

École National Supérieur Agronomique El Harrach – Alger
Ecole Doctorale de Biotechnologies Végétales
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies Végétales
Option: Biotechnologies Végétales

***Etude de l'effet de la polyploïdisation sur
la teneur en hyoscyamine des chevelus
racinaires de *Datura stramonium* L.***

Par:
Mlle BELABBASSI Ouarda
Directeur de thèse Mr. Khelifi L. Pr. ENSA
ENSA, le: 29 / 01 / 2012

Soutenu devant le jury composé de : Président Mme. Khelifi M. Pr. ENSA Examineurs Mme.
Mekliche L. Pr. ENSA Mr. Amdoun R. M.C.A. INRF

Table des matières

Remerciements . .	5
Dédicace . .	6
Liste des abréviations . .	7
Résumé . .	8
Abstract . .	9
صغلم . .	10
Introduction . .	11
Synthèse bibliographique . .	13
I Données générales sur <i>Datura stramonium</i> . .	13
1. Taxonomie et étymologie . .	13
2. Description botanique . .	13
3. Origine et aire de répartition . .	14
4. Intérêts de <i>Datura stramonium</i> L. . .	15
5. Caractéristiques cytogénétiques de <i>D. stramonium</i> L. . .	16
II Polyploïdie et teneur en alcaloïdes . .	17
1. Les alcaloïdes . .	18
2. Polyploïdie . .	22
3. Polyploïdie et les changements chimiques : production de métabolites secondaires . .	25
III Chevelus racinaires : une alternative pour la production d'alcaloïdes chez <i>Datura</i> sp . .	26
1. Induction du <i>Hairy Root</i> . .	26
2. Intérêt des chevelus racinaires . .	33
3. Stratégies d'amélioration de la production de métabolites secondaires dans les chevelus racinaires . .	34
Matériels et méthodes . .	37
1. Induction de la polyploïdie par traitement des chevelus racinaires à la colchicine . .	37
1.1. Matériel végétal . .	37
1.2. Induction de la polyploidie dans les Hairy roots de <i>Datura stramonium</i> . .	37
1.3. Taux de survis . .	38
2. Détermination du niveau de ploïdie . .	38
2.1. Prétraitement . .	39
2.2. Fixation . .	39
2.3. Conservation . .	39
2.4. Hydrolyse . .	39
2.5. Coloration . .	39
2.6. Observation . .	40
3. Sélection des lignées racinaires polyploïdes . .	40
4. Confirmation du niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN . .	40
4.1. Extraction de l'ADN . .	40
4.2. Quantification de l'ADN . .	41

5. Effet de l'élicitation sur la biomasse et le contenu en hyoscyamine des HRs polyploïdes . .	42
6. Extraction et dosage des alcaloïdes . .	42
6.1. Extraction des alcaloïdes . .	42
6.2. Dosage de l'hyoscyamine . .	42
7. Analyse statistique . .	43
Résultats et interprétation . .	44
1. Effets du traitement à la colchicine des chevelus racinaires . .	44
1.1. Survie et croissance des chevelus racinaires traités par la colchicine . .	44
2. Détermination du niveau de ploïdie par le comptage du nombre de chromosomes . .	45
3. Sélection des lignées racinaires performantes . .	47
4. Confirmation du niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN . .	48
5. Effet de la polyploïdisation sur la biomasse (poids sec) et la teneur en hyoscyamine . .	49
6. Effet des éliciteurs sur de la biomasse et sur la teneur en hyoscyamine des HRs . .	50
6.1. Effet de l'élicitation sur la biomasse . .	51
6.2. Effet de l'élicitation sur la teneur en hyoscyamine . .	52
6.3. Taux d'amélioration de la teneur en hyoscyamine . .	52
Discussion . .	55
Conclusion . .	62
Références bibliographiques . .	64
Annexes . .	86
Annexe 1 Composition chimique du milieu de culture Murashige et Skoog (1962). . .	86
Annexe 2 Composition chimique du milieu B5 (Gamborg et <i>al.</i> , 1968) . .	86
Annexe 3 . .	87
Annexe 4 Effets de l'induction de la polyploïdie Sur le taux de survie . .	88
Annexe 5 Effet de la polyploïdisation sur la biomasse (poids sec) . .	89
Annexe 6 Effet de l'élicitation sur la biomasse (poids sec) . .	90

Remerciements

Je remercie avant tout, Allah (# #####) qui m'a aidé et m'a donné la volonté, le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

J'exprime mes sincères remerciements en premier à Mr. KHELIFI L. Pr. ENSA, mon directeur de thèse, qui a cru en moi et qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour ses précieux conseils, ses orientations, ses encouragements, ses suggestions, son aide précieuse, le temps qu'il a consacré à la correction de ce manuscrit, sa disponibilité et son énorme soutien.

Je remercie vivement Mme. KHELIFI-SLAOUI M. Pr. ENSA, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Mme. MEKLIICHE L. Pr. ENSA, qu'il m'est aussi agréable de lui témoigner ma grande gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr AMDOUN R. M.C.A université de Blida, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse malgré ses nombreuses occupations.

Un remerciement sans_cesse à Mme Khalfallah N. Professeur à l'université Mentouri Constantine, pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour avoir bien voulu y consacrer son temps, ses conseils et sa précieuse aide tout au long de ma présence.

Je remercie également, Mme TOURKI M., Mr BELBEKRI N., Mlle Djeghar R. et Rima, ingénieurs de laboratoire à Constantine pour leur aide et tous les moyens qu'ils ont mis à ma disposition pour mener à bien mes préparations des lames et ma présence chez eux.

Il me faut aussi remercier ceux et celles qui, de près ou de loin, par des manips ou à l'occasion de discussions scientifiques ou amicales, m'ont enrichi et ont contribué à l'avancement de mon travail. Merci à tous les membres de l'équipe LRGB pour sa cohésion, son dynamisme et son esprit de famille en particulier à Mme Zaoui Djamilia ingénieur du labo.

Un grand merci à Kati et Kami pour avoir été l'amie et la confidente de tous les jours aussi bien dans les bons que dans les mauvais moments. Merci pour ces milliers d'éclats de rire et moments de délire mais aussi pour votre présence les jours où le moral ne suivait pas.

Merci aux enseignants avec qui j'ai travaillé et qui m'ont transmis leurs savoirs en particulier à Mr. Mekliche A., Mr. Ounane et Mr. Morsli pour tous leurs aides.

Je sais que j'oublie des gens. Mais un fait est certain. Merci à toutes et à tous qui, de loin ou de près, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail et qui m'ont épaulé, je leur laisse ici l'expression de toute ma gratitude et de ma sympathie.

Dédicace

J e dédie ce travail à : -Mes parents qui malgré la distance, m'ont toujours soutenue et ont toujours cru en moi et en mes choix. Je voudrais leur dire que c'est leur amour, leur confiance et leur soutien qui m'a permis d'arriver jusqu'ici. Merci infiniment, je vous aime très fort. -Mes sœurs, mes frères et mon neveu pour leur participation précieuse à mon équilibre par leur présence, leur confiance et leur soutien, depuis déjà bien avant ma thèse. Malgré les joies, les tristesses et toutes les difficultés de la vie quotidienne, la famille reste le sanctuaire où l'on peut se ressourcer.... Merci d'être toujours présents. -Ma grande famille (mon grand père et mes grandes mères, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.....) pour leur amour, leurs encouragements et leur soutien moral, ce en quoi, rien de tout cela n'aurait été possible. -A mes ami(e)s de l'ENSA et d'EL ALIA, particulièrement Khadidja, Dalel, Asma, Farida et Mimi. -A mes amis de la promotion 2009 de Biotechnologies végétales particulièrement à notre groupe des folles (Katty, Miya, Mina, Lamia, Giga, Wawel et Sisi) pour tous les moments de rire, du sérieux et les déjeunés ensemble.

Ouarda (*With all my love, I wish to you all the best*)

Liste des abréviations

- **AAS** : Acide acétylsalicylique ;
- **ANOVA1** : Analyse de la variance à un facteur ;
- **ANOVA2** : Analyse de la variance à deux facteurs ;
- **AS** : Acide salicylique ;
- **B5** : Milieu de culture de **Gamborg et al . (1968)** ;
- **ddl** : Degré de liberté ;
- **DO** : densité optique
- **h**: heures
- **kb** : Kilo base
- **LDS**: Lignée de *D. stramonium*
- **LDSA**: Lignée *D. stramonium* A
- **LDSB** : Lignée de *D. stramonium* B
- **LDSC** : Lignée de *D. stramonium* C
- **M**: mole
- **M.F.**: matière fraîche
- **mg**: milligramme
- **MJ**: methyl jasmonate
- **mM**: millimole
- **M.S.**: matière sèche
- **MS** : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962) ;
- **pb**: paires de bases
- **rpm** : Round peer minute (rotation par minute) ;
- **µg**: microgramme
- **µl**: microlitre
- **µM**: micromole

Résumé

Les alcaloïdes tropaniques, principalement l'hyoscyamine et la scopolamine, sont largement utilisés en médecine. Différents systèmes ont été établis pour la production par voie biotechnologique de ces composés. Contrairement aux cultures de cellules non différenciées qui tendent à être génétiquement instables, les cultures de chevelus racinaires obtenus chez *D. stramonium* L. par *Agrobacterium rhizogenes* constituent un bon système. L'objectif de ce travail est de tester l'effet de la polyploïdisation combinée ou non à une élicitation sur la biomasse et la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires obtenus.

Les résultats obtenus montrent que l'analyse cytogénétique de la lignée utilisée (LDS) confirme son niveau diploïde ($2n=2x=24$). Par ailleurs, le taux de survie des chevelus racinaires traités dépend de la concentration de la colchicine utilisée et de la durée d'exposition.

Sur l'ensemble des lignées racinaires sélectionnées après traitement, seules deux lignées sont avérées tétraploïdes (LDSA et LDSC) et la quantification de l'ADN de ces 2 lignées confirme aussi ce résultat. En outre, La polyploïdisation a engendrée une augmentation de la biomasse et de la teneur en hyoscyamine chez les lignées tétraploïdes. De même, l'essai de l'élicitation montre que la concentration de 10^{-4} M engendre une légère diminution du poids sec par l'acide acétylsalicylique (AAS) et une augmentation par l'acide salicylique (AS) alors que cette concentration engendre une augmentation de la teneur en hyoscyamine de ces lignées pour les deux éliciteurs (AS et AAS).

Mots clés : Alcaloïdes Tropaniques ; Chevelus Racinaires ; Colchicine ; *Datura Stramonium* L., Elicitation ; Polyploïdisation,

Abstract

Tropane alkaloids, mainly hyoscyamine and scopolamine, are widely used in medicine. Various systems have been established for the biotechnological production of these compounds. In contrast to undifferentiated cells cultures which tend to be unstable genetically, hairy root cultures obtained at *D. stramonium* L. by *Agrobacterium rhizogenes* constitute a good system. The objective of this work is to test the effect of the polyploidisation combined or not to an elicitation on the biomass and the hyoscyamine content of the obtained hairy roots.

The obtained results show that the cytogenetic analysis of the used line (L_{DS}) confirms its diploid level ($2n=2x=24$). In addition, the survival rate of the treated hairy roots depends on the concentration of the colchicine used and the exposure time.

On the whole of the hairy root lines selected after treatment, only two lines are proven tetraploids (L_{DSA} and L_{DSC}) and the quantification of the DNA of these two lines confirms also this result. Moreover, the polyploidisation has generated an increase in the biomass and the hyoscyamine content in the tetraploid lines. In the same way, the essay of the elicitation shows that the concentration of 10^{-4} M generates a light reduction in the dry weight by the acetylsalicylic acid (ASA) and an increase by the salicylic acid (SA) whereas this concentration generates an increase in the hyoscyamine content of these lines for the two elicitors (SA and ASA).

Keywords: Tropane Alkaloids ; Hairy Roots ; Colchicine ; *Datura Stramonium* l. ; Elicitation ; Polyploidization.

ص خ لم

الفلويدات التروبانية , خاصة الهوسيامين و الاسكوبولامين , تستخدم بكثرة في الطب. عدة انظمة أنشأت من اجل الإنتاج البيوتكنولوجي لهذه المركبات. على عكس زراعة الخلايا النخري متغايرة و التي هي جينا غير مستقره, زراعة الجذور المشجرة المحصل عليها عد *D. stramonium* L. ب *Agrobacterium rhizogenes* تشكل أحسن نظام. الهدف من هذا العمل هو تجريد أثر تعدد الأوية مركب أو لا مع التحفيز على الشادة الحية والمحتوى من الهوسيامين للجذور المشجرة المحصل عليها.

النتائج المحصل عليها تبين أن تحليل الخلايا و الصبغيات للسلاطة المستخدمة (L_{DS}) يؤكد مستواها أنها ثنائية النواة ($2n=2x=24$). عن ناحية أخرى نسبة حياة الجذور المشجرة المعالجة تعتمد على تركيز الـ colchicine المستخدم و مدة المرض .

من ضمن سلالات الجذور المختارة بعد المعالجة, فقط سلالتان ثبتت أنهما رباعيات النواة (L_{DSA} , L_{DSC}) و استخراج الحمض النووي لهذه السلالتان يؤكد أيضا هذه النتيجة . علاوة على ذلك تعدد النواة هذا أدى إلى ارتفاع الكتلة الحيوية و المحتوى من الهوسيامين عند السلالات رباعية النواة . أيضا محاولة التحفيز تبين أن التركيز 10^{-4} M للحمض اسيتيل ساليسيليك أدى إلى انخفاض خفيف لا وزن الجاف و ارتفاعه بواسطة الحمض ساليسيليك بنفس التركيز في حين أن هذا التركيز يؤدي إلى ارتفاع في المحتوى من الهوسيامين لهذه السلالات من اجل المدفزان (AS, AAS).

الكلمات المفتاح : الفلويدات التروبانية , الجذور المشجرة, colchicine, *Datura stramonium* L., التحفيز , تعدد النواة .

Introduction

La vie humaine dépend des plantes du fait que ces dernières ont été et continuent à être l'une des sources les plus importantes de la médecine pour le traitement de différentes maladies (Cole et *al.*, 2007). En plus des aliments de base telle que les protéines, les corps gras ou les hydrates de carbone, les plantes constituent aussi une source inépuisables de produits pharmaceutiques, cosmétiques, d'insecticides, de colorants etc... (Dechaux et Boitel-Conti, 2005 ; Vasconsuelo et Boland, 2007). Ces composés qui ne sont pas essentiels pour la survie mais confèrent quelques avantages aux cellules des plantes s'appellent les métabolites secondaires (Kim et *al.*, 2002). Ces métabolites jouent différents rôles dont celui de moyen de défense contre les agressions externes (Hartmann, 2007 ; Yendo et *al.*, 2010).

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité (moins de 1% du poids sec) et dépendent considérablement de l'état physiologique et l'ontogenèse de la plante (Dixon, 2001 ; Oksman-Caldentey et Inze, 2004; Wu et *al.*, 2005). En outre, ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre (Gosmann et *al.*, 2010). Les alcaloïdes tropaniques, tels que l'hyoscyamine et la scopolamine (hyoscine), sont produits surtout par les *Solanacées* telles que *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* et *Scopolia* (Hashimoto et Yamada 1987 ; Yamada et Tabata, 1997 ; Li et *al.*, 2008 ; Gryniewicz et Gadzikowska 2008) et possèdent des propriétés thérapeutiques employées pour différentes applications médicinales (Pitta-Alvarez et *al.*, 2000; Waller et Nowacki, 1978 ; Abdel Rahman et *al.*, 2009).

Bien que ces alcaloïdes puissent être synthétisés par la voie chimique, actuellement ce processus de synthèse est long, complexe, cher, et relativement de bas rendement et donc il n'est pas économiquement rentable (Verpoorte et Memelink, 2002 ; Vasconsuelo et Boland, 2007). Par conséquent, beaucoup de stratégies biotechnologiques et cibles moléculaires ont été développées afin d'augmenter ces composés d'intérêts (Dornenburg et Knorr, 1995; Rao et Ravishankar, 2002 ; Yendo et *al.*, 2010).

Du fait que l'hyoscyamine est synthétisée dans les racines, les cultures de chevelues racinaires (*HRs*) *in vitro* sont considérées donc comme une alternative attractive pour sa production par voie biotechnologique (Pitta-Alvarez et *al.*, 2000 ; Spollansky et *al.*, 2000). Ces cultures ont plusieurs avantages, tels que la croissance rapide, la stabilité génétique et présentent un modèle de production quasi semblable aux plantes entières (Flores et *al.*, 1999). L'une des méthodes utilisées pour augmenter la production de ces métabolites est l'utilisation d'éliciteurs (Benhamou, 1996 ; Pitta-Alvarez et Giulietti 1998; Zabetakis et *al.*, 1999 ; Namdeo, 2007).

Chez de nombreuses espèces végétales, le dédoublement chromosomique est souvent accompagné par des changements remarquables aussi bien au niveau du métabolisme secondaire que du métabolisme primaire (Levin, 1983 ; Lavania 2005). De ce fait, l'induction d'une polyploïdie artificielle peut s'avérer utile pour l'amélioration de la production des métabolites secondaires (principes actifs médicinaux) (Dhawan et Lavania, 1996). Mais il convient de noter qu'il n'existe que très peu de travaux en rapport avec l'exploitation des cultures de chevelus racinaires polyploïdisées pour la production de ces métabolites secondaires : par exemple l'obtention de lignées autotétraploïdes de chevelues racinaires

d'*Artemisia annua* L obtenues par polyploïdisation artificiel avec traitement à la colchicine des HRs diploïdes (De Jesus-Gonzalez et Weathers, 2003) et des HRs autotétraploïdes de *D. stramonium* L. par transformation directe des plantes autotétraploïdes (Pavlov et *al.*, 2009).

L'objectif de la présente étude est d'induire une polyploïdisation sur les chevelus racinaires de *Datura stramonium* L. dans le but d'augmenter le rendement en hyoscyamine. A cet effet, nous nous sommes intéressés à :

- Evaluer la concentration de colchicine et le temps d'exposition adéquats pour l'induction d'une polyploïdisation sur nos chevelus racinaires de *D. stramonium* L.
- Sélectionner des lignées racinaires tétraploïdes;
- Vérifier le niveau de ploidie obtenu après traitement des HRs à la colchicine par le comptage du nombre de chromosomes et par le dosage de la quantité de l'ADN des HRs traités à la colchicine;
- Evaluer l'effet de la polyploïdisation sur la biomasse et le contenu alcaloïdique (hyoscyamine);
- Evaluer l'effet de l'élicitation sur la production de biomasse et d'hyoscyamine des lignées tétraploïdes sélectionnées.
- L'élicitation des lignées polyploïdes a également été étudiée en vue de voir l'effet combiné de la polyploïdie et de l'élicitation sur les niveaux de rendement en hyoscyamine.

Synthèse bibliographique

I Données générales sur *Datura stramonium*

1. Taxonomie et étymologie

Le *D. stramonium* L. a été décrit pour la première fois en 1753 par Linné (Benhizia, 1989). Il appartient à l'embranchement des Spermaphytes et au sous-embranchement des Angiospermes, il fait partie de la classe des Dicotylédones et de la famille des Solanacées (Houde, 1985). Deux variétés de *Datura stramonium* L. existent dont deux sont signalées en Algérie : *Datura stramonium* var. *eu-stramonium* avec des fleurs blanches et *Datura stramonium* var. *tatula* avec des fleurs violettes (Amdoun et al., 2005).

Selon Gros-Lebon (1971), le terme *Datura* viendrait de "*Dhatura*" qui est le nom indien de la plante et qui signifie "pomme épineuse" ou "pomme de la mort". Alors que pour Bianchini et Pantano (1986), ce terme viendrait du nom arabe "*Tatourah*" dont la racine "*Tat*" signifie piquer.

Munro (1996), pense que le mot stramonium dérive du grec strychnos=la morelle noire et manikos=furieux, qui veut dire "poison puissant".

Cette plante possède plusieurs noms communs : stramoine, pomme épineuse, chasse taupe, herbe du diable, endormeuse, trompette des anges (Cecchini, 1976). En arabe, elle est connue sous les noms : chidjeret el djinna, djahanama, messakra, tatoura et datoura (Trabut, 1935).

2. Description botanique

La stramoine ou *D. stramonium* (Figure 1) est une plante herbacée annuelle très vigoureuse à port puissant allant de 20 à 100 cm de hauteur (Volak et Jiri, 1983). Elle a des tiges rondes, glabres, rigides et ramifiées en tous sens (divisions dichotomiques jusqu'au sommet de la plante). Elle porte de grandes feuilles, faiblement pétiolées (2- 6 cm), de contour triangulaire, alternes, ovales, sinuées-dentées, de couleur vert-foncée brillante sur la face supérieure, profondément découpées en 5 lobes inégaux pointus (6-8cm) et malodorantes (Fluck, 1977 ; Volak et Jiri, 1983 ; Bruneton, 1999 ; Amdoun et al., 2005). A la bifurcation des branches, s'élèvent solitairement des fleurs tubuleuses, blanches en forme de trompette, larges de 6 à 10 cm (Cecchini, 1976), à lobes très courts terminés par une pointe aiguë (Couplan et Styner, 1994). Le fruit est une capsule dressée de la taille d'une noix ovale couverte d'épines robustes, s'ouvrant en 4 valves par formation tardive d'une fausse cloison, de couleur verte et contenant de nombreuses graines noires, réniformes et aplaties de 2 à 3 mm de longueur (Couplan et Styner, 1994 ; David et al., 2009 ; Taleb, 1995 *In* El Bazaoui et al., 2009). La racine est fusiforme et ramifiée (Thurzova, 1981 ; Pelikan, 1986).



Figure 1: Morphologie de quelques organes de *Datura stramonium* (www.flickr.com).

3. Origine et aire de répartition

Les botanistes ne s'accordent pas tous quant à l'origine de *Datura stramonium* L. (Gay et al., 1986). Selon Curtain (1947) In Harbouche (2005) et Gay et al. (1986), l'origine de *Datura stramonium* L. est discutée entre la région de l'Amérique du nord et la région de la mer caspienne et de la mer noire. Par contre selon Delaveau (1982), Valnet (1983), Avery et al. (1959) cités par Houmani et al. (1999) et Bruneton (2005), c'est au Mexique et au Sud-Ouest des USA où se trouve le berceau de nombreuses espèces de *Datura*. Cette espèce serait donc originaire des Amériques du Sud et du Nord (Volak et Jiri, 1983 ; Bruneton, 1987 et Kothe, 2007) et centrale (Hensel, 2008).

Ce n'est qu'au début du XV^{ème} siècle que les portes de l'Europe occidentale s'ouvrirent au *Datura* à travers l'Espagne (Schaumberg et Paris, 1977 ; Huxley et al., 1992). Puis elle s'est propagée en Afrique du Nord et s'est fixée tout autour de la méditerranée (Huxley et al., 1992). En Algérie, on trouve le *Datura stramonium* L. du littoral jusqu'au Sahara central (Quezel et Santa, 1962 ; Baba Aïssa, 1991).

Datura stramonium L. est classé parmi les plantes plurirégionales, dont l'aire géographique embrasse plusieurs régions, soit à l'état spontané ou introduite (Nahal, 1976).

Cette plante spontanée abonde les champs, les décombres, les terrains vagues, les endroits incultes, les bords des chemins (Poltti, 1987 ; Schauer et Caspari, 2007), aux alentours des habitations et des dépôts d'ordures (Poltti, 1988) mais elle préfère les terrains vagues aux sols riches et humides (Bruneton, 1993).

Elle pousse dans les cultures de Solanacées et de Cucurbitacées (Benhizia, 1989 ; Houmani et al., 1994). Elle est souvent considérée comme une adventice des cultures maraîchères et céréalières (Bruneton, 2005).

4. Intérêts de *Datura stramonium* L.

La stramoine a des propriétés médicinales avérées depuis fort longtemps (Iserin, 2001), ceci est dû à la présence de nombreux alcaloïdes dont l'ensemble s'appelle daturine (Bianchini et Corbitta, 1975). Ces substances sont spasmolytiques (calment les crampes), abaissent les sécrétions glandulaires et dilatent les bronches. On les emploie dans le traitement de l'asthme (cigarettes et comprimés) et des catarrhes violents des bronches (Volak et Jiri, 1983; El Bazaoui et al., 2009). On les utilise aussi comme sédatif du système nerveux contre les névralgies, les coliques intestinales, la coqueluche, les spasmes utérins, les convulsions, l'épilepsie, les tremblements séniles, les douleurs rhumatismales, contre la transpiration excessive et la maladie de Parkinson du fait de leur action sur les muscles des membres inférieurs via le système nerveux central (Poletti, 1987 ; Poletti, 1988 ; Boullard, 2001). Ces substances décontractent aussi les muscles du tube digestif, ceux de la vessie et régulent les sécrétions digestives (Iserin, 2001). En usage externe, les feuilles sont appliquées en cataplasmes analgésiques (Bezanger et al. 1980 ; Couplan et Styner, 1994).

Selon Hensel (2008), l'homéopathie administre les préparations de plantes fraîches pour les inflammations avec fortes fièvres, les catarrhes des yeux et les maladies psychiques.

Les graines sont souvent utilisées comme aphrodisiaques et sont également indiquées comme sédatives dans les maux de tête et comme narcotiques dans l'insomnie. De façon générale, toutes les parties de la plante sont consommées, afin de provoquer une sédation, faire disparaître la fatigue ou plus simplement dans un but de « défence » ; état où prédomine un délire hallucinatoire. Les fleurs sont utilisées en décoction ou fumées en association avec le cannabis (El Bazaoui et al., 2009).

Le *Datura stramonium* L. est très utilisé en pharmacologie humaine et vétérinaire (Weaver et Warwick, 1984) et même dans la protection des végétaux (Felidj, 2005) où il fait partie des séries d'espèces végétales qui réagissent par des symptômes caractéristiques aux différents virus comme ceux causant la mosaïque (Clement, 1981 ; Marchoux et al., 2009).

Le *Datura* trouve donc plusieurs autres applications dans de multiples domaines tels que la lutte biologique, l'agriculture biologique, l'écologie et l'ornementation. En effet, la stramoine figure parmi les plantes qui peuvent diminuer les populations de nématodes à galles de la tomate par son utilisation comme culture intercalaire ou comme engrais vert (Duval, 1991), et même pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre (Adabio, 2004). Par ailleurs, dans l'agriculture biologique, l'allélopathie des *Daturas* pourrait être utilisée pour le désherbage. Ainsi les travaux de Levitt et al. (1984) cités par Amdoun (2003)

montrent que les alcaloïdes de *Datura stramonium* L. inhibent le métabolisme de l'hydrolyse de l'amidon des graines de *Helianthus annuus* lors de la germination.

D'après Rolard (2002), le *Datura stramonium* L. peut être utilisé aussi dans le domaine de l'écologie pour désinfecter les eaux et les sols pollués par les métaux lourds qui seront concentrés sur les parois cellulaires de la plante.

La stramoine est aussi une très belle plante qui présente un grand intérêt ornemental (Adabio, 2004 ; Bruneton, 2005 ; Hensel, 2008).

5. Caractéristiques cytogénétiques de *D. stramonium* L.

Le *Datura stramonium* L. a été utilisé par Blakeslee et ses collaborateurs pour comprendre les principes fondamentaux de la cytogénétique. Le nombre diploïde de l'espèce est de $2n=2x=24$ (Blakeslee et Belling, 1924).

5.1. Aneuploïdie chez *D. stramonium* L.

On parle d'aneuploïdie chaque fois qu'il existe un ou plusieurs chromosomes en plus ou en moins du complément diploïde, ce qui donne une représentation inégale des différents constituants du génome, et le nombre de chromosome par cellule n'est plus un multiple de n (Schultze et Hoffman, 1990). Cette aneuploïdie peut apparaître par addition ou délétion d'un chromosome entier. La délétion d'un chromosome est généralement létale, sauf chez une plante auto- ou allopolyploïde. En revanche, l'addition mène à une forme trisomique, pas toujours viable, mais présentant des problèmes de stérilité. Ces mutants apparaissent occasionnellement dans les descendance des plantes diploïdes. L'exemple le plus connu de ce type de mutation concerne les douze mutants trisomiques de *Datura stramonium* L. (Blakeslee et Avery, 1919 ; Klug et al., 2006). Ces aneuploïdes (trisomies) ont été signalés pour la première fois en 1924 par Belling et Blakeslee où ils prouvaient que l'existence d'un chromosome supplémentaire chez les trisomiques primaires intervient directement dans la réalisation du phénotype du fruit.

Ces 12 cas de trisomie, désignés par mutants primaires, diffèrent non seulement du type standard mais aussi entre eux par les caractères suivants : la taille et la forme de la capsule (Figure 2), la longueur des épines, la taille globale de la plante, des feuilles, des fleurs et des stigmates (Blakeslee et al., 1922 ; Belling et Blakeslee, 1922 ; Blakeslee, 1934). Ainsi le mutant « Rolled » avec ses feuilles étroites et enroulées, ses capsules plus petites et ses épines courtes, résulte d'une trisomie affectant le chromosome n°1 (Blakeslee et Belling, 1924).

Notons enfin l'existence de trisomie secondaire qui apparaît aussi spontanément et occasionnellement dans une descendance diploïde. Chez *Datura stramonium* L., c'est le cas du mutant nain et chétif « Polycarpique », aux feuilles étroites, lancéolées et donnant des capsules encore plus petites que chez le « Rolled ». Dans ce cas, le chromosome additionnel porte deux fois le même bras du chromosome n°1 (Lecolier, 2007).

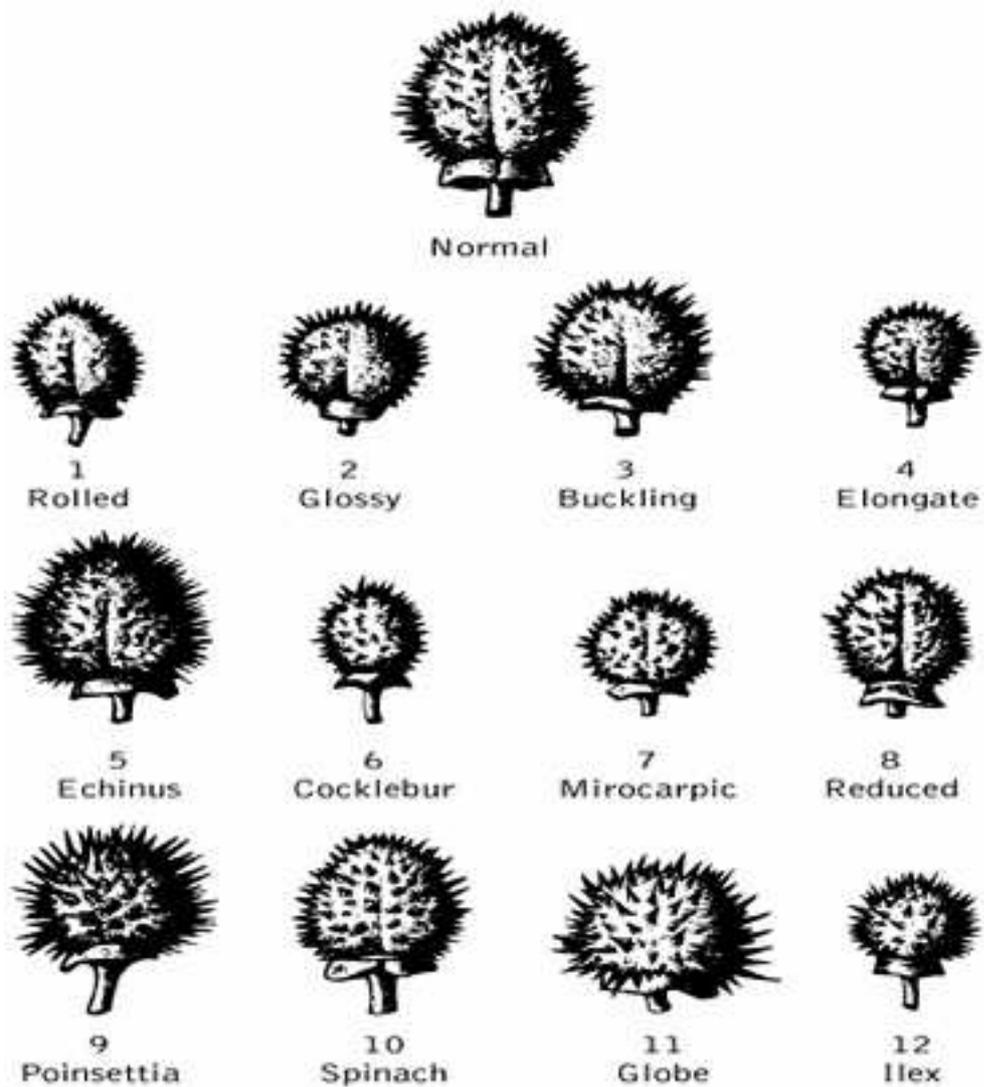


Figure 2: Les différents types de trisomies primaires chez *D. stramonium* L., variation du phénotype en fonction du chromosome affecté par la trisomie (Blakeslee, 1934).

5.2. Polyploïdie chez *D. stramonium* L.

En règle générale, une cellule est polyploïde lorsque son stock chromosomique correspond au stock diploïde multiplié par n . Chez *Datura stramonium* L., il a été identifié jusqu'à présent 6 niveaux de la série polyploïde ($3n$, $4n$, $5n$, $6n$, $7n$, $8n$) (Harbouche, 2005). Ainsi un autotétraploïde fertile existe chez *Datura stramonium* L., qui forme régulièrement des gamètes contenant 24 chromosomes (Beaudry, 1985 ; Baiza et al., 1999). Des aneuploïdes ont été observés chez les tétraploïdes ($4n$), avec $4n+1$, $4n+2$ et $4n+3$ (Blakeslee, 1934).

II Polyploïdie et teneur en alcaloïdes

1. Les alcaloïdes

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme primaire : ce sont donc des *métabolites secondaires*. Ces métabolites peuvent être classés en quatre catégories dont les *alcaloïdes* qui forment une grande famille très hétérogène est un groupe très important de produits naturels en raison de leurs propriétés biologiques, pharmacologiques et de leur diversité structurale (Guignard et *al.*, 1985 ; Hopkins, 2003 ; Mauro, 2006). On estime qu'il existe environ 21000 alcaloïdes identifiés (Wink, 2007).

Biosynthétiquement, les alcaloïdes naturelles peuvent être dérivées des acides aminés, des terpènes, ou des composés aromatiques selon la structure spécifique de l'alcaloïde. En raison de cette diversité, elles sont souvent produites par les plantes et très peu par voie chimique (Heilmann et Bauer, 1999).

1.1. Définition

Le terme alcaloïde a été introduit pour la première fois par le pharmacien Meisner au début du XIX^{ème} siècle. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910: un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins alcaline (de l'Arabe *al kaly* qui signifie soude, et du Grec *eidos* qui signifie aspect) (Bruneton, 1995) et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007). Ils furent parmi les premiers composés biochimiques à être découverts (Gontier, 1993).

Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (Roberts et Wink, 1999 ; Stöckigt et *al.*, 2002).

Ce sont des composés azotés complexes, élaborés par des végétaux et doués de propriétés extrêmement importantes, voire redoutables, sur les organismes vivants (Boullard, 1997). Leur atome d'azote fait partie d'un système hétérocyclique possédant une activité pharmacologique significative. Ils se trouvent sous forme de sels et sont biosynthétisés à partir d'acides aminés. Ces caractéristiques concernent *les alcaloïdes vrais* mais beaucoup d'auteurs distinguent, en plus, les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes.

Les protoalcaloïdes sont des amines simples dans lesquelles l'atome d'azote ne fait pas partie de l'anneau hétérocyclique (Bruneton, 1995).

Les pseudoalcaloïdes ont le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ils ne sont pas biosynthétisés à partir d'acides aminés. La plupart des exemples connus sont des isoprenoïdes et se réfèrent aux alcaloïdes terpénoïdes (Bruneton, 1995).

Selon Cordell et *al.* (2001), il existe certains produits naturels contenant un atome d'azote dans leur structure mais ils ne sont pas considérés comme des alcaloïdes tels que la colchicine et l'acide aristolochique.

1.2. Classification

Il est habituel de classer les alcaloïdes en fonction de leur structure et, ainsi, de distinguer les composés non hétérocycliques des composés hétérocycliques, puis dans ce dernier groupe de classer les alcaloïdes selon l'hétérocycle de base auquel ils se rattachent. D'autres

classifications sont possibles : par exemple celle qui consiste à regrouper les alcaloïdes en fonction de leurs propriétés pharmacologiques ou bien encore celle qui tient compte de leur distribution botanique (Bruneton, 1987).

Selon Mauro (2006), il est très difficile de proposer une classification pour les alcaloïdes en raison du grand nombre de composés connus sous ce terme et surtout à cause de leur diversité structurale. Mais généralement ils sont classés en fonction de la nature du cycle qui prédomine dans la molécule.

Cependant malgré leurs structures extrêmement variées, il existe une autre façon de classer ces composés qui consiste à considérer non pas la structure des alcaloïdes mais leur origine biosynthétique du fait que les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples (Bruneton, 1987). La plus part des alcaloïdes sont synthétisés à partir d'un petit nombre d'acides aminés ordinaires dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde (Hopkins, 2003 ; Mauro, 2006). Ainsi, il existe des alcaloïdes dérivés de l'ornithine, de la lysine, de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane (Mauro, 2006).

Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (Bhat et *al.*, 2005).

1.3. Alcaloïdes tropaniques

1.3.1. Généralités sur les alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes sont classés en fonction de leur activité biologique ou en fonction de leur structure chimique en plusieurs groupes, parmi ceux-ci on trouve les alcaloïdes tropaniques (Bruneton, 1999), qui regroupent: l'hyoscyamine, la scopolamine (ou hyoscine) et l'atropine (isomère racémique de l'hyoscyamine) (Figure 3) qui représentent généralement les alcaloïdes tropaniques les plus importants de plusieurs familles (Erythroxylaceae, Convolvulaceae, Proteaceae, Euphorbiaceae, Rhizophoraceae et Cruciferae) (Griffin et Lin, 2000; Falcão et *al.*, 2008) mais plus particulièrement des Solanacées (Verdrager, 1978 ; Houmani et Cosson, 2000). Cette dernière famille comporte environ 100 genres et 3000 espèces. Particulièrement les genres *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus*, *Przewalskia*, *Atropanthe*, *Physochlaina*, *Mandragora*, *Anthotroche*, *Cyphantera* et *Duboisia*, qui sont connus par leur richesse en alcaloïdes tropaniques (Griffin et Lin, 2000 ; Polya, 2003 ; Wink, 2003a ; Doncheva et *al.*, 2006).

Dans la plante, les alcaloïdes tropaniques sont des esters de l'acide tropanique qui est un acide aromatique et du tropanol ou du scopanol (Leete, 1979 ; Waller et Dermer, 1981 *In* Felidj, 2005). Ils prennent leur nom du noyau tropane (Felidj, 2005) qui est un hétérocycle azoté et bicyclique (Bruneton, 1987). Ils se localisent dans la plante dans plusieurs organes à des concentrations variables. L'hyoscyamine et la scopolamine sont considérés comme les composants majeurs de ces alcaloïdes tropaniques (Koelen et Gross, 1982 ; Shukla et Thakur, 1992).

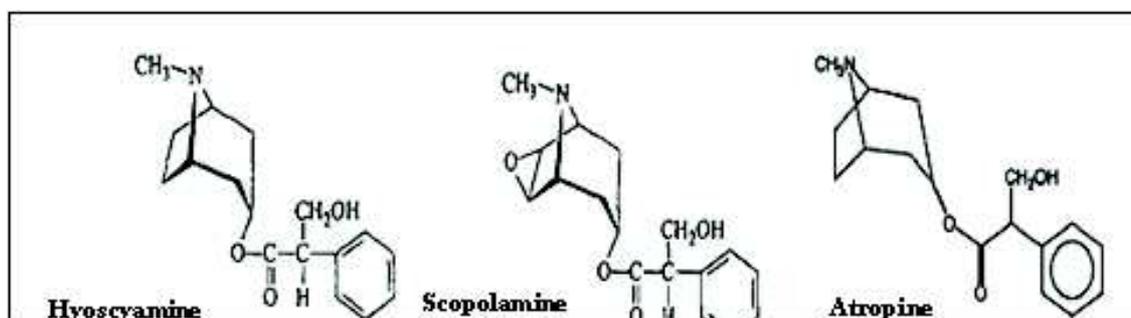


Figure 3: Structure chimique des alcaloïdes tropaniques (Robins et al., 1994).

1.3.2 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques sont biosynthétisés par voie enzymatique (Hashimoto et Yamada, 1987) dans le réticulum endoplasmique (Guignard et al., 1985) à partir de deux acides aminés comme précurseurs pour la biosynthèse de l'hyoscyamine et de la scopolamine qui sont l'ornithine et l'arginine (Nakjima et al., 1993 *In* Amdoun, 2003) et après deux activités enzymatiques initiales qui sont l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine décarboxylase (ADC) (Vallet, 1996).

Selon Guignard et al. (1985) et Wink (2003b), les racines sont le siège de la biosynthèse de l'hyoscyamine. A cet effet, Demeyer et Dejaegere (1992) indiquent que la racine absorbe l'azote de la solution du sol qui sera inclus dans la synthèse du premier acide aminé qui est le glutamate, à partir duquel se forme l'ornithine.

Le point de départ de la voie de biosynthèse est un cycle, la N-méthyle- Δ 1-pyrroline, dérivant de l'ornithine (Richter, 1993). Heby (1981) signale que l'hyoscyamine provient de l'estérification de l'acide tropique et du tropane synthétisé à partir de l'ornithine, qui est méthylationné par l'ornithine méthyle transférase (OMT) en N-méthyl ornithine. Une décarboxylation, conduit à la N-méthyl putrescine qui peut également provenir de la méthylation de la putrescine par la putrescine N-méthyltransférase (PMT). L'action de la N-méthyl putrescine oxydase sur la N-méthyl putrescine engendre le 4-méthylaminobutanal, qui par décarboxylation donne le sel N-méthylpyrrolinium.

L'étape clef dans la biosynthèse du noyau tropane est l'attaque nucléophile par le C-2 de l'acetoacétyl coenzyme A sur le N-méthylepyrrolinium. Le produit d'addition est décarboxylé et l'hygrine résultant est oxydé en 5-acétyl-1-méthylpyrrolinium et converti en tropinone par l'intermédiaire d'une réaction de Mannich. Plus tard, le keton est réduit par la tropinone-réductase tout en donnant la tropine (Bruneton, 1995). L'acide tropique, quant à lui dérive de la phénylalanine, estérifie la tropine pour donner ainsi la L-hyoscyamine (Houmani, 1999 ; Richter, 1993). L'hyoscyamine peut être hydrolysée en tropine lors de l'extraction (Mauro, 2006) et en acide tropique qui sont dépourvus des propriétés physiologiques de l'hyoscyamine (Kinghorn, 1979). Cette dernière migre par la suite à travers le xylème vers les parties aériennes où elle est soit accumulée (Kitamura et al., 1995) ou soit biotransformée en scopolamine (Cosson, 1976).

La voie de biosynthèse de la scopolamine est complexe et fait intervenir plusieurs précurseurs différents, mais cet alcaloïde est directement issu de l'hyoscyamine par une hydrodécarboxylation suivie d'une époxydation qui est très intense dans les jeunes plants (Cosson, 1976 ; Zhang et al., 2003). Ce phénomène met en jeu deux enzymes, l'hyoscyamine 6- β -hydroxylase localisé au niveau du péricycle des jeunes racines et l'hyoscyamine 6- β -époxydase principalement localisée dans les feuilles (Hashimoto et al.,

1991). Les voies de biosynthèses des différents alcaloïdes tropaniques sont représentées dans la figure 4.

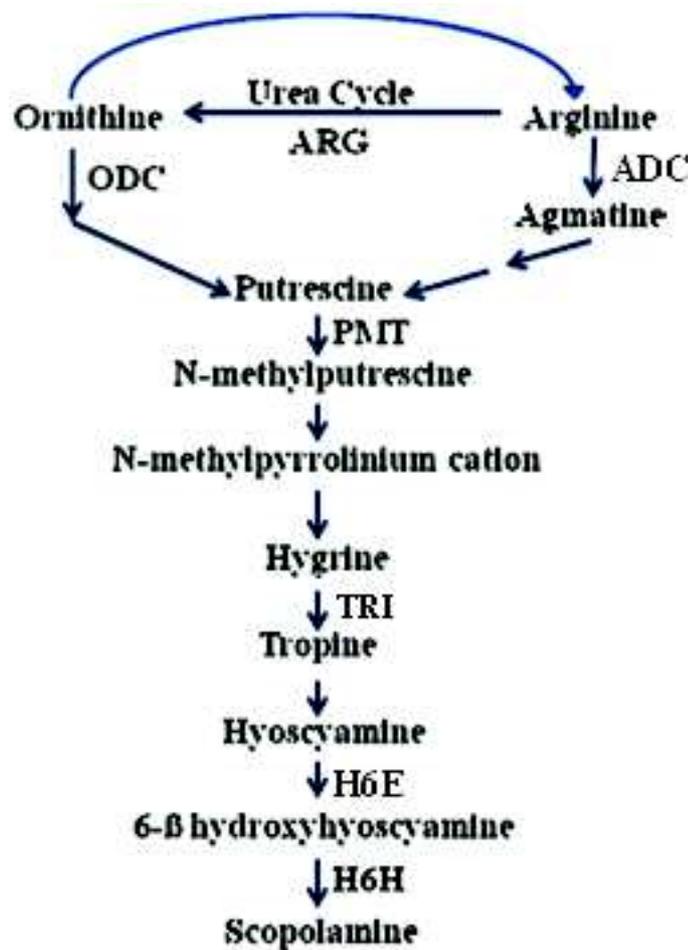


Figure 4 : Voies de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Singh et al., 2011).

ODC: ornithine decarboxylase ; **ADC:** arginine decarboxylase; **ARG** arginase; **PMT:** putrescine N-méthyltransferase; **TRI:** Tropinone reductase I et **H6H:** hyoscyamine 6b-hydroxylase.

1.3.3. facteurs génétiques affectant le contenu alcaloïdique

La teneur en alcaloïdes tropaniques de la plante est le résultat de leur biosynthèse d'une part, et de leur catabolisme (dégradation probable) d'une autre part (Cosson, 1976). Cette teneur est variable et elle est la conséquence de processus complexes dans lesquels interviennent différents types de facteurs dont les facteurs génétiques, le stade de développement des plantes et les facteurs environnementaux (Cosson, 1976). Par ailleurs, le facteur génétique présente une grande influence sur la teneur en alcaloïdes (Gupta et al., 1976 In Benhizia (1989)).

Mechler et Kohlenbach (1978) ont montré que les plantes diploïdes chez certaines espèces de *Datura* présentent des teneurs en alcaloïdes totaux plus importantes que celles des plantes haploïdes, ces teneurs dépendent également du stade de développement de la plante. En effet, les plantes diploïdes et haploïdes présentent des teneurs élevées en alcaloïdes totaux au stade végétatif, mais cette teneur diminue de façon rapide et brusque

au stade de floraison et de maturation des fruits chez les plantes diploïdes tandis qu'elle est progressive chez les plantes haploïdes.

Au sein d'une même espèce, le degré de ploïdie pourrait influencer les variations en teneur alcaloïdiques. Berkov et Philipov (2002) signalent que les *Datura stramonium* L. tétraploïdes montrent un contenu alcaloïdique plus élevé que les diploïdes, aussi bien au niveau des feuilles qu'au niveau des racines. Ceci résulte du fait que chaque espèce ou variété possède son propre potentiel génétique qui se traduit, dans un environnement donné, par une capacité physiologique différente à la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Amdoun, 2003).

Ces variations pourraient s'expliquer par le fait que l'état diploïde est le premier pas vers la polyploïdisation, il semblerait que plus le degré de ploïdie augmente, et plus la teneur en alcaloïdes tropaniques s'accroît. C'est ainsi que les tétraploïdes montrent un contenu alcaloïdique plus important que les diploïdes (Mechler et Kohlenbach., 1978).

2. Polyploïdie

2.1. Introduction

Les angiospermes constituent le groupe le plus diversifié des plantes à graines sur la terre. Bien que la majorité des plantes existantes soient diploïdes, où les cellules somatiques possèdent deux ensembles de chromosomes, un nombre significatif d'espèces de plantes s'est transformé en des polyploïdes (Cheng et Korban, 2011).

La polyploïdie ou duplication génomique désigne l'état d'un noyau dans lequel le nombre de lots de chromosomes homologues (génomés de base) est supérieur à deux (Bretagnolle et *al.*, 1998 ; Comai, 2005 ; Mahé, 2009). Ce doublement du nombre de chromosomes peut intervenir dans les populations cellulaires, aussi bien somatiques que germinales (Poulizac, 1999).

La polyploïdie a depuis longtemps été reconnue comme l'un des processus principaux de l'évolution des eucaryotes, et plus spécialement du règne végétal (Lepoittevin, 2004 ; Schacherer, 2005 ; Desai et *al.*, 2006). Dans la nature, presque 70% des espèces d'angiospermes ont éprouvé un ou plusieurs épisodes de polyploïdisation (Masterson 1994 ; Moore, 2002 ; Jackson et Chen, 2010). Ces proportions élevées indiquent que les changements du niveau de ploïdie ont assurément joué un certain rôle dans l'évolution des plantes (Vamosi et Dickinson, 2006). De plus, les analyses moléculaires suggèrent que la quasi-totalité des angiospermes présentent des traces d'évènements de polyploïdie anciens et parfois successifs (Rustenholtz, 2010).

Ce processus représente aussi un mécanisme de spéciation et d'adaptation majeur chez les angiospermes (Lewis, 1980 ; Schacherer, 2005 ; Fawcett et *al.*, 2009 ; Peer et *al.*, 2009 ; Wood et *al.*, 2009 ; Dewitte et *al.*, 2010) où la fréquence d'apparition est de l'ordre de un par 100000 (Comai, 2005; Gregory, 2005; Leitch et Leitch, 2008). Ainsi à l'heure actuelle de nombreuses espèces végétales et notamment un grand nombre d'espèces cultivées et horticoles sont des polyploïdes comme la pomme de terre, le colza, le blé, le coton, la canne à sucre ou la banane (Anand et *al.*, 2008; Leitch et Leitch, 2008, Laere et *al.*, 2010).

Il y a deux approches pour produire des polyploïdes: la formation spontanée (Zhu et *al.* 1998) où une non réduction gamétique se produit au cours de la méiose quand les ponts d'anaphase ne se résolvent pas. Ceci peut affecter la cytokinèse et la séparation finale des deux cellules sœurs. Le résultat est une refusion des deux noyaux et une cellule avec

un doublement du contenu d'ADN (Cuevas-Ramos, 2010). Cette voie semble être la plus fréquente menant à la polyploïdie puisqu'en général les parents des polyploïdes produisent souvent un nombre important de gamètes non réduits (Thompson et Lumaret, 1992 *In* : Chelaifa, 2010).

La deuxième approche est l'induction artificielle (Kang 2003) où les traitements par la colchicine sont largement répandus pour l'induire dans les conditions *in vivo* et *in vitro* (Tang et al., 2010).

Les plantes polyploïdes possèdent souvent des caractéristiques supérieures de leurs contreparties diploïdes en ce qui concerne les changements morphologiques, cytologiques, l'adaptabilité génétique et la tolérance aux stress environnementaux (Dewitte et al., 2010; Xiong et al. 2006 *In* : Laere et al., 2010). Ceci peut avoir plusieurs conséquences sur l'évolution du génome, particulièrement sur l'expression et l'organisation des gènes (Wendel, 2000).

La polyploïdie est un état qui s'applique aussi bien à une espèce, une population, un individu, à un organe, un tissu ou même à une simple cellule. On peut classer les individus polyploïdes selon leur niveau de ploïdie (triploïde, tétraploïde, pentaploïde, etc...), mais aussi selon l'origine de leur ploïdie et le degré de divergence entre les génomes parentaux impliqués en autopolyploïdie et allopolyploïdie (Lepoittevin, 2004; Schacherer, 2005; Aagaard et al. 2009 ; Chelaifa, 2010 ; Chen, 2010 ; Rustenholz, 2010). L'autopolyploïdie ne semble pas aussi fréquente que l'allopolyploïdie (Judd et al., 2002), la majorité des polyploïdes (>75%) sont des allopolyploïdes (Brochmann et al., 2004).

2.2. Autopolyploïdes

L'autopolyploïdie résulte d'un dysfonctionnement au cours des divisions cellulaires. Cet événement peut se produire par erreur durant la méiose conduisant le plus souvent à la formation de gamètes diploïdes (les diplogamètes) plutôt qu'haploïdes. Si deux gamètes diploïdes fusionnent, une cellule tétraploïde contenant 4 copies de chaque chromosome va être formée (Schacherer, 2005). Si ces gamètes non réduits fusionnent avec des gamètes haploïdes, ils produisent un individu triploïde instable et stérile (Griffiths et al., 2001), qui peut contribuer à la formation d'un individu tétraploïde plus stable (Rustenholz, 2010) comme cela est schématisé sur la figure 5.

L'autopolyploïdie peut également provenir d'un doublement somatique : l'endomitose est un phénomène assez rare qui provoque l'apparition d'une cellule somatique $2n=4x$, qui pourra elle-même donner naissance à une lignée cellulaire, voire à un organe tétraploïde. Elle peut être induite par certaines substances chimiques qui bloquent la polymérisation des microtubules. La plus utilisée étant la colchicine, un alcaloïde dérivée du crocus d'automne (*Colchicum autumnale*). Il perturbe la formation de la fibre mitotique et empêche la séparation du chromosome pendant la mitose (Gao et al., 1996). Cette technique fonctionne bien dans les cellules végétales et animales, mais les végétaux semblent généralement plus tolérants à la polyploïdie (Griffiths et al., 2001).

Les autopolyploïdes sont souvent viables car chaque chromosome a forcément un homologue pouvant former des bivalents durant la méiose et conduire à l'obtention de gamètes permettant la reproduction. Mais généralement, le croisement avec l'organisme original qui a permis sa formation n'est pas fertile (Schacherer, 2005).

Les autopolyploïdes se produisent naturellement dans beaucoup de genres, mais parfois des plantes ont été induites à devenir des autopolyploïdes pour favoriser des caractéristiques désirées (De Jesus, 2003). Cette induction est très intéressante lorsqu'elle

touche des plantes à intérêt agronomique et plus particulièrement les plantes médicinales et aromatiques.

2.3. Allopolyploïdes

L'allopolyploïdie résulte de l'association de deux ou plusieurs génomes d'espèces distinctes mais étroitement apparentées (Griffiths et *al.*, 2001; Lepoittevin, 2004; Schacherer, 2005). Ils résultent soit d'un hybride inter-spécifique instable ayant subi un doublement chromosomique (Aagaard et *al.* 2009; Chelaifa, 2010), soit de la fusion de deux gamètes non réduits issus de deux espèces différentes (De Jesus, 2003; Rustenholz, 2010) comme schématisé sur la figure 5.

Ces chromosomes sont dits homéologues et non parfaitement homologues comme chez les autopolyploïdes (Griffiths et *al.*, 2001), ils présentent des similitudes mais les gènes ne sont pas toujours conservés et leur ordre peut être différent. Le plus souvent, les allopolyploïdes néoformés sont des hybrides stériles ; un doublement de leur garniture chromosomique est alors nécessaire pour restaurer leur fertilité (Lepoittevin, 2004).

Dans ce dernier cas, la duplication du génome restaure la fertilité plus ou moins limitée des hybrides interspécifiques, chez lesquels les problèmes d'appariement chromosomique rendent les méioses irrégulières. De ce fait, l'allopolyploïde est un des mécanismes de spéciation le plus répandu chez les plantes, et conduit à la formation de nouvelles lignées montrant des capacités adaptatives souvent supérieures à leurs parents diploïdes. Ces capacités, qui se traduisent dans la nature par une plus large expansion de ces espèces (dont certaines se montrent envahissantes), ont été largement exploitées par l'Homme, qui a ainsi domestiqué un grand nombre d'espèces jouant aujourd'hui un rôle économique majeur comme le blé, le coton et le maïs (Paterson 2005 ; Wendel et Doyle 2005 ; Udall et Wendel 2006).

Les allopolyploïdes peuvent être utilisés pour améliorer les plantes, afin de combiner en un seul type les caractéristiques profitables d'espèces parentales (Griffiths et *al.*, 2001).

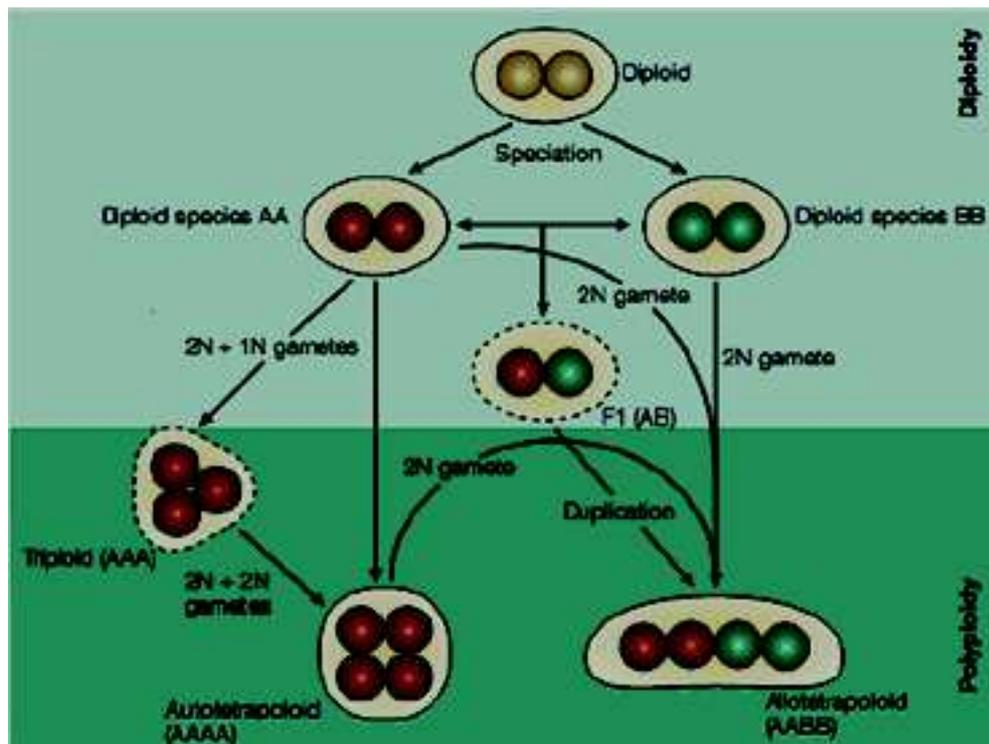


Figure 5: Les différentes voies possibles de transition brutale de la diploïdie à la polyploïdie. Les formes de ploïdie les plus instables ont des contours nucléaires en pointillés

(Comai, 2005).

3. Polyploïdie et les changements chimiques : production de métabolites secondaires

La polyploïdisation est une méthode disponible pour induire la variation (Stanys et al., 2006). A cet effet, la polyploïdie artificielle a été considérée comme une méthode pour augmenter non seulement l'accumulation de biomasse de la plante mais aussi pour augmenter la production de métabolites secondaires de haute valeur ajoutée par la plante (Berkow, 2001 ; De Jessus-Gonzalez et Weathers, 2003 ; Lavania, 2005 ; Fong, 2008). Cette augmentation peut être favorable quand ces organes et/ou la biomasse affectés constituent un produit économique (Dhawania et Lavania, 1996). Par conséquent, la polyploïdie peut être un outil utile pour obtenir de nouveaux cultivars de plantes médicinales (Zhang et al., 2010).

Puisque les autopolyploïdes surgissent comme conséquence d'une multiplication directe du génome, le matériel génétique de base demeure le même avec un dosage multiplié du génome. Par conséquent, une production augmentée des métabolites secondaires des plantes aussi bien que le métabolisme primaire devient impérative (Levin, 1983 ; Dhawania et Lavania, 1996). Pour cela, Rowson (1949) a trouvé que les plantes tétraploïdes de *Datura stramonium* L. possèdent un contenu alcaloïdique 1 à 2 fois plus élevé dans les feuilles, les tiges et les racines quand elles sont comparées avec les plantes diploïdes. Ceci est aussi confirmé chez les plantes tétraploïdes d'*Atropa belladonna* avec une augmentation de 154% (Jackson et Rowson, 1953 ; Gao et al. 2002), chez les graines de *Datura innoxia* et *D. stramonium* L. (Berkow, 2001) et chez *Astragalus*

membranaceus (Chen et Gao, 2007), tandis que *Artemisia annua* tétraploïde produit six fois plus d'artémisinine que les plantes diploïdes (De Jesus-Gonzalez et Weathers, 2003).

Une analyse chimique entreprise sur des allopolyploïdes induits indique que de tels polyploïdes sont généralement plus riches en composés phénoliques et expriment également une plus grande diversité enzymatique que l'un ou l'autre des parents (Dhawania et Lavania, 1996). Alors que chez *Setaria tomentosa*, les autotétraploïdes se sont avérés supérieurs pour l'amidon, les sucres solubles totaux et les lipides (Shashi et Sachdeva, 1990).

Ce dédoublement chromosomique peut aussi changer la chimie secondaire d'une plante de façon qualitative (Levin et *al.*, 1979 ; De Jesus, 2003). Par exemple, des différences qualitatives ont été trouvées dans des profils de glycoflavone de 14 sur 15 populations synthétiques d'autotétraploïdes par rapport à leurs prototypes diploïdes, y compris 14 exemples de flavonoïdes présents dans les tétraploïdes mais pas dans le diploïde, et huit exemples de flavonoïdes présents dans le diploïde mais pas dans les tétraploïdes (Levin, 1983). Ces changements ont été interprétés comme une perturbation des mécanismes métaboliques qui règlent la biosynthèse des différents composés (Dhawania et Lavania, 1996).

Selon Leitch et Bennett (1997), la perte de composés diploïdes dans les autopolyploïdes correspondants est expliquée comme une répression fonctionnelle des gènes structuraux existants et le gain dans les autopolyploïdes est expliqué comme une dérégulation fonctionnelle des gènes structuraux précédemment silencieux.

III Chevelus racinaires : une alternative pour la production d'alcaloïdes chez *Datura* sp

1. Induction du *Hairy Root*

Le groupe des alcaloïdes constitue le groupe de métabolites secondaires le plus étudié. Ces alcaloïdes présentent aussi une valeur pharmaceutique et économique importante, et un bon nombre d'entre eux sont actuellement isolés de la matière végétale puisque aucune méthode de production économiquement faisable alternative n'existe (Verpoorte et *al.*, 2000). Pendant les décennies passées un intérêt considérable a été accordé à la production de produits secondaires par culture de cellules végétales (Oksman-Caldentey et Hiltunen., 1996). Le succès, cependant, a été principalement modéré parce que les voies de biosynthèses sont mal connues. La formation de produits à partir du métabolisme secondaire est souvent basse et instable dans les cultures indifférenciées de callus et de suspensions cellulaires. Par conséquent, les tissus spécialisés tels que les racines sont capables d'accumuler une gamme étendue d'alcaloïdes tropaniques. Ceci suggère que la production d'alcaloïdes est associée à l'organogenèse de la racine (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Le problème principal lié à la culture *in vitro* de racines conventionnelles c'est le taux de croissance qui est habituellement faible. Par ailleurs, les chevelus racinaires induits par *Agrobacterium* sont à croissance rapide et génétiquement stables, ce qui leur permet d'être une alternative importante.

1.1. *Agrobacterium*

Les membres du genre *Agrobacterium* sont des composants omniprésents de la flore microbienne du sol, dont la grande majorité d'entre eux sont saprophytiques, survivants principalement sur de la matière organique en décomposition. Cependant, plusieurs espèces du genre *Agrobacterium* causent aussi des maladies néo-plastiques aux plantes (Escobar et Dandeka, 2003).

Ce genre regroupe les bactéries gram-négatives du sol qui appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* de la sous-classe alpha des *Proteobacteria* (Woese, 1987 ; Krimi et al., 2002). Les deux espèces les plus connues sont *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* qui sont des pathogènes pour de nombreuses plantes dicotylédones et quelques espèces monocotylédones (De Cleene et De Ley, 1981 ; Porter, 1991 ; Toivonen, 1993 ; Tourte, 1998 ; Shanks et Morgan, 1999). Elles causent une prolifération anormale des cellules des plantes dans le site d'infection qui manifeste par la suite la formation de tumeurs nommés « crown galls » dans le cas d'*A. tumefaciens* ou de racines adventives nommées « hairy roots » dans le cas d'*A. rhizogenes* (Mohajjel-Shoja, 2010).

Ces eubactéries ne sporulent pas et se présentent sous forme de bacilles de 0,6 à 1 µm de largeur et de 1,5 à 3 µm de longueur. Elles sont mobiles grâce à la présence de 1 à 6 flagelles péritriches (Kerstens et De Ley, 1984; Tourte, 2001; Prescott et al., 2003; Murugesan et al., 2010). Elles vivent en aérobie stricte à une température optimale de croissance de 25°C à 28°C (Chriqui, 1998; Wlodarczyk, 2010), mais la plupart des souches sont capables de pousser sous une pression d'oxygène réduite (ce qui est le cas dans les tissus végétaux par exemple) (Portier, 2004). Les bactéries du genre *Agrobacterium* occupent différents habitats ; elles peuvent vivre librement dans le sol, dans l'environnement racinaire (rhizosphère) ou comme pathogène des plantes (Wlodarczyk, 2010). En milieu solide, elles forment des colonies convexes, circulaires, lisses et de couleur beige claire (Chriqui, 1998).

1.2. *Agrobacterium rhizogenes* et les gènes du plasmide Ri

Agrobacterium rhizogenes (autrefois *Phytomonas rhizogenes*) a été identifié la première fois il y a plus de 70 ans (White, 1972), comme l'agent causal de la maladie de plantes connue comme syndrome du chevelu racinaire (Veena et Taylor, 2007). La cause principale de cette maladie est la présence d'un grand nombre de plasmides dans les souches d'*A. rhizogenes* dénommés les plasmides Ri « Root inducing » (Figure 6) (Schell et al., 1976; White et Nester, 1980). La classification de ces plasmides dépend du type d'opines qui sont des dérivés de sucres et d'acides aminés, métabolisés exclusivement par les bactéries et que dont les plasmides dirigent les plantes infectées à les synthétiser (Chilton et al. 1982 ; Gelvin, 1990 ; Hamill et Lidgett, 1997 ; Zhou et al. 1998 ; Sevon et Oksman-Caldentay, 2002).

Les plasmides Ri sont groupés dans deux principales classes selon les opines synthétisées par les chevelus racinaires. Les souches de type agropine (exemple : pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834 et pRiLBA9402) qui induisent les racines pour synthétiser l'agropine et les acides relatifs ; et les souches de type mannopine (exemple : pRi8196, TR7 et TR101) qui induisent les racines pour produire le mannopine et les acides correspondants (Rhodes et al., 1990). D'autres souches sont aussi identifiées telles que les souches de type cucumopine (représentées par pRi2659) et les souches de type mikimopine (représentées par pRi1724) (Veena et Taylor, 2007).

Les plasmides Ri les plus étudiés sont ceux des souches de type agropine, qui sont considérés comme étant les plus virulents, et sont à cet effet, les plus utilisés dans

l'établissement des cultures de chevelus racinaires (Gelvin, 1990 ; Sevon et Oksman-Caldentay, 2002 ; Casanova *et al.*, 2005 ; Hu et Du, 2006).

Le plasmide Ri qui se caractérise par sa grande taille de l'ordre de 200 à 800 kilo bases (kb) (Costantino *et al.*, 1994 ; Broothaerts *et al.*, 2005) porte un ou plusieurs fragments d'ADN nommés T-DNA (Transferred-DNA), qui sont transférés vers la cellule végétale, et des gènes de virulence (*vir*) qui codent pour des facteurs de transfert nécessaires pour le T-DNA (Hooykaas, 1984 ; Sheng et Citovsky, 1996 ; Zhou et Christie, 1999). Le T-DNA est délimitée par 24 pb de séquences d'ADN répétées qui sont très similaires entre les plasmides Ti et Ri (Slightom *et al.*, 1986).

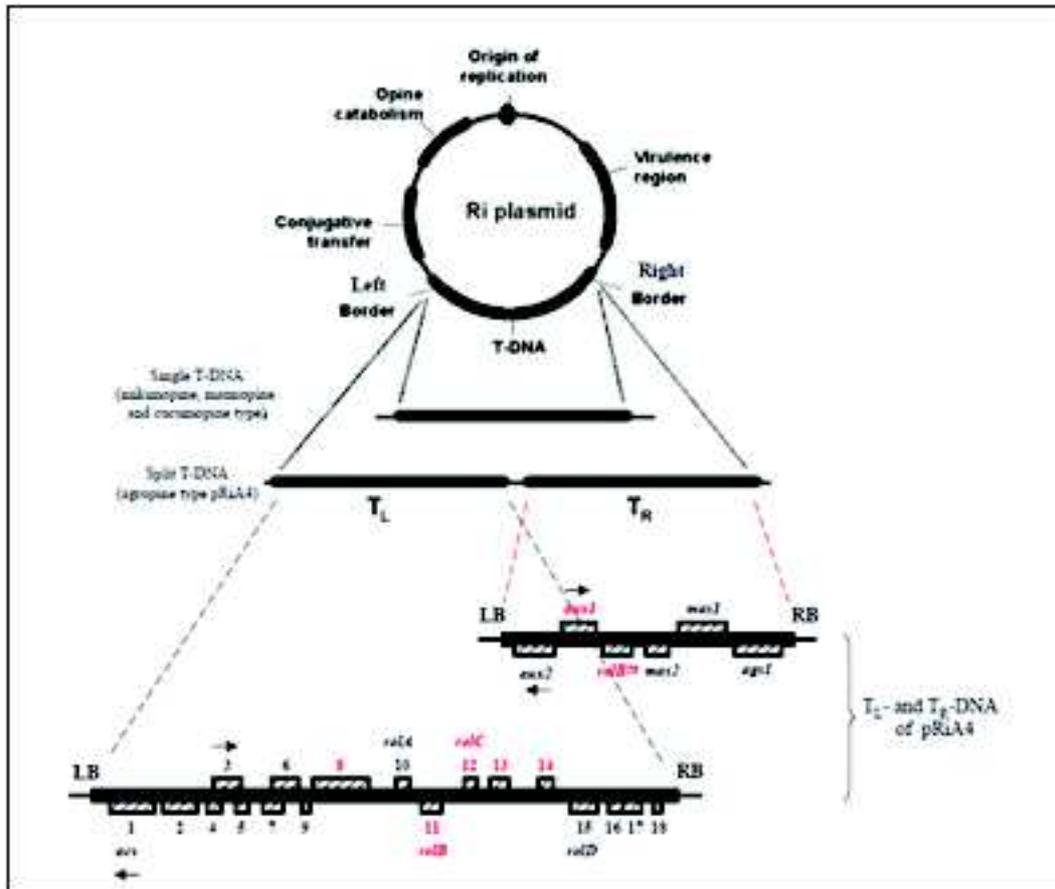


Figure 6: Structure du plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*

(Mohajjel Shoja, 2010)

T_L et **T_R** montrés ici sont de la souche A4. Les **ORFs** (1-18) sont montrés comme des boîtes ouvertes avec des lignes obliques au-dessus ou au-dessous des lignes en fonction de leur orientation. Les flèches présentent l'orientation (5' à 3') des **ORFs** (Open Reading Frames).

Les plasmides Ri de type agropine hébergent deux T-DNA, T_L (T-DNA left ou gauche) et T_R (T-DNA right ou droit) de 15-20 kb qui sont transférés et intégrés indépendamment dans le génome de la plante hôte (White *et al.*, 1985 ; Gelvin, 1990 ; Bensaddek *et al.*, 2008). Cependant les plasmides Ri de type mannopine et de type cucumopine contiennent seulement un T-DNA qui partage une homologie considérable de séquences d'ADN avec le T_L des plasmides de type agropine (Gelvin, 1990). Le Ri-T_R-DNA est très proche des

gènes *tms1* et *tms2* de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* et le Ri-T_L-DNA pourrait être suffisant pour induire la maladie des *hairy roots* (Riseuleo et al., 1982 ; Willmitzer et al., 1982 ; Huffman et al., 1984). Les gènes du T_L-DNA dirigent la synthèse d'une substance qui recrute les cellules pour se différencier dans des racines sous l'influence de la synthèse d'auxines endogènes (Shen et al., 1988 ; Giri et Narasu, 2000). Le Ri-T_R-DNA, qui est responsable de la production d'auxines et de cytokinines, stimulerait l'action du Ri-T_L-DNA, ce qui suggère des modes d'infection entraînant les symptômes de la maladie complètement différents entre *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* (Giri et Narasu, 2000 ; Tikhomiroff, 2001 ; Lüttge et al., 2002).

Le Ri T-DNA contient des gènes *root locus (rol)* responsables de la prolifération racinaire (Sbabou, 2009). Le Ri-T_L-DNA porte 4 *loci* : *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* ou ORFs (Open Reading Frames) 10, 11, 12 et 15, respectivement (White et al., 1985, Slightom et al., 1986), distinguant le plasmide Ri du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* (Chavarri et al., 2010). Ces gènes *rol* ne montrent aucune homologie avec les gènes d'*A. tumefaciens* (Meyer et al., 2000). *rolA* semble être lié au métabolisme de l'acide gibbérellique impliqué dans le développement de la plante. Son expression, tissu-dépendante (Guivarch et al., 1996 In Vallet, 1996), est cruciale pour l'établissement du phénotype "racines transformées" (Meyer et al., 2000). Selon le modèle actuel, l'expression de *rolB* produit une protéine membranaire (β -glucosidase) spécialisée dans la reconnaissance d'auxines qui modifie la réponse de la plante. Ceci se traduit par un tissu racinaire plus dense que la normale. Comme *rolA*, *rolC* est impliqué dans le métabolisme de l'acide gibbérellique. Un modèle récent propose que *rolC* serait impliqué dans le métabolisme et le transport des sucres (Nilson et al., 1997), alors que White et al. (1985) suggèrent que le *rolC* peut être impliqué dans l'élongation des chevelus racinaires. *rolD* n'est pas essentiel pour induire le phénotype des racines transformées, mais son absence retarde l'apparition des racines transformées (Meyer et al., 2000). La capacité des gènes *rolA*, *rolB* et *rolC* à induire des racines néoplastiques (croissance plus vite que la normale) dans les tissus est équivalente à celle du T_L-DNA entier du plasmide Ri (Spano et al., 1988). Le T_R-DNA du plasmide Ri se compose des gènes (*aux1*, *aux2*, *rolB TR*, *mas1*, *mas2* et *ags*) qui contrôlent la biosynthèse des opines et des auxines (Veena et Taylor, 2007). Cependant les gènes *aux* jouent un rôle auxiliaire dans l'induction des chevelus racinaires (Cardarelli et al., 1987 In Casanova et al., 2005).

1.3. Les bases physiologiques de la formation du *Hairy root*

Le mécanisme moléculaire du transfert de l'ADN-T vers la plante hôte est sensiblement le même pour les deux espèces d'*Agrocaterium*, mais la base physiologique de la tumurogenèse est totalement différente. Les tumeurs de la galle du collet résultent de la surproduction des phytohormones spécifiées (auxine et cytokinines) par les gènes de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* (Gelvin, 1990). La base physiologique de la maladie du chevelu racinaire n'est pas totalement comprise. L'altération du métabolisme de l'auxine dans les cellules transformées a été supposée jouer un rôle important dans l'expression du phénotype du chevelu racinaire (Zambryski et al., 1989). Le T_L-DNA joue un rôle majeur dans l'induction des chevelus racinaires, et les gènes qui codent pour la synthèse de l'auxine ont un rôle accessoire (Cardarelli et al., 1987 In Sevon et Oksman-Caldentey, 2002 ; Palazon et al., 1997). L'auxine est nécessaire dans l'induction du chevelu racinaire, mais il semble probablement que l'auxine ne joue pas un rôle dans l'expression de l'ADN-T dans les cellules des plantes transformées (Cardarelli et al., 1987 In Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Des études physiologiques ont par contre montré que les cellules transformées

sont plus sensibles à l'ajout extracellulaire d'auxines que les racines normales (Shen et al., 1998). Spano et ses collaborateurs (1988) ont suggéré que les gènes responsables à l'augmentation de la sensibilité des cellules de chevelus racinaires à l'auxine sont localisés sur le T_L-DNA.

1.4. Interaction *Agrobacterium*-cellule végétale : Mécanismes cellulaires de transformation

La pathogénie d'*Agrobacterium* est un processus unique et fortement spécialisé impliquant un transfert de gène entre les règnes bactérie-plante (Escobar et Dandeka, 2003). Ce transfert nécessite un grand nombre d'étapes distinctes et essentielles (Thikhomirof, 2001). Cependant le mécanisme de la formation du chevelu racinaire n'est pas complètement compris (Sevon et Oksman-Caldentay, 2002 ; Veena et Taylor, 2007) du fait que *A. tumefaciens* a été beaucoup plus étudié que *A. rhizogenes*. Aussi, les mécanismes cellulaires de transformation sont généralement décrits chez *A. tumefaciens*. Néanmoins, ces mécanismes restent semblables à ceux d'*A. rhizogenes* (Demarly, 1996 ; Veena et Taylor, 2007).

On peut dissocier le mécanisme de la transformation en trois étapes : l'adhésion bactérie-plante, l'activation des gènes de virulence *vir* et l'exportation du plasmide T-DNA vers la cellule hôte. L'ensemble de ces événements se trouve illustré dans la figure 7.

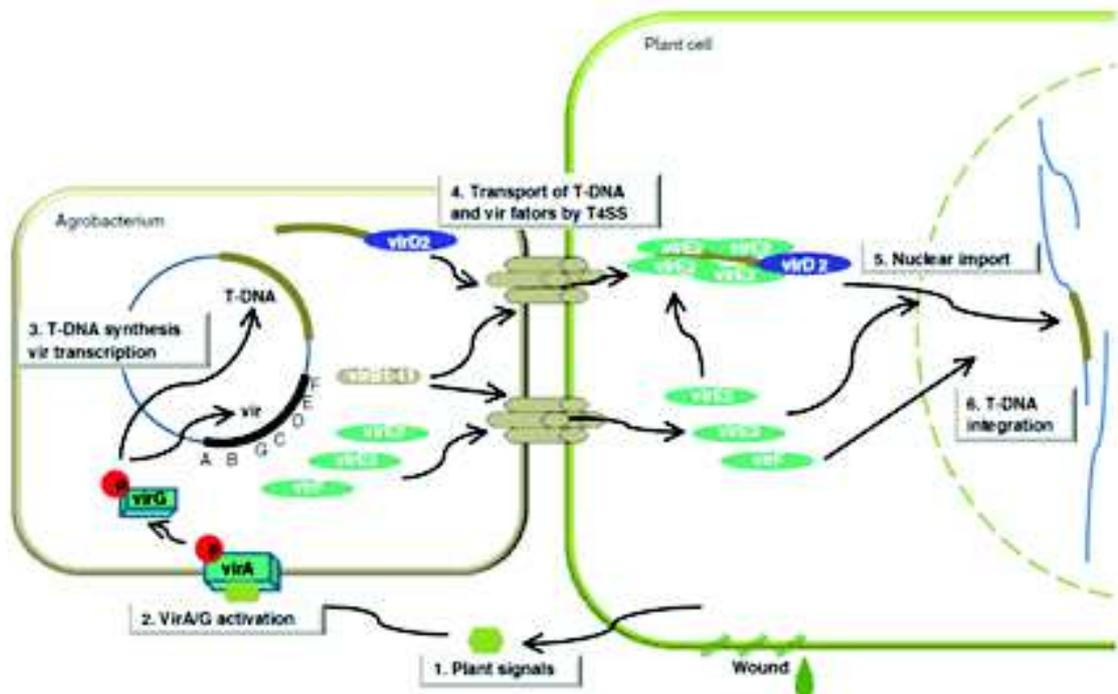


Figure 7: Vue générale du processus de l'interaction *Agrobacterium*–plante hôte (Pitzschke et Hirt, 2010).

· Adhésion de la bactérie à la cellule végétale

Une des premières étapes dans l'interaction entre l'*Agrobacterium* et la plante est l'attachement de la bactérie à la surface cellulaire ; c'est une étape indispensable au processus de l'infection (Scriban, 1999). En effet, la bactérie doit se maintenir attachée au

site cible (Lippincott et Lippincott, 1969) pour créer un pilus de conjugaison reliant les deux membranes cellulaires (Tikhomirot, 2001 ; Belaskri, 2010).

Les *loci* connus responsables de la synthèse des enzymes et protéines impliquées dans l'adhésion sont localisés sur l'ADN chromosomal de la bactérie (Scriban, 1999 ; Thikhomirot, 2001). Huit *loci* du chromosome bactérien sont principalement impliqués dans cette adhésion. Ce sont : *chvA*, *chvB* (Douglas et al., 1985), *chvD*, *exoC* (Cangelosi et al., 1987), *cel* (Matthysse, 1983), *att* (Matthysse, 1987), *miaA* et *ros* (Thikhomirot, 2001). Les deux *loci chvA* et *chvB* ainsi que *exoC*, qui interviennent dans l'attachement, sont impliqués dans la synthèse et l'excrétion d'un β -1,2-glucane hors de la bactérie, un polysaccharide normalement périplasmique, dont le rôle dans l'adhésion, bien qu'indispensable, est encore mal compris (Cangelosi et al., 1989 ; Thikhomirot, 2001). Le *locus cel* est responsable de la synthèse d'un polysaccharide sous forme de fibrilles de cellulose, dont le rôle est d'améliorer l'adhésion une fois qu'elle a été initiée (Matthysse, 1983 ; Matthysse et Gurlitz, 1982). Le *pscA* intervient dans la synthèse de glucanes cycliques et d'acides succinoglycanes (Cangelosi et al., 1987), et enfin *att* code pour une protéine de la surface cellulaire (Matthysse, 1987). D'autres *loci*, comme *ChvE*, permettent la stimulation de l'induction des gènes *vir*, ce qui induit une sensibilité bactérienne aux composés phénoliques (Ankenbauer et Nester, 1990; Cangelosi et al., 1990). Les rôles de *miaA*, *chvD* et *ros* sont mal compris (Thikhomirot, 2001).

Activation du processus d'infection (les gènes *vir*)

Les gènes qui codent pour les protéines impliquées dans la préparation du plasmide T-DNA et dans son transport sont portés par le Ti-DNA et le Ri-DNA (Thikhomirot, 2001).

L'activation du processus d'infection est régulée par les gènes de deux complexes (VirA/VirG) et (VirA/ChvE) (Figure 8). Au sein du complexe (VirA/VirG), le produit du gène *virA*, la protéine kinase transmembranaire VirA exprimée à la surface de la bactérie (Leroux et al., 1987), s'autophosphoryle suite à l'interaction directe avec un composé phénolique de type syringol (le plus actif étant l'acetosyringone) sécrété par les cellules de la plante blessée (Stachel et al., 1985 ; Lee et al., 1995 ; Nilsson et Olsson 1997 ; Giri et Narasu, 2000). D'après Lee et coll. (1996), la sélectivité de VirA sur les composés phénoliques dépend étroitement du plasmide Ti.

VirA active par phosphorylation le régulateur de réponse VirG, la protéine cytoplasmique, qui déclenche la transcription des gènes *vir* localisés sur la région *vir* du plasmide (Stachel et Zambryski, 1986 ; Stock et al., 2000).

Les gènes *vir* sont alors induits en cascade dans l'ordre *virG*, *virB*, *virC*, *virD* et *virE*. Si les composés phénoliques sont en faible concentration ne permettent pas l'activation de VirA, la protéine ChvE (une protéine périplasmique, chromosomale pouvant lier des monosaccharides) prend en charge le deuxième complexe. Lorsque ChvE est activée par son ligand, elle augmente la sensibilité de VirA aux composés phénoliques, permettant une activation de VirA en présence de faibles concentrations de ces composés (Thikhomirot, 2001). Le troisième activateur des gènes *vir* est l'acidité (Mantis et Winans, 1992 ; Li et al., 2002 ; Gao et Lynn, 2005). Celle-ci régule l'expression du gène *virG* placé également sous le contrôle d'un promoteur sensible au pH acide du milieu externe (pH 5,0 à 5,5) via une protéine chromosomale ChvI (Mantis et Winans, 1993).

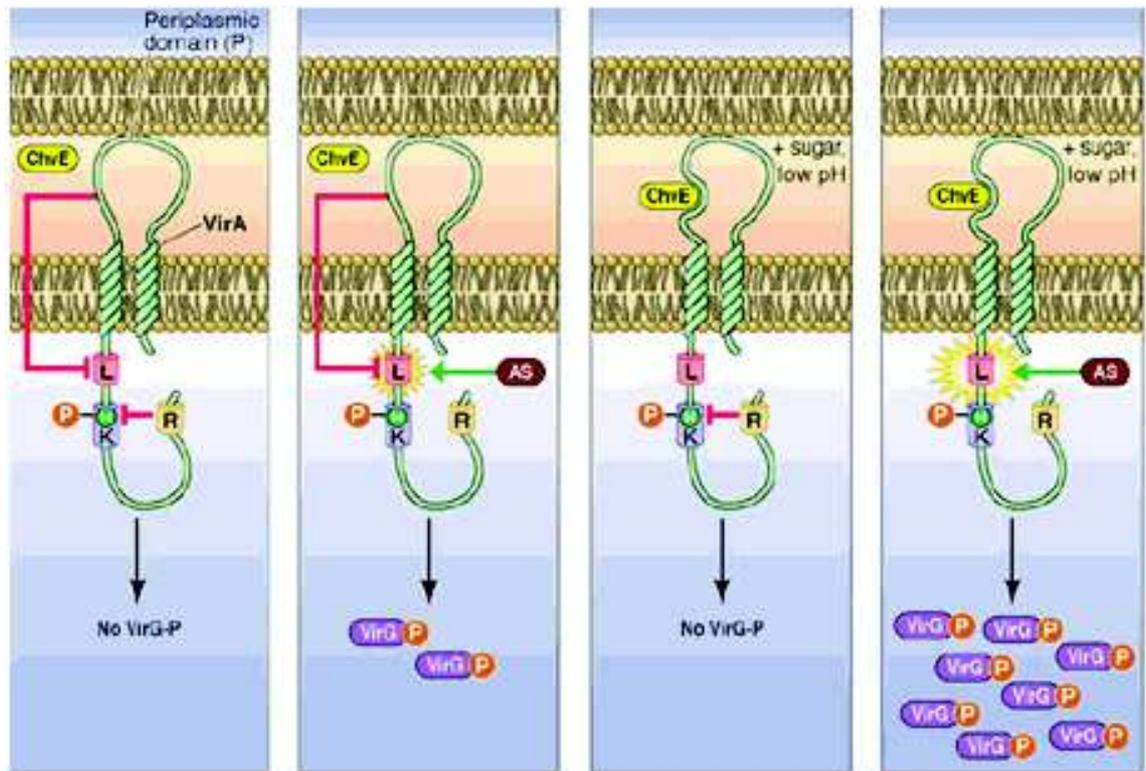


Figure 8 : Model d'intégration et d'activité du signal par les protéines ChvE/VirA transmetteurs du signal

(McCullen Binns, 2006).

Intégration et transfert de l'ADN-T dans la cellule de la plante infectée

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante est un processus aléatoire et d'autres facteurs créatiques codés par les gènes *vir* du plasmide T-DNA jouent un rôle clé dans le déclenchement du processus de transfert (Hamill et Lidgett, 1997).

Les protéines responsables de la maturation et du transfert de l'ADN-T sont codées par la région *vir* du plasmide Ti et ceux codés par les gènes de virulence (*chv*) du chromosome bactérien (Pelletier et Téoulé, 1999 ; Gelvin, 2000 ; Zhu et *al.*, 2000 ; Tzfira et Citovsky, 2002). La bordure droite est essentielle au transfert de l'ADN dans la plante, suggérant que le transfert s'initie au niveau de la bordure droite et se poursuivrait vers la gauche (Miranda et *al.*, 1992).

L'initiation du transfert commence quand le complexe virD1/virD2, qui comprend les gènes *virD1* et *virD2* qui codent respectivement pour une endonucléase et une relaxase (Windels et *al.*, 2008), reconnaît les séquences des bordures droite et gauche de l'ADN-T, et il les clivent à une distance de 4 nucléotides de leur extrémité gauche et déclenche la synthèse d'un ADN-T simple brin (Stachel et Zambryski, 1986). C'est sous cette forme qu'il est exporté dans le noyau de la cellule végétale cible (Thikhomirof, 2001). VirD2 s'attache de manière covalente sur l'extrémité 5' du simple brin du T-DNA (environ 600 copies) pour le protéger contre les nucléases de la cellule végétale cible (Howard et Citovsky, 1990) et elle porte les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) d'adressage vers le noyau de la cellule végétale (Portier, 2004). Les protéines VirE1 stabilisent les protéines protectrices VirE2 (Citovsky et *al.*, 1992; Sundberg et *al.*, 1996). L'ensemble VirD2, VirE2 et T-DNA simple brin constitue le « complexe T ». Les protéines *virB* (11 protéines produites par

l'opéron *virB*) ainsi que *VirD4* serviraient de canal entre la bactérie et la cellule végétale cible (Thikhomirof, 2001) pour transférer le brin du T-DNA selon un système de sécrétion dit de type IV (Christie, 1997 ; Scriban, 1999). La protéine chromosomique *AcvB* jouerait un rôle essentiel dans le transfert du plasmide, mais ce rôle pourrait être remplacé par l'expression de *virJ*, régulée par l'acétosyringone (Pan et al., 1995 *In* Thikhomirof, 2001). L'insertion de l'ADN-T se fait au hasard et sous forme de conjugaison illégitime dans le génome végétal, mais préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives de la plante (Tinland, 1996 *In* Lièvre, 2004 ; Portier, 2004). A cet effet, les chevelus racinaires dérivés montrent souvent différents modèles d'accumulation des métabolites secondaires (Hu et Du, 2006).

Une fois intégré dans le génome, l'ADN-T sera transcrit dans les cellules de la plante (Janssen et Gardner, 1989). Il se comporte comme un locus de plus (transgène) pour la plante, et est transmis de façon mendélienne à la descendance. Le transgène est très exprimé car il comporte des séquences régulatrices de la transcription eucaryotiques (Giri et Narasu, 2000 ; Portier, 2004).

Agrobacterium est donc avant tout un parasite qui se sert de la machinerie métabolique de la plante pour synthétiser le substrat qui lui sert de source de carbone et d'azote (Tikhomiroff., 2001).

2. Intérêt des chevelus racinaires

La maladie du chevelu racinaire est causée par l'infection de plantes supérieures blessées par l'*Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie gram négative du sol transfère un segment d'ADN (T-DNA) à partir de son large plasmide Ri (Root inducing) vers le génome de la plante infectée (Guillon et al., 2006).

Ces dernières années, un intérêt considérable a été montré dans les cultures d'organes transformés, principalement les cultures de chevelues racinaires (Santos et al., 2005).

2.1. Caractéristiques des chevelus racinaires

Les chevelus racinaires ont plusieurs propriétés qui ont favorisé leur utilisation en biotechnologies végétales. Souvent ces racines se développent rapidement avec des temps de dédoublement de la masse ressemblant à ceux des suspensions cellulaires, mais à la différence de ces dernières, elles sont des tissus différenciés qui tendent à produire des métabolites secondaires caractéristiques de l'espèce qui a été transformée (Hamill et Lidgett, 1997). La facilité de leur l'entretien et leur capacité à synthétiser une gamme de composés chimiques offrent un avantage additionnel comme source continue pour la production des métabolites secondaires valables. Puisque la production des métabolites secondaires est généralement plus élevée et génétiquement plus stable dans le tissu différencié, les cultures de chevelues racinaires représentent une alternative de choix au lieu de l'utilisation des cultures de suspension cellulaires (Shanks et Morgan, 1999).

Les chevelus racinaires sont aussi caractérisés par un degré élevé d'embranchements latéraux, profusion de poils de racines et absence de géotropisme (David et al., 1984 ; Tepfer, 1984). Ils se développent souvent plus rapidement que les racines normales (non transformées) à cause de leur embranchement étendu, ayant pour résultat la présence de beaucoup de méristèmes (White et Nester, 1980; Flores et al, 1999; Casanova et al., 2005).

Un dispositif important des racines induites par *A. rhizogenes* est leur capacité unique de se développer *in vitro* en l'absence des régulateurs de croissance exogènes (Shanks

et Morgan, 1999 ; Eckhart et Wink, 2002 ; Kim et *al.*, 2002a ; Rao et Ravishankar 2002 *In* Veena et Taylor, 2007). Cette propriété peut aider à surmonter la difficulté de l'enracinement de certaines espèces (Devi et Rani, 2002).

Néanmoins, la transformation par *A. rhizogeneses* présente une limite majeure est que la génération de plantes transgéniques par multiplication végétative demeure difficile (Makhzoum, 2007 ; Sbabou, 2010).

2.2. Les chevelus racinaires comme source de métabolites secondaires

Les divers avantages de la culture de chevelus racinaires par rapport à la culture de suspensions cellulaires incluent la stabilité génotypique et biochimique, la cytodifférentiation et la croissance dans un milieu sans hormones (Hu et Du., 2006; Srivastava et Srivastava, 2007). Ces facteurs jouent un rôle essentiel pendant la production de métabolites secondaires.

Les cultures de chevelus racinaires de nombreuses plantes ont été établis et ont montré une capacité biosynthétique de métabolites secondaires à peu près identique ou plus grande comparée aux plantes mère entières (Banerjee et *al.*, 1998; Srivastava et Srivastava, 2007).

3. Stratégies d'amélioration de la production de métabolites secondaires dans les chevelus racinaires

Pendant la dernière décennie, des progrès considérables ont été accomplis pour stimuler la formation et l'accumulation des métabolites secondaires en utilisant les cultures de chevelues racinaires. Dans les plantes, l'expression de beaucoup de voies de synthèse de ces métabolites est facilement altérée par des facteurs environnementaux tels que la disponibilité nutritive, les facteurs de stress, la lumière, et les régulateurs de croissance (Giri et Narasu, 2000). Ainsi, il n'est pas rare que la production de ces métabolites dans les chevelus racinaires soit également considérablement affectée par les conditions de culture (Kim et *al.*, 2002b). Plusieurs stratégies ont été adoptées pour l'augmentation du rendement en métabolites secondaires des chevelus racinaires:

3.1. Criblage et sélection de lignées racinaires de haute production

D'une façon générale, la première étape dans n'importe quelle tentative de produire une substance à partir des cultures *in vitro* de plantes est de choisir les lignées les plus productrices et de continuer ce procédé de choix pendant toutes les étapes suivantes d'optimisation (Georgiev et *al.*, 2007). En raison de l'aspect aléatoire concernant l'emplacement dans lequel le TDNA s'intègre dans le génome de la plante hôte, les cultures de chevelus racinaires résultantes souvent montrent des variations considérables dans les taux de croissance, les rendements en produit et les modèles d'accumulation des métabolites secondaires (Hu et Du 2006). En outre, bien que les cultures de racines transformées soient considérées comme stables (Jambe et Morgan, 1999), une certaine hétérogénéité a été trouvée dans ces racines, et la sélection répétée semble être importante pour obtenir des lignées racinaires stables et de haute productivité (Georgiev et *al.*, 2007).

Pour obtenir des lignées racinaires très productives, l'amélioration de la souche commence par le choix d'une plante mère avec une teneur élevée du produit désiré. Les différentes souches d'*A. rhizogenes* peuvent également affecter la transformation (De Jesus, 2003) et le rendement en métabolites.

A cet effet, la sélection de lignées cellulaires fortement productives a été pour longtemps une stratégie bien connue pour la production de métabolites secondaires par les cultures de cellules (Sevon et Oksman-Caldentay, 2002).

3.2. Amélioration du milieu de culture

Beaucoup de constituants des milieux de culture des chevelus racinaires sont des déterminants importants de la croissance et de la production de métabolites secondaires (Giri et Narassu, 2000; Sevon et Oksman-Caldentay, 2002; Georgiev et al., 2007; Bensaddek et al., 2008). Donc l'utilisation de milieux de culture modifiés est généralement exigée (Bensaddek et al., 2008). Des facteurs tels que la source de carbone et sa concentration, la concentration ionique du milieu, le pH du milieu, la lumière, les phytohormones, la température et l'inoculum sont connus pour influencer cette production (Sevon et Oksman-Caldentay, 2002; Bensaddek et al., 2008). La souche d'*A. rhizogenes* a également montré un effet important sur la productivité de biomasse et d'alcaloïdes des chevelues racinaires (Sevon et Oksman-Caldentay, 2002).

La modification des conditions de culture peut augmenter les taux de croissance et les rendements de biomasse des chevelues de *D. stramonium* L.. En effet, des ions de Cu^{2+} (Hilton et Wilson, 1995), de nitrate, de calcium et de phosphore améliorent la production en alcaloïdes tropaniques (Amdoun et al., 2009).

3.3. Elicitation

Les plantes produisent des métabolites secondaires dans la nature comme un mécanisme de défense contre l'attaque par les pathogènes, les ravageurs et les stress abiotiques (Croteau et al., 2000; He et al., 2002, Guillon et al., 2006). Les plantes donnent la même réponse quand provoquées par des composés d'origine pathogénique (éliciteurs) que quand provoquées par le pathogène lui-même (Pal Bais et al., 2001).

Les éliciteurs sont des signaux déclenchant la formation des métabolites secondaires (De Jesus, 2003). Ces éliciteurs sont classés sur la base de leur nature dans deux grandes catégories: éliciteurs abiotiques (facteurs physiques, minérales et chimiques), et éliciteurs biotiques qui sont des facteurs d'origine vivante (comme les polysaccharides dérivés des parois cellulaires) ou du pathogène (comme la chitine ou les glucanes) (Yoshikawa, 1978; Veersham, 2004; Namdeo, 2007).

3.4. Perméabilisation

Dans la plupart des cas, les produits constitués par les cultures de cellules des plantes sont stockés dans les vacuoles (Wink, 1997; Georgiev et al., 2007). Afin de les libérer des vacuoles, deux barrières membranaires ; la membrane plasmique et le tonoplaste ; doivent être perméabilisées (De Jesus, 2003). Des tentatives ont été faite afin de perméabiliser les cellules végétales transitoirement, pour maintenir la viabilité et la capacité de production des chevelus racinaires intacts (De Jesus, 2003). La perméabilisation des cellules dépend de la formation de pores dans un ou plusieurs endroits de la membrane cellulaire, permettant l'expulsion de diverses molécules hors de la cellule.

Une grande variété d'agents de perméabilisation est employée de nos jours (Sevon et Oksman-Caldentay, 2002; De Jesus, 2003). Parmi ces agents on trouve le Tween 20 (Boitel-Conti et al., 1996, Harfi, 2009), les solvants organiques tels que le dimethylsulfoxyde

(DMSO) (Sim et *al.*, 1994); les sels et les polysaccharides (De Jessus, 2003), ainsi que l'ultrasonication et l'électroporation (Rao et Ravinshankar, 2002 *In* De Jessus, 2003).

3.5. Polyploïdie artificielle

Manipuler le nombre de chromosomes (manipulation du ploïdie) des systèmes de chevelu racinaire *in vitro* peut également fournir des moyens efficaces pour augmenter la productivité en métabolites secondaires (Georgiev et *al.*, 2007). Souvent les plantes polyploïdes présentent un gigantisme des organes à cause du complément chromosomique plus élevé (Gao et *al.*, 1996). Ce phénomène peut aider à améliorer l'accumulation des composés bioactifs d'intérêt dans la cellule. Ceci fut le cas quand des autotétraploïdes artificiels ont été produits par traitement à la colchicine de *Vetiveria zizanioides* L. Nash. Les tétraploïdes étaient vigoureux avec des racines plus épaisses et plus longues, et le rendement en huile essentielle produite a été augmenté de 0,98% à 1,4% dans les racines des plantes tétraploïdes comparées au témoin diploïde (Lavania, 1988). De même, les racines d'une plante médicinale diploïde *Salvia miltiorrhiza*, contiennent des quantités plus élevées de tanshinones comme un résultat du traitement par colchicine dû au complément autotétraploïde des chromosomes (Gao et *al.*, 1996).

Matériels et méthodes

1. Induction de la polyploïdie par traitement des chevelus racinaires à la colchicine

1.1. Matériel végétal

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire des ressources génétique et biotechnologie (LRGB). La lignée de chevelu racinaire (HR) de *Datura stramonium* L. utilisée dans ce travail est sélectionnée puis multipliée pendant une année dans le milieu de Murashige et Skoog (MS) solide (contenant 30 g de sucre et de pH ajusté entre 5,6 à 5,8) (annexe 1). Cette lignée a été obtenue dans le cadre d'une autre étude par Mr. Harfi durant l'année 2010 en transformant les hypocotyles de l'espèce par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*.

La lignée de HR est régulièrement (toutes les trois semaines) transférée sur un milieu frais. Cette lignée est jugée performante du point de vue biomasse et production en hyoscyamine. Elle est caractérisée par un degré de ramification racinaire très élevé et une teneur moyenne en hyoscyamine de $5,201 \pm 0,141$ mg/g de M.S.. Une culture de cette lignée a été réalisée dans un milieu de culture B5 liquide (Gamborg et al., 1968) (annexe 2), où environ 0,5 g de poids frais sont cultivés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant environ 50 ml du milieu B5 liquide enrichi de 30 g/l de sucre du commerce et dont le pH est ajusté entre 5,6 à 5,8. Les cultures sont maintenues à l'obscurité sous agitation à 100 rpm à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

1.2. Induction de la polyploïdie dans les Hairy roots de *Datura stramonium*

Un essai factoriel a été conduit, pour cela des concentrations de 0,1% (2,5 mM) et 0,5% (12,5 mM) ont été préparées par l'ajout de la colchicine (Colchicine 96%, Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, Germany) dans le milieu de culture B5 liquide (pH 5,6 à 5,8 + 30 g/l de sucre). Ces solutions sont ensuite stérilisées à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Pour induire la polyploïdie nous avons suivi le protocole adopté par De Jesus-Gonzalez et Weathers (2003), sur des racines uniques d'environ 2 cm prélevées à partir des cultures en milieu liquide. Ces extrémités racinaires âgées de 15 jours sont placées dans des tubes à essai stériles contenant environ 10 ml de la solution de colchicine stérile puis incubées dans la chambre de culture à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 4, 7 et 11 jours (Figure 9). Après le traitement par la colchicine, les racines sont rincées 2 à 3 fois par une solution stérile de milieu B5 liquide pendant 3 à 4 minutes, séchées sur du papier filtre stérile, transférées dans un milieu B5 semi-solide (5g/l d'agar) puis incubées à 25°C dans l'obscurité pendant 30 jours. Le témoin diploïde a été préparé de la même manière que les racines traitées dans le milieu B5 mais sans colchicine. Les racines qui émergent de la racine principale ou les racines latérales sont examinées pour déterminer leur niveau de ploïdie.

Après traitement, le dénombrement chromosomique des racines ayant survécu au traitement à la colchicine s'ensuit en s'appuyant sur des observations cytologiques. Le tri des HRs polyploïdisés est indispensable car les chevelus ne sont pas tous polyploïdes, il existe même des HRs en chimère.

Les paramètres étudiés après les 30 jours de culture sont :

- Calcul du taux de survie qui représente le pourcentage des racines ayant survécu après le traitement à la colchicine;
- Détermination du niveau de ploïdie aussi bien pour les racines traitées que celles non traitées à la colchicine.



Figure 9: Illustration des chevelus racinaires en culture après un traitement à la colchicine (Gr. 1,25).

1.3. Taux de survie

Après un mois de cultures, le taux de survie (TS) des chevelus racinaires dans le milieu de culture B5 semi-solide, a été calculé pour chaque traitement selon la formule suivante:

$$\left[\text{Taux de survie} = \frac{\text{Nombre de racines ayant survécu}}{\text{Nombre de racines traitées}} \times 100 \right]$$

Sont considérées comme vivantes, toutes racines qui, après 30 jours de culture, continuent à se ramifier normalement et ne présentent aucun brunissement.

2. Détermination du niveau de ploïdie

Les chromosomes ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire (métaphase). Toutes les études cytogénétiques visent donc à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade. Pendant cette période chaque molécule d'ADN se condense et devient alors visible au microscope.

Différentes méthodes sont décrites pour l'étude des chromosomes. Elles mettent en jeu l'application d'agents chimiques pour le prétraitement, la fixation des cellules et la coloration de la chromatine en métaphase. Ces méthodes sont bien décrites dans le cahier des « Techniques de cytogénétique végétale » (Jahier et al., 1992).

Afin de déterminer le niveau de ploïdie des HRs traités à la colchicine et du HR témoin, nous avons procédé au comptage chromosomique. Pour ces comptages, une analyse cytogénétique a été faite sur des méristèmes racinaires riches en cellules en pleine activité mitotique. Avant d'induire la polyploïdie, des plaques métaphasiques du HR témoin sont examinées pour confirmer le nombre diploïde des chromosomes ($2n=2x=24$).

La préparation des tissus (pointes racinaires) pour les observations microscopiques passe par 6 phases principales:

2.1. Prétraitement

Il constitue l'étape clef de la cytogénétique et a pour objectif de bloquer les chromosomes en métaphase, pour cela deux agents mitoclasiques ont été utilisés :

- **la 8-hydroxyquinoléine** dont la solution est concentrée à 0,002M (annexe 3). Les extrémités des HRs de 2 cm en pleine croissance sont prélevées en fin d'après midi à partir des cultures de chevelus racinaires des différents traitements, puis traitées par cette solution sous une température de 4°C pendant une nuit.
- **la colchicine** dont la solution est concentrée à **0.05 % (annexe 3)**: Les apex des HRs sont prélevés préférentiellement le matin à 9h puis traités avec cette solution à la température ambiante pendant 1h, 1h30 et 1h45 pour déterminer le meilleur temps de prétraitement.

2.2. Fixation

L'étape de fixation sert à préserver la morphologie du tissu et à réduire au minimum la perte des acides nucléiques. De ce fait, les pointes de HRs ainsi traitées sont fixées soit dans une solution froide du Carnoy (3v : 1v, éthanol absolu 100% : acide acétique glacial) pendant 24 heures à une température de 16°C, soit dans de l'acide acétique 90% pendant 30 minutes à la température ambiante. Ce dernier traitement donne généralement les meilleurs résultats.

2.3. Conservation

Les échantillons préparés peuvent être conservés dans une solution d'éthanol 70% à 4°C pendant plusieurs mois.

2.4. Hydrolyse

L'acide chlorhydrique est utilisé pour provoquer l'hydrolyse des tissus qui a pour objectif de faciliter l'écrasement des extrémités racinaires et donne ultérieurement un bon étalement des cellules et une bonne dispersion des chromosomes entre lame et lamelle. En outre, l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose. L'hydrolyse a été réalisée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1N à 60°C pendant 9 à 10 minutes.

2.5. Coloration

Les pointes racinaires ainsi traitées sont immédiatement incubées dans le réactif de Schiff (solution de Feulgen) dans l'obscurité totale et à la température ambiante pendant 2 heures

maximum. Le principe de la réaction se base sur la propriété qu'ont les groupements aldéhydes, libérés lors de l'hydrolyse, de se réduire au contact de la fuchsine basique pour donner un complexe spécifique coloré en rouge violacé. Ceci rend visible les chromosomes au microscope photonique.

2.6. Observation

La zone méristématique est isolée et placée dans une lame propre puis pressée entre lame et lamelle avec une goutte de carmin acétique 1% (annexe 3). L'excès du carmin est éliminé puis la préparation est observée sous microscope photonique à faible grossissement (10X) pour repérer les cellules en métaphase. Le comptage des chromosomes se fait ensuite à un grossissement supérieur (40X). Pour l'établissement du caryotype, les photos sont prises à l'aide d'un microscope ZEISS Axio scope à un grossissement plus élevé (100X) sous immersion (par l'huile de cèdre). Le microscope est muni d'une camera Sony M35 permettant d'atteindre un grossissement de 2500 x. Pour chaque lignée de HR, au moins dix méristèmes ont été analysés.

3. Sélection des lignées racinaires polyploïdes

Les HRs ayant survécu aux différents traitements à la colchicine ont été multipliés puis étudiés sur le plan cytogénétique pour déterminer leur niveau de ploïdie. Les HRs qui présentent une bonne croissance et un nombre de chromosomes supérieur à celui des HRs témoins sont retenus. Les autres (un nombre de chromosomes correspondant à l'état diploïde, ou un mélange de niveau de ploïdie (mixoploïdes)) sont éliminés. Les HRs retenus sont utilisés pour étudier l'effet de la polyploïdisation et de l'élicitation sur la biomasse (poids sec) et sur la production en hyoscyamine.

4. Confirmation du niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN

4.1. Extraction de l'ADN

La détermination du nombre de chromosomes chez *Datura stramonium* est très difficile à cause de leur petite taille (1,5 à 4µm), c'est la raison pour laquelle, la détermination du niveau de ploïdie n'a pas été réalisée pour toutes les HRs ayant survécu au traitement à la colchicine. .

De plus après le dénombrement des chromosomes des HRs traités à la colchicine, seulement 3 lignées jugées polyploïdes ont été retenues pour confirmer leur niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN.

Pour quantifier l'ADN, l'extraction de celui-ci a consisté, dans un premier temps, à broyer 50 mg de HRs dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre homogène.

Puis l'ADN génomique des HRs a été extrait par le kit NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-

Nagel, Germany) tout en suivant le protocole du fabricant. Les principales étapes du protocole se résument comme suit :

- Lyse des cellules avec du PL2 (Lysis Buffer) qui consiste à ajouter 300 µl de PL2 à la poudre puis 10 µl de RNase A pour éliminer l'ARN et permettre la quantification de l'ADN génomique pure. Le mélange est incubé à 65°C pendant 10 minutes. Ensuite 75 µl du PL3 sont ajoutés puis ré-incubation dans de la glace pendant 5 minutes;
- Filtration et clarification du lysa par centrifugation du lysa brut pendant 5 min à 11000xg pour éliminer les polysaccharides, les contaminations et les débris cellulaires résiduels ;
- Ajustement des conditions de liaison de l'ADN par l'ajout, au filtra de centrifugation, de 450 µl du PC (Binding Buffer) tout en mixant les deux solutions ; pour créer des conditions de liaison optimale de l'ADN au "silica membrane" fourni avec le kit ;
- Liaison de l'ADN par filtration suivie d'une centrifugation pendant 1 minute à 11000xg ;
- Lavage et séchage du "Silica membrane" pour éliminer les contaminants, les protéines et les métabolites par l'ajout de 400 µl du PW1 (Wash Buffer) puis centrifugation à 11000xg pendant 1min suivie d'un ajout de 700 µl de PW2 suivie encore par une centrifugation à 11000xg pendant 1 min et enfin l'ajout de 200 µl du PW2 puis une autre centrifugation pendant 2 min à 11000xg ;
- Elution de l'ADN par un tampon d'élution PE (Elution Buffer) : on place le "Silica membrane" dans un tube de 1.5 ml puis on ajoute 50 µl du PE et on l'incube dans un bain marie à 70° C pendant 5 minutes puis on centrifuge les deux à 11000xg pendant 1min. On refait cette étape une autre fois dans le même tube avec toujours 50 µl de PE neuf.

Chaque résultat représente la moyenne de trois répétitions pour chaque lignée. La solution contenant l'ADN est conservée dans un réfrigérateur avant d'être quantifiée.

4.2. Quantification de l'ADN

Avant de quantifier l'ADN, une dilution de 30% de l'extrait brut doit être effectuée. Après la dilution on fait une lecture de la densité optique (DO) de la solution diluée contenant l'ADN à une longueur d'onde $\lambda=260$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un témoin (blanc sans ADN = eau distillée et PE) a servi pour l'étalonnage du spectrophotomètre. La quantité d'ADN (en ng/µl) est calculée par la formule suivante :

$$Q_{ADN} (ng / \mu l) = DO_{(260)} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

Q : quantité d'ADN en nanogramme par microlitre;

DO (260) : densité optique à une longueur d'onde $\lambda=260$;

50 : coefficient d'extinction de l'ADN (ng/µl) ;

Facteur de dilution : pourcentage de dilution de l'extrait brut de l'ADN, il est égal à 0.3.

5. Effet de l'élicitation sur la biomasse et le contenu en hyoscyamine des HRs polyploïdes

Après confirmation du niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN, seulement deux lignées de HRs jugées tétraploïdes (quantité d'ADN = double de celle du témoin ou un nombre chromosomique supérieur) ont été retenues pour le reste du travail à savoir la lignée L_{DSA} et la lignée L_{DSC}. Dans le but d'augmenter le contenu alcaloïdique des lignées racinaires obtenues, deux éliciteurs ont été utilisés à savoir l'acide salicylique (AS) et l'acide acétylsalicylique (AAS) à 10^{-4} M pendant 24 heures (cette concentration a été sélectionnée précédemment par Mr. Harfi pour son effet positif sur l'amélioration de la production en hyoscyamine), plus un témoin sans élicitation. Pour cela des erlenmeyers de 250 ml contenant environ 50 ml de milieu de culture B5 liquide (Gamborg et *al.*, 1968), de pH entre 5,6 et 5,8 ; additionné de 30 g/l de saccharose, ont été utilisés pour être inoculées par 3 extrémités de HRs d'environ 2 cm âgés de 20 jours.

Les paramètres mesurés, après 21 jours de culture, est le poids sec afin d'estimer l'effet des éliciteurs sur la biomasse des chevelus racinaires. Le poids sec est mesuré après séchage des HRs dans l'étuve à 65°C pendant 24 heures. La teneur en hyoscyamine est aussi quantifiée afin d'estimer l'effet de l'élicitation sur la production en hyoscyamine.

6. Extraction et dosage des alcaloïdes

6.1. Extraction des alcaloïdes

Pour l'extraction des alcaloïdes, nous avons adopté le protocole de Amdoun et *al.*, (2009) basé sur le principe que les alcaloïdes se comportent comme des sels dans une solution acide et comme des éléments organiques dans une solution basique. Les principales étapes de ce protocole sont :

- Broyage, à l'aide d'un mortier, d'environ 50 mg des chevelus racinaires dans un volume de 30 ml d'acide chlorhydrique (HCl) de 0,1N ;
- Agitation du mélange pendant 10 minutes suivi par une filtration à l'aide d'un papier filtre;
- Ajustement du pH à 10 par une solution d'ammoniac (NH₃) ;
- Epuisement des alcaloïdes contenus dans la phase aqueuse par addition du chloroforme (CHCl₃) à volume égal (v:v) suivi d'une agitation pendant 10 minutes;
- Ajout d'une quantité de sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) afin d'adsorber toutes les impuretés. La solution est ensuite filtrée et ne sera récupéré que le chloroforme contenant les alcaloïdes ;
- Evaporation partielle de la solution du chloroforme à l'aide du rotavapor à 80 °C ;
- Evaporation complète dans un bain marie réglé à 60°C jusqu'à séchage complet et l'obtention d'une tache au fond du tube (résidu sec).

6.2. Dosage de l'hyoscyamine

Le résidu sec obtenu précédemment est repris dans 2 ml de dichlorométhane (CH_2Cl_2); puis agité à l'aide d'un vortex. La solution obtenue est ensuite analysée par CPG (Chromatographie Phase Gazeuse), tout en injectant une quantité de $2\mu\text{l}$, pour identifier et quantifier les alcaloïdes des lignées racinaires étudiées. L'identification et la quantification des différents alcaloïdes contenus dans l'extrait sont effectuées en se basant sur les caractéristiques des chromatogrammes obtenus après l'injection (à savoir le temps de rétention et la surface du pic) par comparaison à la courbe d'étalonnage (figure 10): obtenue par les solutions standards de Scopolamine hydrochloride ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \cdot \text{HCL}$) et d'Atropine ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$) qui est un isomère racémique de l'hyoscyamine. Chaque résultat représente la moyenne de trois répétitions.

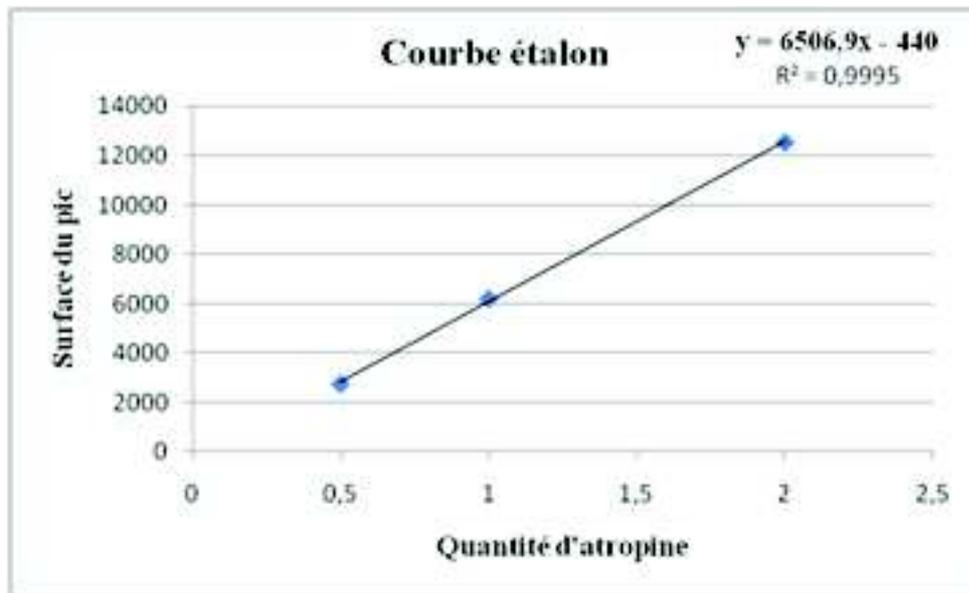


Figure 10 : Courbe obtenue avec la gamme étalon de l'atropine.

7. Analyse statistique

L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA1) et à deux facteurs (ANOVA2) ainsi que le test de Tukey (classification en groupes homogènes) au seuil de 5% sont utilisés pour traiter les résultats obtenus à l'aide du logiciel SPSS version 10.0.

Les graphes et les coefficients de corrélation sont obtenus à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les moyennes suivies de la même (ou les mêmes) lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes.

Résultats et interprétation

1. Effets du traitement à la colchicine des chevelus racinaires

1.1. Survie et croissance des chevelus racinaires traités par la colchicine

Les effets de l'exposition aux concentrations variables en colchicine pour différentes durées sur la croissance des HRs de *Datura stramonium* L. ont été évalués un mois après le traitement.

Les résultats obtenus (Tableau 1 et figure 11) montrent que le taux de survie des chevelus racinaires traités dépend de la concentration de la colchicine utilisée et de la durée d'exposition. Le taux de survie des HRs diminue sensiblement avec l'augmentation de la concentration de la colchicine et de la durée du traitement.

Le taux de survie en absence de colchicine varie entre 90% et 100%, et ce, quelle que soit la durée du passage dans le milieu de culture (figure 11).

Cependant, en présence de colchicine à la concentration de 0.1%, on note une nette diminution du taux de survie avec l'augmentation du temps d'exposition. IL passe de 93.3 % pour une durée d'exposition de 4 jours à 76.6% pour une durée de 7 jours pour atteindre 60% pour une durée de 11 jours (figure 11).

En présence de 0.5% de colchicine, la dégradation du taux de survie suit la même tendance pour passer de 86.6% en 4 jours de traitements à 63.3% après 7 jours et 30% après 11 jours d'exposition (figure 11).

Par ailleurs, si l'on compare l'effet des différentes concentrations de colchicine pour la même durée d'exposition, on s'aperçoit que pour 4 jours d'exposition les concentrations de 0.1% et 0.5% entraînent respectivement une perte de viabilité de HRs de 6.7% et 13.3%. Pour une exposition de 7 jours, ces mêmes concentrations de colchicine entraînent respectivement une perte de viabilité de 13.3 % et 23.7%. Cependant, pour la durée de 11 jours d'exposition, les deux concentrations de colchicine entraînent respectivement 60 et 30% de survie des HRs (figure 11).

Les racines ayant survécu au traitement à la colchicine ont été reprises et multipliées dans un milieu MS solide neuf (20 g de sucre, pH entre 5,6 à 5,8) avant d'être utilisées pour déterminer leur niveau de ploïdie.

Tableau 1: Effet de la concentration en colchicine et de la durée du traitement sur le nombre de racines ayant survécu et sur le taux de survie des HRs de *Datura stramonium* L.

Concentration de la colchicine (%)	Durée d'exposition (j)	Nombre de racines survécues ^a	Taux de survie (%) ^{bc}
0	4	30	100
0	7	27	90
0	11	27	90
0,1	4	28	93,3
0,1	7	23	76,7
0,1	11	18	60
0,5	4	26	86,7
0,5	7	19	63,3
0,5	11	9	30

a = racines qui ne brunissent pas et qui forment des racines latérales.

b = taux de survie (%)

c = enregistré après un mois de culture.

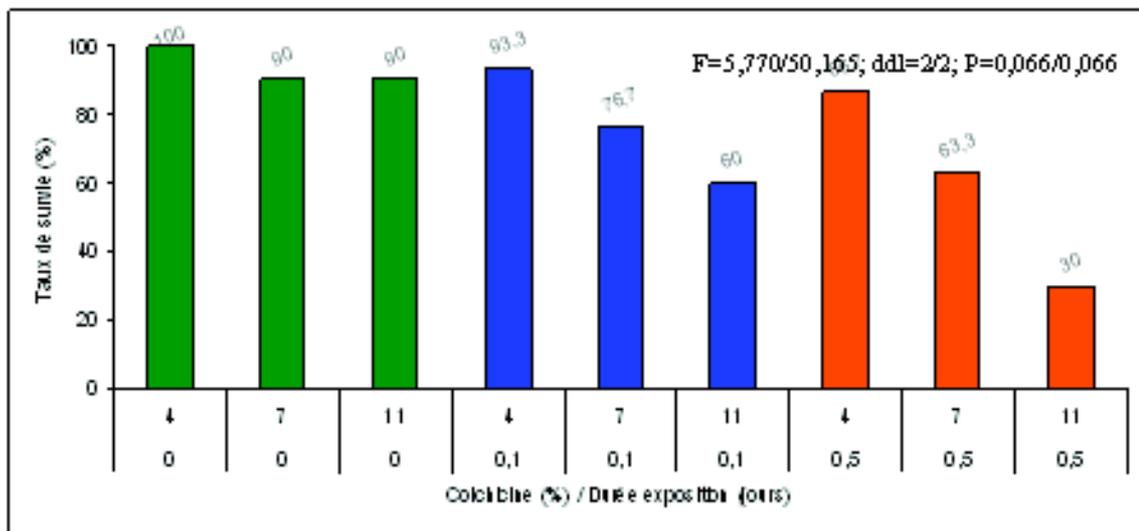


Figure 11 : Effet de la concentration en colchicine et de la durée du traitement sur le taux de survie des HRs de *Datura stramonium* L.

2. Détermination du niveau de ploïdie par le comptage du nombre de chromosomes

Les *Daturas* ont fait l'objet de nombreuses recherches fondamentales en caryologie, mettant en évidence la taille très réduite des chromosomes ainsi que la variabilité du nombre chromosomique intra et inter populations.

Dans le cadre du présent travail, nous n'avons étudié qu'une partie des lignées de HRs obtenues à cause de la difficulté d'observer les chromosomes sur les pointes de HRs. C'est un travail délicat qui demande beaucoup de temps.

- Mise au point de la technique de coloration des cellules mitotiques

L'obtention de bonnes plaques métaphasiques est la première condition pour une bonne observation des chromosomes permettant un comptage aisé des chromosomes. A cet effet deux agents mitoclasiques (Tableau 2) ont été testés à savoir la 8-hydroxy-quinoléine et la colchicine à 0.05% pendant différentes durées de contact.

Prétraitement	Durée	Résultats
8 hydroxy-Quinoleine	Une nuit à 4°C	Assez bon étalement des chromosomes avec une bonne individualisation.
Colchicine à 0.05 %	1h à la température ambiante	Plaques métaphasiques de mauvaise qualité, chromosomes assez contractés et mal dispersés en métaphase.
	1h30 à la température ambiante	Bonnes plaques métaphasiques, chromosomes plus décontractés (longs chromosomes) et assez bien visibles.
	1h45 à la température ambiante	Cellules presque toutes en division, chromosomes contractés de nouveau.

Tableau 2 : Effet du prétraitement des HRs sur la morphologie et sur la qualité des plaques métaphasiques.

Les conditions plus ou moins optimales d'obtention des plaques métaphasiques ont été celles avec le prétraitement à la 8-hydroxy-quinoleine qui a permis d'avoir beaucoup de plaques métaphasiques d'une assez bonne qualité. Cependant, la colchicine à 0.05 % ne semble pas être un très bon agent pour le prétraitement de notre matériel sauf pour la durée de 1h30.

Comptage chromosomique

L'analyse cytologique des extrémités racinaires de la lignée parentale de HRs LD_S à partir d'une dizaine de plaques métaphasiques a révélé que cette lignée est diploïde. Son nombre chromosomique est de 24, c'est-à-dire 12 paires de chromosomes $2n=2x=24$ chromosomes ($x=12$ = nombre de base) (Figure 12.1).

En raison de la petite taille des chromosomes et de la basse fréquence des cellules en métaphase dans les extrémités des HRs de *Datura stramonium* L., le comptage du nombre de chromosomes a été difficile. C'est la raison pour laquelle, un nombre limité de HRs ayant survécu au traitement à la colchicine a fait l'objet d'une étude cytogénétique (faute de temps).

L'étude caryologique de quelques lignées colchipoïdes montre une variation du niveau de ploïdie. Le nombre de chromosomes de ces lignées s'est toujours montré supérieur au nombre de 24, mais il reste difficile à définir avec précision. En outre, un nombre important de mixoploïdes a été obtenu chez les lignées racinaires traitées aux concentrations de 0.1 et 0.5 % de colchicine, et ce, pour toutes les durées de contact. Cependant un certain nombre de HRs traités à la colchicine est resté à l'état diploïde sans changement du nombre de chromosomes. Par ailleurs, certaines lignées de HRs se sont avérées après comptage

chromosomique des tétraploïdes. Celles-ci ont été obtenues avec le traitement par 0,5% de colchicine et pour les durées de 7 jours mais surtout à la durée d'exposition de 11 jours.

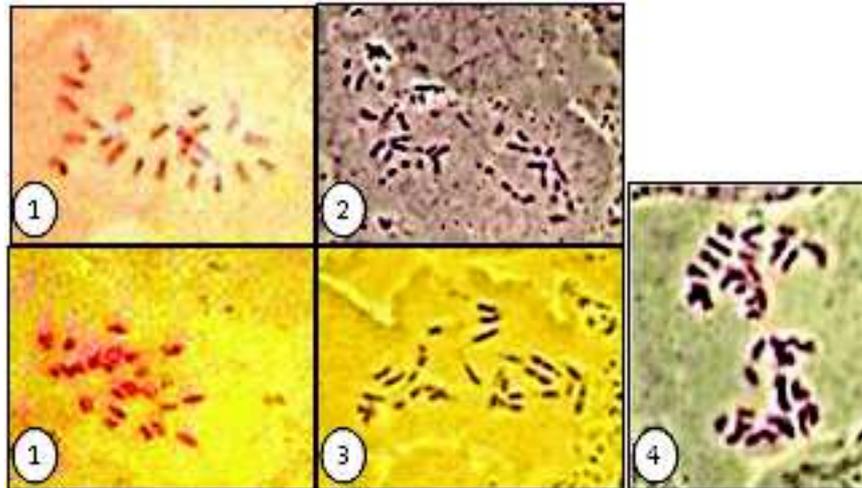


Figure 12 : Plaques métaphasiques des lignées racinaires sélectionnées (1: LDS, 2: LDSA, 3: LDSB, 4: LDSC). (Gr = 1500)

3. Sélection des lignées racinaires performantes

La sélection des lignées racinaires performantes a été faite d'abord sur la base de leur niveau de ploïdie puis sur celle de leur phénotype (vigueur et ramification). Les lignées de HRs restées à l'état diploïde ou qui sont mixoploïdes n'ont pas été sélectionnées pour l'étude de la biomasse et de la teneur en hyoscyamine. De même les lignées qui présentent une faible croissance (faible ramification et faible croissance) sont éliminées.

De l'ensemble des lignées racinaires jugées tétraploïdes, seules trois lignées sont sélectionnées d'abord pour confirmer leur niveau de ploïdie puis pour être utilisées ultérieurement dans l'étude de l'effet de la polyploïdisation et de l'élicitation sur la biomasse et la teneur en hyoscyamine. Les lignées sont obtenues avec le traitement à 0.5 % de colchicine, cependant, l'une avec la durée d'exposition de 4 jours (LDSB) et les 2 autres à la durée de 11 jours (LDSA et LDSC) (Figure 12. 2, 3 et 4).

La culture des lignées ainsi sélectionnées conduite dans le milieu B5 liquide pendant 20 jours n'a révélé aucune différence morphologique entre la lignée diploïde et les 3 lignées jugées tétraploïdes (Figure 13).

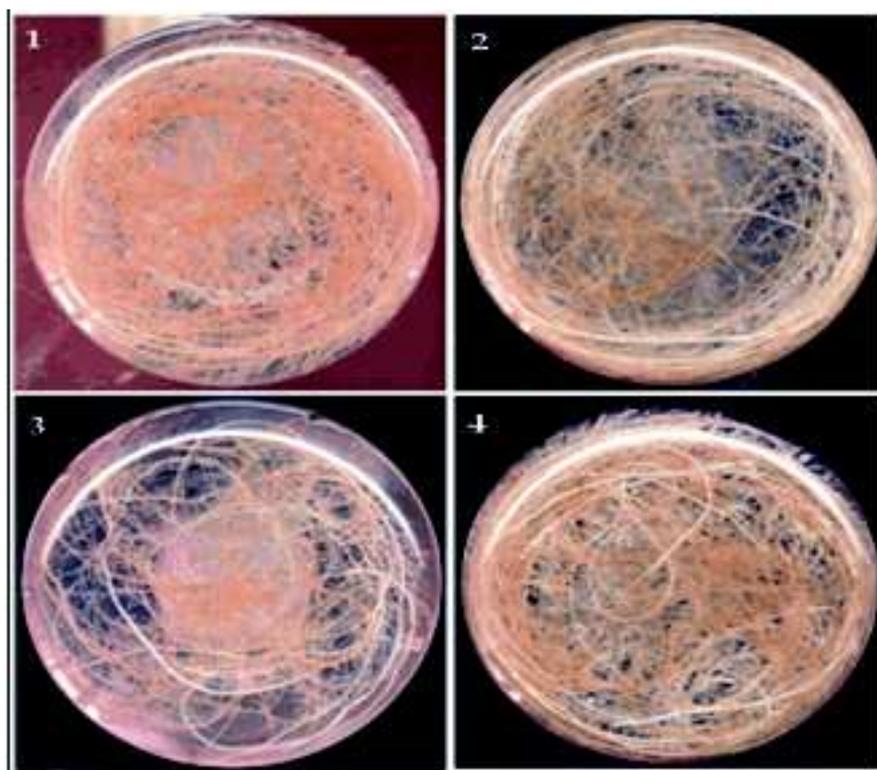


Figure 13 : Morphologie des lignées sélectionnées après 20 jours de culture dans le milieu B5 liquide (1 : L_{DS} = témoin, 2 : L_{DSA} , 3 : L_{DSB} , 4 : L_{DSC}). ($Gr = 0,61$)

4. Confirmation du niveau de ploïdie par la quantification de l'ADN

Après l'extraction de l'AND des HRs des 4 lignées sélectionnées précédemment, une quantification à l'aide d'un spectrophotomètre a été effectuée selon la méthodologie décrite dans matériel et méthodes. Les résultats de la densité optique ainsi que de la quantité de l'ADN (ng/ μ l) correspondante sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Densité optique et quantité d'ADN des 4 lignées de HRs sélectionnées.

Lignée	DO à 260 nm	Quantité d'ADN (ng/ μ l)
Lignée L_{DS} Lignée L_{DSA} Lignée L_{DSB} Lignée L_{DSC}	0,009 0,0186 0,014 0,019	0,14 (A) 0,28 (B) 0,22 (AB) 0,29 (B)

Les lettres (A et B) correspondent aux groupes homogènes obtenus par le test de Tukey.

Les résultats de la quantification de l'ADN montrent que la quantité d'ADN est plus élevée chez les lignées polyploïdes, ce qui confirme leur polyploïdisation par le traitement à la colchicine. Une augmentation de 57% de cette quantité a été observée chez la L_{DSB}

par rapport à la lignée diploïde (L_{DS}), alors qu'une augmentation de 107% et de 100% est enregistrée respectivement chez la L_{DSC} et la L_{DSA} . Ce qui correspond à un dédoublement de la quantité d'ADN chez ces deux dernières lignées comparées à la lignée diploïde.

Une telle augmentation de la quantité d'ADN montre qu'il y a eu aussi un dédoublement du génome et donc il confirme l'étude cytogénétique c'est-à-dire qu'il y a eu une obtention de lignées tétraploïdes (L_{DSA} et L_{DSC}). Pour la L_{DSB} , l'augmentation de la quantité d'ADN n'a été que de 60%, cette lignée ne serait pas vraiment tétraploïde. Elle est éliminée à son tour dans la suite du travail.

En effet, l'analyse de la variance à un facteur (annexe 4) a révélé un effet très hautement significatif de la lignée de HRs sur la quantité d'ADN obtenue. La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey révèle la présence de deux groupes homogènes chevauchants (**A** : L_{DSC} et L_{DSA} ; **B** : L_{DS} ; **AB** : L_{DSB}).

Les lignées de HRs L_{DSC} et L_{DSA} sont donc confirmées comme des tétraploïdes. Elles ont été multipliées en même temps que la lignée L_{DS} pour l'étape suivante : étude de l'effet de la polyploïdisation et de l'élicitation sur la biomasse (poids sec) et sur la teneur en hyoscyamine. La L_{DSB} a été éliminée définitivement éliminée, elle pourrait correspondre à une lignée de type mixoploïde.

5. Effet de la polyploïdisation sur la biomasse (poids sec) et la teneur en hyoscyamine

Les lignées sélectionnées après l'étude cytogénétique et la quantification de l'ADN sont : la lignée témoin (L_{DS}) qui est la lignée diploïde et les deux lignées tétraploïdes (L_{DSA} et L_{DSC}). Elles sont cultivées dans un milieu B5 liquide pendant 20 jours puis sont récoltées pour déterminer l'effet de la polyploïdisation sur la biomasse (le poids sec) et la teneur en hyoscyamine (Tableau 4).

Les résultats obtenus montrent que le poids sec varie en fonction du niveau de ploïdie de la lignée. Le poids sec de la lignée diploïde (L_{DS}) est de 0,2078g alors qu'une augmentation du poids sec a été enregistrée chez les lignées tétraploïdes en comparaison à la lignée diploïde. Les niveaux d'amélioration de la biomasse sont de l'ordre de 22% et 12% respectivement pour les lignées L_{DSA} et L_{DSC} . Une différence dans le poids sec est aussi observée entre les lignées tétraploïdes.

Les teneurs moyennes en hyoscyamine des 3 lignées de HRs varient aussi en fonction du niveau de ploïdie. Une teneur en hyoscyamine de 4,378 mg/g de M.S. a été enregistrée chez la lignée diploïde alors que chez les lignées tétraploïdes les teneurs en hyoscyamine sont supérieures. Ces teneurs sont de 5,516 et 9,068 mg/g de M.S. respectivement pour les lignées L_{DSA} et L_{DSC} , soit une amélioration de 26 % et 106% respectivement pour ces deux dernières lignées.

L'analyse de la variance à un facteur (annexe 5) n'a révélé aucun effet de la polyploïdisation sur le poids sec alors qu'un effet hautement significatif a été obtenu pour

le contenu en hyoscyamine et le test de Tukey montre ainsi deux groupes homogènes chevauchants (**A** : L_{DSC} ; **B** : L_{DS} ; **AB** : L_{DSA}).

Lignée	Poids sec (g)	Teneur en Hyoscyamine (mg/g M.S.)	Taux d'amélioration par rapport au témoin (%)
L _{DS}	0,2078	4,406±0,418 (A)	--
L _{DSA}	0,2535	5,547±0,480 (AB)	26 %
L _{DS c}	0,23335	9,075±0,47 (B)	106 %

Tableau 4 : Effet de la polyploïdisation sur la biomasse et la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura stramonium* L..

Les lettres (A et B) correspondent aux groupes homogènes obtenus par le test de Tukey.

6. Effet des éliciteurs sur de la biomasse et sur la teneur en hyoscyamine des HRs

Les lignées précédemment sélectionnées ont fait l'objet d'un essai d'élicitation par l'Acide salicylique (AS) et l'Acide acétylsalicylique (AAS). Pour cela les chevelus racinaires sont cultivés pendant 21 jours en milieu liquide B5 (Gomborg, 1968). L'élicitation a été réalisée sur ces chevelus pendant 24 heures avant la récolte à la concentration de 10^{-4} M des deux éliciteurs. Les résultats de l'élicitation par les deux éliciteurs sur le poids sec et la teneur moyenne en hyoscyamine des trois lignées racinaires sélectionnées sont regroupés dans le tableau 5.

Lignée	Éliciteur	Poids sec (g)	Teneur en hyoscyamine (mg/g MS)
L _{DS}	SE	0,2078 ^B	4,406±0,418 ^{B/c}
	AS	0,20935 ^B	7,697±0,846 ^{B/a}
	AAS	0,19495^B	6,330±0,317 ^{B/b}
L _{DSA}	SE	0,2535 ^A	5,547±0,480 ^{AB/c}
	AS	0,3005^A	8,046±0,885 ^{AB/a}
	AAS	0,2334 ^A	5,977±0,139 ^{AB/b}
L _{DS c}	SE	0,23335 ^{AB}	9,075±0,47 ^{A/c}
	AS	0,23485 ^{AB}	12,315±0,866 ^{A/a}
	AAS	0,2302 ^{AB}	11,309±0,135 ^{A/b}

Tableau 5 : Effet de l'élicitation sur la biomasse (poids sec) et la teneur en hyoscyamine.

Les lettres (A et B) et (a,b et c) correspondent aux groupes homogènes obtenus par le test de Tukey.

SE : Sans élicitation ; AS : Acide salicylique ; AAS : Acide acétylsalicylique.

6.1. Effet de l'élicitation sur la biomasse

Les résultats obtenus montrent que le poids sec varie en fonction de l'éliciteur ce qui signifie que l'élicitation a un effet sur la croissance des lignées racinaires. La lignée LDSA semble être celle qui se développe le mieux en terme de poids sec, et ce, quel que soit l'éliciteur appliqué. Par ailleurs, l'Acide acétylsalicylique (AAS) exerce un effet inhibiteur sur la croissance des chevelus racinaires du fait qu'il entraîne une légère diminution de la biomasse par rapport au témoin sans élicitation (SE) de chaque lignée de HRs (Figure 14). Par contre l'Acide salicylique entraîne une légère augmentation du poids sec. Ainsi le poids sec moyen varie de 0,19495 g (le résultat le plus faible) obtenu par le traitement de la lignée diploïde (LDS) par de l'AAS à 0,3005 g (le résultat le plus élevé) obtenu par le traitement de la lignée LDSA par de l'AS. De plus, pour cette dernière lignée, caractérisée par les poids secs les plus élevés, l'AAS entraîne une diminution du poids sec de 7,92% par rapport au témoin (SE) de cette même lignée alors que l'AS entraîne une augmentation de 18,55% par rapport au témoin non élicité toujours de cette même lignée.

Par ailleurs, l'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2) révèle un effet significatif de la lignée et un effet non significatif de l'éliciteur. L'ANOVA2 n'a pas non plus montré d'effet d'interaction entre les deux facteurs sur le poids sec. Le test de Tukey montre deux groupes homogènes chevauchants pour la lignée (**A** : LDSA ; **B** : LDS ; **AB** : LDSC) (annexe 6).

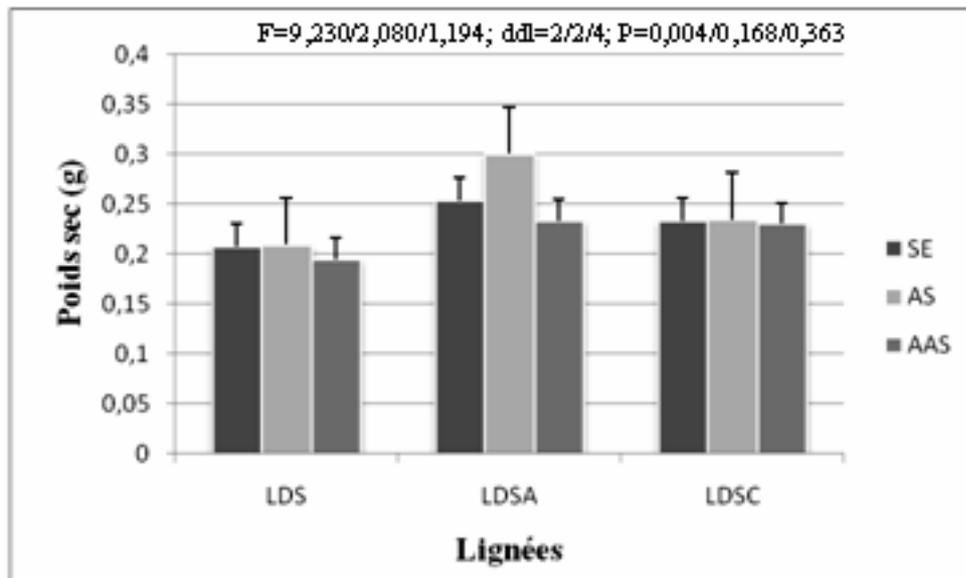


Figure 14 : Effet des éliciteurs sur la biomasse (poids sec) des lignées de chevelus racinaires.

6.2. Effet de l'élicitation sur la teneur en hyoscyamine

Les teneurs en hyoscyamine des différentes lignées varient en fonction des traitements. Contrairement à la biomasse, la teneur en hyoscyamine la plus importante est obtenue avec la lignée LDSC traitée par l'Acide salicylique. Les teneurs moyennes varient de 4.406 mg/g de M.S. à 12.315 mg/g de M.S. respectivement pour la lignée diploïde (LDS) non élicitée et pour la lignée LDSC traitée avec l'AS (Figure 15).

En effet, la lignée diploïde (LDS) produit 4.406 mg/g de M.S. sans élicitation, 6.330 et 7.697 mg /g de M.S. respectivement après l'élicitation avec AAS et AS. Cependant, pour la lignée LDSA, la teneur moyenne en hyoscyamine passe de 5.547 mg/g de M.S. sans élicitation à 8.046 et 5.977 mg/g de M.S. après élicitation par l'AS et l'AAS respectivement. En outre la lignée LDSC, produit 9.075 mg/g de M.S. sans élicitation contre 12.315 et 11.309 mg/g de M.S. en présence des 2 éliciteurs respectivement AS et AAS (Figure 15).

L'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 6) a révélé un effet très hautement significatif de la lignée et de l'éliciteur. Aucun effet d'interaction entre ces deux facteurs sur la teneur en hyoscyamine n'a été observé.

La comparaison des moyennes par le test de Tukey montre deux groupes homogènes chevauchants concernant la lignée quel que soit l'éliciteur (**A** : LDSC ; **B** : LDS ; **AB** : LDSA) et trois groupes homogènes concernant l'éliciteur quelle que soit la lignée du HRS (**a** : AS ; **b** : AAS ; **c** : SE) (tableau 5).

Par ailleurs, une corrélation positive et significative entre la quantité d'ADN et la teneur en hyoscyamine des trois lignées a été enregistrée ($R=0,731$). Ce résultat indique que le niveau de ploïdie joue un rôle certain sur la teneur en hyoscyamine.

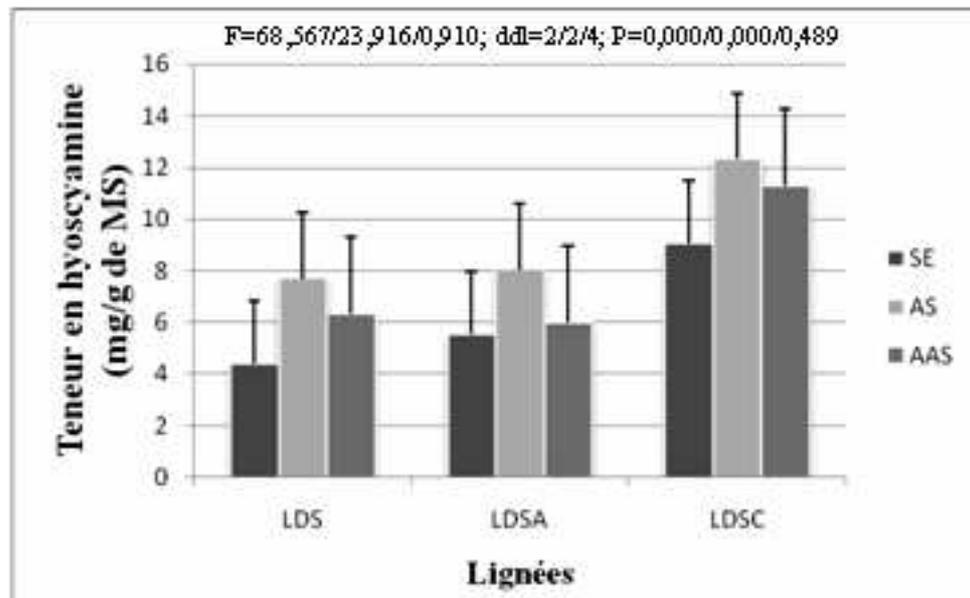


Figure 15 : Effet des éliciteurs sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires.

6.3. Taux d'amélioration de la teneur en hyoscyamine

Les deux éliciteurs présentent des effets nets sur la production en hyoscyamine pour toutes les lignées. En effet, et d'une manière générale et par rapport aux témoins non élicités, l'AS semble plus efficace que l'AAS (figure 16). En effet, pour la lignée diploïde LDS, l'AS a engendré une amélioration de 74,7%, alors que l'AAS n'a enregistré qu'une amélioration de 43,66%. Pour la lignée LDSA, l'AS a amélioré la teneur en hyoscyamine de 45.1% tandis que l'AAS n'a augmenté cette teneur que de 7.8%. Pour la lignée LDSC, l'AS a entraîné une amélioration de la teneur en hyoscyamine de 106% alors que l'AAS n'a amélioré cette teneur que de 24,6%.

Par ailleurs, si on compare les résultats obtenus avec le témoin LDS non élicité, on s'aperçoit que les niveaux d'amélioration sont nettement plus élevés avec une nette dominance de l'AS par rapport à l'AAS (figure17).

On remarque en effet, que la lignée LDSA présente des taux d'amélioration intéressants qui sont de 25.9%, 82.6% et 35.7% en comparaison avec la lignée LDS témoin (diploïde non élicitée). De même pour la lignée LDSC, on note des niveaux d'amélioration encore plus élevés qui sont de 106%, 179.5% et 156.7% (figure 17).

Ces derniers résultats montrent bien l'effet conjugué de la polyploïdisation et de l'élicitation sur l'amélioration de la teneur en hyoscyamine chez les HRs de *Datura stramonium*.

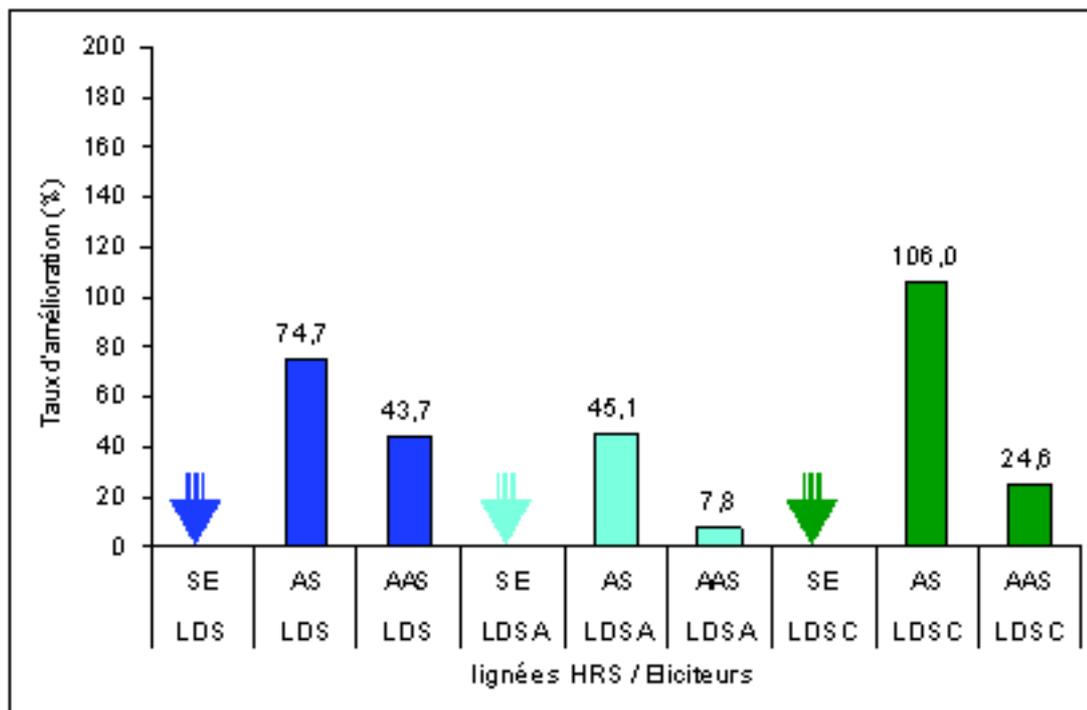


Figure 16 : Taux d'amélioration induits par l'élicitation au sein de chaque lignée HRs (les flèches indiquent la valeur du témoin ayant servi au calcul du taux d'amélioration).

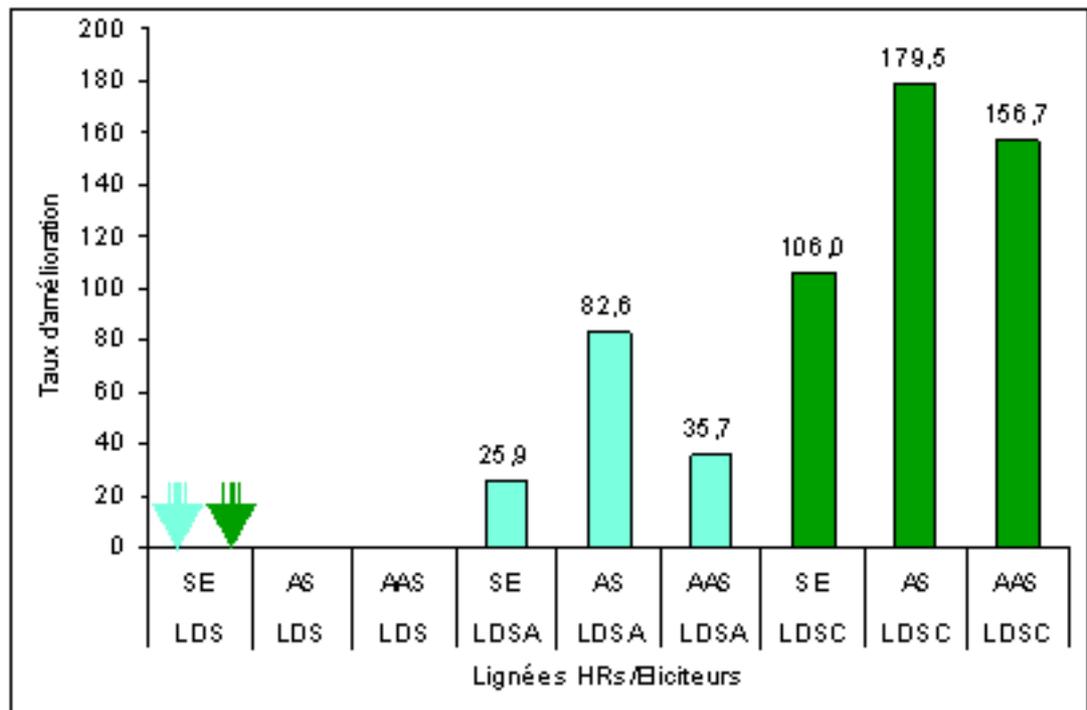


Figure 17 : Taux d'amélioration induit par l'élicitation et la polyploïdisation par rapport à la lignée HRs L_{DS} non élicitée (les flèches indiquent la valeur du témoin ayant servi au calcul du taux d'amélioration).

Discussion

Les plantes polyploïdes ont joué un rôle important en agriculture (Lewis, 1980). Pour les plantes médicinales, les polyploïdes sont habituellement plus valables parce qu'ils montrent une biomasse ou une teneur en composés d'intérêt plus élevés (Gao et al., 1996).

Survie et croissance des HRs traités par colchicine

L'un des indices les plus importants pour l'évaluation de l'impact des traitements de polyploïdisation est le taux de régénération du matériel traité (Stanys et al., 2006). L'inhibition de la croissance des plantes et la mortalité occasionnelle sont un phénomène connu chez les autotétraploïdes induits (Saeed et al., 2006). A cet effet, la définition précise de la concentration de la colchicine est cruciale pour le succès de l'induction *in vitro* de la polyploïdie (Zhang et al., 2008).

Nos résultats après 30 jours de culture, ont permis de trouver un compromis entre la concentration de la colchicine et la durée de traitement pour assurer un taux acceptable de survie des HRs. A cet effet, plus la concentration augmente plus le taux de survie des lignées racinaires diminue, ceci est aussi valable pour le temps de contact de la colchicine. La relation inverse entre la concentration en colchicine et la survie des explants a déjà été signalée pour d'autres espèces *in vivo* (Dwivedi et al., 1986; Sikdar et Jolly, 1994) et *in vitro* (van Duren et al., 1996 ; Chakraborti et al., 1998 ; Yang et al., 2006 ; Sun et al., 2009).

Le traitement des graines de deux variétés de coton (*Gossypium arboreum*) par une solution de 0,5% de colchicine pendant 24 h inhibe la germination de 17 et 28%, par rapport aux témoins respectivement pour les variétés PM₂ et PM₃ (Wongpiyasatid et al., 2003). Cependant, l'application pendant 3 jours successifs, sur le méristème apical des jeunes plantules d'une plante appelée tête de dragon (*Dracocophalum sp.*) avec une solution de colchicine concentrée à 0.1 et 0.5% a donné des taux de survie de 45 et 39% respectivement (Omidbaigi et al. 2010a). Ces mêmes conditions de traitement ont donné des taux de 53% et 21% respectivement après le traitement du basilic (*Ocimum basilicum*) (Omidbaigi et al., 2010b). Ces auteurs rapportent que sur les 5 concentrations de colchicine appliqués, 0.1 et 0.5% semblent être les plus efficaces pour la production des tétraploïdes.

Des résultats similaires ont aussi été obtenus par le traitement des segments basaux de chaumes de *Juncus effusus* L. par ces deux concentrations de colchicine (0,1% et 0,5%) pendant 6, 12 et 24h. Des taux de survie de 80, 60.63 et 50% ont été obtenus avec la concentration de 0,1% pendant respectivement 6, 12 et 24 h alors que pour ces mêmes durées mais à une concentration de 0,5% ce taux a été beaucoup plus faible 41.67, 26.79 et 19.08% (Xu et al., 2010). Cette dernière concentration (0.5%) a montré une variation significative du taux de survie chez 38 populations tunisiennes de fenugrec utilisées pour l'induction de la polyploïdie. Un taux moyen de 82% a été obtenu pour les populations traitées par la colchicine comparé au témoin qui présentait 100% de survie (Marzougui et al., 2011).

Chez les jeunes plantes du Lilas des Indes (*Lagerstroemia indica* L.), la solution de 0,5% de colchicine pendant 96h donne un taux de mortalité de 4,17%. Ce faible taux a été expliqué par l'application localisée de l'agent antiméiotique qui réduit les effets négatifs de la colchicine sur le développement global de la plante, et de ce fait, augmente le taux de survie

des jeunes plantes (Ye et al., 2010). Alors que les plantes de ginger (*Zingiber officinale*) ont présenté un taux de mortalité supérieur à 89% lorsqu'elles sont traitées pendant 2h à une concentration de colchicine de 0.5% comparé à 3% chez le témoin (Smith et al., 2004). Chez le bananier traité dans les mêmes conditions un taux de mortalité de 48% est enregistré (Hamill et al., 1992). Par ailleurs, l'utilisation de la colchicine à la concentration de 0.1% pour l'induction de la polyploidie sur les bourgeons apicaux de *Dioscorea* donne des taux de mortalité de 16.7, 20.8 et 33.3% respectivement pendant 24, 36 et 48h (Zhang et al., 2010). Cette concentration entraîne aussi des taux de mortalité de l'ordre de 37.5% mais pendant 60h chez *Astragalus membranaceus* (Chen et Gao, 2007) et 43% chez *Eucalyptus globulus* (Lin et al., 2010).

Des effets semblables de la dose et du temps de traitement à la colchicine sur l'inhibition de la croissance et la survie du matériel de base utilisé ont été aussi rapportés par d'autres auteurs en traitant des cals de *Citrus* (Wu et Mooney, 2002), de *Gossypium arboreum* (Saeed et al., 2006) et de *Pseudostellaria heterophylla* (Ye et al., 2009). Le traitement de cette dernière espèce par la colchicine pendant 4 et 6 jours a entraîné une mortalité de 6.7% et 43,3% respectivement, alors qu'aucun cal n'a survécu après 8 jours de traitement. Chez *Paulownia tomentosa* et *Alocasia micholitziana*, une solution de 0.1% pendant 3 jours conduit à une mortalité complète des cals (Tang et al., 2010).

Ce taux de mortalité qui augmente avec l'augmentation de la concentration peut être dû à la phytotoxicité de la colchicine.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par les différents auteurs notamment ceux de Marzougui et al. (2011) pour la concentration de 0.5% avec 86,66% de survie et ceux obtenus par Xu et al. (2010) avec 0.1% avec un taux de survie de 60 à 93,33%. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus par De Jesus-Gonzalez et Weathers (2003) où environ 25% des HRs d'*Artemisia annua* traités meurent, indépendamment de la concentration utilisée.

· Détermination du niveau de ploïdie par étude cytogénétique

Selon Azhar et Mohd-Nazir (1991), la technique de prétraitement avec la 8-hydroxy-quinoléine donne des chromosomes plus condensés et par conséquent peut augmenter leur visibilité. Cependant, cette technique est très laborieuse et son utilisation pour le criblage des polyplodes reste limitée (van Duren et al., 1996).

Le niveau de ploïdie peut être détecté par un comptage chromosomique conventionnel (Brutovská et al. 1998). Bien que, cette technique soit laborieuse aussi et demande beaucoup de temps, particulièrement quand le nombre d'individus à analyser est grand (Roux et al. 2003), elle est plus précise car elle permet d'identifier les mixoploïdes et d'établir le caryotype de l'espèce étudiée. Le comptage chromosomique est la méthode la plus réaliste parce qu'elle détermine le nombre exacte de chromosomes (Dolezel et al., 2007).

L'examen cytologique des extrémités racinaires de notre lignée parentale L_{DS} a été vérifié en tant que diploïde avec 24 chromosomes comme précédemment déterminé par d'autres auteurs qui ont étudié cytogénétiquement *Datura stramonium* L. Aird et al., (1988), Baíza et al., (1999) et Berkov et al. (2003) rapportent que l'analyse cytogénétique des lignées de HRs de *D. stramonium* L. montre qu'elles possèdent un nombre de chromosomes euploïde de $2n=2x=24$.

Le nombre élevé des mixoploïdes trouvé dans nos plaques métaphasiques dans les mêmes conditions de traitement pourrait être dû à l'état des cellules qui seraient responsables de l'initiation de nouvelles racines. Bien qu'un certain nombre de cellules

dans le tissu méristématique puisse passer à l'état polyploïde, beaucoup d'autres peuvent rester diploïde. Ainsi, il était possible de trouver des zones où des cellules normales et polyploïdisées étaient entremêlées (Dermen et Henry, 1944; Pryor et Frazier, 1968; Wan et al., 1989).

- Confirmation du niveau de ploïdie par l'extraction de l'ADN

Biradar et al. (1993) indiquent que les quantités nucléaires d'ADN changent dans les tissus somatiques à cause de l'endoréplication conduisant à la formation de noyaux polyploïdes.

L'autoploïdie induit différents effets chez les organismes. L'un des effets remarquable reste l'augmentation de la quantité de chromatine présente dans les noyaux du fait de la multiplication du nombre de chromosomes (Bilquez, 1956). Ceci explique aussi le dédoublement de la quantité d'ADN chez deux de nos lignées tétraploïdes après un traitement à la colchicine.

- Effet de la polyploïdisation sur la biomasse (poids sec) et la teneur en hyoscyamine

La biomasse élevée liée aux plantes polyploïdes est une propriété recherchée chez les espèces médicinales du fait que les tiges, les fleurs et les racines sont souvent la source des composés actifs désirés (Liu et Gao., 2007). Il a été souvent observé que les plantes tétraploïdes ont des racines, des tiges et des pousses plus grandes et une biomasse plus élevée que les diploïdes (Gao et al. 2002 ; Tascan, 2007).

Ainsi le poids frais moyen de la racine des plantes tétraploïdes de *Salvia miltiorrhiza* augmente considérablement (1.54-2.79 fois) comparé à celui de la plante témoin non traitée (Gao et al., 1996). Une augmentation semblable de la biomasse a été rapportée chez *Panax ginseng* C.A. Meur où les biomasses fraîches et sèches des racines adventives octaploïdes sont plus élevées (164,8 MF mg/racine et 13,8 MS mg/racine) comparées avec les racines naturellement tétraploïdes (106,5 MF mg/racine et 11,7 MS mg/racine) (Kim et al., 2004).

La comparaison entre les propriétés des plantes diploïdes et tétraploïdes indiquent que l'augmentation du niveau de ploïdie chez la tête du dragon entraîne une diminution de la longueur des plantes mais une augmentation de leur masse fraîche et sèche (Omidbaigi et al. 2010a). De même il a été rapporté que les HRs tétraploïdes de *Hyoscyamus muticus* enregistrent une augmentation de 17% du poids sec comparés aux chevelus diploïdes (Shahriari-Ahmadi et al., 2008). Ceci est aussi en accord avec les résultats obtenu chez d'autres espèces d'*Hyoscyamus* telle que *Hyoscyamus Niger* (Lavania, 1986; Lavania et Srivastava, 1991).

Omidbaigi et al. (2010a), rapportent que l'augmentation de la matière fraîche et sèche est due à l'augmentation de la surface foliaire et au changement de la qualité et de la quantité des métabolites secondaires.

Nos résultats rejoignent ceux de la plupart des auteurs précités qui rapportent une amélioration de la biomasse par polyploïdisation. La polyploïdisation (tétraploïdisation) de nos HRs a engendré aussi une augmentation de la biomasse (poids sec) par rapport à la lignée diploïde parentale. Par ailleurs, cette augmentation varie en fonction des lignées tétraploïdes de HRs, elle est de 12% pour la lignée L_{DSA} et de 22% pour l'autre (L_{DSC}).

La polyploïdisation résulte généralement de l'endopolyploïdisation (endoreduplication ou endomitose) ou de la fusion nucléaire (Brutovská et al., 1998; Jain 2001; Chen et Gao 2007). La polyploïdie est fréquemment accompagnée par des changements remarquables de la morphologie, la taille des cellules et le métabolisme secondaire (Dhawania et Lavania

1996 ; Gao et al., 2002 ; Levin 2002 ; Lavania, 2005). La stimulation du métabolisme secondaire chez les plantes médicinales est particulièrement recherchée (Heping et al., 2008).

Le profil alcaloïdique montre une augmentation significative du contenu dans les tétraploïdes développés à partir des diploïdes de plusieurs espèces (Berkov et al., 2003; Kim et al., 2004). Cette différence quantitative a été rapportée dans des tétraploïdes développés chez plusieurs espèces végétales telle que *Chamomilla recutita*, *Petunia*, *Salvia*, *Punica granatum*, *Lavandula angustifolia* etc. dans lesquelles l'accumulation des métabolites secondaires augmente par rapport à leurs témoins diploïdes (Gao et al., 1996 ; Griesbach et Kamo, 1998; Svehlikova et Repcak, 2000; Shao et al., 2003; Urwin et al., 2007).

Les cultures de HRs de *Datura stramonium* L. pour la production d'hyoscyamine sont considérées comme une approche alternative non négligeable en raison de leur niveau de production et de leur stabilité génétique élevée (Baiza et al., 1999). Après une phase d'optimisation, les lignées tétraploïdes des HRs de cette même espèce accumulent une teneur en hyoscyamine plus grande que la lignée diploïde (Pavlov et al., 2009). Alors que Rowson (1949) ; Berkow (2001) et Berkov et Philipov (2002), rapportent que les plantes tétraploïdes de *Datura stramonium* et *Datura innoxia* contiennent des alcaloïdes en quantité deux fois plus élevées par rapport aux plantes diploïdes. Ceci est aussi observé chez des lignées tétraploïdes de *Salvia miltiorrhiza* où une productivité beaucoup plus élevée de tanshinone est enregistrée (Gao et al., 1996). De même, il a été aussi rapporté que les plantes tétraploïde d'*Atropa belladonna* et d'*Hyoscyamus muticus* ont un potentiel de production économique presque 1.5 fois plus élevée comparé à celui des diploïdes (Jackson et Rowson, 1953 ; Lavania, 1986). Aussi, une production supérieure est obtenue chez *Artemisia annua* L. où les lignées tétraploïdes produisent 2-5 fois plus d'artémisinine que les lignées diploïdes (De Jesus-Gonzalez et Weathers, 2003).

Selon Heping et al. (2008), le rendement en diosgénine dans une lignée tétraploïde de *Dioscorea zingiberensis* est 1.23 fois plus élevé par rapport au témoin, par contre les tétraploïdes de *Vetiveria zizanioides* ont le potentiel de produire que 62.5% et 39,2% plus d'huile par rapport au parent diploïde et au témoin, respectivement (Lavania, 1988).

Un model commun a été développé pour expliquer les changements provenant de l'induction de tétraploïdes. Ce model se base sur le fait que le faible rapport de la membrane nucléaire sur la chromatine (le volume des cellules tétraploïdes est typiquement environ le double et leur superficie est environ 1.5 fois supérieure aux cellules diploïdes), a comme conséquence un excès de chromatine entrant en contact avec la membrane nucléaire, ce qui , augmenterait l'activité des gènes liés aux voies de biosynthèse, le statut hormone et l'activité photosynthétique (Berkov et al., 2003; Kim et al., 2004 ; Albuizio et al., 2006 ; Lavania, 2005 ; Mishra et al., 2010). Couplés avec une taille agrandie de cellules, tous ces facteurs peuvent avoir un impact positif sur le métabolisme secondaire et sur la production de métabolites pharmaceutiquement actifs (Dhawania et Lavania, 1996 ; Lavania et al., 2006 ; Shariari-Ahmadi et al., 2008). En outre, plus le nombre de ploïdie augmente plus le nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires (et par conséquent les alcaloïdes) sera plus grand.

Dans notre cas, aussi bien la taille des cellules que la quantité de l'ADN ont été mises en évidence chez les HRs tétraploïdes. Il reste à savoir si ces phénomènes interviennent aussi d'une manière significativement positive dans la biosynthèse de l'hyoscyamine.

· Effets des éliciteurs sur la biomasse et le contenu en hyoscyamine

En général, les cultures *in vitro* de cellules et d'organes de plantes pour la production de différents métabolites secondaires ne présentent qu'un succès limité à cause de leurs faibles rendements (Buitelaar et Tramper, 1992). Cependant, l'une des voies prometteuses visant à augmenter la productivité, est l'utilisation d'éliciteurs biotiques et/ou abiotiques (Mueller et al., 1993 ; Pitta–Alvarez et al., 2000; Brader et al., 2001 ; Vasconsuelo et Boland, 2007). Ces dernières années, l'Acide salicylique a suscité une attention particulière du fait qu'il joue un rôle important dans la signalisation cellulaire (Raskin, 1994 ; Bulgakov et al., 2002; Sirvent et Gibson 2002 ; Kanga et al., 2004). En effet, il a été rapporté que l'acide salicylique (AS) et ses dérivés exogènes induisent des effets significatifs sur le comportement de la cellule végétale aux niveaux biologiques, physiologiques et biochimiques (Raskin, 1992 ; Klessig et Malay, 1994 ; Rickauer et al., 1997 ;Robberts et Shuler, 1997). Manthe et al. (1992) ont enregistré une réduction de 25% de la croissance de *Vicia faba* L. après 7 jours de traitement avec 5 mM d'AS. Cependant, quand les racines transformées de la belladone sont traitées avec 2 mM d'AS pendant 24 h, la biomasse au 14^{ème} jour se trouve réduite de 9% par rapport au témoin (Jaziri et al., 1994).

Harfi et al. (2009), estiment que le traitement pendant 12 jours de HRs de *Datura tatula* par l'acide salicylique et l'acide acétylsalicylique entraîne une amélioration de la biomasse à la concentration de 10^{-8} M, et une inhibition aux concentrations de 10^{-4} M et plus. Le même résultat est obtenu par Deng (2005) où il rapporte que le méthyle jasmonate (MeJA), appliqué pendant 24 h, augmente la croissance racinaire des plantules chez *D. stramonium* L. aux concentrations de 10^{-6} M et 10^{-7} M, mais il l'inhibe à 10^{-5} M et plus. Ce type de résultat a également été enregistré avec les HRs de cette même espèce traités par une solution de 10^{-4} M d'AS ou d'AAS (acide acétylsalicylique) où une diminution de la biomasse est aussi enregistrée (Belabbassi et Benouaret, 2009). Par ailleurs, l'élicitation d'une culture de HRs d'*Ocimum basilicum* avec l'acide salicylique ou l'acide jasmonique pendant 7 jours à partir du 21^{ème} jour de culture montre une diminution de la biomasse comparée au témoin (Bais et al., 2002). Une étude similaire réalisée par Jeong et al. (2005), a montré que le traitement des HRs de *Panax ginseng* par l'acide acétylsalicylique inhibe la production de la biomasse à des concentrations comprises entre 10^{-4} à 10^{-3} M. Par ailleurs, l'AS n'a pas eu d'effets négatifs sur la croissance des cultures de racines adventives de *Scopolia parviflora* pour toutes les concentrations utilisées, bien au contraire, il engendre une légère augmentation de la croissance (Kanga et al., 2004).

Dans la présente étude l'Acide salicylique n'a pas induit d'effets négatifs sur la croissance des HRs, ce qui rejoint les résultats obtenus par Kanga et al., (2004) où une légère augmentation du poids sec est obtenue. Ceci pourrait être dû au temps d'exposition relativement court et au traitement avec l'Acide salicylique durant la phase active de la croissance. Nos résultats corroborent aussi ceux de Jeong et al. (2005) et Harfi (2009) pour l'acide acétylsalicylique. Nos résultats (aussi bien ceux de la lignée diploïde que ceux des 2 lignées tétraploïdes) confirment ceux des auteurs précédents. Les 2 types de HRs diploïdes et tétraploïdes, réagissent donc de la même façon et selon les règles déjà établies lorsqu'ils sont traités à l'AS ou à l'AAS.

Les composés secondaires sont présents dans les plantes en quantités infimes et sont souvent déclenchés en réponse aux changements environnementaux (Wu et al., 2005). Les éliciteurs sont des outils utiles pour améliorer la production de ces composés par les plantes (Zhao et al., 2001 ; Yu et al., 2002 ; Singh et al., 2010).

Il a été démontré que l'AS et ses dérivés chimiques (acide acétylsalicylique) augmentent le rendement de quelques métabolites secondaires dans des cultures de tissus/cellules de plantes (Raskin, 1992 ; Raskin, 1994 ; Draper, 1997 ; Baldwin, 1999 ; Shah et Klessig 1999 ; Chotikadachanarong et *al.*, 2011). Dans une culture de suspension cellulaire de *Hyoscyamus muticus* traitée avec 40 μM ($4 \cdot 10^{-5}$ M) d'AS, la production de lubimine augmente de 50%, alors que dans une culture de racines transformées de la même espèce, la production de solavetivone augmente de 48% par l'addition de 4 μM ($4 \cdot 10^{-6}$ M) d'AS (Mehmetoglu et Curtis, 1997). En outre, une augmentation de la production d'alcaloïdes totaux de 505% a été réalisée en ajoutant 1 mM (10^{-3} M) d'AAS à des lignées de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro* (Gregorio et Victor, 1997) ou en ajoutant différentes concentrations d'AAS (0,5 à 20 mM) sur cette même espèce (Godoy et Loyola Vargas, 1997).

Selon Amdoun et *al.* (2009 et 2010), l'élicitation pendant 24 heures par l'utilisation de 0.06 mM ($6 \cdot 10^{-5}$ M) à 10 mM (10^{-3} M) d'acide jasmonique présente un effet très positif sur la teneur en hyoscyamine d'une culture de HRs de *Datura stramonium* L. Avec ces mêmes conditions, l'acide acétylsalicylique induit une augmentation de la production de glucotropaeoline de 300% chez *Tropaeolum majus* L. (Wielanek et Urbanek, 2006) et une augmentation de 281% d'artémisinine chez les chevelus d'*Artemisia annua* L. (Baldi et Dixit, 2008). Les plantes de cette dernière espèce élicitées par 10^{-3} M d'AS, présentent une production totale dans les feuilles de 1.3, 1.5 et 1.8 fois plus élevée comparée aux témoins après 1, 2 et 4 jours après traitement respectivement (Pu et *al.* 2009).

L'effet inductif de l'AS dépend de la phase des cultures cellulaires (Cho et *al.*, 2007), le 20^{ème} jour de culture est le meilleur temps pour l'addition de l'éliciteur pour affecter le rendement en taxol chez *Taxus yunnanensis* (Zhang et *al.*, 2002) et le contenu en anthocyanine chez les cultures cellulaires de *Daucus carota* où une amélioration de 1.68 fois est obtenue quand elles sont traitées par une solution de 0.01 mM de MeJA (Sudha et Ravishankar, 2003). Alors que c'est au 7^{ème} jour qu'un maximum de production de ginsenoside est obtenu après le traitement des racines adventives de *Panax ginseng* avec l'AS et le MeJA ($2 \cdot 10^{-4}$ M) (Mohammad Babar et *al.*, 2006). Par ailleurs, après un traitement de 48 h, la quantité de l'ensemble des alcaloïdes augmente de plus de trois fois chez les HRs de *Catharanthus roseus* élicités par 100 et 250 μM de MeJA (Ruiz-May et *al.*, 2009). Cependant, une amélioration de seulement 40% de scopolamine est enregistrée chez les racines adventives de *Scopolia parviflora* traitées avec 0.01 mM de MeJA pendant 24 h (Kanga et *al.*, 2004).

Nos résultats corroborent ceux des auteurs précédents, en raison d'une amélioration de la production de l'hyoscyamine des lignées de HRs après une phase d'élicitation à l'Acide salicylique ou à l'Acide acétylsalicylique à une concentration de 0.1 mM (10^{-5} M) pendant 24 heures. Nos meilleurs résultats sont obtenus avec l'AS appliqué à la lignée témoin L_{DS}. Bien qu'ils ne représentent une amélioration que de 74,45% équivalent aux niveaux d'amélioration enregistrés par Mehmetoglu et Curtis (1997) et par Kanga et *al.* (2004), ils restent loin des niveaux (505%) obtenus par obtenus par Gregorio et Victor (1997) et par Godoy et Loyola Vargas (1997).

En outre, nos résultats montrent bien l'effet de la combinaison d'une tétraploïdisation et de l'élicitation (soit 197,5% d'amélioration avec l'AS sur la lignée LDSC et de 82,6% d'amélioration avec l'AS sur la lignée LDSA).

Conclusion

Les alcaloïdes tropaniques (scopolamine et hyoscyamine) sont des agents anticholinergiques utilisés dans la médecine. Puisque leur synthèse chimique est difficile et chère, ces composés sont encore extraits à partir des plantes qui appartiennent à plusieurs espèces des Solanacées. L'obtention de ces deux substances par les techniques de culture *in vitro* est une alternative intéressante, puisqu'elle garantirait un approvisionnement stable et uniforme pendant toute l'année, indépendamment des variations saisonnières des plantes cultivées aux champs. Les deux alcaloïdes sont synthétisés dans les racines de la plante; par conséquent la culture des racines normales et transformées est le système *in vitro* le plus approprié pour les produire (Spollansky, et al., 2000). De l'autre côté, le dédoublement chromosomique est accompagné par des changements incluant l'augmentation globale de l'activité enzymatique et l'altération dans les composés phytochimiques de la plante etc., qui peuvent conduire à l'augmentation de la production et à certains changements qualitatifs de la biosynthèse des métabolites secondaires (Levin, 1983; Dhawania et Lavania, 1996; Lavania 2005). Un tel potentiel a pu être exploité par le recours aux manipulations expérimentales pour réaliser des gains commerciaux en ce qui concerne la production de métabolites secondaires utiles.

A cet effet, et dans la perspective d'augmenter la production en hyoscyamine, notre travail a porté sur l'induction des lignées de HRs tétraploïdes de *Datura stramonium* L. par une polyploïdisation artificielle à l'aide du traitement à la colchicine suivie de l'étude de l'effet de l'élicitation par l'AS et l'AAS aussi bien sur la lignée de HR témoin que sur les 2 lignées HRS tétraploïde.

Les résultats obtenus montrent que le taux de survie des HRs traités varie en fonction de la concentration et de la durée d'exposition. La concentration de 0,5% semble être plus toxique par rapport à celle de 0,1% du fait qu'elle entraîne des taux de survie inférieurs surtout à des temps d'exposition élevés (11 jours).

L'étude cytogénétique de la lignée de HR de base montre que c'est une lignée diploïde avec un nombre de chromosomes égale à $2n=2x=24$ et que le traitement de cette même lignée a donné quelques lignées tétraploïdes.

Concernant la quantité de l'ADN au niveau des lignées polyploïdes il a été dédoublé confirmant ainsi les observations cytologiques.

Par ailleurs, la polyploïdisation a induit une augmentation du poids sec et de la teneur en hyoscyamine chez les 2 lignées de HRs autotétraploïdes de *D. stramonium* L.. La lignée LDSA semble être la plus productrice en termes de poids sec alors que la lignée LDSC produit plus d'hyoscyamine que les deux autres lignées.

Quant à la teneur en hyoscyamine induite par l'élicitation, la concentration de 10^{-4} M semble être efficace pour l'amélioration de la production d'hyoscyamine aussi bien pour l'AS que l'AAS. Cependant l'AAS présente une tendance à réduire la biomasse des HRs.

Une corrélation positive est obtenue entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine et entre la quantité d'ADN et la teneur en hyoscyamine. Ceci confirme une fois de plus, l'intérêt de la polyploïdisation pour l'amélioration de la teneur en hyoscyamine chez *D. stramonium* L.

Un bon effet conjugué de la polyploïdisation et de l'élicitation sur l'amélioration de la teneur en hyoscyamine des HRs de *Datura stramonium* surtout pour la lignée LDSC.

Dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait judicieux de :

- Tester d'autres types d'agents mitoclasiques comme l'oryzaline, amiprophos-methyl, N₂O car il existe une affinité de l'agent mitoclasique avec l'espèce à traiter.
- Utiliser un autre type de matériel végétal tel que les graines et les cals par immersion, et le méristème apical par application du coton imbibé de l'agent mitoclasique pour produire des polyploïde qu'il va falloir en suite utiliser pour produire des HRs.
- Utiliser le DMSO ou le Tween 20 pour augmenter la perméabilisation des cellules à la colchicine ;
- Comprendre le mécanisme génétique impliqué dans l'augmentation de la production de l'hyoscyamine.

Références bibliographiques

- Aagaard S.M.D.; Greilhuber J.; Zhang X.C. et Wikström N., 2009. Occurrence and evolutionary origins of polyploids in the clubmoss genus *Diphasiastrum* (*Lycopodiaceae*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 52. p.p.: 746–754.
- Abdel Rahman R.; El-Din E.-W.H.; El-Said A.G.A. et Khelifa H.D., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Datura metel* (L.) and tropane alkaloids determination. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2(2). p.p.: 62-66.
- Adabio., 2004. Pomme de terre (solanacées). Fiche technique en agriculture biologique. ACTA. In : <http://www.civambio33.chezalice.fr/civambio33/documentation/fichesTKmaraichage/FT>.
- Aird E.L.H.; Hamill J.D. et Rhodes M.J.C., 1988. Cytogenetic analysis of *hairy root* cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 15. p.p.: 47-57.
- Albuzio A.; Spettoli P. et Cacco G., 2006. Changes in gene expression from diploid to autotetraploid status of *Lycopersicon esculentum*. *Physiologia Plantarum*, 44. p.p.: 77–80.
- Amdoun R. ; Khelifi-Slaoui M. ; Amroun S. et Khelifi L., 2005. Ressources génétiques des *Daturas* en Algérie. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Éd. Khelifi., I.N.A, El-Harrach, Alger. p.p.: 212-213.
- Amdoun R., 2003. Contribution à l'amélioration de la production d'alcaloïdes tropaniques par des apports calciques chez *Datura stramonium* L. Thèse magistère. Université Saad Dahleb, Blida. 70p.
- Amdoun R.; Khelifi L.; Khelifi-Slaoui M.; Amroune S.; Benyoussef E.-H.; Dao V.T.; Assaf-Ducrocq C. et Gontier E., 2009. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science*, vol. 177, p.p. : 81-87.
- Amdoun R.; Khelifi L.; Khelifi-Slaoui M.; Amroune S.; Benyoussef E.-H.; Assaf-Ducrocq C. et Gontier E.. Simultaneous optimization of growth and hyoscyamine content of *Datura stramonium* L. hairy root elicited by jasmonic acid using desirability function, 2010.
- Anand A.; Gupta A.K.; Teshale E.T.; Mishra A. et Khanna V.K., 2008. Phylogenetic relationship to study the ploidy status and resistance to Karnal Bunt in Indian wheat cultivars using RAPD technique. *Biotechnology*, 7(3). p.p.: 430-438.
- Ankenbauer R. G. et Nester E. W., 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *Journal of Bacteriology*, 172. p.p.: 6442-6446.
- Azhar M.C.M. et Mohd Nazir B., 1991. Polyploidy induction of *Pisang mas*, a diploid banana (*Musa spp.*). *Awana Genting, Pahang, Malaysia*. p.p.: 134-143.

- Baba Aïssa F., 1991. Les plantes médicinales en Algérie. Coéd Bouchane et Ad. Diwan, Alger. 181p.
- Bais H.P.; Walker T.S.; Schweizer H.P.; Vivanco J.M., 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in *hairy root* cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiol. Biochem., 40. p.p.: 983–995.
- Baíza A.M.; Quiroz-Moreno A.; Ruíz J.A. et Loyola-Vargas V.M., 1999. Genetic stability of *hairy root* cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59. p.p.: 9–17.
- Baldi A. et Dixit V.K., 2008. Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2(2). p.p.: 341-348.
- Baldwin I., 1999. The jasmonate cascade and complexity of induced defence against herbivore attack. Sheffield Academic Press, Shef- and Willfield. p.p.: 155-186.
- Banerjee S.; Rahman L.; Uniyal G. C.; Ahuja P. S., 1998. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced *hairy root* cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Sci., 131. p.p.: 203–208.
- Beaudry J.-R., 1985. Génétique générale. Décarie Editeur, Montréal. 501p.
- Belabbassi O. et Benouaret R., 2009. Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires de quelques provenances locales de *Datura stramonium* L.. Mémoire Ingénieur, Ecole National Supérieur Agronomique, Alger. 60P.
- Belaskri A., 2006. Incidence de la maladie du crown gall de l'eucalyptus dans les pépinières forestières de l'Ouest algérien. Mémoire Magistère, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 111p.
- Belling J. et Blakeslee A.F., 1922. The assortment of chromosomes in triploid *Daturas*. Amer. Nat., 55. p.p.: 339-346.
- Benhamou N., 1996. Elicitor-induced plant defense pathways. Trends in Plant Sciences, 1. p.p.: 233-240.
- Benhizia Z., 1989. Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium* L.. Thèse magistère. Institut National Agronomique, Alger. 68p.
- Bensaddek L.; Villarrea M.L. et Fliniaux M.-A., 2008. Induction and growth of *hairy roots* for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 3(1). p.p.: 2-9.
- Berkov S. et Philipov S., 2002. Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Datura stramonium*. Pharm. Biol., 40(8). p.p.: 617-621.
- Berkov S.; Pavlov A.; Kovatcheva P.; Stanimirova P. et Philipov S., 2003. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid *hairy root* cultures of *Datura stramonium*. Zeitschrift für Naturforschung, 58. p.p.: 42–46.
- Berkow S., 2001. Size and alkaloid content of seeds in induced autotetraploids of *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. Pharm Biol, 39. p.p.: 329–331.
- Bezanger L. ; Pinkas M. ; Torck M. et Trotin F., 1980. Plantes médicinales des régions tempérées. Edition Maloine S.A. Paris.

- Bhat S.V. Nagasampagi B.A., Sivakumar M., 2005. Chemistry of natural products. Ed. Narosa, New Delhi, India. 237p.
- Bianchini F. et Corbetta F., 1975. Atlas des plantes médicinales. Fernand Nathan, Paris, 120 p.
- Bianchini F. et Pantano A C., 1986. Guide vert des plantes et des fleurs. Édition Solar. 125p.
- Bilquez, 1956. Etude de la valeur agronomique des différentes sortes de variations héréditaires. Journal d'Agric. Trop. et de Botanique Appliquée, T. III, n°3-4. p.p.: 200-206.
- Biradar D.P.; Rayburn A.L. et Bullock D.G., 1993. Endopolyploidy in diploid and tetraploid maize (*Zea mays* L.). Ann. Bot., 71. p.p.: 417-421.
- Blakeslee A.F. et Avery B.T., 1919. Mutations in the Jimson weed. Journal of Heredity, 10. p.p: 111-120.
- Blakeslee A.F. et Belling J., 1924. Chromosomal chimeras in the Jimson weed, *Datura stramonium*. Journal of Heredity, 15. p.p: 195-206.
- Blakeslee A.F., 1934. New Jimson Weeds from old chromosomes. Hered, 25. p.p.: 80-108.
- Blakeslee A.F.; Belling J.; Farnham M.E. et Bergner A.D., 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. Science, 55. p.p.: 646-647.
- Boitel-Conti M.; Gontier E.; Laberche J.C.; Ducrocq C. et Sangwan-Norreel B.S., 1996. Inducer effect of tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. Plant Cell Reports, 16. p.p.: 241-244.
- Boullard B., 1997. Dictionnaire des plantes et champignons. Editions ESTEM, Paris. 875p.
- Boullard B., 2001. Plantes médicinales du Monde: réalités et croyances. ESTEM, Paris. 636p.
- Brader G.; Tas E.; Palva E.T., 2001. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*. Plant Physiol., 126. p.p.: 849-860.
- Bretagnolle F.; Felbert F.; Calame F.G. et Küpfer P., 1998. La polyploïdie chez les plantes. Botanica Helvetica, 108. p.p.: 5-37.
- Brochmann C.; Brysting A.K.; Alsos I.G.; Borgen L.; Grundt H.H.; Scheen A.C. et Elven R., 2004. Polyploidy in arctic plants. Biol J. Linn. Soc., 82. p.p.: 521-536.
- Broothaerts W.; Mitchell H.; Weir B.; Kaines S.; Smith L.; Yang W.; Mayer J.; Guez C. et Jefferson R., 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature, 433. p.p.: 629-633.
- Bruneton J., 1987. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Lavoisier, Paris, 585p.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Paris. pp : 647-673.

- Bruneton J., 1995. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier, Paris. 915p.
- Bruneton J., 2005. Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Lavoisier, 3ème édition. 618p.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. TEC et DOC, 3ème édition. p.p.: 783- 785.
- Brutovská R.; Cellárová E. et Dolezel J., 1998. Cytogenetic variability of *in vitro* regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. Plant Sci., 133. p.p.: 221–229.
- Buitelaar R.M. et Tramper J., 1992. Stratégies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. Journal of biotechnology, 23(2). p.p.: 111-141.
- Bulgakov V.P.; Tchernoded G.K.; Mischenko N.P.; Khodakovskaya M.V.; Glazunov V.P.; Radchenko S.V.; Zvereva E.V.; Fedoreyev S.A. et Zhuravlev Y.N., 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. J. Biotechnol., 97. p.p.: 213–221.
- Cangelosi G. A.; Ankenbauer R.G. et Nester E. W., 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87. p.p.: 6708-6712.
- Cangelosi G.A.; Hung L.; Puvanesarajah V.; Stacey G.; Ozga D.A.; Leich J.A. et Nester E.W., 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their role in plant interactions. Journal of Bacteriology, 169. p.p.: 2086-2091.
- Cangelosi G.A.; Martinetti G.J.; Leigh A.; Lee C.C.; Theines C. et Nester E.W., 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* protein in export of beta-1,2 glucan. Journal of Bacteriology, 171. p.p.: 1609-1615.
- Casanova E.; Trillas M.I.; Moysset L. et Vainstein A., 2005. Influence on *rol* genes in floriculture. Biotechnology Advances, 23. p.p.: 3-39.
- Cecchini T., 1976. Encyclopédie des plantes médicinales. De Vecchi, 327 p.
- Chakraborti S.P.; Vijayan K.; Roy B.N. et Qadri S.M.H., 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep., 17. p.p.: 799–803.
- Chavarri M.; Vegas G.A.; Zambrano A.Y.; Gutiérrez Z. et Demey J.R., 2010. Insertion of *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene in Mango. Interciencia, 35(7). p.p.: 521-525.
- Chelaifa H., 2010. Spéciation allopolyploïde et dynamique fonctionnelle du génome chez les *Spartines*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1. 165p.
- Chen L.-L. et Gao S.-L. ; 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae, 112. p.p.: 339–344.
- Chen Z.J., 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. Review. Trends in Plant Science, 15(2). p.p.: 57-71.

- Cheng Z.-M. et Korban S.S., 2011. *In vitro* ploidy manipulation in the genomics era. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 104. p.p.: 281–282.
- Chilton M.D.; Tepfer D.A.; Petit A.; David C.; Casse-Delbart F. et Tempe J., 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295. p.p.: 432–434.
- Cho H.-Y.; Lee-Parsons C.W.T.; Yoon S.-Y. H.; Rhee H.S. et Park J.M., 2007. Enhanced benzophenanthridine alkaloid production and protein expression with combined elicitor in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Biotechnol. Lett.*, 29. p.p.: 2001–2005.
- Chotikadachanarong K.; Dheeranupattana S.; Jatisatienr A.; Wangkarn S.; Mungkornasawakul P.; Pyne S.G.; Ung Alison T. et Sastraruji T., 2011. Influence of salicylic acid on alkaloid production by root cultures of *Stemona curtisii* hook. F.. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(4). p.p.: 322-325.
- Chriqui D., 1998. *Biotechnologies végétales : Génie génétique*. Laboratoire CEMV – Université P. et M. Curie, Paris VI, 84p.
- Christie P.J., 1997. The *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in *Eubacteria*. *J. Bacteriol.*, 179. p.p.: 94-3085.
- Citovsky V.; Zupan J.; Warnick D. et Zambryski P., 1992. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. *Science*, 256. p.p.: 1802-1805.
- Clement J.M., 1981. *Larousse agricole*. Librairie Larousse, Paris. 1207p.
- Cole I.B.; Saxena P.K., Murch S.J., 2007. Medicinal biotechnology in the genus *Scutellaria*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 43. p.p: 318–327.
- Comai L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews. Genetics.*, 6. p.p.: 836-846.
- Cordell A.G.; Quinn-Bettie L.M. et Fransworth N.R., 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother*, 15. p.p.: 183 – 205.
- Cosson L., 1976. Importance des facteurs climatiques et des étapes de développement dans la productivité des alcaloïdes tropaniques. *Etude de biologie végétale. Hommage au professeur P. Chouard*. R Jacques, Paris. p.p.: 483- 494.
- Costantino P. ; Capone L. ; Cardarelli M. ; De-Paolis A. ; Mauro M.L. et Trovato M., 1994. Bacterial plant oncogene: the *rol* genes' saga.. *Genetica*, 94. p.p.: 203-211.
- Couplan F., Styner E., 1994. *Guide des plantes sauvages comestibles et toxiques*. Delachaux et Niestlé, Paris. 415p.
- Croteau R.; Kutchan T. et Lewis N., 2000. *Natural products (Secondary metabolites)*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. p.p.: 1250-1318.
- Cuevas Ramos G., 2010. Effets génotoxiques des souches *d'Escherichia coli* produisant la Colibactine. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse. 123p.
- David C.; Chilton M.D. et Temp J., 1984. *Biotechnology*, 2. p.p.: 73-76.
- David W. H.; Vernon V.V. et Jason A. F., 2009. *Jimson Weed, Datura stramonium* L.. University of Florida. 2p.

- De Cleene M. et De Ley J., 1981. The host range of infectious *hairy roots* (*Agrobacterium rhizogenes*). Bot. Rev., 47. p.p.: 147-194.
- De Jesus L., 2003. Effects of artificial polyploidy in transformed roots of *Artemisia annua* L.. Mémoire Master en Science de Biotechnologie, Worcester Polytechnic Institute, USA. 111p.
- De Jesus-Gonzalez L.D. et Weathers P.J., 2003. Tetraploid *Artemisia annua hairy roots* produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep., 21. p.p.: 809–13.
- Dechaux C. et Boitel-Conti M., 2005. A strategy for over accumulation of scopolamine in *Datura Innoxia hairy root* cultures. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(1). p.p.: 101–107.
- Demarly Y., 1996. Amélioration des plantes et biotechnologies. John libbey Eurotext, 2ème édition, Paris. 151p.
- Demeyer K. et Dajaegere R., 1992. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO₃⁻, NH₄) on alkaloid production in *Datura stramonium*. Plant and Soil, 147. p.p.: 79-86.
- Dermen H. et Henry F.B., 1944. A general cytohistological study of colchicine polyploidy in Cranberry. Am. J. Bot., 31. p.p.: 451–463.
- Desai A.; Chee P.W.; Rong J.; May O.L. et Paterson H.A., 2006. Chromosome structural changes in diploid and tetraploid genomes of *Gossypium*. Genome, 49. p.p.: 336–345.
- Devi P. et Rani S., 2002. *Agrobacterium rhizogenes* induced rooting of *in vitro* regenerated shoots of the hybrid *Helianthus annuus x Helianthus tuberosus*. Scientia Horticulturae, 93. p.p.: 179-186.
- Dewitte A.; Eeckhaut T.; Huylenbroeck J.V. et Bockstaele E.V., 2010. Induction of 2n pollen formation in Begonia by trifluralin and N₂O treatments. Euphytica, 171. p.p.: 283–293.
- Dhawania O.P. et Lavania U.C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica, 87. p.p.: 81–89.
- Dixon R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. Nature, 411. p.p.: 843–847.
- Dolezel J.; Greilhuber J. et Suda J., 2007. Flow cytometry with plants: an overview. Weinheim. p.p.: 41–65.
- Doncheva T.; Berkov S. et Philipov S., 2006. Comparative study of the alkaloids in tribe *Datura* and their chemosystematics significance. Biochemical systematic and ecology, 34. p.p.: 478-488.
- Dornenburg H. et Knorr D., 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enz. Microb. Tech., 17. p.p.: 674-684.
- Douglas C.J.; Staneloni R.J.; Rubin R.A. et Nester E.W., 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. Journal of Bacteriology, 161. p.p.: 850-860.
- Draper J., 1997. Salicylate×superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. Trends Plant Sci., 2. p.p.: 162–165.

- Duval J., 1991. Les nématodes de la tomate. In : <http://www.eap.mcgill.ca/agrobio/ab-head.htm>.
- Dwivedi N.K.; Sikdar A.K.; Dandin S.B.; Sastri C.R. et Jolly M.S., 1986. Induced tetraploidy in mulberry: Morphological, anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135. *Cytol*, 51. p.p.: 393–401.
- Eckhart W. et Wink M., 2002. Biotechnology potential of *hairy root* culture. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 4. p.p.: 441-453.
- El Bazaoui A.; Stambouli H.; Bellimam M. A. et Soulaymani A., 2009. Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du *Datura stramonium* L. par CPG/SM et CL/SM. *Annales de Toxicologie Analytique*, 4(21). pp: 183-188.
- Escobar M. A. et Dandekar A. M., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *TRENDS in Plant Science*, 8(8). p.p.: 380-386.
- Falcão H.d.S.; Leite J.A.; Barbosa-Filho J.M.; de Athayde-Filho P.F.; de Oliveira C.M.C.; Moura M.D.; Ferreira A.L.; de Almeida A.B.A.; Souza-Brito A.R.M.; Formiga MDiniz Margareth de Fátima and Batista Leônia Maria. Gastric and Duodenal Antiulcer Activity of Alkaloids: A Review, *Molecules* 2008, 13, 3198-3223
- Fawcett J.A.; Maere S. et Peer Y.V.D., 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14). p.p.: 5737-5742.
- Felidj M., 2005. Effet du stress hydrique sur la production d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura stramonium* cultivé en plein champ. Thèse de Magister. Faculté des sciences agronomiques et vétérinaires, université Saad Dahleb. Blida. 102 p.
- Flores H.E.; Vivanco J.M. et Loyola-Vargas V.M., 1999. 'Radicale' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.*, 4. p.p.: 220-226.
- Fluck H., 1977. Petit guide panoramique des herbes médicinales. Délachaux et Niestle Nauchatel, Paris. 275p.
- Fong S.W., 2008. *In vitro* induction of polyploidy in *Nepenthes gracilis*. Mémoire de Master en Science. Faculty of Science University of Malaya, Kuala Lumpur. 95p.
- Gao R. et Lynn D.G., 2005. Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two component system input for *Agrobacterium* pathogenesis. *J. Bacteriol.*, 187. p.p.: 2182-2189.
- Gao S.L.; Chen B.J. et Zhu D.N., 2002. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 70. p.p.: 289-293.
- Gao S.L.; Zhu D.N.; Cai Z.H. et Xu D.R., 1996. Autotetraploid plants form colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 47. p.p :73-77.
- Gay G.; Olié J.P.; Löö H. et Denker P., 1986. Aspects cliniques, pharmacologiques et thérapeutiques de l'intoxication au *Datura*. *L'évolution psychiatrique*. 51 (3). p.p.: 671-682.
- Gelvin B. S., 1990. *Crown gall* disease and *hairy root* disease. *Plant Physiol.*, 92. p.p.: 281-285.

- Gelvin S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51. p.p: 223-256.
- Georgiev M.I.; Pavlov A.I. et Bley T., 2007. *Hairy root* type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74. p.p.: 1175-1185.
- Giri A. et Narasu M.L., 2000. Transgenic *hairy roots*: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18. p.p.: 1–22.
- Godoy H.G.G. et Loyola-Vargas V.M., 1997. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, 10. p.p.: 537-540.
- Gontier E., 1993. Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé *in vitro* : impact physiologique de l'immobilisation des cellules au sein d'une matrice d'alginate de calcium. Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne, Amiens.
- Gosmann G. et Fett-Neto A.G., 2010. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. *Mol. Biotechnol.*, 46. p.p.: 94–104.
- Gregorio G.H. et Victor M.L.V., 1997. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell. Rep.*, 16. p.p.: 287-290.
- Gregory T.R., 2005. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Ann. Bot.*, 95. p.p.: 133-146.
- Griesbach R.J. et Kamo K.K., 1998. The effect of induced polyploidy on the flavonol of *Petunia* 'Mitchell'. *Growth and Metabolism*, 42. p.p.: 361–363.
- Griffin W.J. et Lin G.D., 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, 53. p.p.: 623-637.
- Griffiths A.J.F.; Miller J.H.; Gelbart W.M. et Lewontin D.T., 2001. Analyse génétique moderne. De Boeck Université, Paris. 676p.
- Griffiths A.J.F.; Miller J.H.; Suzuki D.T.; Lewontin D.T. et Gelbart W.M., 1996. Chromosome mutation II: Changes in number. Freeman and Co., New York USA. p.p.: 249-273.
- Gros-Lebon C., 1971. *Datura stramonium* L., *D. tatula* L.. Etude comparée sur les plants botaniques, chimiques et pharmacodynamique. Thèse Doctorat Université Pharmacie, Grenoble. 110p.
- Gryniewicz G.; et Gadzikowska M., 2008. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacol. Rep.*, 60(4). p.p.: 439–463.
- Guignard J.L.; Cosson L. et Henry M., 1985. Abrégé de phytochimie. MASSON. 224p.
- Guillon S.; Trémouillaux-Guiller J.; Pati P. K. ; Rideau M. et Gantet P., 2006. *Hairy root* research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9. p.p.: 341-346.
- Hamill J. et Lidgett A., 1997. *Hairy root* cultures- opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. Hardwood Academy Publishers, Amsterdam, the Netherlands. p.p.: 1-30.

- Hamill S.D.; Smith M.K. et Dodd W.A., 1992. *In vitro* induction of Banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Aust. J. Bot.*, 40. p.p.: 887-896.
- Harbouche H., 2005. Etude botanique et phytochimique de l'espèce *Datura stramonium* L. dans la région de Sétif. Mémoire de Magister, Université Sétif. 105p.
- Harfi B., 2009. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp : Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Thèse Magistère, Institut National Agronomique. Alger. 109P.
- Hartmann T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry*, 68. p.p.: 2831–2846.
- Hashimoto T. et Yamada Y., 1987. Purification and characterization of hyoscyamine 6b-hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger*. *Eur. J. Biochem.*, 164. p.p.: 277–285.
- Hashimoto T.; Hayashi A.; Amano Y.; Iwanari H. et Yamada Y., 1991. Hyoscyamine 6-#-hydroxylase an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis is localized at the pericycle of the root. *Journal of biological chemistry*, 7(266). p.p.: 4648-4653.
- He C.Y.; Hsiang T. et Wolyn D.J., 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.*, 51. p.p.: 225–230.
- Heby O., 1981. Role of polyamine in the control of cell proliferation and differentiation. Springer-Verlag, 19. p.p.: 1-20.
- Heilmann J., et Bauer R. 1999. New medical applications of plant secondary metabolites. Sheffield Academic Press Ltd., England. p.p.: 274-310.
- Hensel W., 2008. 350 plantes médicinales : les indispensables. Ed. Délachaux et Niestlé, Paris. 256p.
- Heping H.; Shanlin G.; Chen L. et Xiaoke J., 2008. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44. p.p.: 448–455.
- Hilton W.G. et Wilton P.D.G., 1995. Growth and uptake of sucrose and mineral ions by transformed root cultures of *Datura stramonium*, *Datura candida* x *aurea*, *Datura wrightii*, *Hyoscyamus muticus* and *Atropa belladonna*. *Planta Med.*, 61. p.p.: 345-350.
- Hooykaas P.J.J.; Hoficer M.; Den Dulk-Ras H. et Schilperoort R.A., 1984. A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a nopaline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants. *Plasmid*, 11. p.p.: 195 – 205.
- Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514p.
- Houde A., 1985. Pérennité des alcaloïdes. Louis Pariente, Paris. p.p.: 53 : 223.
- Houmani Z. et Cosson L., 2000. Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. *Ethnopharmacology*. Edit-Erga. p.p.: 205-219.
- Houmani Z., 1999. Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Th. Doctorat, Institut National Agronomique, Alger. 124p.
- Houmani Z., Cosson L., et Houmani M., 1999. *Datura ferox* L. and *Datura quercifolia* Kunch (*Solanaceae*) in Algeria. *Flora Mediterraanea* 9: 57-60.

- Houmani Z.; Cosson L.; Corbineau F. et Côme D., 1994. Etude de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L en Algérie. Acta. Bot. Gallica, 141(1). p.p.: 61-66.
- Howard E. et Citovsky V., 1990. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. BioEssays, 12. p.p.: 103-108.
- Hu Z.B. et Du M., 2006. *Hairy Root* and its application in plant genetic engineering. Journal of Integrative Plant Biology, 48(2). p.p: 121#127.
- Huffman G. #.; White F. F.; Gordon M. P. et Nester E. W., 1984. Bacteriology. J. Bacteriol., 157. 269p.
- Huxley A.; Griffith M. et Levy M., 1992. Dictionary Gardening. Mac millan Press, London and Stockton Press, New York. 356p.
- Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed. Larousse. 334p.
- Jackson B.J. et Gardner R.C., 1989. Localised transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. Plant Molecular Biology, 14. p.p: 61-72.
- Jackson B.P. et Rowson J.M., 1953. Alkaloid biogenesis in tetraploid *Datura stramonium*. J. Pharm. Pharmacol., 5. p.p.: 778–793.
- Jackson S. et Chen Z.J., 2010. Genomic and expression plasticity of polyploidy. Current Opinion in Plant Biology, 13. p.p.: 153–159.
- Jahier J.; Chevre A.M.; Delourme R. et Tanguy A.M., 1992. Techniques de cytogénétique végétale. INRA, Paris. 181p.
- Jain S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118. P.p.: 153–166.
- Jaziri M.; Yoshimatsu K.; Homes J. et Shimomura K., 1994. Traits of transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. Plant Cell Tissue Organ Cult., 38. p.p.: 257-262.
- Judd W.S.; Campbell C.S.; Kellogg E.A. et Stevens P., 2002. Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck Université, Paris. 467p.
- Kang X.Y., 2003. Advances in researches on polyploid breeding of forest trees. J. Beijing For Univ., 25. p.p.: 70–74.
- Kanga S.-M.; Jung H.-Y.; Kanga Y.-M.; Yun D.-J.; Bahk J.-D.; Yang J.-K. et Choi M.-S., 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*.
- Kerstens K. et De Ley J., 1984. Genus III. *Agrobacterium*. N.R. Krieg et J.G. Holt. Baltimore: Williams et Wilkins, 1. p.p.: 244-254.
- Kim Y.; Wyslouzil B.E. et Weathers P.J., 2002a. A comparative study of mist and bubble column reactors in the *in vitro* production of artemisinin. Plant Cell Rep., 20. p.p.: 451-455.
- Kim Y.; Wyslouzil B.E. et Weathers P.J., 2002b. Secondary metabolism of *hairy root* cultures in bioreactors. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 38. p.p.: 1–10.

- Kim Y.-S.; Hahn E.-J.; Murthy H.N. et Paek K.-Y., 2004. Effect of polyploidy induction on biomass and ginsenoside accumulations in adventitious roots of Ginseng. *Journal of Plant Biology*, 47(4). p.p.: 356-360.
- Kinghorn A.D., 1979. Tropane alkaloid toxins in toxic plants. N.Yorn. p.p.: 63-65.
- Kitamura Y.; Yamashita R.; Miura H. et Watanabe M., 1995. Atropine dynamics in seedlings of *Duboisia myoporoides*. *Plant physiology*, 146. p.p.: 210-216.
- Klessig D.F. et Malay J., 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.*, 26. p.p.: 1439-1458.
- Klug W.; Cummings M. et Spencer C., 2006. Génétique, 8ème édition. Pearson Education France, Paris. 704p.
- Koelen K.G. et Gross G.G., 1982. Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta medica*, n°: 44. p.p.: 227-230.
- Kothe H.W., 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed terres éditions. 336p.
- Krimi Z.; Petit A.; Mougel C.; Dessaux Y. et Nesme X., 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium spp.* in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7). p.p.: 3358-3365.
- Laere K.V.; França S.C.; Vansteenkiste H.; Huylenbroeck J.V. ; Steppe K. et Labeke M.-C.V., 2010. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta. Physiol. Plant.* 8p. doi:[10.1007/s11738-010-0643-2](https://doi.org/10.1007/s11738-010-0643-2)
- Lavania U.C. et Srivastava S., 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Euphytica*, 52. p.p.: 73-77.
- Lavania U.C., 1986. Genetic improvement of Egyptian henbane hops (*Humulus lupulus* L.). *Sci. Hortic.*, 105. p.p.: 263-268.
- Lavania U.C., 1988. Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autopolyploid of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). *Euphytica*, 38. P.p.: 271-276.
- Lavania U.C., 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genet Resour.*, 3(2). p.p.: 170–177.
- Lavania U.C.; Basu S. et Lavania S., 2006. Towards bio-efficient and non-invasive Vetiver: lessons from genomic manipulation and chromosomal characterization. 9p.
- Lecolier A., 2007. Caractérisation de certains impacts de la mutation Laurina chez *Coffea arabica* L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion. 214p.
- Lee Y.W.; Jin S.; Sim W.S. et Nester E.W., 1996. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium*: genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the VirA protein. *Gene*, 179. p.p.: 83-88.
- Leete E., 1979. Biosynthesis and metabolism of the metabolism of tropane alkaloids. *Planta Medica*, 2(36). pp: 4-52.
- Leitch A.R. et Leitch I.J., 2008. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. *Science*, 320. p.p.: 481-483.

- Leitch I.J. et Bennett M.D., 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.*, 12. p.p.: 470-476.
- Lepoittevin C., 2004. Cartographie génétique du fraisier cultivé octoploïde, *Fragaria x annanassa*. Mémoire D.D.A. 27p.
- Leroux B.; Yanofsky M.F.; Winans S.C.; Ward J.E.; Ziegler S.F. et Nester E.W., 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.*, 6. p.p.: 849-856.
- Levin D.A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am. Nat.*, 122. p.p.: 1-25.
- Levin D.A., 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York.
- Levin D.A.; Torres A.M. et Levy M., 1979. Alcohol dehydrogenase activity in diploid and autotetraploid *Phlox*. *Biochemical Genetics*, 17(1-2). p.p.: 35-42.
- Lewis W.H., 1980. Polyploidy in angiosperms: dicotyledons. Plenum Press, New York. p.p.: 241-268.
- Li L. P.; Jia Y.H.; Hou Q.M.; Charles T.C.; Nester E.W. et Pan S.Q., 2002. A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein *ChvG* regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99. p.p.: 12369-12374.
- Li L.; Wang J.; Wang W.; Lu Y.; Wang Y.; Zhou G. et Kai G., 2008. Optimization of induction and culture conditions and tropane alkaloids production in *hairy roots* of *Anisodus acutangulus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13. p.p.: 606-612.
- Lièvre K., 2004. Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique. Thèse de Doctorat, UMR INPL-INRA, Agronomie et Environnement. 197p.
- Lin H.; Jian M.; Liang L.Y.; Pei W.J.; Liu X.Z. et Zhang H.Y., 2010. Production of polyploids from cultured shoot tips of *Eucalyptus globulus* Labill by treatment with colchicine. *African Journal of Biotechnology*, 9(15). p.p.: 2252-2255.
- Lippinott J.A. et Lippinott B.B., 1969. Bacterial attachment to specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.*, 97. p.p.: 620-628.
- Liu Z. et Gao S., 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis. *In Vitro Cell.Dev.Biol.- Plant*, 43. p.p.: 404-408.
- Lüttge W.; Kluge M. et Bauer G., 2002. Botanique, 3ème édition. Tec. & Doc., Paris. 604p.
- Mahé F., 2009. Phylogénie, éléments transposables et évolution de la taille des génomes chez les lupins. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1. 240p.
- Makhzoum M.A.B., 2007. Mise en place d'un système de transfert de gènes et de régénération de plantes *in vitro* pour l'étude de la régulation du métabolisme des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. : Application au promoteur de la déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase. Thèse Doctorat, Université François Rabelais, Tours. 137p.
- Manthe I.L.; Schulz M. et Schnabl H., 1992. Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: evidence for salicylic acid metabolization. *J. Chem. Ecol.*, 18. p.p.: 1525-1539.

- Mantis N.J. et Winans S.C., 1992. The *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene transcriptional activator *virG* is transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *Journal of Bacteriology*, 174. p.p.: 1189-1196.
- Mantis N.J. et Winans S.C., 1993. The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *E. coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *Journal of Bacteriology*, 175. p.p.: 6626-6636.
- Marchoux G. ; Gognalons P. et Sélassié K.G., 2009. Virus des solanacées : Du génome viral à la protection des cultures. Edition Quæ. 843p.
- Marzougui N.; Boubaya A.; Thabti I.; Elfalleh W.; Guasmi F. et Ferchichi A., 2011. Polyploidy induction of Tunisian *Trigonella foenum-graecum* L. populations. *African Journal of Biotechnology*, 10(43). p.p.: 8570-8577.
- Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264. p.p.: 421-424.
- Mathysse A.G. et Gurlitz R.H.G., 1982. Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture cells. *Physiol. Plant Pathol.*, 21. p.p.: 318-387.
- Mathysse A.G., 1983. Role of the bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Journal of Bacteriology*, 154. p.p.: 906-915.
- Mathysse A.G., 1987. Characterization of non-attaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 169. p.p.: 313-323.
- Mauro N.M., 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier – Grenoble 1. 186p.
- McCullen C.A. et Binns A.N., 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22. p.p.: 101-27.
- Mehler E. et Kohlenbach H.W., 1978. Alkaloid content in leaves of diploid and haploid *Datura* species. *Planta Medica*, (33). p.p.: 350-355.
- Mehmetoglu U. et Curtis W.R., 1997. Effects of abiotic inducers on sesquiterpene synthesis in *hairy root* and cell-suspension cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 67. p.p.: 71-77.
- Meyer A.D.; Tempé J. et Costantino P., 2000. *Hairy root*: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Plant-Microbe Interactions*, 5. p.p.: 93-139.
- Miranda A.; Janssen G.; Hodges L.; Peralta E.G. et Ream W., 1992. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *Journal of Bacteriology*, 174. p.p.: 2288-2297.
- Mishra B.K.; Pathak S.; Sharma A.; Trivedi P.K. et Shukla S., 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum* L.. *South African Journal of Botany*, 76. p.p.: 447-452.
- Mohajjel-Shoja H., 2010. Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, *rolB* and *rolC*, and their homologos in *Nicotiana tabacum*. Thèse Doctorat, Université de Strasbourg, France. 129p.

- Mohammad Babar A.; Yu K.-W.; Hahn E.-J. et Paek K.-Y., 2006. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.*, 25. p.p.: 613–620.
- Moore G., 2002. Meiosis in allopolyploids: the importance of “Teflon” chromosomes. *Trends Genet.*, 18. p.p.: 456–463.
- Mueller M.J.; Brodschelm W.; Spannagl E. et Zenk M.H., 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90. p.p.: 7490–7494.
- Munro M. H., 1996. Intoxications. *Nature*, 365. 61p.
- Murugesan S.; Manoharan C.; Vijayakumar R. et Panneerselvam A., 2010. Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *International Journal of Microbiological Research*, 1(3). p.p.: 92-96.
- Nahal I., 1976. La variabilité des caractéristiques biologiques des climats méditerranées arides. *Act. Ecol. Iranica*, 1. pp: 35-48.
- Namdeo A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. *Phcog. Rev.*, 1. p.p.: 69-79.
- Nilson O.; Tuominen H.; Sundberg B. et Olsson O., 1997. The *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiol. Plant.*, 100. p.p.: 456-462.
- Nilsson O. et Olsson O., 1997. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol*-genes in the formation of *hairy roots*. *Physiol. Plantarum.*, 100. p.p.: 463–473.
- Oksman-Caldentey K.-M. et Hiltunen R.T., 1996. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Res*, 45. p.p.: 57-69.
- Oksman-Caldentey K.M. et Inze D., 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.*, 9(9).
- Omidbaigi R.; Yavari S.; Hassani M.E. et Yavari S., 2010b. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* , 18(1). p.p.: 23-35.
- Omidbaigia R.; Mirzaee M.; Hassanib M.E. et Sedghi Moghadam M., 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production*, 4(2).
- Pal Bais H.; Loyola-Vargas V.M.; Flores H.E. et Vivanco J.M., 2001. Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 37. p.p.: 730-741.
- Palazon J.; Pinol M.T.; Cusido R.M.; Morales C. et Bonfill M., 1997. Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites. *Recent Res. Devel. in Plant Physiol*, (1). p.p.: 125-143.
- Paterson A.H., 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity and crop adaptation. *Genetica*, 123(1-2). p.p.: 191-196.

- Pavlov A.I.; Georgiev V.G.; Marchev A.S. et Berkov S.H., 2009a. Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. World J. Microbiol. Biotechnol., 25. p.p.: 2239–2245.
- Pavlov A.; Berkov S.; Weber J., et Bley T., 2009. Hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium* hairy root in vitro systems with different ploidy levels. Appl Biochem Biotechnol., 157. p.p.: 210–225.
- Root In Vitro Systems with Different Ploidy Levels
- Peer Y.V.D.; Maere S. et Meyer A., 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. Nature Reviews Genetics, 10(10). p.p.: 725-732.
- Pelikan W., 1986. L'Homme et les plantes médicinales. Tome I, Centre triades, Paris, p.p.: 193-196.
- Pelletier G. et Téoulé E., 1999. La transgénése dans le règne végétale : le point sur les plantes d'intérêt agronomique. Tec. and Doc., Paris. 104p.
- Pitta-Alvarez S.I. et Giulietti A.M., 1998. Novel biotechnological approaches to obtain scopolamine and hyoscyamine: The influence of biotic elicitors and stress agents on cultures of transformed roots of *Brugmansia candida*. Phytother. Res., 12(1). p.p.: 18–20.
- Pitta–Alvarez S.I.; Spollansky T.C. et Giulietti A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology, 26. p.p.: 252–258.
- Pitzschke A. et Hirt H., 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium*- induced tumour formation in plants by plant transformation. European Molecular Biology Organization, 29(6). p.p.: 1021–1032.
- Poletti A., 1987. Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Niestlé, Paris. 192p.
- Poletti A., 1988. Fleurs et plantes médicinales. Délachaux et Niestlé, Paris. 222p.
- Polya G., 2003. Biochemical targets of plant bioactive compounds: A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects. CRC Press. 847p.
- Porter J.R., 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Crie. Rev. Plant Sci., 10. p.p.: 387-421.
- Portier P., 2004. Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non-pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium spp.* Thèse Doctorat, Université Claude Bernard –Lyon 1. 122p.
- Poulizac J.-A., 1999. La variabilité génétique. Ellipses, Paris. 159p.
- Prescott L.M.; Harley J.P. et Klein D.A., 2003. Microbiologie. Ed. De boeck, Paris. 1137p.
- Pryor R.L. et Frazier L.C., 1968. Colchicine induced tetraploid azaleas. HortScience, 3. p.p.: 283–286.
- Pu G.-B.; Ma D.-M.; Chen J.-L.; Ma L.-Q.; Wang H.; Li G.-F., Ye H.-C. et Liu B.-Y., 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Rep., 28. p.p.: 1127–1135.

- Quezel P. et Santa S., 1962. Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris. 1170p.
- Raskin I., 1992. Salicylate, a new plant hormone?. *Plant Physiol.*, 99. p.p.: 799-803.
- Raskin I., 1994. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43. p.p.: 439–463.
- Rhodes M.J.C.; Robins R.J.; Hamill J.D.; Parr A.J.; Hilton M.G. et Walton N.J., 1990. Properties of transformed root cultures. Clarendon Press, Oxford. p.p: 201-225.
- Richter G., 1993. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 526p.
- Rickauer M.; Brodschelm V.; Bottin A.; Véronési C.; Grimal H. et Esquerré-Tugayé T., 1997. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta*, 202. p.p.: 155-162.
- Riseuleo G.; Battistoni P. et Costantino P., 1982. *Plasmid*, 7, 45p.
- Roberts M.F. et Wink M., 1999. Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews / Phytochemistry*, 52. p.p.: 1177 – 1180.
- Roberts P. et Shuler M.L., 1997. Large-scale plant cell culture. *Current opinion in biotechnology*, 8. p.p.: 154-159.
- Robins R.J.; Bachmann P.; Peerless A.C.J. et Rabot S., 1994. Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38. p.p.: 241-247.
- Rolard B., 2002. Pollution chimique et radioactive : les plantes au secours de l'homme. In: <http://www.perso.club-internet.fr/phyto200/pollution.html>.
- Roux N.; Toloza A.; Radecki Z.; Zapata-Arias F.J. et Dolzel J., 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Rep.*, 21. P.p.: 483-490.
- Rowson J.M., 1949. Increased alkaloid contents of induced polyploidy of *Datura*. *Nature*, 154. p.p.: 81–82.
- Ruiz-May E.; Galaz-Avalos R.M. et Loyola-Vargas V.M., 2009. Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Mol. Biotechnol.*, 41. p.p.:278–285.
- Rustenholz C, 2010. Impact de la structure du génome sur l'organisation, la régulation et la fonction des gènes sur le chromosome 3B du blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L.). Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal. 155p.
- Saeed R.; Khan I.A. et Khan F.A., 2006. Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD Markers in *Gossypium arboreum* L. *Turkish Journal of Biology*, 30. p.p.: 93–100.
- Santos P.A.G.; Figueiredo A.C.; Oliveira M.M., Barroso J.G.; Pedro L.G.; Deans S.G. et Scheffer J.J.C., 2005. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Science*, 168. p.p. :1089–1096.
- Sbabou L., 2009. Diversité génétique du lupin au Maroc et étude du développement racinaire du lupin blanc sous stress abiotique par des approches de génomique fonctionnelle. Thèse de doctorat, Maroc. 232p.

- Schacherer J., 2005. Duplication dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae* : sélections, caractérisation et mécanismes. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I. 210p.
- Schauer T. et Caspari C., 2007. Guide Délachaux des plantes par la couleur. Ed. Délachaux et Niestlé. 495p.
- Schaumberg P. et Paris F., 1977. Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes. Délachaux et Neistlé S.A. Paris. 396p.
- Schell J.; Van Montagu #.; Depicker #.; DeWaele D.; Engler G. Genetello C.; Hernalsteens J.#.; Holsters #.; Messens #.; Silva #.; Van den Elsacken S.; Van Larabeke N. et Zaenen I. 1976. Plants: nucleic acids and protein synthesis. Ed. L. Bogorad and J. H. Weil, New York: Plenum Press. 329p.
- Schultez R.E. et Hoffman A., 1990. Plants of the Gods: their Sacred, healing and hallucinogenic powers. Rochester, VT: Healing Arts Press.
- Scriban R., 1999. Biotechnologie. Techniques et documentation. Paris. 1042p.
- Sevon N. et Oksman-Caldentay K-M., 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med.*, 68. p.p.: 859-868.
- Shah J. et Klessig D.F., 1999. Salicylic acid: Signal perception and transduction. Elsevier, UK. p.p.: 513-541.
- Shanks J.V. et Morgan J., 1999. Plant 'hairy root' culture. *Current opinion in biotechnology*, 10. p.p: 151–155.
- Shao J.; Chen C. et Deng X., 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 75. p.p.: 241-246.
- Shariari-Ahmadi F.; Dehghan E.; Farsi M. et Azizi M., 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicines treatment. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(24). p.p.: 2653-2659.
- Shashi B. et Sachdeva S.K., 1990. Biochemical variability in cytotypes of *Setaria tomentosa* (Roxb.) Kunth. *Acta Botanica Indica*, 18. p.p. : 216-221.
- Shen W.H.; Petit A.; Guern J. et Tempé J., 1988. *Hairy roots* are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85. p.p.: 3417-3421.
- Sheng J. et Citovsky V., 1996. *Agrobacterium*-plant cell interaction: have virulence proteins-will travel. *Plant Cell*, 8. p.p.: 1699-1710.
- Shukla Y.N. et Thakur R.S., 1992. Tropane alkaloids from *Duboisia myoporoides*. *Phytochen*, 12(31). p.p.: 4380-4390.
- Sikdar A.K. et Jolly M.S., 1994. Induced polyploidy in mulberry (*Morus* spp.): induction of tetraploids. *Sericologia*, 34. p.p.: 105–116.
- Sim S.J.; Chang H.N.; Liu J.R. et Jung K.H., 1994. Production and secretion of indole alkaloids in *hairy root* cultures of *Catharanthus roseus*: effect of *in situ* adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J. Ferment Bioeng.*, 78. p.p.: 229–234.
- Singh A.; Nirala N.K.; Das S.; Narula A.; Rajam M.V. et Srivastav P.S., 2011. Overexpression of ODC (Ornithine Decarboxylase) in *Datura innoxia* enhances the yield of scopolamine. *Acta Physiol. Plant.* doi: [10.1007/s11738-011-0787-8](https://doi.org/10.1007/s11738-011-0787-8).

- Singh K.V.; Rinki J.; Priti T. et Dixit V.K., 2010. Elicitation as yield enhancement strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abus precatorius* Linn. *In vitro cell Dev Biol Plant*, 46. p.p.: 354-362.
- Sirvent T. et Gibson D., 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 60. p.p.: 311–320.
- Slightom J.L.; Durand-Tardif M.; Jouanin L.; Tepfer D. 1986. Nucleotide sequence analysis of T_L-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.*, 261. p.p.: 108 – 121.
- Smith M.K.; Hamill S.D.; Gogel B.J. et Seven-Ellis A.A., 2004. Ginger (*Zingiber officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an *in vitro* colchicine treatment. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44. p.p.: 1065-1072.
- Spano L.; Mariotti D.; Cardarelli M. et Costantino P., 1988. Morphogenesis and auxine sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol.*, 87. p.p.: 479-483.
- Spollansky T.; Pitta-Alvarez S. et Giuliotti A., 2000. Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in *hairy root* cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1). p.p.: 72-75.
- Srivastava S. et Srivastava A.K., 2007. *Hairy root* culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27. p.p.: 29-43.
- Stachel S. E.; Messens E.; Vanmontagu M. et Zambryski P., 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318. p.p.: 624-629.
- Stachel S.E. et Zambryski P.C., 1986. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell*, 46(3). p.p.: 325-333.
- Stanys V.; Weckman A.; Staniene G. et Duchovskis P., 2006. *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84. p.p.: 263–268.
- Stebbins L., 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London: Edward Arnold Ltd Publisher.
- Stock A.M.; Robinson V.L. et Goudreau P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 69. p.p.: 183-215.
- Stöckigt J.; Sheludko Y.; Unger M.; Gerasimenko I.; Warzecha H. et Stöckigt D., 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*, 967. p.p.: 85–113.
- Sudha G. et Ravishankar G.A., 2003. Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid. *ACTA Physiologiae Plantarum*, 25(3). p.p.: 249-256.
- Sun Q.R.; Sun H.S.; Li L.G. et Bell R.L., 2009. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. *Hortic. Sci. Biotech.*, 84(5). p.p.: 548-552.

- Sundberg C.; Meek L.; Carroll K.; Das A. et Ream W., 1996. VirE1 protein mediates export of the single stranded DNA-binding protein VirE2 from *A. tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.*, 178. p.p.: 1207-1212.
- Svehlikova V. et Repcak M., 2000. Variation of apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla rectita* L. *Rauschert. Plant Biology*, 2. p.p.: 403–407.
- Tang Z.-Q.; Chen D.-L. ; Song Z.-J. ; He Y.-C. et Cai D.-T., 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 102. p.p.: 213–220.
- Tang Z.-Q.; Chen D.-L.; Song Z.-J.; He Y.-C. et Cai D.-T., 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 102. p.p.: 213–220.
- Tascan A., 2007. *In vitro* liquid culture systems of *Scutellaria* species. Thesis of Master of Science Plant and Environmental Science. Clemson University. 95p.
- Tepfer D., 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37. p.p.: 959–967.
- Thurzova L., 1981. Les plantes-santé qui poussent autour de nous. Bordas. p.p.: 88-89.
- Tikhomiroff C., 2001. Étude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Mémoire de maître en sciences appliquées, Université de Montréal. 239p.
- Toivonen L., 1993. Utilization of *hairy root* cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.*, 9. p.p.: 12-20.
- Tourte Y., 1998. Génie génétique et biotechnologie : concepts et méthodes. Dunod. 209p.
- Tourte Y., 2001. Les OGM - La Transgénèse chez les plantes. Dunod. 144p.
- Trabut L., 1935. Flore du nord de l'Afrique : répertoire des noms indigènes des plantes spontanées cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. Ed. La Typo litho et Jules carbonel. Alger. 353p.
- Tzfira T. et Citovsky V., 2002. Partners in infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.*, (21). p.p.: 121-129.
- Udall J.A. et Wendel J.F., 2006. Polyploidy and crop improvement. *Crop Science*, 46. p.p.: 3-14.
- Urwin N.A.R.; Horsnell J. et Moon T., 2007. Generation and characterization of colchicine- induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, 156. p.p.: 257–66.
- Vallet A., 1996. Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. ; Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus racinaires. Thèse D.E.A. Université de Picardie Jules Verne. Amiens. <http://www.alexandrevallet.multimania.com>
- Vamosi J.C. et Dickinson T.A., 2006. Polyploidy and diversification: a phylogenetic investigation in *Rosaceae*. *Int. J. Plant Sci.*, 167(2). p.p.: 349–358.

- van Duren M.; Mopurgo R.; Dolezel J. et Afza R., 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, 88. p.p.: 25–34.
- Vasconsuelo A. et Boland R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172. p.p.: 861–875.
- Veena V. et Taylor C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 43. p.p.: 383–403.
- Veersham C., 2004. In elicitation: medicinal plant biotechnology. C.B.S. Publisher, India. p.p.: 270-293.
- Verdrager J., 1978. Plantes médicinales dans les médicaments modernes. Maloine.S.A, Paris. 221p.
- Verpoorte R. et Memelink J., 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13. p.p.: 181–187.
- Verpoorte R.; Van der Heijden R. et Memlink J., 2000. General strategies. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston, London. p.p.: 31-50.
- Volak J. et Jiri S., 1983. Plantes médicinales : 256 illustrations en couleurs. Ed. Grund, Paris. 319p.
- Waller G.R. et Nowacki E.K., 1978. An alkaloid biology and metabolism in plants. Plenum, New York. p.p.: 121–141.
- Wan Y.; Petolin J.F. et Widholm J.M., 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.*, 77. p.p.: 889–892.
- Weaver S.E. et Warwick S.I., 1984. The biology of Canadian weeds: *Datura stramonium*. *Can. J. Bot.*, (64). pp: 979-991.
- Wendel J.F., 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 42(1). p.p.: 225-249.
- Wendel J.F. et Doyle J., 2005. Polyploidy and evolution in plants. Diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants. CABI Publishing. p.p.:97–117.
- White F.F. et Nester E.W., 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *Journal of Bacteriology*. p.p.: 710-720.
- White F.F.; Taylor B.H.; Huffman G.A.; Gordon M.P. et 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. p.p.: 33-44.
- White L.O., 1972. The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to *rhizobia* and other *agrobacteria*. *J Gen Microbiol.*, 72. p.p.: 565-574.
- Wielanek M. et Urbanek H., 2006. Enhanced glucotropaeolin production in *hairy root* cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86. p.p.: 177-186.

- Willmitzer L.; Sanchez-Serrano J.; Busfeld E. et Schell J., 1982. *Mol. Gen. Genet.*, 186. 16p.
- Windels P.; De Buck S. et Depicker A., 2008. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation: patterns of T-DNA integration into the host genome. p.p.: 441-482.
- Wink M., 1997. Special nitrogen metabolism. Dans: *Plant Biochemistry*, Academic Press. 440p.
- Wink M., 2003a. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Ed. *Phytochemistry*, 64. p.p.: 3–19.
- Wink M., 2003b. Alkaloids: properties and determination. Ed. *Phytochemistry*. p.p.: 126-134.
- Wink M., 2007. Ecological roles of alkaloids. Fattorusso E. and O. Tagliatila-Scafati. p.p.: 3-24.
- Wlodarczyk A., 2010. Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Thèse Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 152p.
- Woese C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, (51). p.p.: 221-27
- Wongpiyasatid A.; Hormchan P. et Rattanadilok N., 2003. Preliminary Test of Polyploidy Induction in Cotton (*Gossypium arboreum*) Using Colchicine Treatment. 6p.
- Wood T.E.; Takebayashi N.; Barker M.S.; Mayrose I.; Greenspoon P.B. et Rieseberg L.H., 2009. The frequency of polyploïde speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33). p.p.: 13875-13879.
- Wu J.D.; Wong K.; Ho K.P. et Zhou L.G., 2005. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme Microb Technol*, 36. p.p.: 133-138.
- Wu J.-H. et Mooney P., 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70. p.p.: 99–104.
- Xu L.; Najeeb U.; Naeem M.S.; Daud M.K.; Cao J.S.; Gong H.J.; Shen W.Q. et Zhou W.J., 2010. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. *Biologia Plantarum*, 54(4). p.p.: 659-663.
- Yamada Y. et Tabata M., 1997. Plant biotechnology of tropane alkaloids. *Plant Biotechnol.*, 14. p.p.: 1-10.
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M., Fang, X.W., 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152, 217–224.
- Yap J.W. ; Clyde M.M. ; Kandasamy K.I. ; Madon M. et Koutoulis A., 2010. Colchicine-mediated polyploid induction in Acacia for the breeding of seedless triploid trees. 6p.
- Ye Y.M.; Tong J.; Shi X.P.; Yuan W. et Li G.R., 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Scientia Horticulturae*, 124. p.p.: 95–101.

- Ye Z.; Wang Y.Y. et Tian A.H.Q., 2009. Regeneration of plantlets and tetraploidy induction in *Pseudostellaria heterophylla*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 51(2). p.p.: 13–18.
- Yendo A.C.A.; de Costa F.; Gosmann G. et Fett-Neto A.G., 2010. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: Elicitation strategies and target genes to improve yields. *Mol. Biotechnol.*, 46. p.p.: 94–104.
- Yoshikawa M., 1978. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Nature*, 275. p.p.: 546–547.
- Yu L.J.; Lan W.Z.; Qin W.M. et Xu H.B., 2002. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells. *Process Biochem.*, 38. p.p.: 207–210.
- Zabetakis I.; Edwards R. et O'Hagan D., 1999. Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1). p.p.: 53–56.
- Zambryski P.; Tempe J. et Schell J., 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*, 56. p.p.: 193–201.
- Zenk M.H. et Juenger M., 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review*, 68. p.p.: 2757 – 2772.
- Zhang C.-H.; Wu J.-Y. et He G.-Y., 2002. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biot.*, 60. p.p.: 396–402.
- Zhang L.; Ding R.; Chai Y.; Bonfill M.; Moyano E.; Oksman-Caldentey K.M.; Xu T.; Pi Y.; Wang Z.; Zhang H.; Kai G.; Liao Z.; Sun X. et Tang K., 2003. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger hairy root* cultures. *The National Academy of Sciences of the USA*, 101(17). p.p.: 6786–6791.
- Zhang X.-Y.; Hu C.-G. et Yao J.-L., 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167. p.p.: 88–94.
- Zhang Z.; Dai H.; Xiao M. et Liu X., 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica*, 159. p.p.: 59–65.
- Zhao J.; Fujita K.; Yamada J. et Sakai K., 2001. Improved b-thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55. p.p.: 301–305.
- Zhou L.; Wang J. et Yang C., 1998. Progress on plant *hairy root* culture and its chemistry. Induction and culture of plant *hairy roots*. *Nat. Product Res. Dev.*, 10. p.p.: 87–95.
- Zhou X.R. et Christie P.J., 1999. Mutagenesis of the *Agrobacterium VirE2* single stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with *VirE1* and a permissive site for hybrid protein construction. *J. Bacteriol.*, 181. p.p.: 4342–4352.
- Zhu J.; Oger P.M.; Schrammeijer B.; Hooykaas P.J.J.; Farrand S.K. et Winans S.C., 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.*, 182. p.p.: 3885–3895.
- Zhu Z.T.; Kang X.Y.; Zhang Z.Y., 1998. Studies on selection of natural triploids of *Populus tomentosa*. *Sci. Silvae Sinicae*, 34. p.p.: 22–31.

Annexes

Annexe 1 Composition chimique du milieu de culture Murashige et Skoog (1962).

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

Annexe 2 Composition chimique du milieu B5 (Gamborg et al., 1968)

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

Annexe 3

- Préparation d'une solution de 0,002M de la 8-hydroxyquinoléine
 - Pour 100 ml d'eau distillée on met 0.03 g de la poudre de 8-hydroxyquinoléine;
 - Mettre à ébullition de 70° C et plus jusqu'à ce que la coloration devient jaune;
 - Laisser reposer et avant d'être conservé dans le réfrigérateur.
- Préparation d'une solution de 0,05% de colchicine
 - Mélanger 50 mg de la poudre de colchicine avec 100 ml d'eau distillée;
 - Agitation du mélange dans un agitateur pendant quelques minutes jusqu'à obtention d'une solution homogène.

- Préparation du Carmin acétique à 0.5%
 - Faire bouillir 1 g de carmin en poudre avec 90 ml de l'acide acétique glacial et 110 ml d'eau distillée pendant 1 heure tout en évitant l'évaporation;
 - Laisser décanter jusqu'à refroidissement de la solution puis on la filtre à l'aide du papier filtre;
 - Ajouter 1 g d'acétate de fer, mélanger la solution puis filtrer si nécessaire;
 - Conserver la solution dans un flacon en verre fumé pendant plusieurs années.

Annexe 4 Effets de l'induction de la polyploïdie Sur le taux de survie

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Durée	1666,333	2	833,167	5,770	0,066
Concentration	1667,000	2	833,500	50,165	0,066
Erreur	577,622	4	144,406		
Total	3910,956	8			

Sur la quantité d'ADN

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	0,04283	3	1,428E-02	14,641	0,001
Intra-groupes	0,0078	8	9,750E-04		
Total	0,05063	11			

Test de Tukey

Lignées	N	Sous-ensembles pour $\alpha = 0,05$	
		B	A
L _{Dz}	3	0,14	
L _{DzB}	3	0,22	0,22
L _{DzA}	3		0,28
L _{DzC}	3		0,29

Tableau d'analyse de la variance (ANOVA 2)

Annexe 5 Effet de la polyploïdisation sur la biomasse (poids sec)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2,511E-03	2	1,256E-03	4,020	0,110
Intra-groupes	1,249E-03	4	3,124E-04		
Total	3,761E-03	6			

Sur la teneur en hyoscyamine

Tableau de l'analyse de la variance ANOVA1

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	24,246	2	12,123	30,876	0,004
Intra-groupes	1,571	4	0,393		
Total	25,817	6			

Test de Tukey

Lignées	N	Sous-ensembles pour $\alpha = 0,05$	
		B	A
L _{Dz}	2	4,40550	
L _{DzA}	3	5,54667	
L _{DzC}	2		9,07500

Tableau de l'analyse de la variance ANOVA1

Annexe 6 Effet de l'élicitation sur la biomasse (poids sec)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	1,247E-02	2	6,233E-03	9,230	0,004
Eliciteurs (B)	2,810E-03	2	1,405E-03	2,080	0,168
A*B	3,227E-03	4	8,066E-04	1,194	0,363
Erreur	8,104E-03	12	6,753E-04		
Total	2,797E-02	20			

Test de Tukey

Lignées	N	Sous-ensembles pour $\alpha = 0.05$	
		B	A
L _{DR}	9	0,20403	
L _{DAC}	6	0,23280	0,23280
L _{DATA}	9		0,26248

Sur la teneur en hyoscyamine

Tableau de l'analyse de la variance ANOVA2

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	89,751	2	44,876	68,567	0,000
Eliciteurs (B)	31,305	2	15,652	23,916	0,000
A*B	2,383	4	0,596	0,910	0,489
Erreur	7,854	12	0,654		
Total	130,868	20			

Test de Tukey

Lignées	N	Sous-ensembles pour $\alpha = 0.05$	
		B	A
L _{DR}	6	6,14400	
L _{DATA}	9	6,52344	
L _{DAC}	6		10,93467

Test de Tukey

Eliciteurs	N	Sous-ensembles pour $\alpha = 0.05$		
		C	B	A
SE	7	6,22871		
AAS	7		7,60114	
AS	7			9,19629

Tableau de l'analyse de la variance ANOVA2