

***INDUCTION DE CHEVELUS
RACINAIRES CHEZ TROIS ESPECES
DE *Datura*, SELECTION DE LIGNEES
PERFORMANTES POUR LA PRODUCTION
D'ALCALOÏDES***

Par : Belkacem ZAROURI

Directeur de Thèse : KHELIFI L. Professeur ENSA, El Harrach
ENSA, le : 03 / 01 / 2012

Soutenu devant le jury composé de : Président : ABDELKRIM H. Professeur ENSA, El Harrach
Examineurs: BOUJDENIBA M. Professeur ENS, Kouba KHELIFI-SLAOUI M. Prof. ENSA, El
Harrach

Table des matières

Dédicace . . .	5
Remerciements . . .	6
Résumé . . .	7
Abstract . . .	8
ص خ لم . . .	9
Liste des abréviations . . .	10
INTRODUCTION . . .	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	13
1. LES METABOLITES SECONDAIRES chez IES PLANTES . . .	13
1.1. Préambule . . .	13
1.2. Classification des métabolites secondaires . . .	14
2. LES ALCALOÏDES . . .	15
2.1. Définition et classification . . .	15
2.2. Transport, stockage et turnover . . .	17
2.3. Rôle physiologique des alcaloïdes dans la plante . . .	18
2.4. Actions physiologiques sur l'Homme et utilisation . . .	18
2.5. Les alcaloïdes tropaniques . . .	19
3. LES <i>DATURA</i> . . .	22
3.1. Généralités . . .	22
3.2. Utilisation des <i>Datura</i> : médecine traditionnelle, lutte biologique et phytoremediation . . .	22
3.3. Description botanique des espèces étudiées . . .	23
4. CHEVELUS RACINAIRES ET PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES <i>IN VITRO</i> . . .	24
4.1. Historique . . .	24
4.2. Induction des chevelus racinaires : transformation génétique par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . . .	25
4.3. Application de la culture des chevelus racinaires dans la production de métabolites secondaires <i>in vitro</i> . . .	26
4.4. Autres applications . . .	26
5. STRATEGIES POUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES <i>IN VITRO</i> . . .	27
5.1. Sélection des lignées racinaires . . .	27
5.2. Optimisation du milieu de culture . . .	28
5.3. Elicitation . . .	28
5.4. Perméabilisation cellulaire et libération des métabolites dans le milieu extracellulaire . . .	29
5.5. Génie génétique . . .	30
MATERIEL ET METHODES . . .	32
1. MATERIEL VEGETAL . . .	32
1.1. Obtention des chevelus racinaires . . .	32
1.2. Entretien des lignées racinaires . . .	32

2. ETABLISSEMENT DE LA CULTURE DES CHEVELUS RACINAIRES . . .	33
3. ETUDE COMPARATIVE DES LIGNEES RACINAIRES . . .	33
4. ETUDE DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES TROPANIQUES . . .	34
5. ESSAI DE CERTAINS MILIEUX DE BASE POUR LA CULTURE DES CHEVELUS RACINAIRE . . .	34
6. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN . . .	34
7. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURES . . .	35
8. ESSAI D'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE (JA) ET PERMEABILISATION PAR LE TWEEN 20 (T20) . . .	35
9. PARAMETRES ETUDIES . . .	35
9.1. Croissance en longueur et degrés de ramification . . .	35
9.2. Poids frais, poids sec et taux de croissance . . .	36
9.3. Teneur en alcaloïdes tropaniques . . .	36
10. ANALYSES STATISTIQUES . . .	37
RÉSULTATS . . .	38
1. ETUDE COMPARATIVE DES LIGNEES RACINAIRES . . .	38
1.1. Comparaison interspécifique des lignées . . .	38
1.2. Comparaison intraspécifique des lignées . . .	39
1.3. Analyse de corrélations entre les paramètres étudiés . . .	41
1.4. Comportement des chevelus racinaires sur deux modes de culture : culture stationnaire en milieu semi-solide et culture en milieu liquide avec agitation. . .	42
2. CINETIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES . . .	42
3. REPONSE DES CHEVELUS RACINAIRES À LA CULTURE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE . . .	44
4. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN . . .	45
5. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURE . . .	48
6. EFFETS SIMULTANES DE L'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE ET LA PERMEABILISATION PAR LE TWEEN 20 . . .	49
DISCUSSION . . .	55
1. ETUDE COMPARATIF DES LIGNEES RACINAIRES . . .	55
2. ETUDE DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES . . .	56
3. REPONSE DES CHEVELUS RACINAIRES À LA CULTURE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE . . .	57
4. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN . . .	58
5. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURE . . .	58
6. EFFETS SIMULTANNES DE L'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE ET LA PERMEABILISATION PAR LE TWEEN20 . . .	59
CONCLUSION . . .	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES . . .	64

Dédicace

À mes chers parents

Remerciements

Mes premiers remerciements et reconnaissances iront à Monsieur KHELIFI L., mon promoteur, pour ces orientations, ses encouragements et sa patience.

Mes remerciements iront également à Monsieur ABDELKRIM H. qui a accepté d'examiner et de présider la soutenance de ma thèse.

Je tiens à remercier Monsieur BOUJDENIBA M., qui a accepté de juger ce travail et d'être membre de jury de ma soutenance.

Je tiens aussi à remercier Madame KHELIFI M., pour avoir accepté de faire partie du jury.

Monsieur AMDOUN R. a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt, qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils.

Mademoiselle KRIMI Z. (université de Blida), nous a fourni les souches d'*Agrobacterium rhizogenes*, qu'elle trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

À Djamila, Ingénieur au laboratoire LRGB, j'adresse mes vifs remerciements, sans oublier Ladraa N. qui m'a aidé pour faire les analyses chromatographiques.

Que toute personne participée de près ou de loin à la finalisation de ce travail, trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

Résumé

La complexité et les faibles capacités productives liées à la culture de plein champ ou la culture de suspensions cellulaires pour la production d'alcaloïdes peuvent être surmontées en utilisant les chevelus racinaires. Ce travail présente l'étude de la variabilité des lignées racinaires obtenus par transformation génétique de trois espèces de *Datura*, (*D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia*) par *Agrobacterium rhizogenes*, et certaines stratégies d'amélioration de la production d'alcaloïdes via les chevelus racinaires. Une variabilité considérable a été détectée entre les lignées étudiées en termes de croissance et de la teneur en hyoscyamine. Le milieu B5 serait le plus adéquat pour la culture des chevelus racinaires. Par ailleurs, l'élicitation des chevelus racinaires de *D. stramonium* par 1 à 2g/l de NaCl améliore la teneur en hyoscyamine d'environ trois fois plus que le témoin. Cependant une dose plus élevée (3g/l) provoque un effet inverse. L'extrait de levure et l'acide jasmonique n'ont pas montré d'effet positif sur l'accumulation de l'hyoscyamine. Le T20 est un agent de perméabilisation très puissant, il permet la libération de la quasi-totalité (70 à 80%) de l'HS intracellulaire dans le milieu de culture. Cependant, il provoque une diminution considérable de la biomasse et de la viabilité des tissus racinaires.

Mots clés : *Datura sp.*, *Agrobacterium rhizogenes*, chevelus racinaires, élicitation, perméabilisation, hyoscyamine.

Abstract

The complexity and the production capacity limitations associated with whole plant and suspension cells culture for alkaloids production can be overcome using hairy roots. Here we present the study of the variability of root lines obtained by genetic transformation of three *Datura* species (*D. stramonium*, *D. innoxia* and *D. tatula*) by *Agrobacterium rhizogenes*, and some strategies for alkaloids overaccumulation in hairy root cultures. Considerable variability was detected between the studied lines in terms of growth and hyoscyamine content. The B5 medium is very suitable for hairy roots culture. Elicitation of hairy roots of *D. stramonium* by 1 to 2 g/l NaCl improves the hyoscyamine content three times higher than the control. However a higher dose (3g/l) induces an opposite effect. The yeast extract and jasmonic acid have not shown a positive effect on the accumulation of hyoscyamine. The T20 is a very strong permeabilizing agent; it allows the release of almost all (70-80%) intracellular accumulated HS in the culture medium. However, it induces a considerable decrease in biomass and root tissue viability.

Keywords: *Datura sp.*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, elicitation, permeabilisation, hyoscyamine.

ص خلم

يمكن التغلب على التعقيدات والقيود الإنتاجية المرتبطة بالزراعة الخلوية أو زراعة الخلايا النباتية من أجل إنتاج القلويات عن طريق زراعة الجذور المشجرة. هنا نقدم دراسة لتنوع الجذور المحورة الناتجة عن التحويل الجيني لثلاث أنواع من الداتورة (*D. stramonium*, *D. tatula*, *D. innoxia*) بواسطة *Agrobacterium rhizogenes* و تقييم بعض الاستراتيجيات لتحسين إنتاج القلويات في الجذور المشجرة. تبين ملحوظ في النمو وتراكم القلويات تم اكتشافه ما بين الجذور المدروسة. وسط الزرع ب5 يكون الوسط الأمثل لزراعة الجذور المحورة. تحفيز الجذور المشجرة بواسطة كلوريد الصوديوم من 1 إلى 2 غرام/ل حسن محتوى الهيوسيامين ثلاث مرات أكثر من الشاهد، و لكن جرعة أعلى (3 غرام/لتر) تؤدي إلى نتائج عكسية. خلاصة الخميرة وحمض الجاسمونيك لم يظهر لهما أثر إيجابي على تراكم الهيوسيامين. التوبين 20 عمل فعال لاستخلاص القلويات الخلوية في وسط الزرع، يسمح باستخراج ما يقرب 70 إلى 80٪ من القلويات المتراكمة في خلايا الجذور ولكنه يؤدي إلى انخفاض كبير في الكتلة الحيوية للجذور.

كلمات المفتاح: *Agrobacterium rhizogenes* ، الجذور المشجرة، تحفيز، إنقاذ، هيوسيامين.

Liste des abréviations.

- **Milieu MS:** milieu de culture Murachige et Skoog (1962).
- **Milieu B5 :** milieu de culture Gamborg *et al.* (1968)
- **Milieu LS :** milieu de culture Linsmaier et Skoog (1965).
- **MS:** matière sèche.
- **rpm:** tours par minute.
- **Pf :** poids frais
- **Ps :** Poids sec
- **HS :** hyoscyamine
- **JA :** Acide jasmonique
- **T20 :** Tween 20
- **r :** Coefficient de corrélation de Pearson
- **Rend:** rendement
- **YE:** Yest extract
- **YEM:** milieu à base d'extrait de levure (Yeast Extract) et de Mannitol
- **L :** longueur de la racine principale en cm
- **Dr :** degré de ramification exprimé par le nombre de ramifications latérales sur la racine principale.

INTRODUCTION

Les alcaloïdes qui forment une grande famille de métabolites secondaires présentent un intérêt économique incontestable de par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications nombreuses en médecine (Richter, 1993 ; Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Le genre *Datura* produit une large gamme d'alcaloïdes, deux parmi eux, l'hyoscyamine et la scopolamine ont un intérêt certain pour l'industrie pharmaceutique (Facchini, 2001 ; Berkov *et al.*, 2003 ; 2006). Pour ses besoins pharmaceutiques, l'Algérie importe ces alcaloïdes et ce, malgré la présence en Algérie, à l'état spontané, de nombreuses ressources génétiques de *Datura* (Houmani, 1999), qui peuvent être valorisées pour une production locale de ces substances.

La production d'alcaloïdes tropaniques se fait essentiellement à partir de plantes cultivées sous serres ou en plein-champs, car leur synthèse par voie chimique est trop onéreuse (Wink, 1990 ; Kim *et al.*, 2002 ; Sevon et Oksman-Caldentey, 2002 ; Namdeo, 2007). Cependant, le niveau de production de ces métabolites dans les plantes entières est affecté par l'ontogenèse de la plante (Benhizia, 1989 ; Miraldi *et al.*, 2001 ; Berkov *et al.*, 2005 ; Iranbakhsh *et al.*, 2006), les pathogènes et les facteurs édapho-climatiques (Cosson, 1969 ; Kamada *et al.*, 1986 ; Baricevic *et al.*, 1999 ; Berkov *et al.*, 2006 ; Zayed et Doncheva, 2006). De plus, ceci constitue une concurrence en termes d'occupation des terres pour la production alimentaire (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002). La recherche d'une production indépendante des aléas environnementaux et les besoins accrus en produits purs a incité de nombreux chercheurs à utiliser les techniques de culture *in vitro* (Zryd, 1988 ; Verpoorte *et al.*, 2002 ; Namdeo, 2007).

Les racines végétales sont dotées de fortes capacités de biosynthèse. Plusieurs alcaloïdes faiblement synthétisés dans les suspensions cellulaires sont accumulés à des niveaux relativement élevés dans les cultures racinaires (Zhi-bu et Min, 2006). Actuellement, un intérêt particulier est accordé à la production de métabolites secondaires par la culture *in vitro* de racines génétiquement modifiées issues de transformation par *Agrobacterium rhizogenes*. Celles-ci sont connues sous le terme de chevelus racinaires, « *Hairy Roots* » en anglais (Hilton et Rhodes, 1990 ; Nussbaumer *et al.*, 1998, Moyano *et al.*, 1999 ; Guillon *et al.*, 2006 a et b ; Srivastava et Srivastava, 2007). Les chevelus racinaires sont caractérisés par une croissance rapide (Souret *et al.*, 2003 ; Kovalenko et Maliuta, 2003), une bonne stabilité génétique et des rendements accrus en métabolites secondaires (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993 ; Shanks et Morgan, 1999).

L'obtention de chevelus racinaires suite à la transformation génétique des *Datura* par *Agrobacterium rhizogenes* a été étudiée dans des travaux antérieurs (Zarouri, 2006 ; Ladraa, 2007 ; Amdoun *et al.*, 2009). Une fois l'établissement de la culture des chevelus racinaires des *Daturas* est acquis, l'étape suivante consiste à sélectionner des lignées performantes puis optimiser les conditions de culture pour améliorer la production de la biomasse et d'alcaloïdes tropaniques. Différentes stratégies ont été mises au point pour l'amélioration de la production de métabolites secondaires par la culture *in vitro* de cellules et tissus de différentes espèces végétales. L'optimisation du milieu de culture quantitativement et qualitativement, l'élicitation par les facteurs de stress biotiques et/ou abiotiques et la perméabilisation cellulaire pour la libération des produits accumulés dans le milieu de culture

sont parmi les stratégies les plus appliquées dans ce but (Dicosmo et Misawa, 1995 ; Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002 ; Guillon *et al.*, 2006a ; Georgiev *et al.*, 2007).

Ainsi, le but final du présent travail est l'optimisation de la production d'alcaloïdes tropaniques, notamment l'hyoscyamine et la scopolamine à partir des chevelus racinaires issus de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* de trois espèces de *Datura* (*D. innoxia*, *D. stramonium* et *D. tatula*).

L'aboutissement de cet objectif passe par deux phases:

La première phase consiste à générer et évaluer une gamme de lignées racinaires en vue de sélectionner les plus performantes.

La deuxième phase du travail est centrée sur l'étude de :

1. La cinétique de croissance et d'accumulation des alcaloïdes au cours du temps de culture des chevelus racinaires
2. La réponse des chevelus racinaires à la culture dans différents milieux.
3. L'élicitation des cultures racinaires par le stress salin.
4. L'élicitation par l'extrait de levure.
5. La combinaison : élicitation par l'acide jasmonique et perméabilisation par le tween 20.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES METABOLITES SECONDAIRES chez IES PLANTES

1.1. Préambule

Le métabolisme végétal est un processus très dynamique, les molécules sont en continuels renouvellement, toute cellule à un instant donné est en équilibre entre synthèse et dégradation. L'essentiel des synthèses est orienté vers la production de molécules qui sont vitales pour la structure et le fonctionnement cellulaire, ce sont les métabolites primaires (lipides, protéines, glucides et acides nucléiques) (Dewick, 1997 ; Hopkins, 2003). Cependant, chez les plantes, il existe diverses voies de biosynthèse dérivant du métabolisme primaire qui ne sont pas essentielles pour la survie des organismes, de telles voies sont connues sous le terme général de « métabolisme secondaire ». Ces voies sont très rares chez les animaux supérieurs, bien qu'elles soient occasionnellement présentes chez les insectes et certains invertébrés (Edwards et Gatehouse, 1999). Les produits de ces voies de biosynthèse ont reçu le nom de métabolites secondaires ou produits naturels (Hartmann, 2007).

Les métabolites secondaires ne font pas *sensu stricto*, partie des matériaux de base de la cellule. Lorsque ces molécules sont présentes, elles ne se trouvent normalement que dans des tissus ou dans des organes particuliers ou à des stades précis du développement, de plus, elles se trouvent en faible quantité (Verpoorte *et al.*, 2002 ; Hopkins, 2003). Si on se limite uniquement aux métabolites secondaires des plantes, la diversité des composés découverts est énorme, environ 200000 molécules ont été décrites, d'autres sont encore en cours de caractérisation (Hartmann, 2007). Malgré cela, chaque espèce végétale synthétise un nombre limité de molécules bien définies. Les plantes génétiquement apparentées accumulent des produits similaires confirmant ainsi que les différences observées au sein des métabolites secondaires sont apparus au cours des premiers stades de l'évolution des espèces végétales (Edwards et Gatehouse, 1999 ; Taiz et Zeiger, 2002).

Dans les anciennes études, bien que l'intérêt des métabolites secondaires pour l'homme était bien reconnu, leur importance pour les plantes ne l'était pas encore (Edwards et Gatehouse, 1999). En effet, ces molécules ont été considérées comme produits de déchet du métabolisme primaire (Hartmann, 2007). Cependant, il est actuellement bien établi que les métabolites secondaires jouent un rôle substantiel dans les relations de la plante avec son environnement, et leurs fonctions majeures sont nombreuses:

- Défense contre les herbivores (insectes, mollusques, vertébrés).
- Défense contre les microorganismes (virus, bactéries, champignons).
- Réponse et adaptation aux conditions de stress abiotique
- attraction des pollinisateurs ou des animaux disséminateurs de semences.
- Rôle dans les interactions plante-plante en tant qu'herbicides (phénomène de l'allélopathie) ou en tant qu'agents de signalisation (Wink, 1990 ; Edwards et Gatehouse, 1999 ; Taiz et Zeiger, 2002 ; Hartmann, 2007).

Ainsi, depuis que les métabolites secondaires ont été découverts comme facteur essentiel intervenant dans les interactions des plantes avec d'autres organismes, beaucoup d'entre eux ont montré des activités biologiques ou pharmaceutiques intéressantes pour l'homme, par conséquent, certains métabolites ont été utilisés comme remèdes, arômes, parfums, stimulants, colorants ou pesticides (Wink, 1990).

1.2. Classification des métabolites secondaires

Les plantes produisent un large spectre de métabolites secondaires, qui sont souvent répartis selon leurs origines biosynthétiques et leurs caractéristiques chimiques en trois groupes majeurs, les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes (Dewick, 1997 ; Taiz et Zeiger, 2002). La Figure 1 représente dans une forme simplifiée les voies impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires, ainsi que leurs relations avec le métabolisme primaire.

1.2.1. Les alcaloïdes

Etant donné l'intérêt central de ce groupe de composés dans le présent travail, une section entière lui est réservée ci-dessous.

1.2.2. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols ou encore dérivés phénylpropanoïdes forment une grande famille de composés chimiques hétérogènes, généralement subdivisée en quatre grands classes de composés : Les acides phénoliques, les flavones, les anthocyanes et les tanins (Taiz et Zeiger, 2002 ; Hopkins, 2003). Les constituants de ce groupe contiennent exclusivement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, ils se reconnaissent par la présence d'un ou de plusieurs groupes hydroxyle, modifiés ou non, attachés à une structure aromatique (Richter, 1993 ; Bruneton, 1995).

Les plantes supérieures disposent de trois voies réactionnelles pour synthétiser les cycles aromatiques des composés phénoliques. La voie la plus commune est celle de l'acide shiquimique (Bruneton, 1995; Dewick, 1997). Les composés phénoliques sont aussi formés par condensations répétées d'unités acétate, c'est la voie de l'acétate. La troisième voie possible est la voie acétate-mévalonate, dans l'ensemble cette voie est peu utilisée chez les plantes supérieures (Richter, 1993 ; Bruneton, 1995).

1.2.3. Les Terpénoïdes

Les terpénoïdes (terpènes ou isoprénoïdes) constituent le plus large groupe connu des métabolites secondaires végétaux avec plus de 30.000 composés (Hartmann, 2007). Ce sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à 5 atomes de carbone : l'isoprène (Dewick, 1997; Taiz et Zeiger, 2002 ; Hopkins, 2003). Bien que ces substances ne soient constituées que par des éléments carbone, hydrogène et oxygène, ce groupe se distingue par le nombre inhabituellement élevé de ses composés, qui trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblage (Richter, 1993).

Malgré leur diversité, tous les terpènes ainsi que leurs dérivés possèdent en commun une voie de biosynthèse appelée voie de l'acide mévalonique. Les composés et les dérivés terpéniques peuvent être considérés en tant que polymères du 5-carbone 2-méthyl-1, 3-butadiène ou isoprène, d'où le terme de composés isopréniques (Bruneton, 1995). La famille

des terpènes comprend des hormones (gibbérélines, acides abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle), des stérols (ergostérol, sitostérol, cholestérol), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (Richter, 1993).

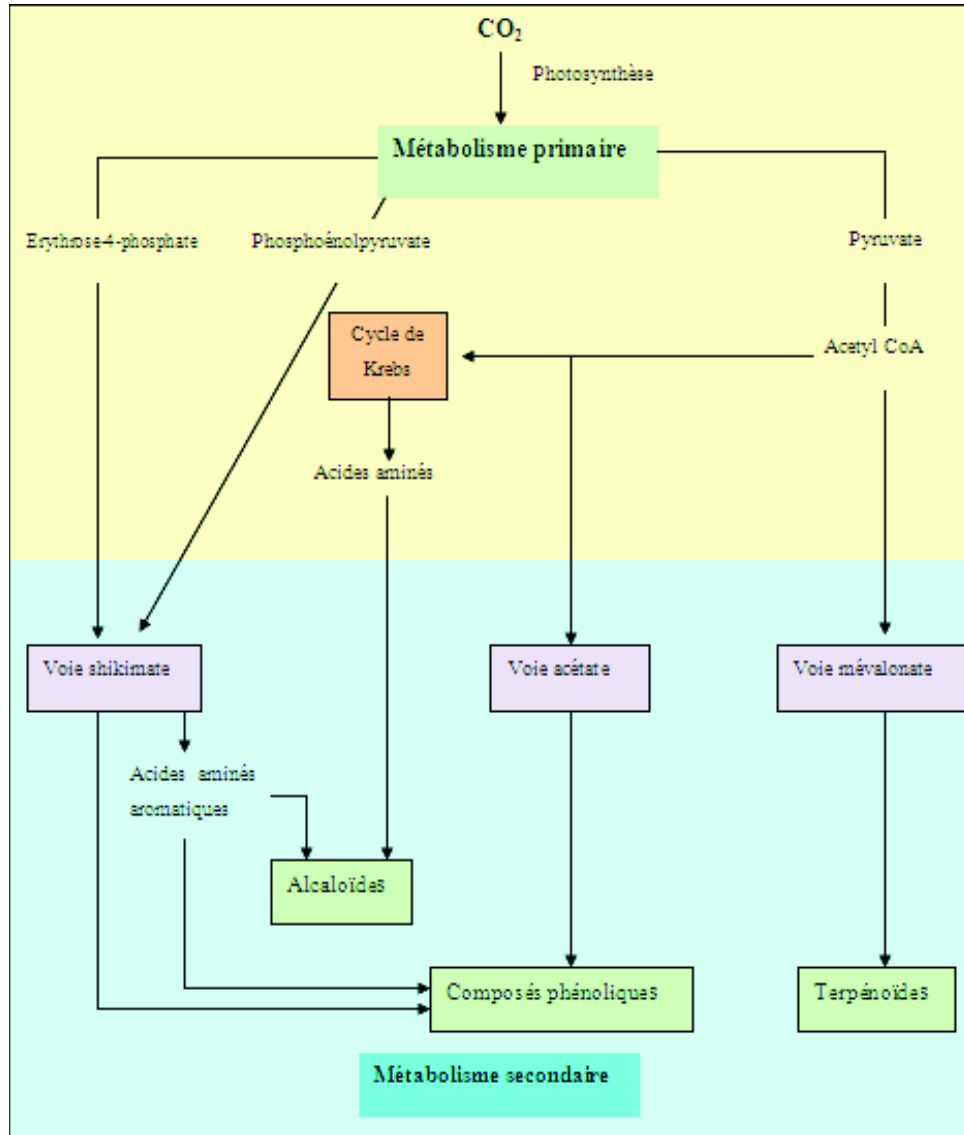


Figure 1. Schéma simplifié des voies majeures de biosynthèse des métabolites secondaires et leurs interconnexions avec le métabolisme primaire (adaptée à partir de Taiz et Zeiger, 2002).

2. LES ALCALOÏDES

2.1. Définition et classification

Le terme "alcaloïde" a été introduit par Meisner W. au début du 19^{ième} siècle pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases (Bruneton, 1995; Aniszewski, 2007), le terme est linguistiquement dérivé du mot arabe al-kali (*Salsola kali*), la plante à partir de laquelle la soude a été extraite pour la première fois (Kutchan, 1995).

La définition du terme "alcaloïde" n'est pas des simples, en effet, elle a constitué une source de controverses académiques à plusieurs reprises, ceci est dû aux similarités que présentent les alcaloïdes avec les autres composés secondaires (Aniszewski, 2007). Selon Wintersteine et Tier (1910), cité par Aniszewski (2007), les principales caractéristiques qui regroupent ces composés sont:

- Toxicité plus ou moins marquée, principalement sur le système nerveux central.
- Structure moléculaire caractérisée par la présence d'un système hétérocyclique et de l'azote.
- Synthèse à partir des aminoacides ou de leurs dérivés immédiats.
- Distribution limitée dans la nature.

Selon Bruneton (1995), un alcaloïde est défini comme étant un composé organique d'origine naturelle, plus ou moins basique, contenant un atome d'azote, d'une distribution limitée et possédant, à de faibles doses, des propriétés pharmacologiques prouvées.

Bien que certaines différences existent entre les définitions données aux alcaloïdes, les scientifiques s'accordent sur l'intérêt vital que constituent ces composés en chimie, en biologie et en médecine. Environ 20% des plantes vasculaires synthétisent des alcaloïdes, ces plantes se rencontrent aussi bien chez les monocotylédones que chez les dicotylédones. Chez les dicotylédones, l'alcaloïde principal est souvent accompagné de nombreux alcaloïdes satellites (Richter, 1993). Vingt-trois alcaloïdes en plus des alcaloïdes majeurs (hyoscyamine et scopolamine) ont été détectés par GC-MS (Chromatographie gazeuse couplé au spectrométrie de masse) au niveau des plantes de *D. stramonium* (Berkov *et al.*, 2006). Les alcaloïdes sont souvent classés, en huit groupes, en fonction du cycle contenant l'azote dans la molécule (Dewick, 1997). Le Tableau1 présente les principales classes d'alcaloïdes, la structure de base du cycle, ainsi que les exemples représentatifs de chaque classe.

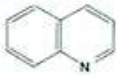
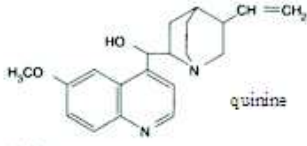

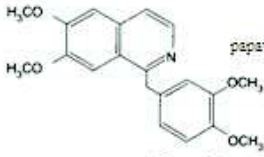
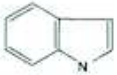
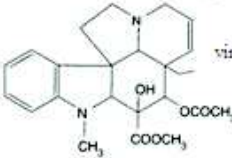
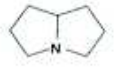
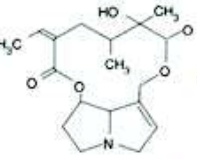
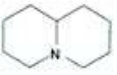
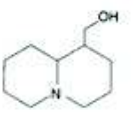

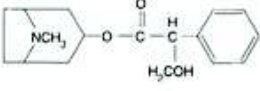

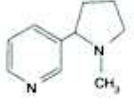
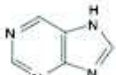
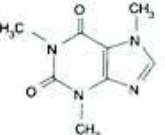
Classe d'alcaloïde	Exemple	Autres composés
Quinoléine 	 quinine	
Isoquinoléine 	 papaverine	morphine codéine berbérine
Indole 	 vindoline	vinblastine reserpine strychnine
Pyrolizidine 	 senecionine	rétorsine
quinolizidine 	 lupinine	cytisine
tropane 	 atropine	Scopolamine cocaïne
Pipéridine 	 nicotine	conine
Purine 	 caféine	

Tableau 1. Les principales classes d'alcaloïdes (Hopkins, 2003).

2.2. Transport, stockage et turnover

L'accumulation et le stockage des métabolites secondaires ne sont pas le résultat de simples processus. Au contraire, ils reflètent les interactions complexes entre biosynthèse, transport, stockage et dégradation. Les alcaloïdes se trouvent dans les plantes sous la forme de sels d'acides organiques solubles dans l'eau. Les composés libres ne sont au contraire solubles que dans les solvants organiques (Richter, 1993), ce qui facilite leur isolement et leur purification en solution (Dewick, 1997). Les alcaloïdes sont très souvent synthétisés dans des sites spécifiques (racines en croissance, cellules laticifères, chloroplastes). Ils sont par la suite transportés vers les sites de stockage. Le caractère basique des alcaloïdes et leur activité antimétabolique rendent leur compartimentation nécessaire, ils sont normalement stockés dans les vacuoles cellulaires (Wink, 1990 ; Bruneton, 1995). D'autre part, il est à noter que les alcaloïdes ne sont pas des substances métaboliques terminales qui sont déposées dans la vacuole sans autres utilisations possibles. Au contraire, de

nombreux alcaloïdes subissent des reconversions dans la plante, ils se comportent donc comme des produits intermédiaires dont la concentration stationnaire serait particulièrement élevée. Cette dynamique de leurs échanges se manifeste entre autre par des oscillations journalières caractéristiques du contenu en alcaloïdes (Wink, 1990 ; Richter, 1993).

2.3. Rôle physiologique des alcaloïdes dans la plante

Le métabolisme secondaire des plantes a été adapté au cours de l'évolution pour accomplir certaines fonctions biologiques tel que la défense contre les agresseurs ou l'attraction de pollinisateurs. Ainsi, afin de comprendre la complexité du métabolisme secondaire il est nécessaire de comprendre leurs fonctions. Ces connaissances sont utiles dans la manipulation de la biosynthèse des métabolites secondaires dans le matériel biologique (cultures cellulaires ou hairy roots) ; à titre d'exemple l'induction de certains produits par des éliciteurs a clairement pris son origine à partir des réactions de défense inductibles des plantes contre les agresseurs (Wink, 1990).

Le rôle classique attribué aux alcaloïdes est basé sur l'hypothèse selon laquelle les alcaloïdes ont seulement une fonction de protection dans les interactions des plantes avec les autres organismes et avec leur environnement. Les plus importantes fonctions biologiques des alcaloïdes connues dans ce sens sont la protection contre les pathogènes et les herbivores, la protection des plantes contre les stress physiques tel que les rayons U.V. et la chaleur, le stockage de l'azote et la stimulation de la croissance (Richter, 1993; Hopkins, 2003). Bien qu'il existe de fortes preuves concernant ce genre d'activités, il n'est pas entièrement clair s'il s'agit ou non de la fonction de base de ces composés dans les organismes qui les produisent. Selon Aniszewski (2007), l'idée qui commence à prendre de l'ampleur actuellement est l'hypothèse selon laquelle, le rôle écologique des alcaloïdes (rôle externe) est considéré comme une fonction secondaire, et que leur fonction primaire est liée à la régulation du métabolisme en contrôlant l'expression des gènes (rôle interne).

2.4. Actions physiologiques sur l'Homme et utilisation

L'activité biologique des alcaloïdes a été bien connue depuis le début de la civilisation humaine. Ils ont été utilisés en phytothérapie traditionnelle pour soigner les maladies, comme poisons dans l'armement durant les guerres tribales, pour la chasse, et pour la sorcellerie, et ils continuent à susciter l'intérêt de l'Homme pour tirer profit de leurs bienfaits sur la santé (Aniszewski, 2007). De nombreux alcaloïdes se distinguent par une action physiologique caractéristique sur l'Homme et sur les animaux, en particulier au niveau du système nerveux où ils interfèrent avec les neurotransmetteurs (Richter, 1993 ; Bruneton, 1995). A forte dose la plus part des alcaloïdes sont toxiques, par contre, à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique d'où leur utilisation dans la médecine depuis l'antiquité (Hopkins, 2003). Ceci a conduit à une large utilisation des plantes contenant les alcaloïdes. Si certaines sont utilisées sous forme galénique (*Belladonna*, *Datura*, *Hyoscyamus*), plusieurs autres sont utilisées comme matière première pour l'extraction industrielle, citant à titre d'exemple la morphine à partir de l'opium, l'ajmalicine à partir du *Catharanthus* (Bruneton, 1995) la scopolamine et l'hyoscyamine à partir des *Datura* (Dethier *et al.*, 1993). Parmi tous les métabolites secondaires, les alcaloïdes sont les seules molécules d'origine naturelle ayant des bienfaits assez considérables, notamment, pour leurs utilisations cliniques. Ils peuvent être considérés comme les plus utiles et au même temps, les plus dangereux produits de la nature (Aniszewski, 2007).

2.5. Les alcaloïdes tropaniques

2.5.1. Définition, Structure et voie de biosynthèse

Plus de 150 alcaloïdes ont été isolés dans ce groupe, ils sont synthétisés essentiellement par les *Solanaceae*, mais ils existent aussi chez les *Erythroxylaceae*, les *Proteaceae*, les *Convolvulaceae*, et les *Rhizobiaceae* (Bruce, 1996). Mis à part quelques exceptions, les alcaloïdes tropaniques sont des esters d'alcools tropaniques et d'acides de différentes structures, aussi bien aliphatiques qu'aromatiques. Ils ont en commun l'élément structural bicyclique contenant l'azote : azabicyclo [3, 2, 1] octane (Bruneton, 1995). On distingue deux séries d'alcaloïdes tropaniques selon l'orientation du groupe hydroxyle à la position 3 du noyau tropane : ceux dérivant du pseudotropanol (ex : Ecgonine), ils sont essentiellement spécifiques aux *Erythroxylaceae*, et ceux dérivant du tropanol, ils sont de loin les plus connus (Bruneton, 1995). Les plus importantes molécules de ce dernier groupe sont : la scopolamine, l'hyoscyamine et l'atropine. Ces derniers sont fréquents chez les *Solanaceae*, et sont particulièrement présent dans diverses espèces appartenant aux genres : *Acnistus*, *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *hyoscyamus*, *Mandragora*, *Przewalskia* et *Scopolia* (Bruneton, 2005; Aniszewski, 2007).

L'hyoscyamine (Figure 2) est un ester du tropanol (ou tropine) et de l'acide tropique, il peut subir facilement une isomérisation racémique surtout durant l'extraction pour se transformer en atropine (Miraldi *et al.*, 2001). Un simple reflux dans le chloroforme par exemple est suffisant pour induire une telle transformation (Bruneton, 1995).

La scopolamine (Figure 3), connue aussi sous le nom de l'hyoscine est un ester du scopanol et de l'acide tropique (Bruneton, 1995).

Les alcaloïdes tropaniques sont produits à proximité des apex racinaires, ils sont cependant, accumulés dans les vacuoles des racines et des feuilles (Wink, 1999). Différents précurseurs sont impliqués dans leur élaboration:

- La phénylalanine est à l'origine de l'acide atropique.
- L'ornithine, acide aminé non protéique, issue de l'arginine chez les animaux et du glutamate chez les plantes est un précurseur du cycle pyrrolidine du noyau tropane.
- L'acétate (sous forme de l'acétoacétyl CoA) est à l'origine des atomes de carbone additionnels nécessaires pour la construction du cycle pipéridine du noyau tropane (Bruneton, 1995 ; Dewick, 1997; Aniszewski, 2007).

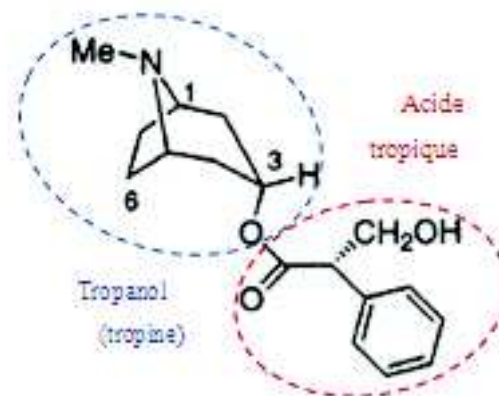


Figure 2. L'Hyoscyamine, un ester du tropanol et de l'acide tropique (adapté à partir de Richter, 1993).

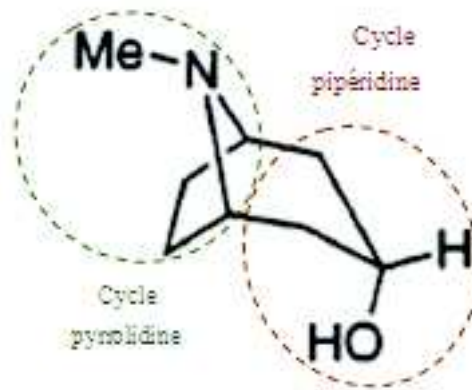


Figure 3. Le Noyau tropane, constitué par l'assemblage du cycle pyrrolidine issu de l'ornithine et du cycle pipéridine issu de l'acétate (adapté à partir de Richter, 1993).

Formation du noyau tropane (Figure 4): L'ornithine (1) est rapidement décarboxylé en putrescine (2), qui est par la suite méthylée. L'oxydation du N-méthylputrescine (3) conduit à la formation de 4-méthyl-aminobutanal qui subit subséquentement une cyclisation pour former un sel : N-méthyl- Δ^1 -pyrrolinium. L'étape clé de la biosynthèse du noyau tropane est l'attaque du sel N-méthyl- Δ^1 -pyrrolinium par le C-2 de l'acétoacétyl-CoA, le produit ainsi naissant est décarboxylé pour former l'hygrine, ce dernier est oxydé en 5-acétonyl-1-méthyl- Δ^1 -pyrrolinium puis converti en tropinone (4), la cétone est réduite par la suite pour former le tropanol ou la tropine (5) (Bruneton, 1995; Dewick, 1997; Facchini, 2001). L'estérification du tropanol par l'acide tropique (6), dérivé de la phénylalanine en transitant par l'acide cinnamique conduit à la formation de l'hyoscyamine (7) (Facchini, 2001). Ce dernier est synthétisé dans la racine, et est partiellement transformé en scopolamine au moment de son transfert vers la partie aérienne de la plante (Richter, 1993), cette réaction de transformation est catalysée par l'enzyme : Hyoscyamine-6 β -hydroxylase (H6H) (Hashimoto *et al.*, 1987). Cette enzyme catalyse d'abord l'hydroxylation de l'hyoscyamine au niveau de la position 6 β du noyau tropane, donnant naissance ainsi à l'hydroxyhyoscyamine (Dewick, 1997), qui est suivie par une réaction d'époxydation pour former la scopolamine (8) (Bruce, 1996).

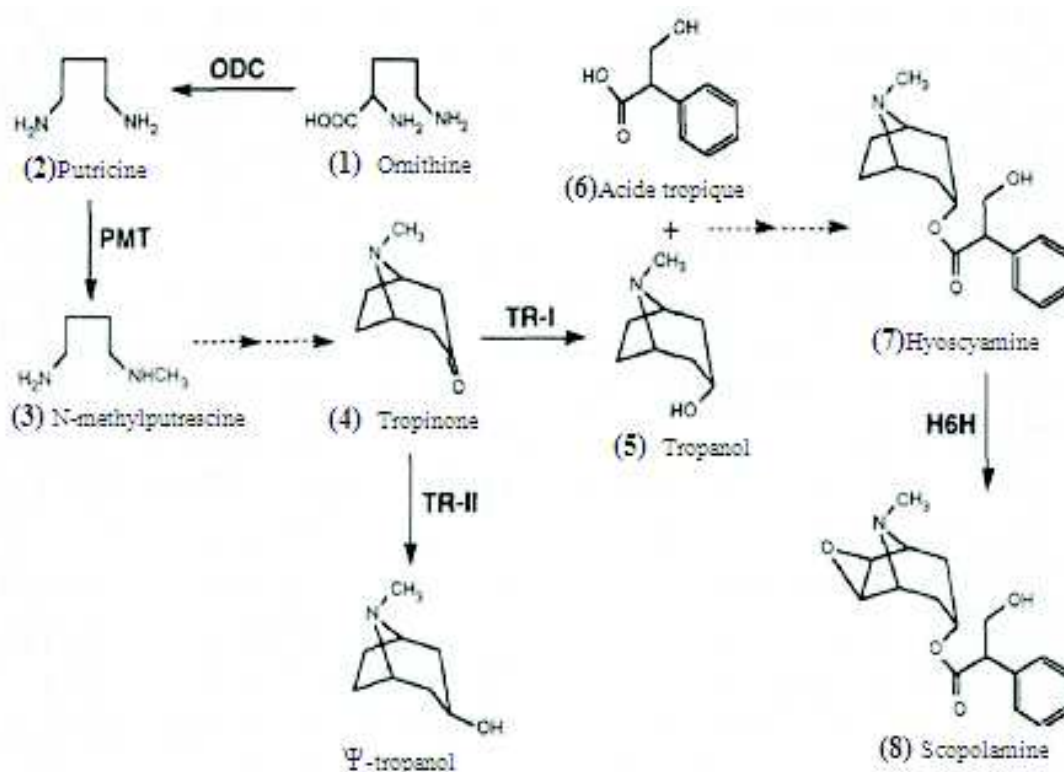


Figure 4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques, Hyoscyamine et scopolamine. ODC : ornithine décarboxylase ; PMT : Putrescine N-méthyltransferase ; TR-I : tropinone réductase-I ; TR-II : tropinone réductase-II ; H6H : hyoscyamine 6B-hydroxylase (adapté à partir de Facchini, 2001).

2.5.2. Activités pharmacologiques et utilisation

D'une manière générale, les plantes contenant les alcaloïdes tropaniques sont pour la quasi-totalité des plantes médicinales. Dans la Chine ancienne, les plantes médicinales ont été connues et utilisées depuis 770 ans avant JC, et en Mésopotamie depuis 2000 ans avant JC, où l'utilisation de la belladone *Atropa belladonna* a été notamment signalée, alors que l'utilisation de *Datura metel* a été signalée en Inde ancienne (Aniszewski, 2007). En effet, les alcaloïdes tropaniques sont d'une grande importance, et sont jusqu'à présent industriellement extraits à partir de solanacées médicinales tel que *Brugmansia*, *Duboisia*, *Belladonna*, et *Datura* (Edward et Gatehouse, 1999; Bruneton, 2005). Selon Aniszewski (2007), au moins 50 produits pharmaceutiques préparés à base d'atropine, d'hyoscyamine et de scopolamine ont été développés et introduits dans le marché du médicament.

L'hyoscyamine et son isomère racémique, l'atropine: ce sont des substances à intérêt considérable, elles ont des propriétés parasympatholytiques, et constituent le point de départ à partir duquel la chimie organique de synthèse a créé la plupart des substances anticholinergiques. L'hyoscyamine possède une activité plus forte que l'atropine, mais, c'est ce dernier qui est communément préparé et utilisé (Bruneton, 1995). L'atropine est un inhibiteur des récepteurs muscariniques des organes périphériques innervés par les fibres parasympathiques. Elle agit par compétitivité et inhibition réversible de l'acétylcholine en se reliant à ses récepteurs (Aniszewski, 2007). En ophtalmologie, l'atropine induit une mydriase passive (dilatation de la pupille), d'où ses effets mydriatiques (Richter, 1993, Bruneton,

1995). En plus de ses effets sur le système nerveux autonome, l'atropine présente aussi des effets sur le système nerveux central (CNS). À forte dose, elle cause des excitations substantielles: agitation, désorientation, réflexes exagérés, hallucination, délire, confusion mentale et insomnie. À faible dose, elle présente des effets dépressifs et sédatifs (Bruneton, 1995). L'atropine très employée, notamment en pré-anesthésie, peut être aussi utilisé comme un antidote des gaz de combat organophosphorés (Bruneton, 2005).

La scopolamine: L'activité parasympholytique de cette alcaloïde est identique à celle de l'atropine, mais, beaucoup moins marquée, ses effets sur le système nerveux centrale sont claires: effets sédatif, dépressif, hypnotique et amnésique (Bruneton, 1995). Elle peut être utilisée comme calmant, antispasmodique et comme anesthésique préliminaire (Rhichter, 1993 ; Vitale *et al.*, 1995).

3. LES *DATURA*

3.1. Généralités

La famille des *Solanaceae* regroupe 85 genres et 2300 espèces, distribuées sur l'ensemble des continents (Glimn-Lacy et Kaufman, 2006 ; Wiart, 2006). Des herbes, des buissons, rarement des arbustes ont été recensés dans cette famille qui fournit à l'homme le tabac et de nombreux produits alimentaires (pomme de terre, aubergine, tomate, poivron et piment) (Bruneton, 2005). Le genre *Datura* comprend 20 espèces distribuées au niveau des régions tropicales et des zones tempérées. Elles sont riches en alcaloïdes dérivés de l'ornithine, particulièrement l'hyoscyamine et la scopolamine. Ces dernières sont aussi présentes chez les genres: *Atropa*, *Duboisia*, *hyoscyamus*, *Mandragora*, et *Scopolia* (Aniszewski, 2007). Dix-sept autres alcaloïdes mineurs ont été recensés chez les espèces appartenant à ce genre (Evans *et al.*, 1972).

La toxicité des *Datura* aussi bien pour l'homme que pour le bétail a été connue depuis fort longtemps, et jusqu'à présent la fréquence des intoxications par les *Datura*, toutes espèces et formes confondues n'est pas négligeable. Ces intoxications sont en effet dues à la teneur alcaloïdique élevée de ces plantes (Vitale *et al.*, 1995 ; Bruneton, 2005 ; Nelson *et al.*, 2007). La variation de la composition en alcaloïdes tropaniques entre les espèces de cette famille peut être d'ordre quantitatif (teneur en alcaloïdes totaux) ou qualitatif (proportion relative de scopolamine et d'atropine) (Bruneton, 2005). Les analyses réalisées par Berkove *et al.* (2006) sur les plantes de *D. stramonium* et *D. innoxia* de différentes provenances (Amérique du Nord, Europe de l'Est, Egypte) ont mis en évidence que la teneur alcaloïdique est plus influencée par les facteurs environnementaux que par les facteurs génétiques.

3.2. Utilisation des *Datura* : médecine traditionnelle, lutte biologique et phytoremédiation

Depuis les civilisations préhistoriques jusqu'à nos jours, les *Datura* figurent parmi les plantes les plus utilisées en phytothérapie par les sociétés traditionnelles pour le traitement de différents maux (Gerlach, 1948). Leurs usages qui dérivent généralement des propriétés pharmacologiques des alcaloïdes tropaniques (voir ci-dessus) et leurs préparations sont variables d'une ethnie à l'autre. Les recherches actuelles ne cessent de mettre en évidence

l'intérêts de ces plantes et leurs extraits comme antibactériens et antifongiques (Rajesh et Sharma, 2002 ; Gnanamani *et al.*, 2003 ; Uzun *et al.*, 2004 ; Dabur *et al.*, 2004 ; Kagale *et al.*, 2004; Eftekhar *et al.*, 2005), insecticides et répulsives (Pascual-Villalobos et Robledo, 1998 ; Guarrera, 1999 ; George *et al.*, 2008). Ces propriétés peuvent être exploitées dans la lutte biologique contre les maladies bactériennes et fongiques des plantes cultivées. De plus, leur sensibilité aux virus, tel que les virus A, X et Y de la pomme de terre les rend bien appréciées comme plantes indicatrices (Van Der Plank et O'Connor, 1952). En outre, les *Datura* ont la capacité d'accumuler divers métaux lourds et produire des quantités élevées en biomasse (Lin et Rayson, 1998 ; Vaillant *et al.*, 2005), ce qui leur donne un rôle primordiale dans les processus de phytoremédiation et de récupération des terrains pollués. Certaines espèces de *Datura* tel que *D. ceratocaula* , *D. metel* et *D. wrightii* sont utilisées comme plantes ornementales pour leurs fleurs en cloche de différentes couleurs. En Algérie 5 espèces sauvages productrices d'alcaloïdes tropaniques appartenant au genre *Datura* ont été recensées, à savoir: *D. ferox* L., *D. innoxia* Mill., *D. quercifolia* H.B.K., *D. stramonium* L. et *D. tatula* L (Houmani *et al.*, 1994 ; 1999 ; Houmani, 1999).

3.3. Description botanique des espèces étudiées

3.3.1. *Datura innoxia* Mill.

Cette espèce a été décrite pour la première fois par Miller en 1768. En Algérie, elle a été identifiée pour la première fois en 1949 par Maire comme *Datura meteloïdes*, alors que la détermination des échantillons récoltés au même endroit par Houmani (1999) a révélé qu'il s'agit bien de *D. innoxia*. C'est une mauvaise herbe commune qui présente une irrégularité dans la germination de ses graines, une faible croissance végétative et un faible rendement alcaloïdique (Kapahi et Sarin, 1978 in Houmani, 1999). Elle se distingue par ses tiges, ses ramifications et ses feuilles recouvertes de poils mous, et la couleur blanche de ses fleurs (Gerlach, 1948). *D. innoxia* est une plante médicinale utilisée de façon routinière en culture *in vitro*. La régénération à partir de ses différents tissus (végétatifs ou reproducteurs), sa sensibilité aux agrobactéries et sa production de métabolites secondaires en font une plante d'un grand intérêt pour les études de transformations génétiques (Ducrocq *et al.*, 1994). Aussi bien les suspensions cellulaires (Gontier *et al.*, 1994) que les chevelus racinaires dérivées de cette espèce ont été examinées pour la production d'alcaloïdes tropaniques *in vitro*. Houmani (1999), indique que les parties aériennes de cette plante renferment une teneur de 1,0 mg/g MS d'alcaloïdes (scopolamine et hyoscyamine). Le rapport scopolamine sur hyoscyamine est de 2,8. Ses organes aériens sont plus riches en scopolamine qu'en hyoscyamine. Les racines renferment environ 7 fois plus d'hyoscyamine (0,7 mg/g MS) que de scopolamine (0,11 mg/g MS).

3.3.2. *Datura stramonium* L.

Cette espèce a reçue beaucoup de noms communs : stramoine, pomme épineuse, chasse-taupe, herbe du diable, endormeuse et trompette des anges (Cecchini, 1976; Aloïs Schmid, 1986). En arabe, on la connaît surtout par: chedjrete el djinn, djhanama, messekra, tatoura et datoura (Trabut, 1935). En anglais: jimson weed, thorn apple, mad apple et devil's trumpet (Bruneton, 2005; Aniszewski, 2007). Son origine est très discutée. Selon Cecchini (1976), elle est originaire du Caucase alors qu'Ozenda (1977), cite l'Amérique comme origine du *D. stramonium*. Elle est largement distribuée dans la majorité des régions tempérées du monde entier (Berkov *et al.*, 2006). L'hyoscyamine et la scopolamine sont les principaux alcaloïdes qui caractérisent le *D. stramonium* avec une prédominance de l'hyoscyamine (Miraldi *et*

al., 2001 ; Iranbakhsh *et al.*, 2006). En effet, les analyses réalisées par Houmani (1999), montrent que les parties aériennes des plantes adultes de *D. stramonium* renferment 0,19 à 0,29 mg/g MS de scopolamine, et 0,52 à 0,82 mg/g MS d'hyoscyamine. En Algérie le *D. stramonium* est cosmopolite (Quezel et Santa, 1962). Elle pousse naturellement dans les lieux incultes, au bord des chemins et des cours d'eau, et comme plante adventice des cultures (Benhizia, 1989). Ozenda (1977) signale que plusieurs espèces de *Datura* existent à l'état sub-spontané ou naturalisé dans les oasis, la plus courante est *D. stramonium*. Sa croissance a lieu du mois d'avril au mois de novembre, la floraison commence en juin et continue jusqu'à la fin du mois d'octobre et la fructification s'échelonne du début de juillet jusqu'au début de l'hiver (Benhizia, 1989). Le *D. stramonium* semble peu utilisé en médecine traditionnelle algérienne (Baba Aissa, 1991). Cependant, elle figure, de tout les temps, parmi les plantes les plus utilisées en médecine populaire dans le monde (Bruneton, 2005). Elle est cultivée dans de nombreux pays, notamment en Europe et en Amérique latine. Les parties utilisables de la plante en pharmacie pour l'extraction des alcaloïdes sont : les feuilles et les boutons floraux (Faouzi Tah Kotb, 1981; Deivick, 1997).

3.3.3. *Datura tatula* L.

Cette espèce est souvent confondue avec *D. stramonium*. Houmani (1999) signale que certains auteurs la considère comme une espèce différente (Bernhardii et Wettetein, 1957 ; Cros Le Bon, 1971), alors que d'autres la considèrent comme une variété de *D. stramonium* (Koch ; Torrey ; Bhagat et al, 1981 ; Van De Veld, 1988). Plus récemment, les essais de croisement réalisés par Berkov *et al.*,(2006), entre la variété à fleurs blanches, *D. stramonium* var. *eu stramonium* et la variété à fleurs violettes, *D. stramonium* var. *tatula* ont mis en évidence que ces deux variétés ne diffèrent que par une seule paire d'allèles et elles appartiennent à une même espèce. L'Allèle codant pour la couleur violette est dominant sur celui qui code pour la couleur blanche des fleurs. Les parties aériennes de cette plante renferment des teneurs en alcaloïdes majeurs de 0,9 mg/g MS. La teneur en hyoscyamine est de 0,7 mg/g MS, elle est environ 3,5 fois plus élevée que celle de la scopolamine. Les racines renferment moins d'alcaloïdes que les parties aériennes, avec 0,4 mg/g MS, elles renferment plus d'hyoscyamine que de scopolamine (Houmani, 1999).

4. CHEVELUS RACINAIRES ET PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES *IN VITRO*

4.1. Historique

La technologie des cultures cellulaires *in vitro* a été introduite vers la fin des années soixante comme un outil pour l'étude et la production de métabolites secondaires (Mulabagal et Tsay, 2004). Bien que certains composés tels que la shikonine, la berbérine et les gensinosides ont été produits avec succès à l'échelle industrielle en appliquant cette approche (Flores et Medina-Bolivar, 1995), dans la plus part des cas, la production de métabolites secondaires par les cultures cellulaires reste faible et instable (Chenieux, 1990 ; Moyano *et al.*, 1999; Giri et Narasu, 2000 ; Souret *et al.*, 2003), car leur biosynthèse semble être corrélée avec le degré de différenciation cellulaire (Kutchan *et al.*, 1983 ; Dicosmo et Misawa, 1995 ; Moyano *et al.*, 1999 ; Sevon et Oksman-Caldentey, 2002;). Certains composés ne peuvent être synthétisés si les cellules restent à l'état indifférencié. A titre d'exemple, la culture de

suspensions cellulaires de *Solanaceae* ne produit que des traces d'alcaloïdes tropaniques (Dicosmo et Misawa, 1995; Flores et Medina-Bolivar, 1995). Par contre, plusieurs alcaloïdes faiblement synthétisés dans les suspensions cellulaires sont, accumulés à des niveaux relativement élevés dans les cultures racinaires (Zhi-bu et Min, 2006), ce qui confirme la nécessité d'un tissu spécialisé pour la biosynthèse des alcaloïdes (Wink, 1990 ; Kamada *et al.*, 1986). C'est pourquoi l'avènement de la culture *in vitro* de tissus différenciés est devenu une nécessité certaine pour compléter et/ou remplacer les cultures cellulaires et les cultures de plein champ (Flores et Medina-Bolivar, 1995). Ainsi, vers le début des années 80, l'intérêt accordé à la culture *in vitro* de chevelus racinaires issus de la transformation génétique des plantes par *Agrobacterium rhizogenes* commençait à prendre de l'ampleur d'année en année (Flores et Medina-Bolivar, 1995). Premièrement, Les chevelus racinaires étaient utilisés comme système modèle pour les études du métabolisme en physiologie végétale, et en second lieu, comme alternatif aux cultures de suspensions cellulaires pour la production de molécules d'intérêt thérapeutique (Shanks et Morgan, 1999).

4.2. Induction des chevelus racinaires : transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes*

Les chevelus racinaires sont obtenus par transformation génétique des cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie infecte une large gamme de plantes dicotylédones, causant la prolifération de racines adventives. C'est le syndrome du « Hairy root », ou chevelu racinaire par opposition au Crown gall causé par *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 1990 ; Sevon et Oksman-Kaldentey, 2002 ; Veena et Taylor, 2007 ; Srivastava et Srivastava, 2007). Le mécanisme d'infection par cette bactérie se fait en trois étapes :

1. Adhésion bactérie-plante : Cela nécessite d'abord une reconnaissance de la cellule végétale par la bactérie qui s'attache à la paroi de celle-ci. Les fonctions de reconnaissance sont portées par le chromosome bactérien (Casse-Delbart, 1990).

2. Activation des gènes vir : L'activation du processus d'infection est régulé par les gènes *virA* et *virG* situés sur le T-DNA et certain gènes chromosomiques. Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure: Les composés phénoliques de type syringone, les monosaccharides (tels que le glucose et l'acide glucorinique) et le pH acide (Liang *et al.*, 1998; Giri et Narasu, 2000).

3. Insertion du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte : au cours de cette étape le T-DNA entre les régions TR (Right) et TL (Left) du plasmide Ri (pour « root induction ») s'intègre au génome nucléaire de la plante hôte. L'expression des gènes portés par le T-DNA conduit à la formation de chevelus racinaires au niveau du site d'infection et la production des opines qui servent de substances de croissances pour la bactérie (Moyano *et al.*, 1999 ; Zhi-Bu et Min, 2006).

Les chevelus racinaires formés comme réponse à l'infection par cette bactérie peuvent être isolés de la plante et cultivés en conditions axéniques sur milieu sans hormones (Flores et Medina-Bolivar, 1995). Le caractère transgénique des chevelus racinaires peut être confirmé par la détection des opines ou des fragments d'ADN dérivé du T-DNA intégré dans le génome de la plante hôte (Parr *et al.*, 1988 ; Moyano *et al.*, 1999 ; Srivastava et Srivastava, 2007). Morphologiquement, les chevelus racinaires sont reconnaissables par une croissance plagiotrope, une forte ramification et développement de poils absorbants à haute densité (Bandyopadhyay *et al.*, 2007 ; Veena et Taylor, 2007).

4.3. Application de la culture des chevelus racinaires dans la production de métabolites secondaires *in vitro*

La culture de racines conventionnelles (non transgéniques) exige l'apport d'hormones de croissances exogènes et sont caractérisées par un faible taux de croissance, ce qui conduit souvent à la perte de l'organisation tissulaire et l'apparition de cals (Flores et Medina-Bolivar, 1995 ; Zhi-Bu et Min, 2006). Ce phénomène provoque le déclin du potentiel biosynthétique (Moyano *et al.*, 1999). La croissance des chevelus racinaires varie de 0,1 à 2 g Ps/litre/jour. Cette valeur dépasse largement celle des racines conventionnelles. Les chevelus racinaires transgéniques présentent un autre avantage, par rapport aux racines conventionnelles, qui est la forte prolifération des racines latérales (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Les chevelus racinaires, sont stables génétiquement (Hanisch Ten Cate *et al.*, 1987 ; Baiza *et al.*, 1999) et hautement productifs en culture sans hormones (Shanks et Morgan, 1999 ; Zhi-Bu et Min, 2006). Du point de vue cytogénétique, les chevelus racinaires sont caractérisés par un nombre chromosomique qui reflète exactement celui de la plante mère dont ils sont issues, par contre les suspensions cellulaires issues des mêmes plantes ont montré des variations, avec prédominance des polyploïdes et des aneuploïdes (Aird *et al.*, 1988). De plus, la croissance rapide et illimitée, le degré de ramification élevé, la facilité de l'entretien et la capacité de synthétiser une large gamme de composés organiques sont autant d'avantages qui font des chevelus racinaires un matériel de choix pour la production de métabolites secondaires (Kamada *et al.*, 1986 ; Shanks et Morgan, 1999 ; Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002 ; Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). De nombreuses plantes médicinales ont été transformées par *A. rhizogenes*, et les chevelus racinaires induits montrent une productivité relativement élevée en métabolites secondaires (Zhi-Bu et Min, 2006). Le Tableau 2 présente certains travaux de recherche réalisés dans ce sens.

4.4. Autres applications

- Régénération de plantes transgéniques : la régénération de plantes à partir de chevelus racinaires a été rapportée chez plusieurs espèces (Kamada *et al.*, 1986 ; Van Altvorst *et al.*, 1992; Giovannini *et al.*, 1997 ; Casanova *et al.*, 2005), le succès de la régénération dépend essentiellement des conditions de culture *in vitro* telles que la balance hormonale ainsi que les caractéristiques du matériel végétal (Tepfer, 1982 ; Casse-Delbart, 1990).
- Production de protéines d'intérêts pharmaceutiques et industriel par la voie du génie génétique (Flores et Medina-Bolivar, 1995 ; Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002 ; Zhi-Bu et Min, 2006).
- Amélioration de la rhizogenèse chez les arbres fruitiers (Lambert et al, 1988 ; Runs Him *et al.*, 1988), et les plantes ornementales (Casanova *et al.*, 2005,).
- Application dans la recherche fondamentale notamment l'étude de la biologie du système racinaire, l'analyse fonctionnelle des gènes (Flores et Medina-Bolivar, 1995) et l'étude des voies de biosynthèse des métabolites secondaires (Robins *et al.*, 1990 ; Walton *et al.*, 1990 ; Robins *et al.*, 1994 ; O'Hagan *et al.*, 1999).
- Phytoremédiation : les chevelus racinaires servent de systèmes modèles pour l'élucidation des processus de transformation et de décontamination des eaux et des sols (Shanks et Morgan, 1999 ; Guillon *et al.*, 2006a et b).

Tableau 2.Exemples de métabolites produits par la culture *in vitro* de chevelus racinaires (adapté à partir de Shanks et Morgan, 1999).

enre	Métabolite	Fonction
<i>Artemisia</i>	Artemisinin	Anti-malariale
<i>Atropa</i>	Alcaloïdes tropaniques	Anti-cholinergique
<i>Beta</i>	Betalains	colorant
<i>Brugmansia</i>	Alcaloïdes tropaniques	Anti-cholinergique
<i>Catharanthus</i>	Alcaloïdes indoliques	Anti-hypersensitive, antimitotique
<i>Coleus</i>	Forskolin	Anti-hypersensitive
<i>Datura</i>	Alcaloïdes tropaniques	Anti-cholinergique
<i>Glycyrrhiza</i>	flavanoïdes isopreniques, polysaccharides	Antimicrobien, antioxydant, immunomodulation
<i>Henna</i>	Lawson	Colorant
<i>Hyoscamus</i>	Alcaloïdes tropaniques	Anti-cholinergique
<i>Lithospermum</i>	Benzoquinones	Colorant
<i>Panax</i>	Analogues de Polyacetylene	inconnu
<i>Paulownia</i>	Verbascoside	Antibactérien, antivirale
<i>Pimpinella</i>	Huiles essentielles	Flaveur, parfumes
<i>Scutellaria</i>	Flavonoïde	Antibactérien antioxydant
<i>Solanum</i>	Solasodine	drogue Stéroïde, précurseur
<i>Trachelium</i>	Polyacetylenes	inconnu
<i>Trichosanthes</i>	Ribosome inactivating protein	Antivirale, antifongique
<i>Valeriana</i>	Valepotriates	Sédative et tranquillisant

5. STRATEGIES POUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES *IN VITRO*.

5.1. Sélection des lignées racinaires

Les chevelus racinaires d'une espèce donnée, issue de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* constituent une population hétérogène dont les lignées individuelles ont des caractéristiques génétiques et physiologiques différentes (Dicosmo et Misawa, 1995). Mano et al. (1989) ont réalisé une étude comparative sur 45 lignées racinaires de *Duboisia leichhardtii* et ont mis en évidence une grande variabilité génétique en terme du taux de croissance et du contenu alcaloïdique entre les lignées examinées. Des résultats similaires ont été signalés par Maldonado-Mendoza et al. (1993) entre les lignées racinaires de *D. stramonium* et Yu et al. (1996) entre les lignées racinaires de *Solanum avicular*. Ceci serait dû au fait que le site d'intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte ainsi que le nombre de copies insérées sont complètement aléatoires. Par conséquent, il existe toujours des différences considérables en matière du taux de croissance et d'accumulation de métabolites secondaires parmi les lignées racinaires issues d'un même événement de transformation (Zhi-Bu et Min, 2006 ; Georgiev *et al.*, 2007). C'est pourquoi la sélection répétée semble constituer un outil incontournable pour l'obtention de lignées hautement productives de métabolites secondaires (Yukimune *et al.*, 1994).

5.2. Optimisation du milieu de culture

La biosynthèse de métabolites secondaires est fortement déterminée par les conditions de culture, que ce soit au niveau des plantes cultivées en pleins champs ou les cultures cellulaires et tissulaires *in vitro* (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002). C'est pourquoi l'optimisation du milieu de culture est un facteur critique pour garantir une bonne production de métabolites secondaires par les chevelus racinaires (Dicosmo et Misawa, 1995 ; Verpoorte *et al.*, 2002).

Les milieux de culture de base couramment utilisés pour la culture *in vitro* d'organes, tissus ou cellules végétales destinés à la production de métabolites secondaires sont : MS (Murashige et Skoog, 1962); B5 (Gamborg, 1970); WP (Woody Plant Medium, Lloyd et McCown, 1980) et le milieu LS (Linsmaier et Skoog, F.1965). Parfois des dilutions à moitié (1/2) ou au quart (1/4) de la formulation originale de ces milieux sont utilisées par certains auteurs (Parr *et al.*, 1988; Hilton et Rhodes, 1990 ; Nussbaumer *et al.*, 1998 ; Nishiyama et Yamakawa, 2004). Le choix d'un milieu ou d'un autre est justifié par ses effets sur la croissance et l'accumulation des produits d'intérêt.

Du fait que chaque chevelu peut avoir des besoins différents en nutriments, les conditions du milieu de culture doivent être optimisées pour chaque espèce ou plutôt pour chaque lignée racinaire (Zhi-Bu et Min, 2006). Ceci se fait par la manipulation aussi bien des composantes nutritionnelles que des constituants du milieu physique. Les facteurs nutritionnels les plus étudiés dans le but d'améliorer la croissance et l'accumulation des métabolites secondaires consistent en la source du carbone et sa concentration (Oksman-Caldentey, 1994 ; Yu *et al.*, 1996 ; Nishiyama et Yamakawa, 2004), la concentration du phosphore et du potassium (Sikuli et Demeyer, 1997), la concentration et la source de l'azote (Oksman-Caldentey, 1994 ; Nussbaumer *et al.*, 1998, Amdoun *et al.* 2009), le calcium (Gontier *et al.*, 1994 ; Pinol *et al.*, 1999 ; Amdoun *et al.* 2009), les métaux lourds et les phytohormones (Rhodes *et al.*, 1994 ; Pitta-Alvarez *et al.* 1997 ; Smith *et al.*, 1997) et les précurseurs de biosynthèse des produits d'intérêt (Nussbaumer *et al.*, 1998 ; Boitelconti *et al.*, 2000). L'environnement de culture, quand à lui est manipulé en jouant sur la lumière (Nishiyama et Yamakawa, 2004), la température (Hilton et Rhodes, 1990 ; Yu *et al.*, 1996), l'agitation et l'aération (Lee *et al.*, 1998a ; Williams et Doran, 1999) , le pH et la pression osmotique du milieu (Yu *et al.*, 1996). Les caractéristiques de l'inoculum ont aussi une influence considérable sur la croissance et la production de métabolites secondaires (Zhi-Bu et Min, 2006).

5.3. Elicitation

Le rôle majeur des métabolites secondaires est la protection des plantes contre les attaques des herbivores, des insectes et des pathogènes ou d'assurer la survie aux stress abiotiques. L'élicitation des plantes ou leurs tissus cultivés *in vitro* est une stratégie basée sur ce principe qui a été développée afin d'améliorer le rendement et la productivité des métabolites secondaires dans les cultures cellulaires/tissulaires *in vitro* (Zhao *et al.*, 2005). L'Elicitation est l'induction ou l'augmentation de la biosynthèse des métabolites par l'addition de traces d'éliciteurs (Radman *et al.*, 2003). Un éliciteur peut être défini comme étant un composé organique ou un facteur physique ou chimique qui provoque chez la plante hôte quand il est ajouté à son environnement une réaction similaire aux réactions de défense contre les stress biotiques ou abiotiques. Les éliciteurs sont généralement classés en deux grandes classes :

- Les éliciteurs biotiques qui englobent des polysaccharides dérivés de la paroi cellulaire végétale (pectine ou cellulose) ou de micro-organismes (chitine ou glucanes), des glycoprotéines et des protéines intracellulaires dont les fonctions sont couplées à des récepteurs et agissent en activant ou désactivant des enzymes ou des canaux ioniques (Namdeo, 2007). Ce groupe peut être divisé en deux sous-groupes : Les éliciteurs exogènes (issues de pathogènes) et les éliciteurs endogènes ou constitutifs des plantes (Yeoman et Yeoman, 1996).
- Les éliciteurs abiotiques : cette classe regroupe les stress physiques et chimiques tel que les UV, le froid et la chaleur, l'éthylène, les fongicides, les antibiotiques, la salinité et les métaux lourds (Yeoman et Yeoman, 1996).

Lorsqu'une cellule végétale reçoit l'une de ces substances ou molécules de signalisation sur sa membrane plasmique, un réseau de transduction de signal se déclenche conduisant à l'activation des gènes cibles ou à la biosynthèse des facteurs de transcription qui régulent finalement les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèses des métabolites recherchés (Zhao *et al.*, 2005). Le Tableau 3 résume certains travaux de recherche sur l'élicitation des cultures *in vitro* de chevelus racinaires dérivés de plantes médicinales produisant des alcaloïdes tropaniques.

5.4. Perméabilisation cellulaire et libération des métabolites dans le milieu extracellulaire

Les produits secondaires synthétisés dans les cultures cellulaires sont généralement stockés dans les vacuoles (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002). Ceci rend plus difficile la production semi-continue/continue des métabolites secondaires par les cultures cellulaires ou tissulaires *in vitro* (Lee *et al.*, 1998b). C'est pourquoi, il est indispensable de développer des méthodes qui permettent l'excrétion des produits d'intérêt directement dans le milieu de culture. Ceci permettrait la récupération et le recyclage de la biomasse et du milieu de culture (Dicosmo et Misawa, 1995). De plus, il est possible de produire un niveau beaucoup plus élevé de métabolites s'ils sont expulsés à l'extérieur de la cellule. Ceci, parce que le produit intracellulairement accumulé empêche parfois sa propre biosynthèse par les mécanismes régulateurs tels que l'inhibition par feed-back (Misawa, 1994). Afin de libérer les produits stockés dans la vacuole, deux barrières membranaires (la membrane plasmique et le tonoplaste) doivent être franchis par les composés stockés. La perméabilisation cellulaires dépend de la formation de pores dans les systèmes membranaires de la cellule, permettant la libération des molécules dans le milieu extracellulaires (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002). Les membranes cellulaires peuvent être perméabilisées en utilisant différents procédés physiques ou chimiques. Les solvants organiques tels que l'isopropanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO), les polysaccharides comme le chitosane et certains métaux lourds sont parmi les composés chimiques employés en tant qu'agents de perméabilisation (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002). Lee *et al.* (1998b) ont réussi la perméabilisation des chevelus racinaires de la belladone en utilisant le cuivre et le cadmium (CuCl_2 et CdCl_2). En appliquant ces agents de perméabilisation 120% et 27% respectivement de la quantité d'alcaloïdes dans le témoin a été détectée dans le milieu de culture. Cependant ces substances provoquent la lyse cellulaires et la mort des tissus. Les mêmes auteurs rapportent l'utilisation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 5mM), cependant, avec moins de succès (6%), mais, ce produit a l'avantage d'être moins nuisible aux tissus en culture. Les méthodes physiques de perméabilisation comprennent l'ultrasonication et l'électroporation

INDUCTION DE CHEVELUS RACINAIRES CHEZ TROIS ESPECES DE *Datura*, SELECTION DE LIGNEES PERFORMANTES POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES

qui consistent à soumettre les cultures cellulaires à un faible courant électrique dans un dispositif particulièrement conçu pour (Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002).

Tableau 3. Etudes d'élicitation appliquées à la culture de chevelus racinaires de *solanaceae* (Sevon et Oksman-Kaldentey, 2002).

Espèce	Eliciteur	Effet
<i>Brugmansia candida</i>	Hemicellulase Theophylline CaCl ₂	Stimulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine
<i>Brugmansia candida</i>	Acide salysilique Extrait de levure CaCl ₂ AgNO ₃ CdCl ₂	Stimulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine
<i>Catharanthus roseus</i>	Methyl jasmonate	Stimulation de catharanthine et d'ajmalicine
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Stimulation de catharanthine et d'ajmalicine
<i>Datura stramonium</i>	Ions métalliques	Accumulation de phytoalexines
<i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Accumulation de phytoalexines
<i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Accumulation de solavetivone
<i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Accumulation de solavetivone et lubimine
<i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Inonotus obliquus</i>	Stimulation de l'hyoscyamine
<i>Hyoscyamus muticus</i>	CuSO ₄	Stimulation de l'hyoscyamine
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Chitosane	Stimulation de l-hyoscyamine
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Acide jasmonique Methyl jasmonate	Faible stimulation de l'hyoscyamine et fort stimulation de plyamines
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Methyl jasmonate + Blessure + <i>Rhizoctonia solani</i>	Accumulation de solavetivone et de lubimine
<i>Nicotiana tabacum</i>	Etrait de levure, extrait de <i>Botrytis fabae</i>	Accumulation de phytoalexines sesquiterpéniques

5.5. Génie génétique

Parfois les capacités biosynthétiques des chevelus racinaires ne sont pas aussi satisfaisantes, à ce moment l'ingénierie métabolique offre de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la production de métabolites secondaires (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002 ; Verpoorte et Memelink, 2002 ; Zhi-Bu et Min, 2006 ; Guillon *et al.*, 2006a et b ; Georgiev *et al.*, 2007). Ceci est encore facilité par le fait que les plasmides Ri d'*A. rhizogenes* peuvent être utilisés à la fois pour l'induction de chevelus racinaires et comme vecteur de gènes (Flores et Medina-Bolivar, 1995). Cette approche a été utilisée pour l'introduction du gène ODC (voir ci-dessus Figure 4) de la levure dans les chevelus racinaires de *Nicotiana rustica* (Hamill *et al.*, 1991). De la même façon le gène H6H (Figure 4) qui catalyse l'époxydation de l'hyoscyamine vers la scopolamine a été cloné à partir de l'*Hyoscyamus niger* et introduit dans les chevelus racinaires d'*Atropa belladonna* (Hashimoto *et al.*, 1993), de *Nicotiana tabacum* (Hakkinen *et al.*, 2005) et de *Datura innoxia* (Dechaux et Boitel-Conti, 2005) dans le but d'améliorer la production de la scopolamine. La biosynthèse de

l'hyoscyamine par les chevelus racinaires de *Datura metel* et *Hyoscyamus muticus* (Moyano *et al.*, 2003) et ceux de *Scopolia parviflora* (Lee *et al.*, 2005) a été améliorée par l'introduction du gène codant la PMT (Figure 4). L'introduction et la surexpression des deux gènes (PMT et H6H) à la fois dans les chevelus racinaires d'*Hyoscyamus niger* améliore le contenu en scopolamine jusqu'à 411 mg/L (9 fois plus élevé que le type sauvage) (Zhang *et al.*, 2004)

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL VEGETAL

1.1. Obtention des chevelus racinaires

Les vitroplants de trois espèces de *Datura* (*D. innoxia*, *D. stramonium* et *D. tatula*) ont été utilisés pour la production des chevelus racinaires. Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire LRGB (ENSA, El Harrach, Alger). La méthode adoptée pour l'induction de chevelus racinaires est essentiellement celle décrite par Amdoun et al. (2009). Les explants d'hypocotyle (1 cm de longueur) sont inoculés par une suspension bactérienne dans le milieu YEM de la souche A₄ d'*Agrobacterium rhizogenes*. À l'aide d'une seringue stérile, une goutte de la suspension est déposée sur la section basale de chaque explant. Les explants ainsi infectés sont mis en culture sur milieu MS solide contenant 250 mg/l de céfotaxime. La co-culture plante-bactérie est conduite à l'obscurité à 26 ± 1°C. Après 20 à 30 jours de co-culture les racines transgéniques commencent à apparaître sur le site d'infection. Lorsqu'elles atteignent une longueur de 2 à 3 cm, elles sont excisées et transférées sur le milieu MS frais contenant 250 mg/l de céfotaxime afin d'éliminer la bactérie.

Les racines non transgéniques ou adventives ont été obtenues en adoptant le protocole établi par Shimomura et al. (1991). Les explants d'hypocotyles de vitroplants sont cultivés sur le milieu MS solide contenant 1 g/l d'AIA (Acide Indole Acétique). Après 15 à 20 jours de culture, des racines néoformées commencent à apparaître sur les explants. Elles sont excisées après avoir atteint une longueur de 2 à 3 cm et mises en culture sur le milieu MS frais sans hormones de croissance. La culture est conduite à l'obscurité à 26 ± 1°C

Au total, 74 lignées racinaires ont été obtenues, 27 à partir de *D. stramonium*, 37 à partir de *D. tatula* et 10 lignées à partir de *D. innoxia*. Après une sélection préliminaire (élimination des lignées callogènes, atypiques et contaminées), 14 lignées (décrites dans le Tableau 4) ont été retenues pour la réalisation du présent travail.

1.2. Entretien des lignées racinaires

Les lignées racinaires obtenues (néoformées et transgéniques) sont maintenues en culture sur le milieu B5/2 (milieu B5 dilué une fois) additionné de 30 g/l de saccharose et 7 g/l d'agar. La culture est conduite à l'obscurité et à 26 ± 1°C. Les chevelus racinaires sont repiqués périodiquement. Toutes les 4 à 6 semaines, des fragments racinaires de 3 à 4 cm de longueur sont prélevés et repiqués sur milieu frais.

Tableau 4. Lignées de chevelus racinaires utilisées dans le cadre du présent travail.

Nom de lignée	Nature	Espèce	Date d'obtention
St	Non transgénique	<i>D. stramonium</i>	Mars 2008
Tt	Non transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2008
I8	transgénique	<i>D. innoxia</i>	Mars 2007
I10	transgénique	<i>D. innoxia</i>	Mars 2007
S1	transgénique	<i>D. stramonium</i>	Avril 2006
S3	transgénique	<i>D. stramonium</i>	Avril 2006
S9	transgénique	<i>D. stramonium</i>	Mars 2007
S18	transgénique	<i>D. stramonium</i>	Mars 2007
S22	transgénique	<i>D. stramonium</i>	Mars 2007
T2	transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2007
T12	transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2007
T13	transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2007
T31	transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2007
T33	transgénique	<i>D. tatula</i>	Mars 2007

2. ETABLISSEMENT DE LA CULTURE DES CHEVELUS RACINAIRES

La culture de chevelus racinaires des *Datura* est réalisée selon deux modes :

Culture en milieu semi-solide : Deux extrémités racinaires de 2 à 3 cm de longueur (Pf = 0.07 g) issue d'une culture âgée de 10 jours sont mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu de culture semi-solide (3,5 g d'agar). Les boîtes sont par la suite placées en chambre de culture à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à la récolte. Ce mode de culture est adopté pour la caractérisation des lignées racinaires et l'étude de l'effet du NaCl et du Tween 20 sur la croissance et la viabilité des chevelus racinaires.

Culture en milieu liquide : Cinq fragments racinaires de 4 à 5 cm de longueur (Pf = 0.16 à 0.2 g) issus d'une culture âgée de 10 jours sont mises en culture ensemble dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 20 ml (pour l'étude des milieux de culture) ou 50 ml de milieu liquide (pour le reste des essais conduits en milieu liquide). Les flacons sont par la suite placés dans un incubateur rotatif réglé à 100 rpm. La culture a lieu dans l'obscurité à $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

3. ETUDE COMPARATIVE DES LIGNEES RACINAIRES

La culture sur le milieu B5 semi-solide de la totalité des lignées citées précédemment a été établie. Quinze jours après la culture, les chevelus racinaires sont récoltés, lavés à l'eau distillée puis séchés sur du papier absorbant. Le poids frais est mesuré immédiatement, alors que le poids sec est mesuré après séchage des chevelus à 50°C pendant 48 heures. Les chevelus sont par la suite conservés jusqu'au moment de l'extraction des alcaloïdes. Les extraits obtenus sont par la suite analysés par la CPG (Chromatographie Phase

Gazeuse) pour déterminer la teneur en alcaloïdes. La lignée S1 issue de *D. stramonium* a été retenue pour la réalisation de tous les essais ultérieurs.

4. ETUDE DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES TROPANIQUES

La lignée S1 a été mise en culture sur milieu B5 liquide. Comptant du premier jour de culture, six récoltes ont été réalisées à un intervalle de cinq jours jusqu'à la fin de la culture (un moi), à savoir, après 5, 10, 15, 20, 25 et 30 jours. Pour chaque récolte les mesures de poids frais et sec ont été prises. Les chevelus secs sont conservés jusqu'au moment de l'extraction des alcaloïdes.

5. ESSAI DE CERTAINS MILIEUX DE BASE POUR LA CULTURE DES CHEVELUS RACINAIRE

La culture de la lignée S1 a été réalisée séparément dans 20 ml de cinq milieux de culture différents. A savoir: B5 (Gamborg, 1970), MS (Murashige et Skoog, 1962) et LS (Linsmaier et Skoog, 1965) additionnés de 3% de saccharose, B5/2 et MS/2 additionnée de 1,5% de saccharose. Les milieux B5/2 et MS/2 contiennent les mêmes constituants que les milieux de base B5 et MS respectivement diluée une fois (1 volume du milieu/2 volumes d'eau). Quinze jours après la culture, les chevelus sont récoltés pour mesurer le poids frais le poids sec et déterminer le contenu alcaloïdique. Il s'est avéré que le milieu B5 est le plus adéquat pour la culture des chevelus racinaires, il a été donc retenu comme milieu de base pour la culture dans les essais ultérieurs.

6. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN

L'élicitation des chevelus racinaires par le stress salin a été réalisée sur les cultures de la lignée S1 sur 50 ml de milieu B5 liquide. L'élicitation consiste à ajouter du NaCl au milieu de culture 14 jours après la mise en culture avec trois concentrations différentes 1, 2, et 3g/l. Les cultures témoins n'ont reçu aucun traitement. Le NaCl est ajouté au milieu de culture sous forme liquide dans une solution mère (100g/l) préalablement préparée et autoclavée. Les chevelus racinaires ont été récoltés 24 heures après l'ajout du sel pour mesurer le poids frais, le poids sec et la teneur en alcaloïdes.

Afin de tester l'effet du stress salin sur la viabilité et la croissance des chevelus racinaires un autre essai a été lancé parallèlement au précédent. La culture de la lignée S1 a été conduite en mode semi-solide. Les mêmes doses de NaCl (1, 2 et 3 g/l) ont été appliquées, mais cette fois-ci au début de la culture. Les chevelus témoins ont été cultivés sur milieu B5 normal sans NaCl. Les chevelus racinaires sont récoltés 15 jours après la mise en culture.

7. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURES

L'élicitation par l'extrait de levure a porté également sur les cultures de la lignée S1 sur milieu B5 liquide. Quatorze jours après le lancement des cultures, les chevelus racinaires sont élicités par trois concentrations différentes de l'extrait de levure 10, 100 et 1000 mg/l. Ces dernières ont été ajoutées aux milieux de culture sous forme de solution concentrée préalablement préparée en dissolvant l'extrait de levure (Yest extract for biotech. Merk) dans un volume adéquat d'eau. La solution a été autoclavée avant usage. La récolte a été réalisée 24 heures après l'ajout de l'extrait de levure. Les cultures témoins ont été récoltées sans aucun traitement.

8. ESSAI D'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE (JA) ET PERMEABILISATION PAR LE TWEEN 20 (T20)

Le but de cet essai a été de tester l'effet de l'interaction JAxT20 sur l'accumulation des alcaloïdes tropaniques et leur sécrétion dans le milieu de culture. L'essai a été planifié selon un dispositif factoriel entre les deux facteurs JA et T20. Trois concentrations ont été choisies pour chaque facteur, 10, 100 et 1000 µM pour JA et 0,5, 1,5 et 3% pour le T20, en plus des témoins. La combinaison factorielle entre JA et T20 résulte en 16 (4 x 4) traitements différentes (Tableau 5). La solution mère de JA utilisée pour l'élicitation a été préparée en dissolvant l'acide jasmonique (Jasmonic Acid, Sigma Aldrich) dans un volume adéquat d'éthanol et d'eau. Cette solution a été filtrée avant d'être ajouté aux cultures racinaires. La solution du T20 (10% Tween20 solution, Bio-Rad laboratories) a été utilisée directement sans autoclavage. Les traitements décrits sur le Tableau 4 ont été ajoutés au même moment aux cultures de la lignée S1 dans 50 ml de milieu B5 après 14 jours de culture. Les chevelus racinaires ont été récoltés 24 après l'application des traitements.

Tableau 5. Essai factoriel Elicitation x Perméabilisation.

		Tween 20(%)			
Acide jasmonique (µM)		0	0,5	1,5	3
		0 – 0	0 – 0,5	0 – 1,5	0 – 3
	10	10 - 0	10 – 0,5	10 – 1,5	10 – 3
	100	100 - 0	100 – 0,5	100 – 1,5	100 – 3
	1000	1000 - 0	1000 – 0,5	1000 – 1,5	1000 - 3

9. PARAMETRES ETUDIES

9.1. Croissance en longueur et degrés de ramification

Ces deux paramètres ont été utilisés pour la caractérisation des lignées racinaires. La longueur considérée est celle mesurée chaque jour sur la racine principale exprimée en cm. Le degré de ramification est le nombre de racines secondaires comptées chaque jour sur

la racine principale. Les mesures sont arrêtées après une semaine de la culture à cause de la prolifération excessive des chevelus racinaires.

9.2. Poids frais, poids sec et taux de croissance

A la fin de chaque essai les chevelus racinaires sont lavés à l'eau distillée pour éliminer le reste du milieu de culture, séchés au papier buvard, puis pesés pour prendre le poids frais. La mesure du poids sec est réalisée 48 heures après dessiccation des chevelus dans l'étuve à une température de 50°C.

9.3. Teneur en alcaloïdes tropaniques

9.3.1. Extraction et purification des alcaloïdes

Le protocole d'extraction est adapté à partir de celui de Amdoun *et al.*, (2009). Une quantité de 50 mg de chevelu racinaire sec est broyée dans un mortier. La poudre obtenue est par la suite épuisée par 20 ml d'HCl (0,1 N) pendant 10 minutes. La suspension est filtrée sur un filtre standard à plat. Le filtrat récupéré est alcalinisé avec du NH₄OH (28%) jusqu'au pH 10, puis épuisé par du chloroforme (CHCl₃) deux fois aux volumes égaux (v/v). Un séchage du double volume du chloroforme récupéré par décantation est effectué par du NO₂SO₄ anhydre. Après filtration, la solution organique est évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor. Le résidu est repris dans 1ml de dichlorométhane puis analysé par CPG.

Le même procédé (sans la première étape : extraction par HCl) a été adopté pour l'extraction des alcaloïdes à partir du milieu de culture liquide pour l'essai factoriel JAxT20.

9.3.2. Analyses chromatographiques des alcaloïdes

Les analyses sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse. Le résidu d'extraction est dissout dans 1 ml de dichlorométhane, puis un volume de 2µl est injecté dans l'appareil (Chrompack CP9002) à une température de four préalablement réglée à 260°C. L'appareil est équipée d'une colonne capillaire WCOT Fused Silica 30m x 0,32 mm (Coating : CP SIL, épaisseur du film : 0.25µm). La température du détecteur à ionisation de flamme est préalablement réglée à 250°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote (N₂) à une pression de 300 kp. Le gaz de combustion est l'hydrogène. Le CPG est couplé à un intégrateur de type Shimadzu. Les temps de rétention et les surfaces des pics sont enregistrés directement par l'intégrateur. Trois répétitions (injections) sont réalisées pour chaque extrait.

Pour l'analyse quantitative une gamme étalon a été préparée en utilisant de l'atropine pure (isomère lévogyre de l'hyoscyamine, Fluka BioChemika Germany). Cinq concentrations de l'étalon ont été préparées par la solubilisation de l'atropine dans du dichlorométhane. L'étalon est injecté dans le CPG selon le protocole ci-dessus. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque concentration d'étalon. La droite de régression est établie sur la base de la moyenne des valeurs des pics obtenus pour chaque concentration de l'étalon (Figure 5). Cette équation va servir au calcul automatique à l'aide du logiciel Microsoft Excel des concentrations en alcaloïdes des différents échantillons.

10. ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel GenStat. Elle a porté sur l'analyse de la variance ANOVA à un ou deux critères de classification, suivie par le test LSD de Fisher pour comparer les moyennes dans le cas où le test ANOVA est significatif au seuil de 0.05. Chaque valeur est calculée sur la base d'au moins 3 répétitions. Les moyennes suivies par la même lettre sur les tableaux et les figures ne sont pas significativement différentes selon le test LSD de Fischer pour $P \leq 0.05$.

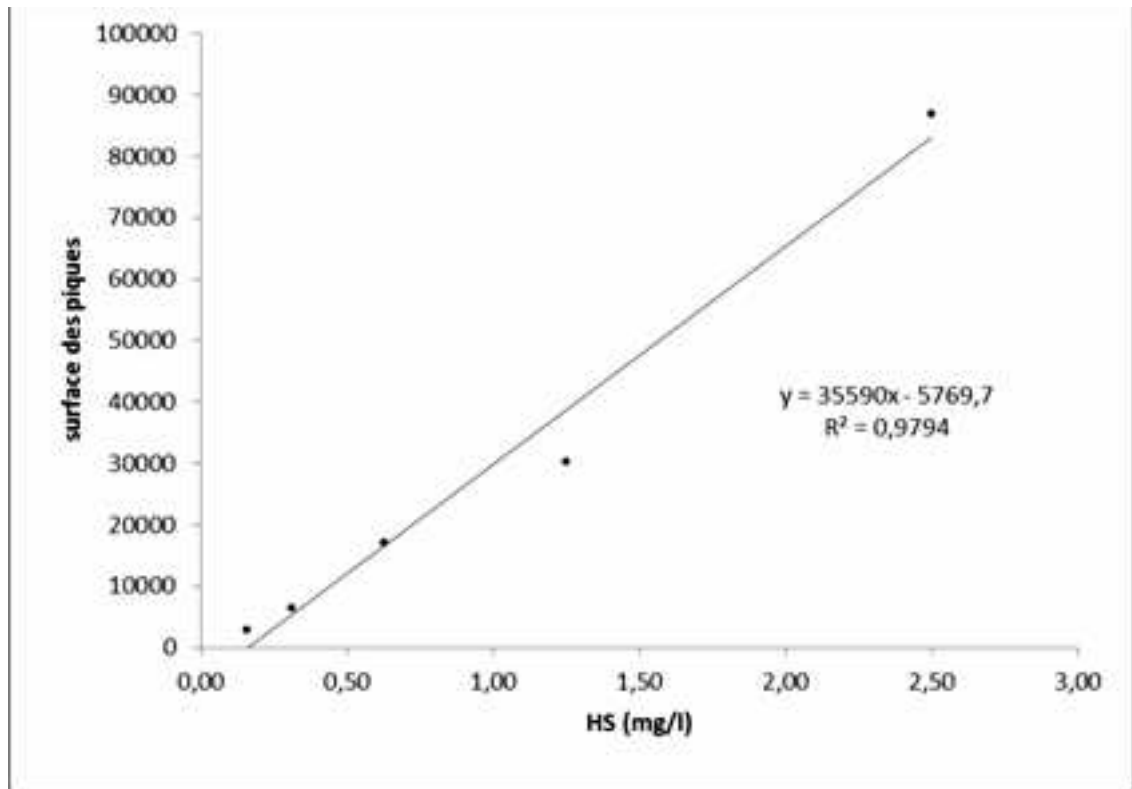


Figure 5. Gamme étalon de l'atropine et droite de régression.

RÉSULTATS

1. ETUDE COMPARATIVE DES LIGNEES RACINAIRES

La croissance des lignées racinaires durant les premiers jours de culture a été suivie en mesurant la longueur et le degré de ramification journaliers. Pour déterminer la quantité de biomasse totale produite vers la fin du cycle de culture, les chevelus racinaires ont été récoltés entièrement après 15 jours de culture pour mesurer le poids frais et le poids sec, ainsi que pour déterminer le contenu alcaloïdique. L'analyse statistique des données enregistrées a été subdivisée en deux étapes : 1) comparaison des lignées entre les espèces, 2) comparaison des lignées au sein de chaque espèce.

1.1. Comparaison interspécifique des lignées

Du point de vue morphologique, nous avons noté que les chevelus racinaires de *D. innoxia* sont fines et ont un aspect translucide alors que ceux de *D. stramonium* et *D. tatula* sont plus épais et sont de couleur blanchâtre (Figure 6). Durant les 5 premiers jours de croissance les lignées racinaires ont enregistré une croissance en longueur similaire pour les trois espèces étudiées avec une croissance journalière moyenne variant entre 0,8 et 1 cm/jour (Tableau 6). Cependant, les lignées issues de *D. stramonium* se ramifie moins (7 racines latérales) que les lignées issues de *D. tatula* et *D. innoxia* (13 et 14 racines latérales respectivement). En termes de production de biomasse, nous n'avons pas observé une grande différence entre les espèces. La différence enregistrée est significative en poids frais et non significative en poids sec.

Parmi les deux alcaloïdes tropaniques d'intérêt, seule l'hyoscyamine (HS) a été détectée dans les extraits alcaloïdiques de toutes lignées examinées. Dans nos conditions d'analyse, la scopolamine n'a été détectée chez aucune lignée. Une différence hautement significative a été révélée pour la l'accumulation de l'hyoscyamine. Les lignées racinaires issues de *D. stramonium* et *D. innoxia* produisent (2,1 et 1,98 mg/g MS d'HS respectivement) presque le double de la quantité produite par les lignées issues de *D. tatula* (0,68 mg/g MS). Cependant du point de vue rendement, le paramètre qui prend en compte aussi bien la biomasse que la teneur en HS, et qui exprime la quantité d'HS produite par litre de milieu de culture utilisé, les lignées issus de *D. stramonium* sont clairement plus productives (5,88 mg/l) que celles issues de *D. innoxia* ou *D. tatula* (3,86 et 2,01 mg/l respectivement).

Tableau 6. Comparaison interspécifique des lignées racinaires.

Espèce	L (cm)	Dr	Pf (g)	Ps (mg)	HS (mg/g MS)	Rend. HS (mg/l)
<i>D. stramonium</i>	4,46	7,27 b	0,82 a	0,056	2,10 a	5,88 a
<i>D. tatula</i>	4,33	13,44 a	0,75 ab	0,059	0,68 b	2,01 b
<i>D. innoxia</i>	3,63	14,50 a	0,43 b	0,039	1,98 a	3,86 b

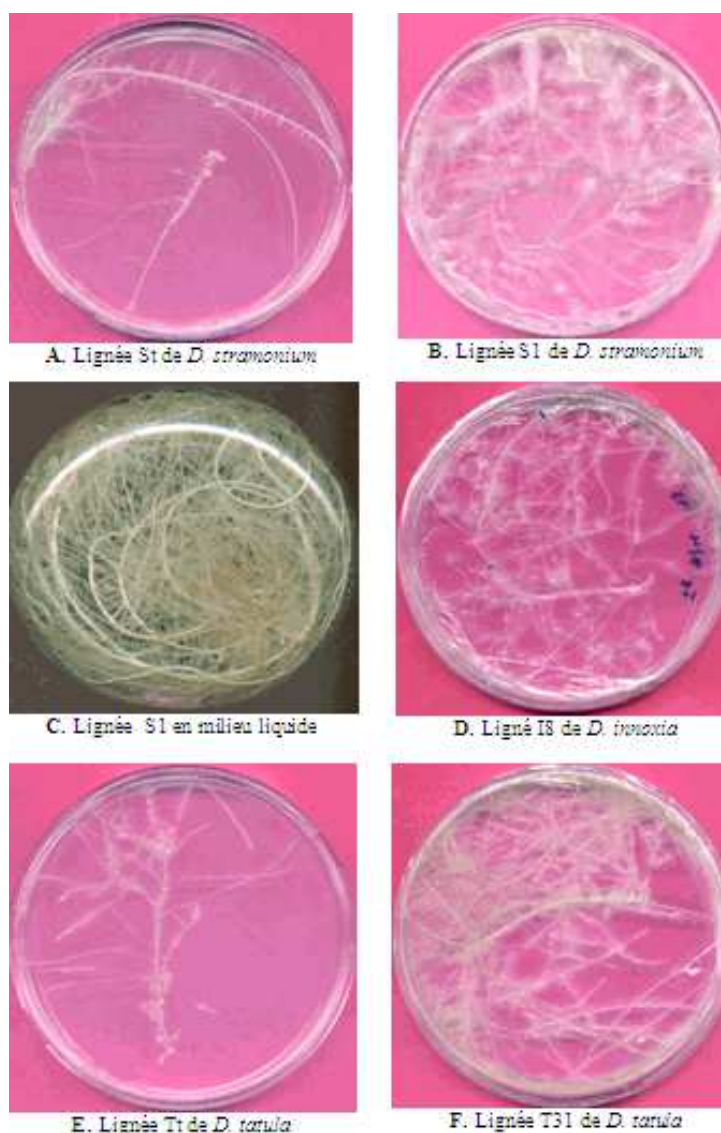


Figure 6. Morphologies de quelques lignées racinaires.

1.2. Comparaison intraspécifique des lignées

Une grande variabilité intra-spécifique a été détectée entre les lignées induites, bien qu'elles soient issues de la transformation génétique de la même espèce par la même souche (A4) d'*Agrobacterium rhizogenes*. Les vitroplants de *D. innoxia* réagissent mal à la transformation génétique par *A. rhizogenes*, les deux lignées caractérisées seraient insuffisantes pour représenter la variabilité génétique au sein de cette espèce. Au 5^{ème} jour de culture, la longueur des racines varie entre 2,3 et 6,87 cm et le degré de ramification varie entre 2 et 14 racines latérales pour les lignées racinaires issues de *D. stramonium* (Tableau 7). Pour les lignées issues de *D. tatula* la longueur racinaire varie entre 2,8 et 6,23 et le degré de ramification varie entre 9 et 23 ramifications/racine principale. Il est à noter également que la croissance n'a pas été uniforme dans le temps, de grandes oscillations journalières ont été enregistrées aussi bien pour la croissance en longueur que pour l'émission des ramifications latérales. La majorité des lignées présentent un certain temps de latence

d'environ 24 heures, durant lequel, l'élongation de la racine principale n'excède pas 1 mm. Le démarrage des ramifications latérales n'est observé qu'après au moins deux jours de culture (une ramification latérale est comptée lorsqu'elle atteint au moins 2 mm de longueur).

Concernant la quantité de biomasse finale produite, elle varie entre 0,5 et 1g de Pf pour les lignées issues de *D. stramonium*, alors qu'aucune différence significative n'est enregistrée pour les lignées issues de *D. tatula* et *D. innoxia*. La différence significative en termes de poids frais et de poids sec indique que la différence de croissance observée est due à une augmentation réelle de la biomasse et non pas à une simple accumulation d'eau dans les tissus. La teneur en HS varie entre 1,28 et 2,83 mg/g MS pour les lignées issues de *D. stramonium* et entre 0,1 et 1,5 mg/g MS pour les lignées issues de *D. tatula*.

Parmi les lignées transgéniques de *D. stramonium*, S9 serait la lignée la plus productive avec un rendement en HS de (10,33 mg/l), et la lignée S3 serait la moins productive avec un rendement de (2,66 mg/l). La lignée non transgénique St de *D. stramonium* est caractérisée par un rendement en HS (0,21 mg/l) très loin du rendement moyen des lignées transgéniques de cette espèce (6,02 mg/g MS). Ceci est due à une faible production de biomasse ($P_s = 0.013$ g), 5 fois moins que la moyenne des lignées transgéniques de *D. stramonium* (0,055 g), et une faible teneur en hyoscyamine (0,32 mg/g MS), soit 7 fois moins que la moyenne des lignées transgéniques (2,18 mg/g MS).

Parmi les lignées transgéniques de *D. tatula*, deux groupes peuvent être distingués. Le premier regroupe les lignées T2 et T23 avec des rendements en HS de 4,31 et 3,06 mg/l respectivement ; le deuxième regroupe les lignées T31 et T12 avec des rendements de 0,33 et 0,11 respectivement. La lignée non transgénique Tt aussi se trouve incluse dans ce deuxième groupe avec un rendement en HS de 0,28 mg/l, elle est caractérisée par une teneur en HS (0,84 mg/g MS) comparable ou supérieure à certaines lignées transgéniques de la même espèce (min : 0,04, max : 1,5 mg/g MS). Cependant, elle est caractérisée par une faible production de biomasse (0,007 g), soit 8 fois moins que la moyenne des lignées transgéniques de la même espèce.

Tableau 7. Production de biomasse et d'hyoscyamine par les lignées issues de chacune des trois espèces.

lignées	L (cm)	Dr	Pf (g)	Ps (g)	HS (mg/g MS)	Rend (mg/l)
<i>D. stramonium</i>						
St	3,83 bc	4,33 bc	0,17 c	0,013 c	0,32 d	0,21 d
S1	6,87 a	12,00 a	1,03 a	0,071 a	1,28 c	4,49 bc
S3	5,73 ab	9,00 ab	0,51 b	0,035 bc	1,70 bc	2,66 cd
S9	2,60 c	8,33 ab	1,07 a	0,068 a	2,83 a	10,33 a
S18	5,4 ab	7,67 ab	0,52 b	0,038 b	2,33 ab	4,51 bc
S22	2,37 c	2,33 c	0,95 a	0,068 a	2,37 ab	8,15 ab
<i>D. tatula</i>						
Tt	6,23 a	7,00 c	0,09 b	0,007 b	0,84 b	0,28 b
T2	2,80 c	9,67 bc	0,68 a	0,057 a	1,5 b	4,31 a
T12	3,20 c	14,00 abc	0,71 a	0,054 a	0,04 a	0,11 b
T13	5,13 a	23,00 a	0,63 a	0,055 a	1,1 b	3,06 a
T31	4,97 ab	18,00 ab	0,98 a	0,073 a	0,09 a	0,33 b
T33	3,67 bc	9,00 bc	0,74 a	0,056 a	0,62 b	1,98 b
<i>D. innoxia</i>						
I8	5,97 b	16,00 b	0,4	0,031	2,11	3,27
I10	1,30 a	13,00 a	0,45	0,048	1,86	4,46

1.3. Analyse de corrélations entre les paramètres étudiés

Le Tableau 8 présente la matrice de corrélation entre les paramètres mesurés pour la caractérisation des lignées racinaires. La longueur des racines mesurée durant les cinq premiers jours de culture est faiblement corrélée ($r = 0,45$) aux taux de ramification mesurés durant la même période. Les lignées racinaires présentant le développement en longueur le plus performant, ne sont pas forcément celles qui se ramifient le mieux. Une très faible corrélation a été enregistrée entre les paramètres de croissance mesurés jusqu'au 5^{ème} jour de la culture (longueur et ramification) et celles mesurés à la récolte (après 15 jours de culture, Pf, Ps et W) ($-0,09 < r < 0,26$). A titre d'exemple nous avons enregistré une longueur de 6,2 cm pour la lignée non transgénique de *D. tatula* Tt, comparable à celle de la lignée transgénique T31 (5,2 cm) alors qu'à la récolte, le poids sec de la lignée Tt n'excède pas 7 mg, soit 10 fois moins que celui de T31 (74 mg). Par contre une très grande corrélation est enregistrée entre la production de biomasse et l'accumulation de l'hyoscyamine (HS : mg/g MS) ($0,94 < r < 0,99$). Cependant, quelques exceptions à cette règle ont été détectées. A titre d'exemple, la lignée T31 de *D. tatula* est classée la première pour le poids sec (0,74 g) alors qu'elle est au dernier rang pour la teneur en hyoscyamine (0,091 mg/g MS). Un autre exemple dans le sens contraire, la lignée I8 de *D. innoxia* qui est une mauvaise productrice de biomasse (31 mg), alors qu'elle a une concentration en hyoscyamine relativement bonne (2,11 mg/g MS). Le rendement en HS est corrélé de la même manière aussi bien avec la biomasse ($r = 0,55$) qu'avec la teneur en HS ($r = 0,55$).

Tableau 8. Matrice de corrélations deux à deux entre les paramètres étudiés.

INDUCTION DE CHEVELUS RACINAIRES CHEZ TROIS ESPECES DE *Datura*, SELECTION DE LIGNEES PERFORMANTES POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES

	Longueur (cm)	Rami-fication	Pf (g)	Ps(g)	W (g)	HS (mg/g ms)	Rend (mg/l)
Longueur (cm)	1						
Ramification	0,45**	1					
Pf (g)	-0,04	0,24	1				
Ps(g)	-0,09	0,26	0,95***	1			
W (g)	-0,03	0,24	0,99***	0,94***	1		
HS (mg/g ms)	-0,03	0,24	0,99***	0,94***	1***	1	
Rend (mg/l)	-0,36*	-0,07	0,55***	0,51***	0,55***	0,55***	1

Les étoiles indiquent le degré de signification statistique du coefficient de corrélation :
* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001.

1.4. Comportement des chevelus racinaires sur deux modes de culture : culture stationnaire en milieu semi-solide et culture en milieu liquide avec agitation.

La lignée S1 de *D. stramonium* a été mise en culture selon deux modes de cultures différents, culture en boîte de Pétri sur 20 ml de milieu B5 semi-solide et culture en flacons Erlenmeyer dans 50 ml de milieu B5 liquide avec agitation rotative (100rpm) (Figures 6B. et 6C.) pour examiner sa réponse à ces modes de culture. Pour standardiser les données nous avons considéré la teneur en HS (mg/g de MS) qui ne dépend pas du volume de culture et le taux de dédoublement calculé en divisant la biomasse finale sur l'inoculum au lieu du Pf ou Ps finale. Le taux de dédoublement des chevelus racinaires cultivés en milieu liquide (33,039) est 66% plus élevé que celui enregistré en culture sur milieu semi-solide (20,24) (Tableau 9). La teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires cultivés sur milieu liquide est de 5,9 mg/g MS. Elle est presque 5 fois plus élevée que celle des chevelus cultivés sur milieu semi-solide.

Tableau 9. Réponse des chevelus racinaires de *D. stramonium* à la culture stationnaire sur milieu semi-solide et la culture en milieu liquide avec agitation.

Mode de culture	Milieu B5 semi-solide (20 ml) en boîtes de Pétri	Milieu B5 liquide (50 ml) en Flacons de 250 ml + agitation
Pf initial (g)	0,041	0,122
Pf final (g)	0,830	3,97
Taux de dédoublement (Pf final /Pf initial)	20,24 b	33,03 a
HS (mg/g MS)	1,28 b	5,869 a

2. CINETIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES

La croissance et l'accumulation de l'hyoscyamine de la lignée S1 de *D. stramonium* a été suivie durant un mois de culture dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml

de milieu B5 liquide. Les chevelus racinaires de trois flacons sont récoltés tous les 5 jours pour mesurer le poids frais, le poids sec, ainsi que la teneur en HS. En se basant sur la courbe de croissance représentée sur la Figure 7 (courbe rouge), le cycle de croissance peut être subdivisé en trois phases :

1. La phase de latence qui correspond plus ou moins aux deux premiers jours de culture. Durant cette phase une absence ou une faible augmentation de la biomasse a été enregistrée.

2. La phase exponentielle qui coïncide à la période s'étalant entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour. Elle est caractérisée par une forte vitesse de croissance, la lignée atteint son maximum au 15^{ème} jour d'incubation (0,26 g MS/flacon).

3. La phase stationnaire qui commence à partir du 15^{ème} jour et se prolonge jusqu'à la fin du cycle. La biomasse enregistrée à partir du 15^{ème} jour reste sensiblement stable (variation statistiquement non significative).

L'hyoscyamine a été détecté tout au long du cycle de croissance de la lignée S1 de *D. stramonium* (Figure 7, courbe noire). La teneur en HS enregistré durant les 10 premiers jours de culture est faible et stable (0,1 mg/g MS). Elle a subit par la suite une augmentation considérable entre le 10^{ème} et le 20^{ème} jour de culture pour atteindre son maximum au 20^{ème} jour (8 mg/g MS). La teneur en HS est relativement stable durant les 10 derniers jours (du 20^{ème} au 30^{ème} jour) de culture. L'évolution du rendement en HS suit sensiblement l'évolution de la teneur en HS. Le rendement maximal a été enregistré vers le 20^{ème} jour (40 mg/l) (Figure 8).

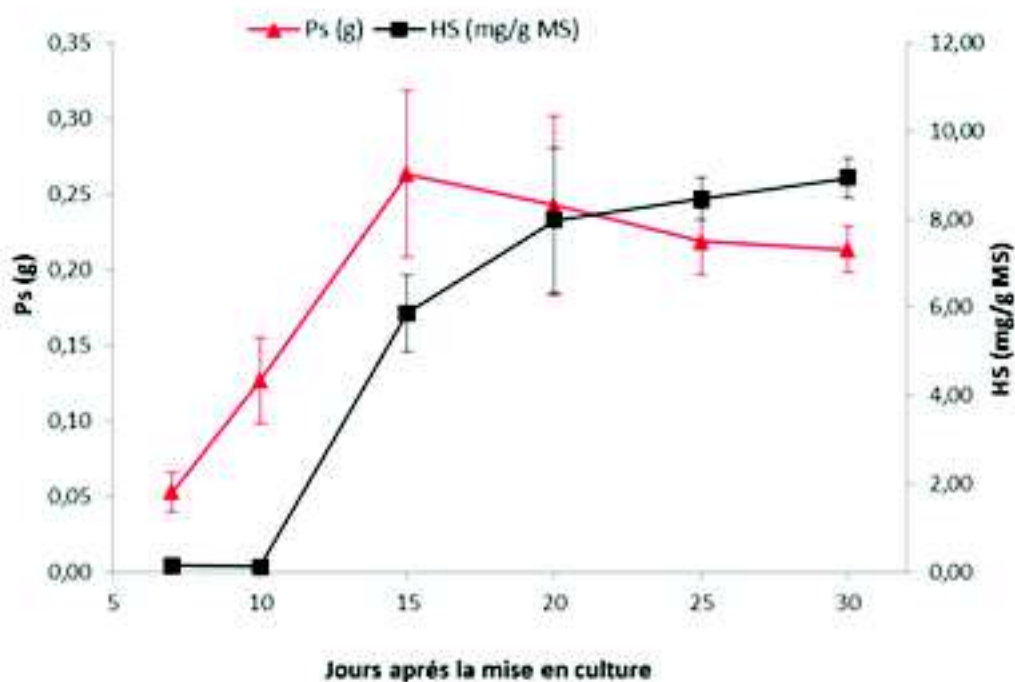


Figure 7. Cinétique de croissance et d'accumulation de l'hyoscyamine chez la lignée S1 de *D. stramonium* pendant un mois de culture.

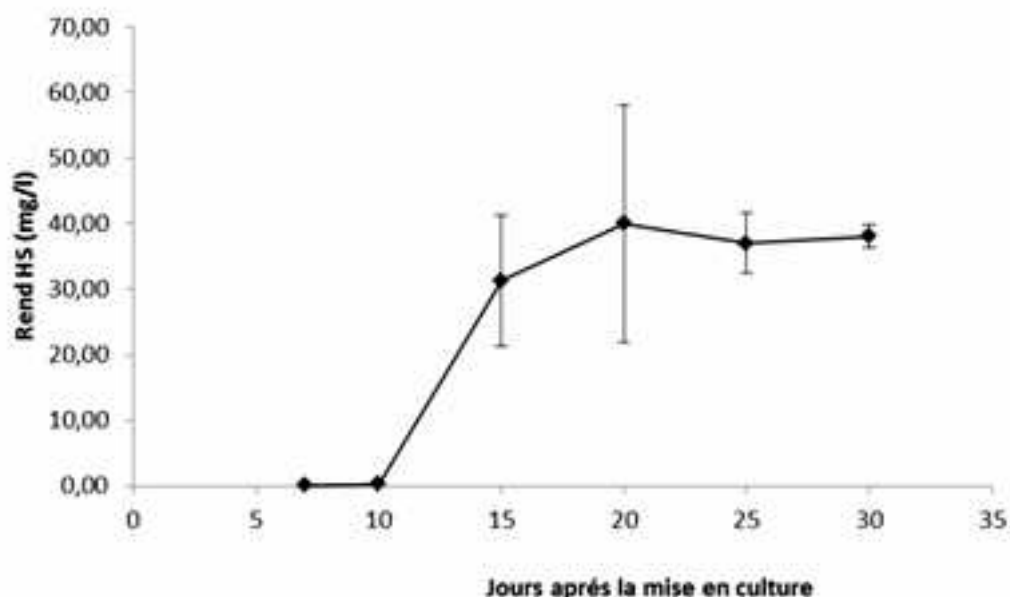


Figure 8. Evolution du rendement en hyoscyamine pendant un mois de culture de la lignée S1.

3. REPONSE DES CHEVELUS RACINAIRES À LA CULTURE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE

Trois milieux de base à savoir B5, MS, LS ainsi que la dilution de moitié de deux milieux B5/2 et MS/2 ont été examinés pour voir leurs effets sur la croissance et l'accumulation de l'hyoscyamine dans les chevelus racinaires de *D. stramonium*. L'analyse de la variance des résultats obtenus révèle un effet hautement significatif ($P < 0.01$) des milieux étudiés aussi bien sur la production de biomasse que sur l'accumulation de l'hyoscyamine. La croissance maximale a été observée dans les chevelus racinaires cultivés sur le milieu B5 entier (Figure 9), où un poids sec de 0.07 g a été enregistré après 15 jours de culture, ce qui correspond à deux fois plus que les milieux dilués B5/2 et MS/2 qui donnent les biomasses les plus faibles ($P_s = 0.03$ et 0.02 g respectivement). Une croissance intermédiaire a été obtenue pour les chevelus racinaires cultivés sur les milieux MS ($P_s = 0,05$ g) et LS ($P_s = 0.04$).

En terme d'accumulation d'hyoscyamine un résultat tout à fait contraire au précédent a été observé (Figure 10). Les chevelus racinaires cultivés sur les deux milieux dilués B5/2 et MS/2 ont produit respectivement 10,8 et 9,6 mg/g MS de HS, soit le double de ce qui a été obtenu avec les milieux B5 et MS entiers. La teneur minimale en hyoscyamine a été obtenue avec les chevelus racinaires cultivés sur le milieu LS. Cependant, en termes de rendement, le milieu B5 entier semble être le plus adéquat pour la production de l'hyoscyamine par les chevelus racinaires de *D. stramonium in vitro*, puisque il permet l'obtention d'un rendement (8,07 mg/l) significativement plus élevé que les autres milieux examinés (entre 3,16 et 5,8mg/l) (Figure 10).

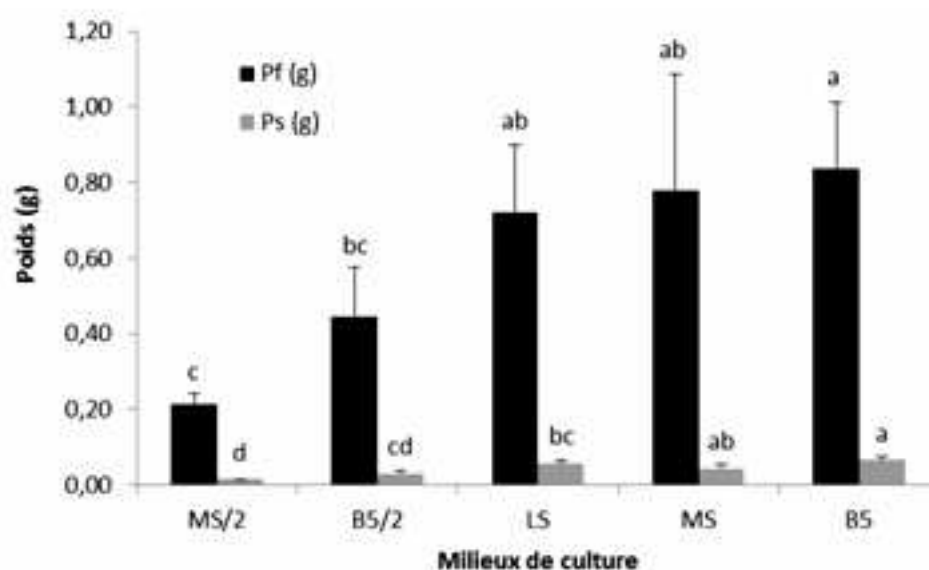


Figure 9. Production de biomasse par les chevelus racinaires de la lignée S1 cultivée sur différents milieux liquides durant 15 jours

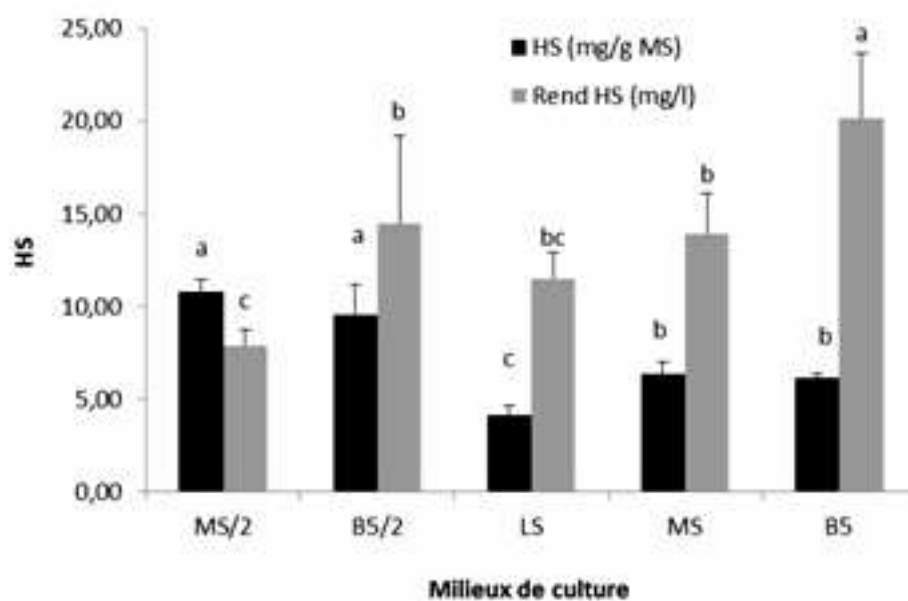


Figure 10. Teneur et rendement en HS des chevelus racinaires de la lignée S1 cultivés sur différents milieux liquides durant 15 jours

4. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN

Les chevelus racinaires âgés de 14 jours ont été élicités durant 24 heures, par trois concentrations différentes de NaCl (1, 2 et 3 g/l). Le poids frais, le poids sec et la teneur en hyoscyamine ont été mesurés à la fin du cycle de culture. L'analyse de la variance des

résultats obtenus n'a révélé aucun effet significatif du sel sur la biomasse des chevelus racinaires (poids frais et poids sec) (Figure 11). Cependant, un effet hautement significatif de la concentration du sel a été révélé sur la teneur en hyoscyamine (Figure 12). L'élicitation des cultures racinaires par 1 et 2 g/l de NaCl entraîne une augmentation de la teneur en HS (8,37 et 11,01 mg/g MS respectivement) d'environ trois fois plus que le témoin (2,74 mg/g MS). Cependant une concentration plus élevée en NaCl à 3 g/l a entraîné un effet inverse, en induisant une réduction de la teneur en hyoscyamine pour atteindre 1,01 mg/g MS (presque le tiers du témoin). Puisque l'élicitation par le stress salin n'a entraîné aucune variation au niveau de la production de biomasse alors, le rendement en HS suit la même tendance que la teneur en HS (Figure 12).

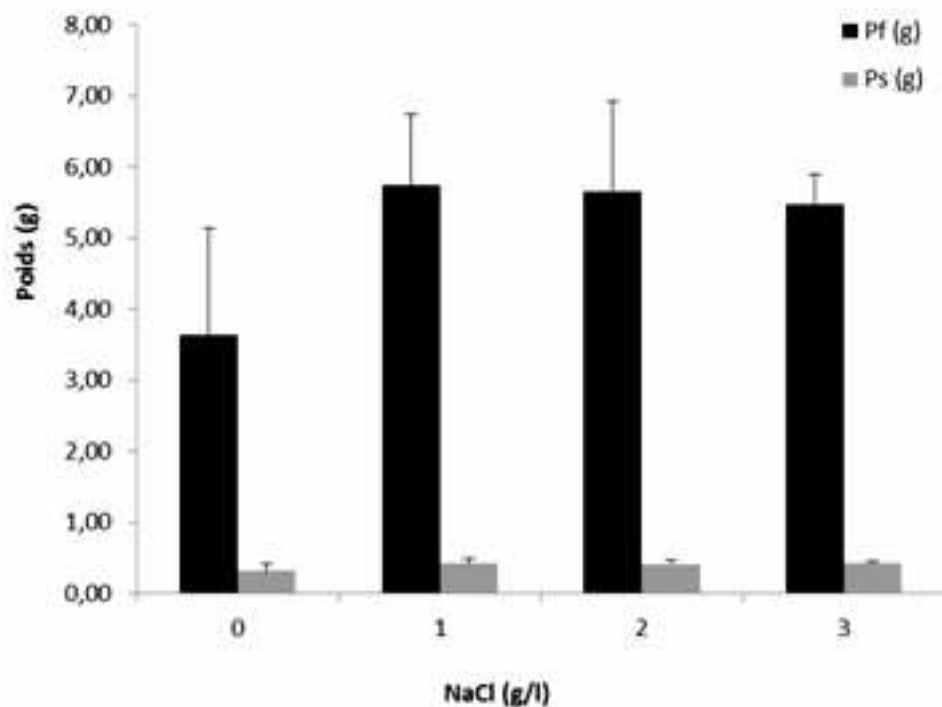


Figure 11. Biomasse des chevelus racinaires de la lignée S1 après élicitation par différentes concentrations de NaCl durant 24 heures

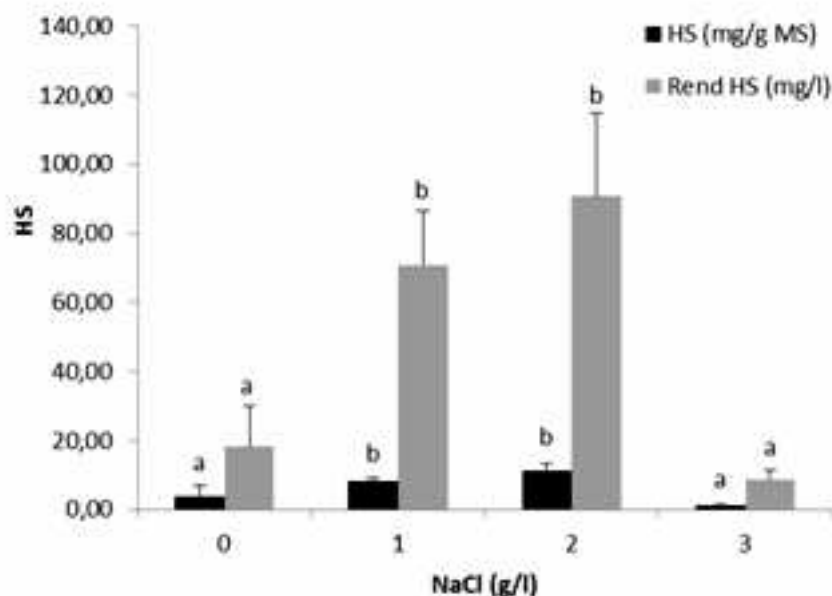


Figure 12. Teneur et rendement en HS des cultures de la lignée S1 élicitées par différentes concentrations de NaCl durant 24 heures

Pour tester l'effet du stress salin sur la croissance et la viabilité des chevelus racinaires, la lignée S1 a été cultivée sur le milieu B5 contenant les mêmes concentrations de NaCl utilisées pour l'élicitation (1, 2 et 3g/l). L'analyse de la variance a montré un effet hautement significatif du stress salin sur la croissance des chevelus racinaires (Figure 13). Indifféremment (différence statistiquement non significative) les trois concentrations de sel testées provoquent une diminution en biomasse (0,1 à 0,2 g de Pf) de l'ordre 75% par rapport au témoin (Ps 0,95 g de Pf).

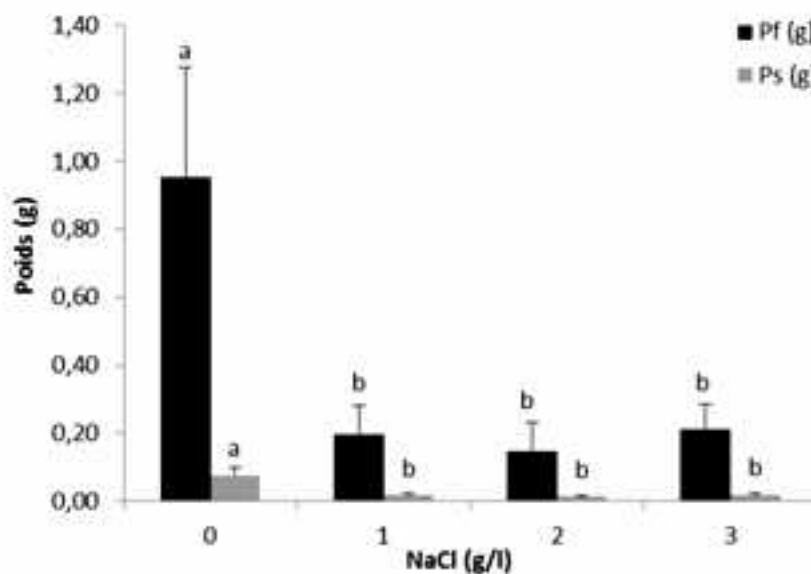


Figure 13. Biomasse des chevelus racinaires de la lignée S1 cultivés sur milieu B5 contenant différentes concentrations de NaCl .

5. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURE

Les cultures de chevelus racinaires dérivés de la lignée S1 ont été élicitées par différentes concentrations de l'extrait de levure (YE : 10, 100 et 1000 mg/l) durant 24 heures. L'analyse de la variance des résultats obtenus n'a révélée aucun effet significatif de l'extrait de levure sur la production de biomasse (Figure 14). Un effet hautement significatif a été révélé sur la teneur en HS. A faible dose (10 mg/l) l'extrait de levure n'a provoqué aucun changement par rapport au témoin (Figure 15). Cependant, à forte doses (100 et 1000 mg/l) l'extrait de levure présente un effet négatif très prononcé sur le contenu alcaloïdique des chevelus racinaires. La teneur en HS des chevelus racinaires élicités avec une concentration de 100 ou 1000 mg/l d'extrait de levure n'excède pas 0,07 mg/g MS de HS, soit 99% moins que le témoin (6,94 mg/g MS).

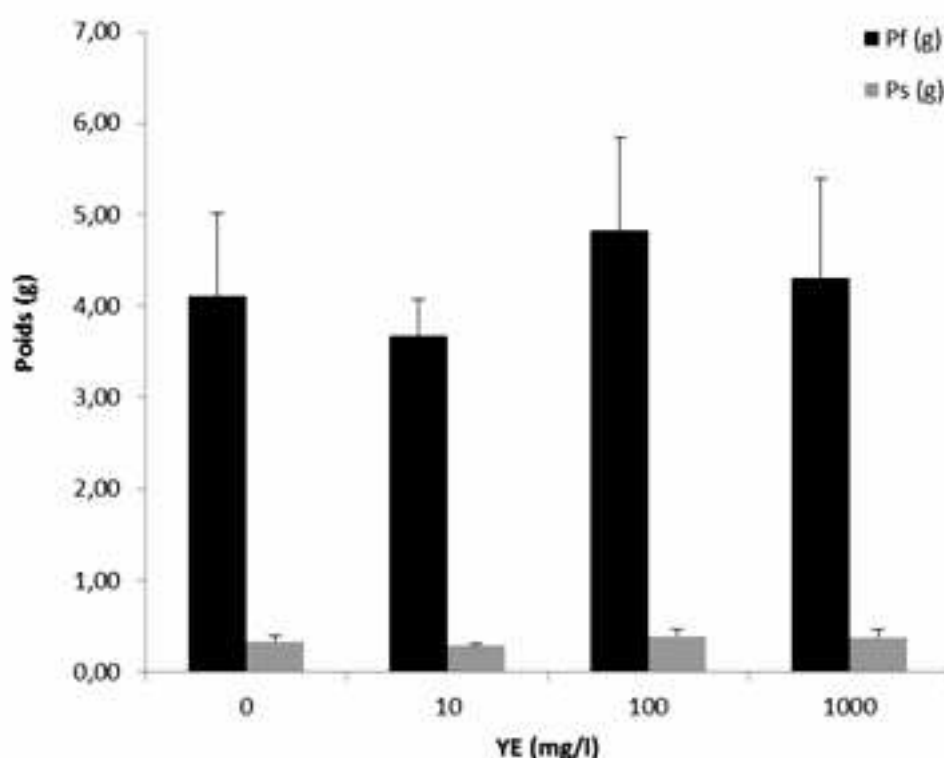


Figure 14. Biomasse des chevelus racinaires de la lignée S1 après élicitation par différentes concentrations d'extrait de levure durant 24 heures.

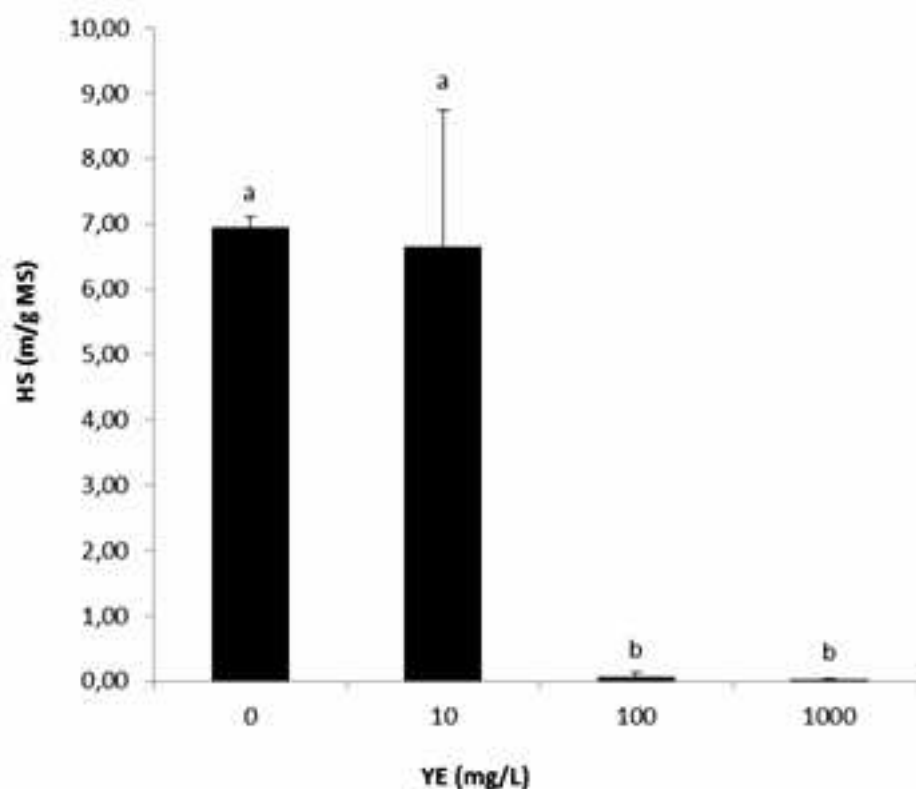


Figure 15. Teneur en HS des chevelus racinaires de la lignée S1 élicité par différentes concentrations d'extrait de levure durant 24 heures.

6. EFFETS SIMULTANES DE L'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE ET LA PERMEABILISATION PAR LE TWEEN 20

Dans le but de tester les effets simultanés d'un éliciteur (acide jasmonique) et d'un agent de perméabilisation (Tween 20), un essai en dispositif factoriel 4 x 4 entre ces deux facteurs a été conduit. Ces traitements ont été ajoutés aux cultures de la lignée S1 âgées de 14 jours. Les chevelus racinaires ont été récoltés après 24 heures d'incubation. Les alcaloïdes présents dans les chevelus racinaires ainsi que les alcaloïdes présents dans le milieu de culture ont été extraits et analysés par CPG. Cependant, le protocole adopté pour le dosage de l'hyoscyamine issue des racines n'était pas adapté pour le dosage de l'hyoscyamine libérée dans le milieu de culture suite aux traitements de perméabilisation par le T20. Néanmoins, pour avoir une idée générale sur le taux de l'HS qui pourrait être libérée dans le milieu de culture après perméabilisation au T20, une estimation a été réalisée en comparant la teneur en HS dans le tissu racinaire des chevelus témoins (non traité au T20) avec la quantité de l'HS restituée dans les tissus traités au T20. La différence correspondrait à la quantité libérée dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau 10.

INDUCTION DE CHEVELUS RACINAIRES CHEZ TROIS ESPECES DE *Datura*, SELECTION DE LIGNEES PERFORMANTES POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES

Tableau 10. Biomasse, HS dans les chevelus racinaires et HS dans le milieu de culture de la lignée S1 soumis à différents traitements JAxT20 durant 24 heures.

JA	T20	Pf (g)	Ps (g)	HS Tissu racinaire (mg/g MS)	HS milieu (mg/g MS)	HS milieu (mg/l)
0	0	3,82	0,26	5,87	0,00	0,00
0	0,5	3,51	0,46	1,01	4,86	44,69
0	1,5	3,95	0,24	0,59	5,28	24,97
0	3	4,38	0,21	0,55	5,32	22,71
10	0	2,96	0,28	4,44	0,00	0,00
10	0,5	2,85	0,21	1,08	3,36	14,10
10	1,5	3,51	0,24	0,89	3,55	16,78
10	3	3,18	0,23	0,39	4,05	18,35
100	0	3,28	0,27	3,28	0,00	0,00
100	0,5	2,90	0,24	1,01	2,27	10,87
100	1,5	3,57	0,27	0,83	2,45	13,08
100	3	3,39	0,23	0,30	2,98	13,91
1000	0	2,63	0,31	3,57	0,00	0,00
1000	0,5	2,76	0,23	0,78	2,79	13,01
1000	1,5	2,64	0,25	0,60	2,97	14,64
1000	3	2,97	0,23	0,43	3,15	14,68

L'analyse de la variance des résultats obtenus a montré un effet significatif du T20 sur la biomasse exprimé en poids frais et non significatif sur le poids sec (Figure 16). Les trois concentrations du T20 (0,5, 1,5 et 3%), provoquent indifféremment une diminution du poids frais des chevelus racinaires de l'ordre de 25% par rapport au témoin. L'effet du T20 est également évident sur l'aspect extérieur des racines traitées. Après 24 h d'incubation en présence du T20 les racines commencent à flétrir et prennent une couleur brunâtre (Figure 17).

En termes de production alcaloïdique, l'analyse de la variance n'a pas révélé un effet significatif de l'acide jasmonique sur l'accumulation de l'hyoscyamine au niveau des tissus racinaires ($p = 0,096$) (Figure 18). Il est à noter que dans cette analyse uniquement les résultats issus des traitements témoins pour le T20 ont été considérés. C'est-à-dire les traitement JA x T20 correspondant aux combinaisons 10 μ M-0% , 100 μ M-0% et 1000 μ M-0% respectivement.

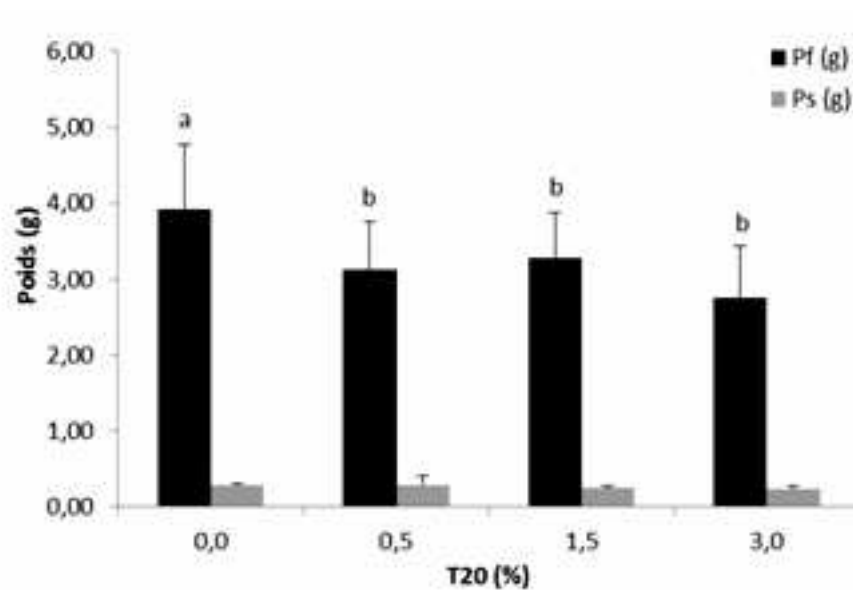


Figure 16. Biomasse des chevelus racinaires de la lignée S1 après perméabilisation par différentes concentrations du T20 durant 24 heures.



Chevelu témoin en culture (0% T20)



Chevelu traitée avec 1.5% de T20 en culture



Chevelus témoin après la récolte



Chevelu traité avec 1.5% de T20 après la récolte

Figure 17. Variation de la morphologie des chevelus racinaires provoqué par le T20.

La perméabilisation des chevelus racinaire par le T20 présente un effet très hautement significatif sur le taux de libération de l'HS dans le milieu de culture. L'addition du T20 à la culture de la lignée S1 avec une concentration variant entre 0,5 et 3% pendant 24 heures d'incubation provoque un épuisement presque total (70 à 80%) du contenu alcaloïdique des chevelus racinaires (Figure 19). Les chevelus racinaires soumis à la perméabilisation par la dose la plus faible du T20 (0,5%) ne retiennent que 0,97 mg/g MS d'HS correspondant à moins d'un quart de la production totale de l'HS (4,28mg/gMS).

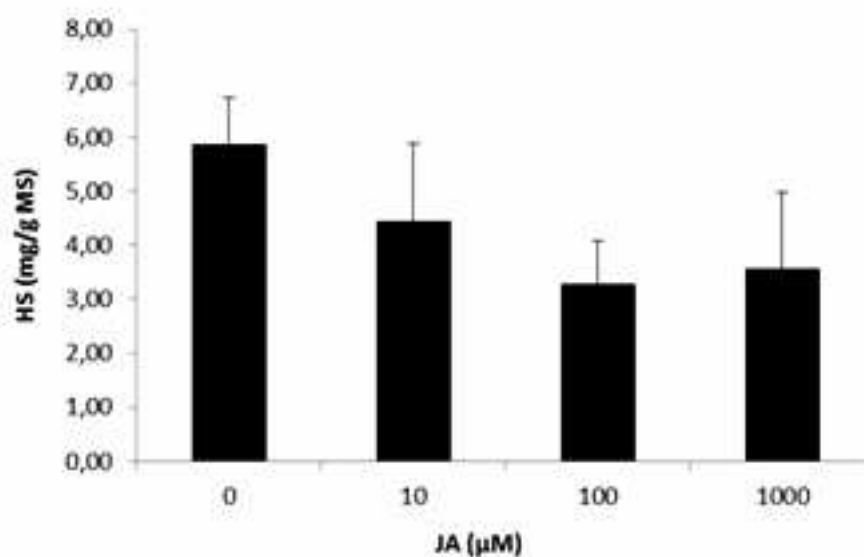


Figure 18. Teneur en HS des chevelus racinaires de la lignée S1 élicités par différentes concentrations de JA durant 24 heures.

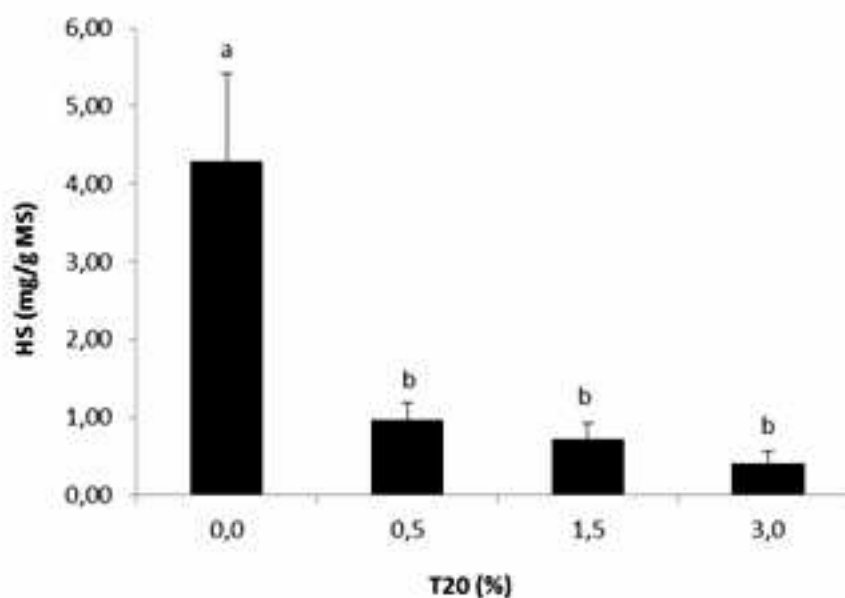


Figure 19. Teneur en HS des chevelus racinaires de la lignée S1 après perméabilisation par différentes concentrations du T20 durant 24 heures.

La viabilité des chevelus racinaires et le pouvoir de reprendre la croissance normale après perméabilisation est très recherchée dans un processus de production continue. Nous avons signalé ci-dessus que le T20 provoque la diminution du poids frais et le brunissement des tissus racinaires après seulement 24h d'incubation. Ainsi, pour examiner l'effet du T20 sur la croissance et la viabilité des chevelus racinaires, un autre essai a été lancé. Les clones de la lignée S1 ont été cultivés sur milieu B5 semi-solide, auquel nous avons ajouté les différents doses du T20 (0,5, 1,5 et 3%) dès le début de la culture. Les résultats obtenus montrent que cet agent de perméabilisation présente un effet drastique sur la croissance des chevelus racinaires (Figure 20). Il provoque un blocage quasi-total de la croissance

quelle que soit la dose appliquée. Les tissus prennent un aspect brunâtre, tandis que les apex racinaires se nécrosent (Figure 21).

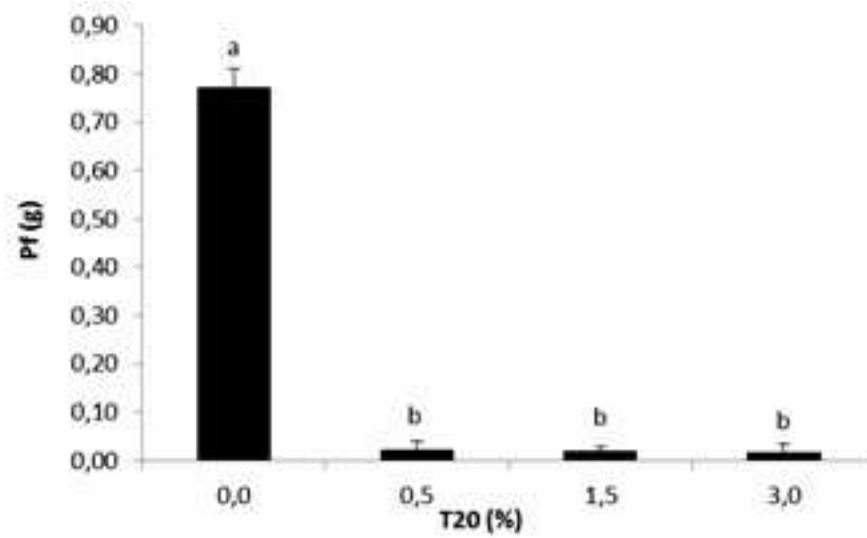


Figure 20. Biomasse des chevelus racinaires de la lignée S1 cultivés sur milieux B5 contenant différentes concentrations du T20.

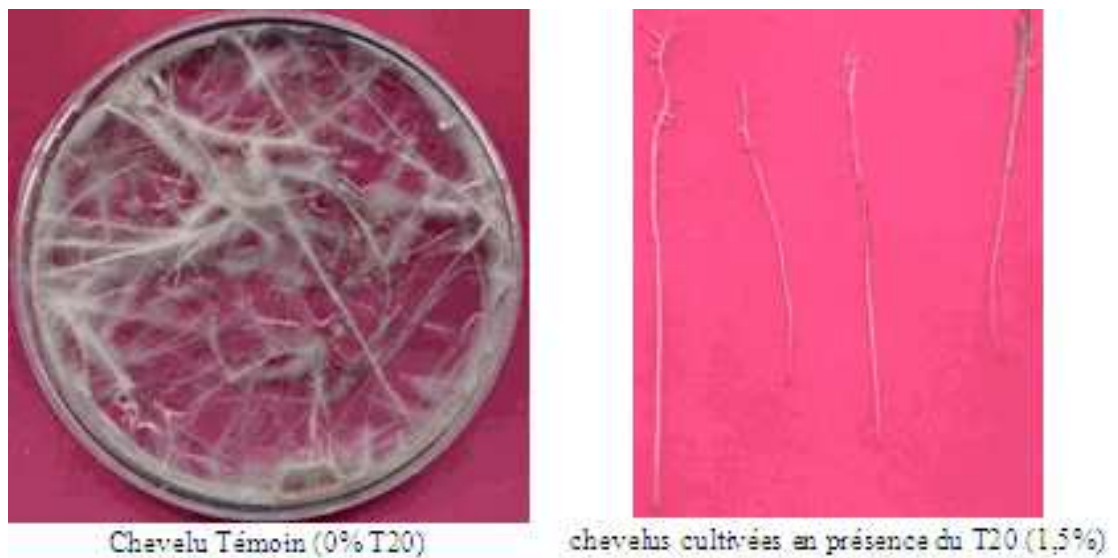


Figure 21. Morphologie des chevelus racinaires témoins et des chevelus traités au T20.

DISCUSSION

1. ETUDE COMPARATIF DES LIGNEES RACINAIRES

Une variabilité génétique inter et intra-spécifique considérable a été détectée entre les lignées examinées en termes de morphologie (biomasse, degré de ramification et couleur) et d'accumulation d'hyoscyamine dans les tissus. Cette variabilité pourrait avoir comme origine d'une part, la diversité génétique du matériel végétal utilisé et d'autre part, la position d'insertion du T-DNA sur les chromosomes, sa longueur et le nombre de copies intégrées dans le génome (Baiza *et al.*, 1998). Ceci suggère la possibilité de réaliser une sélection efficace dans le but d'obtenir des lignées performantes aussi bien pour la production de biomasse que pour l'accumulation des alcaloïdes tropaniques. Nos résultats montrent que les chevelus racinaires de *D. stramonium* seraient les plus riches en hyoscyamine suivie par ceux de *D. tatula* et *D. innoxia*. Ceci reflète le contenu en hyoscyamine dans les racines des plantes entières. Les analyses réalisées par Houmani (1999), montrent que les racines de *D. stramonium* et *D. tatula* sont plus riches en Hyoscyamine que celles de *D. innoxia*.

Dans les racines des plantes entières l'hyoscyamine est l'alcaloïde prédominant, la scopolamine n'est détectée que sous forme de traces (Iranbakhsh *et al.*, 2006). Il semble que les chevelus racinaires cultivés *in vitro* ont un profil biosynthétique similaire à celui des racines des plantes dont elles sont issues (Parr *et al.*, 1988 ; Shanks et Morgan, 1999 ; Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Nos résultats sont en droite ligne avec ceci, puisque nous n'avons détecté que de l'hyoscyamine au niveau de toutes les lignées racinaires examinées. L'absence de la scopolamine dans les lignées étudiées peut être due à une faible activité de l'hyoscyamine-6- β -hydroxylase (H6H), l'enzyme clé responsable de la conversion de l'hyoscyamine en scopolamine ou à un taux de dégradation interne (turn-over) élevé de cet alcaloïde (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993).

En comparant les lignées racinaires non transgéniques de *D. stramonium* avec les lignées transgéniques issues de la transformation génétique par la souche A4 d'*A. rhizogenes*, nous avons remarqué que la lignée non transgénique St est caractérisée par un faible taux de croissance, ce qui est en concordance avec les résultats obtenus par Maldonado-Mendoza *et al.* (1993). Les différences dans la croissance seraient dues au développement et à la croissance des racines latérales et à la présence de zones méristématiques intercalaires actives (Baiza *et al.*, 1998). Cependant, contrairement à nos résultats, ces auteurs indiquent que les lignées non transgéniques de *D. stramonium* sont plus riches en hyoscyamine que les lignées transgéniques. Dans nos essais ceci a été vérifié pour les lignées de *D. tatula*. La lignée non transgénique Tt est plus riche en hyoscyamine que certaines lignées transgéniques.

La production de biomasse finale ne pourrait être déduite en se basant sur le comportement des lignées racinaires durant les premiers jours de culture. L'analyse de corrélation a mis en évidence que la croissance des chevelus racinaires durant les premiers jours de culture exprimée en longueur et degré de ramification n'est pas corrélée à la quantité de biomasse produite vers la fin du cycle de culture. Nos résultats montrent que la production de l'hyoscyamine est fortement corrélée à la production de biomasse. Par contre,

Parr *et al.*, (1988) et Maldonado-Mendoza *et al.*, (1993) signalent une corrélation négative entre la capacité de croissance et le contenu alcaloïdique.

Pour assurer une bonne réponse à la sélection des lignées racinaires, les critères de sélection doivent être bien définis en fonction des objectifs recherchés. Bien que la mesure de la longueur et du degré de ramification permettent d'avoir une idée sur le comportement des lignées racinaires durant les premiers stades de croissance, les données les plus intéressantes à tenir en compte seraient celles enregistrées vers la fin du cycle de culture. Dans le cadre de ce travail nous préconisons le rendement en hyoscyamine comme critère de sélection. Le rendement est un paramètre qui prend en compte aussi bien la biomasse que la teneur en HS des cultures racinaires indépendamment du comportement de celles-ci durant les premiers stades de culture.

La production de métabolites secondaires à l'échelle commerciale nécessiterait la culture des chevelus racinaires en bioreacteurs. Les conditions de culture des chevelus racinaires au laboratoire en milieu liquide avec agitation seraient les plus proches des conditions de culture en bioreacteurs. Ce mode de culture permettrait de prédire le comportement d'une lignée racinaire en bioréacteur mieux que la culture en mode stationnaire sur milieu solide. Durant les premières phases de sélection des lignées racinaires où il y a lieu de travailler sur une large population de lignées, l'utilisation de la culture stationnaire sur milieu solide en boîtes de Pétri serait souhaitée pour faire un premier criblage. Cependant, durant les derniers stades du processus de sélection, quand le nombre de lignées à tester est moindre, il serait judicieux d'utiliser la culture en milieu liquide avec agitation pour l'évaluation des lignées.

2. ETUDE DE LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE ET D'ACCUMULATION DES ALCALOÏDES

L'étude de la cinétique de croissance des chevelus racinaires permet d'obtenir les informations nécessaires pour l'ajustement du temps d'application des processus d'optimisation de la culture, tel que l'élicitation et la perméabilisation et le temps de récolte dans le cas des systèmes de production continus ou discontinus en bioréacteurs. Les résultats obtenus dans le cadre de nos conditions expérimentales montrent que la période du rendement maximale se situe entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jours de culture.

La cinétique de croissance et d'accumulation de l'hyoscyamine de notre lignée suit le même modèle que celui décrit par Oksman-Caldentey *et al.*, (1994) pour les chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus* par Lee *et al.* (1998a), pour les chevelus racinaires de la belladone, avec un léger avancement ou décalage dans le temps qui pourrait être dû aux conditions de culture, aux caractéristiques de l'inoculum, ou aux propriétés intrinsèques du matériel végétal.

Deux modèles reliant la croissance et l'accumulation des métabolites secondaires ont été proposés. Le premier est basé sur l'hypothèse selon laquelle la biosynthèse de métabolites secondaires est très réduite durant la phase active de croissance (phase exponentielle), et démarre activement plus tard pour atteindre son maximum quand la croissance des tissus est quasi-achevée (phase stationnaire). Le deuxième modèle suppose qu'il n'existe plus de compétition entre la croissance et la biosynthèse de métabolites secondaires (Baiza *et al.*, 1998). Nos résultats sont en concordance avec le

premier modèle. L'hyoscyamine commence à augmenter entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour de culture ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance, elle passe de 0,1 mg/g MS à 6 mg/g MS, et atteint sa valeur maximale (8 mg/g MS) durant la phase stationnaire. Maldonado-Mendoza et al. (1993) signalent également que le contenu alcaloïdique dans les chevelus racinaires de *D. stramonium* est faible durant la phase exponentielle de croissance et atteint sa valeur maximale durant la phase stationnaire. Par contre, la teneur en alcaloïdes indoliques dans les chevelus racinaires de *Catharanthus roseus* vers la fin du cycle de croissance (322 µg/g Pf) n'est pas significativement différente avec celle des tissus en croissance rapide durant la phase exponentielle (296 µg/g Pf) (Parr et al., 1988). Ceci montre que le modèle de croissance et de production des métabolites secondaires varie d'une espèce à l'autre et peut être, entre les lignées issues de la même espèce, d'où la nécessité d'étudier la cinétique de croissance des lignées élites individuellement une fois sélectionnées, et ne pas compter sur l'extrapolation des résultats obtenus avec une lignée sur les autres.

3. REPONSE DES CHEVELUS RACINAIRES À LA CULTURE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE BASE

L'optimisation des facteurs physiques et nutritionnels en cultures *in vitro* des tissus végétaux constitue une condition fondamentale pour l'amélioration de la productivité en métabolites secondaires (Dicosmo et Misawa, 1995). Dans le présent travail nous avons examiné trois milieux de base couramment utilisés en culture *in vitro*: B5, MS, et LS, et deux dilutions B5/2 et MS/2. Les résultats obtenus montrent que le milieu B5 complet serait favorable pour la croissance des chevelus racinaires de *D. stramonium* alors que pour l'accumulation des alcaloïdes tropaniques les milieux dilués B5/2 et MS/2 seraient les meilleurs. La même constatation a été faite par Parr et al. (1988) et Hilton et Rhodes (1990), qui indiquent que le milieu B5 dilué de moitié (B5/2) est plus favorable par rapport au milieu B5 entier pour la croissance des chevelus racinaires de *Catharanthus roseus* et de *D. stramonium*. Par contre, Nussbaumer et al. (1998), rapportent que le milieu B5/2 est favorable pour la croissance des chevelus racinaires de l'hybride *Datura candida* x *D. aurea* (Ps = 0,3 g) alors que le milieu B5 complet est celui qui convient pour la biosynthèse de l'hyoscyamine (0,36 % du Ps). Il est à noter que les milieux utilisés par ces auteurs contiennent 50 g/l de saccharose alors que ceux que nous avons utilisés ne contiennent que 30 et 15 g/l respectivement pour le milieu B5 complet et B5/2. Cependant, En termes de rendement, nos résultats sont en complète concordance avec ceux de Nussbaumer et al. (1998), qui ont observé le rendement maximal au niveau des chevelus cultivés sur le milieu B5 complet (19,6 mg/l). Maldonado-Mendoza et al. (1993), rapportent également que le milieu B5 est le plus favorable pour la production des alcaloïdes tropaniques par les chevelus racinaires de *D. stramonium*. Ceci n'est pas toujours vrai pour les autres espèces et métabolites secondaires. A titre d'exemple pour la production de la serpentine par les suspensions cellulaires de *catharanthus roseus*, le milieu MS est le plus recommandé (Dicosmo et Misawa, 1995).

Certains auteurs indiquent que les milieux dilués peuvent offrir des conditions de croissance et de biosynthèse de métabolites secondaires comparables ou supérieures aux milieux de base (Parr et al., 1988 ; Hilton et Rhodes, 1990, Giri et al., 2001). C'est pourquoi nous avons testé les milieux B5/2 et MS/2 afin de vérifier cette hypothèse. En

effets, nos résultats montrent que ces milieux dilués permettent l'obtention d'une teneur en hyoscyamine relativement plus élevée en comparaison avec les milieux B5 et MS. Cependant, ils sont moins favorables pour la croissance. Ceci serait dû à la faible dose de la source du carbone (1,5 % du saccharose). Il convient donc de vérifier cette hypothèse en essayant des doses en saccharose plus élevées. Si la supériorité ou même l'égalité entre les milieux de base et leurs délutions est confirmée, alors, ceci sera un avantage considérable pour la production des alcaloïdes tropaniques *in vitro* à l'échelle industrielle puisque cela permettrait une économie substantielle en nutriments minéraux et organiques.

4. ELICITATION PAR LE STRESS SALIN

Le stress salin induit au niveau des plantes supérieures l'accumulation de différentes substances azotées dérivant du groupe métabolique du glutamate tel que la glycine-bétaïne (Rontein *et al.*, 2002 ; Mahajan et Tuteja, 2005 ; Parida et Das, 2005). Nos essais consistent à examiner l'effet du stress salin sur l'accumulation des alcaloïdes tropaniques qui dérivent partiellement de la même voie métabolique que la glycine-bétaïne (Brachet et Cosson, 1986). D'après les résultats obtenus nous avons constaté qu'en effet, le stress salin modéré (1 à 2 g/l) améliore considérablement la teneur en hyoscyamine (plus de 250% par rapport au témoin) au niveau des chevelus racinaires de la lignée S1 de *D. stramonium*. Cependant, une dose plus élevée (3 g/l) induit un effet inverse sur la teneur en hyoscyamine. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Brachet et Cosson (1986), qui, en appliquant le stress salin sur les plantes de *D. innoxia*, ils ont remarqué que le taux d'hyoscyamine augmente au niveau des feuilles sommitales, mais cette augmentation reste limitée par rapport à l'augmentation de la proline qui survient généralement sous l'effet de la salinité. La biosynthèse de l'hyoscyamine au niveau des chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus* a été également stimulée par l'application du stress hydrique simulé par le mannitol avec un taux d'accumulation 6 fois plus que le témoin (Halperin et Flores, 1997).

Yan *et al.* (2005), signalent qu'une dose très élevée d'un éliciteur peut causer des effets inverses sur la biomasse. Effectivement, les chevelus racinaires cultivés en présence de NaCl voient leur croissance affaiblie. Des résultats similaires ont été obtenus par Halperin et Flores (1997), en appliquant le stress hydrique (0,4 M de mannitol) sur les chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus* (réduction de la biomasse de l'ordre de 90%). Il faut remarquer par ailleurs que l'application du stress salin sur les chevelus racinaires bien développés après 14 jours de culture n'aurait pas les mêmes effets sur les tissus racinaires qu'un stress appliqué au premier jour de culture où le matériel végétal est constitué de fragments racinaires de 3 à 4 cm de longueurs. À ce stade de développement, les tissus racinaires seraient certainement plus sensibles aux stress. Dans ce sens nous n'avons pas observé un effet significatif du sel ni sur le poids frais, ni sur le poids sec après 24 heures d'application sur des tissus âgés de 14 jours. L'augmentation de la teneur en hyoscyamine observée alors, serait due à une stimulation réelle de la biosynthèse de cet alcaloïde et non pas à une simple concentration du produit dans une biomasse réduite (Halperin et Flores, 1997).

5. ELICITATION PAR L'EXTRAIT DE LEVURE

La défense contre les bioagresseurs constitue l'un des principaux rôles des alcaloïdes (Richter, 1993 ; Aniszewski, 2007). La biosynthèse de ces derniers est induite lorsque la plante reçoit un signal provenant de l'agent pathogène. Plusieurs signaux sont utilisés pour simuler l'attaque d'agent pathogène *in vitro* et stimuler ainsi la biosynthèse des métabolites secondaires. Parmi lesquels nous citons les polysaccharides de la paroi (chitine ou glucanes), les extraits bruts de microorganismes (O'hagan, 2000 ; Yan *et al.*, 2005 ; 2006 ; Conceição *et al.*, 2006), les glycoprotéines et les protéines intracellulaires (Namdeo *et al.*, 2007). Dans le cadre de cet essai nous avons choisi l'extrait de levure parce qu'il est disponible, plus économique et facilement manipulables pour simuler une agression biotique sur les chevelus racinaires de *D. stramonium* cultivés *in vitro*.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de levure n'améliore pas la teneur en hyoscyamine dans les tissus racinaires, au contraire nous avons remarqué qu'une dose relativement élevée de cette substance (100 à 1000 mg/l) provoque une diminution drastique de la teneur en HS dans les chevelus racinaires. Un résultat aussi significatif n'a pas été signalé dans la bibliographie dans la mesure de nos connaissances. Ceci indiquerait que le contenu en HS des chevelus racinaires serait libéré dans le milieu de culture. L'analyse de ce dernier doit être effectuée dans les travaux ultérieurs. Dans ce sens, Pitta Alvarez *et al.*, (2003), signalent que l'élicitation des chevelus racinaires de *Brugmansia candida* par l'extrait d'un champignon (*Homonema sp.*) provoque la libération des alcaloïdes intracellulaires dans le milieu de culture.

Cependant, Lee *et al.*, 1998b rapportent un effet neutre de l'extrait de levure sur les chevelus racinaires de la Belladone. Zabetakis *et al.* (1999) indiquent que l'élicitation des chevelus racinaires de *D. stramonium* par l'extrait de levure améliore légèrement le taux d'alcaloïdes (40 % par rapport au témoin) après 4 jours d'incubation. Ces résultats contradictoires suggèrent que l'effet de cet éliciteur n'est pas clair, et que des travaux de recherche plus approfondis sont nécessaires pour élucider les mécanismes biochimiques et moléculaires qui interviennent dans les voies de signalisation et de régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Sudha et Ravishankar, 2002).

Chez les *Solanaceae* productrices d'alcaloïdes tropaniques tel que *D. stramonium* et *Hyoscyamus muticus*, les métabolites secondaires induits par l'élicitation sont dans la plus part des cas des sesquiterpènes (Signs et Flores, 1990; Furze *et al.*, 1991 ; Sevon et Oksman-Kaldentey, 2002) qui constituent les phytoalexines majeurs des solanaceae (Macias *et al.*, 2007). Néanmoins, d'autres auteurs rapportent des effets positifs des éliciteurs biotiques sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Sevon et Oksman-Kaldentey, 2002 ; Pitta Alvarez *et al.*, 2003) et autres classes d'alcaloïdes (Schumacher *et al.*, 1987).

6. EFFETS SIMULTANES DE L'ELICITATION PAR L'ACIDE JASMONIQUE ET LA PERMEABILISATION PAR LE TWEEN20

L'objectif de cet essai factoriel JA x T20 est d'étudier la possibilité de mettre en place une technique de production des alcaloïdes tropaniques *in vitro* qui permettrait de profiter simultanément du rôle de chaque produit. L'acide jasmonique pour stimuler la biosynthèse des alcaloïdes et le T20 pour permettre leur libération dans le milieu de culture. Cette

combinaison simultanée pourrait constituer un processus plus productif et plus efficace, surtout pour la production de ces métabolites en système de culture continu en bioreacteurs.

L'acide jasmonique (JA) et son dérivé volatil le méthylejasmonate sont des molécules de signalisation qui interviennent dans les réactions des plantes au stress biotiques et abiotiques. Les jasmonates exogènes lorsqu'ils sont appliqués aux tissus végétaux exercent une large gamme d'effets aussi bien inhibitrices que stimulatrices qui se manifestent sous forme de changements morphologiques et physiologiques (Sudha et Ravishankar, 2002 ; Gundlach *et al.*, 1992). Les jasmonates ont été utilisées comme éliciteurs, et ont montré leur capacité de stimuler la biosynthèse de certaines classes d'alcaloïdes (Kang *et al.*, 2004 ; Deng, 2005 ; Zayed et Wink, 2004) et autres métabolites secondaires (Palazon *et al.*, 2003 ; Conceicao *et al.*, 2006). Dans le présent essai, nos résultats n'ont pas pu mettre en évidence l'effet stimulant de l'acide jasmonique sur l'accumulation de HS. Une explication plausible qui pourrait justifier nos résultats, comme il a été déjà signalé ci-dessus, ces molécules de signalisation stimulent la biosynthèse des substances de défense contre les microorganismes connues sous le nom de phytoalexines (Signs et Flores, 1990 ; Furze *et al.*, 1991), et les phytoalexines des solanaceae sont des composés de type sesquiterpènes (Macias *et al.*, 2007). Les alcaloïdes tropaniques ne font pas partie de ce groupe de composés. L'effet de l'acide jasmonique peut se manifester sur d'autres substances intermédiaires dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques. Alors que, dans le présent essai, nous n'avons dosé que l'hyoscyamine et la scopolamine. Dans ce sens, Biondi *et al.* (2000) rapportent que les jasmonates augmentent le taux de la putrescine et de la méthyleputrescine au niveau des chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus*, mais sans effet comparable sur la production de l'hyoscyamine et de la scopolamine. De plus, pour arriver à une stimulation maximale de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques, la dose des substances de signalisation tel que l'acide jasmonique doit être optimisée au même temps que la période d'exposition des cultures tissulaires à ces substances (Kang *et al.*, 2004). En effet, Amdoun *et al.* (2010), en utilisant la modélisation mathématique ont pu déterminer avec précision la dose de JA (0,06 mM) et le temps d'exposition (24 hs) optimales pour une augmentation de 182% de la teneur en HS. De plus l'effet d'un éliciteur sur la stimulation de la biosynthèse de métabolites secondaires est variable selon le matériel végétal utilisé et les conditions expérimentales de l'essai. La concentration optimale du méthylejasmonate pour la biosynthèse de l'hyoscyamine (augmentation de 180% en comparaison avec le témoin) par les racines non transgéniques de *Scopolia parviflora* est de 0.01mM après 24 heures d'incubation (Kang *et al.*, 2004), alors que pour la culture racinaire de *D. stramonium* elle est de 0.1µM après 4 jours d'incubation (Zabetakis *et al.*, 1999). Le méthylejasmonate (4,45µM) améliore la biosynthèse de la shikonine dans les suspensions cellulaires d'*Onosma paniculatum* après 4 jours d'incubation (Yan *et al.*, 2005).

L'objectif principal de la perméabilisation des cultures cellulaires est de permettre la libération des métabolites secondaires dans le milieu de culture, ce qui facilitera les processus de production continue en bioréacteurs. De plus cette méthode pourrait constituer un moyen pour éviter les phénomènes d'inhibition des enzymes de biosynthèse par feed-back (Boitel-Conti *et al.*, 1995). Le T20 (polyoxyéthylsorbitane monolaurate) est un détergent communément employé pour la perméabilisation des cellules bactériennes. Il est également utilisé pour la perméabilisation des tissus végétales par certains auteurs, aussi bien en hydroponie (Gontier *et al.*, 2002) qu'*in vitro* (Boitel-Conti *et al.*, 1995 ; 1996 ; 2000). L'efficacité de cette méthode dépend aussi bien de la concentration que du temps d'application de l'agent de perméabilisation. Dans le présent essai le temps d'application du T20 a été fixé à 24 heures d'incubation des chevelus racinaires âgés de 14 jours. La teneur en hyoscyamine dans les racines témoins (non traité au T20) correspond à quatre

fois plus que celle des racines soumises à la perméabilisation. Si on admet que la différence est secrétée dans le milieu de culture (que nous n'avons pas pu doser les alcaloïdes qui s'y trouvent), alors la quantité d'hyoscyamine libérée dans le milieu de culture serait de l'ordre de 70% à 80%. Trois doses de T20 (0,5, 1,5, 3%) ont été essayées, Néanmoins, nous n'avons pas observé une différence significative entre les trois doses appliquées concernant la teneur en hyoscyamine résiduelle dans les tissus racinaires. Boitel-Conti et al. (1995), indiquent que le maximum d'alcaloïdes libérés dans le milieu de culture (presque 50% des alcaloïdes totaux) après perméabilisation des chevelus racinaires de *D. innoxia* par Le T20 a été obtenu avec la dose 5 % du T20 durant 30 heures d'incubation. Une proportion inférieure à celle que nous avons enregistrée dans le présent essai.

La prolongation de la viabilité et du pouvoir biosynthétique des tissus après traitement de perméabilisation est un facteur d'une importance fondamentale pour le développement de processus de production impliquant la libération continue des produits stockés dans les cellules (Lee et al., 1998b). Nos résultats montrent que les trois doses du T20 (0,5, 1,5, 3%) appliquées dans le cadre de nos conditions expérimentales provoquent un arrêt total de la croissance de la lignée S1 cultivée en présence du T20. De plus l'ajout des doses de T20 aux cultures âgées de 14 jours provoque la diminution du poids frais des racines, ceci serait dû à une perte irréversible de l'intégrité membranaires (Lee et al., 1998b) qui entraîne la libération du liquide cellulaires dans le milieu de culture. Boitel-Conti et al. (1995), rapportent que la dose de 5% est létale pour les chevelus racinaires de *D. innoxia* et les doses allant de 0.01 à 1% provoquent une diminution de la croissance sans causer la mort des tissus, elles sont par contre insuffisantes pour libérées les alcaloïdes vers le milieu extracellulaire. Le traitement des chevelus racinaires d'*Atropa belladonna* par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 50 mM) également réduit la biomasse jusqu'à 75% par rapport au contrôle après 14 jours de culture (Lee et al., 1998b).

CONCLUSION

L'objectif de ce travail été d'une part, l'étude de la variabilité génétique des lignées racinaires induites chez trois espèces de *Datura* et la possibilité de réaliser une sélection de lignées élités, et d'autre part de déterminer l'effet de certaines méthodes et processus d'optimisation de la culture *in vitro* des chevelus racinaires pour la production des alcaloïdes tropaniques.

Les chevelus racinaires obtenus par transformation génétique de *D. stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia* par la souche A4 d'*A. rhizogenes* présentent une variabilité génétique considérable, aussi bien pour la capacité de croissance que pour l'accumulation de l'hyoscyamine. Cette variabilité suggère la possibilité de réaliser une sélection avec un gain génétique potentiellement important pour le développement de lignées élités.

Les lignés racinaires issues de *D. stramonium* seraient plus intéressantes que celles issues de *D. tatula* ou *D. innoxia*. Elles présentent de plus grandes potentialités de croissance et d'accumulation d'hyoscyamine.

La cinétique de croissance de la lignée S1 de *D. stramonium* cultivée en milieu liquide suit une courbe de croissance sigmoïde avec trois phases caractéristiques. L'intervalle de temps compris entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jour de culture, qui correspond à l'entrée en phase stationnaire de croissance serait le plus propice pour l'application des processus d'optimisation tel que l'élicitation ou la perméabilisation, et aussi pour la récolte des chevelus racinaires. C'est la période durant laquelle la lignée arrive à son maximum de production de biomasse et d'hyoscyamine.

Le milieu de culture B5 entier serait le plus favorable pour la culture *in vitro* des chevelus racinaires de *D. stramonium*. C'est le milieu dans lequel la lignée S1 a montré son potentiel de production d'hyoscyamine le plus élevé. Cependant, cet avantage du milieu B5 par rapport au milieu dilué B5/2 est dû à ses effets positifs sur la croissance. En termes d'accumulation de l'hyoscyamine, le milieu B5/2 a montré sa supériorité, bien que la concentration en saccharose ne dépasse pas 1,5 %. Certains auteurs rapportent que la source de carbone et sa concentration jouent un rôle important sur la croissance des tissus cultivés *in vitro* et la teneur en métabolites secondaires. Il serait alors plus judicieux de réessayer le milieu dilué (B5/2) en jouant sur la dose du saccharose et même en essayant une dilution supérieure (1/4 par exemple) de la composition minérale.

Le stress salin induit par une dose modérée de NaCl (1 à 2 g/l) constituerait un éliciteur très efficace pour l'amélioration de la production de l'hyoscyamine par la culture *in vitro* de chevelus racinaires de *D. stramonium*. Cependant, une attention particulière doit être accordée à la concentration du sel. Il semble qu'une concentration excessive (≥ 3 g/l) pourrait avoir un effet inverse aussi bien sur la croissance que sur l'accumulation de l'hyoscyamine.

Les résultats obtenus dans le présent travail n'ont pas pu mettre en évidence l'effet positif de l'élicitation par l'extrait de levure et par l'acide jasmonique sur l'amélioration de la teneur en alcaloïdes dans les tissus racinaires de *D. stramonium*. Au contraire, une dose relativement élevée de l'extrait de levure provoque une diminution significative du taux d'hyoscyamine. Certaines études montrent que les alcaloïdes interviennent plus dans les relations des plantes qui les produisent avec les animaux herbivores tels que les insectes et les mammifères. Il serait donc recommandable de tester des éliciteurs qui simulent au

niveau des cellules végétales les attaques dues à ce genre de bioagresseurs, tel que la pectinase ou les blessures mécaniques.

Le T20 est un agent de perméabilisation très puissant, il permet de libérer la quasi-totalité des alcaloïdes intracellulaires dans le milieu de culture. Cependant, son inconvénient majeur est la destruction du matériel végétale en culture. Il serait donc intéressant de l'utiliser dans les modes de culture en discontinu, où la récupération du matériel végétale n'est pas recherchée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AIRD E.L.H., HAMILL J.D., 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: 47-57.
- AMDOUN R., KHELIFI L., KHELIFI-SLAOUI M., AMROUNE S., BENYOUSSEF E.H. DAO VU THI, ASSAF-DUCROCQ C., GONTIER E.**, 2009, Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant science*, 177: 81-87.
- AMDOUN R., KHELIFI L., KHELIFI-SLAOUI M., AMROUNE S., ASCH M., ASSAF-DUCROCQ C., GONTIER E.**, 2010, Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited *Datura stramonium* L. hairy roots using the response surface methodology (RSM). *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 4726-4740.
- ANISZEWSKI T.**, 2007, alkaloids - secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- BAIZA A.M., QUIROZ A., RUIZ J.A., MALDONADO-MENDOZAI., LOYOLA-VARGAS V.M.**, 1998, Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 123-130.
- BAIZA A.M., QUIROZ-MORENO A., RUIZ J.A., LOYOLA-VARGAS V. M.** 1999, Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 9-17.
- BANDYOPADHYAY M., JHA S. TEPFER D.**, 2007, Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Reports*, 26:599-609.
- BARICEVIC D., UMEK A., KREFT S., MATICIC B., ZUPANCIC A.**, 1999, Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environmental and Experimental Botany*, 42: 17-24.
- BENHIZIA Z.**, 1989, Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium* L. Th. Mag., INA, Alger. 68 p.
- BERKOV S., DONCHEVA T., PHILIPPOV S., ALEXANDROV K.**, 2005, Ontogenetic variation of the tropane alkaloids in *Datura stramonium*. *Biochemical Systematic and Ecology*. 33: 1017-1029.
- BERKOV S., PAVLOV A., KOVACHEVA P., STANIMIROVA P., PHILIPPOV S.**, 2003. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58: 42-46.

- BERKOV S., ZAYED R. et DONCHEVA T.**, 2006, Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 77: 169-182.
- Biondi S., Fornale S., Oksman-Caldentey K.M., Eeva M., Agostani S., Bagni N.**, 2000, Jasmonates induce over-accumulation of methylputrescine and conjugated polyamines in *Hyoscyamus muticus* L. root cultures. *Plant Cell Reports*, 19: 691-697.
- BOITEL-CONTI M., GONTIER E., LABERCHE J.C., DUCROCQ C., SANGWAN-NORREEL B.S.**, 1995, Permeabilization of *Datura innoxia* hairy roots for release of stored tropane alkaloids. *Planta Medica*, 61: 287-290.
- BOITEL-CONTI M., GONTIER E., LABERCHE J.C., DUCROCQ C., 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: 241-244.
- BOITEL-CONTI M., LABERCHE J.C., LANOUE A., DUCROCQ C., SANGWAN-NORREEL B.S.**, 2000, Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 131–137.
- BRACHETJ., COSSONL.**, 1986, Changes in the Total Alkaloid Content of *Datura innoxia* Mill. subjected to Salt Stress. *Journal of Experimental Botany*, 37 (5): 650-656.
- BRUCE N. C.**, 1996, Alkaloids. in: De Hans-Jürgen R., Biotechnology. ed. Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 327-337.
- BRUNETON J.**, 1995, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants. ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 915 p.
- BRUNETON J.**, 2005, Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. éd. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris, 618 p.
- CASANOVA E., TRILLAS M.I., MOYSSET L., VAINSTEIN A.**, 2005, Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnology Advances*, 23: 3 –39.
- CASSE-DELBARTF.**, 1990, Utilisation d'*Agrobacterium* pour l'obtention de plantes transgéniques. Cinquantenaire des cultures *in vitro*. Les colloques de l'INRA n°51, Versailles, Ed. clair doré, Paris : 219-230.
- CECCHINI T.**, 1976, Encyclopédie des plantes médicinales. éd. De Vecchi. 327 p.
- CHENIEUX J.C.**, 1990, apport des cultures *in vitro* dans la régulation du métabolisme secondaire végétal. Cinquantenaire des cultures *in vitro*, les colloques de l'INRA n° 51. Versailles. Ed. clair doré : 111-123.
- CONCEICAO L.F.R., FERRERES F., TAVARES R.M., DIAS A.C.P.**, 2006, Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67: 149–155.
- COSSON L.**, 1969, Influence de l'éclaircissement sur les variations ontogéniques des teneurs en scopolamine et en hyoscyamine des feuilles de *Datura metel*, *Phytochemistry*, 8 : 2227-2233.
- DABUR R., SINGH H., CHHILLAR A. K., ALI M. et SHARMA G. L.**, 2004, Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia*, 75: 389-391.

- DECHAUX C., BOITEL-CONTI M.**, 2005, A strategy for overaccumulation of scopolamine in *Datura innoxia* hairy root cultures. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(1): 101–107.
- DENG F.**, 2005, Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82: 16–26.
- Dethier M., Demeyer K., et Cordier Y.**, 1993, Cultivation of *Datura* species for scopolamine and hyoscyamine production in Burundi. *Acta Horticulturae*, 331: 39-48
- DEWICK P. M.**, 1997, Medicinal natural products. ed. John Wiley and Sons, Chichester, England, 466 p.
- DICOSMO F. et MISAWA M.**, 1995, Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13 (3): 425-45.
- DUCROCQ D., SANGWAN R. S. et SANGWAN-NORREEL B. S.**, 1994, Transformation et régénération de plantes transgéniques à partir de divers explants de *Datura innoxia*. *Revue de Cytologie et Biologie Végétale – Botanique*, 17: 53-59.
- EDWARDS R. et GATEHOUSE J. A.**, 1999, Secondary metabolism. *in*: Lea P. J. et Leegood R. C., Plant biotechnology and molecular biology. Ed. John Wiley and Sons, Chichester, England. pp. 193-218.
- EFTEKHAR F., YOUSEFZADI M. et TAFAKORI V.**, 2005, Antimicrobial activity of *Datura innoxia* and *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 76: 118-120.
- EVANS W. C., GHANI A., WOOLLEY V.A.**, 1972, Distribution of littorine and other alkaloids in the roots of *Datura* species. *Phytochemistry*, 11: 2527-2529.
- FACCHINI P.J.**, 2001, Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 29-66.
- FAOUZI TAH KOTB H .**, 1981, Les plantes médicinales, leur culture et leur composition. éd. Dar Elmarrikh. Riyadh. 356 p.
- FLORES H. E. et MEDINA-BOLIVAR F.**, 1995, Root culture and plant natural products: « unearthing » the hidden half of plant metabolism. *Plant tissue culture and biotechnology*, 1 (2): 59-74.
- FURZE, M.J., RHODES, M.J., PARR, A.J., ROBINS, R.J.; WHITEHEAD, I.A., THREFALL, D.R.**, 1991, Abiotic factors elicit sesquiterpenes production but not alkaloid production in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Reports*, 10: 111–114.
- GAMBORG O.L.**, 1970, Effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension cultures. *Plant Physiology*, 45: 372–375
- GELVIN S.B.**, 1990, Crown gall disease and hairy root disease. *Plant Physiology*, 92: 281-285.
- GEORGES K., JAYAPRAKASAM B., DALAVOY S. S. et NAIR M. G.**, 2008, Pest-managing activities of plant extracts and antraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, 99: 2037-2045.

- GEORGIEV M.I., PAVLOV A.I., BLEY T.**, 2007, Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74:1175–1185.
- GERLACH G. H.**, 1948, *Datura innoxia*, a potential commercial source of scopolamine. *Economic Botany*, 2 (4): 439-454.
- GIOVANNINI A., PECCHIONI N., RABAGLIO M., ALLAVENA A.**, 1997, Characterization of ornamental datura plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33: 101-106.
- GIRI A. et NARASU M.L.**, 2000, Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*, 18: 1-22.
- GIRI A., RAVINDRA S.T., GHINGRA V., NARASU M.L.**, 2001, Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current science*. 81 (4): 378-382.
- GLIMN-LACY J. et KAUFMAN P. B.**, 2006, Botany illustrated: Introduction to plants, Major groups, Flowering plant families. Springer, New York, USA. 146 p.
- GNANAMANI A., PRIYA K. S., RADHAKRISHNAN N. et BABU M.**, 2003, Antibacterial activity of two plant extract on eight burn pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 59-61.
- GONTIER E., CLÉMENT A., TRAN T.L.M., GRAVOT A., LIÈVRE K., GUCKERT A., BOURGAUD F.**, 2002, Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Science*, 163: 723-732.
- GONTIER E., SANGWAN B.S., BARBOTIN J. N.**, 1994, Effects of calcium, alginate, and calcium-alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of a stable suspension cell line of *Datura innoxia* Mill. *Plant Cell Reports*, 13:533-536.
- GUARRERA P. M.**, 1999, traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 183-192.
- GUILLON S., TRÉMOUILLAUX-GUILLER J., PATI . K., RIDEAU M., GANTET P.**, 2006a, Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:341–346.
- GUILLON S., TRÉMOUILLAUX-GUILLER J., PATI K., RIDEAU M., GANTET P.**, 2006b, Harnessing the potential of hairy roots: Dawn of a new era. *Trends in Biotechnology*, 24 (9): 403-409.
- GUNDLACH H., MULLER M.J., KUTCHAN T. M., ZENK M.H.**, 1992, Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceeding of the NationalAcademy of Science of the USA*, 89: 2389-2393.
- HAKKINEN S. T., MOYANO E., CUSIDO R.M., PALAZON J., PINOL M.T., OKSMAN-CALDENTY K.M.**, 2005, Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6b-hydroxylase. *Journal of Experimental Botany*, 56 (420): 2611–2618.
- HALPERIN S.J. et FLORES H.E.**, 1997, Hyoscyamine and proline accumulation in water-stressed *Hyoscyamus muticus* 'hairy root' cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33:240-244.

- HAMILL J. D., ROBINS R. D., PARR A. J., EVANS D. M. ET FURZE J. M.**, 1991, Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant molecular biology*, 15: 27-38.
- HANISCH TEN CATE C. H., RAMULU K. S., DIJKHUIS P. DE GROOT B.**, 1987, Genetic stability of cultured hairy roots induced by agrobacterium rhizogenes on tuber discs of potato cv. Bintje. *Plant Science*, 49 217-222.
- HARTMANN T.** 2007, From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831–2846.
- HASHIMOTO T., DAE-JIN Y. et YAMADA Y.**, 1993, Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*, 32, 3: 713-718.
- HASHIMOTO T., KOHNO J., YAMADA Y.**, 1987, Epoxidation *in vivo* of hyoscyamine to scopolamine does not involve a dehydration step. *Plant Physiology*, 84: 144-147.
- HILTON M.G. RHODES M.J.C.**, 1990, Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: 132-138.
- HOPKINS W. G.**, 2003, Physiologie végétale. éd. De Boeck, Bruxelles, 514 p.
- HOUMANI Z., COSSON L., CORBINEAU F., COME D.**, 1994, Etude de la teneur en hyoscyamine et scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. *Acta botanica Gallica*, 141 (1) : 61-66.
- 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, Doc., INA, Alger. 124p.
- HOUMANI Z., COSSON L., HOUMANI M.**, 1999, *Datura ferox* L. and *Datura quercifolia* Kunth (*Solanaceae*) in Algeria. *Flora Mediterranea*, 9: 57-60.
- IRANBAKHSH A., OSHAGHI M.A., MAJD A.**, 2006, Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium* L. (*solanaceae*). Structure and ultrastructure of biosynthesizing cells. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48 (1): 13–18.
- KAGALE S., MARIMUTHU T., THAYUMANAVAN B., NANDAKUMAR R. et SAMIYAPPAN R.**, 2004, Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 91-100.
- KAMADA H., OKAMURA N., SATAKE M., HARADA H., SHIMOMURA K.**, 1986, Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports*, 5: 239-242.
- KANGA S.M., JUNG H.Y., KANGA Y.M., YUN D.J., BAHKB J.D., YANG J.K., M.S. CHOI.**, 2004, Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*, 166: 745–751.
- KIM Y., WYSLOUZIL B E., WEATHERS P.J.**, 2002, Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cellular and Developmental biology-Plant*, 38: 1-10.

- KOVALENKO P.G. et MALIUTA S.S.**, 2003, An effect of transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukrainica bioorganica acta* 1 (1): 50-60.
- KUTCHAN T. M.**, 1995, Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The plant cell*, 7: 1059-1070.
- KUTCHAN T.M., AYABE S., KRUEGER R.J., COSCIA E.M., COSCIA C.J.**, 1983, Cytodifferentiation and Alkaloid Accumulation in Cultured Cells of *Papaver bracteatum*. *Plant Cell Reports*, 2:281-284.
- LADRAA N.**, 2007, Induction des chevelus racinaires par *Agrobactérium rhizogenes* chez *Datura* spp. Mem. Ing. Agr., Institut National Agronomique, Alger.
- LAMBERT C., THOMAS G., LEGER D., PAMBOUKDJIAN N. Et TEPFER D.**, 1988, Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbres fruitiers. 8^{ième} colloque sur les recherches fruitières-Bordeaux Ed. INRA-CTIFL : 73-84.
- LEE K.T., YAMAKAWA T., KODAMA T., IGARASHI Y., SHIMOMURA K.**, 1998a, Effects of aeration on tropane alkaloid production by transformed root of *Atropa belladonna* in flask cultures. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (6): 614-616.
- LEE K.T., YAMAKAWA T., KODAMA T., SHIMOMURA K.**, 1998b, effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of Belladonna. *Phytochemistry*, 49 (8): 2343-2347.
- LEE O.S.; KANG Y.M.; JUNG H.Y.; MIN J.Y.; KANG S.M., CARICAR C.S., PRASAD D.T., BAHK J.D., CHOI M.S.**, 2005, Enhanced production of tropane alkaloids in *scopolia parviflora* by introducing the PMT (putricine n-methyltransferase) gene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 41 (2): 167-172.
- LIANG Y., AOYAMA T. et OKA A.**, 1998, Structural characterization of the *virB* operon hairy-root-inducing plasmid A4. *DNA Research*, 5: 85-93.
- LIN, S., RAYSON, G.D.**, 1998. Impact of surface modification on binding affinity distributions of *Datura innoxia* biomass to metal ions. *Environmental Sciences and Technology*, 32: 1488–1493.
- LINSMAIER, E.M. et SKOOG, F.**, 1965 Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127.
- LLOYD G., MCCOWN B.**, 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceeding*, 30: 421–427.
- MACIAS F.A., GALINDO J.L.G., GALINDO J.C.G.**, 2007, Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, 68: 2917–2936.
- MAHAJAN S. et TUTEJA N.**, 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139–158.
- MALDONADO-MENDOZA I.E., AYORA-TALAVERA T., LOYOLA-VARGAS V.M.**, 1993, Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*: Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 321-329.

- MANO Y., OHKAWA H., YAMADA Y.**, 1989, Production of tropane alkaloid by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science*, 59: 191–201.
- MEDINA-BOLIVAR F. ET FLORES H.E.** 1995, Selection for hyoscyamine and cinnamoyl putrescine overproduction in cell and root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Physiology*, 108: 1553-1560.
- MIRALDI E., MASTIB A., FERRIA S., COMPARINIB I.B.**, 2001, Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72: 644-648.
- MISAWA M.**, 1994, Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. FAO agricultural services bulletin no. 108, FAO, Rome, Italy
- MOYANO E., JOUHIKAINEN K., TAMMELA P., PALAZON J., CUSIDO R. M., PINOL M.T., TEERI T.H., OKSMAN-CALDENTY K.M.**, 2003, Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany*, 54 (381): 203-211.
- MOYANO E., FORNALE S., PALAZON J., CUSIDO R.M., BONFILL M., MORALES C., PIÑOL M.T.**, 1999, Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, 52: 1287-1292.
- MULABAGAL V., TSAY H.S.**, 2004, Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2: 29-48.
- MURASHIGE T. et SKOOG F.**, 1962., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NAMDEO A.G.**, 2007, Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1): 69-79.
- NELSON L. S. SHIH R. D. et BALICK M. J.**, 2007, Handbook of poisonous and injurious plants. Springer, New York, USA. 340 p.
- NISHIYAMA Y. ET YAMAKAWA T.**, 2004, Effect of medium composition on the production of anthocyanins by hairy root cultures of *Ipomoea batatas*. *Plant Biotechnology*, 21(5): 411–414.
- NUSSBAUMER P., KAPÉTANIDIS I., CHRISTEN P.**, 1998, Hairy roots of *Datura candida* x *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 17: 405–409.
- O'HAGAN D.**, 2000, Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. *Natural Product Reports*, 17: 435–446.
- O'HAGAN D., ROBINS R.J., WILSON M., WONG C.W., BERRY M., ZABETAKISI.**, 1999, Fluorinated tropane alkaloids generated by directed biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans*, 1: 2117–2120.
- OKSMAN-CALDENTY K.M., SEVON N., VANHALA L., HILTUNEN R.**, 1994, Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38: 263-272.
- OZENDA P.**, 1977, Flore du Sahara. éd. CNRS, Paris, 622 p.

- PALAZÓN J., CUSIDÓ R.M., BONFILL M., MALLOL A., MOYANO E., MORALES C., PIÑOL M.T.**, 2003, Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 1019–1025.
- PARIDAA A.K., DAS A.B.**, 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324–349.
- PARR A.J., PEERLESS A.C.J., HAMILL J.D., WALTON N.J., ROBINS R.J., RHODES M.J.C.**, 1988, Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 7: 309-312.
- PASCUAL-VILLALOBOS M. J. ROBLEDO A.**, Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, 8: 183-194.
- PINOL M.T., PALAZON J., CUSIDO R.M., RIBO M.**, 1999, Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Science*, 141: 41–49.
- PITTA ALVAREZ S., MARCONI P. L., GIULIETTI A.**, 2003, Comparison of the influence of different elicitors on hyoscyamine and scopolamine content in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39:640–644.
- PITTA-ALVAREZ S.I. et GIULIETTI A.M.**, 1997, Effects of gibberellin GA7 on kinetics of growth and tropane alkaloid accumulation in hairy roots of *Brugmansia candida*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 33:147-153.
- QUEZEL P. Et SANTA S.**, 1963, Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales, Tome II. éd. CNRS, Paris. 1170 p.
- RADMAN R., SAEZ T., BUCKE C., KESHAVARZ T.**, 2003, Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37: 91-102.
- RAJESH et SHARMA G. L.**, 2002, Studies on antimycotic properties of *Datura metel*. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 193-197.
- RAMACHANDRA RAO S. ET RAVISHANKAR G.A.**, 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- RHODES M. J. C., PARR A. J., GIULIETTI A., AIRD E. L. H.**, 1994, Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 143-151.
- RICHTER G.**, 1993, Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. éd. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 526 p.
- ROBINS R. J., BACHMANN P., PEERLESS A.C. J., RABOT S.**, 1994, Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38: 241-247.
- ROBINS R.J., PARR A.J., PAYNE J., WALTON N.J., RHODES M.J.C.**, 1990, Factors regulating tropane-alkaloid production in a transformed root culture of a *Datura candida* x *D. aurea* hybrid. *Planta*, 181:414-422.
- RONTEIN D., BASSET G., HANSON A.D.**, 2002, Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering*, 4: 49–56.

- RUNS HIM K. W., SCHEFFER R. J., STROBEL G. A.**, 1988, Factors influencing root formation in dicots by *Agrobacterium rhizogenes*. *Canadian Journal of Botany*, 66(4): 642-644.
- SCHUMACHER H.M., GUNDLACH H., FIEDLER F., ZENK M.H.**, 1987, Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 6: 410-413.
- SEVON N., OKSMAN-CALDENTY K.M.**, 2002, *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: Root cultures as source of alkaloids. *Planta Medica*, 68: 859-868.
- SHANKS J.V. ET MORGAN J.**, 1999, Plant 'hairy root' culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 151-155.
- SHIMOMURA K., SAUERWEIN M., ISHIMARU K.**, 1991, Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochemistry*, 30 (7): 2275-2278.
- SIGNS M.W., FLORES H.E.**, 1990, The biosynthetic potential of plant root. *BioEssay*, 12:7-13.
- SIKULI N.N. ET DEMEYER K.**, 1997, Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by "hairy roots" of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 261-267.
- SMITH T.C., WEATHERS P.J., CHEETHAM R.D.**, 1997, Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 33:75-79.
- SOURET F.F., KIM Y., WYSLOUZIL B.E., WOBBE K.K., WEATHERS P.J.**, 2003, Scal-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering*, 83 (6): 653-669.
- SRIVASTAVA S. et SRIVASTAVA A.K.**, 2007, Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 29-43.
- SUDHA G. et RAVISHANKAR G.A.**, 2002, Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 181-212.
- TAIZ L. et ZEIGER E.**, 2002, Plant physiology. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 623p.
- TEPFER D.**, 1982, La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. Deuxième colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux. Ed. INRA- CTIFL: 46-53.
- 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. éd. La Typo Litho et Jules Carbonel. Alger. 353 p.
- UZUN E., SARIYAR G., ADSERSEN A., KARAKOC B., OTUK G., OCTAYOGLU E., et PIRILDAR S.**, 2004, Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 287-296.

- VAILLANT N., MONNET F., HITMI A., SALLANON H., COUDRET A.**, 2005, Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere*, 59: 1005–1013.
- VAN ALTVORST A.C., BINO R.J., VAN DIJK A.J., LAMERS A.M.J., LINDHOUT W.H., VAN DER MARK F., DONS J.J.M.**, 1992, Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes* rol genes on tomato plant and flower development. *Plant Science*, 83: 77-85.
- VAN DER PLANK J. E. et O'CONNOR F. C.**, 1952, *Datura ferox* : A test plant for potato virus Y. *The American Potato Journal*, 29: 125-126.
- VÁZQUEZ-FLOTA F., CARRILLO-PECH M., MINERO-GARCÍA Y., MIRANDA-HAM M.L.**, 2004, Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 623–628.
- VEENA V. ET TAYLOR C.G.**, 2007, *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43:383–403.
- VERPOORTE R. et MEMELINK J.**, 2002, Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:181–187.
- VERPOORTE R., CONTIN A., MEMELINK J.**, 2002, Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13–25.
- VITALE A. A., ACHER A. POMILIO A. B.**, 1995, Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 49: 81-89.
- WALTON N.J., ROBINS R.J., PEERLESS A.C.J.**, 1990, Enzymes of N-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*. *Planta*, 182: 136-141.
- WIART C.**, 2006, Ethnopharmacology of medicinal plants, Asia and the Pacific. Humana Press, New Jersey, USA, 228 p.
- WILLIAMS G.R.C., DORAN P.M.**, 1999, Hydrodynamic boundary layers and oxygen requirements in hairy root cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 64 (6): 729-740.
- WINK M.**, 1990, Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood B.V., Rhodes M.J.C., Secondary products from plant tissue culture. Clarendon Press, Oxford: 23-41.
- WINK M.**, 1999, Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology. *in*: Wink M., Biochemistry of plant secondary metabolism, Annual plant reviews, 2: 1-16. ed. Sheffield Academic Press and CRC Press, England.
- YAN Q., HUA Z., TAN R. X., WU J.**, 2005, Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with *in situ* adsorption, elicitation and semi-continuous operation. *Journal of Biotechnology* 119: 416-424.
- YAN Q., SHI M., NG J., WU J.Y.**, 2006, Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170: 853–858.

- YEOMAN M.M., YEOMAN C.L.**, 1996, manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 134: 553 – 569.
- YU S., KWOK K.H., DORAN P.M.**, 1996, Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 238-243.
- YUKIMUNE Y., HARA Y. et YAMADA Y.**, 1994, tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 558: 1443-1446.
- ZABETAKIS I., EDWARDS R., O'HAGANA D.**, 1999, Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50: 53-56.
- ZAROURI B.**, 2006, Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* sur explants de *Datura stramonium* L. en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes. Mem. Ing. Agr., Institut National Agronomique, Alger.
- ZAYED R. et DONCHEVA T.**, 2006, Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 77 (3): 179-182.
- ZAYED R. WINK M.**, 2004, Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (solanaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 863-867.
- ZHANG L., DING R., CHAI Y., BONFILL M., MOYANO E., OKSMAN-CALDENTY K.M., XU T., PI Y., WANG Z., ZHANG H., KAI G., LIAO Z., SUN X., TANG K.**, 2004, Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 101 (17): 6786–6791.
- ZHAO J., DAVIS L.C., VERPOORTE R.**, 2005, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283–333.
- ZHI-BI H. et MIN D.**, 2006, Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology*, 48 (2): 121-127.
- ZRYD J.P.**, 1988, Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Presses polytechniques Romandes. 1^{ière} édition. 308p.