qui leur permet d'atteindre le détecteur. Les ions avec d'autres valeurs  $m/z$  ont une trajectoire instable et par conséquent entrent en collision avec les tiges ou sont expulsés radialement de l'analyseur (Thomas, 2019).

- **Le temps de vol (TOF)**

Le temps de vol est un analyseur de masse largement utilisé en métabolomique. Les ions sont séparés selon leur temps d'arrivée dans le détecteur, et il existe des instruments linéaires et/ou réflectroniques (Ernst et *al.*, 2014). Ce type d'analyseurs utilise un champ électrique pour accélérer les ions générés à travers le même potentiel électrique, puis mesure le temps que chaque ion met pour atteindre le détecteur. Si les ions ont tous la même charge, leurs énergies cinétiques seront identiques, et par conséquent, la vitesse de chaque ion ne dépendra que de sa masse. Cela signifie que les ions les plus légers atteignent le détecteur en premier, tandis que les ions les plus lourds prennent plus de temps (Gilhaus, 2005).

La technologie QTOF est de plus en plus utilisée plus spécifiquement pour une analyse ciblée fiable et pour le dépistage d'analytes suspects ou inconnus en raison de sa haute résolution et de la déconvolution précise des spectres de masse. Néanmoins, ces techniques restent encore peu utilisées en analyse phytochimique en raison de leur coût élevé, ce qui les rend inabordables pour la plupart des laboratoires (Vaye et *al.*, 2022).

#### **4. Potentialité nématicide de *C. procera* contre les nématodes phytoparasites**

##### **4.1. Généralités sur les nématodes phytoparasites**

Les nématodes sont d'une valeur écologique et impact économique important. L'incidence économique peut être positive lorsqu'ils sont impliqués dans le contrôle des ravageurs ou des plantes adventices, ou négative lorsqu'ils diminuent la production agricole (Hodda, 2022).

Les nématodes phytoparasites sont des vers microscopiques qui font partie du super-embranchement des animaux Ecdysozoa qui sont caractérisés par la présence d'une cuticule assez résistante qui mue périodiquement au cours du cycle de vie et leur confère une protection contre les agressions extérieures. Ils ont une forme cylindrique et allongée et ne présentent aucun membre ou squelette (Blaxter & Koutsovoulos, 2015; Prot, 1985).

Les nématodes phytoparasites induisent des blessures et des altérations physiologiques des systèmes végétaux. Ils sont aussi connus pour leur capacité à prédisposer les plantes à l'infection par des agents pathogènes secondaires (Reddy, 2021). Certains nématodes phytoparasites sont capables de provoquer des maladies sur de nombreuses cultures économiquement importantes. Ils ont atteint le statut de ravageurs pour une réduction substantielle du rendement des cultures. Les dommages économiques causés par ces nématodes ont été estimés à 80 milliards de dollars US par an (Nicol et al., 2011).

Les 10 genres les plus importants de nématodes phytoparasites au niveau mondial ont été rapportés par Sasser et Freckman en (1987) à savoir : *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus* et *Helicotylenchus*.

Les espèces appartenant au genre *Meloidogyne* (appelées communément nématodes à galles) constituent le groupe de nématodes le plus important du point de vue impact économique puisqu'elles infectent presque tous les types de plantes et causent des dégâts considérables au niveau mondial (Eunice et al., 2013).

##### **4.2. Systématique et morphologie des nématodes à galles**

Les nématodes à galles (ou *Meloidogyne* spp.) appartiennent au phylum Nematoda. Ils constituent plus de 98 espèces (Jones et al., 2013). Leur classification taxonomique préconisée par Karssen et Moens (2006) est la suivante :

Phylum : *Nematoda*

Classe : *Secernentea*

Ordre : *Tylenchida*

Sous ordre : *Tylenchina*

Super famille : *Tylenchoidea*

Famille : *Heteroderidae*

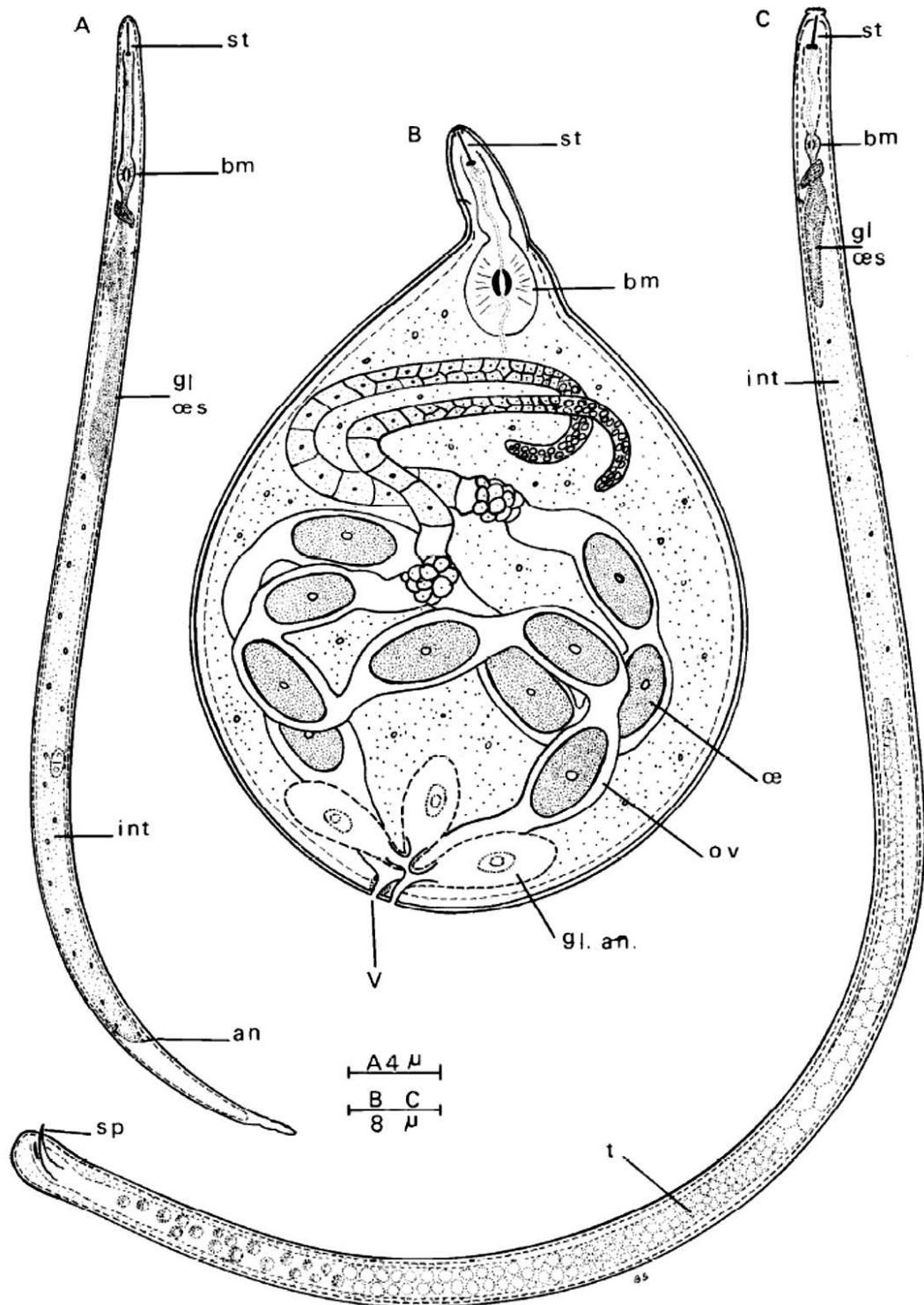
Sous famille : *Meloidogyninae*

Genre : *Meloidogyne*

Les espèces de *Meloidogyne* les plus importantes (parfois appelées les quatre espèces principales) sont les espèces tropicales *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. javanica*, et les espèces tempérées *M. hapla* (Moens et al., 2009).

- **Morphologie des nématodes à galles**

Les *Meloidogyne* sont des endoparasites qui peuvent vivre à l'intérieur de la racine de la plante hôte et qui présentent un dimorphisme sexuel très prononcé (Figure 11). Les larves ont un aspect vermiforme pointues à l'extrémité postérieure. Leur taille varie de 0,3 à 0,5 mm de longueur et d'environ 10 µm de diamètre. Le système digestif occupe la quasi-totalité du corps. A l'extrémité antérieure s'ouvre une bouche, renfermant un stylet creux protractile responsable à la perforation des cellules végétales (De Guiran & Netscher, 1970). Ce dernier est suivi par un canal œsophagien, ensuite l'intestin s'ouvrant à l'extérieur par l'anus. L'œsophage comprend un bulbe musculéux et pourvu d'une valve qui sert à une pompe aspirante et refulante (Cayrol et al., 1992).



**Figure 11 :** Morphologie de *Meloidogyne* sp. (De Guiran & Netscher, 1970)

A : larve de deuxième stade (stade libre) ; B : femelle adulte ; C : mâle adulte ; an. : anus ; bm: bulbe médian de l'œsophage ; gl. an. : glandes anales ; gl. aes. : glande basale de l'œsophage ; int. : intestin ; œ. : œuf ; ov. : ovaire ; sp. : spicules copulateurs ; st. : stylet ; t. : testicules ; v. : vulve.

### **4.3. Biologie et cycle de développement des nématodes à galles**

*Meloidogyne* spp. possèdent six stades de vie : l'œuf, les quatre stades juvéniles (J1-J4), et le stade adulte. Cinq mues séparent les différents stades. La première mue (J1) se produit à l'intérieur de l'œuf. Les œufs regroupés en masses constituent le stade de survie pour les nématodes dans le sol ou même dans les débris racinaires. Les juvéniles de deuxième stade (J2) présentent le stade mobile des nématodes. Ils sont issus à partir de l'éclosion des œufs et vont pénétrer à la plante hôte. Cette phase libre dans la rhizosphère de la plante est courte à raison des faibles réserves énergétiques des J2. Une fois le J2 pique la racine et pénètre, il traverse l'épiderme, le cortex pour arriver jusqu'au cylindre central où il s'installe pour former un site nourricier. L'alimentation du J2 sur les cellules induit la différenciation de ces cellules en cellules nourricières spécialisées, appelées cellules géantes. Une fois qu'une cellule géante est initiée, le nématode devient sédentaire et s'élargit considérablement pour prendre une forme de « boudin ». Durant cette phase sédentaire endophyte, les J2 subissent trois mues pour devenir adultes. Le stade J2 mue en juvénile de troisième stade (J3) après environ 14 jours, puis en juvénile de quatrième stade (J4) et enfin en stade adulte soit comme une femelle piriforme capable de pondre des œufs à l'extérieur de la racine, soit un mâle qui quitte la racine pour atteindre le sol. Les juvéniles J3 et J4 n'ont pas de stylet fonctionnel et ne se nourrissent pas. Les mâles sont vermiformes et ne présentent aucune preuve qu'ils se nourrissent. Ils peuvent apparaître lorsque les conditions sont défavorables au développement des femelles, tel est le cas lorsque la densité des populations est très élevée dans les tissus racinaires et que l'approvisionnement alimentaire est vraisemblablement limité. Selon la température, le cycle de vie peut s'étendre d'un à trois mois. Plusieurs centaines d'œufs peuvent être produits par femelle et regroupés en une seule masse (Moens et al., 2009; Nguyen, 2018).

### **4.4. Lutte contre les nématodes à galles**

Les dommages causés par les nématodes à galles ont une incidence économique très importante à l'échelle mondiale. Il est parfois difficile de les combattre à raison de leur grande variabilité physiologique et de leur grande résistance (Cayrol et al., 1992). Face à ce fléau, plusieurs pratiques de lutte sont utilisées pour faire face à ces ravageurs. Parmi ces méthodes (Reddy, 2021; Sasanelli et al., 2021; Yigezu Wendimu, 2021) :

- **Les méthodes réglementaires :** Grâce aux méthodes réglementaires, il est aujourd'hui possible de garantir que les semences soient exemptes d'infection par les nématodes.
- **Les méthodes physiques :** Sont présentées par le traitement du matériel de plantation à l'eau chaude et par la solarisation du sol.
- **Les méthodes culturales :** La rotation des cultures est l'une des pratiques culturales les plus employées pour gérer les nématodes, en plus des autres méthodes comme les cultures intercalaires.
- **Les méthodes chimiques :** L'utilisation des nématicides d'origine synthétique constitue la méthode la plus efficace. Elle permet d'avoir des différences de croissance et de rendement spectaculaires par le contrôle des nématodes phytoparasites du sol.
- **Les méthodes biologiques :** La lutte contre les nématodes peut être effectuée par l'utilisation de leurs ennemis naturels comme les prédateurs, les parasites, les champignons et les bactéries. De même, par l'application des amendements organiques des plantes nématicides et leurs extraits.
- **Résistance de la plante hôte :** Cette pratique fait appel à l'utilisation des cultivars résistants aux nématodes, ce qui réduira les coûts de production et le recours aux nématicides.

#### **4.5. Nématicide d'origine végétale**

Bien que la lutte chimique contre les nématodes phytoparasites représente la méthode la plus efficace, il est nécessaire de faire recours le plus souvent à d'autres stratégies alternatives respectueuses de l'environnement. Ceci est dû essentiellement à la perturbation de l'équilibre écologique provoquée par les produits synthétiques ainsi que l'accumulation des résidus dans les sols, les nappes phréatique et les denrées alimentaires (Cayrol et *al.*, 1992).

Parmi ces stratégies : l'utilisation des plantes sous forme de poudre (matériel végétal) ou extraits en les incorporant comme amendements du sol ou comme traitement des semences. Il s'agit d'une méthode prometteuse pour faire face aux dégâts causés par les nématodes phytoparasites. Une plante nématicide est une plante qui produise des substances capables à paralyser ou à tuer les nématodes. Les propriétés nématicides de plusieurs espèces végétales sont connues depuis longtemps, certaines ont été testées *in vitro* et *in vivo* à l'aide d'essais en serre et sur le terrain (Makhubu et *al.*, 2021). Farzana et *al.*, (2022) ont montré dans leur étude *in vitro* sur une quinzaine de plantes à savoir : *Allium sativum*, *Annona*

*squamosa*, *Caesalpinia bonduc*, *Capsicum annum*, *Cassia fistula*, *Catharanthus roseus*, *Cleome viscosa*, *Gliricidia sepium*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum*, *Parthenium hysterophorus*, *Piper betel*, *Polyalthia longifolia* et *Tephrosia purpurea* un effet nématocide très appréciable contre des nématodes phytoparasites. Babaali, (2017) a rapporté l'activité nématocide des extraits aqueux et éthanoliques de *Datura stramonium*, *D. innoxia* et *D. tatula* contre *Meloidogyne incognita*. Les métabolites secondaires issus de ces plantes peuvent affecter le développement des nématodes par plusieurs mécanismes comme l'inhibition de l'éclosion des œufs ou la mortalité et la motilité des juvéniles (Sithole et al., 2021).

Actuellement, plusieurs formulations à base de plantes et des dérivés de plantes existent. Elles ont montré une grande efficacité dans la lutte contre les nématodes phytoparasites. L'extrait de l'ail sous forme de granulés ou de suspension est disponible pour usage au semis ou au repiquage (Eder et al., 2021). Un autre produit a été aussi commercialisé à base d'huile de girofle extraite de *Eugenia caryophyllata*. Il a présenté une réduction considérable en termes d'éclosion des œufs (Meyer et al., 2008). De même, des formulations à base des huiles essentielles contenant un mélange de thymol et de géraniol ont enregistré des effets considérables dans ce contexte. Le thymol et le géraniol s'accumulent au niveau des membranes cellulaires et provoquent la modification de leur composition et donc la lyse cellulaire qui aboutit à la libération de substances cellulaires et donc la mort cellulaire (Sasanelli et al., 2021).

#### **4.6. Activité nématocide de *C. procera***

Parmi les différentes plantes antagonistes utilisées à travers le monde pour le contrôle des nématodes : *C. procera*. L'utilisation des différentes parties de cette plante médicinale, telles que les racines, les feuilles, les graines, les fleurs, le latex ou même la plante entière a montré un effet nématocide très notable.

Les feuilles de *C. procera* utilisées comme amendement de sol ou extrait aqueux ont conduit à une réduction appréciable des infections par *Meloidogyne* et ont préservé une bonne croissance des plants de *Abelmoschus esculentus* et de *Solanum lycopersicum*. Plus la concentration est élevée plus le traitement est efficace (Eunice et al., 2013; Hussain et al., 2011; Rao et al., 1996).

L'amendement du sol par les feuilles, les racines, les tiges et les fleurs séchées de *C. procera* inhibe de manière significative la multiplication de *Meloidogyne javanica* et

améliore la croissance des plants d'aubergine. Les feuilles montrent des résultats meilleurs par rapport aux autres parties de la plante (Ahmed et *al.*, 1996).

Jusqu'à présent, plusieurs études ont montré que l'utilisation du matériel végétal de *C. procera* comme amendement ou extrait est responsable de l'élimination ou la réduction des nématodes. La présence de molécules actives à action nématicide au niveau de cette plante peut provoquer donc l'inhibition de l'éclosion et/ou la mort des juvéniles, entraînant un contrôle efficace de ces phytoparasites (Costa & Santos, 2022; Parihar et *al.*, 2011; Reddy, 2021; Singh & Patel, 2015).

# **MATERIEL ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

Cette étude est menée au niveau du laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (LRGB) de l'École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger.

### 1. Matériel végétal et conditions de croissance

#### 1.1. Matériel végétal

Les graines de *C. procera* (Aiton) W.T. Aiton (Figure 12) sont collectées dans la station de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie INRAA (Adrar) (Longitude  $x=w=0^{\circ}18.381'$ , Latitude  $Y=N=27^{\circ}50.718'$ , Altitude  $Z=233$  mètres). Des plants sains de *C. procera* sont utilisés comme source de graines. Les fruits matures sont ouverts et libérés de leurs graines. Les graines non endommagées sont sélectionnées et nettoyées des fibres de soie avant leur utilisation.



**Figure 12** : Photographie de graines de *C. procera*

### **1.1.1. Désinfection des graines**

Les graines de *C. procera* sont désinfectées par une immersion, sous hotte à flux laminaire, dans l'éthanol 70% (v/v) pendant 1 min, suivi d'un trempage pendant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO à 2,6 % de chlore actif). Après la désinfection, les restes de la solution désinfectante sont éliminés au moyen de 3 rinçages successifs de 10 min chacun, avec de l'eau distillée stérile (Khelfi-Slaoui et al., 2005).

### **1.1.2. Test de germination**

Un test de germination pour les graines de *C. procera* est réalisé afin de déterminer leur pouvoir germinatif. Pour ce faire, le milieu solide de Murashige and Skoog (MS) (1962) (Annexe1) est utilisé à cet effet après autoclavage à 120° C pendant 20 min.

Après refroidissement du milieu, le milieu gélosé est versé dans des boîtes de Petri de 9 cm à raison de 20 ml par boîte. Une centaine de graines sont mises à germer dans trois boîtes de Petri. Ces dernières sont scellées avec du parafilm de laboratoire, puis transférées dans la chambre de culture à  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  et dans l'obscurité, pour favoriser la germination. Le nombre de graines germées est compté.

## **1.2. Source de racines et de feuilles naturelles (Essai *in vivo*)**

Cet essai a été réalisé au niveau d'une serre expérimentale attachée au laboratoire de recherche en biotechnologies des productions végétales à l'Université de Blida 1.

Nous avons installé une culture de *C. procera* dans des pots d'une capacité de 3Kg à raison de 2 graines par pot. Un prélèvement après 90 jours de végétation est effectué. Les organes des plants à savoir les racines et les feuilles sont récoltés et séchés dans une étuve à 40°C pour obtenir de la matière sèche qui sera utilisée ultérieurement pour les analyses phytochimiques et l'essai nématocide.

## **1.3. Source d'explants pour l'induction de CRs (Essai *in vitro*)**

Les graines sont placées dans des tubes à essai contenant 20 mL de milieu solide de MS additionné par 7 g/L d'agar et 20 g/L de saccharose. Les vitrosemis sont placés dans la chambre de culture à une température de  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  et une photopériode de 16 heures par jour.

Après 30, 45 et 60 jours dans ces conditions de culture, les hypocotyles, les cotylédons et les feuilles sont excisés des vitrosemis aseptiques et sont utilisés comme explants pour l'induction des CRs.

## **2. Souches bactériennes utilisées et milieu de culture**

Les essais d'induction de CRs chez *C. procera* sont effectués par l'application d'un inoculum bactérien de souches de *A. rhizogenes* ; connues pour leur aptitude à induire des racines transformées à partir de différents tissus et génotypes végétaux (Benyammi et al., 2016). Il s'agit de la souche A4 et la souche ATCC 15834 de *A. rhizogenes*.

### **2.1. Origine des souches bactériennes**

#### **2.1.1. Souche A4 de *A. rhizogenes***

La souche A4 de *A. rhizogenes* est aimablement fournie par le Laboratoire de Valorisation des Ressources Agrobiologiques, Université de Blida 1, Algérie. Elle est originaire de la Californie (États-Unis).

La souche A4 est une souche virulente de *A. rhizogenes* qui comprends trois plasmides: le plasmide a (pArA4a, 180 kb) qui n'est pas nécessaire pour la transformation des plantes, le plasmide b (pRiA4, 250 kb) responsable de l'induction des racines et le plasmide c (pArA4c) qui est une co-intégration du pArA4a et pRiA4 (Jouanin et al., 1986). Cette souche de type agropine transfère deux segments distincts d'ADN-T dans les cellules végétales (Taylor et al., 1985). L'ADN-T de droite (ADN-TR) qui est impliqué dans la biosynthèse de l'auxine et la production d'agropines et l'ADN-T de gauche (ADN-TL) qui contient des gènes *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD*) capables de s'intégrer dans le génome de la plante et sont responsables des changement morphologiques des tissus végétaux transformés à savoir la formation de CRs (White & Nester, 1980; Yasybaeva et al., 2017).

#### **2.1.2. Souche ATCC 15834 de *A. rhizogenes***

La souche ATCC 15834 de *A. rhizogenes* nous est fournie par le laboratoire de biomolécules et biotechnologies végétales, Université de François Rabelais, Tours, France.

C'est une souche typique de type agropine (Nemoto et al., 2009), qui abrite trois grands plasmides : pAr15834a (107 x 10<sup>6</sup> daltons), pAr15834b (154 x 10<sup>6</sup> daltons) et pAr15834c (258 x 10<sup>6</sup> daltons). Les gènes de virulence sont situés sur pAr15834b, tandis que les gènes de sensibilité à l'agrocine 84 sont situés sur pAr15834a. La pathologie induite par les transconjugants virulents ne contenant que pAr15834b est identique à celle produite par la souche sauvage de *A. rhizogenes*. L'analyse des fragments d'endonucléase de restriction des plasmides des transconjugants a révélé que pAr15834c est un cointégrat de pAr15834a et pAr15834b (White & Nester, 1980).

## **2.2. Culture et maintenance des souches bactériennes**

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu solide de Yeast Extract Mannitol (YEM) (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/l, MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0.2g/l, NaCl 0.1g/l, Extrait de levure 0.4g/l, Mannitol 10g/l) (Wise et *al.*, 2006) additionné par 15 g/L d'agar à 28°C à l'obscurité pendant 36 h.

Ces deux souches sont repiquées plusieurs fois sur le milieu gélose YEM dans les mêmes conditions pour les revitaliser et contrôler leur pureté. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

## **2.3. Préparation de l'inoculum bactérien**

Deux colonies bactériennes sont utilisées pour préparer un inoculum bactérien frais. Elles sont ensuite mises à croître dans un milieu liquide de YEM pendant 72h à 100 tr/min à 28°C et à l'obscurité.

La détermination de la croissance bactérienne de l'inoculum préparé est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la densité optique (DO) de la suspension bactérienne à 600 nm. Généralement, un inoculum bactérien ayant une DO<sub>600</sub> de 0,6-0,8 est utilisé pour l'induction de CRs sur les tissus végétaux (Amdoun et *al.*, 2008). L'infection (inoculation) des tissus végétaux de *C. procera*, est réalisée après avoir ajusté la densité de la suspension bactérienne de l'inoculum.

## **3. Initiation des CRs**

### **3.1. Co-culture des bactéries - tissus végétal blessé**

L'étude d'induction de CRs chez *C. procera* est accomplie en 3 essais en fonction de différents facteurs étudiés.

#### **3.1.1. Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs**

Dans cet essai, nous avons cherché à étudier un seul facteur qui est l'effet de l'âge des explants végétaux sur la fréquence d'induction de CRs.

L'induction de CRs est établie par l'infection des hypocotyles issus de vitrosemis de *C. procera* âgés de 30, 45 et 60 jours par la souche A4 de *A. rhizogenes*. Quarante explants sont utilisés pour chaque essai, et chaque essai présente trois répétitions.

Les hypocotyles sont infectés par simple dépôt de l'inoculum bactérien sur la section basale de segments d'hypocotyles d'environ 0,5 cm de longueur à l'aide d'une seringue

stérile et déposés selon une polarité inversée. Ils sont ensuite cultivés sur un milieu solide de MS additionné de 30g/L de saccharose, de 7 g/L d'agar et de 250 mg/L de céfotaxime. La co-culture est effectuée à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  à l'obscurité (Amdoun et *al.*, 2008). Comme témoin, nous avons appliqué du milieu liquide YEM sans bactérie sur les explants.

### **3.1.2. Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs**

Sur la base des résultats obtenus à partir de l'essai 1, nous avons opté pour l'essai 2, où nous avons cherché à étudier un seul facteur qui est l'effet du milieu de co-culture sur la fréquence d'induction des CRs.

L'induction de CRs est établie par l'infection des hypocotyles issus de vitrosemis de *C. procera* âgés de 30 jours par la souche A4 de *A. rhizogenes*. Quarante explants sont utilisés pour chaque essai, et chaque essai présente trois répétitions

Les hypocotyles sont infectés par simple dépôt de l'inoculum bactérien sur la section basale de segments d'hypocotyles d'environ 0,5 cm de longueur à l'aide d'une seringue stérile et déposés selon une polarité inversée. Ils sont ensuite cultivés sur un milieu solide de MS, de  $\frac{1}{2}$  MS, de B5 (Gamborg et *al.*, 1968) (Annexe 1) et de  $\frac{1}{2}$  B5 additionné tous de 30g/L de saccharose, de 7 g/L d'agar et de 250 mg/L de céfotaxime. La co-culture est effectuée à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Comme témoin, nous avons appliqué du milieu liquide YEM sans bactérie sur les explants.

### **3.1.3. Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs**

Sur la base des résultats obtenus à partir des essais 1 et 2, nous avons opté pour un essai qui vise à étudier deux facteurs qui sont l'effet de la nature de l'explant et l'effet de la souche bactérienne.

L'induction de CRs est établie par l'infection des explants issus de vitrosemis de *C. procera* par les souches de A4 ou ATCC 15834 de *A. rhizogenes*. Quarante explants sont utilisés pour chaque essai, et chaque essai présente trois répétitions.

Les explants des hypocotyles sont infectés par simple dépôt de l'inoculum bactérien de l'une des deux souches étudiées sur la section basale de segments d'hypocotyles d'environ 0,5 cm de longueur à l'aide d'une seringue stérile et déposés selon une polarité inversée. Ils sont ensuite cultivés sur un milieu solide de B5 dilué au  $\frac{1}{2}$  additionné de 30g/L

de saccharose, de 7 g/L d'agar et de 250 mg/L de céfotaxime. La co-culture est effectuée à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  à l'obscurité.

Par ailleurs, les explants de cotylédons et de feuilles sont immergés dans l'inoculum bactérien pendant 30 min après blessure à l'aide d'une seringue stérile. Ensuite, ils sont séchés dans des boîtes de Petri stériles tapissées de papier filtre stérile. Ils sont ensuite pré-incubés pour la co-culture à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 48 h sur un milieu  $\frac{1}{2}$  B5 solidifié (Benyammi et al., 2016). Deux jours après, la suspension bactérienne est retirée des explants par élimination, puis suivie d'un lavage à l'eau distillée stérile. Les explants ainsi libérés de la suspension bactérienne sont placés sur du papier filtre stérile afin de les sécher, ils sont ensuite transférés sur un milieu  $\frac{1}{2}$  B5 solidifié additionné de 250 mg/L de céfotaxime en conditions d'asepsie. Ils sont mis à incuber à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  dans des conditions d'obscurité. Du milieu liquide YEM sans bactérie a été appliqué sur les explants servant de témoin.

### **3.2. Détermination du pourcentage d'induction de CRs**

L'apparition des CRs est observée périodiquement pendant cinq semaines pour enregistrer le pourcentage de transformation. Le pourcentage d'induction de CRs (%) est déterminé en comptant le nombre d'explants blessés formant des CRs au site d'infection par rapport au nombre total d'explants blessés utilisés. Le pourcentage d'induction de CRs est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'induction de CRs} = \frac{\text{Nombre d'explants formant des CRs}}{\text{Nombre total d'explants}} \times 100$$

### **3.3. Détermination du nombre moyen de racines par explant**

Le nombre moyen de racines formées par explant est relevé après cinq semaines de culture et de suivi. Le nombre moyen de racines par explant inoculé est obtenu par la division du nombre de toutes les racines obtenues sur le nombre total d'explants ayant formés des racines.

### **3.4. Subculture des CRs en culture**

Les CRs induits sont coupés (5 à 6 cm de longueur) et placés sur un milieu frais semi-solide de  $\frac{1}{2}$  B5 additionné de 4 g/L d'agar et de 250 mg/L de céfotaxime.

Sur le total des lignées de CRs générées, trente lignées racinaires sont choisies en fonction de leur développement, de leur degré de ramification latérale et de l'absence de formation de cals (Amdoun et al., 2008). Les lignées racinaires sont repiquées toutes les

quatre semaines sur un milieu frais identique au précédent. Le niveau de céfotaxime est réduit progressivement puis éliminé après trois passages.

Par la suite, sept lignées racinaires nommées HR1 à HR7 sont sélectionnées sur la base de leur croissance rapide. Les lignées ainsi sélectionnées sont maintenues dans un milieu semi-solide ½ B5 sans céfotaxime pour la suite du travail.

#### **4. Vérification moléculaire de la nature transgénique des CRs induits**

L'intégration de l'ADN-T de *A. rhizogenes* responsable de la formation de CRs est confirmée à l'aide d'un test PCR (Polymerase Chain Reaction) selon le protocole suivant :

L'ADN génomique est extrait des lignées transgéniques putatives et de racines non transgéniques (témoin négatif) de *C. procera* en utilisant un Mini kit NucleoSpin DNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (Annexe 2) selon les instructions du fabricant.

L'ADN plasmidique isolé à partir des cultures de souches de *A. rhizogenes* (A4 et ATCC 15834) est utilisé comme témoin positif ; il est isolé à l'aide d'une Miniprep à lyse alcaline (Annexe 2).

La PCR est réalisée pour amplifier le fragment du gène *rolB* à l'aide d'amorces spécifiques :

- F-5'-GCGACAACGATTCAACCATATCG-3'
- R-5'-TTTACTGCAGCAGGTCTTCATGAC-3'

Chaque réaction PCR est réalisée dans un volume de 20 µL, contenant 2 µL d'ADN, 0,8 µL de chaque amorce spécifique du gène *rolB* (forward et reverse), 2 µL de 10×tampon Taq polymérase, 0,4 µL de mélange dNTP, 0,4 µL de Taq ADN polymérase et 10 µL de H<sub>2</sub>O ultrapure. La PCR est réalisée dans les conditions suivantes : température de dénaturation initiale de 94°C pendant 4 min, suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 57°C pendant 1 min et extension à 72°C pendant 1 min et se termine par une extension finale de 72°C pendant 7 min.

Les résultats de la PCR sont révélés à l'aide d'un marqueur d'ADN (lueur) de 1000 pb en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %). Ce dernier est coloré avec une solution de bromure d'éthidium et examiné sous lumière UV.

## 5. Analyse phytochimique de *C. procera* par GC-MS

Cette partie d'étude est réalisée au niveau du laboratoire de Toxicologie à l'Institut National de Criminalistique et Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC /GN), Bouchaoui, Alger, Algérie.

### 5.1. Profilage chimique (screening)

Des cultures de CRs, âgées de quatre semaines sont récoltées et séchées dans une étuve à 40° jusqu'à stabilité du poids sec. La matière sèche obtenue est broyée en une fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique. Le profilage chimique des CRs est ensuite réalisé par analyse GC-MS sur un système Hewlett Packard HP 5890 Séries II couplé à un détecteur sélectif de masse (MSD) HP 5971A de marque Agilent qui est un analyseur de masse quadripolaire (Figure 13).



**Figure 13 :** Photographie de l'équipement de GC-MS utilisé

#### 5.1.1. Préparation des extraits

Deux grammes de poudre racinaire sont solubilisés dans 10 mL de solvant mixte (Dichlorométhane 20%, Acétonitrile 50%, Ethanol 10%, Hexane 20%).

Le tube contenant l'échantillon est agité à l'aide d'un vortex (vortex VWR) pendant 1 min, puis homogénéisé dans un bain à ultrason (Fisher Scientific) à température ambiante.

L'échantillon est ensuite agité mécaniquement pendant 30 min dans un agitateur rotatif (Heidolph), puis centrifugé pendant 5 min à 3500 tr/min à l'aide d'une centrifugeuse (SIGMA).

Une étape d'évaporation pour éliminer tout liquide résiduel est réalisée dans un évaporateur d'azote (Liebisch) jusqu'au séchage de l'extrait.

500 µL de méthanol (qualité LC-MS) sont ajoutés à l'échantillon puis agité sur un vortex pendant 1 heure. L'échantillon est ensuite homogénéisé dans un bain à ultrasons pendant 20 min et recentrifugé pendant 5 minutes à 3500 tr/min.

Le surnageant est récupéré et filtré à l'aide d'un microfiltre de 45 µm, puis placé dans un microtube pour l'analyse GC-MS.

### **5.1.2. Conditions de la GC-MS**

L'analyse qualitative est réalisée par GC-MS. Un échantillon de 1 µL a est injecté automatiquement en mode splitless. La séparation chromatographique de l'échantillon analysé est réalisée sur une colonne capillaire HP-5MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) dans un gradient de température composé de cinq segments :

La température initiale de la colonne (90°C) est maintenue pendant 0,5 min, augmentée linéairement à raison de 20°C/min à 200°C, puis à 280°C à 15°C/min et enfin à 320°C à raison de 20° C/min, puis maintenu ; le temps de l'analyse de chaque échantillon, à cette température pendant 3,67 min.

L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1 mL/min.

Le spectromètre fonctionne en mode d'ionisation électronique (EI) et l'énergie du faisceau d'électrons est de 70 eV. Les ions positifs ont été analysés. L'acquisition a été réalisée en mode de balayage analytique (Full scan), et tout l'intervalle de masse allant de 38 à 650 uma a été collecté.

### **5.2. Quantification des phytostérols majeurs**

Le profilage chimique des CRs par GC-MS a mis en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires, néanmoins trois phytostérols étaient majoritaires à savoir : le campestérol, le stigmastérol et le β-sitostérol.

Une analyse quantitative des CRs par GC-MS est élaborée afin de quantifier la teneur en phytostérols à partir des CRs, mais aussi à partir de racines et de feuilles issues de plantes

âgés de 90 jours obtenues sous serre et en pots. L'objectif visé est de comparer les variations pouvant exister entre les rendements en phytostérols de la plante entière et les CRs (racines transgéniques).

La matière fraîche de différentes origines est séchée dans une étuve à 40° jusqu'à obtention d'un poids sec constant. La matière sèche obtenue est broyée en une fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique.

### **5.2.1. Préparation des extraits**

Pour la quantification des phytostérols de *C. procera*, nous avons adopté le protocole d'extraction de (Deng et al., 2016) avec quelques modifications.

Une quantité de 500 mg de chaque échantillon est solubilisé dans 25 mL de MeOH/CHCl<sub>3</sub> (4:1, v/v) dans des tubes de 50 mL, puis vortexé et mise sous agitation pendant une heure dans un agitateur rotatif (Heidolph Reax 2). Une fois homogénéisé, l'échantillon est mis dans un bain à ultrason à 70°C pendant 1 h, puis agité pendant 20 min. Nous centrifugeons et nous éliminons le résidu. L'extrait obtenu est évaporé à sec à l'aide d'un Nitrogen évaporateur automatisé (Liebisch) à 70°C. Ensuite, 12,5 mL de CHCl<sub>3</sub> sont ajoutés au résidu avec agitation pendant 20 min. La solution obtenue est lavée trois fois avec 12,5 mL de l'eau ultrapure. Une centrifugation à 2000 tr/min pendant 1 min s'en suit afin d'éliminer toute la phase aqueuse. La fraction soluble dans le CHCl<sub>3</sub> est séchée sous N<sub>2</sub> (gaz), puis re-dissoute dans 2,5 mL de MeOH (qualité LC-MS). L'extrait obtenu est filtré à l'aide d'un microfiltre de 45 µm puis placé dans un microtube pour analyse GC-MS.

### **5.2.2. Conditions de la GC-MS**

Les conditions de l'analyse GC-MS sont les mêmes que celles citées précédemment.

L'analyse quantitative des phytostérols est réalisée en utilisant le mode de détection d'ions sélectionnés (SIM) en sélectionnant les principaux fragments d'ions de chaque composant de phytostérol. La quantification est effectuée à l'aide d'une méthode de standard externe basée sur la courbe d'étalonnage de l'estriol (Figure 14). L'équation linéaire de la courbe d'étalonnage est ( $y = 41731x - 759663$ ), et le coefficient de corrélation est ( $r^2 = 0,9918$ ). La teneur de chaque composé phytostérol est rapportée en microgrammes par gramme de matière sèche végétale.

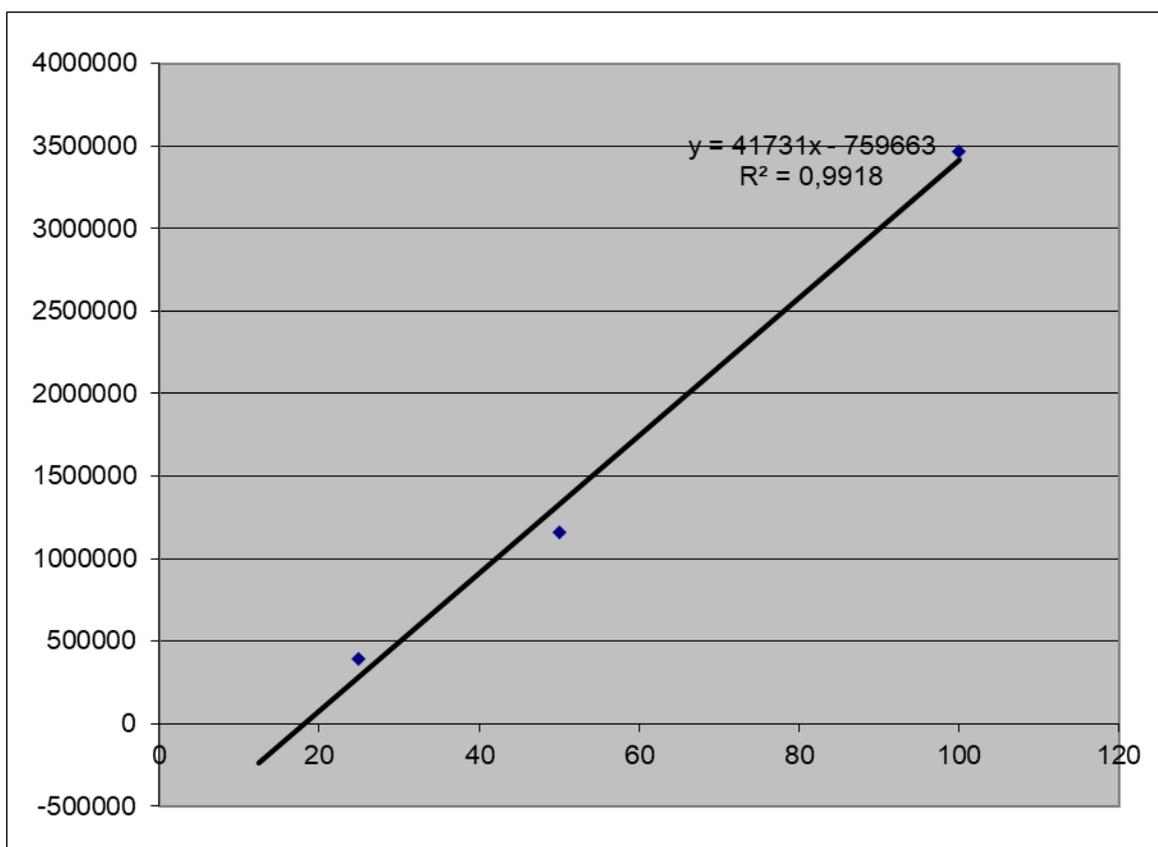


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'estriol (standard)

## 6. Profilage chimique des glycosides cardiaques chez *Calotropis procera* par UHPLC-QTOF/MS

Le profilage chimique des CRs est réalisé par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse quadripôle à temps de vol (QTOF/MS). Le système Waters *ultra-performance liquid chromatography* se composait de deux pompes *binary solvent manager* Acquity™ LC, un échantillonneur automatique *Sample manager* Acquity™ et un gestionnaire de colonne Acquity™. Les données de spectrométrie sont acquises sur un instrument XEVO G2XS QTOF (Waters) contrôlé par le logiciel UNIFY (Figure 15).



**Figure 15 :** Photographie d'équipement UHPLC-QTOF/MS

### **6.1. Préparation des extraits**

Des cultures de CRs âgées de quatre semaines sont récoltées et séchées dans une étuve à 40° jusqu'à stabilité du poids sec. La matière sèche obtenue est broyée en une fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique.

L'extraction des glycosides cardiaques est élaborée selon la méthode décrite par (Pandey et *al.*, 2016) avec quelques modifications. Une quantité de 500 mg d'échantillon est dissoute dans 10 mL d'éthanol absolu et laissée sous agitation mécanique pendant 48h. Le mélange est centrifugé (centrifugeuse Sigma) à 3500 tr/m pendant 1 min. Ensuite, le surnageant est récupéré et évaporé sous Nitrogen évaporateur (Liebisch). Un volume de 5 mL de MeOH (qualité LC-MS) est ajouté au résidu. La solution obtenue est mélangée par vortex (VWR), passé à un bain ultrason (Fisher Scientific) pendant 5 min à 40°C puis filtrée à l'aide d'un microfiltre à seringue stérile de 45 µm pour l'analyse par UHPLC-QTOF/MS.

## **6.2. Analyse par UHPLC-QTOF/MS**

### **6.2.1. Conditions chromatographiques**

La séparation analytique est faite à l'aide d'une colonne ACQUITY HSS C18 (150 x 2 mm, 1.8 µm) (Waters). Une température du four de 50°C et phase mobile contenant du tampon de formiate d'ammonium 5mM. pH 3 (A2) et acétonitrile dans l'acide formique 1% (B2) ; un débit de 0.4 mL/min est utilisé. La concentration initiale de la phase mobile B2 (3 %) est maintenue jusqu'à 0.5 min, augmentée à 40 % à 25 min, ensuite à 100 % à 26 min, et maintenue jusqu'à 30 min.

### **6.2.2. Spectrométrie de masse**

Les conditions de spectrométrie de masse sont les suivantes : interface, ionisation électro-spray positive (ESI+) ; température de la source 140°C ; tension de pulvérisation ionique 20V.

Les conditions pour le mode de balayage du spectromètre de masse à temps de vol (TOF MS<sup>e</sup>) sont les suivantes : un intervalle d'analyse de 100-1000 m/z pour la fonction 1, et de 50-1000 m/z avec une rampe d'énergie de collision de 10-40 eV pour la fonction 2.

## **7. Sélection des lignées racinaires performante pour la production des métabolites secondaires cibles**

Des racines (0,05g) issues de lignées transformées cultivées sur milieu ½ B5 semi-solide sont excisées et transférées individuellement à 50 mL de milieu ½ B5 liquide supplémenté de 3% (p/v) de saccharose (pH=5.7) dans des erlenmeyers d'une capacité de 250 mL. Les racines sont cultivées à 26°C à l'obscurité avec agitation rotative à 100 tr/min.

Les flacons, en triple répétition, sont récoltés après une phase de croissance de 20 jours. Les racines sont rincées à l'eau distillée, transférées sur papier filtre et déterminées en poids frais (PF).

La détermination de l'indice de croissance (IC) des différentes lignées racinaires est calculé suivant la formule :

$$IC = \frac{\text{Poids frais final} - \text{Poids frais initial}}{\text{Poids frais initial}}$$

La sélection des lignées racinaires performantes est réalisée non seulement sur la base de l'IC mais aussi en fonction de leur teneur en phytostérols (Voir section 5.2.).

## **8. Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée et sa production en phytostérols**

La cinétique de croissance de la lignée racinaire déjà sélectionnée est établie pour une période de culture de 35 jours. Environ 0,05 g de racines sont cultivées dans différents erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu  $\frac{1}{2}$  B5 liquide additionné de 3% (p/v) de saccharose et ajusté à pH = 5,7 avant autoclavage.

Les cultures sont incubées dans des chambres de culture à l'obscurité à  $26 \pm 1$  °C sur un incubateur rotatif à agitation (100 tr/min).

Tous les 2 à 3 jours, les CRs sont récoltés, rincés rapidement avec de l'eau distillée, séchés avec du papier filtre.

Le poids sec des racines est enregistré après séchage dans une étuve à air chaud à 40°C (24-72 h) jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le poids sec moyen de la lignée racinaire sélectionnée est déterminé à partir de trois erlenmeyers différents.

Sur les 35 jours de culture, les racines ainsi séchées sont utilisées pour déterminer leur teneur en phytostérols (Voir section 5.2.).

## **9. Etude de l'activité nématocide de *Calotropis procera***

Cette étude est effectuée au niveau du laboratoire de phytopharmacie et protection des végétaux à l'Université Blida 1. Elle vise à évaluer le potentiel nématocide *in vitro* des extraits aqueux de CRs, de racines et de feuilles naturelles de *C. procera* sur les Larves L2 des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp.

### **9.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des CRs des sept lignées déjà sélectionnées de *C. procera* récoltées après 20 jours de culture sur milieu  $\frac{1}{2}$  B5 additionné de 30 g/L de saccharose. Mais, aussi les racines et les feuilles naturelles issues de plants de *C. procera* âgés de 90 jours cultivés en pots sous serre.

Le matériel végétal de différentes origines est mis à sécher, après récolte, dans une étuve à 40°C jusqu'à la stabilité du poids sec. La matière sèche ainsi obtenue est broyée en poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique. Elle est ensuite récupérée et conservée dans des tubes en verre stériles pour être utilisée dans la préparation des extraits aqueux.

## **9.2. Préparation de l'extrait aqueux**

Les extraits aqueux dédiés pour l'étude de l'activité nématocide sont préparés par simple macération aqueuse afin de libérer leurs molécules actives. La matière sèche (2,5 g) de chaque échantillon (matériel végétal de différentes origines) est mélangée avec 25 mL d'eau distillée stérile et mise sous agitation à l'aide d'un agitateur vertical pendant 72h. Les extraits récupérés sont filtrés par papier Wattman (N°1) et conservés à l'abri de la lumière à 4°C.

## **9.3. Préparation de la gamme de concentration**

Afin d'évaluer l'activité nématocide de *C. procera* sur les larves de nématodes à galle du genre *Meloidogyne*. Une gamme de concentration est préparée.

Les extraits aqueux purs (P) des sept lignées CRs, des racines et des feuilles naturelles sont dilués au  $\frac{1}{2}$  et au  $\frac{1}{4}$  par l'ajout de l'eau distillée stérile pour préparer la dilution P/2 et P/4 respectivement.

## **9.4. Extraction et préparation des larves (L2) de *Meloidogyne* spp.**

Les larves (L2) de *Meloidogyne* spp. sont extraites à partir de racines de tomate (*Solanum lycopersicum*) infestées par les nématodes à galles *Meloidogyne* spp. collectées de la région de Gouraya, Tipaza, Algérie, et ce, après l'apparition de galles formées de masses d'œufs sur les racines de tomate.

Les racines infestées sont lavées soigneusement à l'eau courante afin d'éliminer le sol adhérent. Elles sont ensuite mises dans un cristalliseur en verre durant 24h dans le but de faciliter la libération des masses d'œufs.

Les racines déjà trempées dans le cristalliseur, sont mises dans des boîtes de Petri et destinées à l'observation sous loupe binoculaire (Grossissement  $\times 10$ ) et (Grossissement  $\times 25$ ) afin d'extraire les masses d'œufs. Ces dernières, sont extraites par la méthode de forceps à l'aide des aiguilles entomologiques stériles (Nebih Hadj-Sadouk & Charif, 2019).

Une fois extraites, les masses d'œufs sont mises dans des éclosoirs (rondelle PVC doté d'un tamis de 100  $\mu\text{m}$  de maille à la base) contenant environ 20 masses chacun. Les éclosoirs sont mis dans des boîtes de Petri remplies d'eau distillée stérile. Elles sont mises dans une étuve à 25°C pendant 24h à 48h pour favoriser l'éclosion massive.

L'eau contenant les larves libérées progressivement, est récupérée quotidiennement. Les larves sont comptées sous loupe binoculaire (G  $\times 25$ , G  $\times 40$ ). A l'aide d'une micro-

seringue, les larves sont aspirées afin d'être utilisées dans le test *in vitro* de l'effet nématocide de *C. procera*.

#### **9.5. Test *in vitro* de l'efficacité nématocide de *C. procera* sur les larves L2 de *Meloidogyne* spp.**

Le test *in vitro* de l'efficacité nématocide de *C. procera* est effectué dans des microplaques de culture cellulaire à 12 puits. Dans chaque puit un nombre de 30 larves de deuxième stade sont mises en solution dans 50 µL d'eau distillée stérile. Un volume de 1 mL de chaque extrait aqueux (P) et sa dilution (P/2 et P/4) issu de différentes origines (CRs, racines et feuilles naturelles) est additionné dans chaque puit. Un volume de 1 mL d'eau distillée stérile est utilisé comme témoin négatif. Chaque essai est répété quatre fois.

Le potentiel nématocide *in vitro* des extraits aqueux de *C. procera* sur les larves L2 des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* est évalué par comptage de nématodes morts après 24h, 48h et 72h d'incubation.

$$\% \text{ de mortalité} = \frac{\text{Nombre de larves immobiles}}{\text{Nombre total des larves}} \times 100$$

L'effet choc (après 6h de contact) est observé pour évaluer un éventuel effet nématocide élevé.

#### **9.6. Test de revitalisation des larves L2 de *Meloidogyne* spp.**

Afin d'évaluer l'effet irréversible des différents extraits utilisés après 72h, un test de revitalisation est effectué. Les larves sont lavées trois fois à l'eau distillée stérile dans les puits de microplaques pour éliminer les traitements appliqués. Ensuite, les microplaques sont remises à l'étuve à 25°C pendant 24h en vue de leur revitalisation. Le pourcentage de revitalisation est estimé alors par comptage de larves revitalisées.

### **10. Analyse statistique**

Toutes les données de l'ensemble des résultats obtenus sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SPSS statistics d'IBM (Version 20.0).

L'analyse de la variance est effectuée pour calculer la signification statistique des traitements appliqués, et les moyennes ± écart-type sont calculées à l'aide du test de Newman-Keuls au niveau  $\alpha = 0,05$ .

## **RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

## 1. Obtention du matériel végétal

### 1.1. Obtention de racines et de feuilles naturelles (Essai *in vivo*)

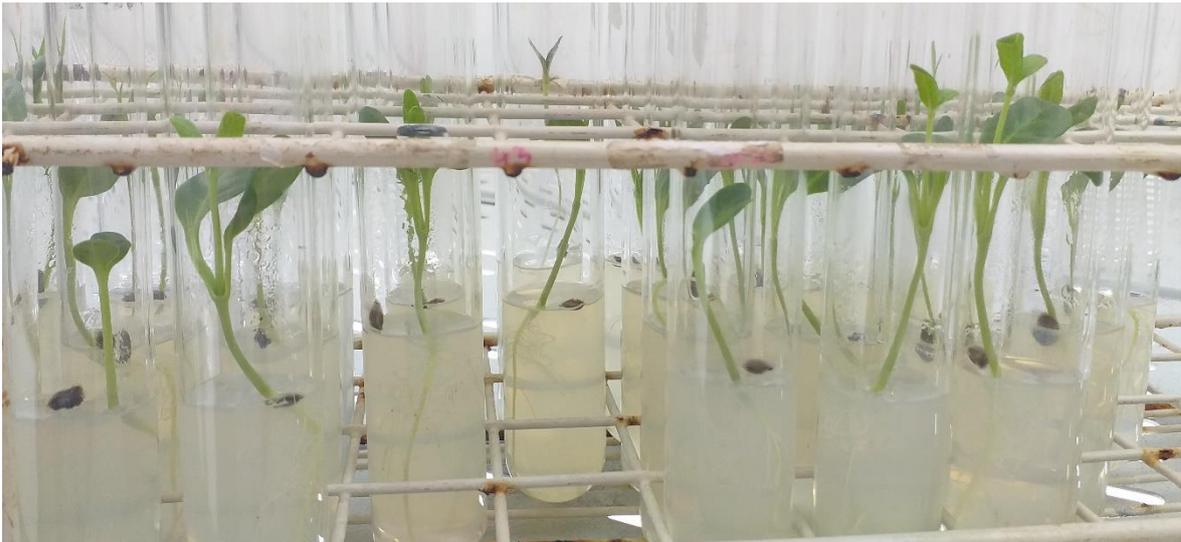
La culture installée au niveau de la serre expérimentale (Serre en polycarbonate semi-contrôlée : l'aération est assurée par des fenêtres placées latéralement de part et d'autre de la serre. Des radiateurs sont présents afin d'assurer une température optimale durant les périodes froides) a donné naissance à des plants de *C. procera* (Figure 16) portant des feuilles opposées de couleur gris-vert, et dégageant un latex blanc après coupure de n'importe quel organe. Le matériel végétal issu de ces plants après 90 jours de culture a servi pour les analyses phytochimiques ainsi que pour l'évaluation de l'activité nématocide.



**Figure 16 :** Plants de *C. procera* obtenus en serre

### 1.2. Obtention de vitrosemis pour l'induction de CRs (Essai *in vitro*)

Les graines de *C. procera* placées dans des tubes à essai contenant 20 mL de milieu MS solide ont abouti à la formation de vitrosemis (Figure 17) qui ont été utilisés pour prélever les différents types d'explants à savoir les fragments des hypocotyles, des cotylédons et de feuilles.



**Figure 17 :** Aspect de vitrosemis de *C. procera* obtenus *in vitro*

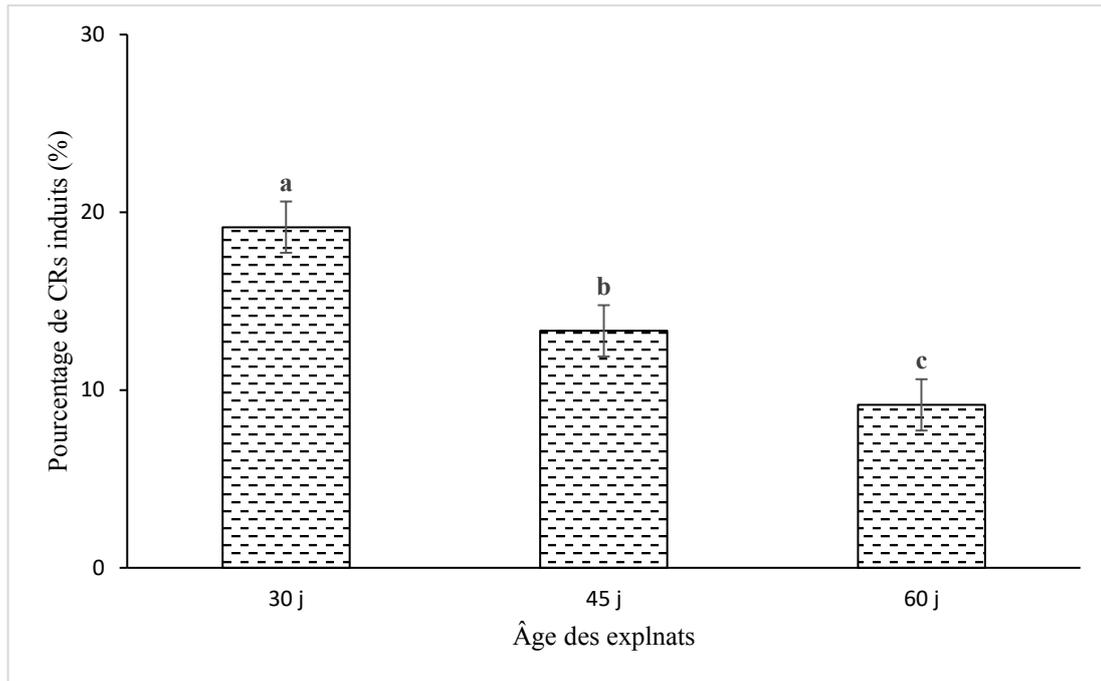
## **2. Initiation des CRs**

Le but de cette étude a été d'établir pour la première fois des CRs de *C. procera*. L'observation CRs a été poursuivie durant cinq semaines après leur induction par A4 et ATCC 15834. Durant cette période, toute racine apparue sur explant (hypocotyle, cotylédon, feuille) traité est considérée comme racine transformée via *A. rhizogenes*. Les résultats sont exprimés par l'émergence directe des racines aux endroits blessés et infectés des explants. Les explants témoins non traités n'ont manifesté aucune racine *in vitro*.

Par ailleurs, le pourcentage d'induction de CRs a été évalué en fonction de l'âge des explants, de la composition du milieu de co-culture, de la souche bactérienne et de la nature des explants.

### **2.1. Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera***

Le pourcentage d'induction de CRs le plus important chez les explants d'hypocotyles de *C. procera* montrent est obtenu par l'utilisation des explants âgés de 30 j (19,17%), suivi par les explants âgés de 45 j (13,33%) et en dernier, ceux de 60 j (9,17%).



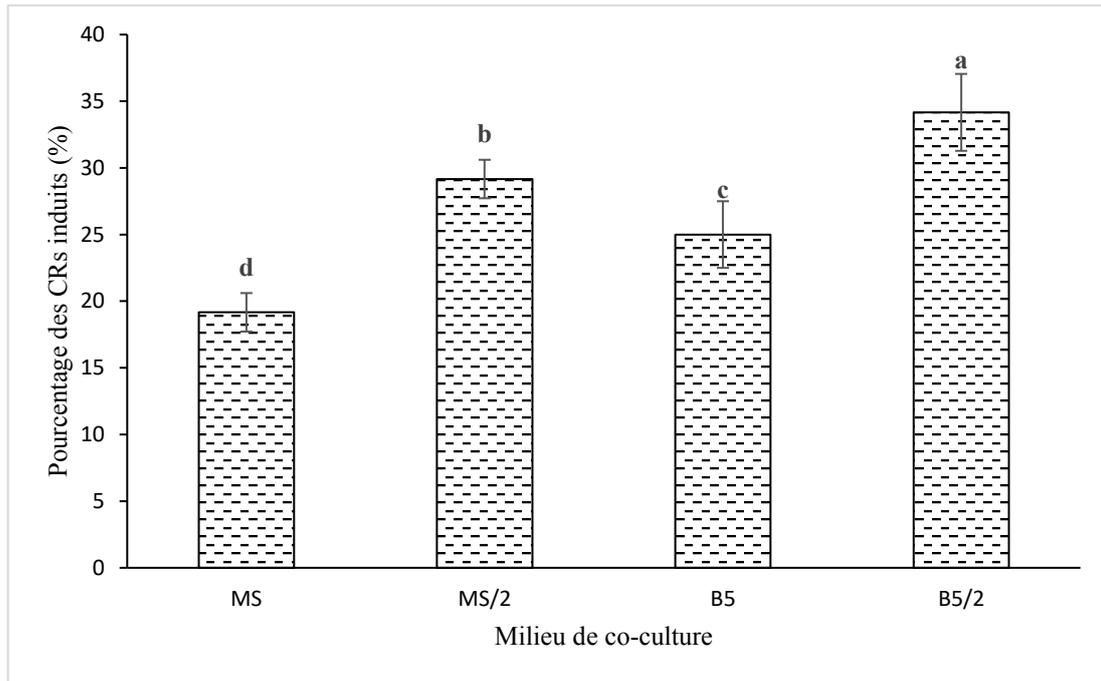
**Figure 18 :** Effet de l'âge des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera*

Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les lettres sur le graphique représentent les groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5\%$

## 2.2. Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera*

L'évaluation du pourcentage d'induction de CRs a permis de constater un effet significatif d'induction sur les milieux de co-culture étudiés (Figure 19).

Le test de l'ANOVA montre effet significatif du milieu de co-culture induit sur le pourcentage d'induction de CRs (Annexe 3). Le pourcentage le plus élevé est donné par l'utilisation du milieu  $\frac{1}{2}$  B5 (34,17%). Des pourcentages plus faibles ont été enregistré sur les milieux  $\frac{1}{2}$  MS (29,17%), du milieu B5 (25%), et MS (19,17%).

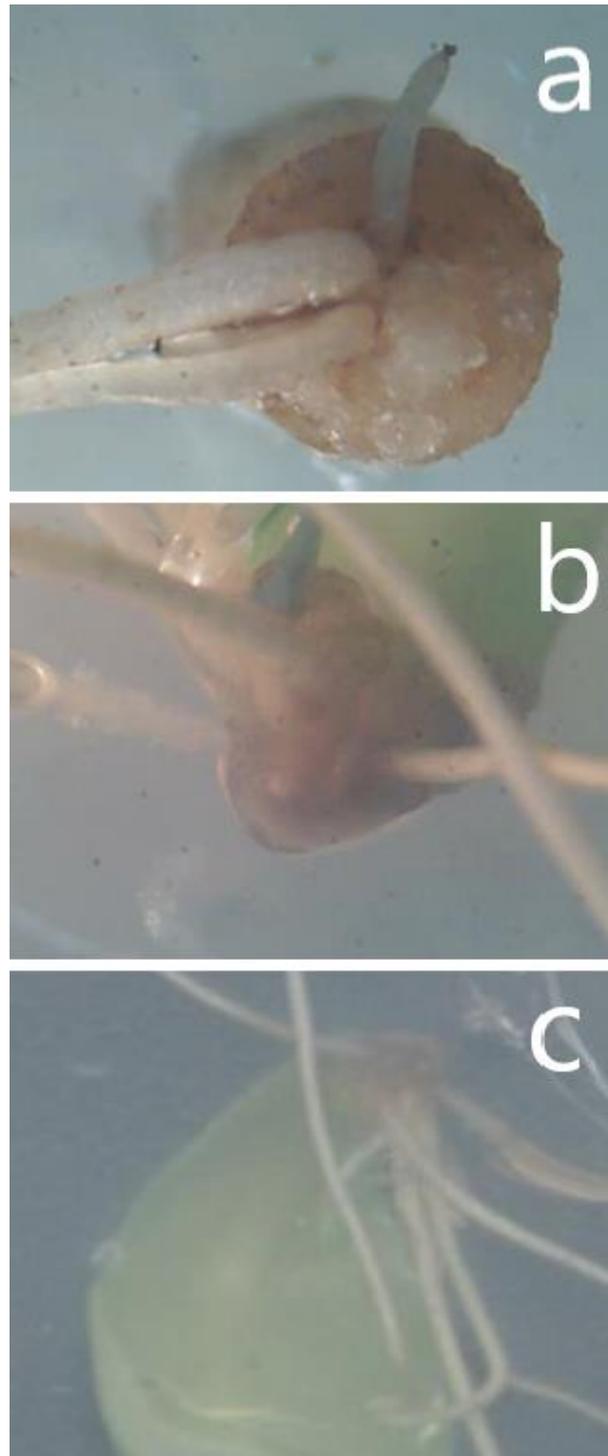


**Figure 19 :** Effet du milieu de co-culture sur le pourcentage d'induction des CRs de *C. procera*

Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les lettres sur le graphique représentent les groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5\%$

### 2.3. Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera*

Sur la base des expériences précédentes, l'effet des différentes souches de *A. rhizogenes* et le type d'explant sur le pourcentage d'induction de CRS a été étudié. Après deux semaines de culture, les racines induites commencent à émerger à partir des sites blessés des explants traités (Figure 20).



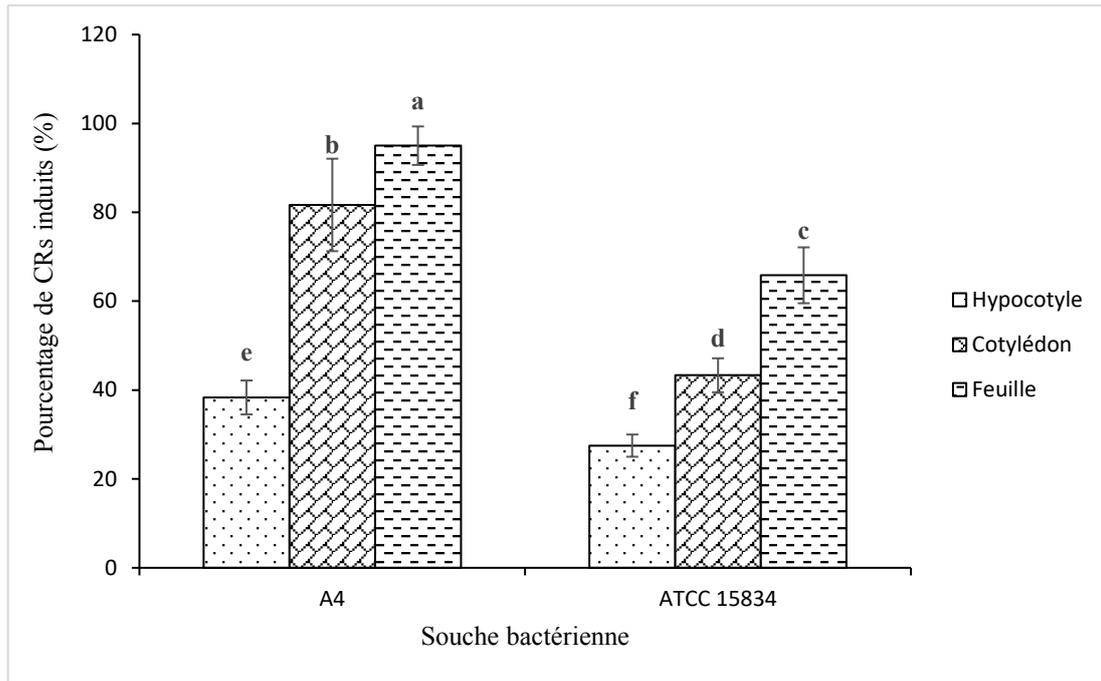
**Figure 20 :** Racines induites au niveau des sites d'infection par *A. rhizogenes* à partir d'hypocotyles (a), de cotylédons (b) et de feuilles (c)

L'estimation du pourcentage d'induction de CRs, montre une variation selon la souche bactérienne appliquée et le type d'explant utilisé (Figure 21). En effet, l'utilisation de différentes souches d'*A. rhizogenes* a un effet significatif sur le pourcentage d'induction de CRs d'après l'ANOVA (Annexe 3).

La souche A4 est la plus efficace pour induire des CRs de *C. procera* chez tous les types d'explant expérimentés. Un pourcentage maximum d'induction de 95% a été enregistré après cinq semaines d'incubation chez les explants de feuilles, suivie de 81,67 % chez les explants de cotylédons et de 38,33 % chez les explants d'hypocotyles. La souche ATCC 15834 a pu induire des CRs aux sites infectés, mais à une fréquence inférieure à celle de la souche A4 (65,83%, 43,33% et 27,50%) respectivement chez les explants de feuilles, de cotylédons et d'hypocotyles.

En outre, l'utilisation de différents types d'explant révèle un effet significatif d'après le test de l'ANOVA (Annexe 3) sur le pourcentage d'induction de CRs. Les explants de feuilles se sont avérés les plus favorables pour induire des CRs à partir de sites blessés (95% et 65,83) traités par les souches A4 e ATCC 15834 respectivement par rapport aux explants de cotylédons et d'hypocotyles.

Le test de l'ANOVA montre également une interaction souche bactérienne-explant significative (Annexe 3) sur le pourcentage d'induction de CRs. La combinaison de la souche A4 et les explants de feuilles donne la fréquence la plus élevée pour induire des CRs chez *C. procera*.



**Figure 21** : Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera*

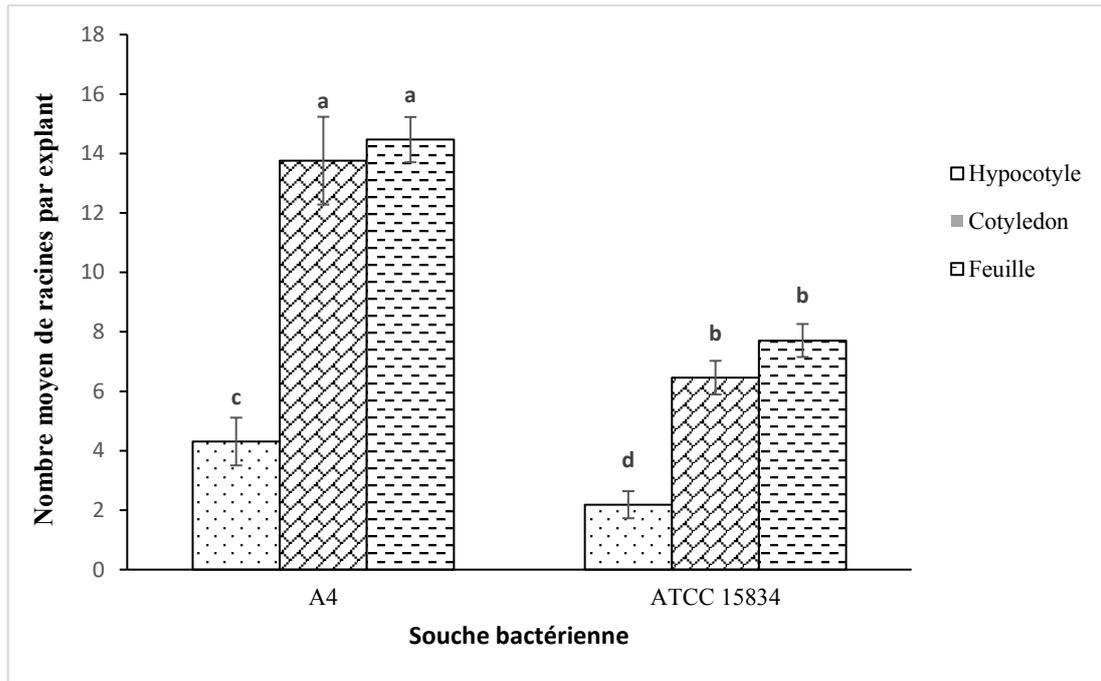
Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les lettres sur le graphique représentent les groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5\%$

#### 2.4. Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le nombre moyen de CRs par explant chez *C. procera*

L'analyse de la variance du nombre moyen de racines induites montre un effet significatif (Annexe 3) de la souche bactérienne appliquée, où la souche A4 de *A. rhizogenes* s'est montrée plus efficace par rapport à la souche ATCC 15834.

Ce même test révèle aussi un effet significatif du type d'explants utilisés. Le test Post-hoc de Newman-Keuls au seuil  $\alpha$  de 0,05 (Annexe 3) montre que les explants de cotylédons et de feuilles appartiennent au même groupe homogène à l'opposé des explants d'hypocotyles qui appartiennent à un groupe différent et inférieur.

Le nombre moyen de CRs induits le plus appréciable est obtenu avec la souche A4 sur des explants de feuilles et de cotylédons (14,47 et 13,76 respectivement) (Figure 22).



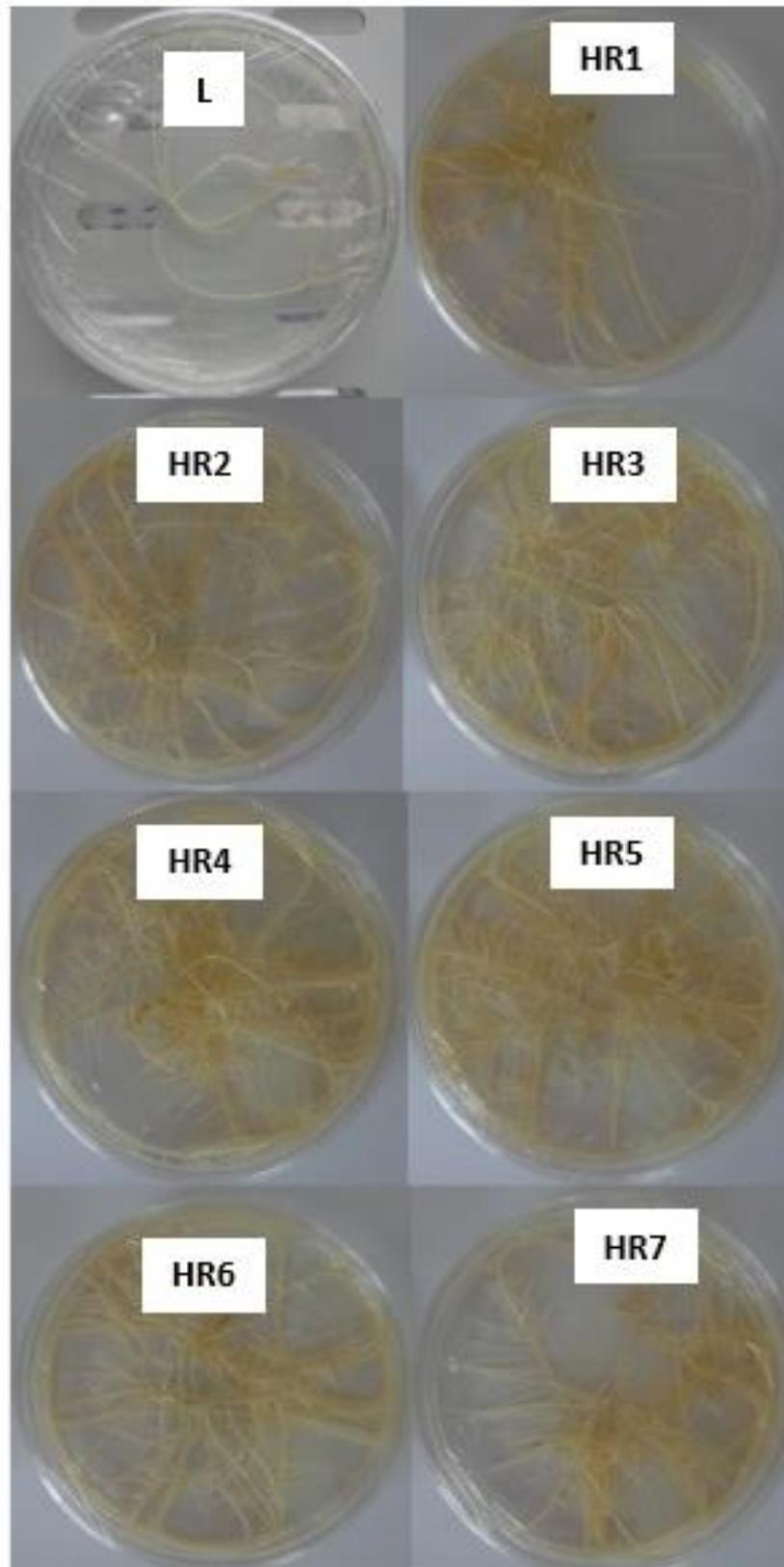
**Figure 22 :** Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants sur le nombre moyen de racines induites par explant chez *C. procera*

Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Les lettres sur le graphique représentent les groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5\%$

### 3. Subculture et multiplications des CRs transgéniques

Les CRs de *C. procera* sont excisés et cultivés sur le milieu  $\frac{1}{2}$  B5 contenant de la céfotaxime afin d'éliminer la bactérie de *A. rhizogenes*.

Sur l'ensemble des CRs obtenus (2114 lignées), certains d'entre -eux ont présenté une faible croissance (Figure 23) ou parfois la formation de cals. Alors que trente lignées de ces CRs ont montré une croissance notable et qui ne présentent pas de cals. Ces dernières ont été transférées au moins trois fois sur milieu frais dont la concentration de la céfotaxime est réduite progressivement jusqu'à que les racines soient exemptes de la présence bactérienne. A partir de ces lignées, sept d'entre elles ont été sélectionnées vu leur croissance rapide et leur degré de ramification latérale important. Elles sont ensuite multipliées sur le milieu  $\frac{1}{2}$  B5 dépourvu d'hormones (Figure 23).

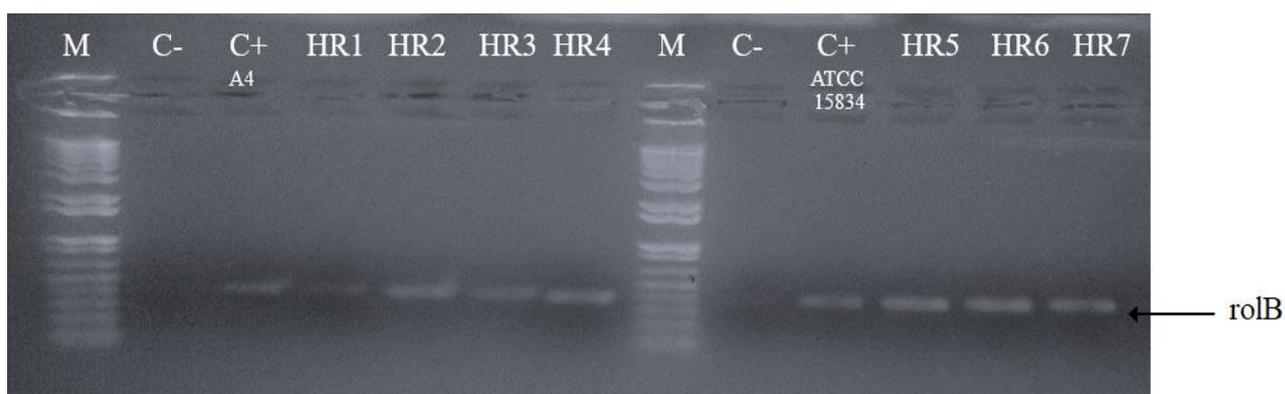


**Figure 23** : Aspect morphologique de lignées racinaires issus de la transformation de *C. procerus* par *A. rhizogenes*

L : Lignée racinaire non sélectionnée ; HR1-HR7 : Lignées racinaires sélectionnées

#### 4. Confirmation par PCR de la nature transgénique des CRs

Afin de confirmer l'intégration de l'ADN-T du plasmide Ri de *A. rhizogenes* dans l'ADN génomique des CRs (lignées racinaires sélectionnées), l'amplification par PCR a été réalisée à l'aide d'amorces directes et inverses du gène *rolB*. L'ADN des racines issues de l'infection par *A. rhizogenes* et celui des racines naturelles de *C. Procera* (issues directement de la germination des graines) ont été extraits et purifiés. Le fragment du gène *rolB* n'a été observé que dans l'ADN amplifié des sept lignées de CRs sélectionnées (Figure 24). Aucun fragment du gène *rolB* n'a été détecté pour les racines naturelles utilisées comme témoin négatif (Figure 24). Les fragments correspondant au gène *rolB* ont également été amplifiés chez l'ADN plasmidique des deux souches de *A. rhizogenes* (A4 et ATCC 15834) utilisées comme contrôle positif (Figure 24). Ces résultats confirment la nature transgénique des sept lignées de CRs sélectionnées.



**Figure 24** : Analyse moléculaire des CRs (Amplification par PCR du gène *rolB*)

HR1-HR7 : Lignées racinaires transformées de *C. procera* ; M : Marqueur de taille moléculaire ; C- : Contrôle négatif (Racines naturelles issues de la germination des graines) ; C+A4 et C+ ATCC 15834 : Contrôle positif des souches A4 et ATCC 15834 respectivement de *A. rhizogenes*

#### 5. Profilage chimique (screening) des CRs de *C. procera* par GC-MS

L'objectif de cette partie de l'étude est d'analyser la composition chimique des CRs de *C. procera* issues de la transformation génétique par *A. rhizogenes*.

Trente-six composés bioactifs appartenant à différentes classes de métabolites ont été identifiés par analyse GC-MS (Figure 25). L'identification de ces composés a été réalisée sur la base de l'interprétation des spectres de masse correspondants, comparés aux données rapportées dans la littérature ainsi qu'aux spectres de la bibliothèque NIST. Le temps de

réention, le nom, la formule moléculaire, le poids moléculaire et la surface de pic des composés sont donnés dans le tableau (2).

Les principaux métabolites identifiés chez les CRs de *C. procera* sont l'acide palmitique (23,15%), l'acide linoléique (isomère 1 et isomère 2 14,36% et 12,18% respectivement), le stigmastérol (12,96%), le squalène (8,60%), le  $\beta$ -sitostérol (5,07 %) et le campestérol (4,93 %) (Figure 30).

D'autres composés de plus faibles concentrations ont été également identifiés, comme le 4.8.A Diméthyl.6(2. méthyl oxyranil)-4A,5,6,7,8,8A- huxahydro-2(1H) naphthalène (2,98%), le stigmastadienone (1.69%), l'acide stéarique (1.41%), le tocophérol (vitamine E) (1.34%) et le egosta-5, 22-dien-3-ol (1.07%).

EN outre, d'autres composés à l'état de traces ont été également retrouvés, dont le cholestérol (0.85%), l'acide pentadécanoïque (0.83%), le 1,4-Dihydro-9- isopropylidene-5,6,7,8-tetramétoxy-1,4- méthanonaphthalène (0,80%), le tricosane (0.77%), le Delta.6- progestérone (0.75%), le cyclotétradécane (0.67%), le O-benzo[B]xenthen-12-one,11-(acetyloxy) (0,63%), l'ester éthylique de l'acide palmitique (0.54%), l'ester glycérique d'acide palmitique (0.49%), le 4. ((1.E).3 hydroxyl.1.proponyl)-2-méthoxyphénol (0,43%), l'acide heptadécanoïque (0.41%), le conjugué acide férulique glycine (0.40%), l'heptadécane (0.38%), le  $\beta$ -progestérone (0.36%), le 1,21-Docosadiène (0,30%), l'ester méthylique d'acide brassidique (0.27%), le 4.4'.-Dibutoxy- 1,1'biphenyl (0,26%), l'élémicine M (demethyl-) iso-2 (0,24%), le 17-Cyclohexyl triacontane (0,17), l'acide linoléique (0.15%), l'octadécane (0.15%), le pentadécane (0.14%), et le 2- (octadecyloxy) ethanol (0,04%).

*Résultats et interprétations*

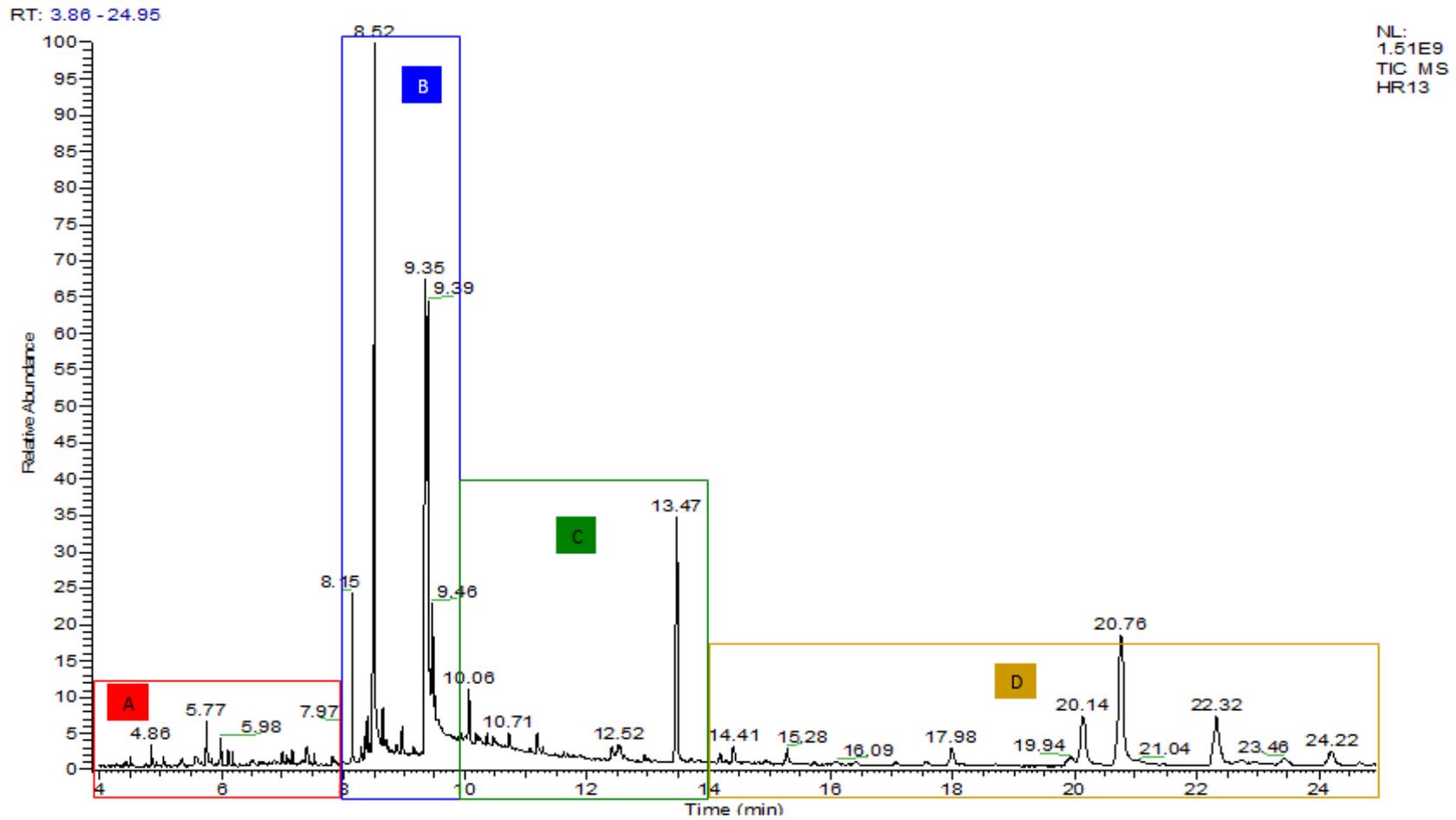


Figure 25 : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de *C. procera* obtenu en mode full scan

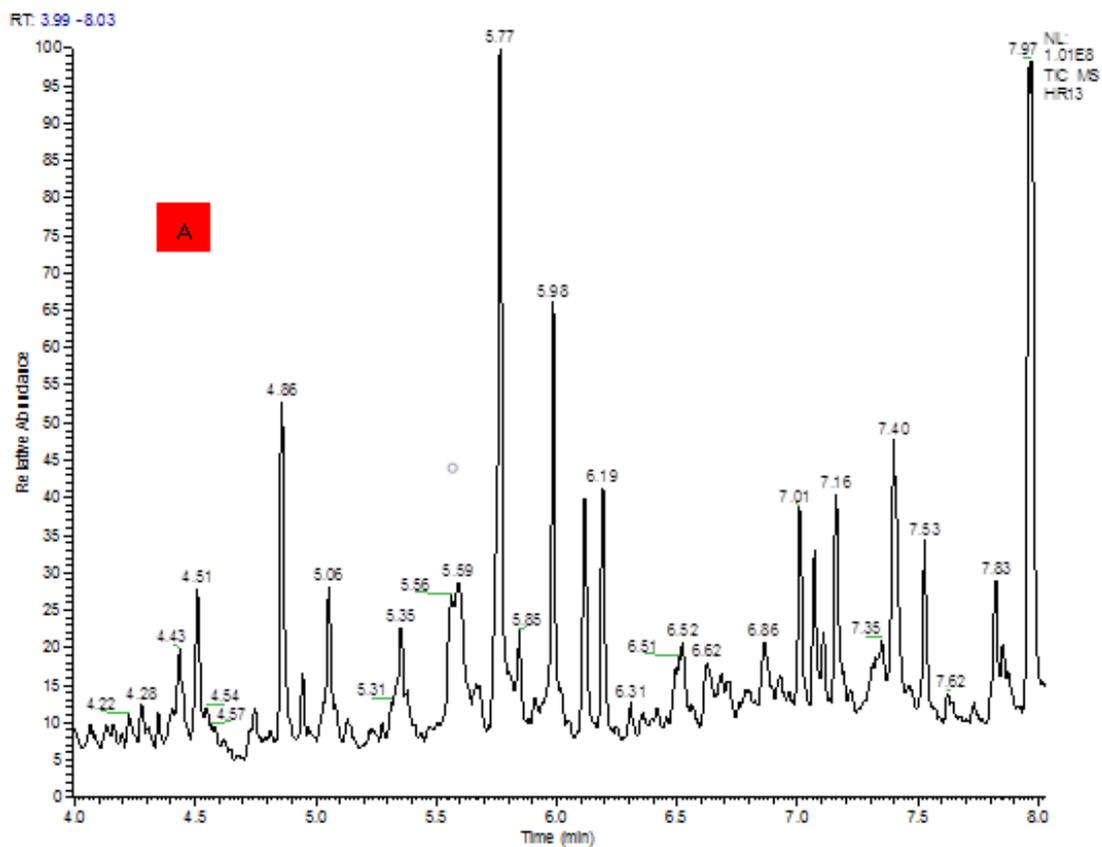


Figure 26 : **Partie A** : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de *C. procera* obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 4.00-8.00 min)

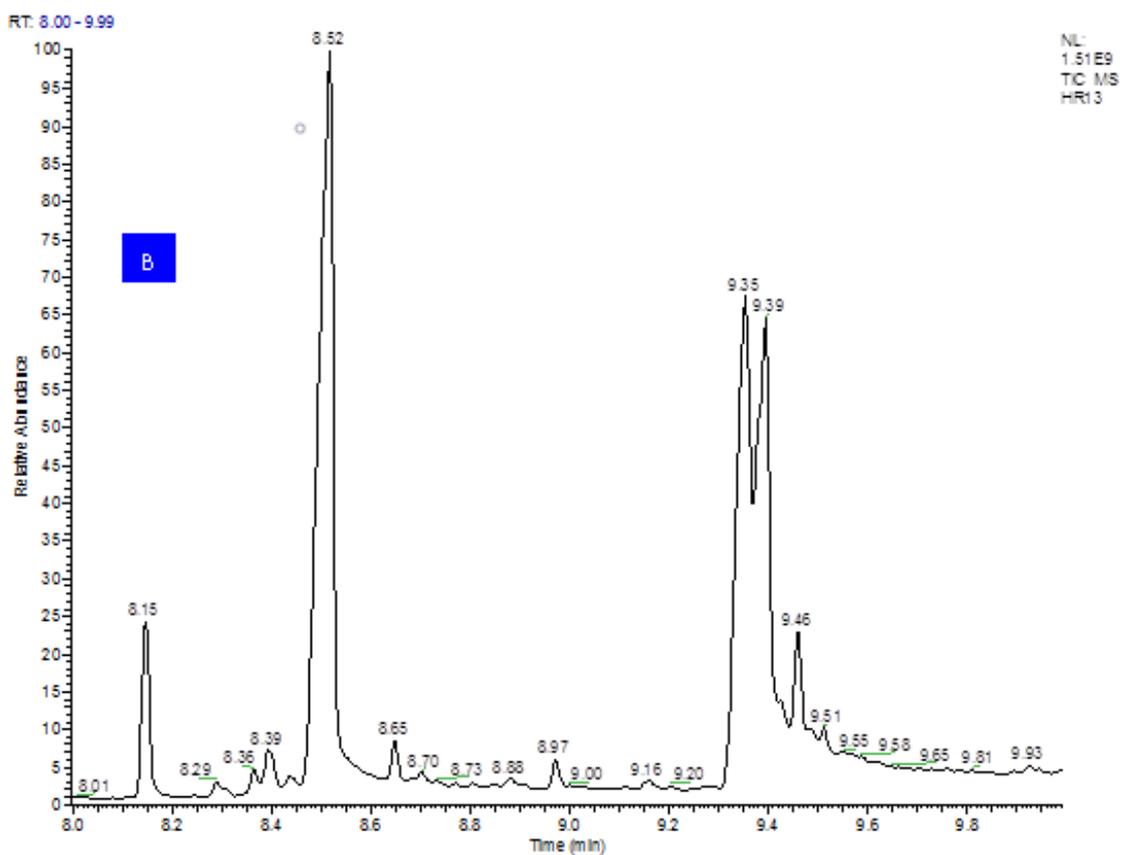


Figure 27 : Partie B : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de *C. procera* obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 8.00-10.00 min)

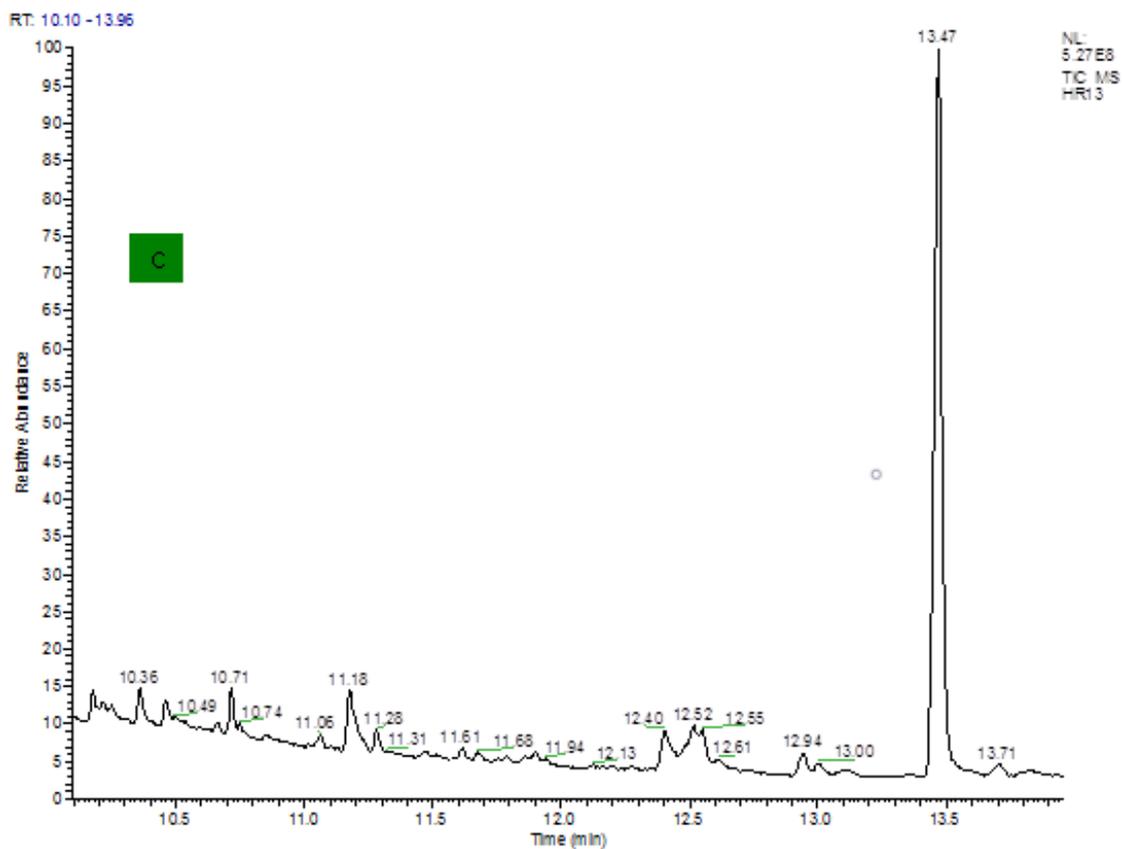


Figure 28 : **Partie C** : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de *C. procera* obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 10.00-14.00 min)

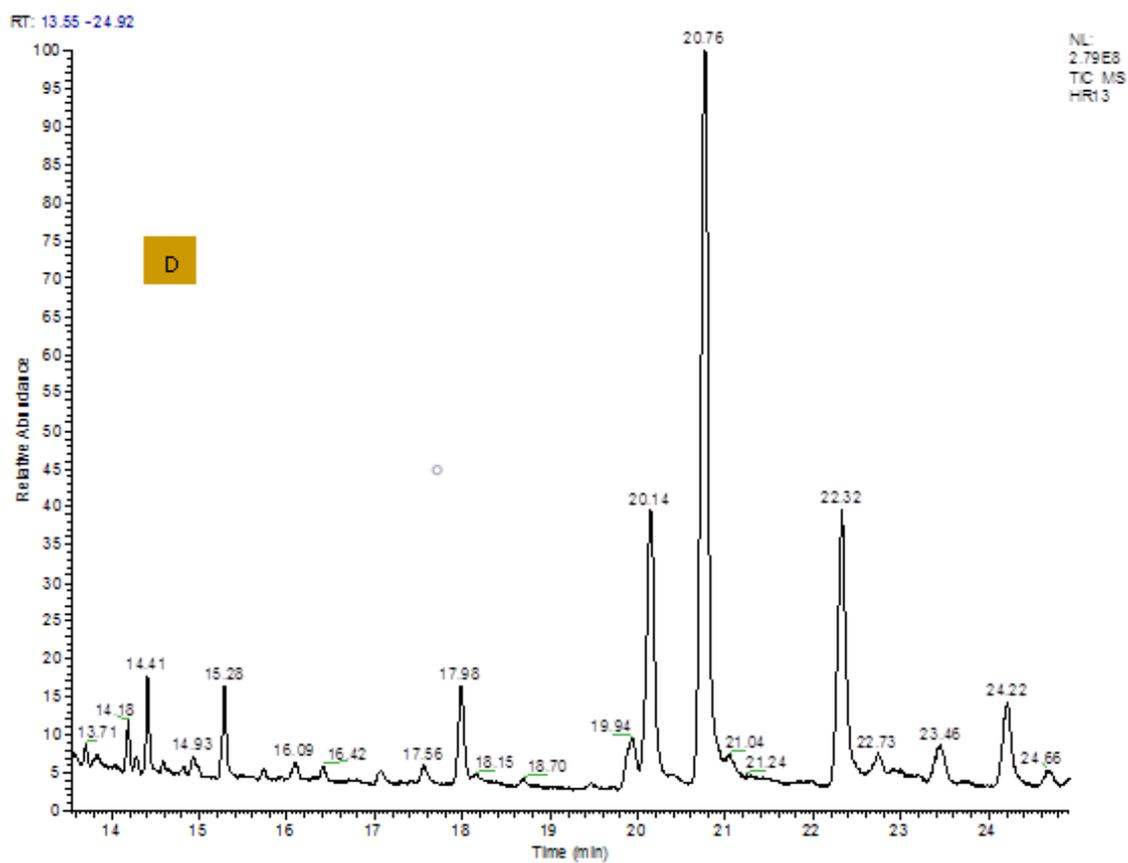
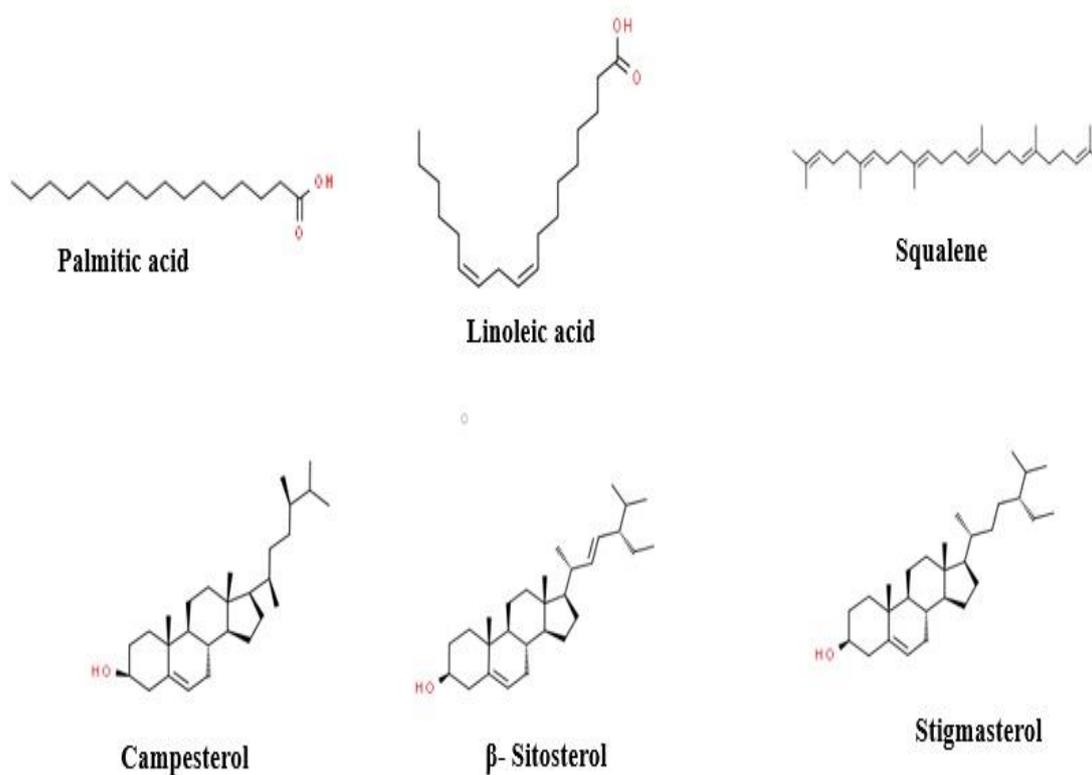


Figure 29 : Partie D : Chromatogramme GC/MS de l'extrait de CRs de *C. provera* obtenu en mode full scan (Temps de rétention : 14.00-25.00 min)

La figure (30) illustre la structure chimique des acides : palmitique, linoléique, du squalène, du campesterol, du  $\beta$ -sitostérol et du stigmastérol, des composés identifiés majoritairement chez les CRs de *C. procera* via un screening par GC-MS.



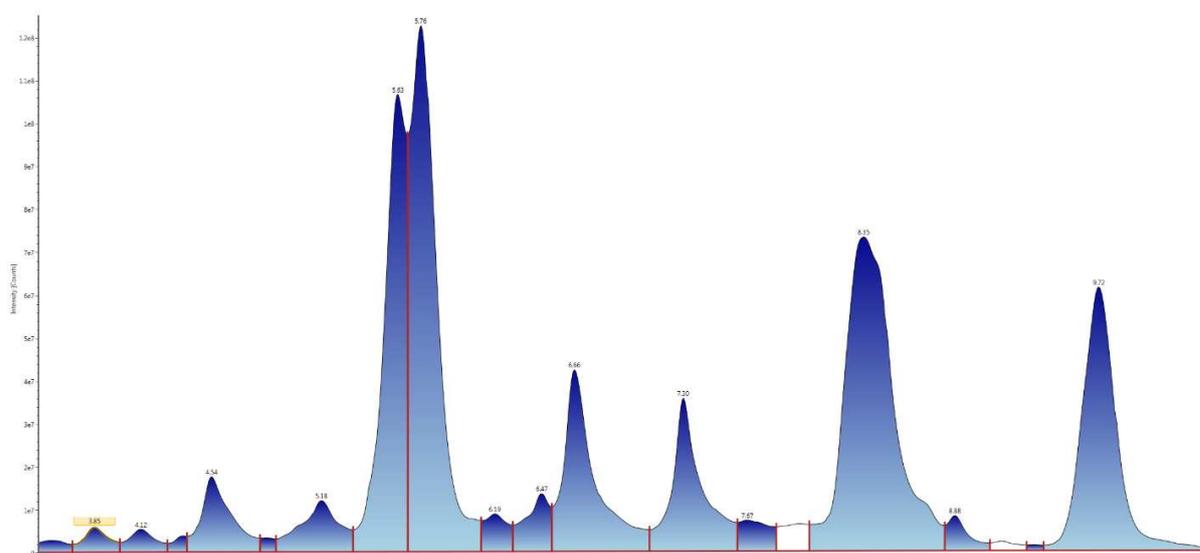
**Figure 30 :** Structure chimique des composés majeurs identifiés à partir de CRs de *C. procera* par GC-MS

**Tableau 2** : Liste et formules des composés chimiques identifiés à partir des extraits de CRs de *C. procera* par analyse GC-MS (TIC = Total Ion Chromatogram)

TIC	N°	Temps de Réention (min.)	Nom du composé	Formule moléculaire	Poids Moléculaire	Surface du pic %
A	1	4.43	Pentadecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212	0,14
	2	5.06	Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	254	0,15
	3	5.59	Heptadecane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240	0,38
	4	5.77	Cyclotetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196	0,67
	5	5.98	Ferulic acid glycine conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	279	0,40
	6	6.31	2-(octadecyloxy) ethanol	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	314	0,04
	7	6.52	Linolenic acid	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292	0,15
	8	7.16	Elemicin.M (demethyl-) iso-2	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	236	0,24
	9	7.40	4. ((1.E).3 hydroxyl.1.proponyl)-2-methoxyphenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	180	0,43
	10	7.97	Pentadecanoic acid	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	0,83
B	11	8.15	4.8.A Dimethyl.6(2. methyl oxyranil)-4A,5,6,7,8,8A-hyxahydro-2(1H)naphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	243	2,98
	12	8.52	Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	23,15
	13	8.65	Palmitic acid ethyl ester	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	0,54
	14	8.97	Heptadecanoic acid	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	0,41
	15	9.35	Linoleic acid isomer 1	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	14,36
	16	9.39	Linoleic acid isomer 2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	12,18
	17	9.46	Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	1,41
C	18	10.06	Tricosane	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	324	0,77
	19	10.36	Brassicic acid methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	352	0,27
	20	10.46	Linoleic acid isomer 3	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	0,20
	21	10.71	1,21-Docosadiene	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub>	306	0,30
	22	11.18	Palmitic acid glycerol ester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	330	0,49
	23	11.28	17-Cyclohexyl triacontane	C <sub>39</sub> H <sub>78</sub>	546	0,17
	24	12.40	O-benzo[B]xenthen-12-one,11-(acetyloxy)	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	304	0,63
	25	12.94	4.4'.-Dibutoxy-1,1'biphenyl	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	298	0,26
	26	13.47	Squalene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410	8,60
	27	14.18	β-Progesterone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314	0,36
D	28	14.41	Delta.6-progesterone	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	312	0,75
	29	15.28	1,4-Dihydro-9-isopropylidene-5,6,7,8-tetrametoxy-1,4-methanonaphtalene	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	302	0,80
	30	17.98	Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430	1,34
	31	19.94	Ergosta-5, 22-dien-3-ol	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	398	1,07
	32	20.14	Campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	400	4,93
	33	20.76	Stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412	12,96
	34	22.32	β-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414	5,07
	35	23.46	Cholesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	386	0,85
	36	24.22	Stigmastadienone	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O	410	1,69

## 6. Profilage chimique des glycosides cardiaques chez *C. procera* par UHPLC-QTOF/MS

Cette partie de l'étude a pour but : la caractérisation des glycosides cardiaques dans l'extrait éthanolique des CRs de *C. procera* par UHPLC-QTOF/MS (en mode d'ionisation positive). Les résultats obtenus révèlent la présence de dix composés. L'identification de ces composés est basée sur l'interprétation de leurs spectres de masse, leur temps de rétention, l'ion précurseur  $[M+H]^+$  ( $m/z$ ), les ions fragments ( $m/z$ ) en prenant en considération les données de la littérature ainsi que les bases de données internationales. Le chromatogramme en mode positif est présenté dans la figure (31).



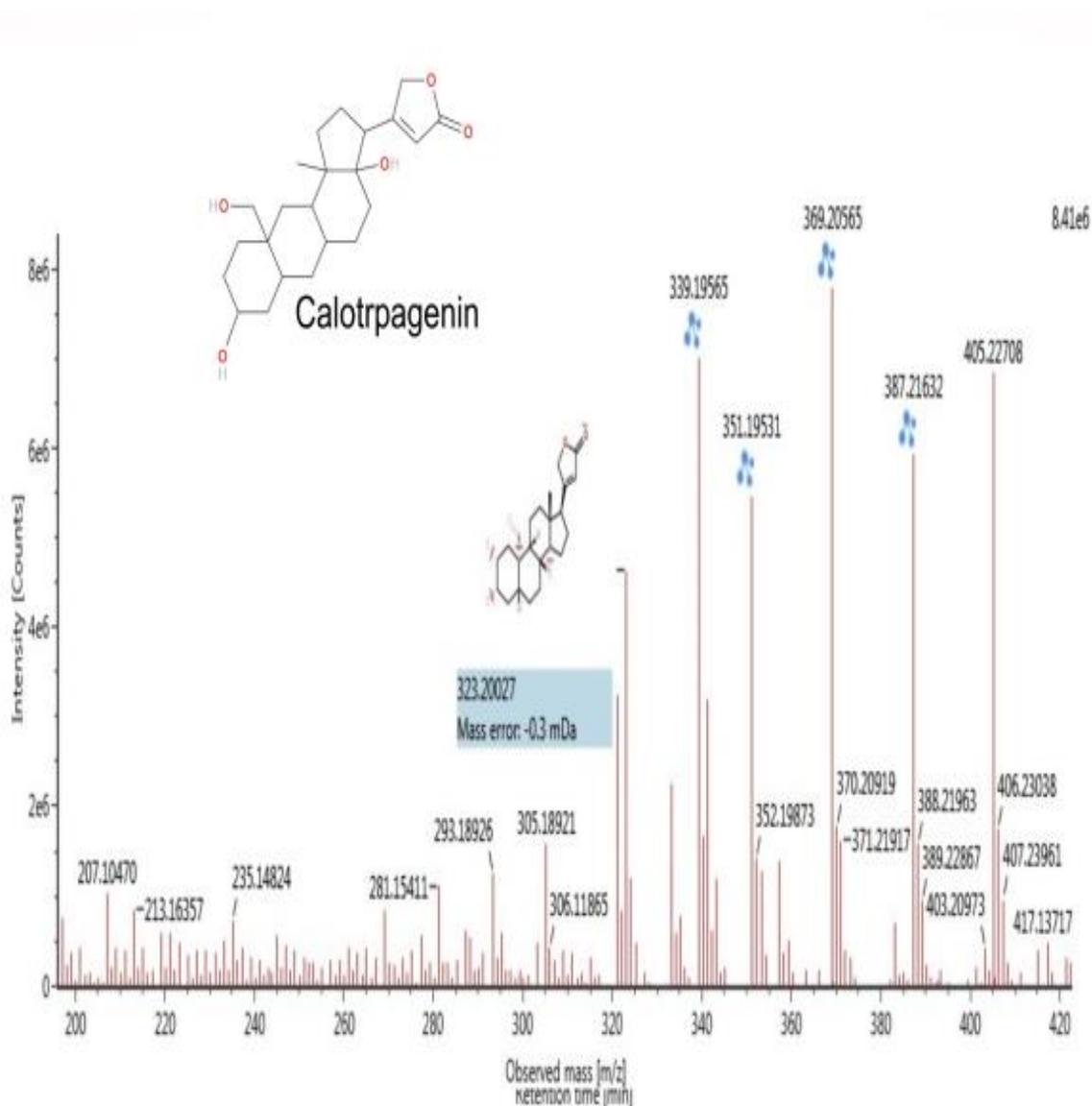
**Figure 31 :** Chromatogramme d'ionisation par UHPLC-QTOF/MS des CRs de *C. procera* en mode positif

Le chromatogramme de base des CRs de *C. procera* résultant de l'analyse par UHPLC-QTOF/MS déjà développée a montré la présence de 10 composés appartenant à la famille des glycosides cardiaques. Les informations exhaustives des composés identifiés (numérotés de 1 à 10 indiquant l'ordre d'élution) sont répertoriées dans le tableau (3).

**Tableau 3 :** Glycosides cardiaques détectés par UHPLC-QTOF/MS en mode ESI positif chez les CRs de *C. procera* (TR : Temps de Rétention, Exp : Expérimental, Calc : Calculé)

Numéro du pic	Identification du composé	TR (min)	Formule moléculaire	Exp. m/z	Calc. m/z	Ions fragments majoritaires (m/z)
1	Calotropagénine	3.85	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	405.2270	405.2275	323.2002 - 339.1956 - 351.1953 - 369.2056 - 387.2163
2	Calotoxine	4.54	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>10</sub>	549.2685	549.2693	325.2160 - 373.2373 - 391.2478 - 513.2484
3	Frugoside	5.63	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	537.3068	537.3066	325.2166 - 337.2165 - 339.2318 - 373.2378
4	Coroglaucigénine	5.76	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	391.2481	391.2485	325.2166 - 337.2165 - 373.2378
5	Calotropine	6.66	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	533.2746	533.2750	177.0548 - 323.2007 - 355.2263 - 497.2530 - 515.2641
6	Calactine	7.30	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	533.2739	533.2747	323.2005 - 339.1968 - 497.2528 - 515.2637
7	Uzarigénine	8.35	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	375.2422	375.2529	205.1223 - 293.2258 - 321.2209 - 339.2316 - 357.2422
8	Asclépine	8.88	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	575.2844	575.2853	311.2011 - 497.2525 - 539.2620 - 557.2735
9	Uscharidine	9.56	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	531.2353	531.2353	193.0861 - 267.1591 - 362.2467
10	Uscharine	9.72	C <sub>31</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>8</sub> S	588.2636	588.2637	161.1326 - 323.2009 - 341.2115 - 552.2424 - 570.2525

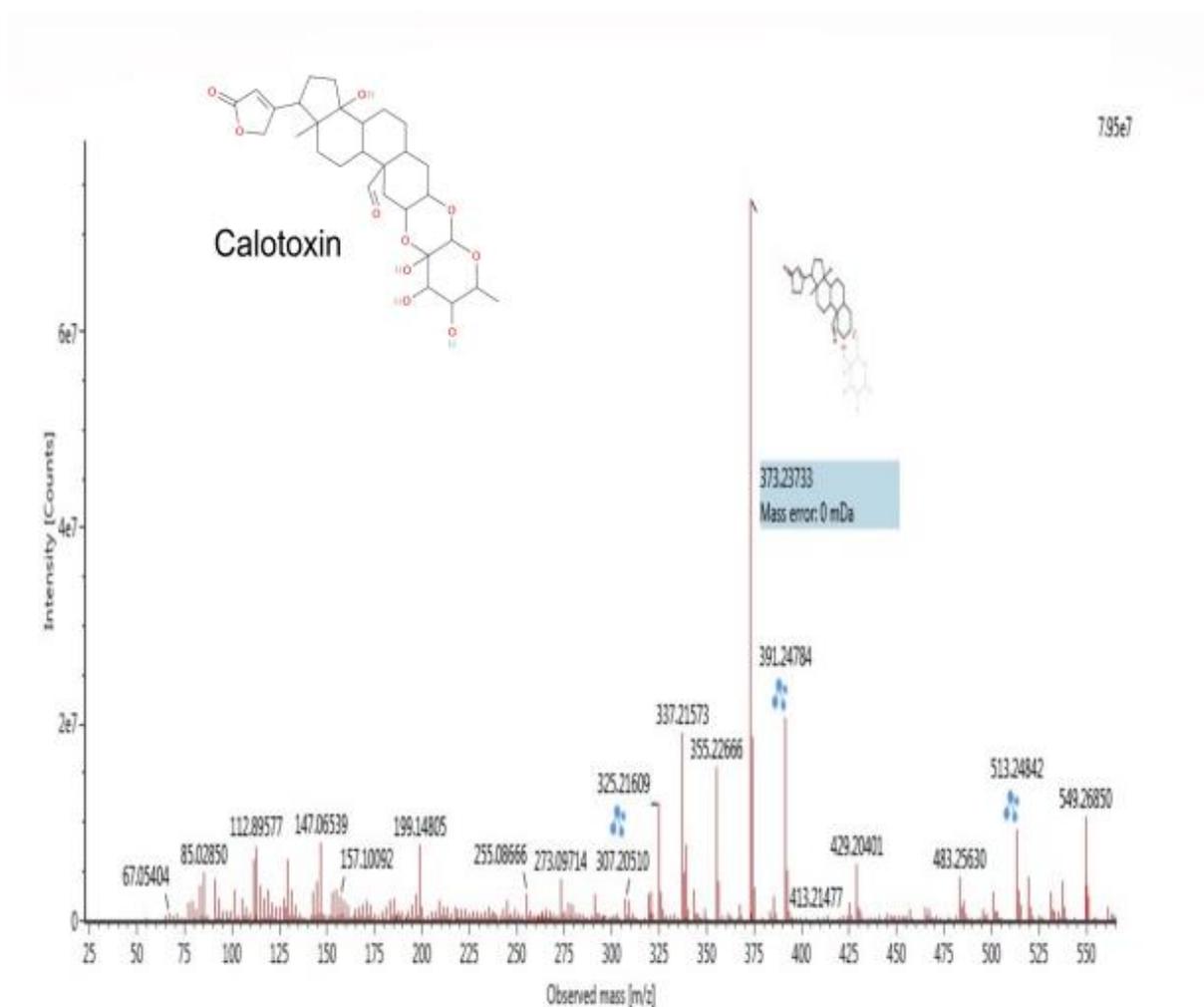
D'après l'analyse QTOF/MS, le composé (1) élué à TR de 3,85 min montre un pic moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  405.2275 en mode d'ionisation positive. Ce composé correspondant à la formule  $C_{23}H_{32}O_6$ , a été identifié comme étant la **calotropagénine**. Le spectre de masse de ce composé a donné un fragment majeur à  $m/z$  323.2002. En même temps, d'autres ions fils sont apparus à  $m/z$  387.2163, 369.2056, 351.1953 et 339.1956 (Figure 32).



**Figure 32** : Spectre de masse de calotropagénine

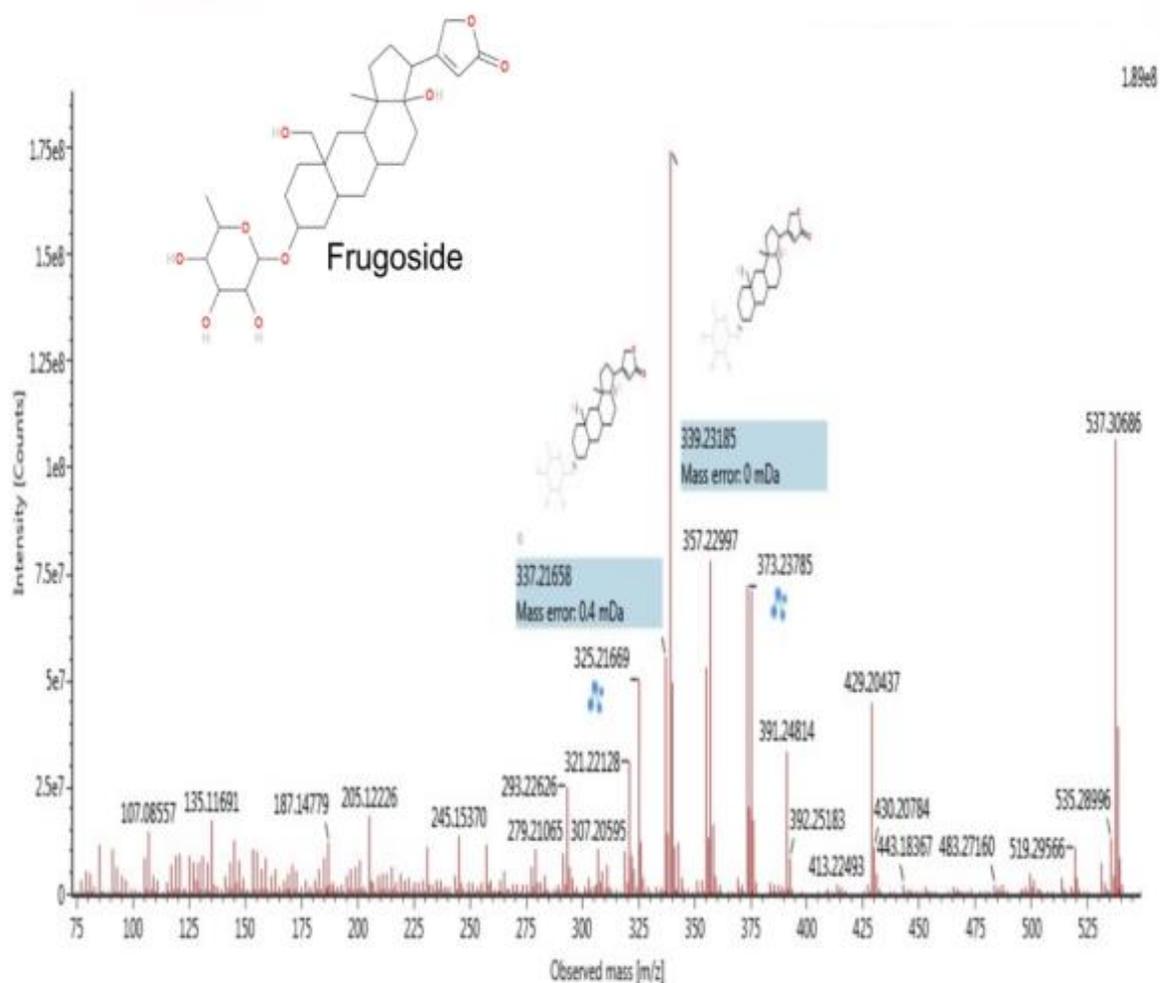
Le composé (2) élué à TR = 4.54 min et a donné un pic moléculaire  $[M+H]^+$  à m/z 549.2693.

Ce composé a un fragment majoritaire à m/z 373.2373. D'autres pics caractéristiques sont apparus à m/z 513.2484, 391.2478 et 325.2160 (Figure 33). Ce composé ayant la formule moléculaire ( $C_{29}H_{40}O_{10}$ ) a été caractérisé comme étant la calotoxine.



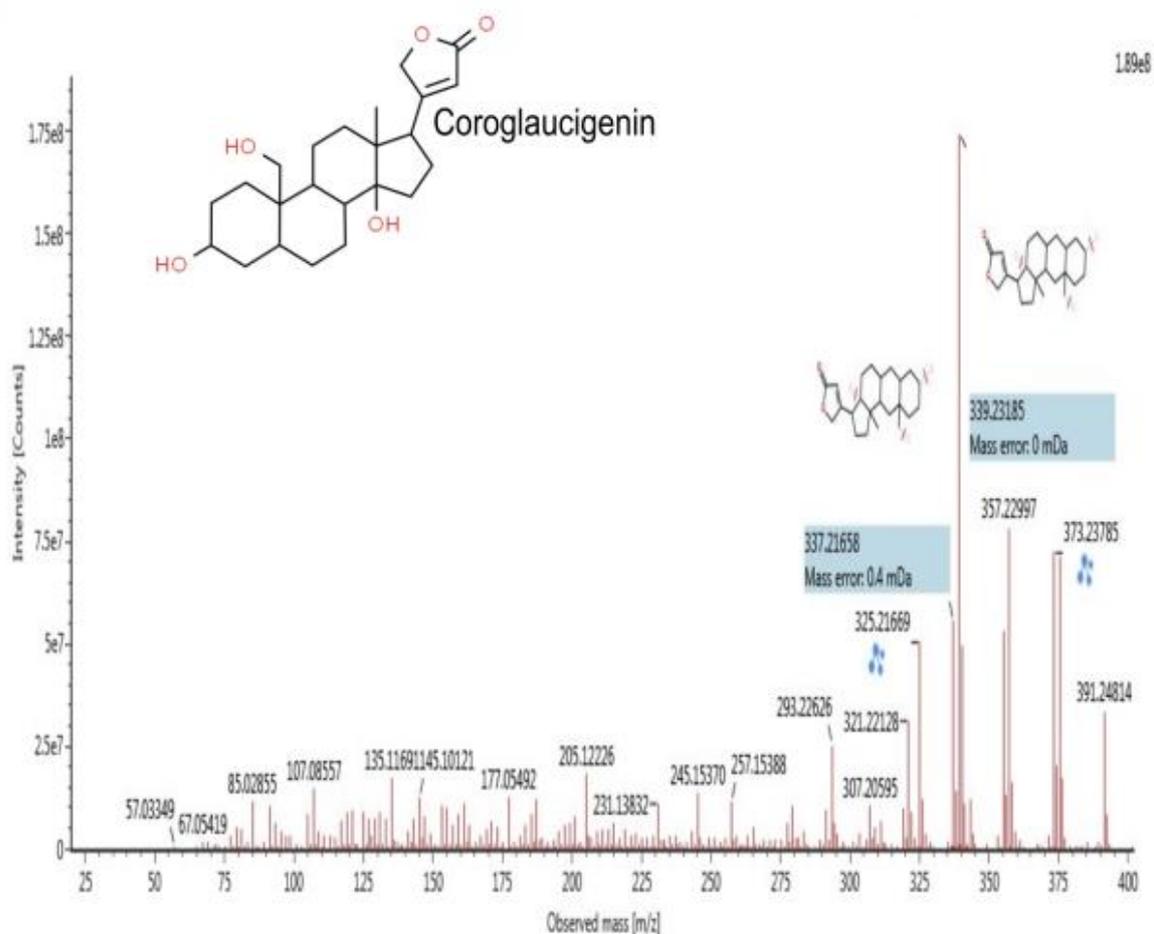
**Figure 33** : Spectre de masse de calotoxine

Le composé (3) élué à TR = 5.63 min a produit un ion moléculaire  $[M+H]^+$  à m/z 537.3066 et des fragments d'ions majeurs à m/z 339.2318 et 337.2165. Le spectre MS a donné d'autres fragments fils à m/z 373.2378 et 325.2166 (Figure 34). Le composé (3) a été reconnu donc comme frugoside, ayant la formule moléculaire (C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>).



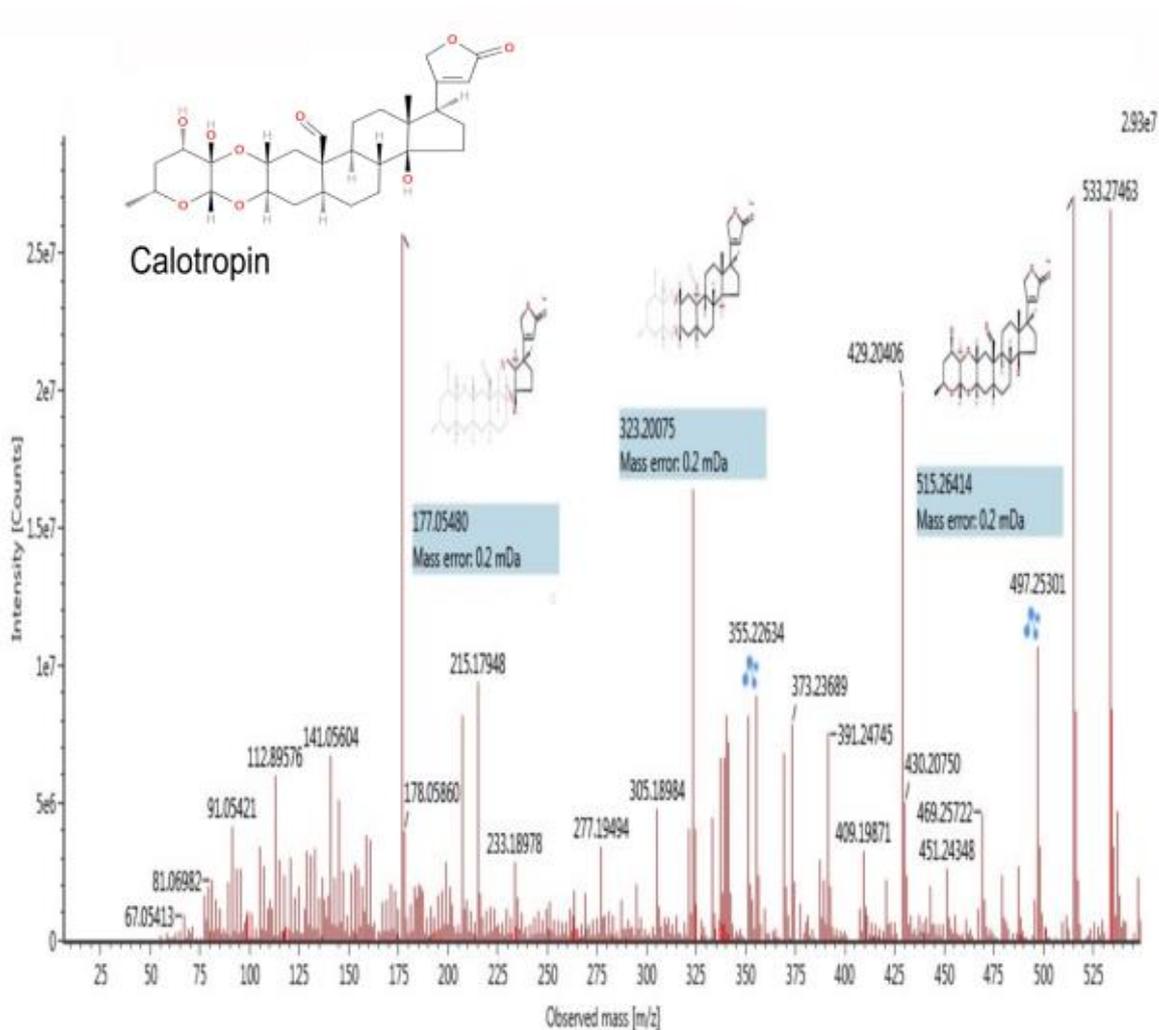
**Figure 34** : Spectre de masse du frugoside

Le composé (4), apparu à TR = 5.76 min, donnant l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à m/z 391.2485, correspond à la formule moléculaire  $C_{23}H_{34}O_5$ . Le spectre MS a présenté des fragments d'ions majeurs à m/z 339.2318 et 337.2166, des ions fils à m/z 373.2378 et 325.2166 (Figure 35). Ce composé a été attribué à la coroglaucigénine.



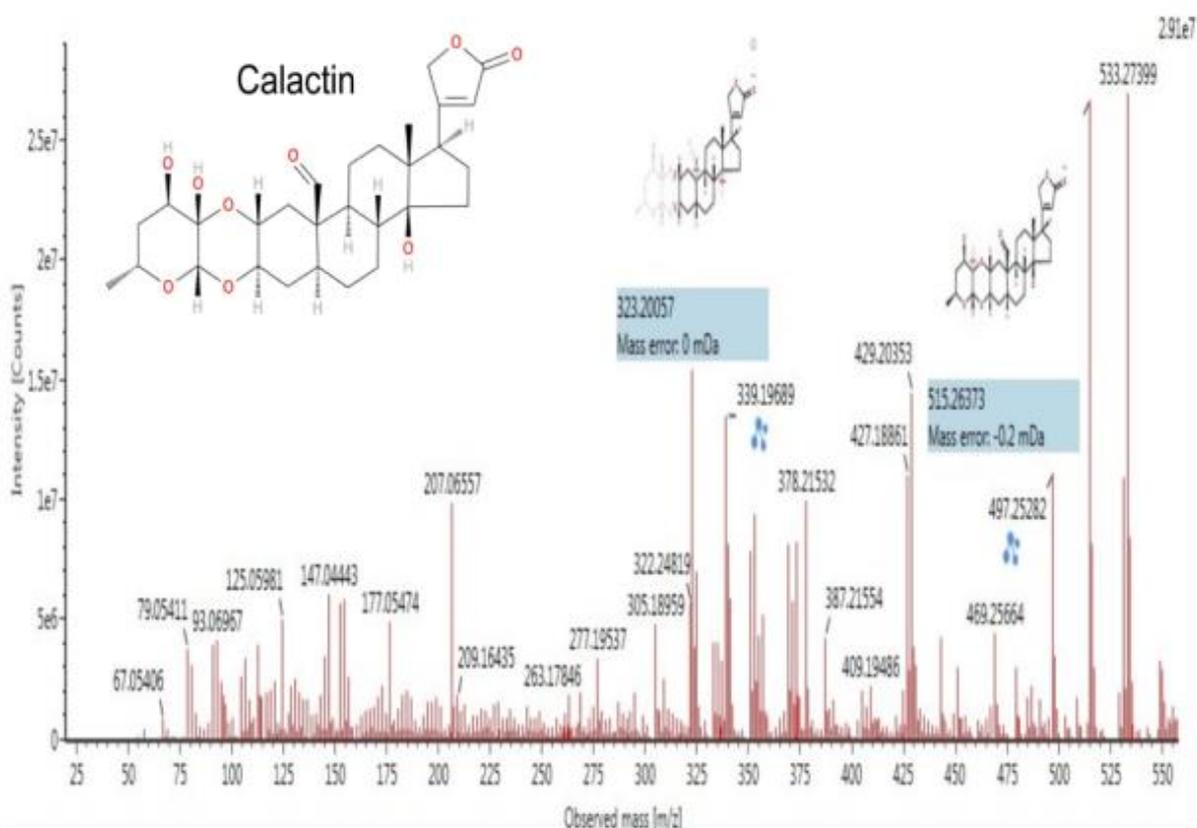
**Figure 35** : Spectre de masse de la coroglaucigénine

Le composé (5), élué à TR = 6.66 min a donné l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à m/z 533.2750. Dans le spectre MS, des fragments majeurs ont été obtenus à m/z 515.2641, 323.2007 et 177.0548. D'autres ions fils sont apparues à m/z 497.2530 et 355.2263 (Figure 36). En conséquence, le composé (5) de formule moléculaire  $C_{29}H_{40}O_9$  a été caractérisé comme étant **calotropine**.



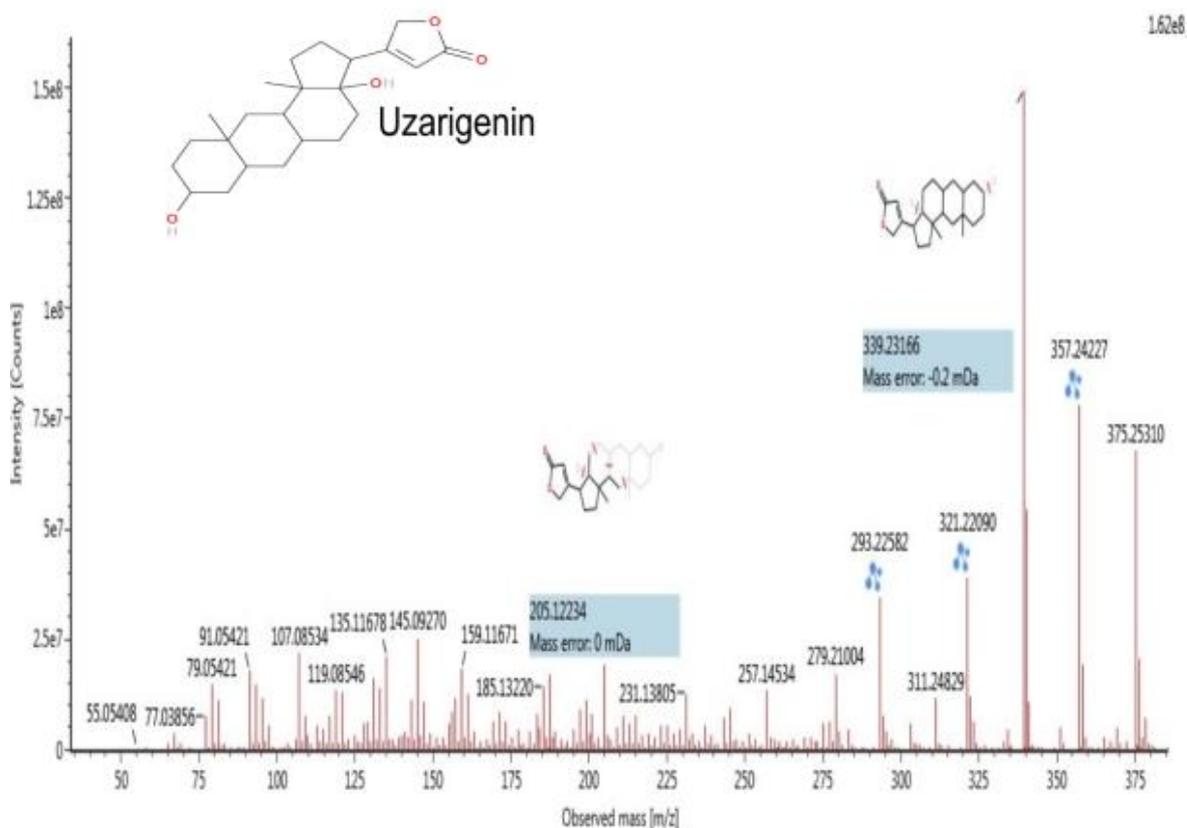
**Figure 36 :** Spectre de masse de la calotropine

Le composé (6) apparu à TR = 7,30 min, a donné un ion moléculaire  $[M+H]^+$  à m/z 533.2747, correspondant à la formule moléculaire  $C_{29}H_{40}O_9$ . Les principaux fragments du spectre MS pour ce composé sont apparus à m/z 515.2637 et 323.2005. Des ions fils sont également apparus à m/z 497.2528 et 339.1968 (Figure 37). Ce composé est caractérisé comme étant la **calactine**.



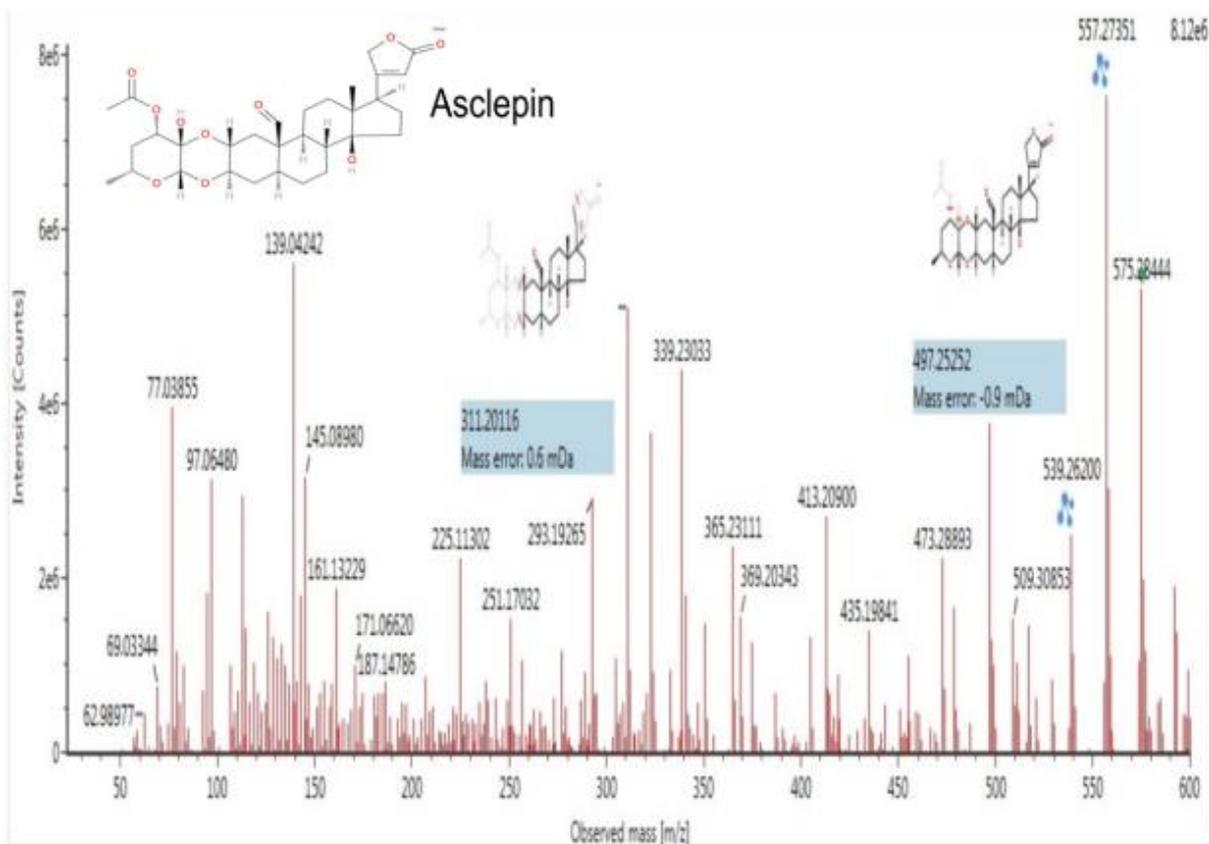
**Figure 37** : Spectre de masse de la calactine

Le composé (7) élué à TR = 8.35 min ayant la formule moléculaire C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> est considéré comme de l'uzarigénine, un glycoside cardiaque, produisant un ion moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à m/z 375.2529 et des fragments majeurs à m/z 339.2316 et 205.1223. D'autres fragments caractéristiques sont apparus à m/z 357.2422, 321.2209 et 293.2258 (Figure 38).



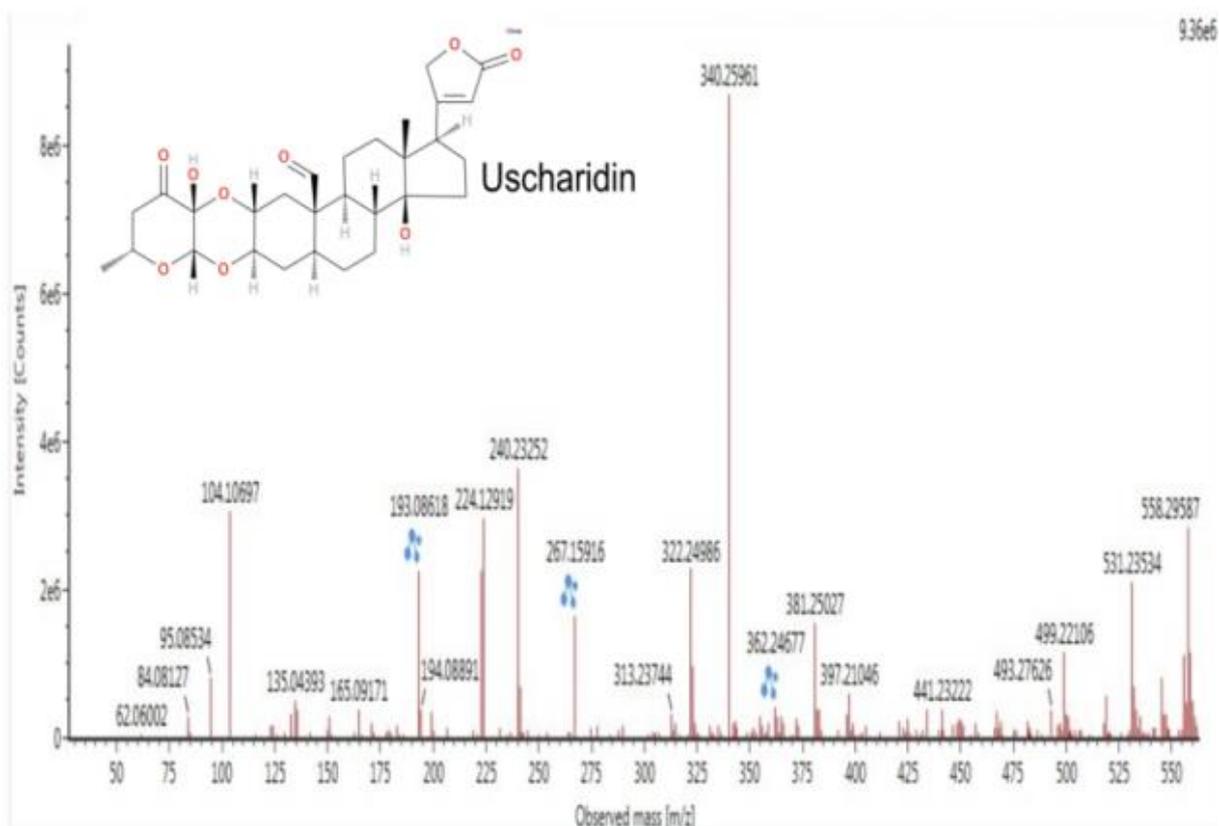
**Figure 38** : Spectre de masse de l'uzarigénine

Le composé (8) enregistré à TR = 8.88, produit l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  575.2853 avec des fragments majeurs à  $m/z$  497.2525 et 311.2011, et d'autres fragments caractéristiques à  $m/z$  557.2735 et 539.2620. Le composé (8) ayant la formule moléculaire  $C_{31}H_{42}O_{10}$  a été identifié comme l'**asclépine** en raison de son spectre de masse (Figure39).



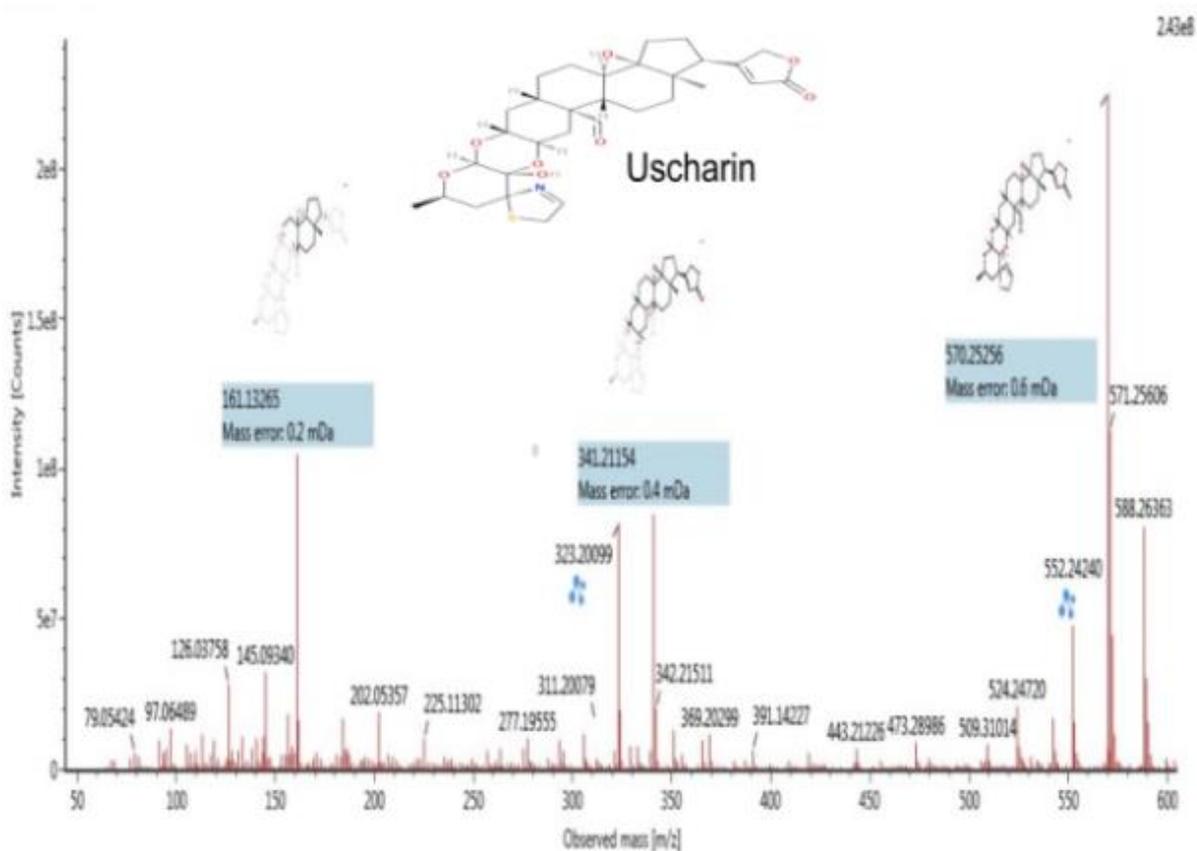
**Figure 39** : Spectre de masse de l'asclépine

Le composé (9) avec un TR 9.56 min, a donné l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  531.2353, tandis que des fragments caractéristiques sont apparus à  $m/z$  362.2467, 267.1591 et 193.0861 (Figure 40). Les données du spectre MS suggèrent que le composé (9) avec la formule moléculaire  $C_{29}H_{38}O_9$  est déterminé comme l'**uscharidine**.



**Figure 40** : Spectre de masse de l'uscharidine

Le composé (10) avec TR, 9.72 min a produit un ion moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  588.2637, des fragments majeurs à  $m/z$  570.2525, 341.2115 et 161.1326, et d'autres ions fils à  $m/z$  552.2424 et 323.2009 (Figure 41). Sur la base de l'interprétation des fragments, le composé (10) a été identifié comme l'**uscharine** ayant la formule  $C_{31}H_{41}NO_8S$ .



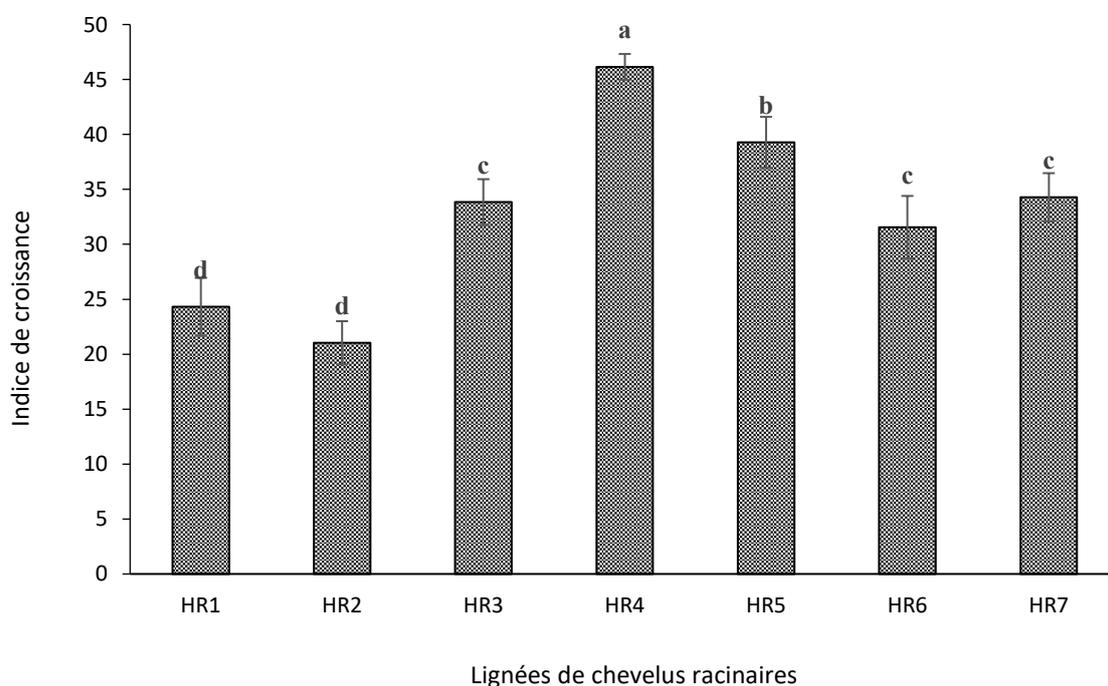
**Figure 41** : Spectre de masse de l'uscharine

## 7. Sélection des lignées racinaires

Dans le but de choisir la meilleure lignée de CRs de *C. procera* en termes de production de masse et en métabolites secondaires, les sept lignées pré-sélectionnées ont fait l'objet d'une détermination de leur indice de croissance et de leur teneur en phytostérols majeurs (campesterol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol). Néanmoins, la détermination de leur teneur en glycosides cardiaques n'a pas été effectuée à cause de l'indisponibilité des molécules standards.

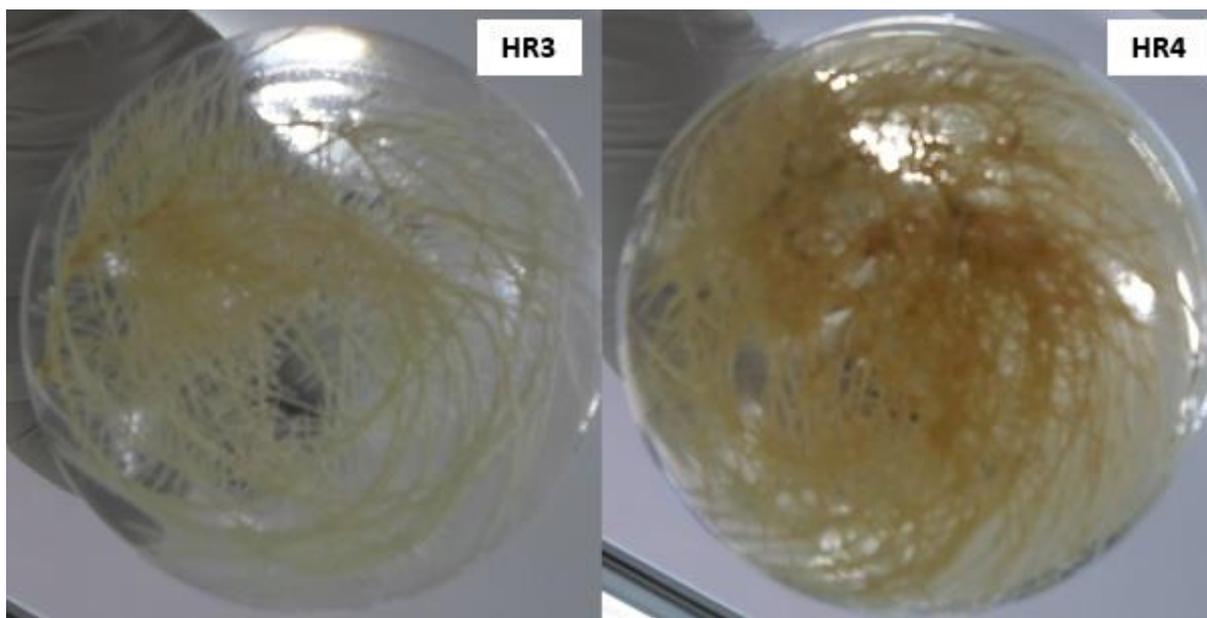
### a. Indice de croissance des lignées de *C. procera*

Bien que leur morphologie et leur croissance soient similaires en milieu sans hormone, les sept lignées de CRs sélectionnées (HR1-HR7) diffèrent par leur croissance de biomasse. Après 20 jours de culture dans le milieu liquide  $\frac{1}{2}$  B5 additionné de 3 % (p/v) de saccharose, l'indice de croissance vari de 21,04 à 46,14 selon la lignée (Figure 42). L'IC le plus élevé a été enregistré chez la lignée HR4 (46,14) (Figure 42) et l'IC le plus bas a été révélé pour les lignées HR1 (24,32) et HR2 (21,04). L'IC du reste des lignes est intermédiaire.



**Figure 42 :** Indice de croissance des sept lignées de *C. procera* sur la base du poids frais après 20 jours de culture

Les données sont présentées comme la moyenne (de trois mesures)  $\pm$  l'écart type. Les barres suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5$  %. Les CRs sont cultivés dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu  $\frac{1}{2}$  B5 liquide.



**Figure 43 :** Croissance des lignées racinaires HR3 et HR4 de *C. procera* sur le milieu liquide  $\frac{1}{2}$  B5 additionné de 3 % (p/v) de saccharose après 20 jours de culture

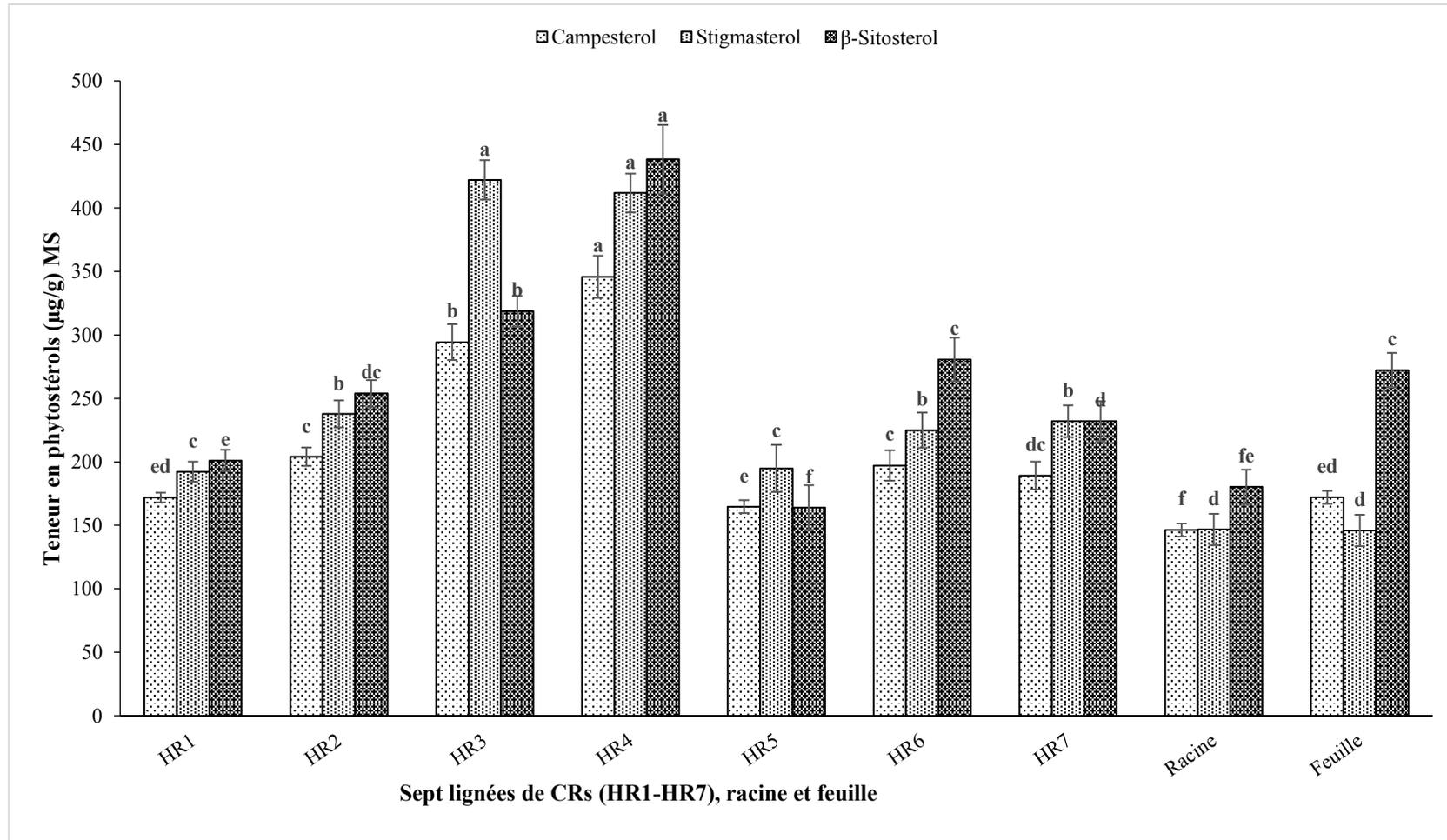
**b. Teneur en phytostérols (campesterol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) des lignées de *C. procera***

Dans cette partie, nous avons cherché non seulement à déterminer la teneur en phytostérols des sept lignées pré-sélectionnées de *C. procera* mais aussi à déterminer la teneur des racines et de feuilles naturelles de plants de *C. procera* âgés de 90 jours cultivés en pots sous serre afin de comparer les teneurs en phytostérols dans les sept lignées de CRs et dans la plante à son état naturel.

La teneur en phytostérols de toutes les lignées de CRs s'est montrée plus élevée que celle des racines naturelles, à l'exception de la teneur en  $\beta$ -sitostérol de la lignée HR5 qui était la plus faible (163,9  $\mu\text{g/g MS}$ ) (Figure 44). De plus, les lignées de CRs montrent une quantité de phytostérols presque plus élevée que celle des feuilles naturelles excluant la teneur en campesterol (164,7  $\mu\text{g/g M.S.}$ ) chez la lignée HR5 et la teneur en  $\beta$ -sitostérol chez la lignée HR1 (201,1  $\mu\text{g/g M.S.}$ ) et HR5 (Figure 44). La teneur en phytostérols varie cependant entre l'ensemble des lignées de CRs (Annexe 3).

L'analyse GC-MS montre que l'accumulation de phytostérols est maximale chez la lignée HR4 (345,8  $\mu\text{g campesterol/g M.S.}$ , 411,8  $\mu\text{g stigmastérol/g M.S.}$  et 438,3  $\mu\text{g } \beta\text{-sitostérol/g M.S.}$ ) (Figure 44). Ces résultats montrent des teneurs de 2,4 à 2,8 fois plus élevées par rapport aux racines naturelles.

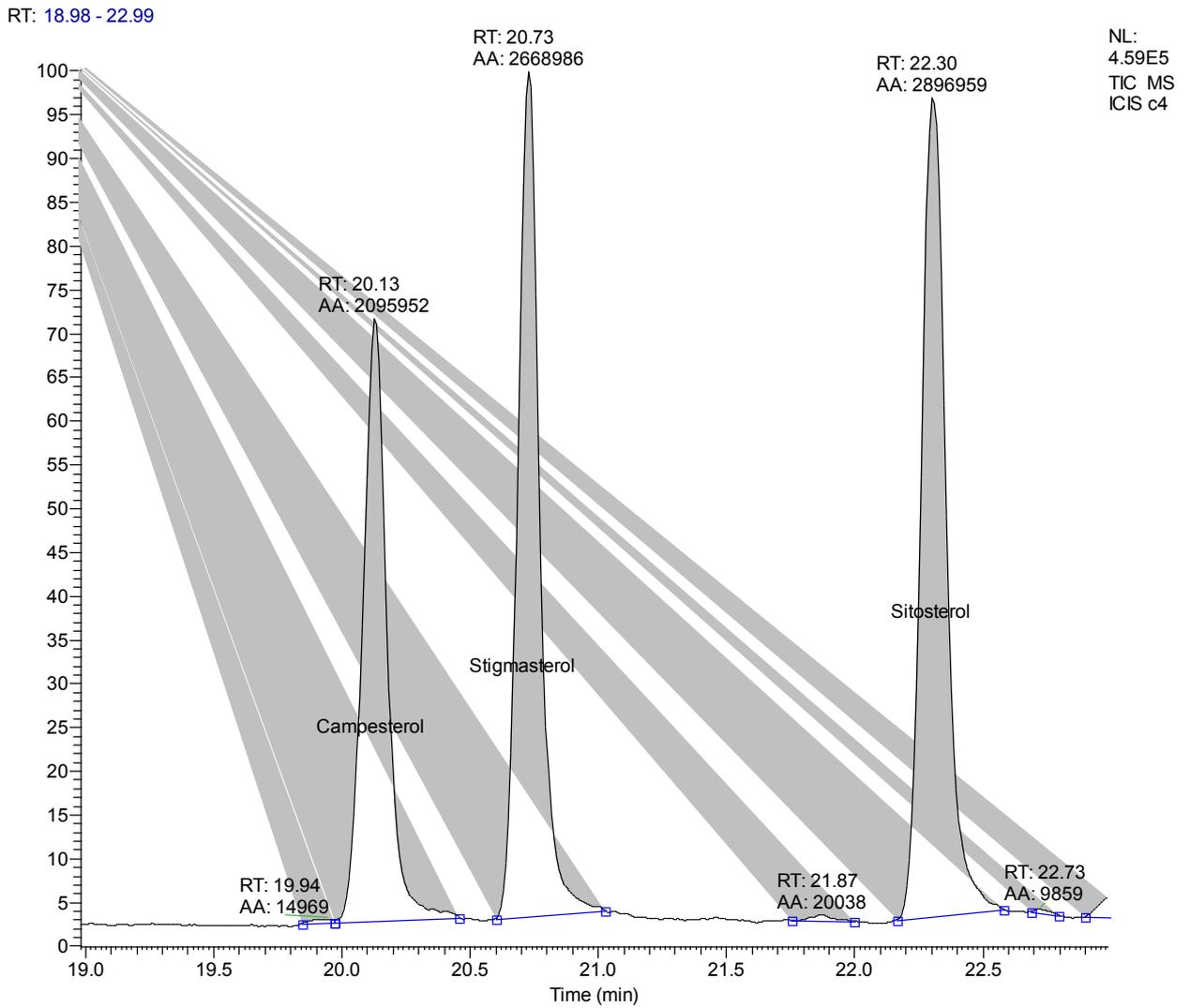
## Résultats et interprétations



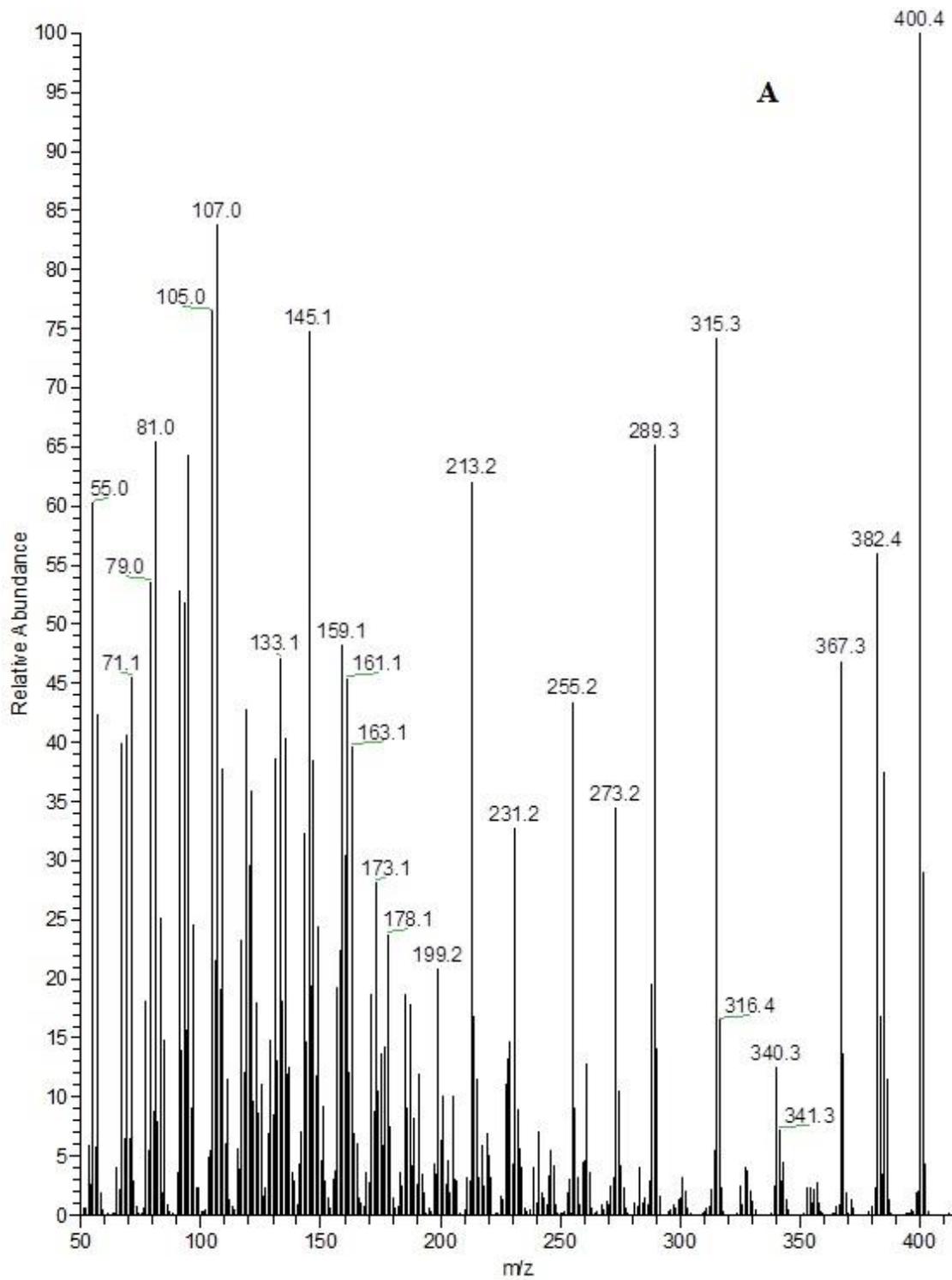
**Figure 44 :** Teneur en phytostérols (campesterol, stigmasterol et β-sitostérol) en µg/g M.S. des sept lignées CRs de *C. procera* et des racines et feuilles naturelles non transformées sur la base d'une analyse GC-MS

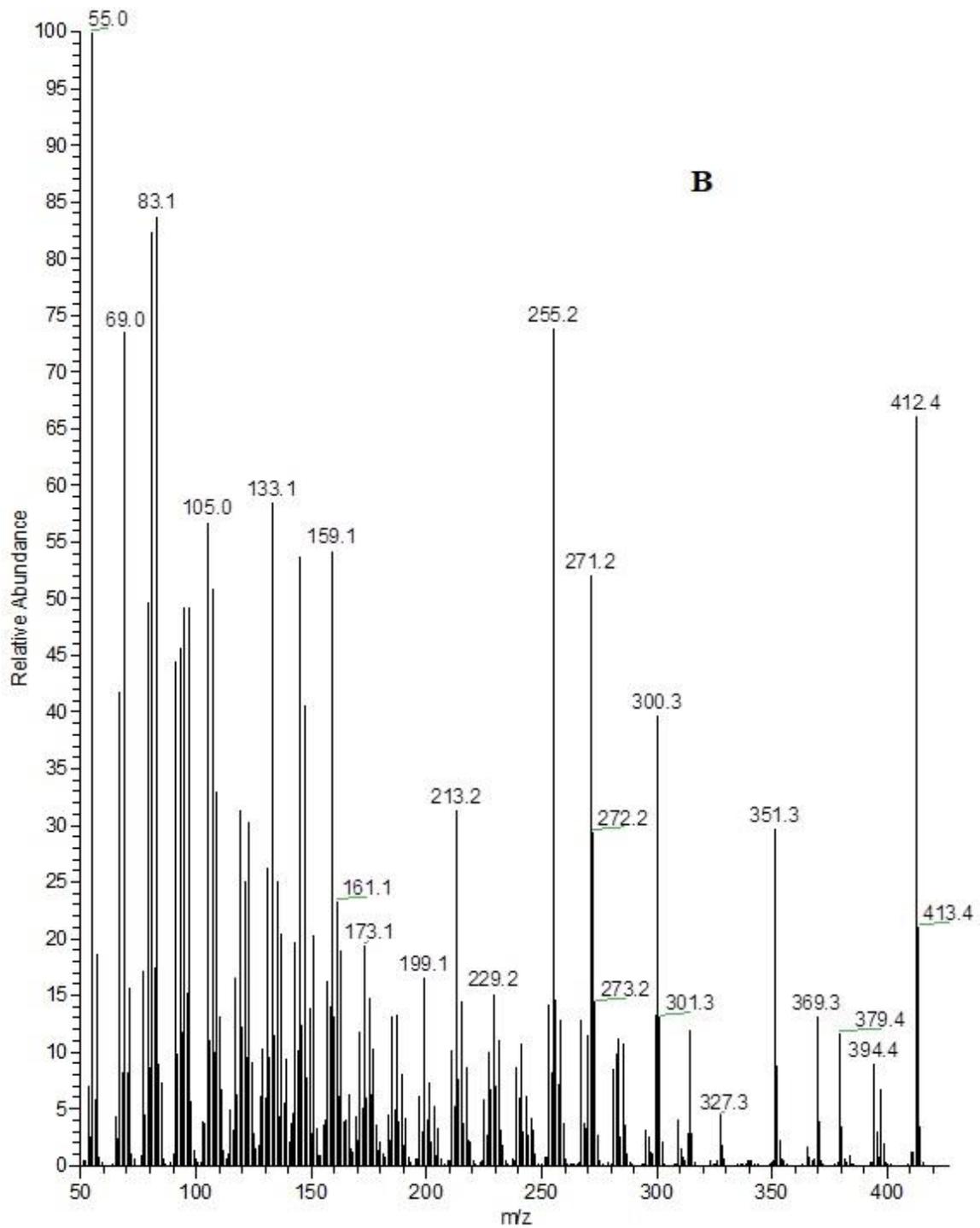
Les données sont présentées comme la moyenne (de trois mesures) ± l'écart type. Les barres suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil  $\alpha=5\%$ . Les CRs sont cultivés dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu  $\frac{1}{2}$  B5 liquide.

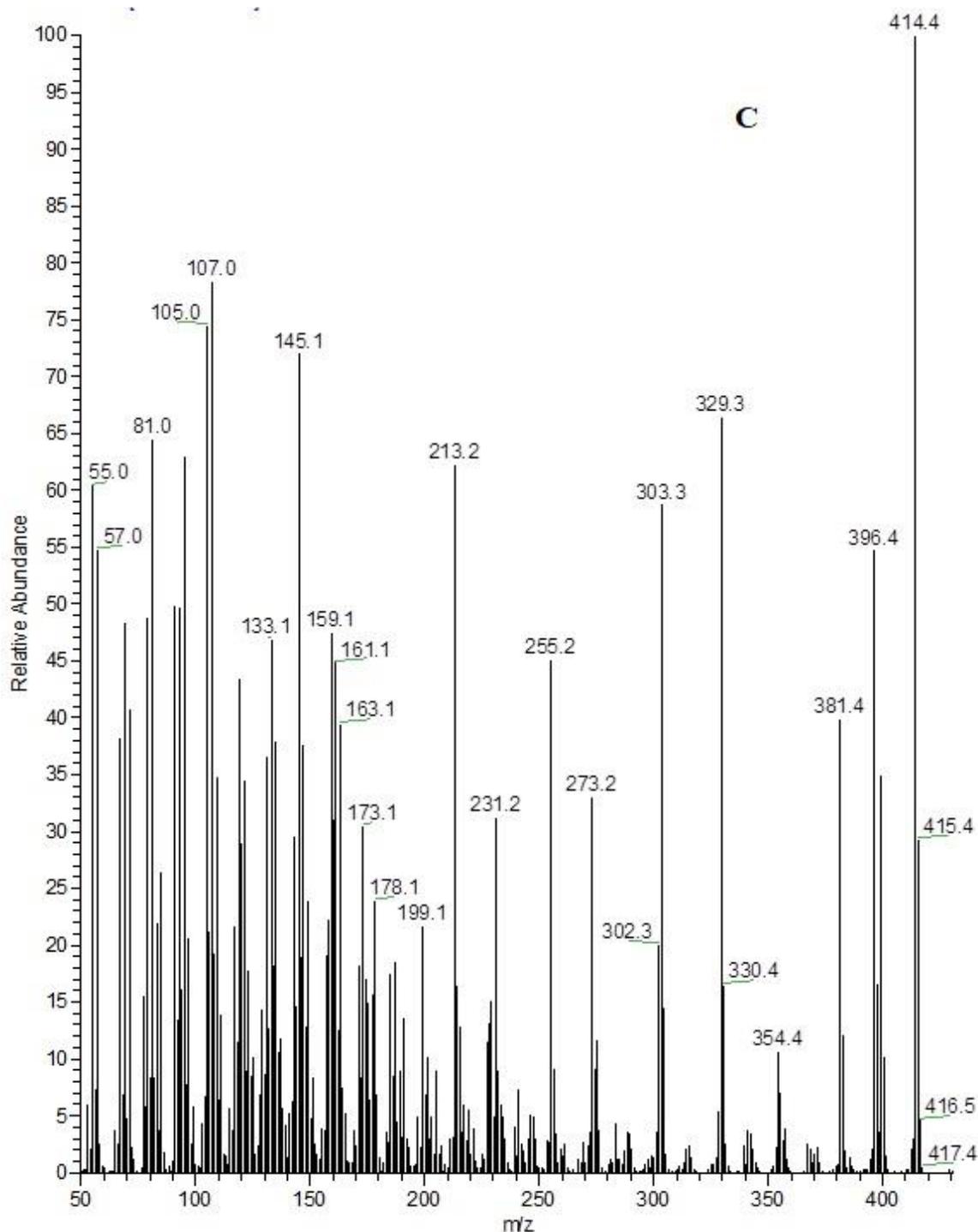
La figure (45) illustre le Chromatogramme GC/MS obtenu en mode SIM de campestérol, de stigmastérol et de  $\beta$ -sitostérol. Alors que les spectres de masse de ces phytostérols sont représentés en figure (46).



**Figure 45 :** Chromatogramme GC/MS obtenu en mode SIM de campestérol, de stigmastérol et de  $\beta$ -sitostérol







**Figure 46 :** Spectre de masse du A : campestérol, B : stigmastérol et C :  $\beta$ -sitostérol

Sur la base des résultats obtenus en 6.1. et 6.2. la lignée racinaire HR4 s'est montrée comme la plus efficace en termes de production de biomasse et de phytostérols. Elle est ainsi sélectionnée pour l'étude de la cinétique de croissance et la cinétique d'accumulation de phytostérols.

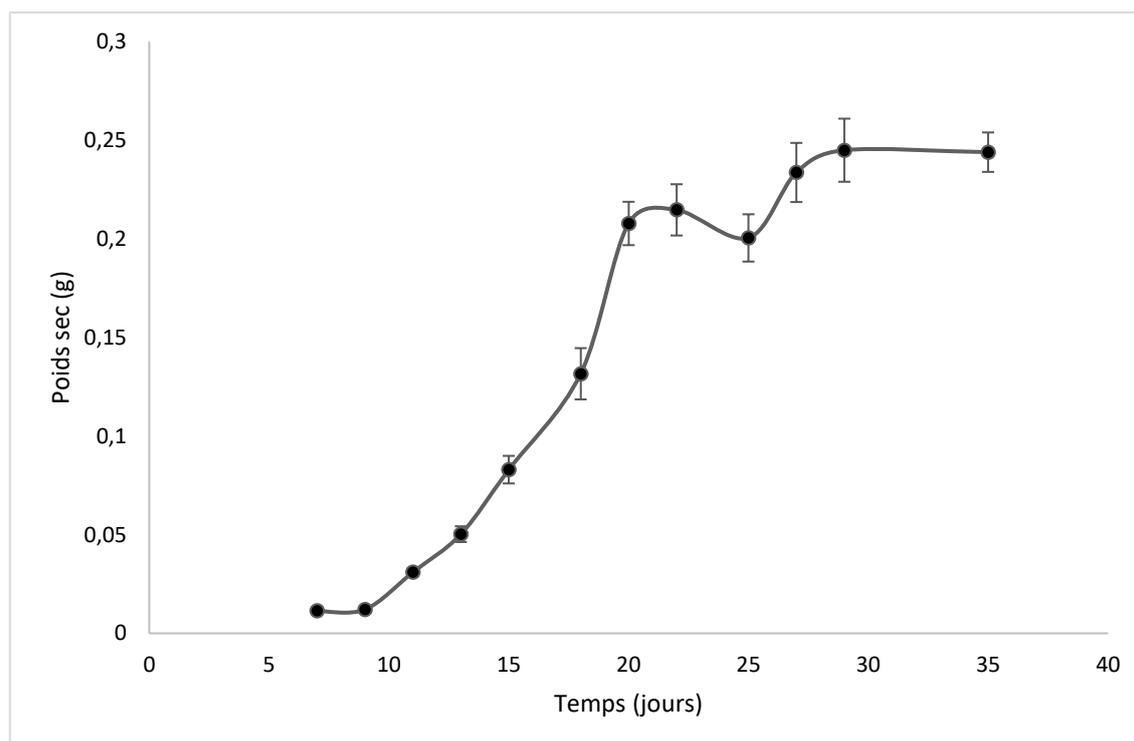
## **8. Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée HR4**

### **a. Cinétique de croissance de la lignée sélectionnée**

La figure (47) représente la courbe de croissance de la lignée HR4 cultivée en milieu liquide de ½ B5. Les résultats, montrent que

L'étude de la cinétique de croissance est basée sur la mesure du poids sec de la biomasse produite. Après une période de culture de 35 jours l'inoculum initial a atteint 0,244 g en fin de croissance, ce qui correspond à 4,88 g de matière sèche par litre de culture. La courbe de croissance obtenue présente trois phases

- La première phase s'étalant jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour de culture. Cette phase correspond à la phase de latence, relativement longue et faible en production de biomasse. Elle semble être due au très faible poids de l'inoculum initial. La croissance de la lignée racinaire à cette phase est faible à modérée, ce qui correspond à la phase d'adaptation des CRs au milieu et aux conditions de culture.
- La deuxième phase correspond à la phase de croissance exponentielle allant du 13<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de culture. Cette phase se caractérise par la croissance la plus rapide. Une accumulation de 0,208 g de matière sèche a été enregistré à la fin de cette phase.
- La troisième phase est la phase de ralentissement de la croissance, elle s'étale du 21<sup>ème</sup> jour jusqu'au 35<sup>ème</sup> jour. Elle est le résultat de l'épuisement du milieu de culture suite à la croissance massive en phase exponentielle.



**Figure 47** : Cinétique de croissance de la lignée HR4 sur milieu liquide  $\frac{1}{2}$  B5

Chaque point est la moyenne de trois répétitions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

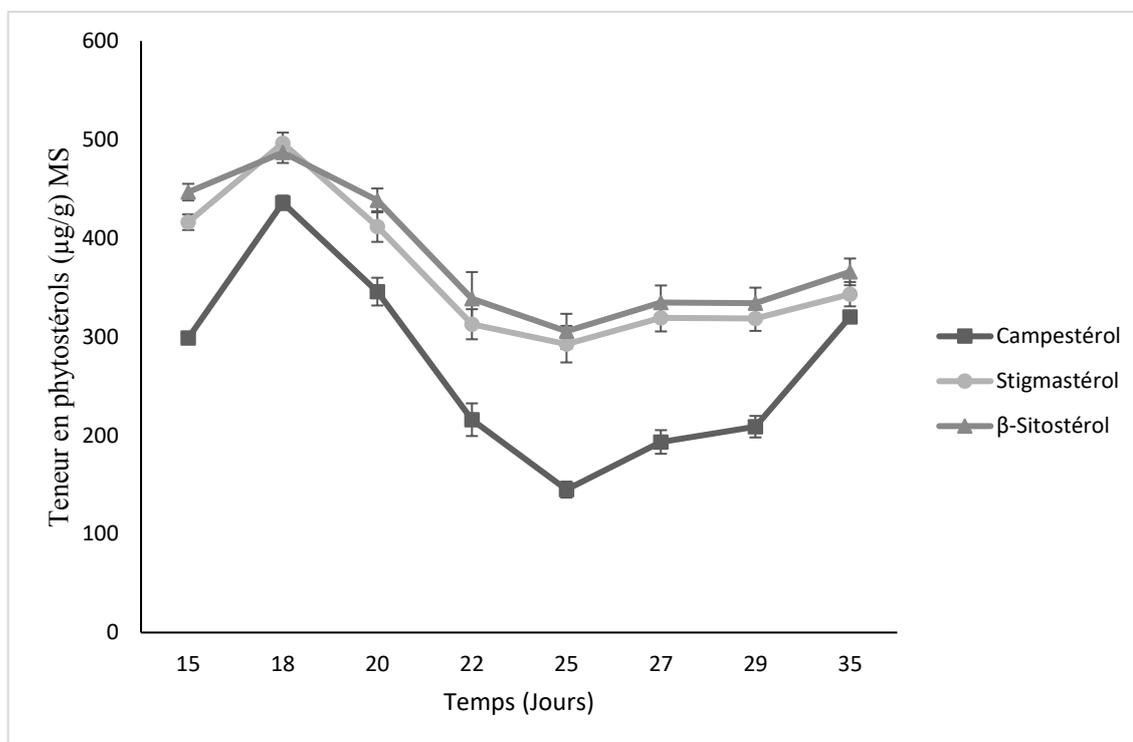
#### **b. Cinétique de production de phytostérols (campestérol, stigmastérol et $\beta$ -sitostérol) de la lignée sélectionnée**

Le campestérol, le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol sont identifiés dans la matière sèche de la lignée racinaire HR4 à l'aide de la GC-MS.

L'évolution de la production de ces trois composés est représentée sur la figure (48). Le profil des teneurs en campestérol, en stigmastérol et en  $\beta$ -sitostérol présente une accumulation entre le 15<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour de culture, puis une décroissance entre le 18<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour de culture et en fin une re-croissance entre le 25<sup>ème</sup> au 35<sup>ème</sup> jour de culture.

Les fluctuations subies par ces trois composés vont dans le même sens, mais à des degrés différents. De ce fait à chaque augmentation de la teneur en stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol correspond à une augmentation de la concentration en campestérol. Cependant, on peut observer que les teneurs en campestérol sont toujours nettement inférieures à celles du stigmastérol et du  $\beta$ -sitostérol.

En effet, le pic d'accumulation de campestérol, de stigmastérol et de  $\beta$ -sitostérol (435,9  $\mu\text{g/g}$  M.S., 496,4  $\mu\text{g/g}$  M.S. et 486,9  $\mu\text{g/g}$  M.S. respectivement) a été enregistrée au 18<sup>ème</sup> jour de culture. Ceci coïncide avec la phase exponentielle de croissance chez cette lignée.



**Figure 48 :** Cinétique d'accumulations de phytostérols (campesterol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) de la lignée HR4

Chaque point est la moyenne de trois répétitions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

## 9. Effet nématocide de l'extrait aqueux de *C. procera*

### a. Evaluation de la toxicité de l'extrait aqueux à partir de *C. procera* sur les larves (L2) de *Meloigogyne* spp.

L'activité nématocide des extraits aqueux de CRs, de feuilles et de racines naturelles de *C. procera* a été testée *in vitro* sur des larves (L2) de *Meloigogyne* spp. Les résultats sont illustrés dans le tableau (4).

L'observation sous loupe binoculaire des larves (L2) juste après l'application des traitements a mis en évidence un effet choc instantané, ce qui suggère un effet nématocide très élevé.

D'après le tableau (4), il apparaît que tous les traitements appliqués, quelle que soit la dose, des extraits de *C. provera* sont hautement efficaces et ont pu occasionner 100 % de mortalité des larves L2 après 24 h, à l'exception des traitements à l'extrait de racines naturelles où des pourcentages légèrement inférieurs ont été enregistrés, et ce, à la dose pure P et ses dilutions P/2 et p/4 (92%, 90% et 88% respectivement). Ceci est en comparaison avec le témoin négatif présenté par l'application de l'eau distillée stérile.

**Tableau 4 :** Effet des extraits aqueux de *C. procera* sur le taux de mortalité des larves (L2) des *Meloidogyne* spp.

P : Dose pure, P/2 : Demi dose, P/4 : Quart dose

Traitements	Dose appliquée	Pourcentage de mortalité dans le temps %		
		24h	48h	72h
Témoin	P	1	1	2
	P/2	1	1	2
	P/4	1	1	2
HR1	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR2	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR3	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR4	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR5	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR6	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
HR7	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100
Extrait de racines naturelles	P	92	97	98
	P/2	90	93	95
	P/4	88	90	91
Extrait de Feuilles naturelles	P	100	100	100
	P/2	100	100	100
	P/4	100	100	100

Dans le but de bien estimer l'effet des traitements appliqués sur le pourcentage de mortalité des larves (L2) de *Meloidogyne* spp., nous avons fait recours au Modèle Linéaire Général (G.L.M.). Ce test a permis de déduire que les traitements des extraits aqueux de *C. procera* varient très significativement selon l'origine de la matière végétale ( $p= 0.000$ ) et la dose appliquée ( $p=0.000$ ) après 24h, 48h et 72h de contact. Les résultats du test G.L.M. sont illustrés dans le tableau (5).

Les diagrammes de profil établis par SPSS montrent un effet similaire entre les extraits des lignées HR1-HR7 et les extraits de feuilles, alors que les extraits de racines naturelles présentent une activité nématocide inférieure (Figure 49). De même l'application de la dose pure entraîne un effet plus remarqué que les dilutions  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$ .

Les résultats positifs issus de l'application des extraits aqueux de *C. procera* sur la mortalité des larves (L2) laisse suggérer que ses différentes parties contiennent des molécules solubles dans l'eau très toxiques pour les nématodes à galle.

**Tableau 5 :** Modèle G.L.M. appliqué à l'activité nématocide des différents traitements à différentes doses utilisées

	Source	Somme des carrés de type III	d.d.l.	Moyenne des carrés	F-ratio	P
24h	Traitements	104554,800	9	11617,200	174258,000	,000
	Dose	3,200	2	1,600	24,000	,000
48h	Traitements	104716,800	9	11635,200	174528,000	,000
	Dose	7,200	2	3,600	54,000	,000
72h	Traitements	102817,200	9	11424,133	171362,000	,000
	Dose	12,800	2	6,400	96,000	,000

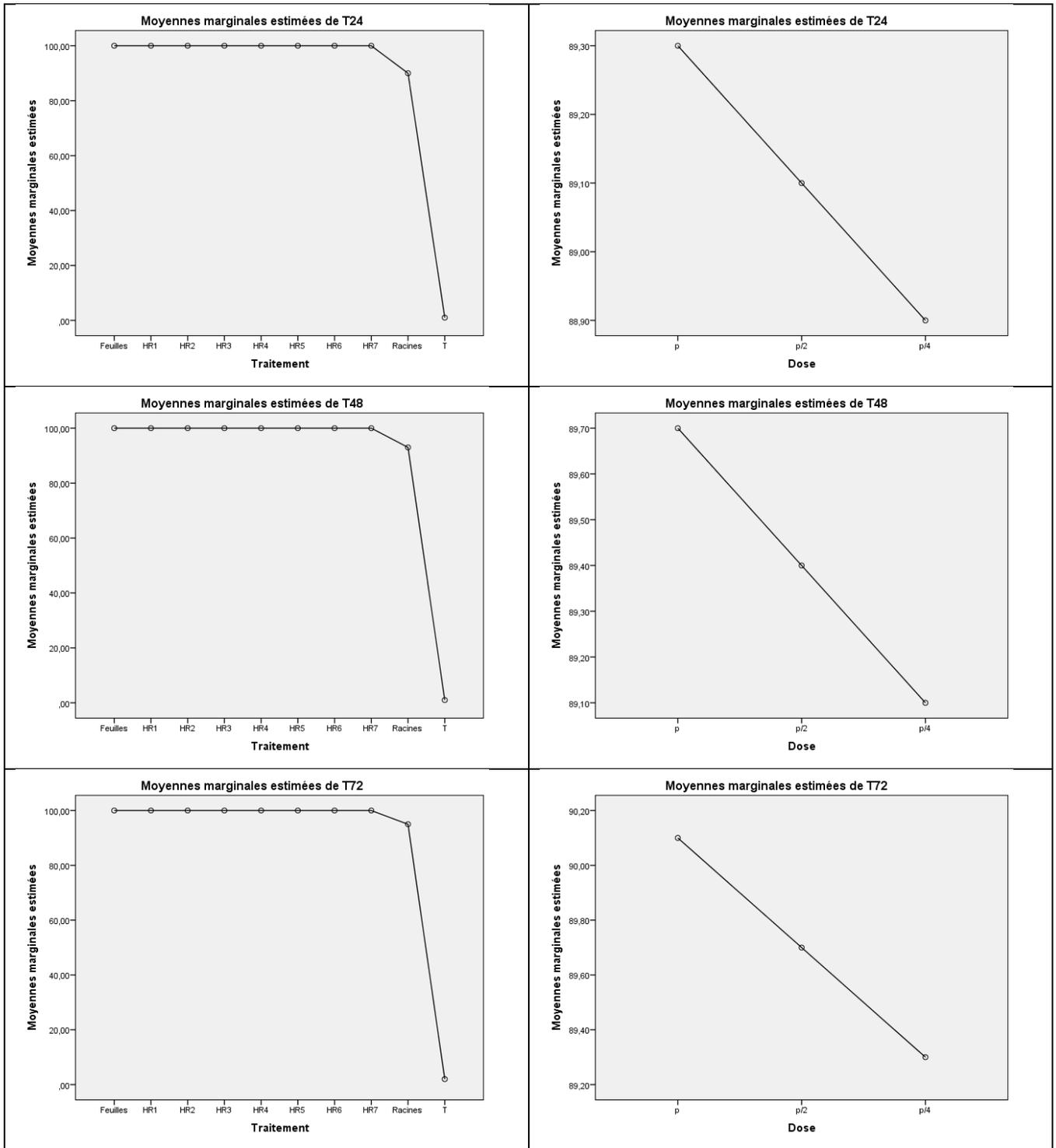


Figure 49 : Diagramme de toxicité des extraits de *C. procera* en fonction du type de traitement et de la dose appliquée

**b. Etude de la réversibilité de l'effet des extraits aqueux de *C. procera* appliqués sur les larves (L2) de *Meloigogyne* spp.**

Dans le but de déterminer si les extraits exercent un effet nématocide ou nématostatique, une étude de l'irréversibilité des extraits aqueux de *C. procera* a été développée *in vitro* sur les larves (L2) de *Meloigogyne* spp. Après 72h de traitement, les larves sont lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les larves revitalisées sont comptées après 24h.

Les résultats de la revitalisation montrent que les larves (L2) traitées par les différents extraits aqueux de *C. procera* (sept lignées de CRs, feuilles et racines naturelles), quel que soit leur dose utilisée, ne montrent en aucun cas une revitalisation. Ce qui prouve que ces extraits n'ont pas un effet réversible et possèdent donc un effet nématocide réel.

## **DISCUSSION DES RESULTATS**

Actuellement, les CRs de nombreuses espèces végétales peuvent être considérées, non seulement, comme un outil efficace pour la production de composés phytochimiques, mais aussi, comme des modèles expérimentaux appropriés pour les enquêtes sur les mécanismes de régulation du métabolisme des plantes (Rogowska & Szakiel, 2021; Stiles & Liu, 2013).

### **1. Obtention du matériel végétal**

Dans la présente étude, la désinfection des graines de *C. procera* est réalisée avec succès en utilisant de l'éthanol 70% (v/v) pendant 1 min, suivi d'un trempage pendant 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO à 2,6 % de chlore actif). Ce protocole est efficace pour éviter toute contamination (Benmahioul et al., 2009) des graines de *C. procera*. Plusieurs études sur la désinfection des graines à l'aide de l'hypochlorite de sodium ont été rapportées. Une longue durée de contact peut entraîner la mort des cellules et nuire à la viabilité des graines (Akbari et al., 2012).

Nous avons testé aussi le pouvoir germinatif des graines de cette plante et nous avons enregistré un taux de germination maximal de 100 %. Cette importante faculté germinative est due à la tolérance des graines de *C. procera* aux différents facteurs environnementaux. Cette caractéristique assure la large diffusion de cette espèce végétale dans les écosystèmes les plus extrêmes (Leal et al., 2013).

### **2. Initiation des CRs**

Le but de cette partie d'étude est de développer pour la première fois un protocole d'induction de CRs en utilisant une variabilité de tissus végétaux en faisant varier leur âge, le milieu de co-culture et les souches bactériennes.

- **Effet de l'âge des explants**

Nos résultats montrent que la réponse des explants d'hypocotyles varie selon l'âge des explants. Les explants les plus jeunes âgés de 30j présentent une induction des CRs plus élevée que les plus âgés (45j et 60j). En effet, il a été démontré chez de nombreuses espèces végétales que l'âge de l'explant influence le processus de transformation médiée par *Agrobacterium* (Saravanakumar et al., 2012; Sujatha et al., 2013; Ahmadi Moghadam et al., 2014).

- **Effet du milieu de co-culture**

L'évaluation de l'influence du milieu de co-culture sur le taux d'induction des CRs montre une réponse variable d'un milieu à un autre. Le taux le plus élevé est enregistré en utilisant le milieu ½ B5. Certains travaux indiquent que la composition du milieu de co-culture comme la concentration en sels minéraux peut influencer le taux d'induction des CRs chez les plantes. Le taux d'induction de CRs augmente lorsque la co-culture est réalisée dans des milieux MS les moins concentrés en minéraux (½ MS et ¼ MS) (Inoguchi et al., 2003). Ceci serait dû à la prolifération accrue de *Agrobacterium* dans le milieu qui manque certains éléments c'est-à-dire le moins concentré puisque la forte présence de ces éléments nutritifs pourra inhiber l'expression des gènes de virulence de la bactérie (Sharafi et al., 2014).

- **Effet de la souche bactérienne et de la nature des explants**

La fréquence d'induction de CRs varie significativement selon la souche bactérienne utilisée. Des études antérieures ont rapporté l'influence de la variabilité des souches de *A. rhizogenes* sur l'aptitude d'induction de CRs (Tao & Li, 2006; Tavassoli & Safipour Afshar, 2018; Sahayarayan et al., 2020). Cela peut être dû aux différents niveaux de virulence présents chez les différentes souches, ainsi qu'aux différences dans l'intégration de l'ADN-T dans les cellules végétales et le nombre de copies de transgènes transférées (Mehrotra et al., 2015).

Dans notre cas, la souche A4 est la souche bactérienne la plus efficace pour induire des CRs de *C. procera*, et ce, quel que soit le type d'explants. La souche A4 est largement utilisée pour l'induction des CRs de nombreuses plantes (Amdoun et al., 2008; Harfi et al., 2013, 2018). Des études similaires ont enregistré une fréquence d'induction racinaire plus élevée avec la souche A4 par rapport à la souche ATCC 15834 (Skała et al., 2015; Kabirnatay et al., 2016; Makowczyńska et al., 2021).

Des réponses variables des différents types d'explants vis-à-vis de la même souche de *A. rhizogenes* sont notées. Les explants de feuilles sont les plus réactifs quant à l'induction des CRs à partir des sites blessés. La variabilité des réponses des différents tissus végétaux à la transformation par *A. rhizogenes* a déjà été répertoriée en termes d'induction de CRs chez *Papaver bracteatum* (Sharafi et al., 2013), chez *Momordica charantia* (Thiruvengadam et al., 2014), chez *Cucumis anguria* (Yoon et al., 2015) et chez *Catharanthus roseus* (Benyammi et al., 2016).

La nature de l'explant joue donc un rôle important dans le succès de la transformation génétique. Généralement, les feuilles constituent un tissu végétal de choix pour la transformation par *A. rhizogenes*, elles sont plus réactives que les autres explants (Sujatha et al., 2013). Les variations de réponses des explants vis-à-vis de la même souche de *A. rhizogenes* seraient dues à l'interaction entre les génotypes, de la plante et de la souche de *A. rhizogenes*, et ce, en termes d'expression du gène *rolB*. Chaque type d'explant exprime les gènes *rol* différemment (Sudha et al., 2013; Park, 2021). L'effet des gènes *rol* sur l'altération de l'équilibre cytokinine/auxine est déjà démontré (Hamill, 1993). Cela signifie que la prédisposition des explants à la transformation génétique par *A. rhizogenes* dépend de l'état physiologique et de l'anatomie des différents tissus dans la même plante.

En addition de l'effet des souches bactériennes et du type d'explant sur la fréquence d'induction de racines, nos résultats montrent que les souches de *A. rhizogenes* utilisées et la nature du tissu végétal influencent également le nombre de racines induites au niveau du site blessé.

La souche A4 donne un nombre de racines induites plus important que la souche ATCC 15834. Certaines recherches menées sur différentes espèces végétales ont montré un nombre de racines induites variable lors de l'utilisation de différentes souches de *A. rhizogenes* tels que les essais d'induction réalisés sur *Catharanthus roseus* (Benyammi et al., 2016). Les explants de feuilles et de cotylédons présentent un nombre plus élevé de CRs que les explants d'hypocotyle. Ces données sont en accord avec les travaux antérieurs. Le statut physiologique du tissu de l'explant peut jouer un rôle important dans le nombre de racines transgéniques induites (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2018; Lokhande et al., 2015).

L'intégration de l'ADN-T du plasmide Ri de *A. rhizogenes* dans l'ADN génomique des CRs (lignées racinaires sélectionnées) est confirmé à l'aide de l'amplification du gène *rolB* par la PCR. Le fragment du gène *rolB* est observé dans l'ADN amplifié chez les sept lignées sélectionnées, ce qui confirme la nature transgénique des lignées racinaires sélectionnées.

Des études précédentes ont utilisé le gène *rolB* de manière similaire pour confirmer la nature transgénique de plusieurs plantes (Benyammi et al., 2016; El-Esawi et al., 2017; Moussous et al., 2018; Nakasha et al., 2017; Ya-ut et al., 2011). Le gène *rolB* est déjà connu pour son rôle crucial dans l'induction des CRs à partir de tissus végétaux (Aoki & Syono, 1999). En plus de ce rôle majeur dans le développement des CRs, le gène *rolB* est impliqué

dans l'augmentation de la production des métabolites secondaires chez les CRs (Shkryl et *al.*, 2008).

### **3. Profilage chimique**

#### **3.1. Profilage chimique par GC-MS**

Plusieurs études antérieures ont rapporté la composition chimique des feuilles, du latex et des fruits de *C. procera* par analyse GC-MS (Doshi et *al.*, 2012; Chandrawat & Sharma, 2015; Naser et *al.*, 2019). A notre connaissance, il s'agirait de la première analyse chimique des CRs de *C. procera*.

L'analyse chromatographique des extraits de CRs de *C. procera* par GC-MS a mis en évidence trente-six composés bioactifs de différentes classes métaboliques, à savoir : des acides gras, des stérols, des terpènes, des alcanes, des esters et autres. Certains de ces molécules sont déjà détectés dans différentes parties de la plante. Notre étude montre que les plus importants métabolites secondaires présents dans la culture des CRs sont l'acide palmitique, l'acide linoléique, le stigmastérol, le  $\beta$ -sitostérol, le campestérol, le squalène, le tocophérol (vitamine E) et le tricosane.

L'acide palmitique, l'acide linoléique et d'autres acides gras ont été déjà détectés chez *C. procera* (Pattnaik et *al.*, 2017; Waheed et *al.*, 2016; Naser et *al.*, 2019). Ces acides gras et leurs dérivés sont connus pour leurs propriétés antibactérienne, antivirale, anticancéreuse et anti-athérosclérotique (Yff et *al.*, 2002; den Hartigh, 2018).

Des investigations antérieures ont montré la présence de stérols dans cette plante tels que le stigmastérol, le  $\beta$ -sitostérol et le campestérol (Chandrawat & Sharma, 2015; Chundattu et *al.*, 2016). Plusieurs activités du stigmastérol ont été décrites en littérature telles que l'activité antioxydante, anti-tumorale et anti-inflammatoire (Kaur et *al.*, 2011). Kushwaha et *al.* (2019) ont étudié l'efficacité antifilarienne du  $\beta$ -sitostérol des fleurs de *C. procera*. Tandis que Paniagua-Pérez et *al.* (2008) ont inspecté le potentiel immunostimulant de ce composé. En outre, l'activité antifongique de ces trois stérols a déjà été prouvée (Choi et *al.*, 2017).

Alhazmi et *al.* (2018) et Naser et *al.* (2019) ont révélé la présence de squalène à partir d'extrait de feuille de *C. procera*. Ce composé est largement utilisé comme composant principal des émulsions parentérales pour l'administration de médicaments et de vaccins (Fox, 2009). Narayan Bhilwade et *al.* (2019) ont rapporté que le squalène réduit

l'inflammation en indiquant son potentiel en tant qu'adjuvant en chimiothérapie chez des souris porteuses de tumeurs.

Des observations antérieures ont rapporté aussi la présence de tocophérol (vitamine E), de tricosane, d'esters et d'alcanes (Doshi et *al.*, 2012; Alhazmi et *al.*, 2018; Naser et *al.*, 2019). Le tricosane et les alcanes ont été signalés pour leur effet antibactérien (Habtamu & Melaku, 2018).

Par conséquent, la présence de toutes ces molécules indique que les CRs de *C. procera* peuvent jouer un rôle majeur en tant que source de matériel biologique pour la production d'agents anti-inflammatoires, antibactériens, antifongiques, anti-ulcératifs et anti-tumoraux (Awad et *al.*, 2003; Berger et *al.*, 2004).

Ainsi, les propriétés thérapeutiques des composés chimiques détectés dans cette étude justifient bien la large utilisation des racines de *C. procera* en médecine traditionnelle. Des recherches supplémentaires sont cependant, nécessaires pour améliorer le rendement des CRs en molécules bioactives et pour leur purification.

Des recherches plus poussées sur les voies des gènes et des enzymes de ces molécules seront cruciales pour comprendre leurs voies de biosynthèse et pour décrypter les mécanismes impliqués dans leurs régulations au niveau du génome, du protéome et du métabolome.

### **3.1. Profilage chimique des glycosides cardiaques par UHPLC-QTOF/MS**

La caractérisation des glycosides cardiaques de l'extrait éthanolique des CRs de *C. procera* par UHPLC-QTOF/MS en mode d'ionisation positive a permis de mettre en évidence l'identification de dix molécules bioactives.

Le composé (1) est identifié comme étant de la **calotropagénine**. Nos résultats sont en accordance avec l'identification proposée par (Pandey et *al.*, 2016) pour cette molécule. Ce composé a été déjà identifié à partir de *C. procera* (Hassal & Reyle, 1959; Kumar et *al.*, 2019). La calotropagénine est un glycoside cardiaque; connu pour son puissant effet anticancéreux en raison de son activité inhibitrice transcriptionnelle du HIF-1 (un facteur de transcription très impliqué dans le développement du cancer) (Lopez-Lazaro, 2009) contre la lignée cellulaire T47D (Zheng et *al.*, 2021). Selon des études antérieures, la calotropagénine a démontré un potentiel antihépatocytotoxique important. La CI50 pour la calotropagénine s'est avérée être de  $10,40 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$  (Al-Taweel et *al.*, 2017).

Le composé (2) est caractérisé comme de la **calotoxine** et sa présence a été signalée chez *C. procera* par plusieurs chercheurs (Kumar et al., 2019; Seiber et al., 1982; Zheng et al. 2021). Il a également été suggéré que ce composé a aussi un puissant effet anticancéreux (Zheng et al., 2021). La calotoxine peut être utilisée pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la kinase des cellules T inductibles par l'interleukine-2 (ITK), qui peuvent avoir de vastes applications thérapeutiques en tant qu'immunosuppresseurs et en tant que médicaments anticancéreux (Parthasarathy et al., 2021).

Le composé (3) est reconnu comme **frugoside**. Ces résultats corroborent avec ceux publiés par Pandey et al. (2016). Le frugoside est précédemment isolé des racines de *C. procera* et a montré une importante activité inhibitrice de croissance *in vitro* contre les cellules cancéreuses humaines (Ibrahim et al., 2014; Zheng et al., 2021). Il a été démontré que le frugoside inhibe l'activité des peroxyrédoxines en régulant à la baisse de l'expression de la sulfirédoxine. L'accumulation résultante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation stimulée de p-p38 ont entraîné la mort médiée par les mitochondries de deux lignées cellulaires de mélanome humain (M14 et A375). Ils ont inversé ce phénotype par la surexpression de la sulfirédoxine ou la stimulation des antioxydants. L'effet sur la croissance tumorale a été confirmé dans des tests de xénogreffe (Song et al. 2019).

Le composé (4) correspond à la **coroglaucigénine**. Cette identification confirme également celle obtenue par Pandey et al. (2016). Cette molécule est isolée et identifiée dans différentes parties de *C. procera* (Rajagopalan et al., 1955; Kumar et al., 2019). Dans la littérature, la coroglaucigénine est connue pour son action anticancéreuse colorectale *in vitro* et *in vivo* (Huang et al., 2018). Elle est considérée aussi comme sensibilisateur potentiel pour la radiothérapie anticancéreuse, qui non seulement inhibe la prolifération des cellules cancéreuses, mais améliore également la radiosensibilité des cellules cancéreuses en supprimant l'expression de molécules antioxydantes (Sun et al., 2017).

Le composé (5) correspond à la **calotropine**. Les données de la présente étude sont compatibles avec celles obtenues par Crout et al. (1964) et Pandey et al. (2016). Ce composé a été révélé à partir de différentes parties de *C. procera* dans des études antérieures (Bruschweiler et al., 1969; Seiber et al., 1982; Alzahrani et al., 2017; Kumar et al., 2019). La calotropine possède une activité antitumorale significative (Li et al., 2009; Ibrahim et al., 2014; Zheng et al., 2021). La cytotoxicité de la calotropine contre diverses lignées cellulaires d'origine humaine et murine a été vérifiée. Elle présente une sélectivité de lignée cellulaire similaire pour les glycosides cardiaques tels que la digoxine et l'ouabaïne (Kiuchi et al.

1998). Zhou et *al.* (2019) révèlent que la calotropine empêche la croissance tumorale et active un rôle protecteur de la protéine YAP (*Yes-associated protein*) dans les cellules cancéreuses colorectales, suggérant qu'une approche potentielle du traitement du cancer colorectal pourrait impliquer la combinaison de calotropine et les médicaments ciblant la protéine YAP. Elle peut également être utilisée pour le traitement des maladies auto-immunes en tant que composé médicinal (Liu, et *al.* 2018).

Le composé (6) correspond à la **calactine** qui est déjà rapportée chez *C. procera* (Baabad et *al.*, 2019). Cette identification est similaire à celle publiée par Kanojiya & Madhusudanan (2012). Il a été rapporté que la calactine présente une activité inhibitrice de croissance élevée contre les lignées cellulaires humaines A549 et Hela avec des valeurs de CI50 de (0,036  $\mu\text{M}$ , A-549) et (0,083  $\mu\text{M}$ , Hela) (Mohamed et *al.* 2015). Elle est capable d'inhiber la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase plus fortement que l'ouabaïne (Petschenka, et *al.* 2018). Cette substance peut être utilisée comme molécule principale pour la création de nouveaux inhibiteurs de l'ITK, qui peuvent avoir un large éventail d'utilisations thérapeutiques comme immunosuppresseurs et médicaments anticancéreux (Parthasarathy et *al.*, 2021).

Le composé (7) correspond à l'**uzarigénine**. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Pandey et *al.*, 2016; Bader et *al.*, 2021). L'uzarigénine a déjà été isolée à partir de *C. procera* (Shaker et *al.*, 2010), et a été signalée pour sa capacité à inhiber la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de la même manière que son isomère  $5\beta$  digitoxigénine (Farr et *al.*, 2002; Petschenka et *al.*, 2018). Cela fait de l'uzarigénine l'un des meilleurs médicaments pour le traitement des maladies cardiaques (Tomilova et *al.*, 2022). À une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , l'uzarigénine diminue l'activité métabolique des cellules HT29 et HepG2 de 59 % et 35 %, respectivement (Shaker et *al.*, 2010). Selon les observations faites par Navarro et *al.* (1985) l'uzarigénine a une efficacité inotrope positive comparable à celle de la digitoxigénine.

Le composé (8) correspond à l'**asclépine** déjà signalée par Bader et *al.* (2021). L'asclépine a été identifiée dans l'extrait méthanolique du latex de *C. procera* (Kumar et *al.*, 2019). Des études antérieures ont prouvé l'effet cardiaque de l'asclépine. Cet effet s'est avéré plus actif que la g-strophanthine, la digoxine, la digitoxine et la digitoxigénine (Patnaik & Köhler, 1978). Ce composé présente une forte activité cytotoxique contre deux lignées cellulaires cancéreuses (HepG2 et Raji) avec une valeur CI50 de 0,02  $\mu\text{M}$  (Li et *al.*, 2009).

Le composé (9) correspond à l'**uscharidine**, un glycoside cardiaque déjà identifié chez *C. procera* (Crout et *al.*, 1964; Kumar et *al.*, 2019). Une activité antitumorale significative

est décrite pour cette molécule, présentant une activité cytotoxique avec une valeur CI50 de 0,38  $\mu$ M et 0,02  $\mu$ M contre les lignées cellulaires HepG2 et Raji respectivement (Li et al., 2009).

Le composé (10) est identifié comme étant l'**uscharine** déjà identifié aussi par Bader et al. (2021). Les recherches précédentes ont détecté ce composé dans diverses parties de *C. procera* (Bruschweiler et al., 1969; Kumar et al., 2019). Il a été démontré que l'uscharine a un effet inhibiteur significatif sur l'activité de HIF-1 plus puissant que la digoxine (Parhira, et al. 2014). Cette molécule a présenté des effets cytotoxiques sensiblement plus forts (CI50 de 16,61-73,48 nM) sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, notamment HCT116, HeLa, HepG2, A549, MCF-7, A2780 et MDA-MB-231, ce qui suggère qu'elle présente un potentiel anticancéreux (Zheng, et al. 2021). Il a également été rapporté que l'uscharine présentait un traitement potentiel des maladies neurodégénératives grâce à l'accélération de la différenciation neuronale des cellules souches neurales (CSN) (Yoneyama et al., 2017). De même, ce composé a présenté un puissant effet molluscicide contre les escargots terrestres. Il a été démontré que l'uscharine peut être 128 fois plus toxique que le méthomyl contre l'escargot terrestre *Theba pisana* (Hussein, et al. 1994).

Au final, nous pouvons conclure que les glycosides cardiaques isolés et identifiés dans cette étude sont connus tous pour leur activité anticancéreuse. Certaines molécules possèdent une activité inhibitrice transcriptionnelle du HIF-1. Alors que d'autres, cas de l'asclépine présentent une activité anticancéreuse par un effet antagoniste au facteur ROR $\gamma$ t (Facteur principal de transcription de l'expression de la cytokine IL-17 et de la différenciation des lymphocytes Th17, qui sont responsables de l'induction de nombreuses maladies auto-immunes) (J. Liu et al., 2019). De même, la plupart de ces molécules possèdent un effet cardiaque en inhibant la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de la même manière que les digitoxines.

#### **4. Croissance des CRs et production de phytostérols**

Chaque lignée racinaire est un clone cellulaire, elle résulte d'un évènement de transformation unique qui peut se distinguer des autres en montrant une grande variabilité dans le nombre de copies, la position et la longueur de l'ADN-T intégré dans le génome de la plante hôte (Halder et al., 2018).

Les stérols sont des composants qui régulent la fluidité et la perméabilité de la membrane. Ils participent également au contrôle des processus métaboliques associés à la membrane, de sorte que des concentrations élevées de stérols peuvent modifier l'activité de

certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse des autres métabolites (Benveniste, 2002; Kreis & Müller-Uri, 2010).

En revanche, les phytostérols ont rarement été traités comme des métabolites d'intérêt pouvant être obtenus à partir de cultures de tissus végétaux *in vitro*. Un intérêt croissant pour ces métabolites a récemment fait surface en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine liés à leur capacité hypocholestérolémiante et à leurs propriétés putatives anti-diabétiques, anti-cancéreuses et anti-inflammatoires (Rogowska & Szakiel, 2021).

Nos résultats montrent que les lignées racinaires de *C. procera* (HR1-HR7) cultivées sur milieu liquide ½ B5 (3 % de saccharose) présentent une bonne croissance et une morphologie typique des CRs, mais dont le niveau de développement et de production de phytostérols (Campesterol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) après 20 jours de culture est différent pour les sept lignées. Une variation d'accumulation de biomasse et de métabolites secondaires a été rapportée précédemment entre différentes lignées racinaires transformées (Chaudhuri et al., 2005; Verma et al., 2007; Amdoun et al., 2008; Abhyankar et al., 2013; Benyammi et al., 2016; Grzegorzczuk-Karolak et al., 2018). Ces variations de croissance et d'accumulation de phytostérols observée entre les lignées racinaires de *C. procera* peut être expliquée par les variations de la présence et de l'expression des gènes *rol* A, B et C pour chaque lignée racinaire, ce qui pourrait altérer la biosynthèse des régulateurs de croissance endogènes ou la sensibilité des cellules végétales aux régulateurs de croissance (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2018). Les gènes *rol* semblent influencer la croissance des lignées racinaires en activant la transcription de certains gènes. Le gène *rol* B paraît l'activateur le plus vigoureux dans l'induction et la croissance racinaire (Gutierrez-Valdes et al., 2020). De nombreuses études ont souligné que la production de métabolites par les CRs dépend également de l'expression des gènes *rol* (Huang et al., 2014).

Toutes les lignées racinaires présélectionnées de *C. procera* ont produit des niveaux significativement plus élevés de phytostérols par rapport aux racines et aux feuilles récoltés sur du matériel naturel, particulièrement la lignée racinaire HR4 où des teneurs de 2,4 à 2,8 fois plus élevées par rapport aux racines naturelles sont enregistrées. Nos résultats rejoignent ceux de Verma et al. (2007) où la lignée sélectionnée de *Picrorhiza kurroa* a produit des quantités presque trois fois plus élevées de glycosides totaux par rapport à celles des racines non transformées. Les CRs sont déjà connus par leur aptitude à synthétiser un niveau plus

élevé de métabolites secondaires où des quantités comparables à celles des plantes à l'état naturel (Bathoju et al., 2017; Huang et al., 2014).

### **5. Cinétique de croissance et de production de phytostérols de la lignée sélectionnée**

La caractéristique majeure des lignées racinaires est leur capacité de produire des métabolites secondaires en même temps que la croissance. Il est donc possible d'obtenir une source continue de métabolites secondaires à partir des CRs en croissance active (Huang et al., 2014; Liu et al., 1998).

La production de métabolites secondaires à partir des cultures de CRs est influencée par plusieurs facteurs tels que les souches bactériennes, les lignées racinaires et la cinétique de croissance de ces lignées *in vitro* (Halder et al., 2018; Huang et al., 2014). A cet effet, une étude approfondie de la cinétique de croissance et de production des différents phytostérols de la lignée racinaire sélectionnée HR4 est nécessaire afin de mieux connaître les différentes phases de croissance et d'accumulation des métabolites. Cette étude permet de déterminer non seulement le moment de récolte et d'applications des éliciteurs mais aussi à définir le moment d'appliquer l'imperméabilisation.

Dans notre étude, la cinétique de croissance de la lignée sélectionnée est suivie sur la base de la mesure du poids sec de la biomasse produite durant un intervalle de 35 jours. A la fin de cette période la biomasse est multipliée presque 49 fois. La courbe de croissance de la lignée HR4 se décompose en trois phases :

Une phase de latence caractérisée par une faible accumulation de biomasse qui peut être expliquée par l'adaptation de la lignée racinaire au milieu de culture et aux conditions environnantes. De nombreux auteurs décrivent une phase de latence au début du cycle de développement des lignées racinaires telle que l'étude de Harfi et al. (2013) dans laquelle trois lignées racinaires issues de la transformation de trois espèces de *Datura* ont présenté une phase de latence. Benyammi et al. (2016) ont rapporté une faible croissance durant les premiers jours de culture des lignées racinaires de *Catharanthus roseus*.

Une phase de croissance exponentielle où la croissance des CRs suit une loi exponentielle où elle atteint son niveau optimal avec une accumulation de biomasse sèche de 0,208 g au 20<sup>ème</sup> jour de culture. Plusieurs recherches ont affirmé la croissance exponentielle des lignées racinaires (Katuri & Khanna, 2019; Murthy et al., 2008). Durant

cette phase les CRs produisent des ramifications latérales et donc le nombre de méristèmes apicaux augmente considérablement.

Une phase de ralentissement où la croissance diminue progressivement est au aussi observée. La phase de déclin peut être liée à l'épuisement d'un ou de plusieurs éléments nutritifs du milieu de culture suite à la croissance massive des CRs en phase exponentielle. Nous avons observé durant cette phase une coloration brune du milieu de culture et des CRs qui semble due à la présence des polyphénols oxydés originaires de tissus sénescents et qui sont très nuisibles pour les CRs.

Dans la présente étude, nous avons également quantifié les teneurs de la lignée racinaire HR4 en phytostérols à savoir le campestérol, le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol par GC-MS sur une période de culture de 35 jour. Ces trois molécules sont déjà identifiées et quantifiées à partir des CRs de plusieurs plantes telles que *Arabidopsis thaliana* (Jozwiak et al., 2013), et de *Artemisia* (Mottaki et al., 2019).

L'allure de la courbe d'accumulation des trois phytostérols étudiés est semblable mais à des niveaux d'accumulation différents entre les trois métabolites ( $\beta$ -sitostérol et stigmastérol, et ceux obtenus en campestérol). Ceci peut être expliqué par la présence du même point de branchement : 24-méthylènelophénol au niveau de la voie de biosynthèse des trois stérols. Par l'intermédiaire de différentes enzymes il se produit du campestérol, et de l'autre côté se produit du sitostérol et du stigmastérol (Carland et al., 2010).

Les pics d'accumulation des phytostérols par la lignée HR4 sont notés au 18<sup>ème</sup> jour de culture, pendant lequel des teneurs de 435,9  $\mu\text{g/g}$  M.S. de campestérol, 496,4  $\mu\text{g/g}$  M.S. de stigmastérol et 486,9  $\mu\text{g/g}$  M.S. de  $\beta$ -sitostérol sont enregistrées. Cette forte accumulation synchronise avec la phase exponentielle de croissance de la lignée HR4. La corrélation entre la phase exponentielle de la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires est déjà rapportée par plusieurs auteurs (Liu et al., 1998; Huang et al., 2014; Benyammi et al., 2016). Toutefois, certains auteurs ont mentionné que la production des métabolites secondaires était maximale lorsque la croissance s'arrête (phase plateau), le carbone n'est plus nécessaire en grande quantité pour le métabolisme primaire et les composés secondaires sont plus activement synthétisés (Bourgau et al., 2001; Harfi et al., 2013).

Par ailleurs, nous avons noté une décroissance de teneurs des phytostérols entre le 18<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour de culture et en fin une re-croissance entre le 25<sup>ème</sup> au 35<sup>ème</sup> jour de culture. Nous suggérons que ceci résulte de la compétition qui pourrait exister entre les

stéroïdes et les autres métabolites secondaires comme les terpénoïdes et les glycosides cardiaques puisque les précurseurs des différentes voies sont utilisés dans la synthèse de différents intermédiaires chez *C. procera* (Kaur et al., 2021; Pandey et al., 2016; Rogowska & Szakiel, 2021).

## **6. Effet nématocide de l'extrait aqueux de *C. procera***

Les plantes constituent une source riche de produits chimiques dérivés du métabolisme secondaire qui peuvent agir dans la défense contre les prédateurs et les microorganismes envahissants (Halder et al., 2018; Heinrich et al., 2021). L'étude des composés chimiques des CRs des plantes est importante pour l'identification de leurs constituants bioactifs, l'établissement de leur mode d'action et pour le développement de nouveaux produits biopesticides (Gutierrez-Valdes et al., 2020).

L'utilisation des extraits bruts pour lutter contre les organismes pathogènes et les insectes nuisibles des plantes commencent à prendre de l'ampleur dans le domaine de la lutte biologique. Certains auteurs ont mis en évidence un effet promoteur de l'utilisation des extraits de différentes parties de plantes pour lutter contre les nématodes à galles (Farzana et al., 2022; Sithole et al., 2021).

De nombreuses recherches ont mentionné le pouvoir nématocide élevé des molécules isolées à partir des extraits de plantes telles que les polyacétylènes, les esters carboxyliques, les acides gras, les acides aminés, les composés aromatiques, les hétérocycles à oxygène, azote ou soufre, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Certains composés sont isolés de différentes parties de plants de *Carthamus tinctorius*, *Hedera hélix*, *Tagetes patula*, *T. tenuifolia*, *T. erecta*, *Eclipta alba*, *Bocconia cordata*, *Sophora flavescens*, *Daphne odora* et *Artemisia maritima*. Ces composés testés pour leur activité nématocide sont : la saponine, le bithienyl, l'écliptine, la sanguinarine, la chélérythrine, la bocconine, les dérivés cytosine, l'anagryne, l'odoracine, l'odratine, la pyrolizidine et le lactone terpénoïque (Cayrol et al., 1992). Ces biomolécules appartenant à diverses familles chimiques peuvent être en partie responsables de l'activité nématocide obtenue, et ce, en totale concordance avec les résultats de notre expérimentation.

La présente étude peut être considérée comme la première à être menée sur l'activité nématocide de l'extrait aqueux de CRs de *C. procera*. Les résultats de l'évaluation de la toxicité de l'extrait aqueux à partir de *C. procera* sur les larves (L2) de *Meloigogyne* spp. ont montré que l'extrait aqueux des CRs présente une mortalité significative vis-à-vis de

*Meloidogyne* spp., qui a atteint 100 % pour l'ensemble des extraits de lignées racinaires (HR1-HR7).

De nombreux travaux ont illustré l'effet nématocide des extraits de plante (Sikder & Vestergård, 2020). Ainsi, nos résultats rejoignent ceux obtenus par Parihar et al. (2011) où l'extrait aqueux des feuilles, des fleurs et des graines de *C. procera* montre un potentiel nématocide important. L'utilisation de la concentration aqueuse standard s'est révélée hautement délétère pour les juvéniles du 2<sup>ème</sup> stade de *Meloidogyne incognita* et le pourcentage de mortalité est maximum. Farzana et al. (2022) ont rapporté que les extraits de *Piper betel*, de *Allium sativum* et de *Cassia fistula* aux concentrations de 5 et 10% ont montré des taux de mortalité de 76 à 98% 72 h après le traitement. Sithole et al. (2021) ont dévoilé que les extraits méthanoliques végétaux bruts de *Vernonia colorata* et *Citrus maxima* avaient une forte activité nématocide contre *M. incognita*. Toutefois, sont très rares les études utilisant les métabolites de CRs pour lutter contre les nématodes. Kyo et al. (1990) ont rapporté l'effet nématocide des extraits de CRs ( $\alpha$ -terthienyl) de *Tagetes patula* L.

L'efficacité de l'extrait aqueux des CRs de *C. procera* s'est avérée supérieure à celle des racines naturelles, mais reste similaire à celle de l'extrait des feuilles naturelles. Cela peut avoir résulté de l'accumulation importante de métabolites secondaires actifs dans les CRs par rapport à celle des racines naturelles. L'analyse chimique des racines naturelles et les CRs soutient également cette hypothèse, dans laquelle l'accumulation de métabolites secondaires dans les CRs est significativement plus élevée que dans la racine naturelle de la plante (Bathoju et al., 2017; Thiruvengadam et al., 2014).

Dans cette étude, nous avons cherché aussi à déterminer si les extraits aqueux de *C. procera* peuvent exercer un effet nématocide ou nématostatique par le test de revitalisation après 24h. Aucun traitement n'a montré une revitalisation, ce qui implique la confirmation de l'effet nématocide létal des métabolites issus des CRs de *C. Procera*.

Les principes actifs responsables de l'activité nématocide de *Calotropis procera* et le mécanisme d'action impliqué n'ont pas encore été élucidés. Plusieurs métabolites seraient à l'origine de la forte activité nématocide des extraits de *C. procera*, à l'instar des composés phénoliques, des alcaloïdes, des glycosides cardiaques, des stérols, des tanins, des flavonoïdes, des triterpénoïdes et des saponines (Rohit et al., 2012).

Etant que l'activité anti-nématode est confirmée par la présente étude, il serait judicieux de fragmenter l'extrait brut et d'identifier le composé actif responsable de cette

activité. Il est donc suggéré que d'autres recherches à grande échelle soient menées impliquant un grand nombre de nématodes, des doses inférieures à celles utilisées dans l'étude actuelle, l'identification des principes actifs et la standardisation des études de dose et de toxicité (envers les plantes) pour le développement de nouveaux bio-nématocides.

# **CONCLUSION GENERALE**

*Calotropis procera* est une espèce végétale très répondeuse en Algérie, utilisée pour traiter de nombreuses maladies et infections microbiennes dans la médecine traditionnelle. Cependant, les composés actifs responsables des effets biologiques de cette plante sont largement inconnus. L'utilisation des cultures de tissus et plus particulièrement les cultures de CRs issues d'une transformation par *Agrobacterium rhizogenes* constituent une voie prometteuse pour produire et étudier les molécules bioactives synthétisées par cette plante.

Les résultats de la présente étude présentent un protocole d'induction des CRs, leur maintien en culture, et la sélection d'une lignée racinaire (HR4) de *C. procera* à croissance rapide et à production élevée en métabolites secondaires. Ils permettent aussi de donner la liste des biomolécules appartenant à différentes classes métabolomiques susceptibles d'être produites par les CRs de *C. procera*, ainsi que leur pouvoir nématicide.

Dans ce travail, *C. procera* a montré une réponse positive à l'infection par *A. rhizogenes*, produisant des CRs sans la présence des régulateurs de croissance végétales exogènes. Les variations de l'âge des explants, de milieux de co-culture, de souches bactériennes et de types d'explants présentent un effet significatif en termes d'induction de CRs. Ainsi, le milieu ½ B5 est le milieu le plus approprié pour l'induction de ces chevelus. En outre, *C. procera* est plus sensible à la souche A4 par rapport à ATCC 15834. Les explants les plus réactifs pour une induction maximale de CRs sont les feuilles, suivis par les cotylédons et d'un degré moins les hypocotyles. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'induction des CRs est optimale et efficace en utilisant des explants des feuilles âgées de 30 jours, la souche A4 et le milieu ½ B5.

Les lignées racinaires obtenues ont conservé leur capacité de croissance et continuent de croître en tant que transformants stables pendant plus de cinq ans après leur induction. Cette propriété de nos lignées racinaires permettrait donc de les cultiver en bioréacteur pour une production industrielle de métabolites d'intérêt après une phase d'optimisation de culture dans ces nouvelles conditions.

La production de phytostérols (campesterol, stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) varie considérablement entre les sept lignées de CRs sélectionnées. Par ailleurs, la production de ces mêmes lignées racinaires en phytostérols est nettement supérieure à celle des racines et des feuilles non transformées de *C. procera*. De plus, l'étude de la cinétique de croissance

et de production de phytostérols de la lignée HR4 met en évidence une corrélation entre la production élevée en phytostérols et la phase exponentielle de sa croissance.

Par ailleurs, les cultures de CRs de la lignée HR4 sélectionnée de *C. procera* produisent une grande variété de stérols. La stabilité génétique des CRs (Lütken et al., 2017), faciliterait l'optimisation de leur croissance et leur rendement en stérols. En outre, la production de quantités significatives des différents stérols par les CRs de *C. procera* suggère leur utilisation pour l'étude des voies de biosynthèse des stérols. Ainsi, cette approche pourrait contribuer à produire des stérols et des glycosides cardiaques par voie biotechnologique et en quantités suffisamment importante pour des usages médicaux.

Le screening phytochimique par GC-MS des CRs de *C. procera* a montré l'existence de trente-six composés aux structures chimiques variables qui sont responsables de nombreuses activités biologiques. Les plus importants sont l'acide palmitique, l'acide linoléique, le stigmastérol, le  $\beta$ -sitostérol, le campestérol, le squalène, le tocophérol et le tricosane. Ce travail souligne le potentiel de la métabolomique non ciblée pour fournir de meilleures informations et des descriptions complètes de la composition phytochimique des CRs par rapport aux approches ciblées.

Pour la première fois, une description détaillée des profils de glycosides cardiaques de cette espèce végétale est réalisée. À l'aide de l'analyse UHPLC-QTOF/MS, dix composés sont identifiés à partir de l'extrait éthanolique de nos CRs de *C. procera* à savoir : calotropagénine, calotoxine, frugoside, coroglaucigénine, calotropine, calactine, uzarigénine, asclépine, uscharidine et uscharine. Par conséquent, cette découverte préliminaire pourrait être très utile pour produire des extraits actifs, et l'approche que nous avons élaborée mérite donc une attention particulière en vue de produire de nouveaux métabolites à usage pharmaceutique (notamment les antimitotiques et les cardiotoniques) susceptibles de générer une forte valeur ajoutée.

Enfin, au cours de la présente étude, nous avons tenté à l'instar d'autres chercheurs à utiliser les extraits de CRs d'une plante médicinale comme source de molécule capable de réduire les populations de nématodes phytoparasites dans les sols agricoles. Les résultats obtenus à cet effet montrent une réelle activité nématicide. En effet, l'extrait aqueux des CRs de *C. procera* présente une mortalité significative (100 %) vis-à-vis des larves (L2) de *Meloigogyne* spp. Ce résultat reste stable quel que soit l'extrait de la lignée racinaire utilisée.

L'utilisation des extraits de CRs permettrait donc d'aider à lutter contre les nématodes en raison de leur teneur plus élevée en biomolécules à effet nématocide.

La présente étude se distingue des autres études réalisées sur *C. procera* car elle comprend plusieurs volets de recherche liés à la culture de CRs, au profilage phytochimique, à la découverte de nouvelles molécules potentiellement médicinales et nématocides. Ainsi, nous proposons en termes de perspectives :

- Faire une étude plus détaillée pour examiner les effets biologiques des glycosides cardiaques des racines, des feuilles, du latex et des graines de *C. procera*
- Faire recours à des techniques d'analyse chimique encore plus fines (telle que la résonance magnétique nucléaire) en vue de confirmer la détermination structurale des glycosides cardiaques après leur séparation et préparer les molécules standards
- Optimiser l'induction et la production des CRs et le choix de lignées performantes en termes de stérols et des glycosides cardiaques, et ce, par la modification de la composition du milieu de culture et l'utilisation des éliciteurs biotique et abiotique
- Entreprendre des études complémentaires pour valider les résultats relatifs aux effets nématocides de *C. procera*, et ce, en utilisant une large gamme de doses sur différentes espèces de nématodes.
- Evaluer d'autres effets biologiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* des extraits bruts, mais aussi en utilisant les différentes molécules séparément après purification.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbassy, M. A., Kadous, E. A., & Marei, G. I. K. (2012). Isolation and Identification of Cardenolide Compounds of *Gomphocarpus sinaicus* and Their Fungicidal Activity Against Soil Borne and Post Harvest Fungi. *6*, 985–994.
- Abhyankar, G., Rao, K. V, & Reddy, V. D. (2013). Genomic and metabolomic fingerprinting of *Phyllanthus amarus* ( Schumm & Thonn ) hairy root clones. *Annals of Phytomedicine*, *2*(1), 74–88.
- Ahamed, J. I., Francy, K., Priya, A. V., PremaKumari, J., Steiny, R. P., Kamalarajan, P., & Venkatadri, B. (2022). Computational and biological efficacy of stigmaterol against HeLa cells and Vero cells- first time isolated from the ethanolic extract of *Annonamuricata* Linn leaves. *Journal of Molecular Structure*, *1252*, 132186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132186>
- Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K., Bahramnejad, B., & Ghiasvand, T. (2014). Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *16*(2), 409–420.
- Ahmed, R., Shahab, M., Inam-ul-Haq, M., Javed, N., Dogar, M., & Khan, M. Y. (1996). Effect of soil amendment with *Calotropis procera* for the control of *Meloidogyne javanica* infection on egg plant. *Pakistan Journal of Nematology*, *14*, 55–59.
- Akbari, M., Akbari, M., Akbari, D., & Sajedi, N. A. (2012). Influence of sodium hypochlorite on seed germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) variety Tarum. *Research on Crops*, *13*(1), 11–15.
- Akhgari, A., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Yrjönen, T., Vuorela, H., Oksman-Caldentey, K. M., & Rischer, H. (2015). Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of *Rhazya stricta* (Apocynaceae) by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, *26*(5), 331–338. <https://doi.org/10.1002/pca.2567>
- Al-Rajhy, D. A. H., Alahmed, A. M., Hussein, H. I., & Kheir, S. M. (2003). Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science*, *59*(11), 1250–1254. <https://doi.org/10.1002/ps.748>
- Alhazmi, H. A., Sultana, S., Khan, A., & Al-bratty, M. (2018). GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *10*(1), 45–49.
- Al-Taweel, A. M., Perveen, S., Fawzy, G. A., Rehman, A. U., Khan, A., Mehmood, R., & Fadda, L. M. (2017). Evaluation of Antiulcer and Cytotoxic Potential of the Leaf, Flower, and Fruit Extracts of *Calotropis procera* and Isolation of a New Lignan Glycoside. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2017*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/8086791>
- Alzahrani, H. S., Mutwakil, M., Saini, K. S., & Rizgallah, M. R. (2017). *Calotropis Procera* : A Phytochemical and Pharmacological Review with Special Focus on Cancer. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, *7*(10), 232–240.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Benyoussef, E. H., Thi, D. V., Assaf-Ducrocq, C., & Gontier, E. (2009). Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the in vitro biochemical response. *Plant Science*, *177*(2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.016>
- Amdoun, R., Khelifi, L., & Zarouri, B. (2008). Chevelu racinaire de *Datura stramonium* L . induit par *Agrobacterium rhizogenes* en vue de la production d ’ alcaloïdes par voie biotechnologique. *Technologies Avancées*, *20*, 39–44.
- Amdoun, R., Benyoussef, E. H., Benamghar, A., & Khelifi, L. (2019). Prediction of hyoscyamine content in *Datura stramonium* L. hairy roots using different modeling approaches: Response Surface Methodology (RSM), Artificial Neural Network (ANN)

- and Kriging. *Biochemical Engineering Journal*, 144, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.002>
- Amdoun, R., Benyoussef, E. H., Benamghar, A., Sahli, F., Bendifallah, N., & Khelifi, L. (2020). Approaches for Modeling and Optimization of the Secondary Metabolite Production by Plant Biotechnology Methods. *In Reference Series in Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0\\_37-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0_37-1)
  - Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Asch, M., Assaf-ducrocq, C., & Gontier, E. (2018). The Desirability Optimization Methodology; a Tool to Predict Two Antagonist Responses in Biotechnological Systems: Case of Biomass Growth and Hyoscyamine Content in Elicited *Datura stramonium* Hairy Roots. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(1), 11–19. <https://doi.org/10.21859/ijb.1339>
  - Amini, M. H., Ashraf, K., Salim, F., Meng Lim, S., Ramasamy, K., Manshoor, N., Sultan, S., & Ahmad, W. (2021). Important insights from the antimicrobial activity of *Calotropis procera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(7), 103181. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103181>
  - Aoki, S., & Syono, K. (1999). Synergistic function of rolB, rolC, ORF13 and ORF14 of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*, 40(2), 252–256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029535>
  - APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.
  - Awad, A. B., Williams, H., & Fink, C. S. (2003). Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(2), 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00274-7)
  - Baabad, S., Ali, H. M., Khan, T., & Ramadan, A. M. (2019). Effect of environmental conditions on accumulation of some pharmaceutical substances in *Calotropis procera*. *Advances in Environmental Biology*, 12(11), 5–10. <https://doi.org/10.22587/aeb.2018.12.12.2>
  - Babaali, D. (2017). Etude de la dynamique des populations des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* en Algérie. Essais de méthodes de luttés alternatives à la lutte chimique. Thèse de Doctorat, École Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger, 186.
  - Bader, A., Omran, Z., Al-asmari, A. I., Santoro, V., Tommasi, N. De, Ambola, M. D., Piaz, F. D., Conti, B., Bedini, S., & Halwani, M. (2021). Systematic Phytochemical Screening of Different Organs of *Calotropis procera* and the Ovicidal Effect of Their Extracts to the Foodstuff Pest *Cadra cautella*. *Molecules*, 26, 905. <https://doi.org/10.3390/molecules26040905>
  - Baek, S., Ho, T. T., Lee, H., Jung, G., Kim, Y. E., Jeong, C. S., & Park, S. Y. (2020). Enhanced biosynthesis of triterpenoids in *Centella asiatica* hairy root culture by precursor feeding and elicitation. *Plant Biotechnology Reports*, 14(1), 45–53. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00573-w>
  - Basu, A., Sen, T., Pal, S., Mascolo, N., Capasso, F., & Nag Chaudhuri, A. K. (1997). Studies on the antiulcer activity of the chloroform fraction of *Calotropis procera* root extract. *Phytotherapy Research*, 11(2), 163–165. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199703\)11:2<163::AID-PTR51>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199703)11:2<163::AID-PTR51>3.0.CO;2-S)
  - Bathoju, G., Rao, K., & Giri, A. (2017). Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum*

- borivilianum* (Safed musli). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(3), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1290-8>
- Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O. A. H., & Dias, D. A. (2018). Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, 14(11), 1–31. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2>
  - Bebawi, F. F., Campbell, S. D., & Mayer, R. J. (2015). Seed bank longevity and age to reproductive maturity of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton in the dry tropics of northern Queensland. *Rangeland Journal*, 37(3), 239–247. <https://doi.org/10.1071/RJ14130>
  - Benmahiou, B., Daguin, F., & Kaid-Harche, M. (2009). Effects of salt stress on germination and in vitro growth of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Comptes Rendus - Biologies*, 332(8), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.03.008>
  - Bensaddek, L., Villarreal, M. L., & Fliniaux, M. (2008). Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic Journal of Integrative Biosciences*, 3(1), 2–9.
  - Benveniste, P. (2002). Sterol Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 1, 1–31. <https://doi.org/10.1199/tab.0004>
  - Benveniste, P. (2004). Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616>
  - Benyammi, R., Paris, C., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., Belabbassi, O., Bakiri, N., Aci, M. M., Harfi, B., Malik, S., Makhzoum, A., Desobry, S., & Khelifi, L. (2016). Screening and kinetic studies of catharanthine and ajmalicine accumulation and their correlation with growth biomass in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2033–2043. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1140213>
  - Berger, A., Jones, P. J. H., & Abumweis, S. S. (2004). Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-5>
  - Bettini, P., Michelotti, S., Bindi, D., Giannini, R., Capuana, M., & Buiatti, M. (2003). Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolD gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 107(5), 831–836. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1322-0>
  - Bettini, P., Baraldi, R., Rapparini, F., Melani, L., Mauro, M. L., Bindi, D., & Buiatti, M. (2010). The insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) affects plant architecture and endogenous auxin and abscisic acid levels. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.013>
  - Bhat, S. K., & Sharma, A. (2013). Therapeutic Potential of Cardiac Glycosides of *Calotropis Gigantea* for Breast Cancer. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(6), 164–167. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04636>
  - Bhatti, G. R., Qureshi, R., & Shah, S. M. (1998). Ethnobotany of *Calotropis procera* with special reference to the people of Nara desert. *Scientific Sindh Annual Research Journal*, 5, 1–10.
  - Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26–S39. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>
  - Bouchez, D., & Tourneur, J. (1991). Organization of the agropine synthesis region of the T-DNA of the Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 25(1), 27–39. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(91\)90004-g](https://doi.org/10.1016/0147-619x(91)90004-g)
  - Bouchonnet, S., & Libong, D. (2004). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *L'actualité Chimique*, 275, 7–14.

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*, 839–851.
- Boutraa, T. (2010). Growth Performance and Biomass Partitioning of the Desert Shrub *Calotropis Procera* under Water Stress Conditions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, *6*(1), 20–26.
- Bruschweiler, F., Stockel, K., & Reichstein, T. (1969). *Calotropis*-Glykoside, vermutliche Teilstruktur. *Helvetica Chemica Acta*, *52*(8), 2276–2303.
- Bulgakov, V. P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, *26*(4), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.001>
- Burdziej, A., Pączkowski, C., Destrac-Irvine, A., Richard, T., Cluzet, S., & Szakiel, A. (2019). Triterpenoid profiles of the leaves of wild and domesticated grapevines. *Phytochemistry Letters*, *30*, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.009>
- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanò, L., Capone, I., & Costantino, P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular & General Genetics: MGG*, *209*(3), 475–480. <https://doi.org/10.1007/BF00331152>
- Carland, F., Fujioka, S., & Nelson, T. (2010). The Sterol Methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 Influence *Arabidopsis* Development through Nonbrassinosteroid Products. *Plant Physiology*, *153*(2), 741–756. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152587>
- Casanova, E., Zuker, A., Trillas, M. I., Moysset, L., & Vainstein, A. (2003). The rolC gene in carnation exhibits cytokinin- and auxin-like activities. *Scientia Horticulturae*, *97*(3), 321–331. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00155-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00155-3)
- Cayrol, J.-C., Djian-Caporalino, C., & Panchaud-Mattei, E. (1992). La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. *Courrier de La Cellule Environnement de l'INRA*, *17*, 31–44.
- Chamkhi, I., Benali, T., Aanniz, T., El Menyiy, N., Guaouguaou, F.-E., El Omari, N., El-Shazly, M., Zengin, G., & Bouyahya, A. (2021). Plant-microbial interaction: The mechanism and the application of microbial elicitor induced secondary metabolites biosynthesis in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *167*, 269–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.001>
- Chandra, S., & Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, *10*(3), 371–395. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9210-8>
- Chandrawat, P., & Sharma, R. A. (2015). GC-MS Analysis of Fruits of *Calotropis procera* : A Medicinal Shrub. *Research Journal of Recent Sciences*, *4*, 11–14.
- Chandrawat, P., & Sharma, R. A. (2016). The Genus *Calotropis*: An Overview on Bioactive Principles and their Bioefficacy. *Research Journal of Recent Sciences*, *5*(1), 61–70.
- Chaudhuri, K. N., Ghosh, B., Tepfer, D., & Jha, S. (2005). Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: Growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant Cell Reports*, *24*(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0904-x>
- Choi, N. H., Jang, J. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Nguyen, V. T., Min, B. S., Le Dang, Q., & Kim, J. C. (2017). Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *141*, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.006>
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic

- plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 37(6), 687–700. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0120-0>
- Chundattu, S. J., Agrawal, V. K., & Ganesh, N. (2016). Phytochemical investigation of *Calotropis procera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S230–S234. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.03.011>
  - Clouse, S. D. (2002). *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*, 14(9), 1995–2000. <https://doi.org/10.1105/tpc.140930>
  - Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
  - Costa, N. de J. F., & Santos, C. D. G. (2022). Emprego de *Calotropis procera* no controle de *Meloidogyne incognita* raça 2 em tomateiro. *Diversitas Journal*, 7(3), 1190–1204. <https://doi.org/10.48017/dj.v7i3.2074>
  - Crout, D. H. G., Hassall, C. H., & Jones, T. L. (1964). Cardenolides. Part VI.1 Uscharidin, calotropin, and calotoxin. *Journal of the Chemical Society*, 2175–2187. <https://doi.org/10.1039/jr9640002187>
  - De Guiran, G., & Netscher, C. (1970). Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites de cultures tropicales. *Cahiers de l'ORSTOM*, 11, 151–185.
  - den Hartigh, L. J. (2018). Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre-clinical and human trials with current perspectives. *Nutrients*, 11(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nu11020370>
  - Deng, S., Wei, T., Tan, K., Hu, M., Li, F., Zhai, Y., Ye, S., Xiao, Y., Hou, L., Pei, Y., & Luo, M. (2016). Phytosterol content and the campesterol:sitosterol ratio influence cotton fiber development: role of phytosterols in cell elongation. *Science China Life Sciences*, 59(2), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4992-3>
  - Denoroy, L., Zimmer, L., Renaud, B., & Parrot, S. (2013). Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review. *Journal of Chromatography B*, 927, 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.005>
  - Doran, P. M. (2013). Biotechnology of Hairy Root Systems. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 134, 159. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39019-7>
  - Doshi, H. V., Parabia, F. M., Sheth, F. K., Kothari, I. L., Parabia, M., & Ray, A. (2012). Phytochemical Analysis Revealing the Presence of Two New Compounds from the Latex of *Calotropis Procera* (Ait.) R.Br. *International Journal of Plant Research*, 2(2), 28–30. <https://doi.org/10.5923/j>.
  - Eder, R., Consoli, E., Krauss, J., & Dahlin, P. (2021). Polysulfides applied as formulated garlic extract to protect tomato plants against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plants*, 10(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/plants10020394>
  - Edwards, P. A., & Ericsson, J. (1999). Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 157–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.157>
  - El-Esawi, M. A., Elkesh, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/5604746>
  - El-Ghazali, G. E., Al-Khalifa, K. S., Saleem, G. A., & Abdallah, E. M. (2010). Traditional medicinal plants indigenous to Al-Rass province, Saudi Arabia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2680–2683. <https://doi.org/10.5897/jmpr09.556>
  - Erdman, M. D. (1983). Nutrient and Cardenolide Composition of Unextracted and Solvent-Extracted *Calotropis procera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 31(3), 509–513. <https://doi.org/10.1021/jf00117a012>
- Ernst, M., Silva, D. B., Silva, R. R., Vêncio, R. Z. N., & Lopes, N. P. (2014). Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: From analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural Product Reports*, 31(6), 784–806. <https://doi.org/10.1039/c3np70086k>
  - Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
  - Estabraq H. Naser, Abbas M. Kashmer, S. A. A. (2019). Antibacterial activity and phytochemical investigation of leaves of *Calotropis Procera* plant in Iraq by GC-MS. *International Journal for Pharmaceutical Science and Research*, 10(4), 1988–1994. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1988-94](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1988-94)
  - Estramareix, C., Ratet, P., Boulanger, F., & Richaud, F. (1986). Multiple mutations in the transferred regions of the *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmids. *Plasmid*, 15(3), 245–247. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(86\)90043-0](https://doi.org/10.1016/0147-619x(86)90043-0)
  - Ettre, L. S. (2000). Chromatography: The separation technique of the 20th Century. *Chromatographia*, 51(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF02490689>
  - Eunice, O., Oluwasesan, B., & Adewumi, D. (2013). The nematicidal effect of aqueous extract of leaves of *Calotropis procera* against root knot nematode infection on vegetative growth of okra plants (*Abelmoschus esculentus* L . moench ). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 3(4), 193–196.
  - Farr, C. D., Burd, C., Tabet, M. R., Wang, X., Welsh, W. J., & Ball, W. J. (2002). Three-dimensional quantitative structure - Activity relationship study of the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by cardiotonic steroids using comparative molecular field analysis. *Biochemistry*, 41(4), 1137–1148. <https://doi.org/10.1021/bi011511g>
  - Farzana, Abid, M., & Hussain, F. (2022). Screening of ethnomedicinal plants for their antifungal and nematicidal activities against soil-borne phytopathogens. *South African Journal of Botany*, 147, 18–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.12.003>
  - Faust, T., Theurer, C., Eger, K., & Kreis, W. (1992). Studies on the Biosynthesis of Cardiac Glycosides: Fucosyltransferase Activity in Leaves of *Digitalis lanata*. *Planta Med*, 58, 672.
  - Figlan, S., & Makunga, N. P. (2017). Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia runcinata* L. f. using *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*, 112, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.029>
  - Fox, C. B. (2009). Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*, 14(9), 3286–3312. <https://doi.org/10.3390/molecules14093286>
  - Gai, Q. Y., Jiao, J., Wang, X., Zang, Y. P., Niu, L. L., & Fu, Y. J. (2019). Elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(1), 77–86. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01553-8>
  - Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
  - García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M. T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(6), 607–624. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.005>
  - Gelvin, S. B. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51, 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>

- Gilhaus, M. (2005). Mass Spectrometry | Time-of-Flight. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (Second Edi, pp. 412–423). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00347-2>
- Gillet, H. (1968). Note écologique et ethnobotanique sur *Calotropis procera*. *Journal d'agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*, 15(12), 543–545. <https://doi.org/10.3406/jatba.1968.3007>
- Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V., & Narasu, M. L. (2001). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current science*, 81(4), 378–382.
- Grace, B. (2006). The biology of Australian weeds. *Plant Protection Quarterly*, 21(4), 152–160.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Kuźma, Ł., Skała, E., & Kiss, A. K. (2018). Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 117, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.014>
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P., & Pandey, D. K. (2021). Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition. *South African Journal of Botany*, 149, 1029–1043. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.014>
- Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K.-M., Ritala, A., & Cardon, F. (2020). Hairy Root Cultures-A Versatile Tool With Multiple Applications. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
- Ha, L. T., Pawlicki-Jullian, N., Pillon-Lequart, M., Boitel-Conti, M., Duong, H. X., & Gontier, E. (2016). Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillol-type ginsenosides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0980-y>
- Habibi, P., Soccol, C. R., & Grossi-De-Sa, M. F. (2018). Hairy Root-Mediated Biotransformation: Recent Advances and Exciting Prospects. In: Srivastava, V., Mehrotra, S., Mishra, S. (eds) *Hairy Roots*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_8)
- Habtamu, A., & Melaku, Y. (2018). Antibacterial and Antioxidant Compounds from the Flower Extracts of *Vernonia amygdalina*. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/4083736>
- Halder, M., Roychowdhury, D., & Jha, S. (2018). A Critical Review on Biotechnological Interventions for Production and Yield Enhancement of Secondary Metabolites in Hairy Root Cultures. In: Srivastava, V., Mehrotra, S., Mishra, S. (eds) *Hairy Roots*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_2)
- Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 880–895. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
- Hamill, J. D. (1993). Alterations in auxin and cytokinin metabolism of higher plants due to expression of specific genes from pathogenic bacteria: A review. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20(4–5), 405–423. <https://doi.org/10.1071/pp9930405>
- Hammiche, V., & Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.028>
- Harfi, B., Khelifi, L., Bekhouche, M., & Khelifi-Slaoui, M. (2013). Study of biomass growth kinetic's and hyoscyamine accumulation in hairy roots of three species of *Datura*. *Wulfenia Journal*, 20(04), 306–313. <http://www.multidisciplinarywulfenia.org/>
- Harfi, B., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Assaf-Ducrocq, C., & Gontier, E. (2018).

- Tropane alkaloids GC/MS analysis and low dose elicitors' effects on hyoscyamine biosynthetic pathway in hairy roots of Algerian *Datura* species. *Scientific Reports*, 8(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36625-4>
- Hartmann, M. A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170–175. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01233-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01233-3)
  - Hassal, H., & Reyle, K. (1959). 8. Cardenolides. Part III. The constitution of calotropagenin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 85–89.
  - Hassan, L. M., Galal, T. M., Farahat, E. A., & El-Midany, M. M. (2015). The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. *Trees - Structure and Function*, 29(2), 311–320. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1158-7>
  - He, J. X., Fujioka, S., Li, T. C., Kang, S. G., Seto, H., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Jang, J. C. (2003). Sterols regulate development and gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(3), 1258–1269. <https://doi.org/10.1104/pp.014605>
  - Heinrich, M., Mah, J., & Amirkia, V. (2021). Alkaloids used as medicines: Structural phytochemistry meets biodiversity—An update and forward look. *Molecules*, 26(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules26071836>
  - Herl, V., Fischer, G., Müller-Uri, F., & Kreis, W. (2006). Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 $\beta$ -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Phytochemistry*, 67(3), 225–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.013>
  - Herl, V., Frankenstein, J., Meitinger, N., Müller-Uri, F., & Kreis, W. (2007). Delta 5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta HSD) from *Digitalis lanata*. Heterologous expression and characterisation of the recombinant enzyme. *Planta Medica*, 73(7), 704–710. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981537>
  - Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*, 5114(1), 1–289. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1>
  - Hoopes, G. M., Hamilton, J. P., Kim, J., Zhao, D., Wiegert-Rininger, K., Crisovan, E., & Buell, C. R. (2018). Genome assembly and annotation of the medicinal plant *Calotropis gigantea*, a producer of anticancer and antimalarial cardenolides. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(2), 385–391. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300331>
  - Hou, Y., Shang, C., Meng, T., & Lou, W. (2021). Anticancer potential of cardiac glycosides and steroid-azole hybrids. *Steroids*, 171, 108852. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108852>
  - Huang, S. H., Vishwakarma, R. K., Lee, T. T., Chan, H. S., & Tsay, H. S. (2014). Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. *Botanical Studies*, 55(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-17>
  - Huang, Y. H., Lei, J., Yi, G. H., Huang, F. Y., Li, Y. N., Wang, C. C., Sun, Y., Dai, H. F., & Tan, G. H. (2018). Coroglaucigenin induces senescence and autophagy in colorectal cancer cells. *Cell Proliferation*, 51(4), 1–11. <https://doi.org/10.1111/cpr.12451>
  - Humbert, L., & Lhermitte, M. (2005). Molécules indétectables par chromatographie en phase gazeuse. *Annales de Toxicologie Analytique*, 17(1), 57–62. <https://doi.org/10.1051/ata:2005038>
  - Hussain, M. A., Mukhtar, T., & Kayani, M. Z. (2011). Efficacy evaluation of *Azadirachta indica*, *Calotropis procera*, *Datura stramonium* and *Tagetes erecta* against root-knot nematodes *meloidogyne incognita*. *Pak. J. Bot*, 43, 197–204.
  - Hussein HI, Kamel A, Abou-Zeid M, Abdel-Khalek, El-Sebae H, Saleh MA. (1994). Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. *J Chem*

- Ecol*, 20(1):135-40. [https://doi: 10.1007/BF02065996](https://doi.org/10.1007/BF02065996). PMID: 24241704.
- Ibrahim, S. R.M., Mohamed, G. A., Shaala, L. A., Moreno, L., Banuls, Y., Kiss, R., & Youssef, D. T. A. (2014). Proceraside A, a new cardiac glycoside from the root barks of *Calotropis procera* with in vitro anticancer effects. *Natural Product Research*, 28(17), 1322–1327. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.901323>
  - Ibrahim, Sabrin R.M., Mohamed, G. A., Shaala, L. A., Banuls, L. M. Y., Van Goietsenoven, G., Kiss, R., & Youssef, D. T. A. (2012). New ursane-type triterpenes from the root bark of *Calotropis procera*. *Phytochemistry Letters*, 5(3), 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.04.012>
  - Inoguchi, M., Ogawa, S., Furukawa, S., & Kondo, H. (2003). Production of an Allelopathic Polyacetylene in Hairy Root Cultures of Goldenrod (*Solidago altissima* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(4), 863–868. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.863>
  - Inoguchi, M., Oka, M., Shikada, T., & Kato, J. (1996). Agropine synthase gene of Ri plasmid is different from the homologous gene of Ti plasmid in tissue-specificity. *Journal of Plant Physiology*, 149(1), 73–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80176-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80176-3)
  - Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Muhammad, G., & Khan, M. N. (2005). Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.022>
  - Iwalewa, E. O., Elujoba, A. A., & Bankole, O. A. (2005). In vitro spasmolytic effect of aqueous extract of *Calotropis procera* on Guinea-pig trachea smooth muscle chain. *Fitoterapia*, 76(2), 250–253. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.12.011>
  - Jenner, A. M., & Brown, S. H. J. (2017). Sterol Analysis by Quantitative Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1583, 221-239. doi: 10.1007/978-1-4939-6875-6\_17.
  - Jocelyn Paré, J. R., & Yaylayan, V. (1997). Chapter 7 Mass spectrometry: Principles and applications. In J. R. J. Paré & J. M. R. Bélanger (Eds.), *Instrumental Methods in Food Analysis* (Vol. 18, pp. 239–266). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80016-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80016-9)
  - Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
  - Jozwiak, A., Ples, M., Skorupinska-Tudek, K., Kania, M., Dydak, M., Danikiewicz, W., & Swiezewska, E. (2013). Sugar availability modulates polyisoprenoid and phytosterol profiles in *Arabidopsis thaliana* hairy root culture. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(2), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.11.006>
  - Juszczak, A. M., Zovko-Končić, M., & Tomczyk, M. (2019). Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110731>
  - Kabirnataj, S., Nematzadeh, G., Zolala, J., & Talebi, A. F. (2016). High-efficient transgenic hairy roots induction in chicory: Re-dawn of a traditional herb. *Acta Agriculturae Slovenica*, 107(2), 321–334. <https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.2.06>
  - Kamath, J. V., & Rana, A. C. (2002). Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. *Fitoterapia*, 73(2), 111–115. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00005-9)
  - Kanojiya, S., & Madhusudan, K. P. (2012). Rapid identification of calotropagenin glycosides using high-performance liquid chromatography electrospray ionisation

- tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 23(2), 117–125. <https://doi.org/10.1002/pca.1332>
- Karim, N., Khan, I., Abdelhalim, A., Halim, S. A., Khan, A., & Al-Harrasi, A. (2021). Stigmasterol can be new steroidal drug for neurological disorders: Evidence of the GABAergic mechanism via receptor modulation. *Phytomedicine*, 90, 153646. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2021.153646>
  - Karssen, G., & Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In R. N. Perry & M. Moens (Eds.), *Plant nematology* (CABI, pp. 59–90).
  - Katuri, S. R., & Khanna, R. (2019). Kinetic growth model for hairy root cultures. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 16(2), 553–571. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019027>
  - Kaufmann, A. (2020). The use of UHPLC, IMS, and HRMS in multiresidue analytical methods: A critical review. *Journal of Chromatography B*, 1158, 122369. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122369>
  - Kaur, N., Chaudhary, J., Akash, J., & Kishore, L. (2011). Stigmasterol: A Comprehensive. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2, 2259–2265.
  - Kaur, A., Batish, D. R., Kaur, S., & Chauhan, B. S. (2021). An Overview of the Characteristics and Potential of *Calotropis procera* From Botanical, Ecological, and Economic Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 12, 690806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690806>
  - Kim, C. Y., Im, H. W., Kim, H. K., & Huh, H. (2001). Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng* by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 239–242. <https://doi.org/10.1007/s002530000557>
  - Kiuchi, F., Fukao, Y., Maruyama, T., Obata, T., Tanaka, M., Sasaki, T., Mikage, M., Haque, M. E., & Tsuda, Y. (1998). Cytotoxic principles of a Bangladeshi crude drug, akond mul (roots of *Calotropis gigantea* L.). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46(3), 528–530. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.528>
  - Koch, V., Nieger, M., & Bräse, S. (2020). Towards the synthesis of calotropin and related cardenolides from 3-epiandrosterone: A-ring related modifications. *Organic Chemistry Frontiers*, 7(18), 2670–2681. <https://doi.org/10.1039/d0qo00269k>
  - Kreis, W., & Müller-Uri, F. (2010). Biochemistry of Sterols, Cardiac Glycosides, Brassinosteroids, Phytoecdysteroids and Steroid Saponins. In *Annual Plant Reviews* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0428>
  - Kumar, S., Dewan, S., Sangraula, H., & Kumar, V. L. (2001). Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00219-7)
  - Kumar, S., Gupta, A., & Pandey, A. K. (2013). *Calotropis procera* root extract has the capability to combat free radical mediated damage. *ISRN Pharmacology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/691372>
  - Kumar, V. L., Pandey, A., Verma, S., & Das, P. (2019). Protection afforded by methanol extract of *Calotropis procera* latex in experimental model of colitis is mediated through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory signaling. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.187>
  - Kumari, I., & Chaudhary, G. (2021). *Calotropis procera* (Arka): A Tribal Herb of Utmost Significance. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 8(3). <https://doi.org/10.31033/ijrasb.8.3.8>
  - Kushwaha, V., Rastogi, S., Pandey, M. M., Saxena, K., Khatoon, S., Rawat, A. K. S., & Murthy, P. K. (2019). In vitro and in vivo antifilarial activity of standardized extract of

- Calotropis procera* flowers against brugia malayi. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(14), 1252–1262. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190620154054>
- Kyo, M., Miyauchi, Y., Fujimoto, T., & Mayama, S. (1990). Production of nematocidal compounds by hairy root cultures of *Tagetes patula* L. *Plant Cell Reports*, 9(7), 393–397. <https://doi.org/10.1007/BF00232407>
  - Lal, S. D., & Yadav, B. K. (1983). Folk medicines of *kurukshetra district* (Haryana), India. *Economic Botany*, 37(3), 299–305. <https://doi.org/10.1007/BF02858885>
  - Laloi, M., Perret, A. M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M. N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J. M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M. A., & Moreau, P. (2007). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 143(1), 461–472. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091496>
  - Leal, L. C., Meiado, M. V., Lopes, A. V., & Leal, I. R. (2013). Germination responses of the invasive *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae): comparisons with seeds from two ecosystems in Northeastern Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85(3), 1025–1034. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000300013>
  - Lemcke, K., & Schmülling, T. (1998). A putative rolB gene homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* TR-DNA has different morphogenetic activity in tobacco than rolB. *Plant Molecular Biology*, 36(5), 803–808. <https://doi.org/10.1023/A:1005905327898>
  - Li, J. Z., Qing, C., Chen, C. X., Hao, X. J., & Liu, H. Y. (2009). Cytotoxicity of cardenolides and cardenolide glycosides from *Asclepias curassavica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(7), 1956–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.045>
  - Liu, B., Ye, H., Li, G., Chen, D., Geng, S., Zhang, Y., Chen, J., & Gao, J. (1998). Studies on dynamics of growth and biosynthesis of artemisinin in hairy roots of *Artemisia annua* L. *Chinese Journal of Biotechnology*, 14(4), 249–254.
  - Liu, J., Bai, L. P., Yang, F., Yao, X., Lei, K., Kei Lam, C. W., Wu, Q., Zhuang, Y., Xiao, R., Liao, K., Kuok, H., Li, T., & Liu, L. (2019). Potent antagonists of ROR $\gamma$ t, cardenolides from *Calotropis gigantea*, exhibit discrepant effects on the differentiation of *T. Lymphocyte* subsets. *Molecular Pharmaceutics*, 16(2), 798–807. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01063>
  - Lokhande, V. H., Kudale, S., Nikalje, G., Desai, N., & Suprasanna, P. (2015). Hairy root induction and phytoremediation of textile dye, Reactive green 19A-HE4BD, in a halophyte, *Sesuvium portulacastrum* (L.). *Biotechnology Reports*, 8, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.002>
  - Lopez-Lazaro, M. (2009). Digoxin, HIF-1, and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813047106>
  - Lovestead, T. M., & Urness, K. N. (2019). Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC–MS), ASM Handbook, Vol. 10: Materials Characterization. [https://tsapps.nist.gov/publication/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=926655](https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=926655)
  - Lütken, H., Meropi-Antypa, N., Kemp, O., Hegelund, J. N., & Müller, R. (2017). Hairy root cultures of *Rhodiola rosea* to increase valuable bioactive compounds. In *Production of Plant Derived Natural Compounds through Hairy Root Culture*, (pp. 65–88). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69769-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69769-7_4)
  - Madani, I., Ali, L. I., & Nur, E. (2017). Evidences from morphological investigations supporting APGIII and APGIV Classification of the family *Apocynaceae* Juss ., nom . cons. *European Academic Research*, 4(10), 8259–8266.

- Makhubu, F. N., Khosa, M. C., & McGaw, L. J. (2021). South African plants with nematicidal activity against root-knot nematodes: A review. *South African Journal of Botany*, 139, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.010>
- Mako, G. A., Memon, A. H., Mughal, U. R., Pirzado, A. J., & Bhatti, S. A. (2012). Antibacterial effects of leaves and root extract of *Calotropis Procera* L. *Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci.*, 28(2), 141-149.
- Makowczyńska, J., Kalembe, D., & Skała, E. (2021). Establishment of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. transformed roots, influence of the culture conditions on root growth and production of essential oil. *Industrial Crops and Products*, 165, 113446. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113446>
- Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Bousaid, M., Lazrek, H. B., & Jana, M. (2000). Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 293–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00257-9)
- Mauro, M. L., & Bettini, P. P. (2021). *Agrobacterium rhizogenes* rolB oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.037>
- McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1015–1026. <https://doi.org/10.2307/3870054>
- McMaster, M. C. (2008). GC-MS: A practical user's guide. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 121, Issue 20). <https://doi.org/10.1021/ja9857460>
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Srivastava, V., & Rahman, L. U. (2015). Hairy root biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: a potent approach for the production of pharmaceutically important terpenoid indole alkaloids. *Biotechnology Letters*, 37(2), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1695-y>
- Mellon, F. A. (2003). Mass Spectrometry | Principles and Instrumentation. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (Second Edi, pp. 3739–3749). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00746-X>
- Meyer, A., Tempe, J., & Costantino, P. (2000). Hairy root: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: Stacey G, Keen N (eds) *Plant-microbe interactions*,. Vol. 5, PS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 93-139.
- Meyer, S. L., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T., & Chitwood, D. J. (2008). Dose–response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science*, 64, 223–229. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-Knot Nematodes*, 1–17. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Mohamed, N. H., Liu, M., Abdel-Mageed, W. M., Alwahibi, L. H., Dai, H., Ismail, M. A., Badr, G., Quinn, R. J., Liu, X., Zhang, L., & Shoreit, A. A. M. (2015). Cytotoxic cardenolides from the latex of *Calotropis procera*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4615–4620. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.08.044>
- Mossa, J. S., Tariq, M., Mohsin, A., Ageel, A. M., Al-Yahya, M. A., Al-Said, M. S., & Rafatullah, S. (1991). Pharmacological Studies on Aerial Parts of *Calotropis Procera*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 19(3), 223–231.
- Mottaki, Z., Rezayian, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., & Mirmasoumi, M. (2019). Using hairy roots for production of secondary metabolites in *Artemisia*. *Plant Biotechnology Reports*, 13(3), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00534-3>

- Moussous, A., Paris, C., Khelifi-Slaoui, M., Bekhouche, M., Zaoui, D., Rosloski, S. M., Makhzoum, A., Desobry, S., & Khelifi, L. (2018). Pseudomonas spp. increases root biomass and tropane alkaloid yields in transgenic hairy roots of Datura spp. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(1), 117–126. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9862-1>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Murthy, H. N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D. A., Davey, M. R., Power, J. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2008). Establishment of Withania somnifera hairy root cultures for the production of withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 975–981. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00680.x>
- Murti, Y., Yogi, B., & Pathak, D. (2010). Pharmacognostic standardization of leaves of Calotropis procera (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae). *International Journal of Ayurveda Research*, 1(1), 14–17. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.59938>
- Nadeem, M., Mumtaz, M. W., Danish, M., Rashid, U., Mukhtar, H., Anwar, F., & Raza, S. A. (2019). Calotropis procera: UHPLC-QTOF-MS/MS based profiling of bioactives, antioxidant and anti-diabetic potential of leaf extracts and an insight into molecular docking. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 3206–3220. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00243-z>
- Nakasha, J. J., Sinniah, U. R., Shaharuddin, N. A., Hassan, S. A., Subramaniam, S., & Swamy, M. K. (2017). Establishment of an efficient in vitro regeneration and Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformation protocol for safed musli (Chlorophytum borivilium Santapau & R.R.Fern.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 53(6), 571–578. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9831-8>
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites : A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69–79.
- Narayan Bhilwade, H., Tatewaki, N., Konishi, T., Nishida, M., Eitsuka, T., Yasui, H., Inanami, O., Handa, O., Naito, Y., Ikekawa, N., & Nishida, H. (2019). The Adjuvant Effect of Squalene, an Active Ingredient of Functional Foods, on Doxorubicin-Treated Allograft Mice. *Nutrition and Cancer*, 71(7), 1153–1164. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1597900>
- Naresh, K., Bhawani, S., & Kumar, T. M. (2014). Ultra Performance Liquid. *Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc.*, 3(3), 84–94.
- Navarro, E., Boada, J., Rodriguez, R., Martin, P., Breton, J., & Gonzalez, A. G. (1985). Pharmacological study of uzarigenin-glucoside-canaroside. *Planta Medica*, 6(11), 498–500. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969574>
- Nebih Hadj-Sadouk, D., & Charif, F. (2019). Toxicité des extraits de plantes sur les larves (L2) du nématode à kystes de la pomme terre (Globodera spp.) (nematoda, heteroderidae). *Revue Agrobiologia*, 9(1), 1234–1241.
- Nemoto, K., Hara, M., Goto, S., Kasai, K., Seki, H., Suzuki, M., Oka, A., Muranaka, T., & Mano, Y. (2009). The aux1 gene of the Ri plasmid is sufficient to confer auxin autotrophy in tobacco BY-2 cells. *Journal of Plant Physiology*, 166(7), 729–738. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.09.006>
- Nenaah, G. E. (2013). Potential of using flavonoids, latex and extracts from Calotropis procera (Ait.) as grain protectants against two coleopteran pests of stored rice. *Industrial Crops and Products*, 45, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.043>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

- Nguyen, V. C. (2018). Genetic diversity of the grapevine vector nematode *Xiphinema* index and application to optimize the resistance strategy. Thèse de Doctorat, *Université Côte d'Azur*, France, 179.
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Nijs, L.d., Hockland, S., Maafi, Z.T. (2011). Current Nematode Threats to World Agriculture. *In*: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2)
- Nimoriya, R., Singh, Y., Singh, S. K., Singh, P., Jeet, A., Bilung, C. J., Kanojiya, S., & Mishra, D. K. (2021). Standardization of zygotic embryo culture from *Nerium oleander* L. and comparative analysis of biosynthesized cardiac glycosides within in vitro and acclimatized plants. *Current Botany*, 12, 204–215. <https://doi.org/10.25081/cb.2021.v12.7163>
- Nolvachai, Y., & Marriott, P. J. (2013). GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends. *Journal of Separation Science*, 36(1), 20–36. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200846>
- Noui, A., Boudiar, T., Bakhouch, A., del Mar Contreras, M., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Laouer, H., & Akkal, S. (2018). Chemical characterization of polyphenols from *Daucus muricatus* growing in Algeria by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Research*, 32(8), 982–986. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1371162>
- Orwa C, A, Mutua, Kindt R, Jamnadass R, S Anthony (2009). Agroforestry Database : a tree reference and selection guide version 4.0. <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>
- Pandey, A., Swarnkar, V., Pandey, T., Srivastava, P., Kanojiya, S., Mishra, D. K., & Tripathi, V. (2016). Transcriptome and Metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. *Scientific Reports*, 6(34464), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep34464>
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Álvarez-González, I., Sánchez-Chapul, L., Pérez-Gallaga, J., Hernández, N., Flores-Mondragón, G., & Velasco, O. (2008). Cell protection induced by beta-sitosterol : Inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity. *Archives of Toxicology*, 82(9), 615–622. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0277-3>
- Parhira, S., Zhu, G. Y., Jiang, R. W., Liu, L., Bai, L. P., & Jiang, Z. H. (2014). 2'-Epi-uscharin from the latex of *Calotropis gigantea* with HIF-1 inhibitory activity. *Scientific Reports*, 4(7), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep04748>
- Parihar, G., & Balekar, N. (2016). *Calotropis procera*: A phytochemical and pharmacological review. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), 115–131.
- Parihar, K., Rehman, B., & Siddiqui, M. A. (2011). Nematicidal potential of aqueous extracts of botanicals on *Meloidogyne incognita* in vitro. *Current Nematology*, 22, 55–61.
- Park, S. (2021). Explant preparation. *In Plant Tissue Culture : Techniques and Experiments* (pp.,47–53). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821120-5.00013-4>
- Parthasarathy, V., Menon, A. R., & Devaranavadagi, B. (2021). Target Fishing of Calactin, Calotropin and Calotoxin Using Reverse Pharmacophore Screening and Consensus Inverse Docking Approach. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(6), e130921188782. <https://doi.org/10.2174/1570163817666201207143958>
- Patel, S. (2016). Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1036–1041.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.030>
- Patnaik, G. K., & Köhler, E. (1978). Pharmacological investigation on asclepin--a new cardenolide from *Asclepias curassavica*. Part II. Comparative studies on the inotropic and toxic effects of asclepin, g-strophantin, digoxin and digitoxin). *Arzneimittel-Forschung*, 28(8), 1368–1372.
  - Pattnaik, P. K., Kar, D., Chhatoi, H., Ghosh, G., & Kuanar, A. (2017). Chemometric profile & antimicrobial activities of leaf extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. *Natural Product Research*, 31(16), 1954–1957. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1266349>
  - Petschenka, G., Fei, C. S., Araya, J. J., Schröder, S., Timmermann, B. N., & Agrawal, A. A. (2018). Relative selectivity of plant cardenolides for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases from the monarch butterfly and non-resistant insects. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01424>
  - Poole, C. F. (2003). *The essence of chromatography*. Elsevier.
  - Prot, J.-C. (1985). *Introduction aux nématodes phytoparasites: les nématodes parasites des cultures maraîchères*. ORSTOM.
  - Rahman, M. A., & Wilcock, C. C. (1991). A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). *Nordic Journal of Botany*, 11(3), 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1991.tb01408.x>
  - Rajagopalan, S., Tamm, C., & Reichstein, T. (1955). 216. Die Glykoside der samen von *Calotropis procera* R.Br. *Helvetica Chimica Acta*, 38(7), 1809–1824.
  - Rajamohan, S., Kalaiivanan, P., & Ilayaraja Sivagnanam, M. R. (2014). Antioxidant, Antimicrobial activities and GC-MS analysis of *Calotropis gigantea* white flowers. *Journal of Phytopharmacology*, 3(6), 405–409.
  - Ramachandra Setty, S., Quereshi, A. A., Viswanath Swamy, A. H. M., Patil, T., Prakash, T., Prabhu, K., & Veeran Gouda, A. (2007). Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*, 78(7–8), 451–454. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.022>
  - Ramadan, A. M., Azeiz, A. A., Baabad, S., Hassanein, S., Gadalla, N. O., Hassan, S., Algandaby, M., Bakr, S., Khan, T., Abouseadaa, H. H., Ali, H. M., Al-Ghamdi, A., Osman, G., Edris, S., Eissa, H., & Bahieldin, A. (2019). Control of β-sitosterol biosynthesis under light and watering in desert plant *Calotropis procera*. *Steroids*, 141, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.11.003>
  - Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
  - Rao, M. S., Parvatha Reddy, P., & Das, S. M. (1996). Effect of integration of *Calotropis procera* and *Glomus fasciculatum* on the management of *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Nematologia Mediterranea*, 24, 59–61.
  - Rasik, A. M., Raghbir, R., Gupta, A., Shukla, A., Dubey, M. P., Srivastava, S., Jain, H. K., & Kulshrestha, D. K. (1999). Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00118-X)
  - Rathod, R. H., Chaudhari, S. R., Patil, A. S., & Shirkhedkar, A. A. (2019). Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-019-0007-8>
  - Ravi, B. G., Guardian, M. G. E., Dickman, R., & Wang, Z. Q. (2020). Profiling and

- structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1618, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460903>
- Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., & Rawat, B. (2019). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root cultures: A promising approach for production of useful metabolites. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00008-6>
  - Reddy, P. P. (2021). *Nematode Diseases of Crops and their Management*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-3242-6>
  - Rogowska, A., & Szakiel, A. (2021). Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures—Simultaneous stimulation or competition? *Plants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/plants10102028>
  - Rohit, S., Thakur, G. S., Sanodiya, B. S., Savita, A., Pandey, M., Sharma, A., & Bisen, P. S. (2012). Therapeutic Potential of *Calotropis procera*: A giant milkweed. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(2), 42-57. <https://doi.org/10.9790/3008-0424257>
  - Rouessac, F., & Rouessac, A. (2004). *Analyse Chimique*. Dunod, Paris (Vol. 6). <https://doi.org/10.1126/science.12.289.71>
  - Sahayarayan, J. J., Udayakumar, R., Arun, M., Ganapathi, A., Alwahibi, M. S., Aldosari, N., & Morgan, A. M. A. (2020). Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains for in-vitro Hairy Root Induction, Total Phenolic, Flavonoids Contents, Antibacterial and Antioxidant Activity of (*Cucumis Anguria* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 2972-2979. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.050>
  - Saravanakumar, A., Aslam, A., & Shajahan, A. (2012). Development and optimization of hairy root culture systems in *Withania somnifera* (L.) Dunal for withaferin-A production. *African Journal of Biotechnology*, 11(98), 16412–16420. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3867>
  - Sasanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C., & Veronico, P. (2021). Review on control methods against plant parasitic nematodes applied in southern member states (C zone) of the european union. *Agriculture*, 11(7), 1-19. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070602>
  - Sasser, J. N., & Freckman, D. W. (1987). world perspective on neamtology: the role of the society. In *Vistas on nematology : a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists / edited by Joseph A. Veech and Donald W. Dickson*. Hyattsville, Md. : Society of Nematologists, 1987.
  - Sayeed, A. (2007). Introduction of Plant Constituents and their Tests. *Pharmacognosy*, 1–40.
  - Schaller, H. (2004). New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.012>
  - Seddek, A. L. S., Mahmoud, M. E., Shiina, T., Hirayama, H., Iwami, M., Miyazawa, S., Nikami, H., Takewaki, T., & Shimizu, Y. (2009). Extract from *Calotropis procera* latex activates murine macrophages. *Journal of Natural Medicines*, 63(3), 297–303. <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0335-7>
  - Seiber, J. N., Nelson, C. J., & Lee, S. M. (1982). Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 21(9), 2343–2348. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)85202-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)85202-3)
  - Seignobos, C. (2016). L'arbuste *Calotropis procera*, un épisode de son histoire dans le bassin du lac Tchad. *Revue d'ethnoécologie*, 9, 2–17.

- <https://doi.org/10.4000/ethnoecologie.2462>
- Sevón, N., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859–868. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34924>
  - Shaker, K. H., Morsy, N., Zinecker, H., Imhoff, J. F., & Schneider, B. (2010). Secondary metabolites from *Calotropis procera* (Aiton). *Phytochemistry Letters*, 3(4), 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.07.009>
  - Sharafi, A., Sohi, H. H., Azadi, P., & Sharafi, A. A. (2014). Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(2), 257–262. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0217-z>
  - Sharafi, A., Sohi, H. H., Mousavi, A., Azadi, P., Razavi, K., & Ntui, V. O. (2013). A reliable and efficient protocol for inducing hairy roots in *Papaver bracteatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0246-2>
  - Sharma, P., & Sharma, J. D. (2000). In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. *Fitoterapia*, 71(1), 77–79. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00121-5)
  - Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2008). Individual and combined effects of the rolA, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 118–125. <https://doi.org/10.1002/bit.21727>
  - Sikder, M. M., & Vestergård, M. (2020). Impacts of root metabolites on soil nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01792>
  - Singh, R. S., Chattopadhyay, T., Thakur, D., Kumar, N., Kumar, T., & Singh, P. K. (2018). Hairy root culture for in vitro production of secondary metabolites. In Kumar N. A promising biotechnological approach: conservation, genetic improvement and utilization, (pp. 235-50). [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0535-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0535-1_10)
  - Singh, T., & Patel, B. A. (2015). Management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in bottle gourd using different botanicals in pots. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 39(3), 441–445. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0361-y>
  - Sinkar, V. P., Pythoud, F., White, F. F., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1988). rolA locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants. *Genes & Development*, 2(6), 688–697. <https://doi.org/10.1101/gad.2.6.688>
  - Sithole, N. T., Kulkarni, M. G., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2021). Potential nematicidal properties of plant extracts against *Meloidogyne incognita*. *South African Journal of Botany*, 139, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.014>
  - Skąła, E., Kicel, A., Olszewska, M. A., Kiss, A. K., & Wysokińska, H. (2015). Establishment of hairy root cultures of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *BioMed Research International*, 2015, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/181098>
  - Soares, P. M., Lima, S. R., Matos, S. G., Andrade, M. M., Patrocínio, M. C. A., De Freitas, C. D. T., Ramos, M. V., Criddle, D. N., Cardi, B. A., Carvalho, K. M., Assreuy, A. M. S., & Vasconcelos, S. M. M. (2005). Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.010>
  - Song, I. S., Jeong, Y. J., Kim, J. E., Shin, J., & Jang, S. W. (2019). Frugoside induces mitochondria-mediated apoptotic cell death through inhibition of sulfiredoxin expression in melanoma cells. *Cancers*, 11(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers11060854>
  - Souza Silva, P. T. de, Souza, L. M.F de, Morais, M. B. de, Moraes, M. M. de, Camara,

- C. A. G. da, & Ulisses, C. (2022). Effect of biotic elicitors on the physiology, redox system, and secondary metabolite composition of *Lippia alba* (Mill.) cultivated in vitro. *South African Journal of Botany*, 147, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.042>
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2014). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2286–2297. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0664-6>
  - Stiles, A. R., & Liu, C. Z. (2013). Hairy Root Culture: Bioreactor design and process intensification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 134, 91–114. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_181](https://doi.org/10.1007/10_2013_181)
  - Stuhlemmer, U., & Kreis, W. (1996). Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 34, 85–91.
  - Sudha, C. G., Sherina, T. V., Anu Anand, V. P., Reji, J. V., Padmesh, P., & Soniya, E. V. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the medicinal plant *Decalepis arayalpathra* and production of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0226-6>
  - Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., & Ranjitha Kumari, B. D. (2013). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris* : Hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products*, 44, 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.007>
  - Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62(6), 817–836. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2)
  - Sun, J., Xiao, J., Wang, X., Yuan, X., & Zhao, B. (2012). Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. *Biotechnology Letters*, 34(3), 563–569. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0804-4>
  - Sun, M., Pan, D., Chen, Y., Li, Y., Gao, K., & Hu, B. (2017). Coroglaucigenin enhances the radiosensitivity of human lung cancer cells through Nrf2/ROS pathway. *Oncotarget*, 8(20), 32807–32820. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16454>
  - Suo, X., Xu, F., Tan, K., Huang, L., Bao, C., & Luo, M. (2021). Functions of phytosterols in seed development of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Industrial Crops and Products*, 170, 113802. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113802>
  - Sweidan, N., Esawi, E., Ismail, M., & Alshaer, W. (2021). Anticancer Cardenolides from the aerial parts of *Calortopis procera*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 76(5), 243–250. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0281>
  - Tao, J., & Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*, 72(2), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.07.010>
  - Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3 Biotech*, 8(8), 351. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1375-z>
  - Teixeira, F. M., Ramos, M. V., Soares, A. A., Oliveira, R. S. B., Almeida-Filho, L. C. P., Oliveira, J. S., Marinho-Filho, J. D. B., & Carvalho, C. P. S. (2011). In vitro tissue culture of the medicinal shrub *Calotropis procera* to produce pharmacologically active proteins from plant latex. *Process Biochemistry*, 46(5), 1118–1124. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.033>

- Telli, A., Chedad, A., & Sadine, S. E. (2022). Ethnobotanical study of medicinal plants used for scorpion sting envenoming treatments in Algerian Septentrional Sahara. *International Journal of Environmental Studies*, 1–23. <https://doi.org/10.1080/00207233.2022.2055345>
- Thiruvengadam, M., Praveen, N., Maria John, K. M., Yang, Y. S., Kim, S. H., & Chung, I. M. (2014). Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(3), 545–557. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0506-4>
- Thomas, S. N. (2019). Chapter 10 - Mass spectrometry. In W. Clarke & M. A. Marzinke (Eds.), *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)* (pp. 171–185). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7>
- Toivonen, L. (1993). Utilization of Hairy Root Cultures for Production of Secondary Metabolites. *Biotechnology Progress*, 9(1), 12–20. <https://doi.org/10.1021/bp00019a002>
- Tomilova, S. V., Kitashov, A. V., & Nosov, A. M. (2022). Cardiac Glycosides: Distribution, Properties and Specificity of Formation in Plant Cell and Organ Cultures In Vitro. *Russian Journal of Plant Physiology*, 69(3). <https://doi.org/10.1134/S1021443722030165>
- Trovato, M., Maras, B., Linhares, F., & Costantino, P. (2001). The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13449–13453. <https://doi.org/10.1073/pnas.231320398>
- Trypsteen, M., Van Lijsebettens, M., Van Severen, R., & Van Montagu, M. (1991). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports*, 10(2), 85–89. <https://doi.org/10.1007/BF00236463>
- Van Quaquebeke, E., Simon, G., André, A., Dewelle, J., El Yazidi, M., Bruyneel, F., Tuti, J., Nacoulma, O., Guissou, P., Decaestecker, C., Braekman, J. C., Kiss, R., & Darro, F. (2005). Identification of a novel cardenolide (2'-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: Structure-activity relationship analyses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(3), 849–856. <https://doi.org/10.1021/jm049405a>
- Vaye, O., Ngumbu, R. S., & Xia, D. (2022). A review of the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography MS-based techniques for the analysis of persistent organic pollutants and ultra-trace level of organic pollutants in environmental samples. *Reviews in Analytical Chemistry*, 41(1), 63–73. <https://doi.org/10.1515/revac-2022-0034>
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes* : Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(5), 383–403. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Verma, P. C., ur Rahman, L., Negi, A. S., Jain, D. C., Khanuja, S. P. S., & Banerjee, S. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth.: establishment and selection of superior hairy root clone. *Plant Biotechnology Reports*, 1(3), 169–174. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0029-0>
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Waheed, N., Jabeen, K., Iqbal, S., & Javaid, A. (2016). biopesticidal activity of *Calotropis procera* L. Against *Macrophomina phaseolina*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 13, 163–167.
- Wang, J. W., & Wu, J. Y. (2013). Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. *Advances in*

- Biochemical Engineering/Biotechnology*, 134, 55–89. <https://doi.org/10.1007/10>
- Wang, Y., Zhang, S., Huang, F., Zhou, X., Chen, Z., Peng, W., & Luo, M. (2018). VirD5 is required for efficient *Agrobacterium* infection and interacts with *Arabidopsis* VIP2. *New Phytologist*, 217(2), 726–738. <https://doi.org/10.1111/nph.14854>
  - White, F. F., & Nester, E. W. (1980). Hairy root: Plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1134–1141. <https://doi.org/10.1128/jb.141.3.1134-1141.1980>
  - White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 33–44. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.33-44.1985>
  - Winans, S. C. (1992). Two-Way Chemical Signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiol Rev*, 56(1), 12–31.
  - Wongshaya, P., Chayjarung, P., Tothong, C., Pilaisangsuee, V., Somboon, T., Kongbangkerd, A., & Limmongkon, A. (2020). Effect of light and mechanical stress in combination with chemical elicitors on the production of stilbene compounds and defensive responses in peanut hairy root culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.015>
  - Wu, S., Lv, G., & Lou, R. (2012). Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. In R. Davarnejad, & M. Jafarkhani (Eds.), *Applications of Gas Chromatography*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32446>
  - Ya-ut, P., Chareonsap, P., & Sukrong, S. (2011). Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. *Biotechnology Letters*, 33(12), 2519–2526. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0717-2>
  - Yadav, R. N. S., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phtology*, 3(12), 10–14.
  - Yang, F. Q., Feng, K., Zhao, J., & Li, S. P. (2009). Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(5), 1172–1178. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.025>
  - Yff, B. T. S., Lindsey, K. L., Taylor, M. B., Erasmus, D. G., & Jäger, A. K. (2002). The pharmacological screening of *Pentanisia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 101–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00380-4)
  - Yigezu Wendimu, G. (2021). Biology, Taxonomy, and Management of the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Sweet Potato. *Advances in Agriculture*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8820211>
  - Yoneyama, T., Arai, M. A., Akamine, R., Koryudzu, K., Tsuchiya, A., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Itoh, M., Okamoto, R., & Ishibashi, M. (2017). Notch Inhibitors from *Calotropis gigantea* That Induce Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells. *Journal of Natural Products*, 80(9), 2453–2461. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00282>
  - Yoon, J. Y., Chung, I. M., & Thiruvengadam, M. (2015). Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities from transgenic hairy root cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *South African Journal of Botany*, 100, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.05.008>
  - Zafar, S., Dilshad, E., Ismail, H., Rizvi, C. B., & Mirza, B. (2019). Rol genes enhance content of artemisinin and other secondary metabolites in Shennong hybrid of *Artemisia annua*. *Chinese Herbal Medicines*, 11(2), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.11.002>

- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zhao, W., Liu, M., Shen, C., Liu, H., Zhang, Z., Dai, W., Liu, X., & Liu, J. (2020). Differentiation, chemical profiles and quality evaluation of five medicinal *Stephania* species (*Menispermaceae*) through integrated DNA barcoding, HPLC-QTOF-MS/MS and UHPLC-DAD. *Fitoterapia*, 141, 104453. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104453>
- Zheng, Z., Zhou, Z., Zhang, Q., Zhou, X., Yang, J., Yang, M. R., Zhu, G. Y., Jiang, Z. H., Li, T., Lin, Q., & Bai, L. P. (2021). Non-classical cardenolides from *Calotropis gigantea* exhibit anticancer effect as HIF-1 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 109, 104740. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104740>
- Zhou, M. L., Zhu, X. M., Shao, J. R., Tang, Y. X., & Wu, Y. M. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3228-0>
- Zhou, L., Cai, L., Guo, Y., Zhang, H., Wang, P., Yi, G., & Huang, Y. (2019). Calotropin activates YAP through downregulation of LATS1 in colorectal cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, 12, 4047–4054. <https://doi.org/10.2147/OTT.S200873>

# **ANNEXES**

## Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

### 1.1. Composition du milieu de culture MS (Murashige & Skoog, 1962)

Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
<b>Macroéléments</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	440
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Microéléments</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
	MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	22,30
	ZnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	8,60
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025
	COCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fer</b>	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O
<b>EDTA</b>	Na <sub>2</sub> EDTA	Na <sub>2</sub> EDTA
<b>Vitamines</b>	Glycine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Thiamine HCl	0,1
	Myoinositol	100

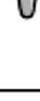
## 1.2. Composition du milieu de culture B5 (Gamborg et al., 1968)

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

## Annexe 2 : Protocoles d'extraction d'ADN génomique des plantes et plasmidique des bactéries

### 2.1. Protocoles d'extraction d'ADN génomique des plantes

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

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

## 2.2. Protocole de purification de l'ADN plasmidique des bactéries

### Protocol-at-a-glance (Rev.07)

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

## Annexe 3 : Tests statistiques

### 1. Variable dépendante : pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera*

#### 1.1. Variable dépendante : pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera* en fonction de l'âge des explants

Tests des effets inter-sujets					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	151,389 <sup>a</sup>	2	75,694	36,333	,000
Ordonnée à l'origine	1736,111	1	1736,111	833,333	,000
Âge des explants	151,389	2	75,694	36,333	<b>,000</b>
Erreur	12,500	6	2,083		
Total	1900,000	9			
Total corrigé	163,889	8			

a. R deux = ,924 (R deux ajusté = ,898)

Student-Newman-Keuls

age	N	Sous-ensemble		
		1	2	3
60j	3	c		
45j	3		b	
30j	3			a
Sig.		1,000	1,000	1,000

#### 1.2. Variable dépendante : pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera* en fonction du milieu de co-culture

Tests des effets inter-sujets					
Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	364,063 <sup>a</sup>	3	121,354	25,889	,000
Ordonnée à l'origine	8667,187	1	8667,187	1849,000	,000
Milieu de co-culture	364,063	3	121,354	25,889	<b>,000</b>
Erreur	37,500	8	4,688		
Total	9068,750	12			
Total corrigé	401,563	11			

a. R deux = ,907 (R deux ajusté = ,872)

Student-Newman-Keuls

Milieu	N	Sous-ensemble			
		1	2	3	4
MS	3	d			
B5	3		c		
MS/2	3			b	
B5/2	3				a
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

**1.3. Variable dépendante : pourcentage d'induction de CRs chez *C. procera* en fonction de la souche bactérienne et de la nature des explants**

Tests des effets inter-sujets

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	10561,111 <sup>a</sup>	5	2112,222	62,713	,000
Ordonnée à l'origine	61834,722	1	61834,722	1835,918	,000
Souche	3068,056	1	3068,056	91,093	,000
Explant	6904,861	2	3452,431	102,505	,000
Souche * Explant	588,194	2	294,097	8,732	,005
Erreur	404,167	12	33,681		
Total	72800,000	18			
Total corrigé	10965,278	17			

a. R deux = ,963 (R deux ajusté = ,948)

Student-Newman-Keuls	Sous-ensemble					
	1	2	3	4	5	6
Hypocotyle ATCC15834	f					
Hypocotyle A4		e				
Cotylédon ATCC15834			d			
Feuille ATCC15834				c		
Cotylédon A4					b	
Feuille A4						a

**2. Variable dépendante : nombre moyen de racines par explant en fonction de la souche bactérienne et de la nature des explants**

**Tests des effets inter-sujets**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	374,313 <sup>a</sup>	5	74,863	105,947	,000
Ordonnée à l'origine	1195,442	1	1195,442	1691,810	,000
Souche	130,950	1	130,950	185,323	,000
Explant	219,069	2	109,535	155,015	,000
Souche * Explant	24,294	2	12,147	17,191	,000
Erreur	8,479	12	,707		
Total	1578,235	18			
Total corrigé	382,793	17			

a. R deux = ,978 (R deux ajusté = ,969)

Student-Newman-Keuls

	Sous-ensemble			
	1	2	3	4
Hypocotyle ATCC15834	d			
Hypocotyle A4	c			
Cotylédon ATCC15834	b			
Feuille ATCC15834	b			
Cotylédon A4	a			
Feuille A4	a			

### 3. Variable dépendante : Indice de croissance des lignées de *C. procera*

Tests des effets inter-sujets

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	1304,976 <sup>a</sup>	6	217,496	43,688	,000
Ordonnée à l'origine	22760,506	1	22760,506	4571,896	,000
Lignée racinaire	1304,976	6	217,496	43,688	<b>,000</b>
Erreur	69,697	14	4,978		
Total	24135,178	21			
Total corrigé	1374,673	20			

a. R deux = ,949 (R deux ajusté = ,928)

Student-Newman-Keuls

Lignée racinaire	N	Sous-ensemble			
		1	2	3	4
HR2	3	d			
HR1	3	d			
HR6	3		c		
HR3	3		c		
HR7	3		c		
HR5	3			b	
HR4	3				a
Sig.		,093	,324	1,000	1,000

**4. Variable dépendante : Teneur en phytostérols des sept lignées racinaires transformées de *C. procera* et de racines et de feuilles non transformées**

**4.1. Variable dépendante : Teneur en campesterol des sept lignées racinaires transformées de *C. procera* et de racines et de feuilles non transformées**

**Tests des effets inter-sujets**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	105543,477 <sup>a</sup>	8	13192,935	121,362	,000
Ordonnée à l'origine	1184919,433	1	1184919,433	10900,112	,000
Organe	105543,477	8	13192,935	121,362	<b>,000</b>
Erreur	1956,728	18	108,707		
Total	1292419,638	27			
Total corrigé	107500,205	26			

a. R deux = ,982 (R deux ajusté = ,974)

**Student-Newman-Keuls**

HRLines	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
Racine	3	f					
HR5	3		e				
HR1	3		e	d			
Feuille	3		e	d			
HR7	3			d	c		
HR6	3				c		
HR2	3				c		
HR3	3					b	
HR4	3						a
Sig.		1,000	,671	,132	,221	1,000	1,000

**4.2. Variable dépendante : Teneur en stigmastérol des sept lignées racinaires transformées de *C. procera* et de racines et de feuilles non transformées**

**Tests des effets inter-sujets**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	253855,209 <sup>a</sup>	8	31731,901	165,648	,000
Ordonnée à l'origine	1625362,785	1	1625362,785	8484,758	,000
Organe	253855,209	8	31731,901	165,648	<b>,000</b>
Erreur	3448,128	18	191,563		
Total	1882666,122	27			
Total corrigé	257303,337	26			

a. R deux = ,987 (R deux ajusté = ,981)

Student-Newman-Keuls

HRLines	N	Sous-ensemble			
		1	2	3	4
Feuille	3	d			
Racine	3	d			
HR1	3		c		
HR5	3		c		
HR6	3			b	
HR7	3			b	
HR2	3			b	
HR4	3				a
HR3	3				a
Sig.		,948	,808	,510	,372

**4.3. Variable dépendante : Teneur en  $\beta$ -sitostérol des sept lignées racinaires transformées de *C. procera* et de racines et de feuilles non transformées**

**Tests des effets inter-sujets**

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	167083,352 <sup>a</sup>	8	20885,419	82,336	,000
Ordonnée à l'origine	1826552,250	1	1826552,250	7200,722	,000
Organe	167083,352	8	20885,419	82,336	,000
Erreur	4565,922	18	253,662		
Total	1998201,525	27			
Total corrigé	171649,275	26			

a. R deux = ,973 (R deux ajusté = ,962)

**Student-Newman-Keuls**

HRLines	N	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
HR5	3	f					
Racine	3	f	e				
HR1	3		e				
HR7	3			d			
HR2	3			d	c		
Feuille	3				c		
HR6	3				c		
HR3	3					b	
HR4	3						a
Sig.		,222	,129	,112	,126	1,000	1,000

# **PUBLICATIONS**

## GC-MS PROFILING OF TRANSFORMED ROOTS OF *CALOTROPIS PROCERA*

DJERDJOURI Amina<sup>1\*</sup>, ABBAD Mohamed<sup>2</sup> et BOUMRAH Yacine<sup>3</sup>

1. Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologie, École Nationale Supérieure Agronomique (ES1603), 16200 El-Harrach, Alger, Algérie
2. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, Département de Biotechnologie et Agro-Écologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida1, BP 270, Route de Soumaâ, Blida 09000 - Algérie
3. Institut National de Criminologie et de Criminologie (INCC/GN), Bouchaoui, Alger, Algérie

Reçu le 19/04/2021, Révisé le 29/09/2021, Accepté le 08/11/2021

### Abstract

**Description of the subject:** *Calotropis procera* (Ushaar) is a xerophyte species containing secondary metabolites that confer a number of biological and pharmacological properties to be used as a potential source of disease-treatment drugs. A number of studies have reported on the chemical composition of Ushaar leaves but there are no reports on hairy roots composition.

**Objective:** The aim of this study was thus to analyze the phytochemical composition of the hairy roots of *C. procera* induced by genetic transformation via *Agrobacterium rhizogenes*.

**Methods:** Induced hairy roots (4 weeks old) have been dried, grounded into fine powder and solubilized into a solvent solution containing 20% dichloromethane, 50% acetonitrile, 10% ethanol, and 20% hexane. The extracts have been analyzed by Gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS).

**Results:** Different chemical compounds that belong to different classes of secondary metabolites have been identified. Those identified compounds include fatty acids, sterols, tri-terpenes, alkanes and esters. The most abundant components were; palmitic acid (23.15%); linoleic acid isomers 1 and 2 (14.36%, 12.18% respectively); squalene (8.60%); stigmaterol (12.96%);  $\beta$ -sitosterol (5.07%) and campesterol (4.93%).

**Conclusion:** The identified compounds have various therapeutic effects as anticancer, anti-inflammatory and antibacterial molecules. The ability to induce hairy roots containing active compounds suggests the possibility of using *Calotropis* as a source of potential therapeutic metabolites through a plant molecular pharming setting.

**Keywords:** *Calotropis procera*; *Apocynaceae*; hairy roots; GC-MS; secondary metabolites, ushaar

## PROFILAGE PAR CPG-SM DES RACINES TRANSFORMÉES DE *CALOTROPIS PROCERA*

### Résumé

**Description du sujet :** *Calotropis procera* (Ushaar) est une espèce xérophylite contenant des métabolites secondaires qui confèrent un certain nombre de propriétés biologiques et pharmacologiques pouvant être utilisé comme source potentielle de médicaments pour le traitement des maladies. Plusieurs études ont rapporté la composition chimique des feuilles de l'Ushaar, mais aucune n'a rapporté la composition chimique des chevelus racinaires.

**Objectifs :** Le but de cette étude est d'analyser la composition phytochimique des chevelus racinaires de *C. procera* induits par la transformation génétique via *Agrobacterium rhizogenes*.

**Méthodes :** Les chevelus racinaires induits (âgés de 4 semaines) ont été séchés, broyés en poudre fine et solubilisés dans une solution de solvant contenant 20% de dichlorométhane, 50% d'acétonitrile, 10% d'éthanol et 20% d'hexane. Les extraits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et spectrométrie de masse (SM).

**Résultats :** Différents composés chimiques appartenant à différentes classes de métabolites secondaires ont été identifiés. Ces composés identifiés comprennent les acides gras, les stérols, les tri-terpènes, les alcanes et les esters. Les composants les plus abondants étaient ; l'acide palmitique (23,15%) ; les isomères 1 et 2 de l'acide linoléique (14,36%, 12,18% respectivement); le squalène (8,60%); le stigmastérol (12,96%); le  $\beta$ -sitostérol (5,07%) et le campestérol (4,93%).

**Conclusion :** Les composés identifiés ont divers effets thérapeutiques en tant que molécules anticancéreuses, anti-inflammatoires et antibactériennes. La capacité à induire des chevelus racinaires contenant des composés actifs suggère la possibilité d'utiliser *Calotropis* comme source de métabolites thérapeutiques potentiels par le biais des paramètres du molecular pharming des plantes.

**Mots clés :** *Calotropis procera* ; *Apocynaceae* ; chevelus racinaires ; CPG-SM ; métabolites secondaires, ushaar

\* Auteur correspondant : DJERDJOURI Amina, E-mail : aminadjer@gmail.com

## INTRODUCTION

Plants have been used as a natural source of medication since the dawn of civilization. Plant roots and shoots have been described by ancient practitioners to treat different kinds of diseases without knowledge of precise chemical content or mode of action of the active compounds in plant tissues [1], [2]. *Calotropis procera* (Ait.) W.T. Aiton (Fig. 1) (also known as giant milkweed, ushaar, rubber bush, king's crown or Sodom apple) is a xerophytic perennial desert shrub (Apocynaceae) that contain different types of chemical and medicinal properties. Native to tropical and subtropical Afro-Asian regions, the shrub grows on a variety of soils and under harsh environmental conditions [3], [4], [5].



Figure 1. *Calotropis procera*.

A number of secondary metabolites have already been identified in this plant, such as sterols [6], cardiac glycosides [7], triterpenes [8], flavonoids [9], alkaloids, coumarins, saponins and tannins [10]. Many biological and pharmacological properties have also been attributed to the plant, such as anticancer activity [11]. Despite some toxic effects, different organs of *Calotropis* have been used in local traditional medicine for the treatment of multiple diseases or injuries, such as rheumatism and asthma, leprosy, elephantiasis, fever, menorrhagia, malaria, snake bite [5], [12], antimicrobial, anti-inflammatory, anti-diarrheal, anthelmintic, spasmolytic, immunomodulatory, antipyretic, antioxidant, wound healing, protective, analgesic, acaricide, antinociceptive, antiulcer and anti-fertility, cheese-making activities and as a source of natural colorants for textile or in the production of nanoparticles [5], [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19]. Over the last few decades, the culture of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* has been largely used for the

production of valuable bioactive molecules [20], [21], [22], [23], [24], [25]. Hairy roots cultures offer many advantages related to rapidity of growth in hormone-free culture medium, genotypic and biochemical stability, and high productivity of secondary metabolites compared to cells or callus cultures, or even the roots of the mother plants [26], [27], [28]. Several studies already reported the chemical composition of leaves and roots of *C. procera* [29], [30], [7], but to the best of our knowledge, no research has been reported so far on the chemical analysis of *C. procera* hairy roots.

Our aim was to induce the formation of hairy roots in *C. procera* through *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) and to analyze the chemical composition of the developing hairy roots using gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). These are powerful techniques routinely used to analyze the content of small molecules in plant, plant genetic and metabolic engineering studies.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Plant material

Healthy plants of *C. procera* grown in the region of Adrar (South Algeria) were used as a source of seeds. Mature fruits have been harvested and undamaged seeds extracted, cleaned from silk fibers, and cultured in vitro. The seeds were first plated into test tubes containing 20 mL of Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 7 g/L of agar and 20 g/L sucrose. In vitro seedlings were then transferred into a growth chamber at a temperature of  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  and a photoperiod of 16 hours light and 8 hours dark. After 30 days in these culture conditions, the seedlings have been used as a source explants.

### 2. Culture of transformed roots (hairy roots)

This research was conducted in the Genetic Resources and Biotechnology laboratory at the Higher National Agronomic School, El Harrach, Algiers, Algeria. *C. procera* plants cultivated in vitro were genetically transformed by *A. rhizogenes* strains (A4 and AR15834) to obtain transformed roots or hairy roots. These latter were cultivated in half strength B5 medium in complete darkness and harvested after 4 weeks for further chromatographic analysis by GC-MS.

### 3. Sample preparation

Hairy roots (4 weeks old) were dried in an oven at  $40^\circ\text{C}$  until a constant dry weight was obtained.

Dried hairy roots were ground into a fine powder in a ceramic mortar and pestle. Two grams of hairy root powder was solubilized in 10 ml of a solvent solution containing 20% dichloromethane, 50% acetonitrile, 10% ethanol, and 20% hexane. The tube containing the sample was agitated in a vortex mixer (vortex VWR) for 1 min, and then homogenized in an ultrasonic bath (Fisher Scientific) at room temperature. The samples were shaken mechanically for 30 min in a rotary shaker (Heidolph), and then centrifuged for 5 min at 3500 rpm (SIGMA). An evaporation step to remove any residual liquids was performed in nitrogen evaporator (Liebisch) until drying the extract. 500 µL of methanol (LC-MS grade) was added, followed by vortexing for 1 hour. The mixes were homogenized in an ultrasonic bath for 20 min and centrifuged for 5 minutes at 3500 rpm. The supernatant was recovered and filtered using a 45 µm microfilter in a vial for GC-MS analysis.

#### 4. Gas chromatography – Mass spectrometry (GC/MS) conditions

Qualitative analysis was carried out by GC-MS. The study was conducted using a Hewlett Packard HP 5890 Series II Gas Chromatograph GC System coupled to an HP 5971A mass selective detector (MSD) manufactured by Agilent (United States), which is a quadrupole mass analyzer. 1-µL samples were injected automatically in splitless mode. Chromatographic separation of the analyzed samples was performed on a HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25µm) in a temperature gradient consisted of five segments. Initial column temperature (90°C) was maintained for 0.5 min, increased linearly at the rate of 20°C/min to 200°C, then to 280°C at 15°C/min and finally to 320°C at 20°C/min, maintained at this temperature for 3.67 min. Helium at a constant flow of 1 mL/min was used as a carrier gas. The spectrometer was operated in electron ionization mode (EI) and the electron beam energy was 70 eV. Positive ions were analyzed. Acquisition was carried out in scan mode, and the entire mass range from 38 to 650 amu was collected.

## RESULTS

We aimed to analyze the chemical composition of hairy roots in the medicinal plant *Calotropis procera* after transformation by *A. rhizogenes*. The infection by *A. rhizogenes* results in the transfer of genetic material from bacteria to the plant and the formation of hairy roots [24], [28].

The *C. procera* hairy root culture was grown in half strength B5 medium in complete darkness. Thirty-six bioactive compounds belonging to different classes of metabolites have been identified by GC-MS analysis (Figure 2, 3, 4, 5 and 6). The identification of these compounds was performed based on the interpretation of the corresponding mass spectra compared with data reported in the literature as well as with the spectra of the NIST library. The GC-MS retention time (RT), name, molecular formula, molecular weight and peak area of the compounds are given in Table (1).

The main metabolites that have been found in *C. procera* hairy roots are palmitic acid (23.15%), linoleic acid: isomer 1 and isomer 2 (14.36%, 12.18% respectively), stigmaterol (12.96%), squalene (8.60%), β-sitosterol (5.07%), and campesterol (4.93%) (Figure 7). Other compounds of lower concentrations have also been identified, such as 4.8.A Dimethyl.6(2. methyl oxyranil)-4A,5,6,7,8,8A-hyxahydro-2(1H) naphthalene (2,98%), stigmastadienone (1.69%), stearic acid (1.41%), tocopherol (vitamin E) (1.34%) and egosta-5, 22-dien-3-ol (1.07%). A certain number of compound trace concentrations have also been found, including cholesterol (0.85%), pentadecanoic acid (0.83%), 1,4-Dihydro-9-isopropylidene-5,6,7,8-tetramethoxy-1,4-methanonaphthalene (0,80%), tricosane (0.77%), Delta.6-progesterone (0.75%), cyclotetradecane (0.67%), O-benzo[B]xenthen-12-one, 11-(acetyloxy) (0,63%), palmitic acid ethyl ester (0.54%), palmitic acid glycerol ester (0.49%), 4. ((1.E).3 hydroxyl.1.proponyl)-2-methoxyphenol (0,43%), heptadecanoic acid (0.41%), ferulic acid glycine conjugate (0.40%), heptadecane (0.38%), β-progesterone (0.36%), 1,21-Docosadiene (0,30%), brassidic acid methyl ester (0.27%), 4,4'.-Dibutoxy-1,1'biphenyl (0,26%), Elemicin.M (demethyl-) iso-2 (0,24%), 17-Cyclohexyl triacontane (0,17), linolenic acid (0.15%), octadecane (0.15%), pentadecane (0.14%), 2-(octadecyloxy) ethanol (0,04%).

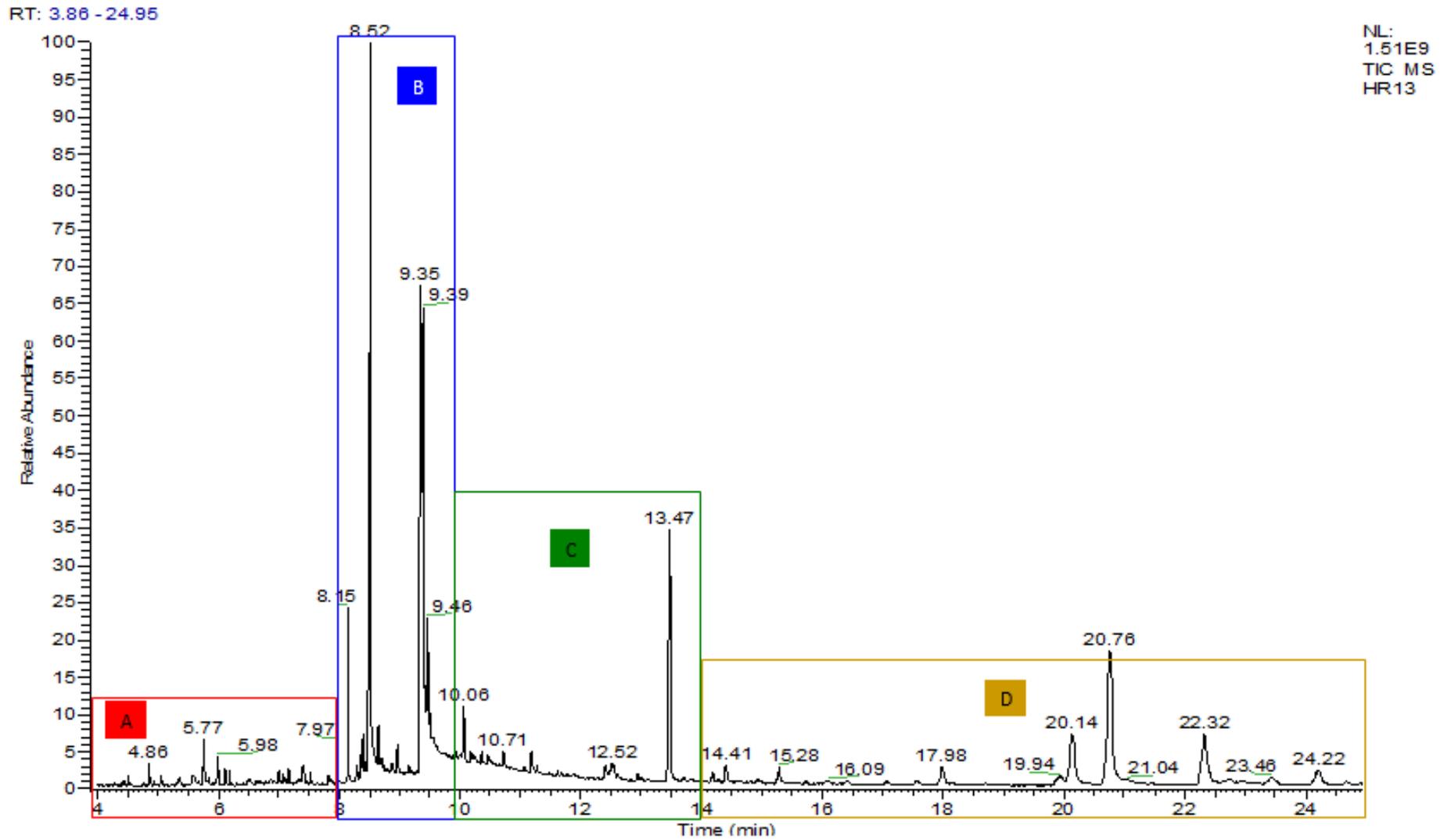


Figure 2: GC-MS chromatogram (TIC: Total Ion Chromatogram) of hairy roots of *C. procera* Ait.

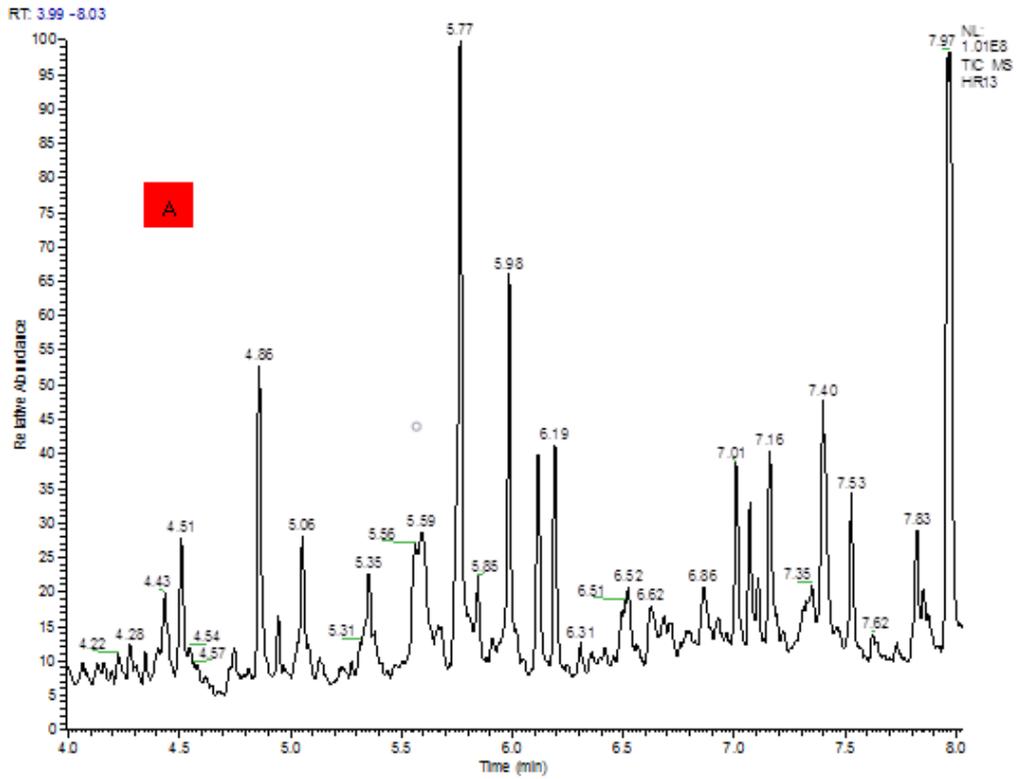


Figure 3: Part A: GC-MS chromatogram of hairy roots of *C. procera Ait.* (Retention time: 4.00-8.00 min)

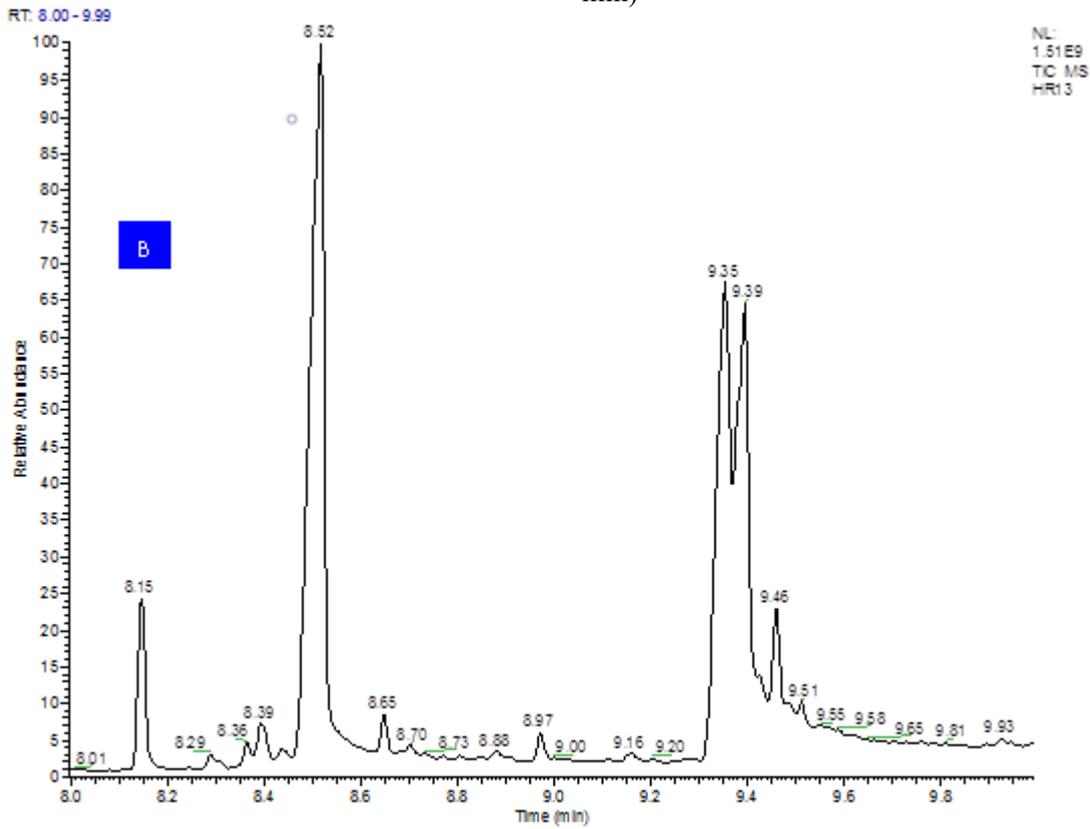


Figure 4: Part B: GC-MS chromatogram of hairy roots of *C. procera Ait.* (Retention time: 8.00-10.00 min)

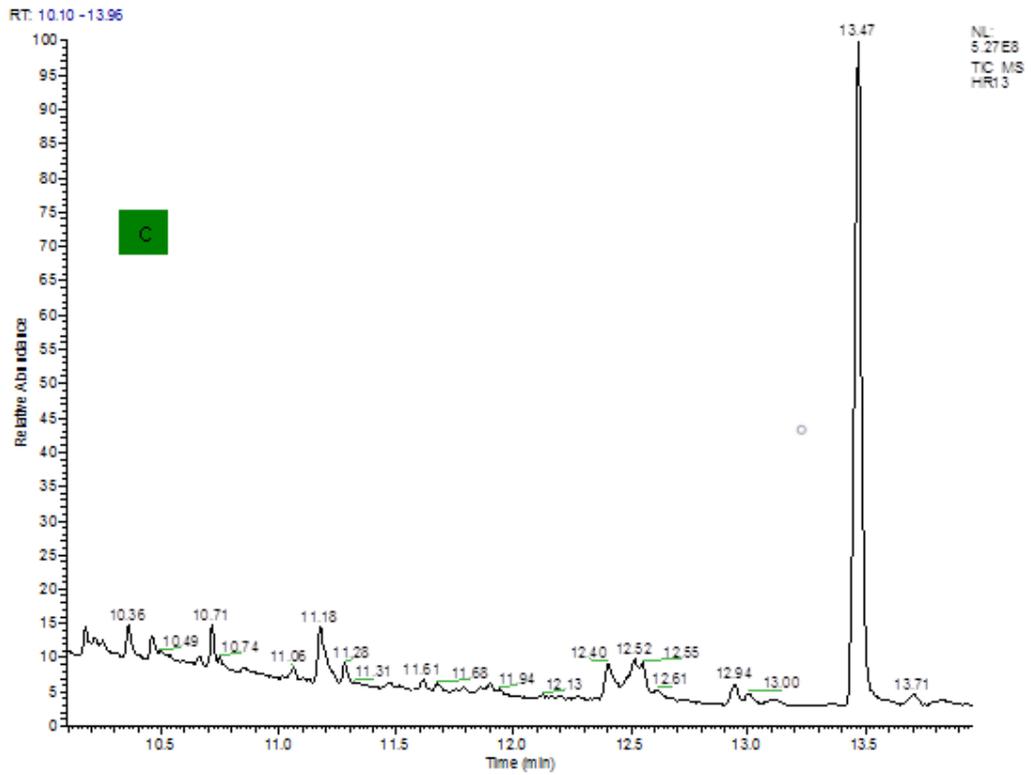


Figure 5: Part C: GC-MS chromatogram of hairy roots of *C. procera* Ait. (Retention time: 10.00-14.00 min)

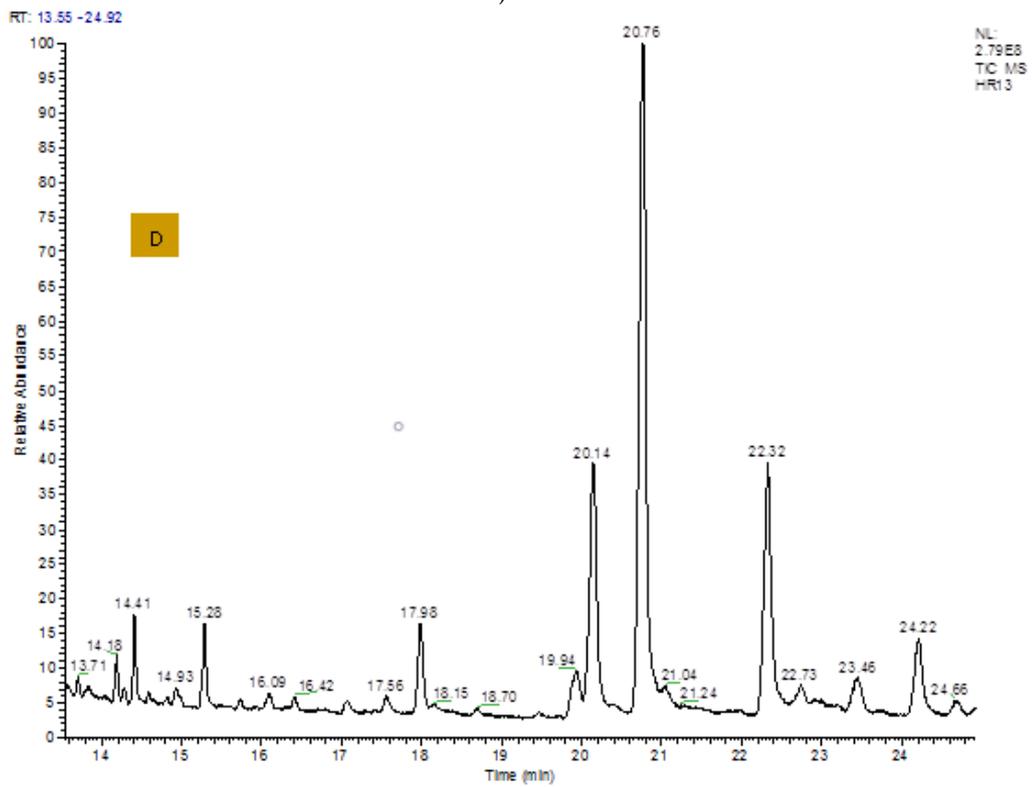
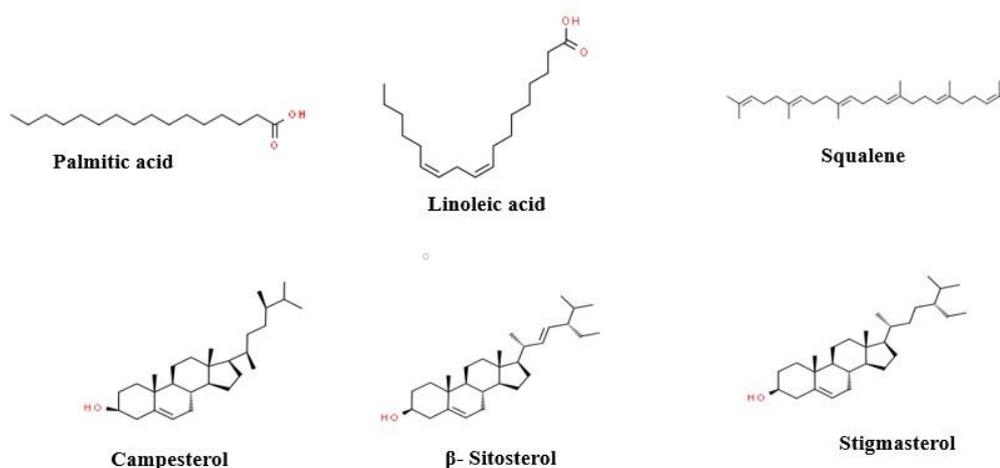


Figure 6: Part D: GC-MS chromatogram of hairy roots of *C. procera* Ait. (Retention time: 14.00-25.00 min)

**Table 1:** Chemical compounds identified in *C. procera* hairy roots extract using GC-MS analysis

TIC Part	N°	Retention Time (RT) (minute)	Compound's Name	Molecular formula	Molecular Weight (MW)	Peak Area %
A	1	4.43	Pentadecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212	0,14
	2	5.06	Octadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	254	0,15
	3	5.59	Heptadecane	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240	0,38
	4	5.77	Cyclotetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196	0,67
	5	5.98	Ferulic acid glycine conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	279	0,40
	6	6.31	2-(octadecyloxy) ethanol	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	314	0,04
	7	6.52	Linolenic acid	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292	0,15
	8	7.16	Elemicin.M (demethyl-) iso-2	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	236	0,24
	9	7.40	4. ((1.E).3 hydroxyl.1.proponyl)-2-methoxyphenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	180	0,43
	10	7.97	Pentadecanoic acid	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242	0,83
B	11	8.15	4.8.A Dimethyl.6(2. methyl oxyranil)-4A,5,6,7,8,8A-hyxahydro-2(1H)naphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	243	2,98
	12	8.52	Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	23,15
	13	8.65	Palmitic acid ethyl ester	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	0,54
	14	8.97	Heptadecanoic acid	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	0,41
	15	9.35	Linoleic acid isomer 1	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	14,36
	16	9.39	Linoleic acid isomer 2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	12,18
	17	9.46	Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	1,41
C	18	10.06	Tricosane	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	324	0,77
	19	10.36	Brassicic acid methyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	352	0,27
	20	10.46	Linoleic acid isomer 3	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	0,20
	21	10.71	1,21-Docosadiene	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub>	306	0,30
	22	11.18	Palmitic acid glycerol ester	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	330	0,49
	23	11.28	17-Cyclohexyl triacontane	C <sub>39</sub> H <sub>78</sub>	546	0,17
	24	12.40	O-benzo[B]xenthen-12-one, 11-(acetyloxy)	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	304	0,63
	25	12.94	4.4'.-Dibutoxy-1,1'biphenyl	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	298	0,26
	26	13.47	Squalene	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410	8,60
D	27	14.18	β-Progesterone	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314	0,36
	28	14.41	Delta.6-progesterone	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	312	0,75
	29	15.28	1,4-Dihydro-9-isopropylidene-5,6,7,8-tetrametoxy-1,4-methanonaphthalene	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	302	0,80
	30	17.98	Tocopherol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	430	1,34
	31	19.94	Ergosta-5, 22-dien-3-ol	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	398	1,07
	32	20.14	Campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	400	4,93
	33	20.76	Stigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412	12,96
	34	22.32	β-sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414	5,07
	35	23.46	Cholesterol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	386	0,85
	36	24.22	Stigmastadienone	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O	410	1,69

Figure 7. Structure of major constituents identified from *C. procera* hairy root cultures: palmitic acid, linoleic acid, squalene, campesterol, β-sitosterol and stigmasterol.

## DISCUSSION

Previous studies reported chemical composition of leaves, latex and fruits of *C. procera* by GC-MS analysis [31], [32], [33]. In this research, a variety of bioactive molecules was identified in hairy root culture extracts, ranging from fatty acids, sterols, terpenes, alkanes, esters and others. Some of these molecules were already detected in different parts of *C. procera* plants. Palmitic acid, linoleic acid and other fatty acids were previously detected in *C. procera* [32], [34], [35]. These fatty acids and their derivatives are known for their antibacterial, antiviral, anti-carcinogenic and anti-atherosclerotic properties [36], [37]. Previous studies indicated the presence of sterols in *C. procera*, such as stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and campesterol [6], [31]. Several activities of stigmasterol have been described as antioxidant, anti-tumor and anti-inflammatory molecules [38]. Paniagua-Pérez *et al.* [39] have also investigated immunostimulant potential of  $\beta$ -sitosterol. Antifungal activities of these three sterols have already been proved [40]. Naser *et al.* [32] and Alhazmi *et al.* [41] have also reported the presence of squalene in *C. procera* leaf extract. This compound is widely used as a principal component of parenteral emulsions for drug and vaccine delivery [42]. Squalene seems also to reduce inflammation when used as an adjuvant during a chemotherapy in tumor-bearing mice [43].

Some studies report the presence of tocopherol (Vitamin E), tricosane, esters and alkanes [32], [33], [41]. Tricosane and alkanes have antibacterial effects [44].

The presence of all these molecules indicates that *C. procera* hairy roots can be used as a source of anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, anti-ulcerative and anti-tumoral agents [45], [46]. The multiple therapeutic properties of the chemical compounds present in this plant suggests that the use of *C. procera* roots in traditional medicine is somewhat supported by scientific evidence. However, further research would be required to enhance the overall yield of bioactive molecules produced in hairy roots at economic and pharmaceutical levels, which would require advanced research to understand their biosynthetic pathways and mechanisms and then to enhance their production for biopharmaceutical purposes.

## CONCLUSION

This study aims to analyzing the chemical composition of the extracts of genetically transformed roots of *C. procera*, a high medicinal valued plant widely spread across Algeria. The analysis has been carried out using GC-MS method as a direct and fast analytical approach for the identification of fatty acids, sterols, terpenes, alkanes and esters. Thirty-six compounds of different chemicals and metabolites classes have been identified that the predominant molecules were palmitic acid, linoleic acid, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol and squalene. Some of these compounds have anti-cancerous, antibiotic anti-inflammatory, antifungal and antipyretic effects, suggesting the high potential of *C. procera* hairy roots to produce preventive and therapeutic biopharmaceuticals.

## REFERENCES

- [1] A. G. Atanasov *et al.*, "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 8. Elsevier B.V., pp. 1582–1614, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- [2] B. B. Petrovska, "Historical review of medicinal plants' usage," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 6, no. 11, pp. 1–5, 2012.
- [3] M. K. and B. N. Bourmita Y., Cherit A., Didi Ould El Hadj M., "Anti-termite Activity of Aqueous Extracts from Saharan Toxic Plants Against *Anacanthotermes ochraceus*," *J. Entomol.*, vol. 10, no. 4, pp. 207–213, 2013.
- [4] L. M. Hassan, T. M. Galal, E. A. Farahat, and M. M. El-Midany, "The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T.," *Trees - Struct. Funct.*, vol. 29, no. 2, pp. 311–320, 2015, doi: 10.1007/s00468-015-1158-7.
- [5] A. S. and P. S. B. Sharma Rohit, Gulab S. Thakur, Bhagwan S. Sanodiya, Ashish Savita, Mukeshwar Pandey, "Therapeutic Potential of *Calotropis procera*: A giant milkweed," *J. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 42–57, 2012, doi: 10.9790/3008-0424257.
- [6] S. J. Chundattu, V. K. Agrawal, and N. Ganesh, "Phytochemical investigation of *Calotropis procera*," *Arab. J. Chem.*, vol. 9, pp. S230–S234, 2016, doi: 10.1016/j.arabjc.2011.03.011.
- [7] A. Pandey *et al.*, "Transcriptome and Metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 34464, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1038/srep34464.
- [8] S. R. M. Ibrahim *et al.*, "New ursane-type triterpenes from the root bark of *Calotropis procera*," *Phytochem. Lett.*, vol. 5, no. 3, pp. 490–495, 2012, doi: 10.1016/j.phytol.2012.04.012.
- [9] K. H. Shaker, N. Morsy, H. Zinecker, J. F. Imhoff, and B. Schneider, "Secondary metabolites from *Calotropis procera* (Aiton)," *Phytochem. Lett.*, vol. 3, no. 4, pp. 212–216, 2010, doi: 10.1016/j.phytol.2010.07.009.

- [10] M. S. A.-S. and S. R. J. S. Mossa, M. Tariq, A. Mohsin, A. M. Ageel, M. A. Al-Yahya, "Pharmacological Studies on Aerial Parts of *Calotropis Procera*," *Am. J. Chin. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 223–231, 1991.
- [11] H. S. Alzahrani, M. Mutwakil, K. S. Saini, and M. R. Rizgallah, "Calotropis Procera: A Phytochemical and Pharmacological Review with Special Focus on Cancer," *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, vol. 7, no. 10, pp. 232–240, 2017.
- [12] V. Hammiche and K. Maiza, "Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 105, no. 3, pp. 358–367, 2006, doi: 10.1016/j.jep.2005.11.028.
- [13] A. Basu and A. K. N. Chaudhuri, "Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 31, no. 3, pp. 319–324, 1991, doi: 10.1016/0378-8741(91)90017-8.
- [14] V. V. G. N. L. Gavade and H. M. S. S. B. Babar, "Green synthesis of ZnO nanoparticles by using *Calotropis procera* leaves for the photodegradation of methyl orange," *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 28, no. 18, pp. 14033–14039, 2017, doi: 10.1007/s10854-017-7254-2.
- [15] M. Hussaan, N. Iqbal, S. Adeel, M. Azeem, M. T. Javed, and A. Raza, "Microwave-assisted enhancement of milkweed (*Calotropis procera* L.) leaves as an eco-friendly source of natural colorants for textile," *Env. Sci Pollut Res*, vol. 24, pp. 5089–5094, 2017, doi: 10.1007/s11356-016-8162-3.
- [16] S. Kumar, A. Gupta, and A. K. Pandey, "Calotropis procera Root Extract Has the Capability to Combat Free Radical Mediated Damage," *ISRN Pharmacol.*, vol. 2013, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1155/2013/691372.
- [17] G. A. Mako, A. H. Memon, U. R. Mughal, A. J. Pirzado, and S. A. Bhatti, "ANTIBACTERIAL EFFECTS OF LEAVES AND ROOT EXTRACT OF CALOTROPIS PROCERA LINN.," *Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci.*, vol. 28, no. 2, 2012.
- [18] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014," *J. Nat. Prod.*, vol. 79, pp. 629–661, 2016, doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- [19] C. D. T. Silva, M.Z.R., Oliveira, J.P.B., Ramos, M.V., Farias, D.F., de Sá, C.A., Ribeiro, J.A.C., Silva, A.F.B., de Sousa, J.S., Zambelli, R.A., da Silva, A.C., Furtado, G.P., Grangeiro, T.B., Vasconcelos, M.S., Silveira, S.R., Freitas, "Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from *Calotropis procera* latex for cheesemaking," *Food Chem.*, vol. 307, p. 125574, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125574.
- [20] M. L. Zhou, X. M. Zhu, J. R. Shao, Y. X. Tang, and Y. M. Wu, "Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 4, pp. 1229–1239, 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3228-0.
- [21] C.-Z. L. Bilal H. Abbasi, Chun-Long Tian, Susan J. Murch, Praveen K. Saxena, "Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*," *Plant Cell Rep*, vol. 26, pp. 1367–1372, 2007, doi: 10.1007/s00299-007-0344-5.
- [22] A. B. Cardillo et al., "Anisodamine Production from Natural Sources: Seedlings and Hairy Root Cultures of Argentinean and Colombian *Brugmansia candida* Plants," *Planta Med*, vol. 76, pp. 402–405, 2010.
- [23] M. A. B. Abdullah Makhzoum, Geneviève Petit-Paly, Benoit St. Pierre, "Functional analysis of the DAT gene promoter using transient *Catharanthus roseus* and stable *Nicotiana tabacum* transformation systems," *Plant Cell Rep*, vol. 30, pp. 1173–1182, 2011, doi: 10.1007/s00299-011-1025-y.
- [24] A. B. Makhzoum, P. Sharma, and M. A. Bernards, *Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Hairy Roots: An Ideal Platform for Transgenic Plant Production and Other Promising Applications*. 2012.
- [25] B. N. Stanišić M, Ćosić T, Savić J, Krstić-Milošević D, Mišić D, Smigočki A, Ninković S, "Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple." Mock H-P, editor. *Tree Physiol.*, pp. 888–905, 2019.
- [26] V. D. and M. L. N. Archana Giri, Sarish T. Ravindra, "Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*," *Curr. Sci.*, vol. 81, no. 4, pp. 378–382, 2001.
- [27] S. A. Khan et al., "Pyrethrin accumulation in elicited hairy root cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*," *Plant Growth Regul.*, vol. 81, no. 3, pp. 365–376, 2017, doi: 10.1007/s10725-016-0213-8.
- [28] A. Makhzoum, A. Bjelica, G. Petit-, and M. A. Bernards, "Novel Plant Regeneration and Transient Gene Expression in *Catharanthus roseus*," *All Res. J. Biol.*, vol. 6, pp. 1–9, 2015.
- [29] I. A. Adam and T. E. Hagr, "GC-MS Analysis of Chemical Constituents from Chloroform Extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br (Asclepiadaceae) Roots Collected in Sudan," *Open Sci. J. Anal. Chem.*, vol. 4, no. 2, pp. 20–24, 2019.
- [30] A. Mittal and M. Ali, "Acyclic diterpenic constituents from the roots of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.," *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 1, pp. 59–63, 2015, doi: 10.1016/j.jscs.2011.12.019.
- [31] P. Chandrawat and R. A. Sharma, "GC-MS Analysis of Fruits of *Calotropis procera*: A Medicinal Shrub," *Res. J. Recent Sci.*, vol. 4, pp. 11–14, 2015.
- [32] E. H. Naser, A. M. Kashmer, and S. A. Abed, "Antibacterial Activity and Phytochemical Investigation of Leaves of *Calotropis Procera* Plant in Iraq By Gc-MS," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 1988–1994, 2019, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1988-94.
- [33] A. R. Hire V. Doshi, Farzin M. Parabia, Falguni K. Sheth, Indravadan L. Kothari, Minoo. Parabia, "Phytochemical Analysis Revealing the Presence of Two New Compounds from the Latex of," *Int. J. Plant Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 28–30, 2012, doi: 10.5923/j.
- [34] P. K. Pattnaik, D. Kar, H. Chhatoi, G. Ghosh, and A. Kuanar, "Chemometric profile & antimicrobial activities of leaf extract of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*," *Nat. Prod. Res.*, vol. 6419, no. July, p. 0, 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1266349.
- [35] N. Waheed, K. Jabeen, S. Iqbal, and A. Javaid, "BIOPESTICIDAL ACTIVITY OF *Calotropis procera* L. AGAINST *Macrophomina phaseolina*," *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, vol. 13, pp. 163–167, 2016.
- [36] L. J. den Hartigh, "Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre-clinical and human trials with current perspectives," *Nutrients*, vol. 11, no. 2, pp. 1–29, 2018, doi: 10.3390/nul11020370.

- [37] B. T. S. Yff, K. L. Lindsey, M. B. Taylor, D. G. Erasmus, and A. K. Ja, "The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid," vol. 79, pp. 101–107, 2002.
- [38] N. Kaur, J. Chaudhary, J. Akash, and L. Kishore, "Stigmasterol: A comprehensive review," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 2, no. 9, pp. 2259–2265, 2011.
- [39] R. Paniagua-Pérez *et al.*, "Cell protection induced by beta-sitosterol: Inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity," *Arch. Toxicol.*, vol. 82, no. 9, pp. 615–622, 2008, doi: 10.1007/s00204-007-0277-3.
- [40] N. H. Choi *et al.*, "Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 141, pp. 103–108, 2017, doi: 10.1016/j.pestbp.2016.12.006.
- [41] H. A. Alhazmi, S. Sultana, A. Khan, and M. Al-bratty, "GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Leaves," *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 45–49, 2018.
- [42] C. B. Fox, "Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery," *Molecules*, vol. 14, no. 9, pp. 3286–3312, 2009, doi: 10.3390/molecules14093286.
- [43] H. Narayan Bhilwade *et al.*, "The Adjuvant Effect of Squalene, an Active Ingredient of Functional Foods, on Doxorubicin-Treated Allograft Mice," *Nutr. Cancer*, vol. 71, no. 7, pp. 1153–1164, 2019, doi: 10.1080/01635581.2019.1597900.
- [44] A. Habtamu and Y. Melaku, "Antibacterial and Antioxidant Compounds from the Flower Extracts of *Vernonia amygdalina*," *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2018, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1155/2018/4083736.
- [45] A. Berger, P. J. H. Jones, and S. S. Abumweis, "Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients," *Lipids Health Dis.*, vol. 3, pp. 1–19, 2004, doi: 10.1186/1476-511X-3-5.
- [46] A. B. Awad, H. Williams, and C. S. Fink, "Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 14, no. 2, pp. 111–119, 2003, doi: 10.1016/S0955-2863(02)00274-7.

## Résumé

*Calotropis procera* (Apocynaceae) est une plante médicinale riche en molécules bioactives ayant une importance économique de par leur utilisation en pharmacologie qu'en agriculture. De par leur intérêt, la production par voie biotechnologique (via les chevelus racinaires (CRs)) de ces métabolites constitue une voie prometteuse.

La première partie de la thèse consiste à développer un protocole d'induction de CRs efficace pour *C. procera*. La deuxième partie aborde l'analyse de la composition phytochimique des CRs de *C. procera* par GC-MS et UHPLC-QTOF/MS. Dans la perspective de valorisation dans la protection des cultures, l'évaluation du potentiel nématocide des extraits de CRs de *C. procera* a été réalisée.

Concernant l'induction des CRs, nos résultats montrent que la souche bactérienne, le type et l'âge des explants ainsi que le milieu de co-culture utilisé jouent un rôle prépondérant. Ainsi, la fréquence de transformation optimale (95%) est obtenue avec des feuilles âgées de 30 jours et inoculées par la souche A4 sur le milieu ½ B5. La nature transgénique de nos CRs a été confirmée par amplification PCR du gène *rol B*. Les différences du taux de croissance et de teneurs en phytostérols (campesterol, en stigmastérol et en  $\beta$ -sitostérol) entre les sept lignées racinaires sélectionnées est extrêmement significatives. La lignée HR4 a donné le rendement le plus élevé, atteignant 345,8  $\mu\text{g}$  de campesterol/g M.S., 411,8  $\mu\text{g}$  de stigmastérol/g M.S. et 438,3  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -sitostérol par g de M.S.

Par ailleurs, l'analyse des extraits des CRs par GC-MS a permis de mettre en évidence trente-six composés bioactifs de différentes classes métaboliques dont les plus importants sont les stérols. En outre, la caractérisation des glycosides cardiaques de l'extrait éthanolique des CRs de *C. procera* par UHPLC-QTOF/MS met en évidence la présence de dix molécules bioactives.

Enfin, l'évaluation de la toxicité de l'extrait aqueux des CRs de *C. procera* sur les nématodes (*Meloigogyne* spp.) montre une mortalité totale (100 %), et ce, pour les extraits des sept lignées racinaires.

**Mots clés :** Activité nématocide, *Agrobacterium rhizogenes*, *Calotropis procera*, Chevelus racinaires, GC-MS, Glycosides cardiaques, Métabolites secondaires, PCR, Phytostérols, UHPLC/QTOF-MS.

## Summary

*Calotropis procera* (Apocynaceae) is a medicinal plant rich in bioactive molecules having an economic importance due to their use in pharmacology and in agriculture. Because of their interest, the biotechnological production (via hairy root) of these metabolites constitutes a promising way.

The first part of the thesis consists in developing an efficient hairy root induction protocol for *C. procera*. The second part deals with the analysis of the phytochemical composition of *C. procera* hairy root by GC-MS and UHPLC-QTOF/MS. In, the perspective of valorization in crop protection, the evaluation of the nematocidal potential of extracts of *C. procera* hairy root was carried out.

Regarding the induction of hairy root, our results show that the bacterial strain, the type and age of the explants as well as the co-culture medium used play a major role. Thus, the optimum transformation frequency (95%) is obtained with 30-day-old leaves inoculated with the A4 strain on the ½ B5 medium. The transgenic nature of our hairy root was confirmed by PCR amplification of the *rol B* gene. The differences in growth rate and phytosterol content (campesterol, stigmasterol and β-sitosterol) between the seven selected root lines is extremely significant. The HR4 line gave the highest yield, reaching 345.8 μg campesterol/g DM, 411.8 μg stigmasterol/g DM and 438.3 μg β-sitosterol per g DM.

In addition, the analysis of the extracts of hairy root by GC-MS made it possible to highlight thirty-six bioactive compounds of different metabolic classes, the most important of which are sterols. In addition, the characterization of cardiac glycosides of the ethanolic extract of *C. procera* hairy root by UHPLC-QTOF/MS highlights the presence of ten bioactive molecules.

Finally, the evaluation of the toxicity of the aqueous extract of *C. procera* hairy root on nematodes (*Meloigogyne* spp.) shows a total mortality (100%), and this, for the extracts of the seven root lines.

**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, *Calotropis procera*, Cardiac glycosides, Hairy root, GC-MS, Nematicidal activity, PCR, Phytosterols, Secondary metabolites, UHPLC/QTOF-MS.

## ملخص

نبتة العشار (*Calotropis procera*, Apocynaceae) هي نبتة طبية غنية بالجزينات النشطة بيولوجيًا التي لها أهمية اقتصادية نظرا لاستخدامها في علم الأدوية والزراعة. من جهة أخرى فإن هذه الجزينات تتطلب إنتاجها مخبريا عن طريق الجذور الشعرية المحورة وراثيا وهو ما يشكل طريقًا واعدًا.

يتمثل الجزء الأول من الأطروحة في تطوير بروتوكول فعال لإنتاج الجذور الشعرية لـ *C. procera*. أما الجزء الثاني فيتناول تحليل التركيب الكيميائي النباتي للجذور الشعرية لـ *C. procera* بواسطة GC-MS و UHPLC-QTOF / MS. أما فيما يخص التثمين في حماية المحاصيل ، تم إجراء تقييم مستخلصات الجذور الشعرية لـ *C. procera* في مكافحة آفة النيماتودا.

فيما يتعلق بإنشاء الجذور الشعرية، تظهر نتائجنا أن السلالة البكتيرية ونوع وعمر الجزء النباتي المستخدم بالإضافة إلى وسط الزراعة المشتركة تلعب دورًا رئيسيًا.

وبالتالي، يتم الحصول على نسبة انشاء جذور شعرية مثلى (95%) بأوراق عمرها 30 يومًا محورة بسلالة A4 على وسط زراعة ½ B5. تم تأكيد الطبيعة المعدلة وراثيًا للجذور الشعرية من خلال تضخيم PCR لجين B *rol*. الاختلافات في معدل النمو ومحتوى فيتوستيرول بين سلالات الجذور الشعرية السبعة المختارة متباينة للغاية. أعطت سلالة HR4 أعلى إنتاجية حيث وصل إلى 345.8 ميكروجرام كامبستيرول / جرام مادة جافة و411.8 ميكروجرام ستيجماسستيرول / جرام مادة جافة و438.3 ميكروجرام بيتا سيتوستيرول لكل جرام مادة جافة.

بالإضافة إلى ذلك، أتاحت تحليل مستخلصات الجذور الشعرية بواسطة GC-MS الكشف عن وجود ستة وثلاثين مركبًا حيويًا من فئات المستقلبات المختلفة، وأهمها الستيرويدات. بالإضافة إلى ذلك، فإن توصيف جليكوسيدات القلب للمستخلص الإيثانولي من الجذور الشعرية لـ *C. procera* بواسطة UHPLC-QTOF / MS يبين وجود عشرة جزينات نشطة بيولوجيًا.

أخيرًا، يُظهر تقييمسمية المستخلص المائي للجذور الشعرية لـ *C. procera* على الديدان الخيطية (*Meloigogyne* spp.) معدل وفيات إجمالي (100%)، وهذا بالنسبة لمستخلصات سلالات الجذور السبعة.

**الكلمات الرئيسية:** نشاط ضد نيماتودي، *Agrobacterium rhizogenes*، *Calotropis procera*، الجذور الشعرية، GC-MS، جليكوسيدات القلب، المستقلبات الثانوية، PCR، فيتوستيرول، UHPLC / QTOF-MS.