

***Induction de chevelus racinaires par
Agrobacterium rhizogenes chez Datura
sp :***
Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes.

Présenté par :

Mr. HARFI Boualem

Directrice de thèse Mme. KHELIFI M. M.C. INA

Soutenu le : 12/03/2009

Jury Président Mr. BELLAL M.M Pr. INA Examineurs Mlle. KRIMI Z. Pr. USD Mr. KHELIFI L. M.C
INA Mme. ABROUS O. M.C. USTHB

Table des matières

Remerciements . .	6
Dédicace . .	7
Résumé . .	8
Abstract . .	9
صّخّلم . .	10
Introduction . .	11
Synthèse bibliographique . .	13
Le <i>Datura</i> . .	13
Généralités sur les <i>Datura</i> . .	13
2. Intérêts des <i>Datura</i> . .	17
3. Toxicité des <i>Datura</i> . .	18
II. La maladie du chevelu racinaire . .	18
1. <i>Agrobacterium</i> . .	18
2. Plasmide Ri . .	18
3. Base physiologique de la maladie du chevelu racinaire . .	20
4. Relation <i>Agrobacterium</i> -cellule végétale . .	20
5. Intérêts de la culture des chevelus racinaires . .	23
III. Les alcaloïdes . .	23
1. Définition . .	24
2. Classification . .	24
3. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine . .	24
4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques . .	26
5. Extraction des alcaloïdes et préparation de l'échantillon . .	27
6. Dosage et identification des alcaloïdes . .	27
IV. Système de culture en continu . .	29
1. Perméabilisation . .	30
2. Contraintes de la culture en bioréacteur . .	30
3. Bioréacteurs . .	30
Matériels et méthodes . .	36
I Objectif du travail . .	36
II Obtention des vitrosemis . .	36
1. Origine des graines de <i>Datura</i> . .	37
2. Scarification . .	37
3. Désinfection des graines . .	37
4. Mise en culture . .	37
III Obtention des chevelus racinaires . .	38
1. Origine de l'agrobactérie . .	38
2. Préparation des suspensions bactériennes . .	39
3. Inoculation et co-culture plante-bactérie . .	39
IV Isolement des racines transformées et multiplication des chevelus racinaires . .	40

V Sélection des lignées racinaires . . .	40
VI Optimisation de la composition de la fraction minérale du milieu de culture . . .	41
VII Essai d'optimisation de l'élicitation de la biomasse et du contenu alcaloïdique . . .	42
VIII Essai d'optimisation de la perméabilisation des chevelus racinaires . . .	43
IX Essai de production d'alcaloïdes en système de culture continu . . .	43
X Extraction des alcaloïdes tropaniques . . .	44
1 Intracellulaire . . .	44
2 Extracellulaire . . .	45
XI Dosage et identification des alcaloïdes . . .	45
XII Analyse statistique . . .	45
Résultats et interprétations . . .	47
I Germination des graines de <i>Datura</i> . . .	47
II Obtention des chevelus racinaires . . .	48
1.Taux de réactivité . . .	48
2.Taux d'induction racinaire . . .	48
3.Temps moyens d'apparition de la première racine . . .	49
4.Nombre moyen de racines par explant . . .	49
III Sélection des lignées racinaires performantes . . .	50
IV Effet de la composition du milieu de culture sur la biomasse et le contenant alcaloïdique . . .	51
1.Milieu MS . . .	51
2.Milieu B5 . . .	51
3.Effet de la concentration en azote . . .	59
4.Effet de la concentration en calcium . . .	63
5.Bilan . . .	67
V Effet des éliciteurs sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes . . .	68
VI Effet des agents de perméabilisation des chevelus racinaires . . .	74
VII Essai de production des alcaloïdes en continu . . .	78
Discussion . . .	81
I Obtention des vitro-semis . . .	81
II Obtention des chevelus racinaires . . .	81
III Culture sur milieu liquide . . .	82
1. Effet des milieux MS et B5 . . .	82
2.Effet des concentrations en Azote . . .	82
3.Effet des concentrations en Calcium . . .	83
IV Elicitation de la biomasse et du contenu alcaloïdique . . .	84
V Perméabilisation des chevelus racinaires . . .	85
Conclusion . . .	86
Références bibliographiques . . .	88
Annexes . . .	97
Annexe 1 . . .	97
Annexe 2 . . .	98

Annexe 3 . .	101
Annexe 4 . .	104
Annexe 5 . .	107

Remerciements

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

Je tiens à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Mme. KHELIFI-SLAOUI M. MC. INA, ma directrice de thèse, qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.

Je remercie également Mr. BELLAL M.M. Pr. INA, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr. KHELIFI L. MC. INA, de m'avoir suivi tout le long de la partie expérimentale, d'avoir corrigé une partie de ce mémoire et accepté de faire partie du jury de ma soutenance, et aussi pour tous ses conseils et sa disponibilité.

Un grand remerciement à Mlle. KRIMI Z. MC. USD, d'avoir accepté d'examiner notre travail et de nous avoir fourni les souches d'*Agrobacterium rhizogenes*, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Un chaleureux remerciement à Mme. ABROUS O. MC. USTHB, de m'avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Mes remerciements les plus profonds aussi :

A M. Amdoun Ryad Doctorant et Mme ZaouiDjamila Ingénieur au laboratoire des ressources phylogénétiques et Biotechnologies, Samia ingénieur au laboratoire d'analyses du sol (phytotechnie) et Mohamed ingénieur au laboratoire des méthodes d'analyse instrumentales (département technologie alimentaire), de nous avoir aidé à la mise en marche de la CPG.

A tous mes amis (es) pour leur soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à Mes très chers parents, auxquels je dois tout mon respect et que je ne remercierais jamais assez pour leurs sacrifices ; Mes sœurs, mes frères et à toute ma famille ; Tous mes amis Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail. Boualem

Résumé

Les alcaloïdes tropaniques présentent une grande valeur économique en particulier pour l'industrie pharmaceutique. La culture de chevelus racinaires obtenus par inoculation d'explant de *Datura sp* avec *Agrobacterium rhizogenes* offre des perspectives prometteuses pour leur production *in-vitro*. L'objectif de ce travail est d'essayer d'optimiser cette production.

Sur l'ensemble des lignées racinaires obtenues, les lignées retenues sont DT10, DS18, DI3 et DF11 issues respectivement de la transformation génétique des espèces *Datura tatula*, *D. stramonium*, *D. innoxia* et *D. ferox*. La lignée la plus performante est DT10.

Les résultats obtenus montrent que les milieux entiers (MS et B5) donnent les meilleures biomasses, les milieux dilués ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ B5, $\frac{3}{4}$ B5) sont plus intéressants pour la production des alcaloïdes. Les concentrations 75 mM d'azote et 10 mM de calcium ont donné les poids secs les plus importants. L'essai de l'élicitation de la biomasse révèle que la concentration 10^{-8} M des acides salicylique (AS), acétylsalicylique (AAS) et jasmonique (AJ) donne les meilleurs poids secs. Quant à l'élicitation de la production de hyoscyamine, c'est la concentration 10^{-4} M de l'AJ et 10^{-6} M des AS et AAS qui donne les teneurs les plus élevées. A fin de perméabiliser les chevelus racinaires, un tensioactif (tween20) et du peroxyde d'hydrogène sont utilisés, 1% de tween20 libre dans la solution nutritive plus de 33 mg/l d'hyoscyamine. En utilisant cette dose dans un système de culture semi-continu, la teneur en hyoscyamine obtenue pour la première semaine est de 33,9 mg/l elle chute au-delà de manière significative pour la suite de la culture.

Mots clés : *Datura sp*, *Agrobacterium rhizogenes*, chevelu racinaire, CPG, alcaloïdes tropaniques, optimisation, élicitation, perméabilisation.

Abstract

The tropane alkaloids present a great economic value in particular for pharmaceutical industry. The culture of hairy root obtained by inoculation of *Datura sp* with *Agrobacterium rhizogenes* offers promising prospects for their *in-vitro* production. The objective of this work is to try optimizing this production.

On the whole of obtained lines, the lines selected are DT10, DS18, DI3 and DF11 resulting respectively from the genetic transformation of *Datura tatula*, *D. stramonium*, *D. innoxia* and *D. ferox*. The most effective line is DT10.

Results obtained show that the whole mediums (MS and B5) give the best biomass, the diluted mediums ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ B5, $\frac{3}{4}$ B5) are more interesting for the production of alkaloids. The concentrations 75 mM of nitrogen and 10 mM of calcium gave the most significant dry weights. The tests of elicitation of the biomass reveals that concentration 10^{-8} M of the salicylic acid (SA), acetylsalicylic acid (ASA) and jasmonic acid (JA) give the best dry weights, as for the elicitation of the production of hyoscyamine, it is the concentration 10^{-4} M of the JA and 10^{-6} M of the SA and ASA which give the highest contents. Tween20 and hydrogen peroxide are used for permeabilisation of hairy root, 1% of tween20 releases in the nutritive solution more than 33 mg/l of hyoscyamine. By using this amount in a semi-continuous system, the content of hyoscyamine obtained for the first week is of 33,9 mg/l, it falls significantly for the continuation of the culture.

Keywords : *Datura sp*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, CPG, tropane alkaloids, optimisation, elicitation, permeabilisation.

صّخلم

لدى القلويدات التروپانية أهمية كبيرة في مجال الصيدلة. زرع الجذور المشتة المتحصّل عليها من نبات *Datura sp* باستخدام *Agrobacterium rhizogenes* تحطى آمال في إنتاجها عن طريق الزراعة الأنثوية، الهدف من هذا العمل هو محاولة تحسين إنتاج القلويدات التروپانية. من ضمن سلالات الجذور المشتة المتحصّل عليها السلالات المختارة DT10, DS18, DB و DF11 المتحصّل عليها من النباتات *Datura stramonium*, *D. innoxia*, *D. ferox*. أفضل سلالة هي DT10. النتائج المتحصّل عليها تظهر أن الوسط الكامل يعطى أحسن الأوزان أما الوسط المقسوم يعطى أفضل كميات القلويدات التروپانية. تراكيز 75 ميليول من الأزوت و 10 ميليول من الكالسيوم أعطت أفضل الأوزان. محاولة تحفيز وزن الجذور المشتة باستخدام الأحماض ساليسيليك أستيل ساليسيليك و جاسمونيك أظهرت أن تركيز 10^{-3} مول يعطى أحسن الأوزان أما فيما يخص كميات القلويدات التروپانية فالتركيز 10^{-4} و 10^{-6} مول هي الأفضل. محاولة تحرير القلويدات التروپانية في الوسط الزراعي باستخدام Tween20 و H_2O_2 بيئت أن 1% من Tween20 حرر أكثر من 33 مغ/ل من الهجوسامين في الوسط الزراعي. إستخدام هذه النسبة في نظم زرع متواصل أظهر أن إنتاج القلويدات التروپانية تنقص أسبوع بعد أسبوع خلال مدة الزراعة.

الكلمات الرئيسية : *Datura sp*, *Agrobacterium rhizogenes*, CPG, القلويدات التروپانية, تحسين, تحفيز, تحرير.

Introduction

Les plantes sont des usines biologiques naturelles. Elles produisent des substances actives biochimiques : alcaloïdes, huiles essentielles, flavones, tanins,... et les mettent à la disposition de l'homme qui peut en faire usage pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenberg et Paris , 1997**).

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement de plantes. Depuis l'identification du premier alcaloïde en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes (**Mauro, 2006**). Ils forment une grande famille très hétérogène de métabolites secondaires qui présentent plusieurs intérêts grâce à leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine (**Hopkins, 2003**).

On distingue trois familles d'alcaloïdes. Parmi elles, les alcaloïdes tropaniques dont les plus importants sont la scopolamine, l'atropine et l'hyosyamine (**Benhizia, 1989**). Ces substances sont extraites à partir de plantes de la famille des *Solanaceae*, dont le genre *Datura*. Ces dernières ont été le centre de nombreuses investigations biologiques en raison de leur contenu alcaloïdique (**Ramadan et al. , 2007**).

La production d'alcaloïdes par culture en plein champ qui dépend des facteurs climatiques et la complexité de leur synthèse par voie chimique souvent trop onéreuse, fait que leur production par biotechnologies constitue une alternative intéressante. En effet, la culture *in-vitro* offre l'avantage d'un contrôle des conditions environnementales et donc, une régularité de la production (**Toivonen, 1993 ; Srivastava et Srivastava, 2007**).

La possibilité de produire ces métabolites par des cultures cellulaires a été largement étudiée (**Toivonen, 1993**). Cependant, les cultures cellulaires sont caractérisées par une instabilité génétique et un faible rendement en métabolites secondaires (**Toivonen, 1993 ; Giri et Narasu, 2000**). La production des alcaloïdes tropaniques nécessite un tissu spécialisé comme les chevelus racinaires induits par *Agrobacterium rhizogenes*, vu leur croissance rapide, leur stabilité génétique et biosynthétique (**Giri et Narasu, 2000 ; Amdoun et a l. , 2006**).

Ces chevelus racinaires sont uniques avec un avantage additionnel comme source continue de production de métabolites secondaires (**Hamill et al. , 1986 ; Mukundan et al. , 1998**).

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* qui peuvent être valorisées (**Houmani, 1999**).

Ainsi, des espèces spontanées d'Algérie du genre *Datura* ont fait l'objet de notre étude en vue de leur valorisation. A cet effet, nous nous sommes intéressés à :

- L'induction des chevelus racinaires chez quelques espèces du genre *Datura* à savoir : *Datura stramonium*, *D. innoxia*, *D. tatula* et *D. ferox* par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* ;
- La sélection des lignées racinaires performantes ;
- L'optimisation de la production de chevelus racinaires sur milieu liquide ;
- L'élicitation de la production de biomasse et d'alcaloïdes sur milieu semi-solide ;

Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp :

- La perméabilisation des chevelus racinaires ;
- Le développement des chevelus racinaires en bioréacteur (culture en continu) ;
- L'extraction des alcaloïdes ;

Le dosage et l'identification des alcaloïdes par chromatographie en phase gazeuse.

Synthèse bibliographique

Le *Datura*

Généralités sur les *Datura*

Les *Datura* sont des solanacées à alcaloïdes tropaniques, ayant des propriétés thérapeutiques très recherchées en pharmacie (**Bianchini et Corbetta , 1975**).

Le mot *Datura* viendrait du nom arabe « *tatorah* » dont la racine « *tat* » signifie piquer (**Bianchini et Pantano , 1986**). Selon d'autres auteurs, ce mot proviendrait de « *dhatara* » qui est le nom indien de la plante et qui signifie « pomme épineuse » ou « pomme de la mort » (**Poletti, 1988**). En Algérie, les espèces de *Datura* sont connues sous plusieurs noms selon les régions, en Kabylie « *bourandjouf* » et aux Aurès « *netina* » (**Dambri, 1998**).

1.1 Origine et distribution des *Datura*

Les *Datura* sont originaires de l'Europe méridionale, de la région tropicale d'Asie en Inde et d'Amérique méridionale (**Bianchini et Pantano , 1986**). Ils sont répandus dans les régions chaudes, tempérées et tropicales (**Paris et Moysse , 1971**). Les *Datura* sont cosmopolites en Algérie (**Quezel et Santa, 1962**), ils poussent à l'état sauvage aux bords des routes, dans les décombres et dans les cultures. Les *Datura* préfèrent les sols légèrement basiques, humides et les expositions bien ensoleillées (**Houmani et al ., 1994**).

Le genre *Datura* regroupe plusieurs espèces, dont cinq sont signalées à l'état spontané en Algérie, il s'agit de : *Datura ferox* L., *Datura innoxia* Mill., *Datura quercifolia* H.B.K., *Datura stramonium* L., *Datura tatula* L. (**Houmani, 1999**).

1.2 *Datura stramonium* L.

La stramoine (Fig. 1) est une plante annuelle vigoureuse dont la tige arrondie porte des feuilles ovales aiguës profondément découpées en lobes inégaux pointus et marquées par des nervures saillantes, axillaires, grandes. Les fleurs ont un calice à 5 sépales et une corolle tubuleuse, plissée, blanche, évasée en entonnoir. Le fruit est une capsule fortement épineuse, à 4 valves épaisses, contenant de nombreuses graines noires, réniformes, à surface réticulée (**Bruneton, 2005**). Le *Datura stramonium* est une plante herbacée de port puissant (**Volak et al. , 1983**) de 0,3 à 1 m de hauteur (**Cecchini, 1976**). Le pétiole mesure de 2 à 6 cm et le limbe de (5 à 13) x (3 à 15) cm (**Amdoun et al ., 2005**). La racine est fusiforme et ramifiée (**Thurzova, 1981 ; Pelikan, 1986**).



Figure 1 : *Datura stramonium* (Csapody, 1961).

La teneur en hyoscyamine des parties aériennes du *D. stramonium* est de $0,67 \pm 0,15$ mg/g MS. Elle est environ 2,5 fois plus importante que celle de la scopolamine. Les racines présentent des teneurs en hyoscyamine environ 4 fois plus faible que celles des parties aériennes. Elles sont également dominées par l'hyoscyamine. La production moyenne d'alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine) est de 105 mg / plante (Houmani et Cosson, 2000).

1.3 *Datura tatula* L.

Datura tatula (Fig. 2) est une plante annuelle, à saveur amère et à odeur légèrement vireuse, elle peut atteindre 1,5 m de hauteur. La tige est dichotome, elle est mince plus au moins ridée, de couleur brin pourpre. La feuille présente un limbe acuminé de 8 à 25 cm de long et de 7 à 15 cm de large, de forme ovale dentelée, le pétiole est cylindrique de couleur violette. La fleur est solitaire à l'aisselle de chaque ramification, elle présente un court pédoncule, elle est pentagone à ovaire super, le calice est gamosépale, d'une couleur verte avec des stries violacées. La corolle est infundibuliforme de couleur pourpre lavande. Les racines sont de couleur pâle et portent de nombreuses radicelles. Le caryotype est de $2x=2n=24$ chromosomes (Lebon, 1971).

Il y a souvent confusion entre *D. stramonium* et *D. tatula*. Adzet et al. (1979) signalent que *D. tatula* est considérée comme une espèce par Bernhardii et Wettstein (1957) et comme une variété de *D. stramonium* par Koch et Torrey. D'autres auteurs les considèrent comme deux espèces différentes (Lebon, 1971).



Figure 2 : *Datura tatula* (Csepely, 1961).

Les parties aériennes du *D. tatula* renferment une teneur en hyoscyamine de $0,73 \pm 0,19$ mg/g MS. Celle-ci est environ 3,5 fois plus élevée que celle de scopolamine. Les racines sont également dominées par l'hyoscyamine avec une teneur de 0,38 mg/g MS. La production moyenne en alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine) est de 53 mg / plante MS (Houmani et Cosson, 2000).

1.4 *Datura innoxia* Mill.

Le *Datura innoxia* (Fig. 3) est une plante annuelle, de port dressé, elle peut atteindre 2 m de hauteur (Paris et Moyse, 1971). La tige de *Datura innoxia* est duvetée et violette. Ces feuilles sont alternes, vertes et sinuées, légèrement duveteuses, leur pétiole mesure entre 2 et 7 cm, le limbe est à la base arrondi et mesure (4 à 12) x (2 à 8) cm. La plante porte une fleur érigée de 8 à 15 cm, blanche ou violette. Le calice fait plus de la moitié de la largeur de la corolle, cette dernière fait 10 cm environ de longueur. Le fruit est une capsule épineuse,

ovoïde ou globuleuse de (3 à 5) x (4 à 6) cm qui se torde vers le bas. Lors de la formation à maturité le fruit s'ouvre de manière irrégulière pour libérer de grandes graines de 3 à 5 mm réniformes, rugueuses de couleur marron (Amdoun *et al.*, 2005). Selon Ducrocq (1994) l'espèce est autogame et présentant un caryotype de $2x = 2n = 24$ chromosomes.



Figure 3 : *Datura innoxia* (Csapody, 1961).

Les parties aériennes du *D. innoxia* renferment une teneur de $1,03 \pm 0,24$ mg/g MS d'alcaloïdes (scopolamine + hyoscyamine), ayant un rapport de scopolamine / hyoscyamine de 2,81. Ces organes sont dominés par la scopolamine ; contrairement aux racines qui renferment 7 fois plus de hyoscyamine que de scopolamine. La production moyenne d'alcaloïdes majeurs est de 109 mg par plante (**Houmani et Cosson, 2000**).

1.5 *Datura ferox* L.

Le *D. ferox* (Fig. 4) est une plante annuelle diploïde ($2x = 2n = 24$). La tige est verte, glabre, mesurant 50 à 150 cm de longueur, ayant un diamètre de 1 à 1,5 cm. La fleur est composée d'une corolle blanche mesurant 4,5 à 6 cm de longueur, glabre et pliée longitudinalement, d'un calice de 2 à 2,5 cm, elle porte un style de 2,5 cm de longueur et une anthère de 3 mm. Le fruit est une capsule ovoïde très épineuse, à maturité elle s'ouvre en 4 valves d'où s'échappe des graines noires très dures de 2,5 mm de largeur (**Houmani, 1999 ; Houmani et Cosson, 2000**).

C'est une espèce spontanée en Chine du sud, mais elle est naturalisée dans les régions chaudes du monde (**Bhatt et Saratbabu, 1988**). Ces mêmes auteurs signalent que d'après **Bhandari (1977)** cette espèce se trouve dans les déserts du Rajasthan en Inde et qu'elle est présente dans les régions semi-arides à sol non salé, ce qui représente un aspect intéressant pour sa distribution géographique.



Figure 4 : *Datura ferox* (Csapody, 1961).

La teneur en alcaloïdes (scopolamine + hyoscyamine) des parties aériennes est de $1,16 \pm 0,16$ mg/g MS. A cause de sa faible teneur en hyoscyamine, le rapport scopolamine/ hyoscyamine est très élevé (18,3). Les parties aériennes renferment 4,5 fois plus d'alcaloïdes (scopolamine + hyoscyamine) que les racines, qui présentent une teneur de 0,25 mg/g MS. La production moyenne d'alcaloïdes des parties aériennes est de 106 mg / plante (Houmani et Cosson, 2000).

2. Intérêts des *Datura*

Parmi les solanacées, les *Datura* sont particulièrement riches en alcaloïdes tropaniques essentiellement en hyoscyamine et en scopolamine (Houmani, 1999), dont la teneur oscille entre 0,2 et 0,6 % (Goullé et al ., 2004).

A faible dose, les alcaloïdes tropaniques peuvent avoir d'importantes applications pharmaceutiques (Vallet, 1996 ; Hopkins, 2003). Les alcaloïdes tropaniques ou des extraits qui en renferment sont utilisés comme médicaments, relaxants musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes (Hopkins, 2003). Ils sont antispasmodiques, sédatifs et anticholinergiques, les alcaloïdes sont également efficaces contre les douleurs consécutives à une antrose du rein, de la vésicule biliaire, du colon et des organes abdominaux (Verdrager, 1978).

Les *Datura* trouvent plusieurs autres applications dans de multiples domaines. Dans le cadre de la lutte biologique, le *D. stramonium* figure parmi les plantes qui peuvent diminuer les populations de nématodes à galle de la tomate, et même pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre (Adabio, 2004).

Dans le domaine de l'agriculture biologique, l'allélopathie des *Datura* pourrait être utilisée pour le désherbage (Roberts et Winks, 1998). D'après Rolard (2002), les *Datura* peuvent être aussi utilisés dans le domaine écologique, dans la bioremédiation des sols et des eaux pollués par les métaux lourds. Ainsi, ces derniers seront concentrés sur les parois cellulaires de la plante.

De plus, les *Datura* sont de très belles plantes qui présentent un grand intérêt ornemental (Abadio, 2004).

3. Toxicité des *Datura*

Selon Lapostolle (2006) La consommation de ces plantes dans un but addictif sous forme de décoction ou d'ingestion de graines est actuellement le mode d'intoxication le plus fréquent. Le nombre de graines ingérées peut varier de 7 à 200.

Toutes les parties de la plante sont toxiques et renferment des alcaloïdes tropaniques. Le *Datura* est, comme la belladone, un parasympatholytique mais dont l'effet est plus intense.

L'intoxication se traduit par un syndrome anticholinergique à symptomatologie essentiellement neuropsychique avec excitation psychomotrice, propos incohérents, hallucinations visuelles, angoisse, désorientation et agressivité. La présence d'une mydriase bilatérale est constante alors que les autres signes anticholinergiques sont inconstants : sécheresse buccale, tachycardie sinusale, hyperthermie, rétention urinaire et vomissements. Dans les cas graves, on peut observer : coma, convulsions et détresse respiratoire (Lapostolle, 2006).

II. La maladie du chevelu racinaire

1. *Agrobacterium*

Depuis sans doute des millions d'années, des bactéries du sol accomplissent des transferts naturels de gènes dans les plantes. A l'occasion d'une blessure, elles introduisent, dans le génome nucléaire des hôtes qui leur sont sensibles, une partie de leur ADN plasmidique qui est ensuite capable de s'y exprimer (Chilton, 1983). Ces bactéries sont des Rhizobiacées Gram- du genre *Agrobacterium*. Il s'agit d'*A. rhizogenes* et *A. tumefaciens*, proches parentes l'une de l'autre et respectivement responsables des maladies du chevelu racinaire (*hairy root*) et de la galle du collet (*crown gall*). Ces bactéries se présentent sous forme de bacilles de 0,6 à 1 µm de largeur et de 1,5 à 3 µm de longueur. Elles sont mobiles grâce à 1 à 6 flagelles et ne font pas de spores. Elles vivent en aérobie, car elles possèdent un métabolisme du type respiratoire avec l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons. Elles sont toutefois capables de croître sous de tensions réduites d'oxygène dans les tissus de la plante. La température optimale de croissance est de 25°C à 28°C. En milieu solide, elles forment des colonies convexes, circulaires, lisses et de couleur beige clair (Chriqui, 1998).

2. Plasmide Ri

Le plasmide Ri (Fig. 5) est caractérisé par sa grande taille (200 à 800 kb) et contient deux régions nécessaires à l'infection, la région de l'ADN-T (ADN transféré) destinée pour être transféré à la cellule végétale et la région *vir* (virulence). L'ADN-T est délimité par 24 pb de séquences d'ADN répétées (Slightom et al., 1986).

Un certain nombre de groupes de plasmides Ri (pRi) ont été caractérisés. La classification de ces plasmides dépend des types d'opines (Tableau 1) auxquels les ADN-T orientent la synthèse de la plante infectée (Lahners *et al.*, 1984).

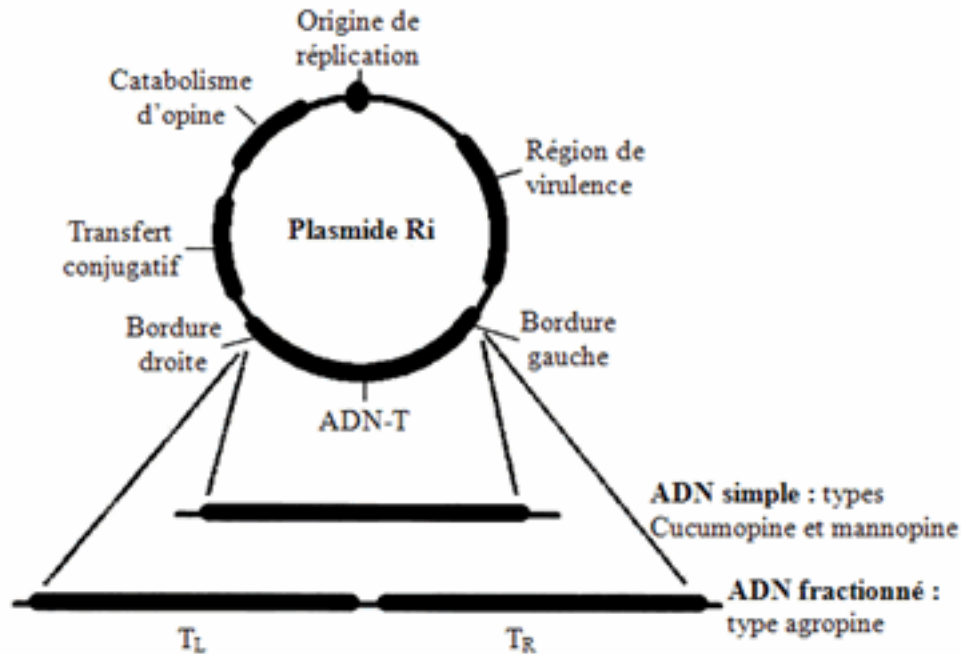


Figure 5 : Structure du plasmide Ri (Veena et Taylor, 2007)

Les souches d'*A. rhizogenes* les plus fréquemment étudiés sont les souches à agropine (A4 et 1855) et de type mannopine (8196). Les pRi de type agropine abritent deux fractions d'ADN-T, T_L (*T-DNA left*) et T_R (*T-DNA right*). Les pRi de type mannopine et de type cucumopine contiennent un seul fragment d'ADN-T, ce dernier est homologue au T_L des pRi de type agropine (Lahners *et al.*, 1984).

Tableau 1 : Principales opines servant à la classification des plasmides Ri d'*A. rhizogenes* (Chriqui, 1998).

Types de plasmides	Souches portant ces plasmides
Agropine Mannopine Cucumopine Mikimopine	A4, 15834 et HRI. 8196, TR7 et TRIOI. 2659. NIAES 1724.

Après transfert, l'ADN-T intègre l'ADN nucléaire végétal où ses gènes sont transcrits par l'ARN polymérase II. L'ADN-T contient des gènes indiquant le phénotype rhizogène. Il héberge des gènes qui orientent la production et la sécrétion des opines. Ces opines peuvent être utilisées par des souches d'agrobactéries comme source de carbone (énergie) et parfois

comme source d'azote. En outre, quelques opines peuvent induire le transfert conjugal du pRi entre cellules bactériennes. La région *vir* du pRi contient de nombreux gènes impliqués dans le traitement de l'ADN-T et de son transfert vers la cellule végétale (Hooykaas, 1984).

Les racines induites par *A. rhizogenes* peuvent être maintenues en tant que cultures de chevelus racinaires, qui ont la capacité de produire des métabolites secondaires à un niveau plus élevé que des cultures en suspension, et qui sont génétiquement beaucoup plus stables (Primrose *et al.* , 2003).

3. Base physiologique de la maladie du chevelu racinaire

En dépit des similitudes entre les gènes *vir* et les bordures de l'ADN-T des plasmides Ti et Ri, qui reflètent très probablement des mécanismes identiques du transfert de l'ADN-T de la bactérie (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*) aux cellules végétales, nous savons maintenant que les bases physiologiques de la maladie de la galle du collet et du chevelu racinaire diffèrent de manière significative. Dans une certaine mesure, ceci a pu avoir été prévisible considérant les possibilités régénératrices des tissus incitées par ces deux bactéries. Les tumeurs de la galle du collet régénèrent rarement des plantes capables de s'enraciner. Des plantes régénérées de ces tumeurs ont été analysées, la majorité de l'ADN-T est abîmé ou l'expression de la plupart des gènes de l'ADN-T est inactivée par méthylation de ces derniers (Durand-Tardif *et al.* , 1985 ; Tepfer, 1984).

Pendant, des plantes sont spontanément régénérées des chevelus racinaires, quoique avec leur morphologie modifiée, contiennent et expriment toujours les gènes de l'ADN-T du plasmide Ri (Durand-Tardif *et al.* , 1985 ; Tepfer, 1984). Ces plantes régénérées diffèrent des plantes normales dans plusieurs aspects : elles montrent fréquemment des changements dans la pigmentation et la morphologie de la feuille, la longueur des entre-noeuds, le géotropisme des racines, la morphologie de la fleur et le cycle de la plante (Gelvin, 1990).

4. Relation *Agrobacterium*-cellule végétale

Selon Chriqui (1998), on peut considérer trois grandes étapes dans le mécanisme du transfert de l'ADN-T des plasmides Ri vers les cellules végétales :

- La reconnaissance et l'attachement de la bactérie aux cellules végétales blessées. Il s'agit des premiers événements du processus infectieux ;
- Le transfert et l'intégration de l'ADN-T ;
- L'expression des gènes portés par l'ADN-T après leur intégration dans le génome nucléaire végétal, cette expression étant à l'origine des symptômes du chevelu racinaire et du déterminisme de la relation parasitaire.

L'ensemble de ces événements est illustré dans la figure 6.

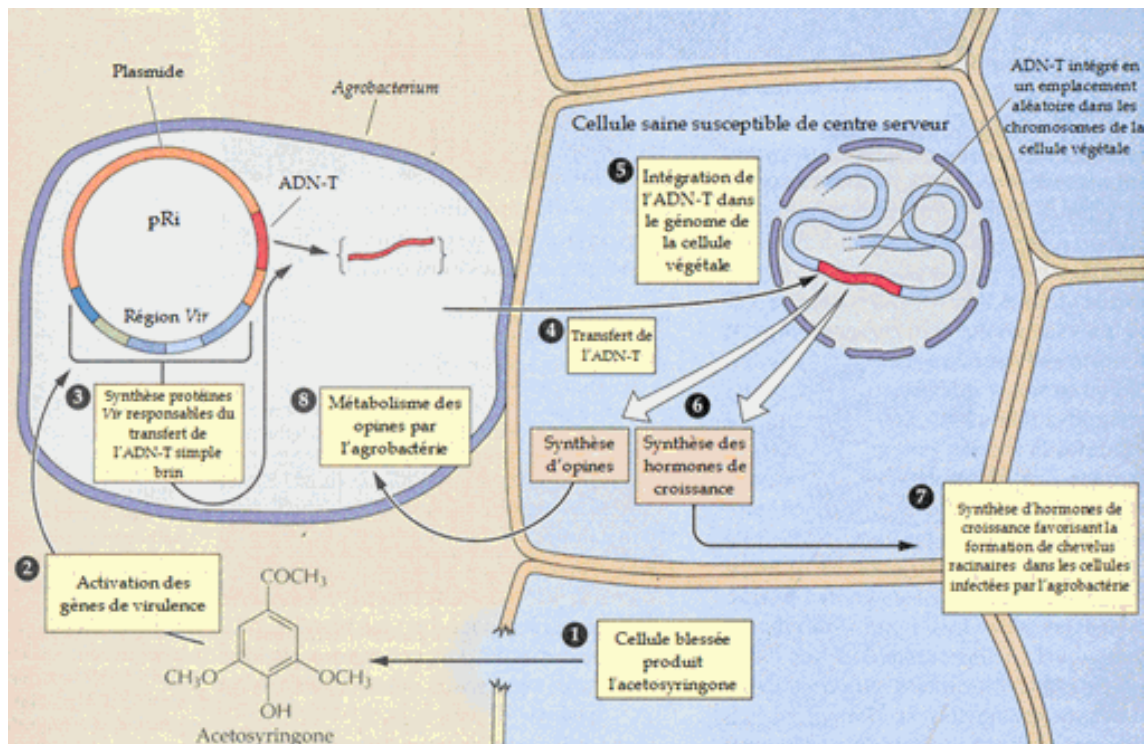


Figure 6 : Relation *Agrobacterium* – cellule végétale (Wei-Ying, 2003).

4.1. Attachement de la bactérie aux cellules végétales

Le transfert de l'ADN-T dans la cellule végétale nécessite d'abord une reconnaissance de la cellule par la bactérie qui s'attache à la paroi de celle-ci, les gènes responsables de l'attachement sont portés par le chromosome bactérien (Scriban, 1999). Les loci *chvA*, *chvB* et *exoC* sont responsables de la synthèse d'un polysaccharide, β 1,2-glucane, qui serait impliqué dans la capacité d'adhésion. Le locus *cel* serait responsable de la synthèse d'un polysaccharide de type cellulose dont le rôle serait de stabiliser l'adhésion bactérie- plante une fois qu'elle a été initiée. D'autres loci seraient indispensables pour le pouvoir d'adhésion de la bactérie (*miaA*, *chvD*, *ros*) mais leur rôle reste inconnu (Tikhomiroff, 2002).

4.2. Transfert et intégration de l'ADN-T

Les séquences bordures de l'ADN-T ne sont pas transférées sous forme intacte dans le génome de la plante mais elles sont impliquées dans le processus du transfert (Zambryski et al., 1982). La délétion de la répétition droite de la séquence bordure empêche le transfert de l'ADN-T (Shaw et al., 1984).

Les gènes responsables du transfert de l'ADN-T sont situés au niveau de la région *vir*. Deux de ces gènes, *virA* et *virG* sont exprimés de façon permanente à un faible niveau et ils contrôlent l'activation des autres gènes *vir*, induite par la plante. La protéine VirA est une kinase qui traverse de part en part la membrane bactérienne interne et sert de récepteur pour certaines molécules phénoliques (l'acétylsyringone étant la plus utilisée en laboratoire) qui sont relarguées par les cellules de la plante blessée (Stachel et al., 1985). Beaucoup de sucres agissent en synergie avec les signaux phénoliques pour augmenter l'expression des gènes *vir* (Shimada et al., 1990). La protéine VirA, une fois activée, phosphoryle la protéine VirG, qui est un activateur transcriptionnel des autres gènes *vir*. En plus de

virG, d'autres gènes situés sur le chromosome bactérien codent aussi pour des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes *vir* (Kado, 1998).

L'induction de l'expression des gènes *vir* entraîne la synthèse de protéines formant un pilus conjugatif par lequel l'ADN-T est transféré dans la cellule végétale. Les composants du pilus sont codés par des gènes de l'opéron *virB* (Lai et Kado, 2000). Le transfert de l'ADN-T proprement dit est initié par une endonucléase formée des produits des gènes *virD1* et *virD2*. Elle effectue soit des coupures simple brin, soit une coupure double brin dans les séquences bordures de l'ADN-T, ce processus est amplifié par les protéines des gènes *virC1* et *virC2* (Steck, 1997). Les brins de l'ADN-T sont recouverts de VirE2, une protéine de liaison à ADN simple brin, le complexe (ADN-T + VirE2) est ensuite transféré à la cellule végétale à travers le pilus.

VirD2 s'attache de manière covalente sur l'extrémité 5' du simple brin de l'ADN-T pour l'exciser, ce dernier est protégé contre les nucléases de la cellule végétale par VirE2. Une fois qu'il est dans le noyau, l'ADN-T s'intègre par un processus de recombinaison aléatoire et non homologue (Casse et Breitler, 2001 ; Crété, 2006 ; Davet, 1996 ; Scriban, 1999). Selon Chupeau (2001), il y a resynthèse de la portion coupée entre les sites de coupure et régénération d'un ADN-T double brin (Fig. 7). Scriban (1999) rapporte que la délétion de l'ADN génomique se fait par des éléments de régulation de la transcription, Pol II, et le complexe T.

L'intégration de l'ADN-T au sein du génome nucléaire se fait au hasard dans les parties qui sont régulièrement transcrites, et plusieurs copies de l'ADN-T peuvent se retrouver dans le génome de la cellule végétale (Tikhomiroff, 2002)

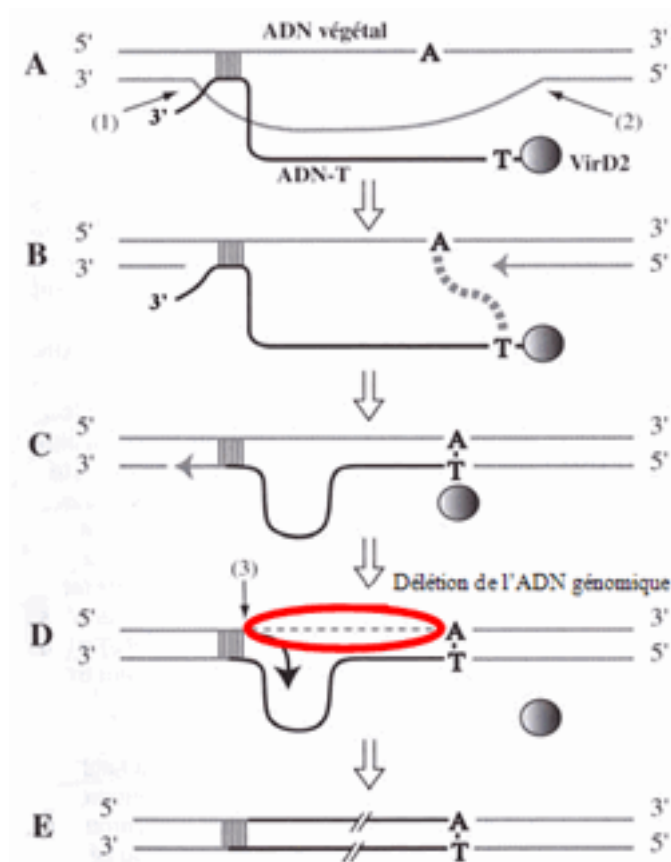


Figure 7 : Modèle d'intégration de l'ADN-T dans l'ADN végétal (Crété, 2006).

A, B : recombinaison de l'ADN-T ; **C** : resynthèse d'un ADN-T double brin ; **D** : délétion de l'ADN génomique ; **E** : intégration de l'ADN-T.

4.3. Expression des gènes portés par l'ADN-T

L'expression de l'ADN-T chez les plantes se traduit par, la formation d'un chevelu racinaire abondant au site d'infection. Ce chevelu a la faculté de synthétiser des opines qui diffèrent selon les souches de l'*A. rhizogènes* (Davet, 1996).

Quatre gènes sont responsables de l'apparition des chevelus racinaires et de leur phénotype, les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* (Tikhomiroff, 2001). Selon Slightom et al. (1986) les gènes *rol* (*root locus*) correspondent à des *orf* (*open reading frames*) spécifiques. L'expression de *rolA* est nécessaire pour l'établissement du phénotype des chevelus racinaires, celle du *rolB* détermine la densité du tissu des chevelus racinaires. *rolC* est lié au métabolisme de l'acide gibbérellique. *rolD* n'est pas essentiel pour induire le phénotype de la maladie, mais son absence retarde l'apparition des racines transformées (Schmulling et al., 1988).

5. Intérêts de la culture des chevelus racinaires

Les cultures de chevelus racinaires sont caractérisées par un taux de croissance élevé et peuvent synthétiser les métabolites secondaires dérivant des plantes d'origine. Naturellement, les cultures de racines ont besoin d'un apport exogène en phytohormone et ont un rythme de développement très lent ayant pour résultat une faible synthèse de métabolites secondaires. Cependant, l'utilisation de la culture des chevelus racinaires a révolutionné le rôle des cultures de tissus végétaux pour la synthèse de métabolites secondaires. Ces chevelus racinaires sont uniques et ils sont caractérisés par une stabilité génétique et biosynthétique, une croissance rapide, leur facilité d'entretien et leur capacité de synthétiser une grande gamme de composés chimiques avec un avantage additionnel comme source continue de production de métabolites secondaires (Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998).

A fin d'obtenir des cultures de chevelus racinaires à haute densité, il est nécessaire de maintenir les conditions de culture au niveau optimum. Ces cultures suivent un modèle de croissance définie, toutefois, la production de métabolites secondaires n'est pas proportionnellement liée à la croissance. Des racines transformées de plusieurs espèces ont été largement étudiées pour la production *in-vitro* de métabolites secondaires (Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998). Des lignées de chevelus racinaires peuvent être une source prometteuse pour la production normalisée de métabolites secondaires. Ces cultures de chevelus racinaires produisent des métabolites secondaires génération après génération sans perte de la stabilité génétique et biosynthétique, cette propriété peut être utilisée pour des manipulations génétiques dans le but d'augmenter la capacité biosynthétique (Giri et Narasu, 2000).

Ainsi, l'*A. rhizogènes* contribue à la transformation de plantes et à la production de plantes transgéniques à usage biotechnologique (Veena, 2007).

III. Les alcaloïdes

1. Définition

Les alcaloïdes sont une des classes des métabolites secondaires les plus importants. Le terme alcaloïde ou « alkaly-like » (alkaly = soude ; like = qui a l'apparence) a été proposé pour la première fois par le pharmacien **Meissner** en **1818**.

Une substance d'alcaloïdes d'origine animale ou végétale peut être définie comme un composant basique contenant dans sa structure moléculaire complexe un atome d'azote et qui peut manifester une activité pharmacologique significative (**Roberts et Wink, 1998**).

Récemment, les alcaloïdes sont présentés comme des molécules organiques cycliques avec un atome d'azote dans leur structure. Cette définition est proposée par **Pelleter (in Santavy, 1970)**. Selon **Cordell et al. (2001)**, il est nécessaire de noter quelques exceptions :

- Certains produits naturels contenant un atome d'azote dans leur structure ne sont pas considérés comme des alcaloïdes, on peut citer la Colchicine et l'Acide aristolochique.
- Une classe dites « **Protoalcaloïdes** » constituée de simples amines. Ce sont ce qu'on appelle « Les amines biologiques » comme l'Ephédrine et la Mescaline. Et les « **Pseudoalcaloïdes** ».

Les alcaloïdes sont considérés comme des composés organiques d'origine naturelles, azotés, plus au moins basique, de distribution restreinte et doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. Le regroupement d'un tel ensemble est confirmé par des réactions de précipitation (**Cordell et al. , 2001**).

2. Classification

On estime qu'il y a plus de 10 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. Proposer une classification pour les alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale (**Mauro, 2006**).

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes selon leur précurseur biosynthétique. Ainsi, il existe des alcaloïdes dérivés de l'ornithine, de la lysine, de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane (**Mauro, 2006**).

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

3. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine

Dans ce groupe, les pyrrolizidines et les tropanes sont les plus importants. Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présentes dans les plantes qui font partie des familles botaniques *Asteracea*, *Boraginaceae*, *Fabaceae* et *Orchidaceae*. Très toxiques, souvent hépatotoxiques (**Hartmann, 1995**).

Parmi les pyrrolizidines naturelles, la **rétronécine** et la **senécionine** (Fig. 8) (isolées de plantes de l'espèce *Senecio* et *Heliotropium*) sont les plus connues. On peut citer comme exemple de pyrrolizidines, l'indicine *N*-oxide, isolée d'*Heliotropium indicum*, qui s'est révélé être un agent antitumoral et antileucémique et fait objet d'une étude clinique à l'Institut National du Cancer aux Etats-Unis (Dewick, 2001).

Dans la famille des tropanes, l'**hyoscyamine**, la **scopolamine** (ou hyoscine) et l'**atropine** (Fig. 8) sont parmi les alcaloïdes les plus utilisés dans le domaine médical. Ils sont présents dans les plantes de l'espèce *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Mandragora officinarum* et *Datura sp* (Mauro, 2006). Ces alcaloïdes ont des propriétés antispasmodiques dans le système gastrointestinal et également des propriétés antisécrétrices (utiles au cours des interventions chirurgicales). L'atropine est largement utilisée dans le domaine de l'ophtalmologie en tant qu'agent mydriatique (pour dilater la pupille) (Dewick, 2001 ; Bhat et al., 2005).

La **cocaïne** (Fig. 8) est un alcaloïde peu abondant présent dans les plantes de l'espèce *Erythroxylum*. La source la plus importante de ce composé est l'*Erythroxylum coca*, utilisé depuis l'antiquité comme anesthésique local. Elle est beaucoup utilisée dans le domaine de l'odontologie, mais aujourd'hui, en raison de ses propriétés neurotoxiques elle est remplacée par d'autres drogues moins toxiques. Au cours des interventions chirurgicales des yeux, de l'appareil auditif, du nez et de la gorge, la cocaïne est encore largement utilisée (Bhat et al., 2005).

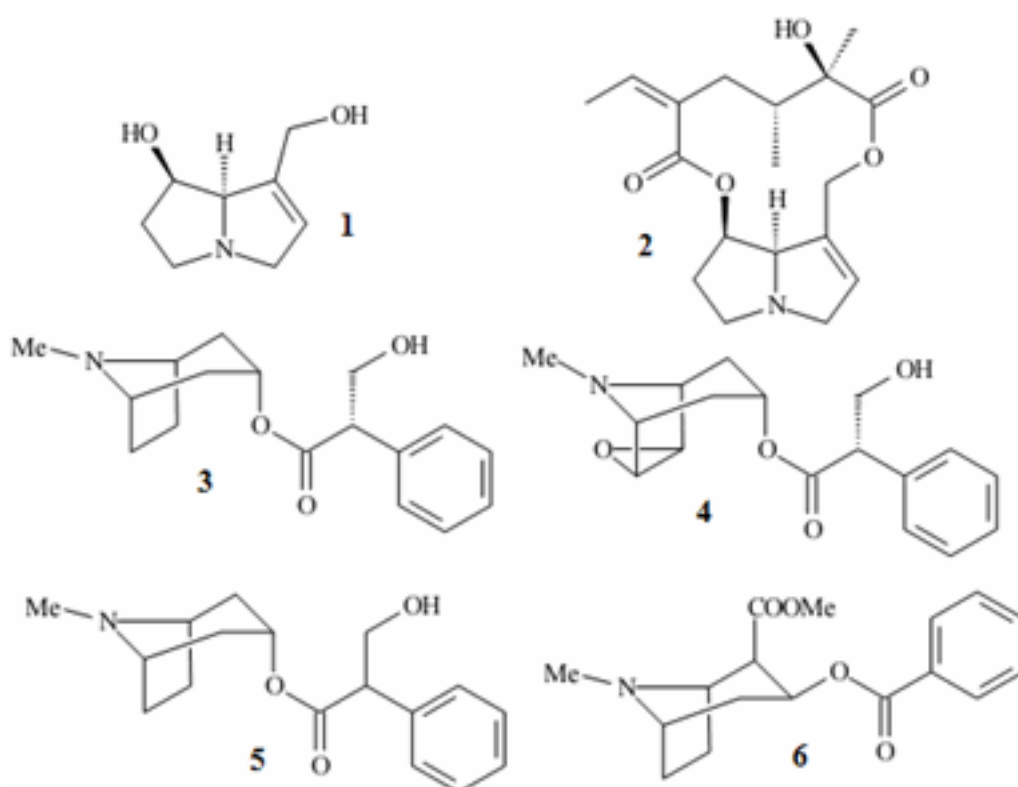


Figure 8 : Quelques alcaloïdes dérivés de l'ornithine (Mauro, 2006)

1 : rétronécine ; 2 : senécionine ; 3 : hyoscyamine ; 4 : scopolamine ; 5 : atropine ; 6 : cocaïne

4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques sont produits principalement chez les solanacées. Selon **Facchini (2001)**, la formation du cation *N*-méthyle-D1-pyrrolinium impliqué dans la biosynthèse des alcaloïdes commence par la décarboxylation de l'ornithine et/ou de l'arginine par une décarboxylase (OrnDC ou ArgD). Ces enzymes sont impliquées dans la formation de la putrescine directement ou par l'intermédiaire de l'agmatine. En dépit de l'existence de deux itinéraires à la putrescine, l'arginine est suggérée fournir la majeure partie de la putrescine pour la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.

La première étape de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est catalysée par une putrescine *N*-méthyltransférase (PMT). La tropinone est le premier intermédiaire avec un anneau tropane. Deux déshydrogénases, la tropinone réductase I (TR-I) et la tropinone réductase II (TR-II) réduisent la tropinone en tropine et γ -tropine respectivement (Fig. 9).

L'hyoscyamine est produite par la condensation de la tropine et de l'acide tropique (intermédiaire dérivé de la phénylalanine). L'hyoscyamine peut être convertie en scopolamine par hydroxylation de l'anneau tropane (**Facchini, 2001**)

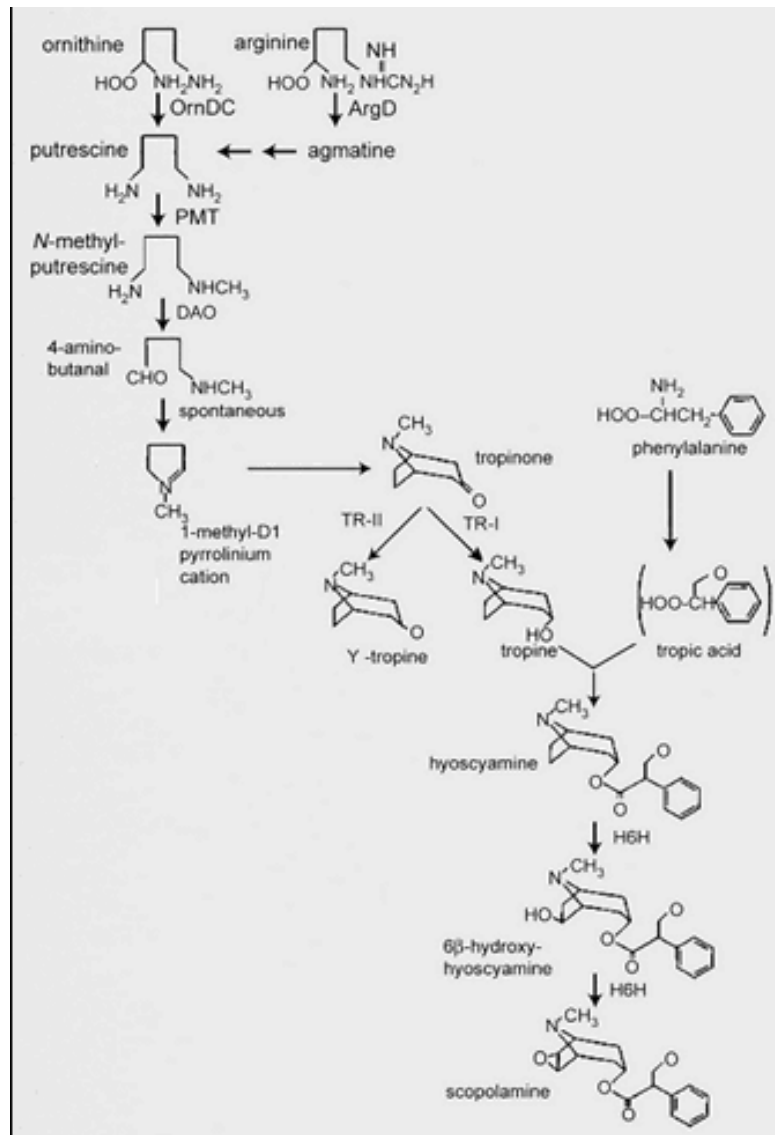


Figure 9 : Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Lee et al., 2004)

5.Extraction des alcaloïdes et préparation de l'échantillon

5.1.Extraction

La solubilité est décisive pour le choix de la méthode d'extraction. Tous les alcaloïdes tropaniques, excepté l'apoaotropine, la cocaïne et les truxillines, sont assez hydrosolubles, au moins à pH acide. La solubilité dans l'eau des alcaloïdes tropaniques permet une extraction sélective avec une solution aqueuse acide, à l'exclusion des composés lipophiles et fournit ainsi aux extraits peu de contaminants. L'extraction à grande échelle de l'hyoscyamine et de la scopolamine modifiée par l'addition du méthanol s'est avérée une alternative intéressante, parce qu'elle est souple, reproductible et permet de récupérer le dissolvant organique (Brachet et al., 1999).

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

5.2.Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon rapportée pour des alcaloïdes tropaniques est habituellement faite par l'extraction liquide – liquide (ELL) avec des dissolvants non miscibles ou par l'extraction en phase solide (EPS) (Drager, 2002).

La préparation de l'échantillon sans pertes est importante si une évaluation quantitative de tous les alcaloïdes est exigée. Pour beaucoup d'alcaloïdes, le procédé de préparation de l'échantillon est basé sur la différence de solubilité des sels d'alcaloïdes par rapport aux bases libres. Un extrait aqueux acide doit être alcalinisé pour transférer les alcaloïdes en forme de bases puis les extraire dans les dissolvants organiques non miscible avec l'eau. Si une ELL est employée, il est recommandé de la pratiquer rapidement ou utiliser un soluté modérément alcalin (par le carbonate de sodium ou l'ammoniac) (Drager, 2002).

Une alternative à l'ELL est l'EPS. Un choix large de matrices est disponible, des cartouches prêtes à l'emploi et de plusieurs tailles. L'EPS à phase inversée C₁₈ (PI18) emploie le même principe qu'une ELL ; l'extrait aqueux est alcalinisé puis utilisé dans la colonne d'extraction où tous les composés suffisamment lipophiles sont maintenus. L'élution est habituellement faite avec du méthanol acide. Au lieu des cartouches PI, beaucoup d'auteurs emploient particulièrement de la terre diatomée préparée (kieselgur). Quant une analyse par HPLC est projetée, les échantillons peuvent être préparés en utilisant des cartouches de laboratoire (préparées au laboratoire) avec du gel de silice pur, l'élution doit se faire par la phase mobile de l'HPLC (Drager, 2002).

6.Dosage et identification des alcaloïdes

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) conviennent bien à l'étude des alcaloïdes (Dräger, 2002).

6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

6.1.1 Principe

En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Skoog *et al.* , 2003).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (Tranchant *et al.* , 1995).

6.1.2 Appareillage de la CPG

a) Alimentation en gaz vecteur

Les gaz vecteurs ou gaz porteurs, doivent être chimiquement inertes, comme c'est le cas de l'hélium, l'argon, l'azote et l'hydrogène. Le choix du gaz est souvent dicté par le type de détecteur utilisé. A l'alimentation en gaz, sont associés des régulateurs de pression, des jauges et des débitmètres, et souvent un tamis moléculaire qui élimine l'eau et d'autres impuretés (Skoog *et al.* , 2003).

b) Système d'injection de l'échantillon

La méthode la plus courante consiste à utiliser une micro-seringue avec laquelle on injecte l'échantillon liquide ou gazeux à travers un diaphragme ou un septum en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située en tête de la colonne (Skoog *et al.* , 2003).

c) Configuration des colonnes et de leurs fours

Il existe deux types de colonnes en CPG, les *colonnes remplies* et les *colonnes tubulaires ouvertes* ou *capillaires*. La longueur des colonnes chromatographiques est comprise entre 2 et 50 m, ou plus. Pour pouvoir être mises dans un four thermostatique, elles sont usuellement constituées d'enroulement de 10 à 30 cm de diamètre (Skoog *et al.* , 2003).

d) Système de détection

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) est le plus utilisé. Dans un brûleur, l'effluent de la colonne est mélangé avec de l'hydrogène et de l'air, et ce mélange est enflammé électriquement (Skoog *et al.* , 2003).

6.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

6.2.1 Principe

L'HPLC (Fig. 10) et la CPG sont deux méthodes pouvant être décrites par des théories communes (principe commun). Dans les deux cas, un fluide appelé phase mobile parcourt la colonne. Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne (Skoog *et al.* , 2003).

6.2.2 Appareillage

Selon **Skoog et al. (2003)**, Un appareillage pour HPLC est généralement constitué de :

- Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante.
- Une pompe ;
- Vanne d'injection ;
- Une colonne ;
- Phase stationnaire ;
- Ordinaire, polaire et composée de gel de silice ;
- Inverse, apolaire et composée de silice greffée par des chaînes linéaires en atomes de carbones (C₈ et C₁₈).
- Détecteurs (détecteur UV-visible : le plus utilisé) ;
- Enregistreur.

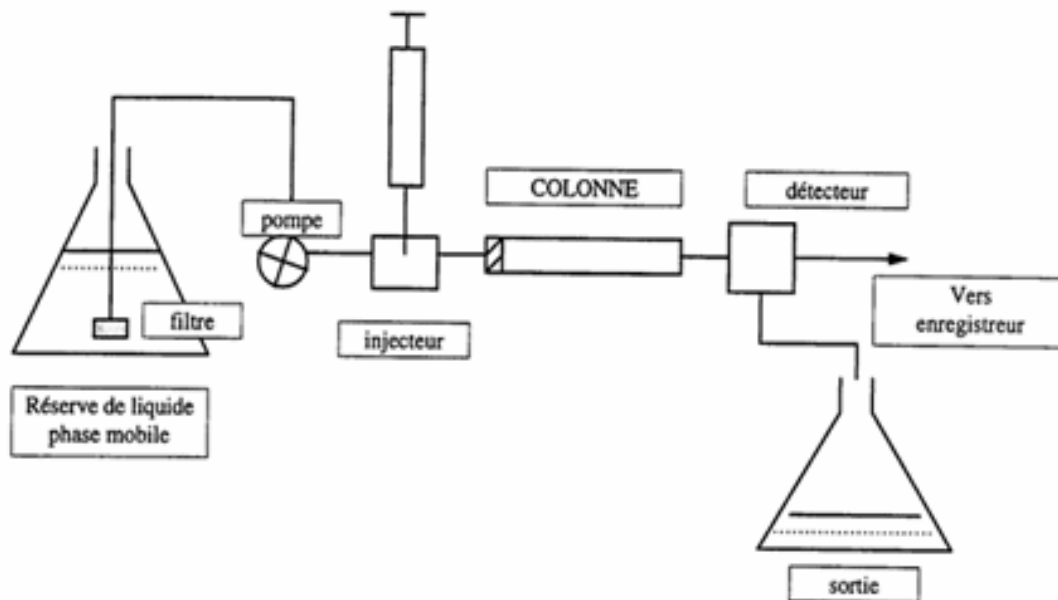


Figure 10 : Principe et appareillage de l'HPLC

IV. Système de culture en continu

Le grand potentiel des cultures de chevelus racinaires comme source stable de produits chimiques biologiquement actifs a attiré l'attention de la communauté scientifique (**Wilson et al., 1987**). En même temps elles fournissent beaucoup de défis pour la culture à grande échelle. Puisque les conditions de culture dans un bioréacteur sont totalement différentes que celles des boîtes de Pétri (**Kim et al., 2002²**). Dans un réacteur, le processus de la culture est en continu pendant des périodes prolongées, le produit est récupéré avec le milieu de culture épuisé de façon périodique (**Giri et Narasu, 2000**).

La capacité d'exploiter la culture des chevelus racinaires comme source de produits chimiques bioactifs dépend du développement des systèmes appropriés de bioréacteurs où

plusieurs paramètres physiques et chimiques doivent être pris en compte (**Giri et Narasu, 2000**).

1.Perméabilisation

Les cultures de chevelus racinaires des *Solanacées* sont les plus étudiées en raison de leur capacité à synthétiser des quantités relativement stable d'alcaloïdes tropaniques (**Avery et al ., 1987 In Boitel-Conti et al ., 1995**). Malheureusement, les composés désirés sont généralement mal libérés dans le milieu de culture (**Singh et al ., 1988 In Boitel-Conti et al ., 1995**) et leur accumulation dans la racine peut être limitée par une rétroaction (feed-back) d'inhibition des enzymes (**Pras et al ., 1991 In Boitel-Conti et al ., 1995**). La libération des alcaloïdes avec la prolongation de l'activité biosynthétique des racines transformées peut être une solution (**Boitel-Conti et al ., 1995**).

Le traitement avec du peroxyde d'hydrogène de 5 mM (H₂O₂) induit un dégagement passager des alcaloïdes sans affecter la viabilité des racines transformées (**Lee et al., 1998**). Selon **Boitel-Conti et al . (1995)**, le tween 20 (polyoxyéthylènesorbitane monolaurate) peut être utilisé comme agent de perméabilisation.

2.Contraintes de la culture en bioréacteur

La morphologie des chevelus racinaires est tout à fait flexible ; les racines répondent aux changements de l'environnement local. Les changements de la morphologie, y compris des changements de la densité et de la longueur des racines. Ainsi, la conception de bioréacteurs est contrainte à un compromis entre les besoins biologiques des tissus, sans induire une réponse biologique additionnelle et indésirable. L'agitation mécanique cause l'enroulement des racines et mène à la formation de calcs (**Giri et Narasu, 2000**).

3.Bioréacteurs

Les réacteurs utilisés pour la culture des chevelus racinaires sont de trois types : bioréacteurs à phase liquide, bioréacteur à phase gaz et bioréacteur hybride qui est une combinaison des deux autres (**Kim et al ., 2002²**).

3.1.Bioréacteur à réservoir remué (STR : Stirred tank reactor)

Ce type de bioréacteur (Fig. 11) inclut une roue à aubes ou lames qui facilitent le transfert de masse, et n'est pas habituellement approprié aux cultures de chevelus racinaires en raison de la formation de calcs au niveau des blessures provoquées par cisaillement de la rotation de la roue à aubes (**Taya et al ., 1989 ; Hilton et Rhodes, 1990**). Cependant, récemment certains bioréacteurs à réservoir remué modifiés ont été développés. Ces STRs modifiés ont de grandes roues à aubes et une cloison, ils sont agités à une vitesse réduite ; alternativement, des chevelus racinaires peuvent être développés dans une cuve en acier à l'intérieur du STR (**Giri et Narasu, 2000**).

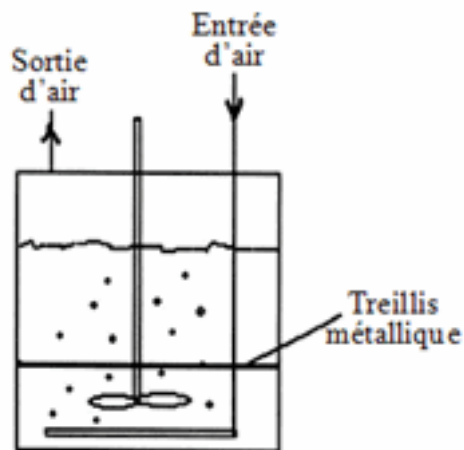


Figure 11 : Bioéacteur à réservoir remué (Kim et al., 2002¹)

3.2. Bioréacteurs submergés (Airlift ou submerged bioreactors)

Sont semblables aux STRs mais leur manque la roue à aubes. De l'air humidifié passe par la grille de verre, fonctionne comme aérateurs. Ce type de bioréacteur (Fig. 12) s'est avéré réussi pour la culture des chevelus racinaires (Taya et al., 1989 ; Tescione, 1997).

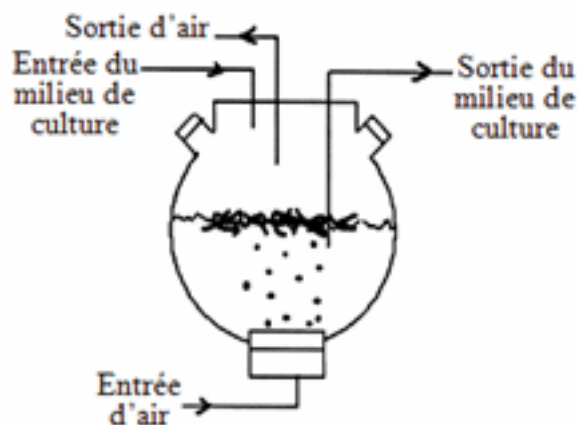


Figure 12 : Bioréacteur submergé (Kondo et al., 1989)

3.3. Bioréacteur à colonne aérée (Bubble column reactor)

Comme un bioréacteur submergé, dans une colonne, les bulles créent moins d'effet de cisaillement, de sorte qu'il soit utile pour la culture des structures organisées telles que les chevelus racinaires. Dans ce cas-ci, le taux de bouillonnement doit être graduellement augmenté avec la croissance des chevelus racinaires. D'ailleurs, la division d'une colonne en segments, et l'installation de multiples séparateurs augmente le transfert de masse (Buitelaar et al., 1991).

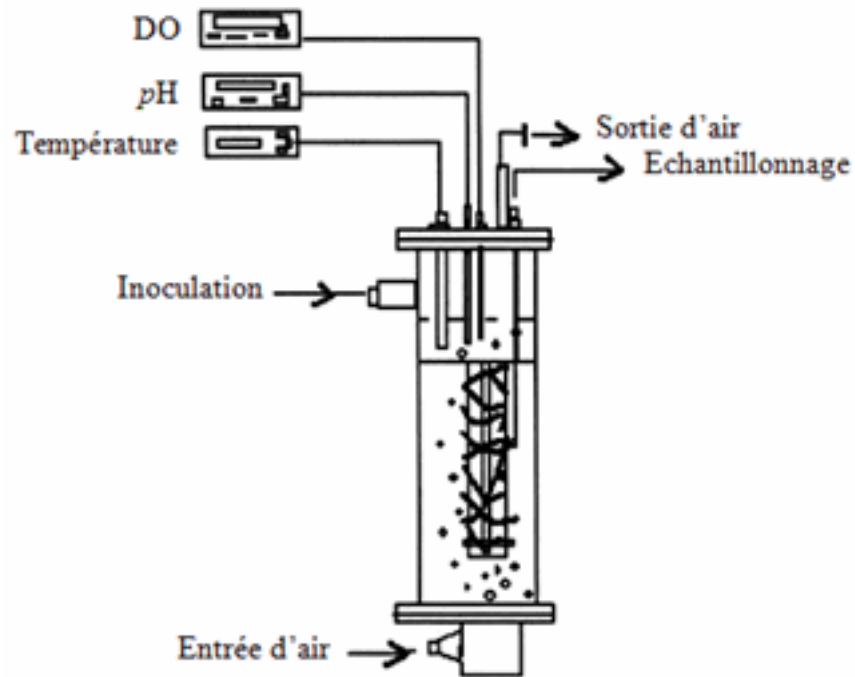


Figure 13 : Bioréacteur à colonne aérée (Kim et al., 2003)

3.4. Bioréacteur à turbine (Turbine blade reactor)

C'est une combinaison du réacteur à réservoir remué et du bioréacteur submergé. Ici l'espace de culture est séparé de l'espace d'agitation par le filet d'acier inoxydable, de sorte que les chevelus racinaires n'aient pas de contact avec la roue à aubes. L'air est introduit du fond de réservoir et dispersé par une roue à aubes de huit lames qui remue le milieu. C'est efficace pour la culture des chevelus racinaires (Kondo et al., 1989).

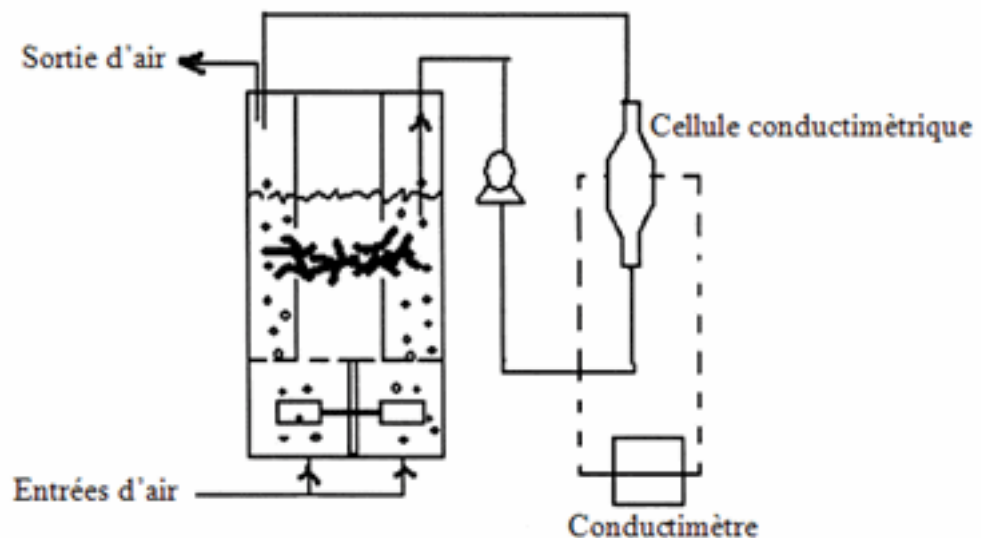


Figure 14 : Bioréacteur à turbine (Kondo et al., 1989)

3.5. Bioréacteur à brume (Mist bioreactor = trickle bed reactor)

Ici le milieu s'écoule goutte à goutte au-dessus d'un papier filtre Whatman contenant la biomasse, puis le milieu épuisé est écoulé, au fond du bioréacteur à un réservoir et il est recyclé à un taux spécifique. Le degré de distribution du liquide change selon le mécanisme de diffusion du liquide au dessus de la chambre du réacteur. Pour une meilleure dispersion, la pulvérisation est faite en mélangeant l'air humidifié au milieu qui crée la brume (**Dilorio et al ., 1992 ; Whitney, 1992**).

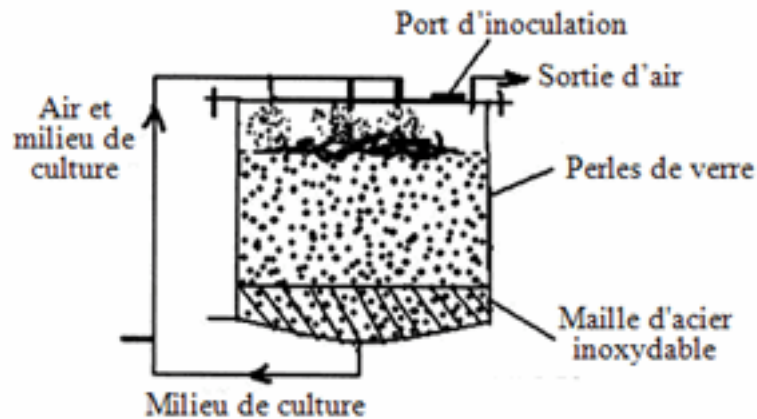


Figure 15 : Bioréacteur à brume (Srivastava et Srivastava, 2007)

3.6. Bioréacteur à phase gaz (Gas phase reactor)

De l'air humidifié est introduit du fond du réacteur par une plaque de verre agglomérée. C'est utile pour le mélange et l'oxygénation (**Giri et Narasu, 2000.**).

Réacteurs en lesquels la phase liquide est dispersée et le gaz est la phase continue (système de culture aeroponique), ils semblent offrir des conditions idéales pour la croissance et la productivité des cultures de racines en raison du contenu élevé du gaz disponible à la croissance de ces dernières (**McKelvey et al ., 1993**).

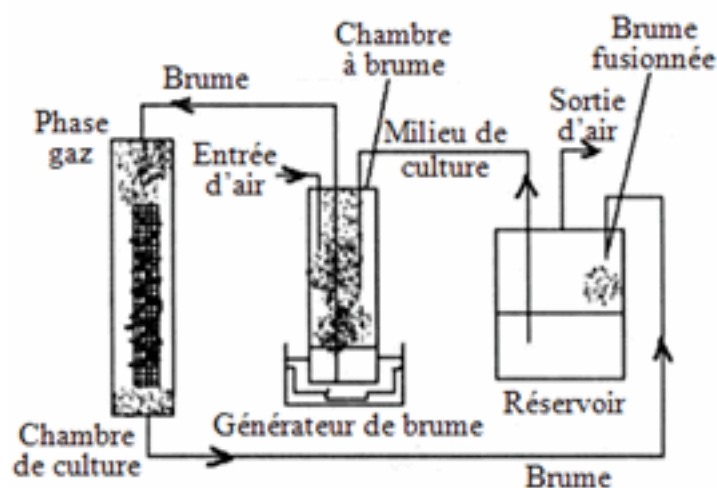


Figure 16 : Bioréacteur à phase gaz (Kim et al., 2002¹)

3.7. Bioréacteur à tambour rotatif (Rotating drum bioreactor)

Il est composé d'un récipient en forme de tambour monté sur des rouleaux pour l'appui et la rotation. Le tambour tourne seulement à 2 – 6 rpm pour réduire au minimum la pression de cisaillement sur les chevelus racinaires. **Kondo et al ., (1989)** ont employé ce système pour les chevelus racinaires de carotte. Les chevelus racinaires adhèrent aux surfaces du réacteur et pendant que le tambour tourne les racines tendent à se déchirer. Pour surmonter ce problème, une pellicule de mousse de polyuréthane allumée est fixée sur la surface du tambour, auquel les chevelus racinaires obtenus sont fixés. Ceci a eu comme conséquence une croissance plus élevée sans détachement.

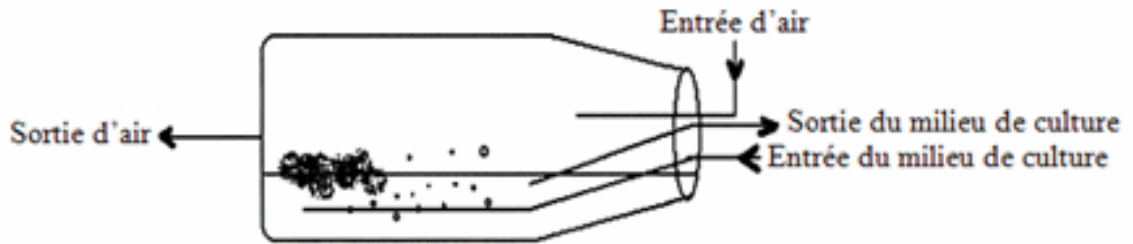


Figure 17 : Bioréacteur à tambour rotatif (Kondo et al., 1989)

3.8. Bioréacteur convecteur de flux (Convective flow reactor)

Ce réacteur consiste principalement en un réservoir remué et une chambre tubulaire de culture (**Kim et al ., 2002**). Bien que le réacteur convecteur de flux ait montré une performance améliorée comparé à un réacteur à colonne aérée, il ne peut être un système à grande échelle réaliste, cela est dû à l'insuffisance de la pression exigée pour circuler le milieu de culture à une vitesse assez élevée et surmonter la résistance d'écoulement au lit de racine (**Carvalho et Curtis, 1998**).

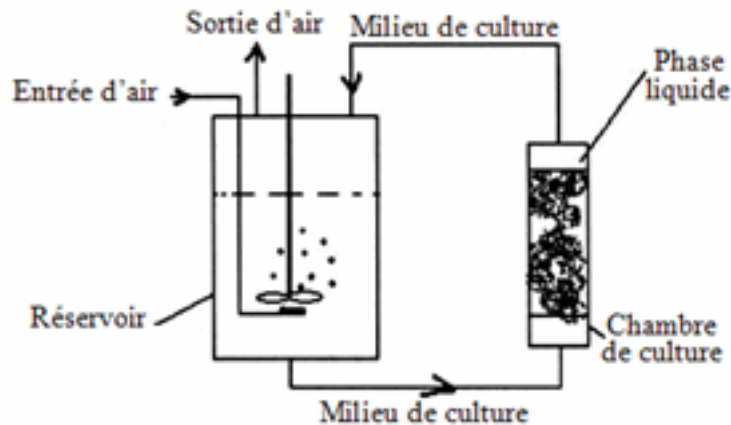


Figure 18 : Bioréacteur convecteur de flux (Kim et al., 2002¹)

3.9. Bioréacteurs à flux radial (Radial flow reactors)

Les conditions d'écoulement du liquide dans les bioréacteurs sont importantes pour la croissance des chevelus racinaires (**Yu et Doran, 1994**). Le changement de l'écoulement a une influence à la fois sur les facteurs du transfert d'oxygène au niveau des entrecroisements des racines à l'intérieur du bloc et sur le stress hydrique des cellules du

chevelu racinaire. La connaissance de ces facteurs a contribué dans le développement du réacteur à flux radial. Il améliore l'approvisionnement en oxygène et favorise la culture à haute densité des chevelus racinaires (Kino-Oka *et al.*, 1999).

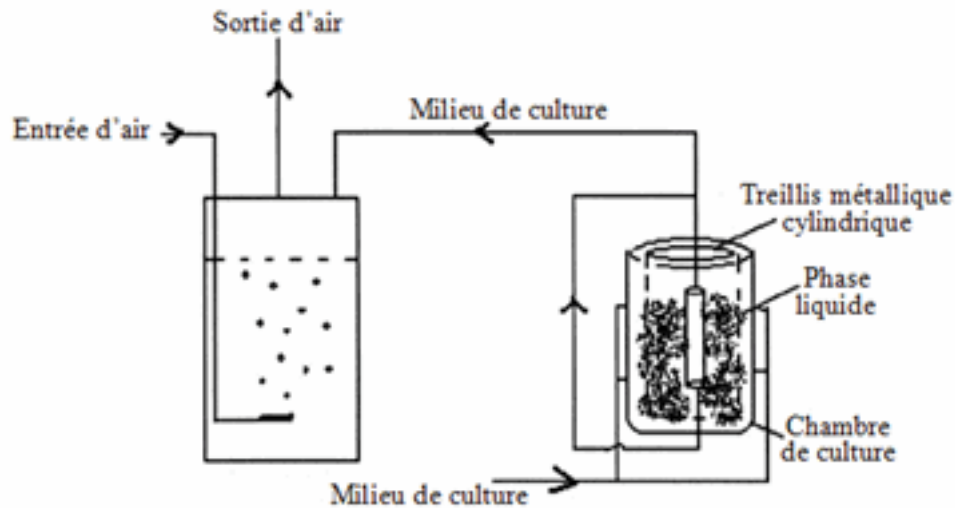


Figure 19 : Bioréacteurs à flux radial (Kim *et al.*, 2002¹)

3.10. Bioréacteur à vapeur nutritive (Nutrient Mist Bioreactor)

Weathers et Giles (1988) sont à l'origine du concept d'approvisionnement par des vapeurs nutritives. Des brumes peuvent être produites en employant des becs et l'air comprimé ou des ultrasons (Weathers *et al.*, 1997). Ce système évite les dommages causés par les pulvérisateurs du liquide sur le chevelu racinaire, les brumes sont plus efficaces et le besoin d'équipement de recyclage est limité. L'utilisation des brumes diminue également l'épaisseur du film liquide sur la surface des racines, de ce fait, l'augmentation des transferts d'éléments nutritifs et de gaz (O₂, CO₂ ...) (Weathers *et al.*, 1999).

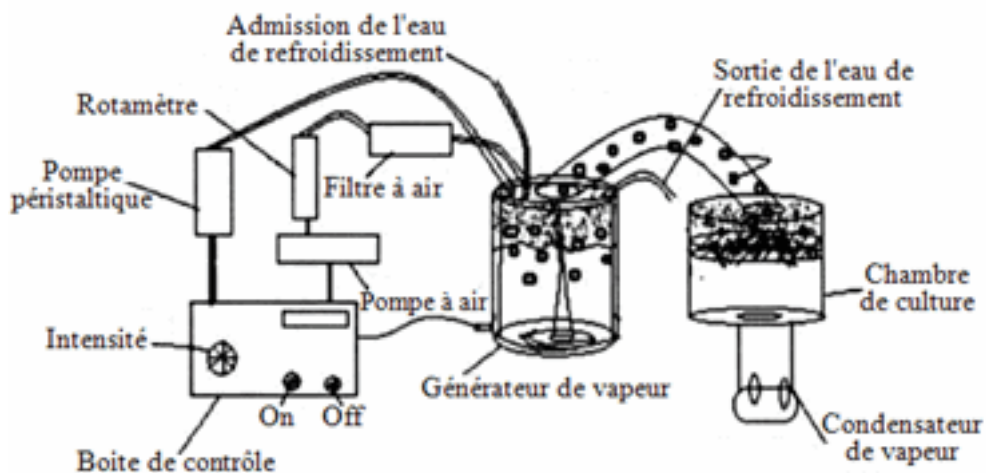


Figure 20 : Bioréacteur à vapeur nutritive (Kim *et al.*, 2002¹).

Matériels et méthodes

I Objectif du travail

Les solanacées, particulièrement les espèces du genre *Datura* sont connues pour leur contenu alcaloïdique (Houmani, 1999). Des *Datura* spontanés provenant de diverses régions d'Algérie ont fait l'objet de notre étude en vue de leur valorisation. Pour cela, nous nous sommes intéressés à :

- L'induction des chevelus racinaires chez quatre espèces du genre *Datura* à savoir : *Datura stramonium* (DS), *D. innoxia* (DI), *D. tatula* (DT) et *D. ferox* (DF) par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* ;
- La sélection des lignées racinaires intéressantes ;
- L'optimisation du développement des chevelus racinaires sur milieu liquide en tenant compte des paramètres suivants :

Milieu de culture (MS et B5) ;

Concentration en azote ;

Concentration en calcium.

- L'optimisation de l'élicitation de la biomasse et de la production d'alcaloïdes en utilisant de :

L'acide salicylique (AS) ;

L'acide acétylsalicylique (AAS) ;

L'acide jasmonique (AJ).

- L'optimisation de la perméabilisation des chevelus racinaires avec :

Du Tween 20 ;

Du peroxyde d'hydrogène.

- Essai de développement des chevelus racinaires en système de culture continue ;
- L'extraction des alcaloïdes :

Intracellulaire ;

Extracellulaire (dans le milieu de culture).

- Le dosage et l'identification des alcaloïdes par chromatographie en phase gaz (CPG).

II Obtention des vitrosemis

Des vitrosemis obtenus à partir de graines matures de *Datura* sp sont utilisés pour prélever les hypocotyles destinés à la transformation.

1. Origine des graines de *Datura*

Les graines (Fig. 21) de *Datura stramonium*, *D. tatula* et *D. innoxia* sont obtenues à partir de populations spontanées récoltées au niveau de la Mitidja, quant aux graines de *D. ferox*, elles sont originaires de Ain Timouchent.

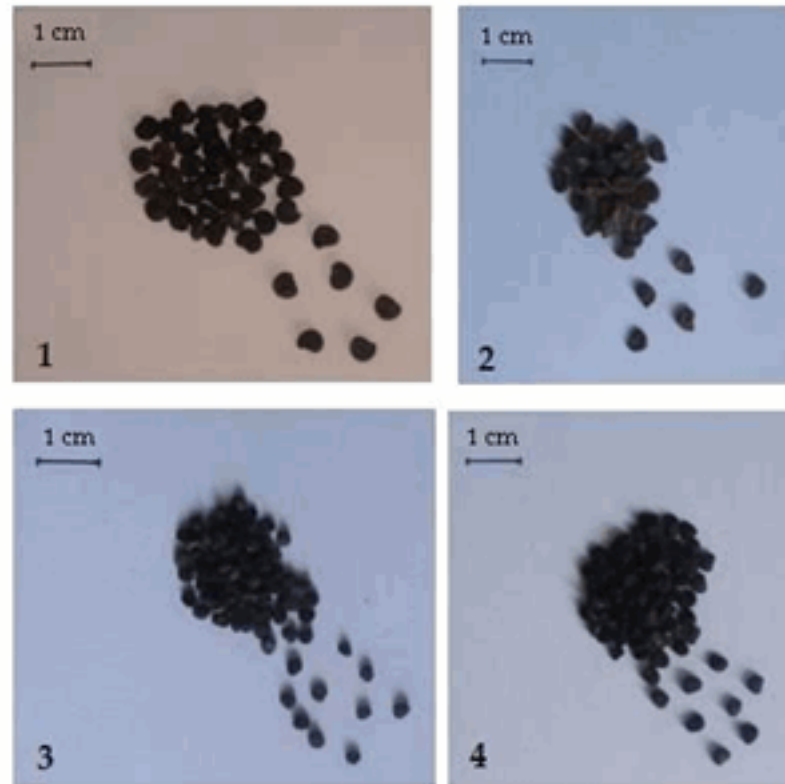


Figure 21: Graines matures des *Datura* utilisées pour l'obtention des vitrosemis
1 : DF ; 2 : DI ; 3 : DS ; 4 : DT.

2. Scarification

La scarification a lieu selon la méthode préconisée par **Khelifi-Slaoui et al . (2005)** qui consiste à frotter les graines entre deux feuilles de papier verre (80 point).

3. Désinfection des graines

Les graines scarifiées ont été désinfectées par un passage dans l'éthanol à 70° pendant 30 secondes et un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile et un séchage sur du papier filtre stérile (**Khelifi-Slaoui et al ., 2005**).

4. Mise en culture

Les graines sont ensemencées dans des tubes contenant environ 20 ml de milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) (Tableau 2) additionné de 7 g/l d'agar et 20 g/l de saccharose.

Les cultures sont placées dans la chambre de culture à une température de 26 ± 1°C et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

Le taux de germination de chaque espèce est calculé après six jours de culture.

Composition chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments	
H ₃ BO ₃	6,20
Ki	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₃ EDTA	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Additifs	
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Glycine	2

Tableau 2 : *Composition chimique du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)*

III Obtention des chevelus racinaires

1. Origine de l'agrobactérie

La souche A₄ utilisée dans notre travail est originaire de la Californie (Etat-Unis), elle est isolée par **Dubrin (Bouzar, 1983)**. C'est une souche à agropine (**Lambert et al ., 1988**). Elle porte le plasmide Ri dont l'ADN-T est constitué de 2 segments, T_L-DNA (left DNA) et

T_R-DNA (right-DNA) (Giri et Narasu, 2000 ; Tao et Li, 2006). Elle nous a été fournie par le laboratoire de microbiologie de l'université de Blida.

2.Préparation des suspensions bactériennes

La souche bactérienne est conservée à l'obscurité dans le milieu YEM (Vincent, 1970) (Tableau 3), à une température de -4°C .

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

Tableau 3 : Composition chimique du milieu YEM (Vincent, 1970)

2.1 Activation de la bactérie

L'activation consiste à ensemercer les bactéries sur un milieu de culture YEM neuf de pH 7 et les mettre en incubation à l'obscurité, à une température de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 48 à 72 heures. Une partie des bactéries activées est utilisée pour la préparation des suspensions, l'autre partie est remise en conservation pour les prochaines manipulations.

2.2 Mise en suspension de la souche bactérienne

Cette étape consiste à ensemercer la souche préalablement activée dans le milieu de culture YEM liquide pendant 72 heures (environ 10^6 germes/ml). L'incubation des bactéries en suspension est réalisée dans l'obscurité à $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dans un incubateur-agitateur réglé à 80 rpm.

3.Inoculation et co-culture plante-bacterie

Trois mois après le semis des graines de *Datura sp*, les vitrosemis sont suffisamment développés. L'inoculation a lieu 72 heures après la mise en suspension des bactéries. Les explants témoins subissent les mêmes traitements mais avec des milieux de culture sans bactéries.

L'inoculation se fait par simple dépôt à l'aide d'une seringue au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles de 0,5 à 1 cm de longueur. Ils sont ensuite déposés, selon une polarité inversée, à raison de 4 explants par boîte de pétri, sur milieu MS contenant 250 mg/l de céfotaxime (antibiotique). La co-culture est réalisée dans l'obscurité et à $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Amdoun et al., 2005).

La réponse du végétal (explant) est évaluée après 60 jours de l'inoculation et sur la base des paramètres suivants :

- Le taux de réactivité qui représente le pourcentage d'explants ayant formés un cal sur le site d'infection ;
- Le taux d'induction de chevelus racinaires correspondant au pourcentage d'explant ayant donnés des racines ;
- Le temps moyen d'apparition de la première racine ;
- Le nombre moyen de racines par explant.

Seules les racines émergeantes du site d'inoculation (cals) sont comptabilisées.

IV Isolement des racines transformées et multiplication des chevelus racinaires

Les racines transformées qui apparaissent sur les explants inoculés sont excisées lorsqu'elles atteignent environ 2 cm de longueur. Elles sont transférées sur milieu MS solide additionné de 250 mg de céfotaxime afin d'éliminer les bactéries qui accompagnent éventuellement ces racines. Des repiquages sur des milieux contenant de moins en moins d'antibiotique sont nécessaires.

Ayant atteint une taille et un degré de ramification jugés suffisants, les racines sont découpées en portions de 2 cm non ramifiées. Elles sont par la suite cultivées chacune sur milieu MS solide sans antibiotique.

- Confirmation de la transformation

Le gène *rolC* provient de l'ADN-T transféré par *A. rhizogenes* dans la plante. La vérification par PCR de la présence du gène *rolC* dans les cellules qui confirme la transformation (Gelvin, 1990 ; Amdoun *et al.* , 2006) n'a pas été réalisée. Dans nos essais la confirmation se fait par simple comparaison des traitements aux témoins.

V Sélection des lignées racinaires

Chaque racine isolée peut être considérée comme une lignée unique. Chaque racine induite par l'*Agrobacterium* est issue d'un événement de transformation différent (Dhakulkar *et al.* , 2005). Les racines isolées dans notre expérimentation sont donc considérées comme des lignées distinctes.

Les racines qui présentent une forte croissance sont retenues, alors que celles qui présentent une faible croissance ou qui sont callogènes, sont systématiquement éliminées. Les lignées racinaires sont sélectionnées selon trois critères :

- Vitesse moyenne de croissance des racines (cm/jour) ;
- Longueur moyenne totale (cm) après 12 jours de culture ;
- Importance des ramifications.

VI Optimisation de la composition de la fraction minérale du milieu de culture

Les lignées racinaires sélectionnées à partir des différentes espèces étudiées sont mises en culture dans un milieu liquide. L'optimisation est réalisée dans des ballons à fond plat de 250 ml contenant 20 ml de milieu de culture. Le poids frais de l'inoculum est d'environ 0,01 g, la culture des chevelus racinaires est conduite dans les conditions suivantes : l'obscurité ; une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$; une vitesse d'agitation de 100 rpm et pendant 12 jours seulement.

Les paramètres étudiés sont :

Milieu de culture : Deux milieux de culture sont utilisés à savoir :

- Milieu MS dont les macroéléments et microéléments sont dilués : 1 fois MS, $\frac{3}{4}$ MS et $\frac{1}{2}$ MS.
- Milieu B5 (Tableau 4) dont les macroéléments et microéléments sont dilués : 1 fois B5, $\frac{3}{4}$ B5 et $\frac{1}{2}$ B5.

Concentration en azote : 100 mM, 75 mM et 50 mM. Le témoin étant le milieu B5 entier (25 mM en azote).

Concentration en calcium : 15 mM, 10 mM et 5 mM. Le témoin étant le milieu B5 entier (1 mM en calcium).

Le pH des milieux de culture utilisés est compris entre 5,6 et 5,8. Les milieux de culture sont additionnés de 20 g/l de saccharose.

L'interprétation des résultats est fonction de la biomasse (poids frais et sec) des chevelus racinaires et de leurs contenus alcaloïdiques. Le poids sec est obtenu après séchage dans l'étuve à 60°C pendant 48 heures.

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

Tableau 4 : Composition chimique du milieu B5 (Gamborg et al., 1968)

VII Essai d'optimisation de l'élicitation de la biomasse et du contenu alcaloïdique

Des extrémités de racines non ramifiées d'environ 2 cm obtenues de la transformation de l'espèce *Datura tatula* sont introduites dans des boîtes de Pétri contenant environ 20 ml de milieu de culture B5 semi-solide (4 g/l d'agar) de pH entre 5,6 et 5,8 et additionné de 20 g/l de saccharose.

Les travaux de **Sandoval-Yepiz** (2004) sur l'effet de l'acide salicylique sur la biomasse des racines de *Tagetes erecta* nous ont inspiré et nous avons testé, comme éliciteurs de la biomasse et du contenu alcaloïdique des chevelus racinaires, trois acides avec quatre concentrations différentes à savoir :

- L'acide salicylique (AS) avec les concentrations : 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M ;
- L'acide acétylsalicylique (AAS) : 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M ;
- L'acide jasmonique (AJ) : 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M.

Le témoin étant le milieu de culture B5 semi-solide sans éliciteur. Les paramètres mesurés, après 12 jours de culture dans l'obscurité, sont les poids frais et secs afin d'estimer l'effet des éliciteurs sur la croissance des chevelus racinaires. La teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires nous informe de l'effet des éliciteurs sur leur biosynthèse.

VIII Essai d'optimisation de la perméabilisation des chevelus racinaires

Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer les alcaloïdes dans le milieu de culture, différentes concentrations de Tween 20 (**Boitel-Conti et al.**, 1995) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Lee et al.**, 1998) comme agents de perméabilisation ont été utilisées.

Environ 0,05 g de chevelus racinaires sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml de milieu de culture B5. La culture est conduite dans l'obscurité avec une agitation à 100 rpm et à une température de 26 ± 1 °C.

Trois concentrations de Tween 20 (0,5%, 1% et 2%) et deux concentrations de peroxyde d'hydrogène (5mM et 10mM) ont été utilisées.

Pour chaque concentration, nous avons testés deux lots d'Erlenmeyers. Nous avons ajouté les agents de perméabilisation, pour le premier lot au moment de l'introduction du milieu avec le chevelu racinaire, et 24 heures avant de récolter le milieu de culture pour le deuxième lot.

Le témoin étant le milieu de culture B5 sans agent de perméabilisation. Après deux semaines de culture, le milieu de culture est récupéré. L'effet du Tween 20 et du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des chevelus racinaires est évalué par les poids frais et sec de ces derniers. Les alcaloïdes libérés par les chevelus racinaires sont extraits à partir du milieu de culture.

IX Essai de production d'alcaloïdes en système de culture continu

Notre travail consiste à proposer un système de culture de chevelus racinaires en semi-continu inspiré des bioréacteurs cités dans la littérature (**Kim et al.**, 2002¹ ; **Kim et al.**, 2003 ; **Kondo et al.**, 1989 ; **Srivastava et Srivastava**, 2007).

Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer les alcaloïdes dans le milieu de culture, on ajoute au milieu de culture du tween 20 à 1% 24 heures avant de récupérer le milieu de

culture épuisé. Le milieu de culture est renouvelé chaque semaine et pendant 5 semaines successives à compter de la deuxième semaine de culture.

Notre système de culture est composé d'un bocal muni d'une grille posée au fond du bocal pour supporter le chevelu racinaire. Le tout est placé sur un agitateur-incubateur (Fig. 22) réglé à 100 rpm.

Nous avons introduit dans 100 ml de milieu de culture B5 environ 0,2 g de chevelus racinaires. Les conditions de culture sont l'obscurité et une température de 26 ± 1 °C.



Figure 22 : Système de culture en semi-continu (1 : Gr = 0,12 ; 2 : Gr = 0,42)

X Extraction des alcaloïdes tropaniques

1 Intracellulaire

Afin d'extraire les alcaloïdes intracellulaire nous avons adopté le protocole de **Amdoun et al. (2007)** basé sur le principe que, les alcaloïdes sont sous forme de sels dans une solution acide et sous forme organique dans une solution basique. Le protocole consiste en :

- Un broyage des chevelus racinaires (poids sec de 30 mg) dans une solution d'HCl 0,1 N (environ 15 ml y compris le rinçage du matériel du broyage) ;
- Agitation pendant 10 minutes ;
- Filtration suivie d'un rinçage avec la solution d'HCl ;
- Introduction du filtrat dans une ampoule à décanter après avoir alcalinisé jusqu'à pH d'environ 10 par une solution d'ammoniac (NH_3) ;

- Addition du chloroforme (CHCl_3) dans le rapport 1 : 1 en volume (solution alcaline : chloroforme) ; agitation sans former d'émulsion, puis après décantation, récupération de la phase organique ;
- Reprise de la dernière étape avec la phase aqueuse ;
- Mélanger les deux phases organiques puis séchage sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) ;
- Filtration et récupération de la phase organique dans une capsule ;
- Evaporation de la solution du chloroforme à l'aide d'un rotavapor.

2 Extracellulaire

Les alcaloïdes extracellulaires sont extraits par du chloroforme (20 ml de la solution nutritive + 40 ml du chloroforme). Ainsi, il faut successivement :

- Filtrer 20 ml de milieu de culture ;
- Alcaliniser jusqu'au pH 10 ;
- Epuiser la solution aqueuse deux fois par du chloroforme à volumes égaux ;
- Mélanger les deux phases organiques et les sécher sur sulfate de sodium anhydre ;
- Filtrer et récupérer la phase organique dans une capsule ;
- Evaporer la solution du chloroforme.

XI Dosage et identification des alcaloïdes

Le dosage et l'identification des alcaloïdes des lignées racinaires étudiées sont réalisés par chromatographie phase gazeuse (CPG).

Le résidu sec est repris dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2) puis filtré. Le filtrat est ensuite analysé par CPG. L'identification et le dosage des différents constituants de l'extrait sont effectués sur la base des caractéristiques des chromatogrammes obtenus (le temps de rétention et la surface du pic) par rapport à ceux des courbes d'étalonnage (alcaloïdes standards de la marque *Fluka* : Scopolamine hydrochloride ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \cdot \text{HCL}$) et Atropine ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$)). L'atropine étant un isomère de l'hyoscyamine, elle peut donc être utilisée comme standard pour identifier cette dernière (*Cieri et al., 2003*). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois répétitions.

L'appareil de l'analyse est un CHROMPACK CP9002, muni d'un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'une colonne capillaire DB1 (L = 30 m, \varnothing = 0,32 mm externe et 0,25 mm interne). L'azote est le gaz vecteur et l'hydrogène le gaz de combustion. La température de la colonne est réglée à 260 °C et celle du détecteur et de l'injecteur à 280°C.

XII Analyse statistique

L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA1) et à deux facteurs (ANOVA2) ainsi que le test de Tukey (classification en groupes homogènes) au seuil de 5% sont utilisés pour traiter

les résultats obtenus à l'aide du logiciel SPSS version 10.0, quant à la comparaison des pourcentages, elle est réalisée par le test de Khi-deux (X^2).

Pour chaque paramètre étudié, une analyse de la corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est réalisée.

Les moyennes suivies de la même (ou les mêmes) lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes.

Tous les graphes sont réalisés à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.0, les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5%. Les symboles * (5%), ** (1%), *** (0,1%) représentent le niveau de signification : significatif, hautement significatif et très hautement significatif respectivement.

Résultats et interprétations

I Germination des graines de *Datura*

Après six jours de culture, les taux de germination obtenus pour les différentes espèces de *Datura* étudiées sont regroupés dans le tableau 5. Ils varient de 69,87% à 97,59% respectivement pour *D. innoxia* et *Datura ferox*.

Espèces	Taux de germination (%)
<i>Datura stramonium</i>	75,90 ^B
<i>D. tatula</i>	92,85 ^A
<i>D. innoxia</i>	69,87 ^B
<i>D. ferox</i>	97,59 ^A

Tableau 5 : Taux de germination des graines de *Datura* sp

Le test de Khi-deux indique une différence significative des taux de germination des quatre espèces de *Datura* (annexe 1). La comparaison des moyennes révèle deux groupes homogènes (**A** : *D. tatula* et *D. ferox* ; **B** : *D. stramonium* et *D. innoxia*).

Les vitrosemis (Fig. 23) obtenus après deux mois de culture sont destinés à prélever les hypocotyles qui serviront à réaliser les transformations génétiques par l'*Agrobacterium rhizogenes*

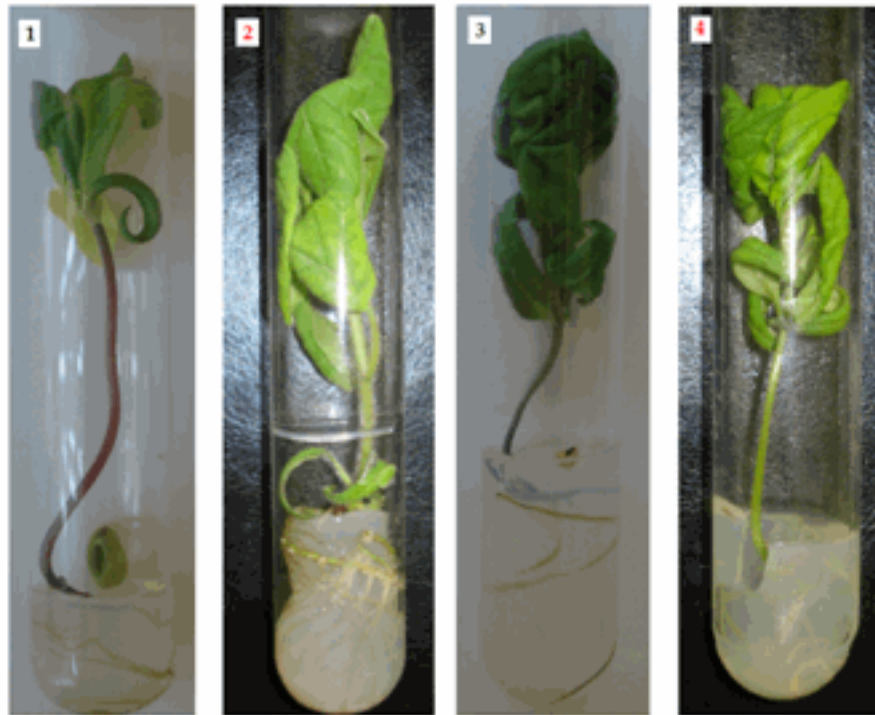


Figure 23 : vitrosemis de *Datura* sp âgés de 60 jours ($Gr = 0,94$)

1 : *Datura ferox* ; 2 : *D. innoxia* ; 3 : *D. tatula* ; 4 : *D. stramonium*

II Obtention des chevelus racinaires

1. Taux de réactivité

Après 6 à 10 jours de l'inoculation par la souche A4 d'*A. rhizogenes*, tous les explants forment un cal au niveau du site d'infection (Fig. 24). La réactivité est de 100 % pour les quatre espèces. De même, tous les explants témoins montrent le développement de cals.

2. Taux d'induction racinaire

Le test de Khi-deux indique une différence significative des taux d'induction sur les quatre espèces de *Datura* (annexe 1). La comparaison des moyennes révèle deux groupes homogènes (**A** : *D. tatula* et *D. stramonium* ; **B** : *D. ferox* et *D. innoxia*).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 6.

Espèces	Taux d'induction (%)
<i>Datura stramonium</i>	52,5 ^A
<i>D. tatula</i>	57,5 ^A
<i>D. innoxia</i>	15 ^B
<i>D. ferox</i>	27,5 ^B

Tableau 6 : Taux d'induction racinaire des explants de *Datura sp*

3. Temps moyens d'apparition de la première racine

Le temps moyen d'apparition de la première racine est de 26,3 jours pour *Datura stramonium*, de 18 jours pour *D. tatula*, de 17,5 jours pour *D. innoxia* et de 11,7 jours pour *D. ferox*.

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif de l'espèce pour le temps moyen d'apparition de la première racine ($p = 0,000$; annexe1). La comparaison des moyennes a permis de mettre en évidence trois groupes homogènes (**A** : *Datura ferox* ; **B** : *D. tatula* et *D. innoxia* ; **C** : *D. stramonium*).

4. Nombre moyen de racines par explant

Le nombre moyen de racines par explant est de 1,1 racines/explant pour *Datura stramonium*, 1,5 racines/explant pour *D. tatula*, 0,4 racines/explant pour *D. innoxia* et de 1,4 racines/explant pour *D. ferox*.

L'analyse de la variance montre un effet significatif de l'espèce pour ce paramètre ($p=0,012$; annexe1). La comparaison des moyennes montre deux groupes homogènes qui se chevauchent (**A** : *Datura tatula* et *D. ferox* ; **AB** : *D. stramonium* ; **B** : *D. innoxia*).

La figure 24 illustre la réactivité et l'aspect des racines induites sur fragments d'hypocotyles de vitrosemis de *Datura sp* par la souche A4 d'*A. rhizogenes*.

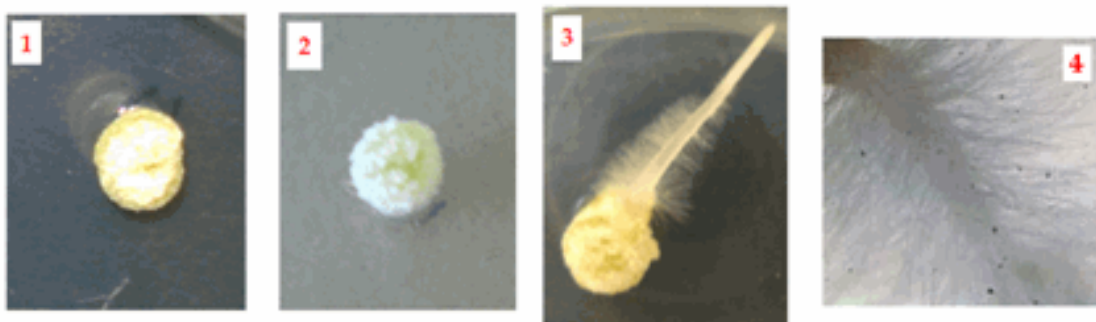


Figure 24 : Réactivité et aspects des racines induites sur *Datura sp* par *A. rhizogenes* (1, 2 et 3 : Gr = 2,54 ; 4 : Gr = 8,9) 1 : cal formé sur explant témoin ; 2 : cal formé sur explant induit par l'agrobactérie ; 3 : racine émergeant du site d'inoculation ; 4 : morphologie du chevelu racinaire.

III Sélection des lignées racinaires performantes

Les racines transformées présentent généralement une bonne croissance. Cependant une partie d'entre elles sont caractérisées par une faible croissance et/ou par la formation de calcs. Les racines exprimant ce phénotype ne sont donc pas sélectionnées.

De l'ensemble des racines transformées obtenues, 13 racines sont sélectionnées. Elles sont caractérisées par une bonne croissance sans formation de calcs. Les résultats de la longueur moyenne totale, de la vitesse de croissance moyenne et de la ramification des chevelus racinaires ; après 12 jours de culture sur milieu MS semi-solide ont permis de retenir 4 lignées racinaires, une de chaque espèce étudiée, pour la suite de notre travail (Tableau 7).

	Longueur totale (cm)	Vitesse moyenne de croissance (cm/jour)	Ramification
<i>Datura stramonium</i>			
- DS 02	11,16 ± 1,25	0,93	Ramifiée
- DS 07	7,33 ± 1,52	0,61	Peu ramifiée
- DS 18	11,83 ± 0,76	0,98	Ramifiée
- DS 29	7,00 ± 1,00	0,58	Peu ramifiée
<i>D. tatula</i>			
- DT 06	5,83 ± 0,76	0,48	Peu ramifiée
- DT 10	12,83 ± 0,76	1,07	Très ramifiée
- DT 20	8,83 ± 0,29	0,73	Peu ramifiée
- DT 34	9,53 ± 0,57	0,79	Ramifiée
<i>D. innoxia</i>			
- DI 02	9,83 ± 1,25	0,82	Ramifiée
- DI 03	12,16 ± 0,29	1,01	Ramifiée
<i>D. ferox</i>			
- DF 11	12,66 ± 0,57	1,05	Peu ramifiée
- DF 17	7,00 ± 0,50	0,58	Peu ramifiée
- DF 40	8,66 ± 0,57	0,72	Peu ramifiée

Tableau 7 : Lignées racinaires sélectionnées après 12 jours de culture sur milieu MS.

Ainsi, les quatre lignées racinaires retenues (Fig. 25) pour la suite du travail sont : DF11, DI3, DS18, et DT10.

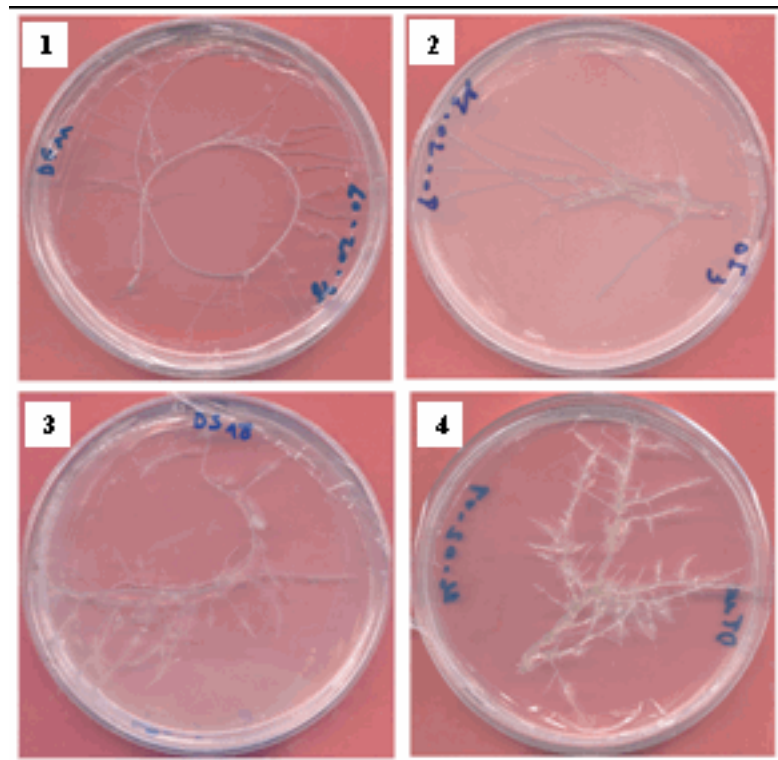


Figure 25 : Lignées racinaires retenues, après 12 jours de culture sur milieu MS ($Gr = 0,53$). 1 : DF11 ; 2 : DI3 ; 3 : DS18 ; 4 : DT10

IV Effet de la composition du milieu de culture sur la biomasse et le contenant alcaloïdique

1. Milieu MS

Le tableau 8 ci-dessous regroupe les résultats de la biomasse moyenne (poids frais et poids sec) et de la teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires obtenus après 12 jours de culture.

		Milieu MS		
		1 fois	3/4	1/2
DT 10	P.F.	1,967 ± 0,381 ^{A/a}	1,288 ± 0,115 ^{A/b}	0,867 ± 0,046 ^{A/c}
	P.S.	0,107 ± 0,009 ^{A/a}	0,055 ± 0,007 ^{A/b}	0,031 ± 0,004 ^{A/c}
	T. H.	2,585 ± 0,175 ^{A/b}	2,484 ± 0,224 ^{A/b}	2,359 ± 0,158 ^{A/a}
DS 18	P.F.	1,170 ± 0,228 ^{B/a}	0,872 ± 0,141 ^{B/b}	0,380 ± 0,047 ^{B/c}
	P.S.	0,052 ± 0,008 ^{B/a}	0,031 ± 0,007 ^{B/b}	0,014 ± 0,002 ^{B/c}
	T. H.	2,408 ± 0,125 ^{A/b}	3,009 ± 0,168 ^{A/a}	2,532 ± 0,088 ^{A/b}
DI 03	P.F.	1,245 ± 0,301 ^{B/a}	0,692 ± 0,037 ^{B/b}	0,463 ± 0,027 ^{B/c}
	P.S.	0,055 ± 0,010 ^{B/a}	0,023 ± 0,006 ^{B/b}	0,017 ± 0,003 ^{B/c}
	T. H.	1,308 ± 0,195 ^{B/a}	1,090 ± 0,274 ^{B/a/b}	0,634 ± 0,081 ^{B/b}
DF 11	P.F.	0,201 ± 0,056 ^{C/a}	0,144 ± 0,008 ^{C/b}	0,123 ± 0,009 ^{C/b}
	P.S.	0,014 ± 0,002 ^{C/a}	0,009 ± 0,001 ^{C/b}	0,005 ± 0,001 ^{C/c}

Tableau 8 : Effet de la concentration du milieu MS sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires produits par les quatre lignées sélectionnées.

Lettre en majuscule : classification en groupes homogènes des lignées racinaires (colonne).

Lettre en minuscule : classification en groupes homogènes des concentrations du milieu de culture (ligne).

P.F. : Poids frais exprimé en g/20ml de milieu de culture.

P.S. : Poids sec exprimé en g/20ml de milieu de culture.

T.H. : Teneur en hyoscyamine exprimée mg/g de matière sèche.

Après 12 jours de culture sous agitation des quatre lignées racinaires retenues cultivées dans le milieu MS à différentes concentrations (1 fois, $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{2}$ MS), les poids secs les plus importants sont obtenus avec le milieu MS entier (Planche : 1). La lignée DT10 donne le poids sec le plus intéressant pour les trois concentrations du milieu MS (Fig. 26). En effet, l'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) révèle un effet très hautement significatif de la concentration du milieu MS utilisées et la lignée racinaires.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les résultats de la biomasse montre trois groupes homogènes (**A** : DT10 ; **B** : DS18 et DI3 et **C** : DF11) pour chacune des concentrations du milieu MS utilisées. Ce même test dévoile trois groupes homogènes (**a** : 1 fois MS ; **b** : $\frac{3}{4}$ MS et **c** : $\frac{1}{2}$ MS) pour chacune des lignées racinaires sélectionnées.

Contrairement à la biomasse, la teneur en hyoscyamine (Fig. 27) la plus importante est obtenue avec la lignée DS18 (groupe homogène **A/a**) dans le milieu $\frac{3}{4}$ MS. L'analyse de la

variance à deux facteurs (annexe 2) confirme en effet cette observation et elle révèle un effet très hautement significatif de la concentration du milieu MS et de la lignée racinaire.

Vue la faible biomasse obtenue, dans les différentes concentrations du milieu MS pour la lignée DF11, le dosage de l'hyoscyamine n'est pas réalisé. Pour les trois autres lignées retenues, le test de Tukey révèle, en considérant les lignées racinaires, les groupes homogènes suivants :

- Pour la DT10 : Deux groupes homogènes ; **a** : ½ MS et **b** : 1 fois MS et ¾ MS ;
- DS18 : Deux groupes homogènes ; **a** : ¾ MS et **b** : 1 fois MS et ½ MS ;
- DI3 : Deux groupes homogènes qui se chevauchent à savoir : **a** : 1 fois MS et **b** : ½ MS et un groupe intermédiaire **ab** : ¾ MS.

La comparaison des moyennes des teneurs en alcaloïdes en utilisant le test de Tukey et en tenant compte des trois concentrations du milieu MS montre les groupes homogènes suivants :

- Pour le milieu MS entier : deux groupe homogènes ; **A** : DT10 et DS18 et **B** : DI3 ;
- ¾ MS : deux groupe homogènes ; **A** : DT10 et DS18 et **B** : DI3 ;
- ½ MS : deux groupe homogènes ; **A** : DT10 et DS18 et **B** : DI3.

La corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est négative pour les deux lignées DT10 et DS18, elle est positive pour la lignée DI3 (Fig. 28).

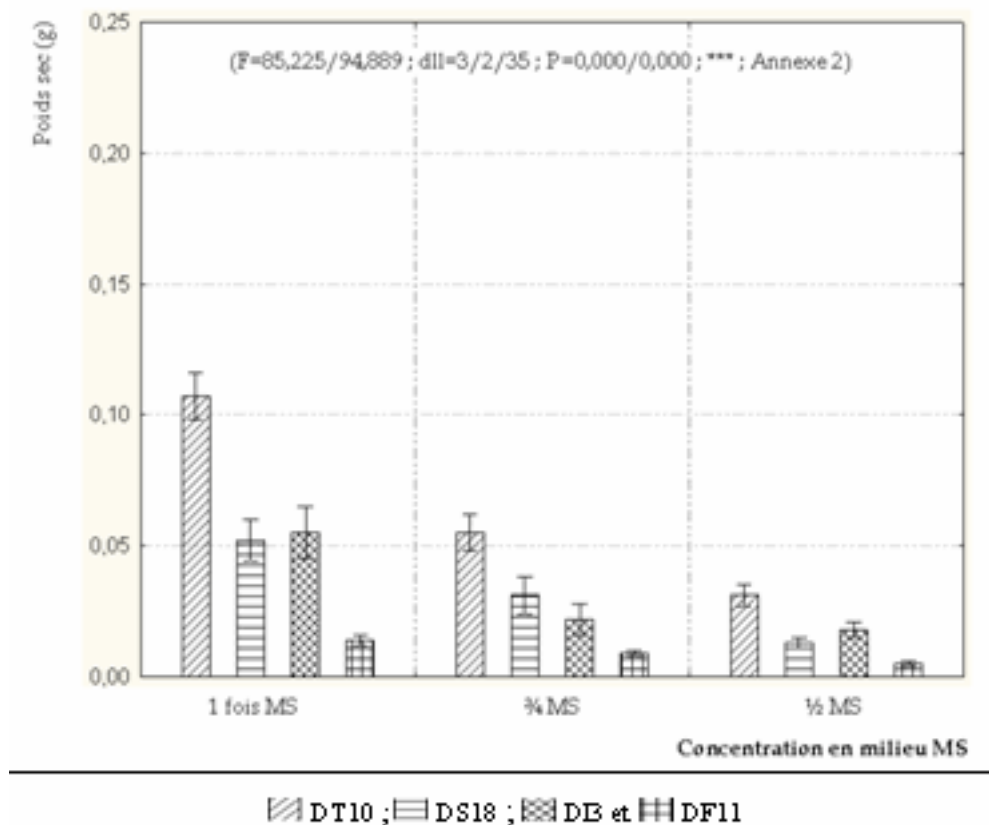


Figure 26 : Effet de la concentration du milieu MS sur la biomasse des chevelus racinaires

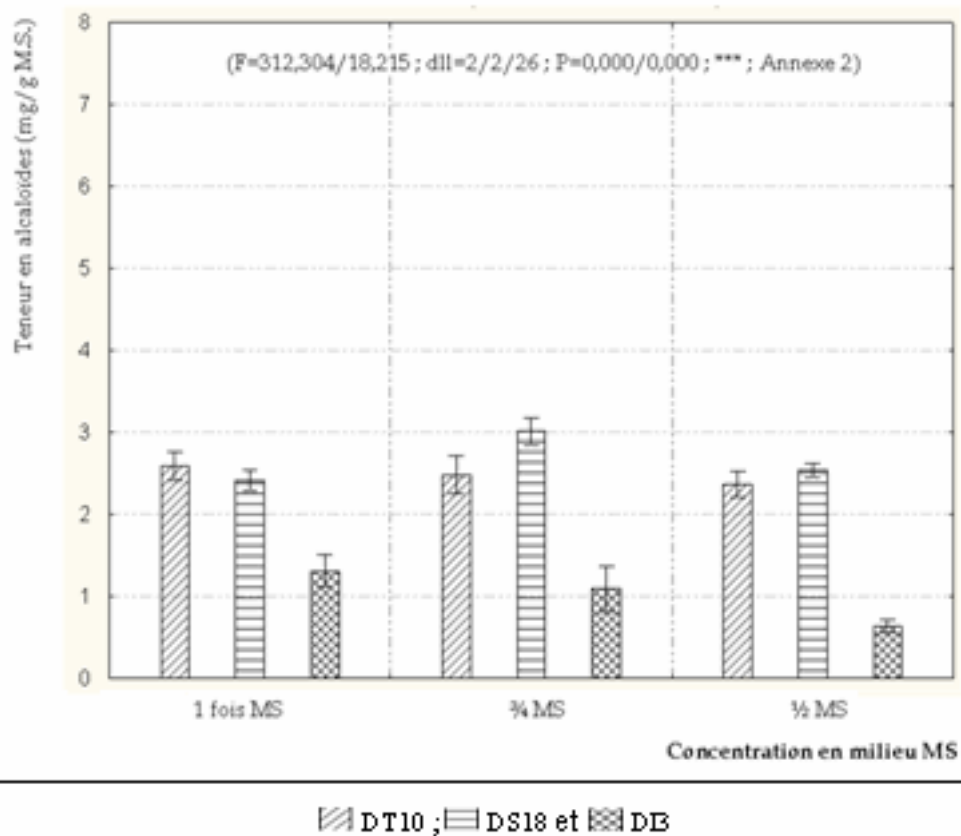


Figure 27 : Effet de la concentration du milieu MS sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires

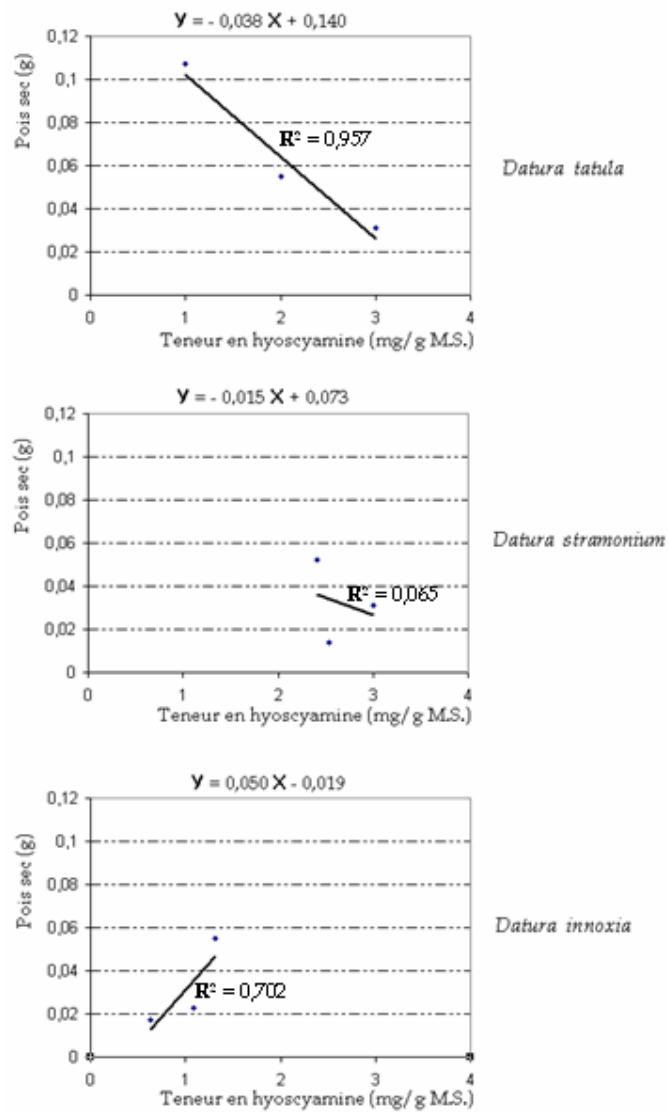


Figure 28 : Corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine sur milieu MS.

2.Milieu B5

Les résultats de l'influence de concentration du milieu B5 sur les poids frais et secs (Planche : 1) et sur la teneur moyenne en alcaloïdes des quatre lignées racinaires sélectionnées sont consignés dans le tableau 9.

		Milieu B5		
		1 fois	3/4	1/2
DT 10	P.F.	2,466 ± 0,115 ^{AA}	1,867 ± 0,072 ^{Ab}	1,503 ± 0,141 ^{Ac}
	P.S.	0,123 ± 0,005 ^{AA}	0,093 ± 0,004 ^{Ab}	0,075 ± 0,009 ^{Ac}
	T.H.	2,949 ± 0,389 ^{Ac}	4,214 ± 0,309 ^{Ab}	6,721 ± 0,431 ^{AA}
DS 18	P.F.	1,624 ± 0,064 ^{Ba}	0,741 ± 0,079 ^{Cb}	0,618 ± 0,005 ^{Bb}
	P.S.	0,078 ± 0,003 ^{Ba}	0,035 ± 0,004 ^{Cb}	0,029 ± 0,001 ^{Bb}
	T.H.	1,409 ± 0,201 ^{Bb}	3,611 ± 0,511 ^{AA}	1,878 ± 0,168 ^{Cb}
DI 03	P.F.	1,238 ± 0,003 ^{Ca}	1,021 ± 0,015 ^{Bb}	0,636 ± 0,116 ^{Bc}
	P.S.	0,063 ± 0,000 ^{Ca}	0,051 ± 0,001 ^{Bb}	0,032 ± 0,006 ^{Bc}
	T.H.	2,469 ± 0,289 ^{Ab}	4,178 ± 0,299 ^{AA}	3,028 ± 0,065 ^{Bb}
DF 11	P.F.	0,225 ± 0,008 ^{Da}	0,207 ± 0,006 ^{Db}	0,181 ± 0,008 ^{Cc}
	P.S.	0,012 ± 0,001 ^{Da}	0,011 ± 0,001 ^{Db}	0,009 ± 0,001 ^{Cc}

Tableau 9 : Effet de la concentration du milieu B5 sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires.

Lettre en majuscule : classification en groupes homogènes des lignées racinaires (colonne).

Lettre en minuscule : classification en groupes homogènes des concentrations du milieu de culture (ligne).

P.F. : Poids frais exprimé en g/20ml de milieu de culture.

P.S. : Poids sec exprimé en g/20ml de milieu de culture.

T.H. : Teneur en hyoscyamine exprimée mg/g de matière sèche.

Les résultats montre qu'au bout de 12 jours de culture, pour les quatre lignées racinaires retenues en présence de différentes concentrations du milieu B5 liquide (1fois, $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{2}$ B5), les poids secs les plus importants (Fig. 29) sont obtenus avec le milieu B5 entier. On a obtenu avec la lignée racinaire DT10 les poids secs les plus intéressants pour les trois concentrations du milieu B5 étudiées. En effet, l'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) révèle des effets très hautement significatifs de la concentration du milieu B5 et de la lignée racinaire.

Le test de Tukey concernant la biomasse révèle en considérant les concentrations du milieu B5, trois groupes homogènes pour la lignée DT10 (**a** : 1 fois B5 ; **b** : $\frac{3}{4}$ B5 et **c** : $\frac{1}{2}$ B5), deux groupes homogènes pour la lignée DS18 (**a** : B5 entier et **b** : $\frac{3}{4}$ B5 et $\frac{1}{2}$ B5) et trois groupes homogènes pour les lignées DI3 et DF11. En tenant compte des lignées racinaires sélectionnées, ce même test montre que la lignée DT10 est le groupe homogène le plus intéressant (**A**) et ce quelque soit la concentration du milieu B5 (1 fois B5, $\frac{3}{4}$ B5 et $\frac{1}{2}$ B5).

L'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) montre des effets très hautement significatifs des deux facteurs testés (concentration du milieu B5 et lignée racinaire) sur la teneur en alcaloïde (Fig. 30). La biomasse obtenue dans le milieu ½ B5 avec la lignée DT10 est significativement plus faible que celles obtenues dans les milieux B5 entier et ¾ B5, mais la teneur en hyoscyamine enregistrée dans le milieu ½ B5 pour cette lignée est la plus importante et elle correspond au groupe homogène le plus intéressant (**A/a**) toutes lignées et toutes concentrations (1fois B5, ¾ B5 et ½ B5) confondues.

Vue la faible biomasse obtenue, avec les différentes concentrations du milieu B5, pour la lignée DF11, le dosage de la hyoscyamine n'est pas réalisé. Pour les trois autres lignées retenues, en considérant les lignées racinaires, le test de Tukey révèle, les groupes homogènes suivants :

- Pour DT10 : trois groupes homogènes ; **a** : ½ B5, **b** : ¾ B5 et **c** ; 1 fois B5 ;
- DS18 : trois groupes homogènes ; **a** : ¾ B5, **b** : ½ B5 et **c** ; 1 fois B5 ;
- DI3 : Deux groupes homogènes à savoir : **a** : ¾ B5 et **b** : 1 fois B5 et ½ B5.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey et en tenant compte des différentes concentrations du milieu B5 montre les groupes homogènes suivants :

- Pour le milieu B5 entier : deux groupes homogènes ; **A** : DT10 et DI3 et **B** : DS18 ;
- ¾ B5 : un groupe homogène ; **A** : DT10, DS18 et DI3 ;
- ½ B5 : trois groupes homogènes ; **A** : DT10, **B** : DI3 et **C** : DS18.

La corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est négative pour l'ensemble des lignées étudiées (DT10, DS18 et DI3) (Fig. 31).

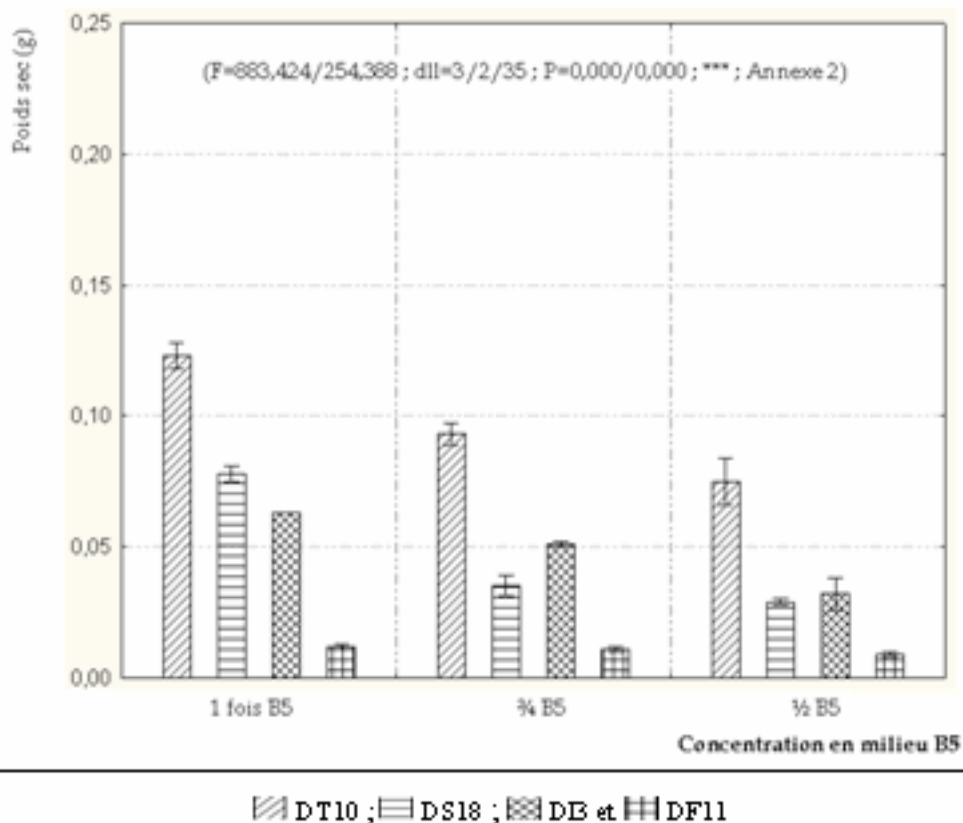
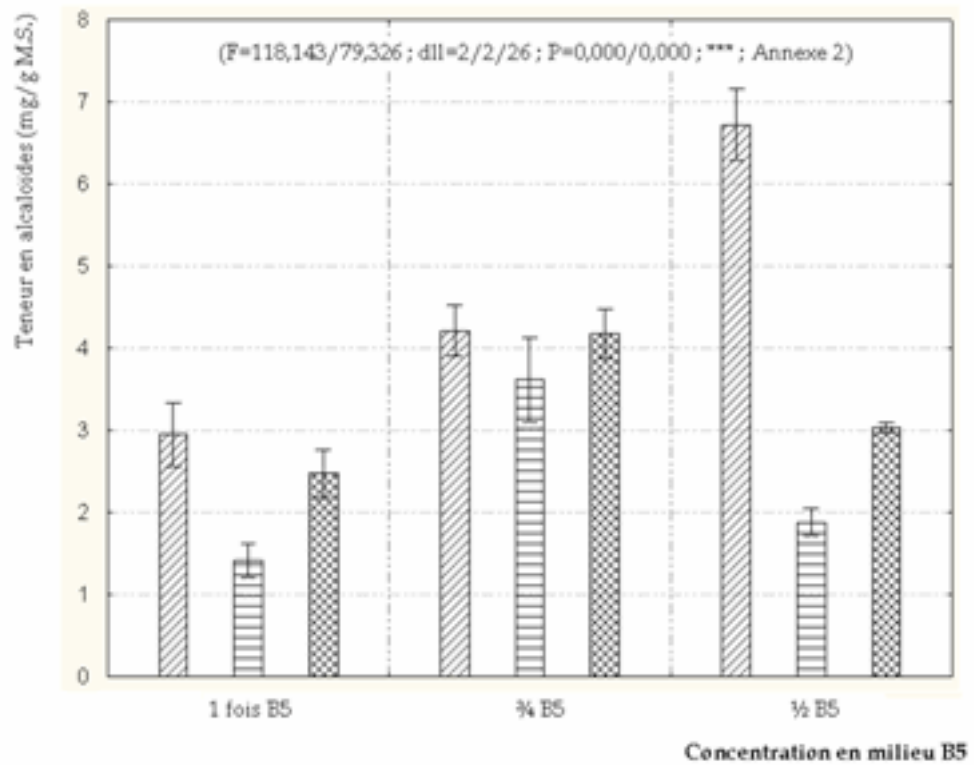


Figure 29 : Effet de la concentration du milieu B5 sur la biomasse des chevelus racinaires



DT10 ; DS18 et DE

Figure 30 : Effet de la concentration du milieu B5 sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires

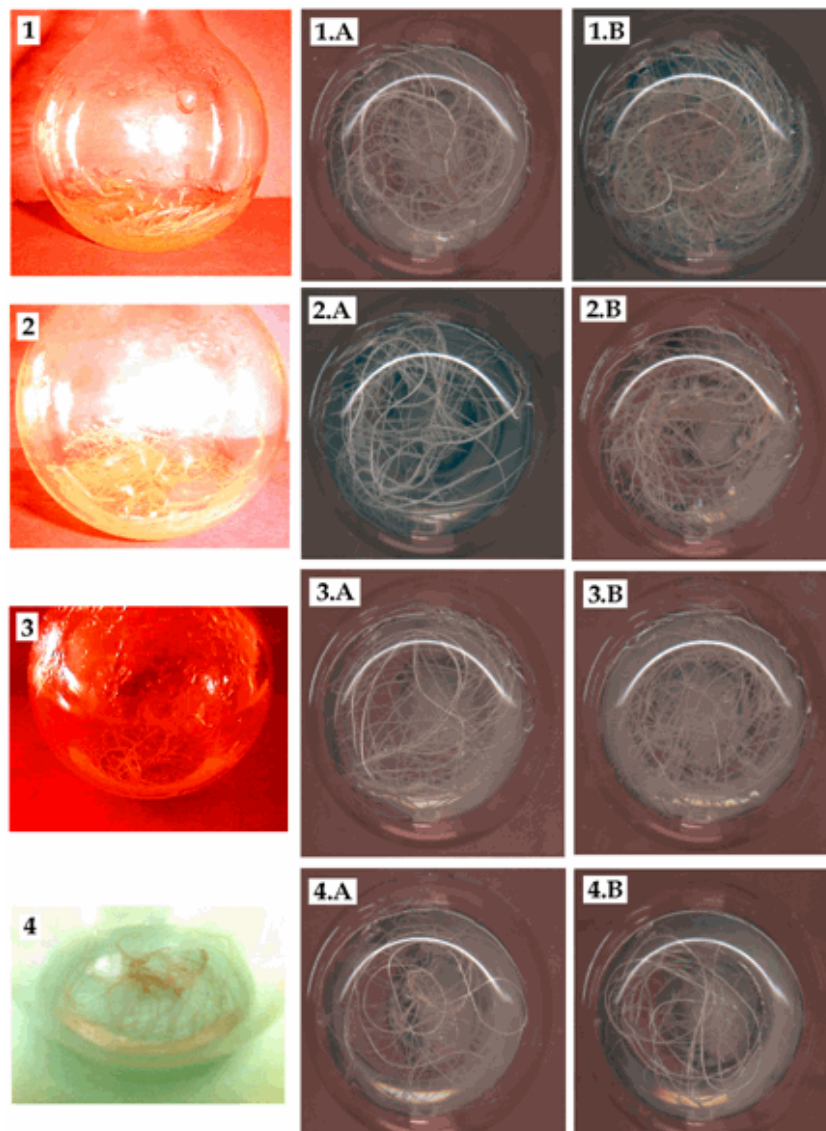


Figure 31 : Corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine sur milieu B5.

1 : DT10, 2 : DS18, 3 : DI3 et 4 : DF11

A : développement des chevelus racinaires sur milieu MS.

B : développement des chevelus racinaires sur milieu B5

3.Effet de la concentration en azote

Le milieu B5 entier a servi pour l'étude de l'effet de la concentration de l'azote sur la biomasse et la teneur en hyoscyamine des lignées racinaires sélectionnées.

Le tableau 10 regroupe les résultats de la biomasse et de la teneur en alcaloïde des chevelus racinaires obtenus après 12 jours de culture.

		Concentration en azote (mM) dans le milieu B5		
		50	75	100
DT 10	P.F.	2,819 ± 0,239 ^{Aa}	3,735 ± 0,028 ^{Aa}	3,098 ± 0,074 ^{Ab}
	P.S	0,155 ± 0,013 ^{Aa}	0,205 ± 0,002 ^{Aa}	0,175 ± 0,009 ^{Ab}
	T.H.	1,024 ± 0,168 ^{Bb}	0,855 ± 0,085 ^{Bb}	2,264 ± 0,255 ^{Aa}
DS 18	P.F.	1,734 ± 0,056 ^{Bb}	1,923 ± 0,059 ^{Ba}	1,257 ± 0,046 ^{Cc}
	P.S	0,095 ± 0,003 ^{Bb}	0,106 ± 0,003 ^{Ba}	0,069 ± 0,003 ^{Cc}
	T.H.	0,379 ± 0,038 ^{Cb}	1,754 ± 0,188 ^{Aa}	1,479 ± 0,199 ^{Ba}
DI 03	P.F.	1,346 ± 0,030 ^{Cb}	1,608 ± 0,103 ^{Ca}	1,410 ± 0,081 ^{Bb}
	P.S.	0,074 ± 0,002 ^{Cb}	0,088 ± 0,006 ^{Ca}	0,078 ± 0,005 ^{Bb}
	T.H.	1,885 ± 0,116 ^{Aa}	1,829 ± 0,229 ^{Aa}	1,724 ± 0,421 ^{ABa}
DF 11	P.F.	0,227 ± 0,021 ^{Dc}	0,334 ± 0,042 ^{Db}	0,474 ± 0,064 ^{Da}
	P.S.	0,013 ± 0,001 ^{Dc}	0,018 ± 0,003 ^{Db}	0,026 ± 0,003 ^{Da}

Tableau 10 : Effet de différentes concentrations en azote dans le milieu B5 sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires.

Lettre en majuscule : classification en groupes homogènes des lignées racinaires (verticale).

Lettre en minuscule : classification en groupes homogènes des concentrations en azote du milieu de culture (horizontale).

P.F. : Poids frais exprimé en g/20ml de milieu de culture.

P.S. : Poids sec exprimé en g/20ml de milieu de culture.

T.H. : Teneur en hyoscyamine exprimée mg/g de matière sèche.

Au terme de la culture, l'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) révèle un effet très hautement significatif de la concentration de l'azote utilisé dans le milieu B5 sur la biomasse des chevelus racinaires. Les poids secs les plus importants (Fig. 32) sont obtenus avec la concentration 75 mM sauf pour la lignée DF11 où la concentration 100 mM c'est révélée plus efficace.

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les moyennes de la biomasse montre, considérant les concentrations de l'azote dans le milieu B5 les résultats suivants :

- Pour DT10 : trois groupes homogènes (**a** : 75mM, **b** : 100mM et **c** : 50mM) ;
- Pour DS18 : trois groupes homogènes (**a** : 75mM, **b** : 50mM et **c** : 100mM) ;
- Pour DI3 : deux groupes homogènes (**a** : 75mM, **b** : 50mM et 100mM) ;
- Pour DF11 : trois groupes homogènes (**a** : 100mM, **b** : 75mM et **c** : 50mM).

En tenant compte des lignées racinaires sélectionnées :

- 50mM : quatre groupes homogènes (**A** : DT10, **B** : DS18, **C**:DI3 et **D** : DF11) ;
- 75mM : quatre groupes homogènes (**A** : DT10, **B** : DS18, **C**:DI3 et **D** : DF11) ;
- 100mM : quatre groupes homogènes (**A** : DT10, **B**:DI3, **C**:DS18 et **D** : DF11).

L'effet de la concentration de l'azote utilisé s'est révélé aussi très hautement significatif (annexe 2) sur le contenu alcaloïdique des lignées racinaires retenues (Fig. 33). L'interaction la plus intéressante (concentration d'azote * lignée racinaire) est obtenue avec la lignée DT10 et la concentration 100mM.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey (au seuil $\alpha=5\%$) a révélé les groupes homogènes suivants :

- Considérant les concentrations de l'azote dans le milieu B5 :
- Pour DT10 : deux groupes homogènes (**a** : 100mM et **b** : 75mM et 50mM) ;
- Pour DS18 : deux groupes homogènes (**a** : 75mM et 100mM et **b** : 50mM) ;
- Pour DI3 : un groupe homogène (**a** : 50mM, 75mM et 100mM) ;

En tenant compte des lignées racinaires sélectionnées :

- Pour 50mM : trois groupes homogènes (**A** : DI3, **B** : DT10 et **C**: DS18) ;
- Pour 75mM : deux groupes homogènes (**A** : DS18 et DI3 et **B** : DT10) ;
- Pour 100mM : deux groupes chevauchants (**A** : DT10, **AB** : DI3 et **B**: DS18).

La corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est négative pour l'ensemble des lignées étudiées (DT10, DS18 et DI3) (Fig. 34).

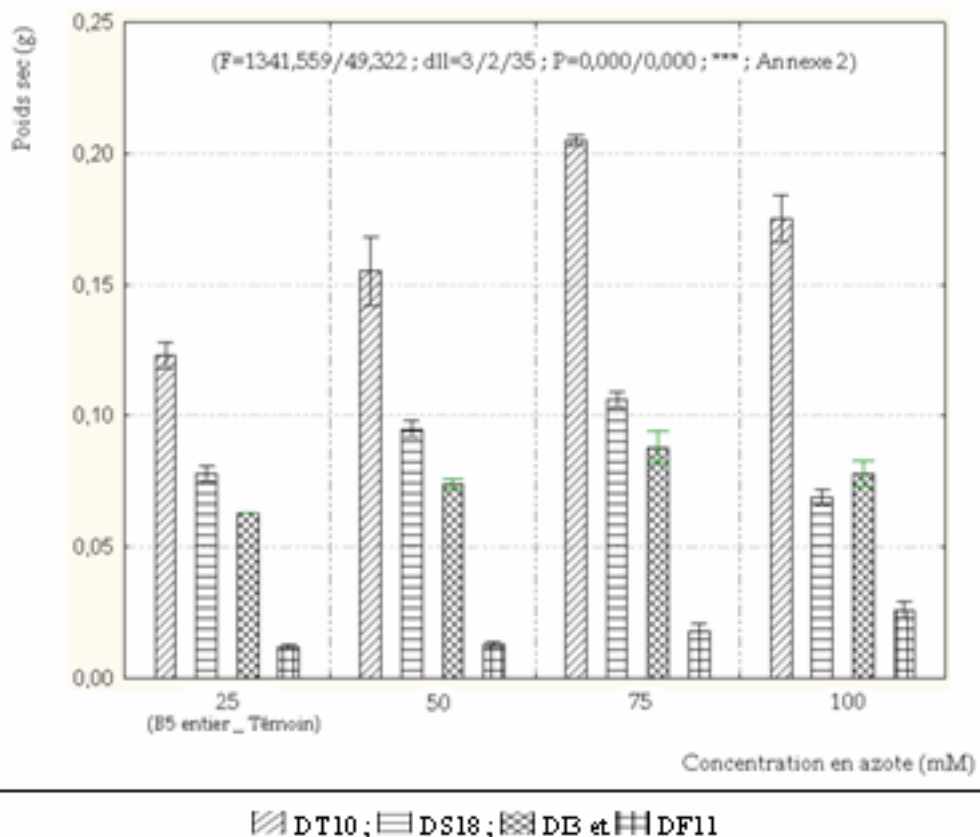


Figure 32 : Effet de la concentration en azote sur la biomasse des chevelus racinaires

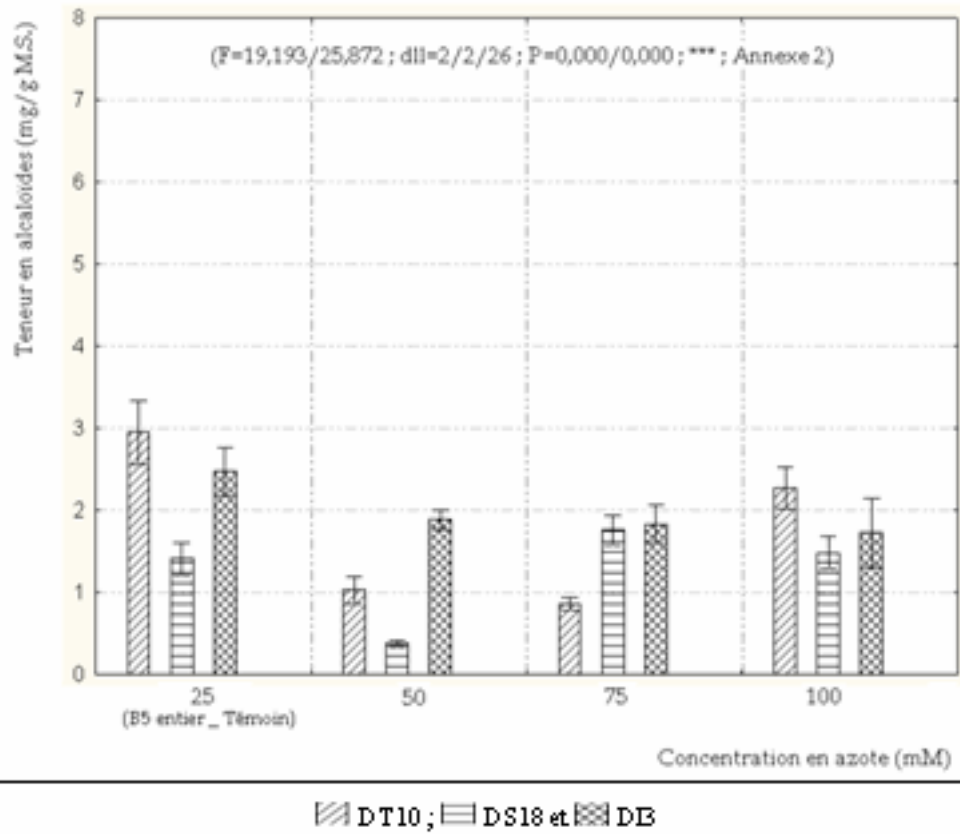


Figure 33 : Effet de la concentration en azote sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires

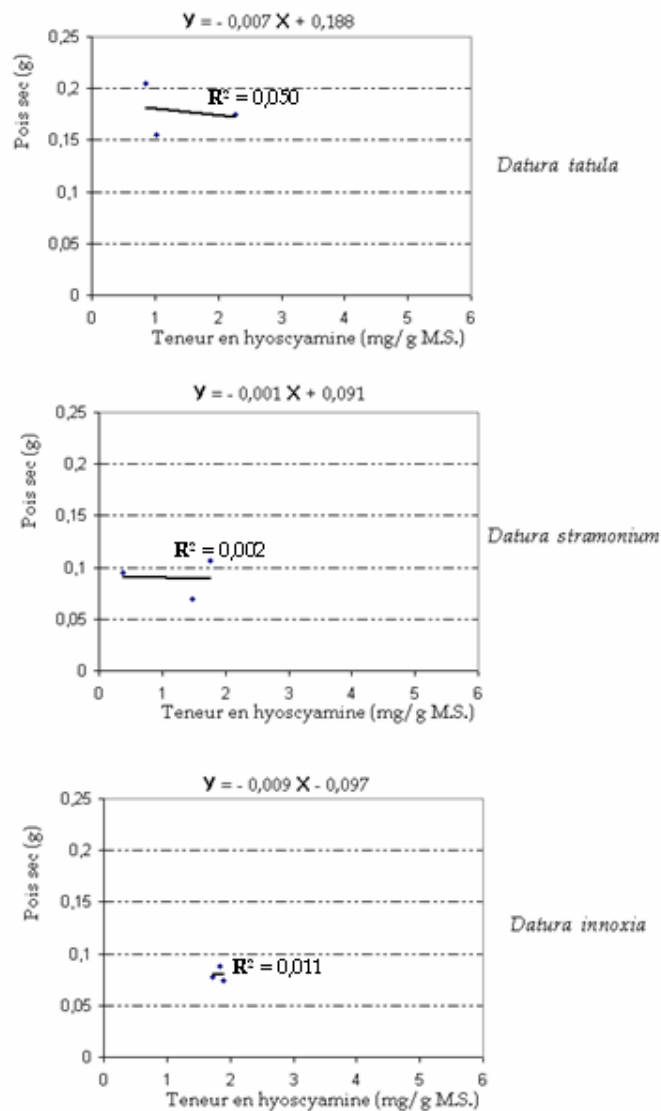


Figure 34 : Corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine en fonction de la concentration en azote.

4.Effet de la concentration en calcium

Le milieu B5 entier a servi pour l'étude de l'effet de la concentration du calcium sur la biomasse et la teneur en hyoscyamine des lignées racinaires sélectionnées.

Les résultats de l'influence de la concentration en calcium sur les poids frais et secs et sur la teneur moyenne en alcaloïdes des quatre lignées racinaires sélectionnées sont regroupés dans le tableau 11.

		Concentration en calcium (mM) dans le milieu B5		
		5	10	15
DT 10	P.F.	2,564 ± 0,063 ^{Aa}	2,712 ± 0,059 ^{Aa}	1,780 ± 0,172 ^{Ab}
	P.S.	0,154 ± 0,004 ^{Aa}	0,163 ± 0,004 ^{Aa}	0,107 ± 0,010 ^{Ab}
	T.H.	5,794 ± 0,281 ^{Aa}	3,074 ± 0,179 ^{ABb}	3,231 ± 0,178 ^{Ab}
DS 18	P.F.	1,653 ± 0,050 ^{Bb}	1,892 ± 0,101 ^{Ba}	1,551 ± 0,069 ^{Ab}
	P.S.	0,099 ± 0,003 ^{Bb}	0,114 ± 0,006 ^{Ba}	0,093 ± 0,004 ^{Ab}
	T.H.	4,228 ± 0,239 ^{Ba}	3,531 ± 0,424 ^{Aa}	2,509 ± 0,398 ^{Ab}
DI 03	P.F.	1,393 ± 0,007 ^{Cb}	1,456 ± 0,015 ^{Cb}	1,596 ± 0,017 ^{Aa}
	P.S.	0,084 ± 0,001 ^{Cb}	0,087 ± 0,001 ^{Cb}	0,096 ± 0,001 ^{Aa}
	T.H.	1,161 ± 0,283 ^{Cb}	2,458 ± 0,105 ^{Bb}	3,129 ± 0,414 ^{Aa}
DF 11	P.F.	0,255 ± 0,020 ^{Db}	0,317 ± 0,012 ^{Da}	0,333 ± 0,014 ^{Ba}
	P.S.	0,015 ± 0,002 ^{Db}	0,019 ± 0,001 ^{Da}	0,020 ± 0,001 ^{Ba}

Tableau 11 : Effet de la concentration en calcium sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires.

Lettre en majuscule : classification en groupes homogènes des lignées racinaires (colonne).

Lettre en minuscule : classification en groupes homogènes des concentrations en calcium du milieu de culture (ligne).

P.F. : Poids frais exprimé en g/20ml de milieu de culture.

P.S. : Poids sec exprimé en g/20ml de milieu de culture.

T.H. : Teneur en hyoscyamine exprimée mg/g de matière sèche.

Les poids secs obtenus avec les lignées racinaires sélectionnées en fonction des concentrations du calcium dans le milieu B5 (Fig. 35) varient de 0,015 g obtenu avec la lignée DF11 à la concentration en calcium de 5mM (étant le résultat plus faible) à 0,163 g obtenu avec la lignée DT10 à la concentration en calcium de 10mM (étant le résultat le plus intéressant). En effet, l'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) révèle des effets très hautement significatifs de la concentration du calcium utilisé dans le milieu et de la lignée racinaire.

Le test de Tukey montre pour la biomasse en considérant les différentes concentrations de calcium dans le milieu B5, deux groupes homogènes pour la lignée DT10 (**a** : 5 et 10mM et **b** : 15mM), deux groupes homogènes pour la lignée DS18 (**a** : 10mM et **b** : 5 et 15 mM), deux groupes homogènes pour la lignée DI3 (**a** : 15mM et **b** : 5 et 10 mM) et deux groupes homogènes pour la lignée DF11 (**a** : 10 et 15mM et **b** : 5 mM). Cependant, En tenant compte de la lignée racinaire, ce même test montre que la lignée DT10 est le groupe homogène le

plus intéressant (**A**) et cela pour les concentrations du calcium de 5 et 10 mM. Par contre pour la concentration du calcium de 15 mM dans le milieu B5, il n'existe pas de différence significative de la biomasse entre les lignées DT10, DS18 et DI3, elles appartiennent au même groupe homogène (**A**).

Vu la faible biomasse obtenue avec les différentes concentrations de calcium dans le milieu B5 pour la lignée DF11, le dosage de la hyoscyamine n'est pas réalisé. L'analyse de la variance à deux facteurs (annexe 2) révèle un effet très hautement significatif de la lignée sur la teneur en hyoscyamine (Fig. 36). Le test de Tukey réalisé sur leur contenu alcaloïdique révèle les groupes homogènes suivants :

- Pour DT10 : Deux groupes homogènes ; **a** : 5mM et **b** : 10 et 15mM ;
- Pour DS18 : Deux groupes homogènes ; **a** : 5 et 10mM et **b** : 15 mM ;
- Pour DI3 : trois groupes homogènes : **a** : 15 mM, **b** : 10mM et **c** : 5mM.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey et en considérant les différentes concentrations de calcium dans le milieu B5 montre les groupes homogènes suivants :

- Pour 5mM : trois groupes homogènes ; **A** : DT10, **B** : DS18 et **C** : DI3 ;
- Pour 10 mM : deux groupes homogènes qui se chevauchent ; **A** : DS18, **AB** : DT10 et **B** : DI3 ;
- Pour 15mM : un groupe homogène ; **A** : DT10, DS18 et DI3.

La corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est positive pour l'ensemble des lignées étudiées (DT10, DS18 et DI3) (Fig. 37).

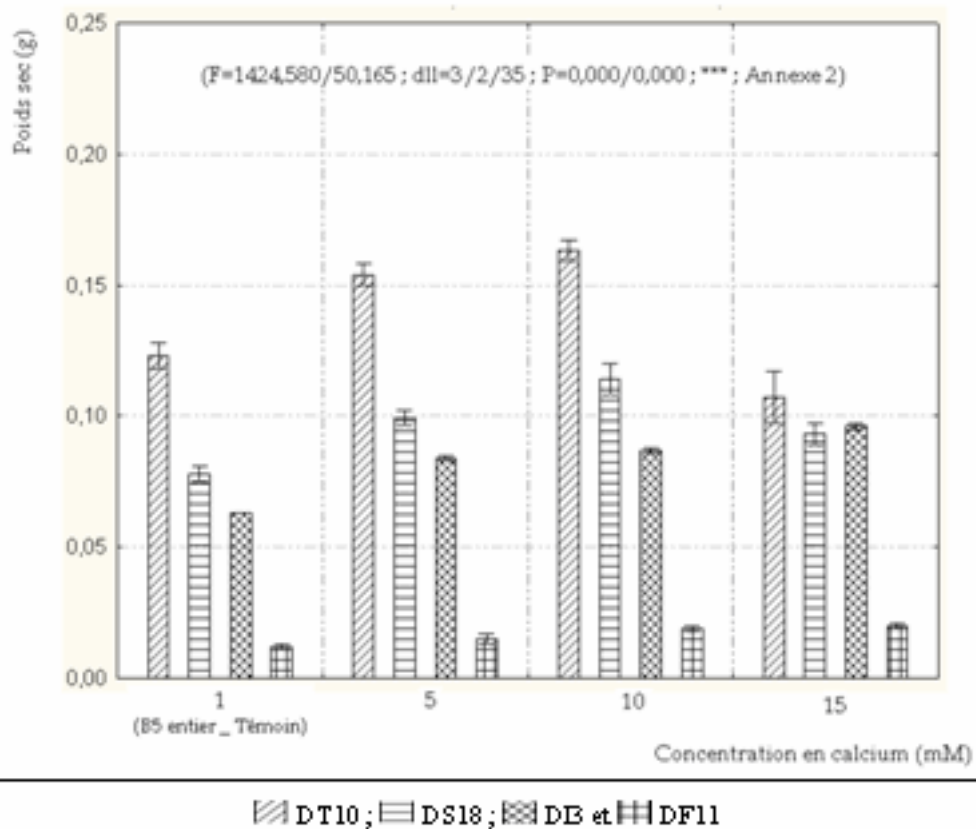


Figure 35 : Effet de la concentration en calcium sur la biomasse des chevelus racinaires

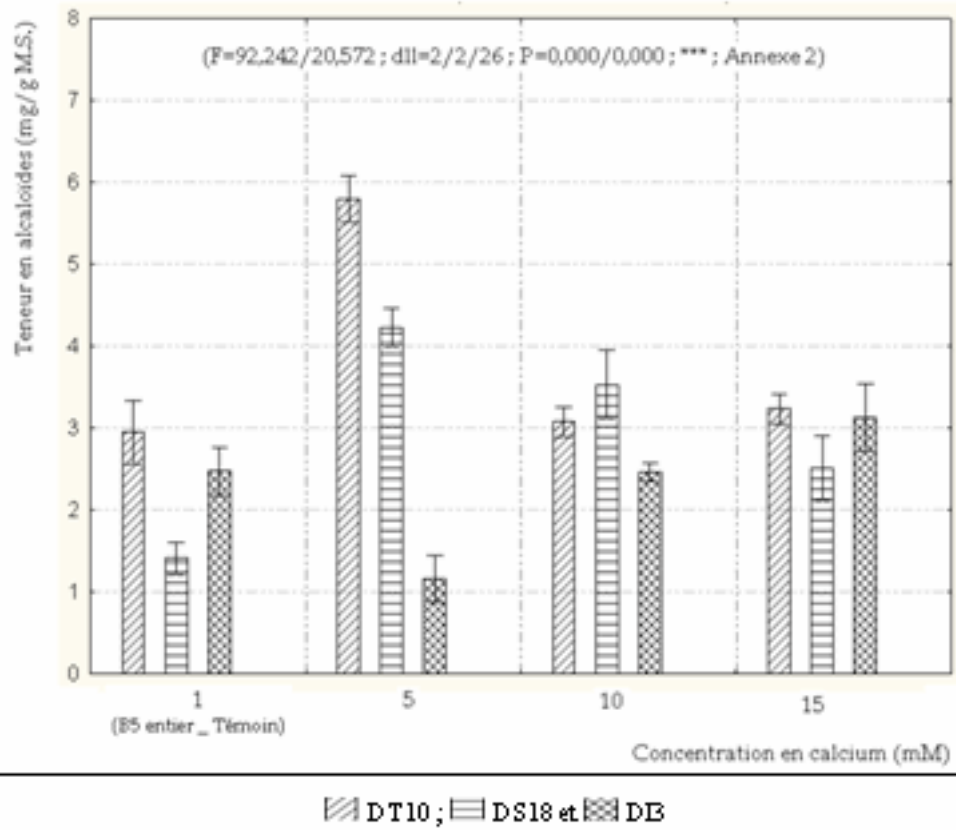


Figure 36 : Effet de la concentration en calcium sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires

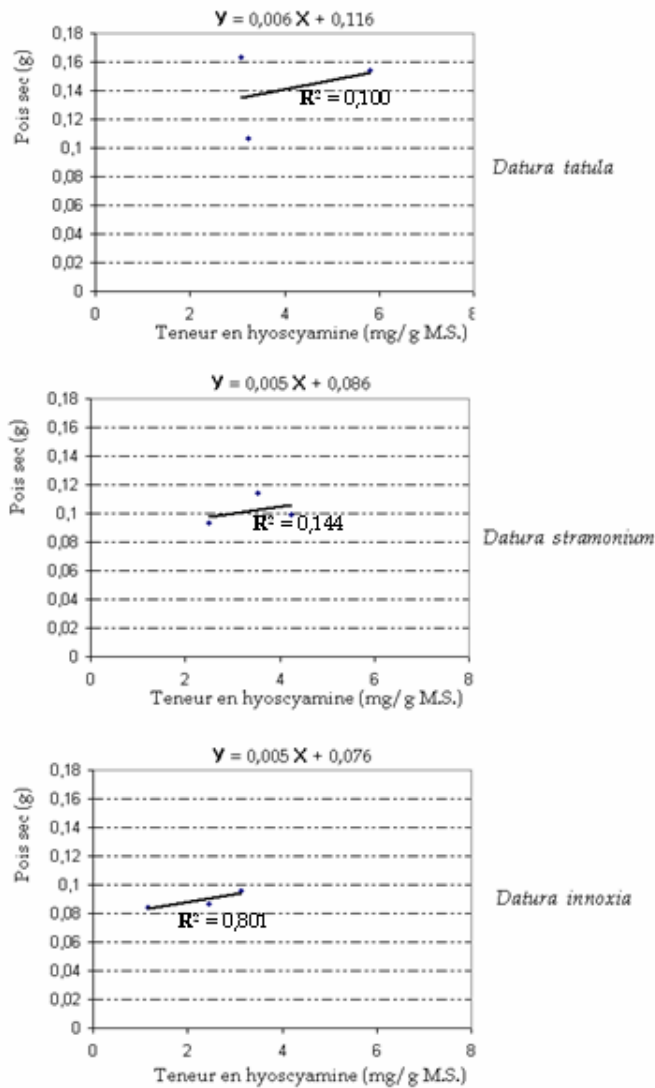


Figure 37 : Corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine en fonction de la concentration en calcium.

5.Bilan

Il ressort des résultats obtenus de l'effet de la composition du milieu de culture sur la biomasse et le contenu alcaloïdique des lignées racinaires retenues que :

- Le développement des chevelus racinaires est plus intense dans le milieu B5 que le milieu MS ;
- Les poids secs obtenus, d'une manière générale, sont plus importants dans le milieu B5 entier que dans les milieux $\frac{3}{4}$ B5 et $\frac{1}{2}$ B5 ;
- La concentration de 75 mM de l'azote dans le milieu B5 montre une biomasse des chevelus racinaires plus importante ;
- La concentration de 10 mM de calcium dans le milieu B5 manifeste l'effet le plus important sur la biomasse des chevelus racinaires ;

- La lignée DT10 est la plus performante si l'on considère l'ensemble des milieux et concentrations étudiés ;

Par ailleurs et contrairement à la biomasse des chevelus racinaires, les teneurs en alcaloïdes les plus importantes sont obtenues, d'une manière générale, dans les milieux dilués ($\frac{1}{2}$ B5, $\frac{3}{4}$ B5, $\frac{1}{2}$ MS et $\frac{3}{4}$ MS). La teneur la plus élevée en hyoscyamine est obtenue dans le milieu $\frac{1}{2}$ B5 et avec la lignée DT10.

L'effet des concentrations en calcium employées sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires semble plus important que celui des concentrations en azotes.

Le type de corrélation obtenu entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est négatif pour l'ensemble des lignées étudiées et pour l'ensemble des milieux et des concentrations testées excepté pour les concentrations en calcium où nous avons obtenu une corrélation positive entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine des différentes lignées racinaires.

Et enfin, on constate un effet du génotype traduit par les différences de comportement entre les lignées racinaires sélectionnées des différentes espèces pour les différents facteurs étudiés.

V Effet des éliciteurs sur la biomasse et la teneur en alcaloïdes

Des racines de la lignée DT10 sont introduites dans des boîtes de Pétri, contenant environ 20 ml de milieu de culture B5 semi-solide.

Le tableau 12 regroupe les résultats de la biomasse (Planche 2) et de la teneur en hyoscyamine de la lignée DT10 obtenus après 12 jours de culture en utilisant trois éliciteurs (AS : acide salicylique, AAS : acide acétylsalicylique et AJ : acide jasmonique).

	Concentration de l'éliciteur (M)	P.F. (g)	P.S. (g)	T.H. (mg/g M.S.)
AS	10 ⁻⁴	<0,01 ^H	-	-
	10 ⁻⁴	0,241 ± 0,019 ^G	0,014 ± 0,001 ^G	6,195 ± 0,358 ^A
	10 ⁻⁸	0,905 ± 0,139 ^{AB}	0,044 ± 0,005 ^{AB}	3,341 ± 0,216 ^{CD}
	10 ⁻¹⁰	0,483 ± 0,063 ^{DEF}	0,026 ± 0,003 ^{DE}	2,331 ± 0,148 ^E
AAS	10 ⁻⁴	<0,01 ^H	-	-
	10 ⁻⁴	0,474 ± 0,031 ^{DEFG}	0,024 ± 0,001 ^{EF}	5,118 ± 0,284 ^B
	10 ⁻⁸	0,992 ± 0,087 ^A	0,049 ± 0,001 ^A	3,505 ± 0,048 ^{CD}
	10 ⁻¹⁰	0,660 ± 0,037 ^{CDE}	0,033 ± 0,003 ^{CD}	2,435 ± 0,160 ^E
AJ	10 ⁻⁴	0,353 ± 0,132 ^{FG}	0,016 ± 0,001 ^{FG}	5,585 ± 0,134 ^{AB}
	10 ⁻⁴	0,644 ± 0,031 ^{CDE}	0,030 ± 0,001 ^{CDE}	3,815 ± 0,544 ^C
	10 ⁻⁸	0,878 ± 0,136 ^{ABC}	0,045 ± 0,003 ^A	2,878 ± 0,291 ^{DE}
	10 ⁻¹⁰	0,691 ± 0,006 ^{BCD}	0,036 ± 0,002 ^{BC}	2,388 ± 0,245 ^E
Témoin	-	0,448 ± 0,037 ^{FG}	0,025 ± 0,002 ^{EF}	2,409 ± 0,108 ^E

Tableau 12 : Effet des éliciteurs sur la biomasse et le contenu alcaloïdique des racines transformées.

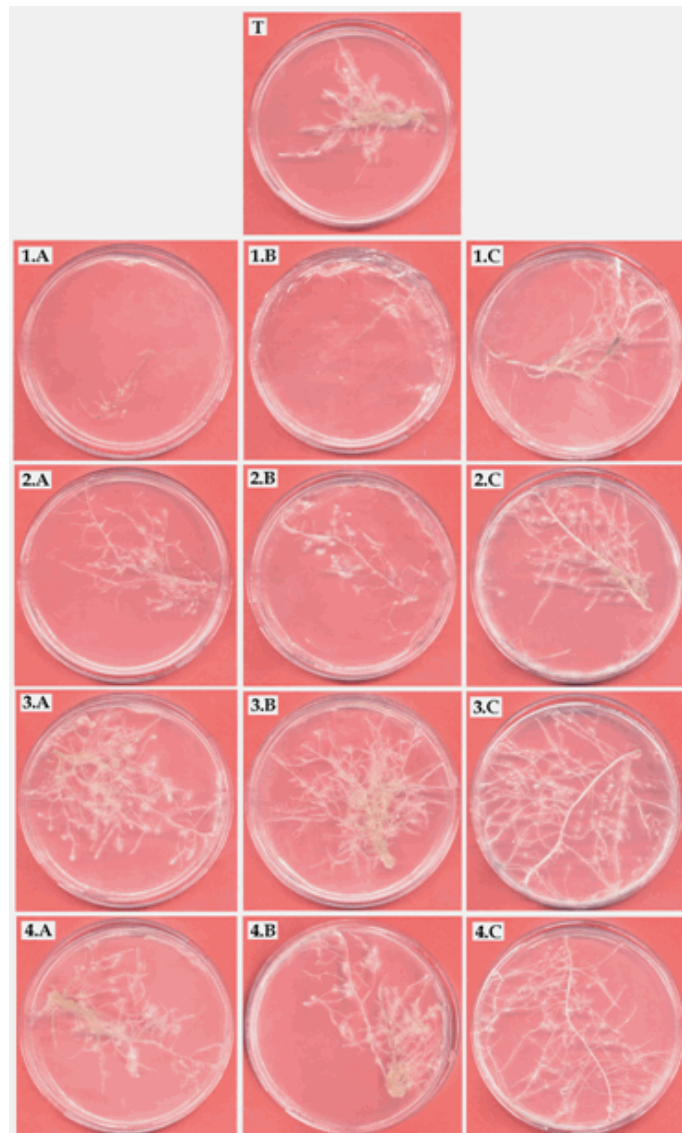


Planche 2 : Aspect des chevelus racinaires obtenus avec la lignée DT10 en présence de différents éliciteurs ($Gr = 0,46$).

T : témoin ; A : AAS ; B : AS et C : AJ.

1 : 10^{-4} M ; 2 : 10^{-6} M ; 3 : 10^{-8} M et 4 : 10^{-10} M.

- Biomasse

Les poids secs obtenus après 12 jours de culture de la lignée DT10 sur milieu B5 semi-solide en fonction des différents traitements (Fig. 38) varient de 0,014 à 0,049 g. La biomasse passe de 0,025 g chez le témoin à 0,049 g en utilisant la concentration 10^{-8} M de l'acide acétylsalicylique (étant le résultat le plus important) et une augmentation d'environ 200% est enregistrée. La concentration 10^{-4} M des deux acides salicylique et acétylsalicylique semble inhibé le développement du chevelu racinaire.

L'analyse de la variance (annexe 3) a révélé un effet très hautement significatif de l'éliciteur sur la biomasse du chevelu racinaire.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey (au seuil $\alpha=5\%$) a montré sept groupes homogènes qui se chevauchent.

- Groupe **A** : comporte les biomasses obtenues en traitant avec les concentrations 10^{-8} M de l'acide acétylsalicylique et avec 10^{-8} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **AB** : représenté par la concentration 10^{-8} M de l'acide salicylique ;
- Groupe **BC** : représenté par la concentration 10^{-10} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **CD** : représenté par la concentration 10^{-10} M de l'acide acétylsalicylique ;
- Groupe **CDE** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **DE** : représenté par la concentration 10^{-10} M de l'acide salicylique ;
- Groupe **EF** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide acétylsalicylique et le témoin ;
- Groupe **FG** : représenté par la concentration 10^{-4} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **G** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide salicylique.

- Teneur en alcaloïdes

La teneur en hyoscyamine de la lignée DT10 après 12 jours de culture sur le milieu B5 semi-solide en fonction des différents traitements (Fig. 39) varie de 2,331 à 6,195 mg/g M.S. Elle passe de 2,409 mg/g M.S. chez le témoin à 6,195 mg/g M.S. avec la concentration 10^{-6} M de l'acide salicylique (étant le résultat le plus intéressant) et une augmentation d'environ 260% est enregistrée.

L'analyse de la variance (annexe 3) révèle un effet très hautement significatif de l'éliciteur sur la teneur en hyoscyamine du chevelu racinaire.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey (au seuil $\alpha=5\%$) montre cinq groupes homogènes qui se chevauchent.

- Groupe **A** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide salicylique ;
- Groupe **AB** : représenté par la concentration 10^{-4} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **B** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide acétylsalicylique ;
- Groupe **C** : représenté par la concentration 10^{-6} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **CD** : représenté par la concentration 10^{-8} M de l'acide salicylique et la concentration 10^{-8} M de l'acide acétylsalicylique ;
- Groupe **DE** : représenté par la concentration 10^{-8} M de l'acide jasmonique ;
- Groupe **E** : représenté par la les concentrations 10^{-10} M de l'acide salicylique, 10^{-10} M de l'acide acétylsalicylique, 10^{-10} M de l'acide jasmonique et le témoin ;

La corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine est significativement négative, le coefficient de détermination R^2 est de 0,344 (Fig. 40).

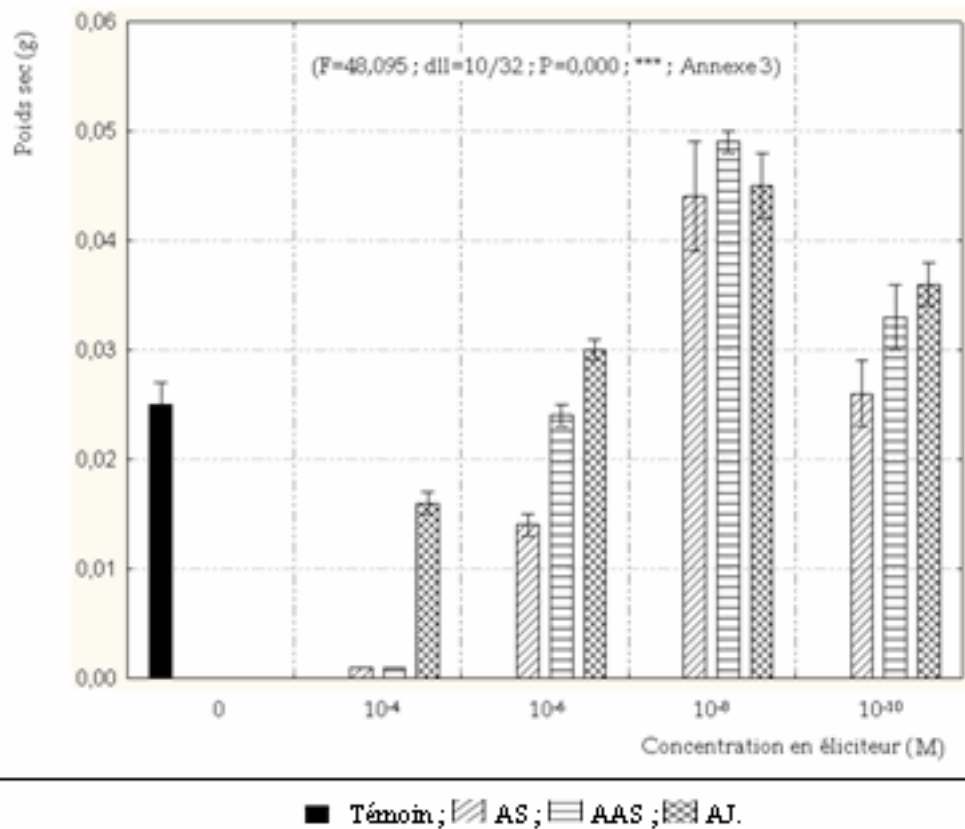


Figure 38 : Effet des éliciteurs sur la biomasse des chevelus racinaires

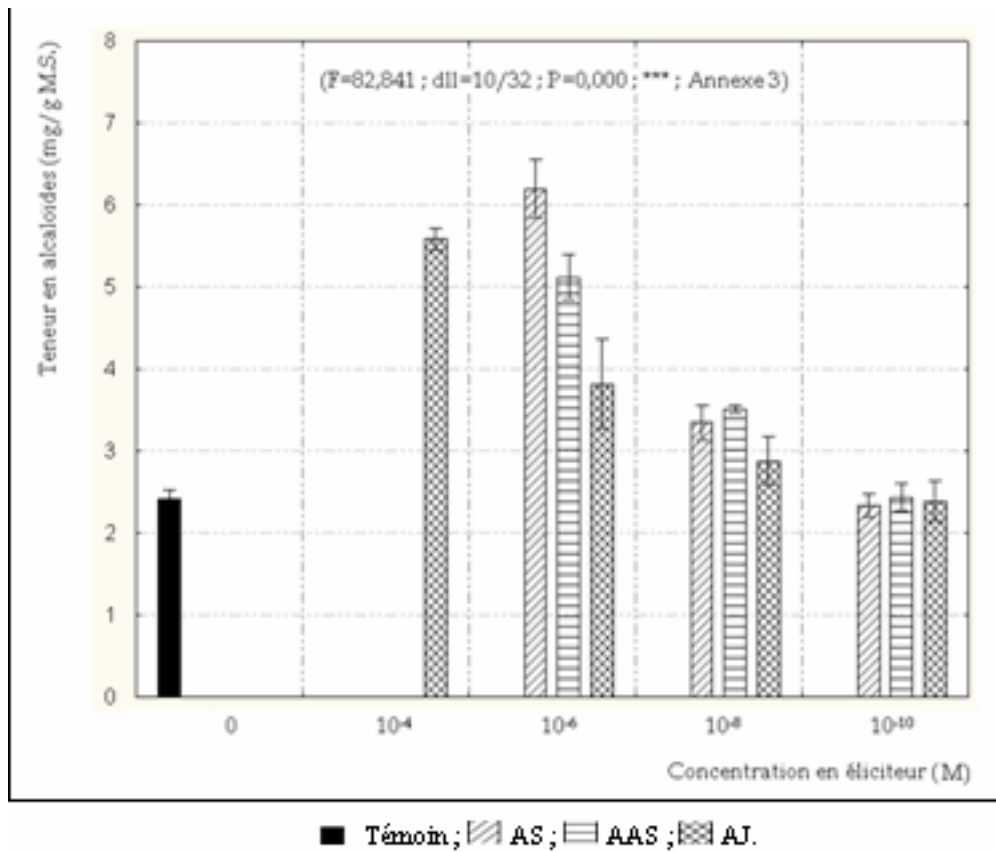


Figure 39 : Effet des éliciteurs sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires

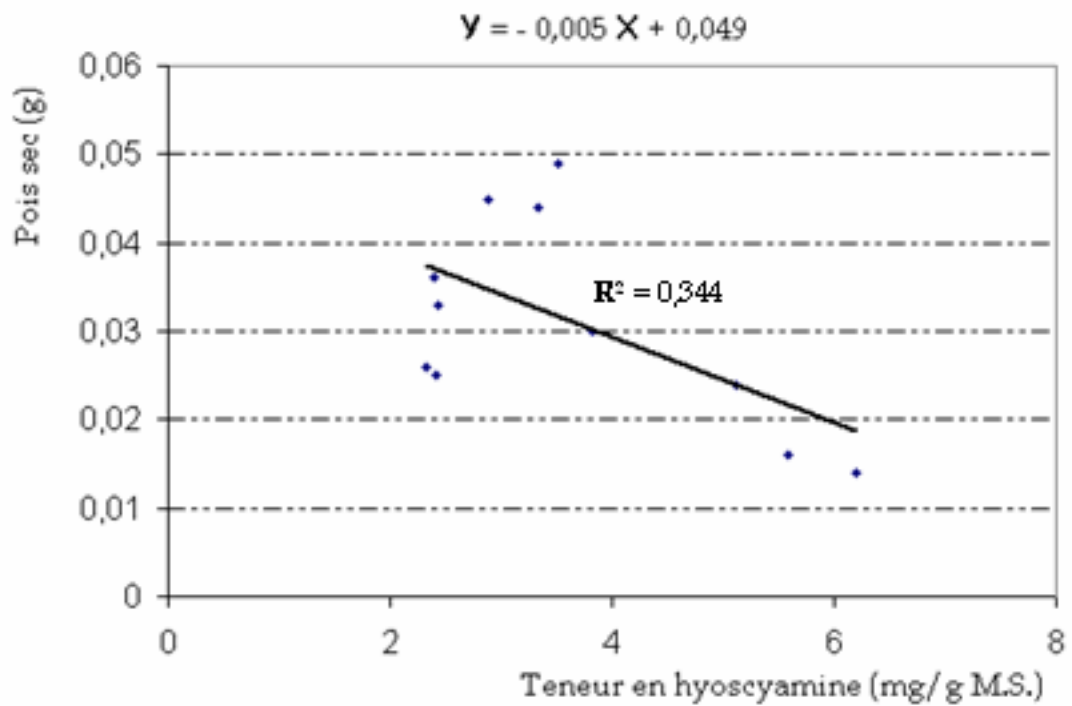


Figure 40 : Corrélation entre le poids sec et la teneur en hyoscyamine en fonction de la concentration en éliciteur.

VI Effet des agents de perméabilisation des chevelus racinaires

Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer les alcaloïdes dans le milieu de culture, différentes concentrations de Tween 20 et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme agents de perméabilisation ont été utilisées.

Pour chaque concentration, nous avons testés deux lots d'Erlenmeyers. Nous avons ajouté les agents de perméabilisation, pour le premier lot au moment de l'introduction du chevelu racinaire dans le milieu, et 24 heures avant de récolter le milieu de culture pour le deuxième lot.

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats de la biomasse (Planche 3) et de la teneur en hyoscyamine de la lignée DT10 obtenus après deux semaines de culture et en utilisant différents traitements de perméabilisation.

		Traitements	P.F. (g)	P.S. (g)	T.H. (mg/l M.C.)
L'agent de perméabilisation apporté au début de culture	H ₂ O ₂	5 mM	2,022 ± 0,158 ^D	0,162 ± 0,014 ^{CD}	0,254 ± 0,058 ^E
		10 mM	0,838 ± 0,239 ^E	0,097 ± 0,006 ^D	0,111 ± 0,049 ^E
	T20	0,5 %	0,264 ± 0,035 ^E	0,019 ± 0,004 ^E	0,000 ^E
		1 %	0,209 ± 0,001 ^E	0,011 ± 0,001 ^E	0,000 ^E
	2 %	0,183 ± 0,009 ^E	0,008 ± 0,001 ^E	0,000 ^E	
L'agent de perméabilisation apporté 24 h avant de récupérer le milieu de culture	H ₂ O ₂	5 mM	3,698 ± 0,223 ^{AB}	0,237 ± 0,005 ^{AB}	0,704 ± 0,094 ^{DE}
		10 mM	2,777 ± 0,296 ^C	0,209 ± 0,002 ^{BC}	1,591 ± 0,109 ^D
	T20	0,5 %	3,079 ± 0,104 ^{BC}	0,218 ± 0,005 ^{BC}	26,159 ± 0,855 ^B
		1 %	2,845 ± 0,070 ^C	0,203 ± 0,003 ^{BC}	33,678 ± 0,975 ^A
		2 %	2,336 ± 0,285 ^{CD}	0,191 ± 0,009 ^{BC}	11,018 ± 0,588 ^C
Témoins (non traité)	-	4,197 ± 0,270 ^A	0,291 ± 0,013 ^A	0,000 ^E	

Tableau 13 : Effet de la perméabilisation sur la biomasse et le contenu alcaloïdique des racines transformées.

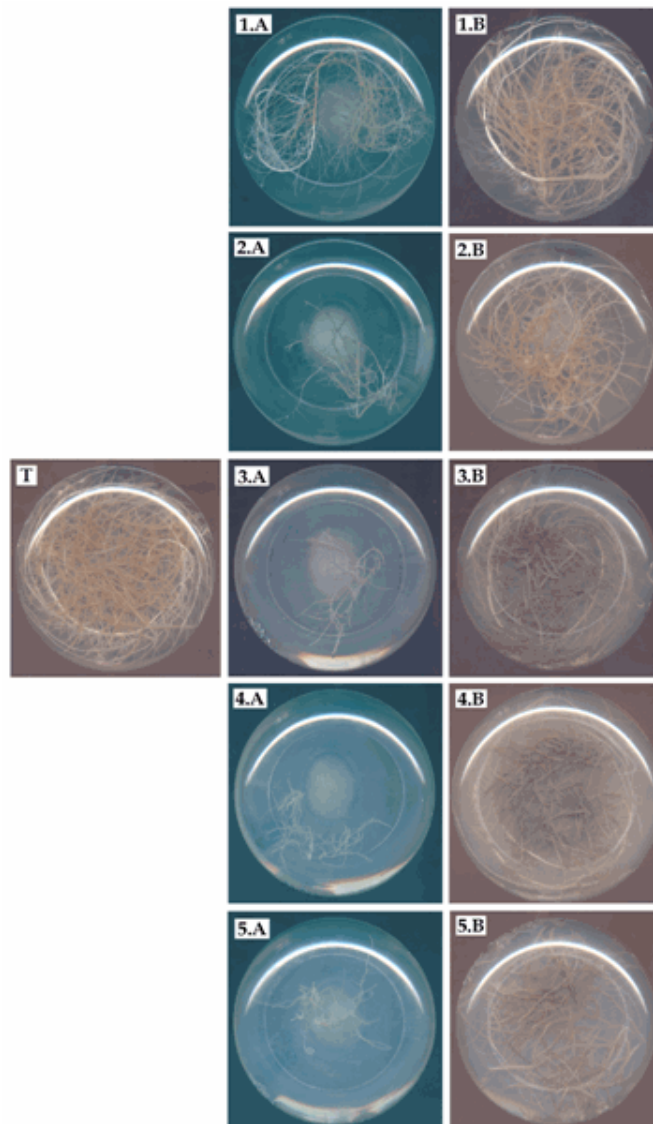


Planche 3 : Effet de la perméabilisation sur la biomasse du chevelu racinaire (Gr = 0,43).

T : témoin ; **A** : traitement au début de culture ; **B** : 24 heures avant de récupérer la solution nutritive.

1 : 5mM H₂O₂ ; **2** : 10mM H₂O₂ ; **3** : 0,5% T20 ; **4** : 1% T20 et **5** : 2% T20.

- Biomasse

Les poids secs obtenus après deux semaines de culture de la lignée DT10 sur le milieu B5 liquide en fonction des différents traitements varient de 0,008 g à 0,291 g (témoin). Tous les traitements engendrent une diminution significative de la biomasse par rapport au témoin. Les réductions de la biomasse les plus importantes sont obtenues avec les traitements effectués en début de la culture (Planche 3).

L'analyse de la variance (annexe 4) révèle un effet très hautement significatif de l'agent de perméabilisation sur la biomasse du chevelu racinaire (Fig. 41).

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey (au seuil $\alpha=5\%$) montre cinq groupes qui se chevauchent.

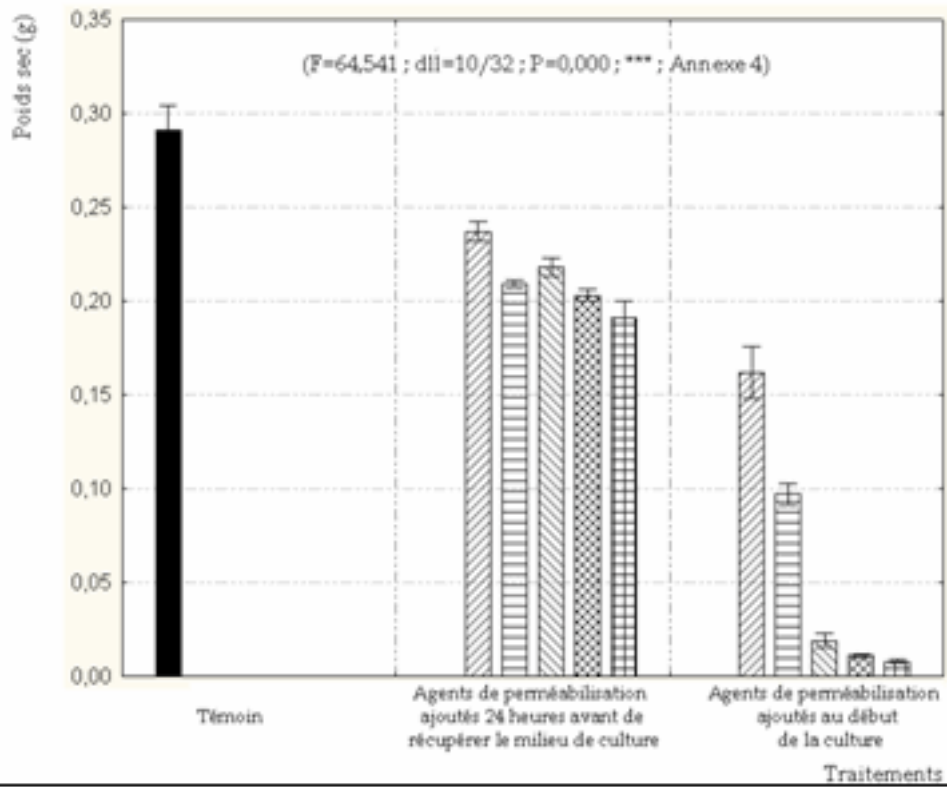
- Groupe **A** : représenté par le témoin ;
- Groupe **AB** : représenté par le traitement avec 5mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **BC** : regroupe les traitements avec 10mM d' H_2O_2 , 0,5% de T20 (tween 20), 1% de T20 et 2% de T20, et ce, quand l'agent de perméabilisation est appliqué 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **CD** : représenté par le traitement avec 5mM d' H_2O_2 ajouté au début de la culture ;
- Groupe **D** : représenté par le traitement avec 10mM d' H_2O_2 ajouté au début de la culture ;
- Groupe **E** : regroupe les traitements avec 0,5%, 1% et 2% de T20, et ce, quand l'agent de perméabilisation est appliqué au début de la culture ;
- - Teneur en alcaloïdes

La teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive (Fig. 42) après deux semaines de culture de la lignée DT10 dans le milieu B5 liquide en fonction des différents traitements varie de 0 à 33,678 mg/l de milieu de culture. Les teneurs en hyoscyamine dans la solution les plus intéressantes sont obtenues avec les traitements appliqués 24 heures avant de récupérer le milieu de culture, c'est-à-dire au 14^{ème} jour de culture.

L'analyse de la variance (annexe 4) révèle un effet très hautement significatif des différents traitements sur la teneur en hyoscyamine du chevelu racinaire.

La comparaison des moyennes en utilisant le test de Tukey (au seuil $\alpha=5\%$) montre cinq groupes homogènes dont deux se chevauchent.

- Groupe **A** : représenté par le traitement avec 1% de T20, 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **B** : représenté par le traitement avec 0,5% de T20, 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **C** : représenté par le traitement avec 2% de T20, 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **D** : représenté par le traitement avec 10mM d' H_2O_2 , 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **DE** : représenté par le traitement avec 5mM d' H_2O_2 , 24 heures avant de récupérer le milieu de la culture ;
- Groupe **E** : regroupe le témoin et les cinq traitements dont l'agent de perméabilisation est appliqué au début de la culture ;



■ Ténoir; ▨ 5mM H₂O₂; ▩ 10mM H₂O₂; ▪ 0,5% T20; ▫ 1% T20 et ▬ 2% T20.

Figure 41 : Effet des agents de perméabilisation sur la biomasse

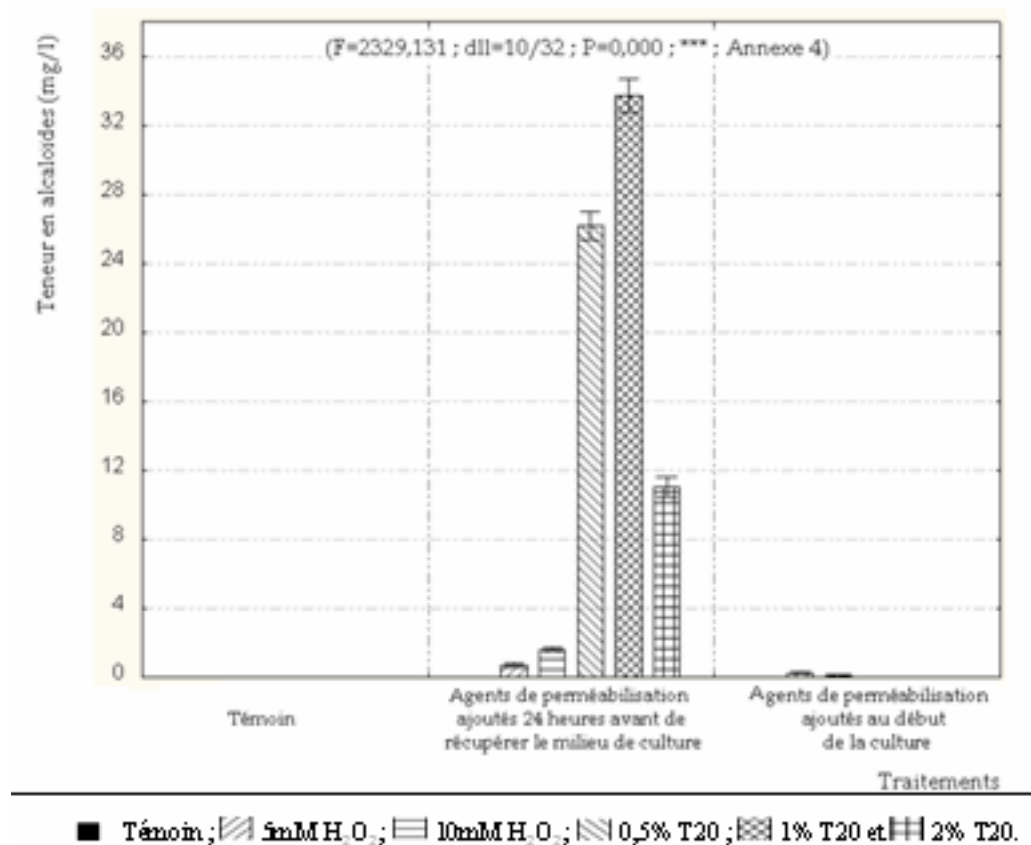


Figure 42 : Effet des agents de perméabilisation sur la teneur en hyoscyamine

VII Essai de production des alcaloïdes en continu

Notre système de culture est composé d'un bocal (contenant 100 ml de milieu de culture B5) muni d'une grille posée au fond du bocal pour supporter le chevelu racinaire. Le tout est placé sur un agitateur-incubateur.

Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer les alcaloïdes dans le milieu de culture, on ajoute au milieu de culture du tween 20 à 1% 24 heures avant de le récupérer.

L'extraction des alcaloïdes extracellulaire est réalisée sur 20 ml de solution nutritive.

Le tableau ci-après regroupe les résultats de l'évolution de la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive.

Jour de perméabilisation	Teneur en hyoscyamine (mg/l M.C.)
14 ^{ème}	33,885 ± 0,621 ^A
21 ^{ème}	13,089 ± 0,529 ^B
28 ^{ème}	7,669 ± 0,395 ^C
35 ^{ème}	1,311 ± 0,125 ^D
42 ^{ème}	0,901 ± 0,106 ^D

Tableau 14 : Evolution de la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive.

Au bout de 14 jours de culture de la lignée DT10 dans un bocal contenant le milieu B5, nous avons traité avec 1% de T20, 24 heures plus tard (au 15^{ème} jour), la solution nutritive épuisée est récupérée puis remplacée par un milieu de culture frais. Nous avons répété cette opération 7 jours plus tard, et ainsi jusqu'au 42^{ème} jour. Les teneurs en hyoscyamine enregistrées diminuent de semaine en semaine et passent de 33,885 mg/l au 15^{ème} jour à 0,901 mg/l au 43^{ème} jour.

L'analyse de la variance (annexe 5) révèle un effet très hautement significatif des différentes teneurs en hyoscyamine obtenues dans la solution en fonction du temps (Fig. 43).

Le test de Tukey (au seuil $\alpha = 5\%$) réalisé sur les moyennes de la teneur en hyoscyamine dans le milieu de culture (M.C.) montre les résultats suivants :

- Groupe **A** : représenté par la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive au 15^{ème} jour ;
- Groupe **B** : représenté par la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive au 22^{ème} jour ;
- Groupe **C** : représenté par la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive au 29^{ème} jour ;
- Groupe **D** : représenté par la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive au 36^{ème} et 43^{ème} jour ;

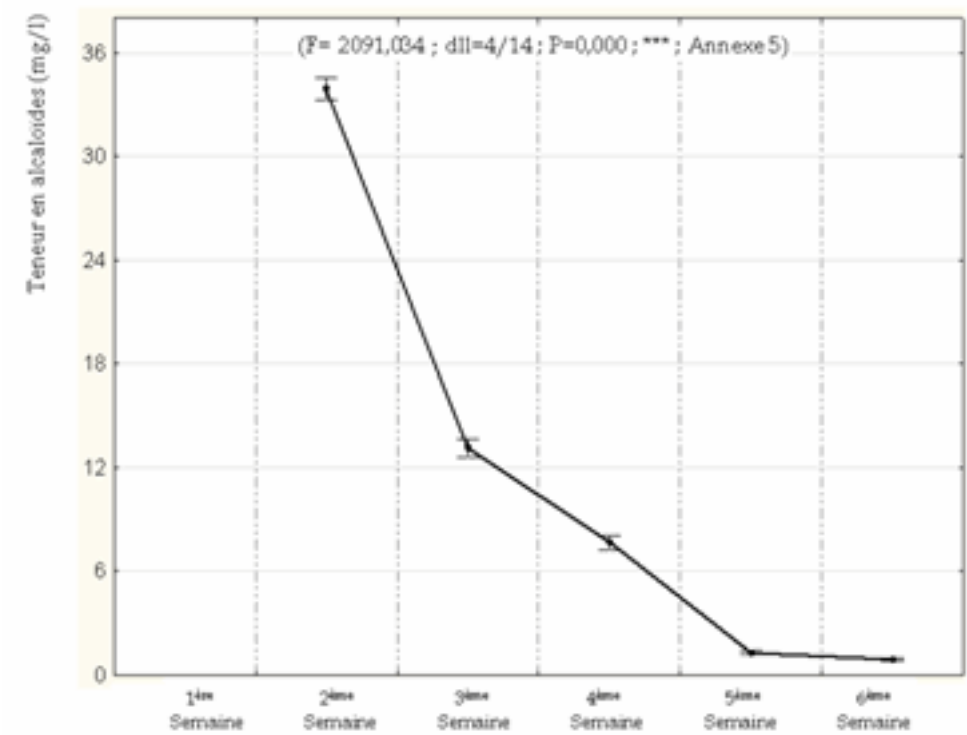


Figure 43 : Evolution de la teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive

Discussion

I Obtention des vitro-semis

Selon **Khelifi-Slaoui et al. (2005)**, les graines de *Datura* non scarifiées ne germent pas. Ceci montre l'importance de la scarification pour la germination et le développement des vitrosemis chez le *Datura*.

Nos résultats rejoignent ceux de nombreux auteurs qui ont obtenu des pourcentages de germination semblables : 91,66 % (**Khelifi-Slaoui et al., 2005**), et 88%, (**Reischman-Berman et al. 1989**) pour le *Datura stramonium* et 89,80% pour le *D. tatula* et 91,49% pour le *D. stramonium* (**Laadra, 2006**). Par ailleurs, sur les 332 tubes à essai ensemencés, nous n'avons eu aucune contamination, ce qui démontre l'efficacité du protocole de désinfection de **Khelifi-Slaoui et al. (2005)**.

II Obtention des chevelus racinaires

Nous avons eu des taux d'induction, selon l'espèce inoculée, allant de 15% pour le *Datura innoxia* à 57,5% chez le *D. tatula*. **De Cleen et De Ley (1981 in Dhakulkar et al., 2005)** expliquent que les taux d'induction des chevelus racinaires sont fortement influencés par le génotype à infecter. De plus, pour la même espèce de différentes provenances on a obtenu des réponses différentes à l'induction. En effet, d'après **Ecran et Taskin (1999)**, quatre populations de différentes provenances de *Rubia tinctorium* L. infectées par la souche 15834 ont présenté des taux d'induction de 75% pour la population Konya, suivie par Izmir avec 60%, Usak 34% et enfin Bademagaci avec 33%.

Selon **Amdoun et al. (2006)**, le nombre de racines transformées produites pour l'ensemble des explants de *D. innoxia* et *D. stramonium* ne dépassent pas les trois racines par explant. Ces résultats soutiennent ceux obtenus pour les quatre espèces de *Datura* de notre étude.

Les racines transformées qui sont apparues sur les explants inoculés ont été excisées et transférées sur un milieu de culture neuf. Elles ont été ainsi multipliées et maintenues à un stade juvénile. La variation de la vitesse de croissance observée et les différences morphologiques chez les lignées racinaires pourraient être attribuées d'une part, aux différents sites d'insertion de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales (**Abhyankar et al., 2005**) et d'autre part, au nombre de copies de l'ADN-T insérées (**Furze et al., 1987 in Dhakulkar et al., 2005**).

Mayonoa et al. (1999), ont montré que les chevelus racinaires obtenus chez le tabac, le *Duboisia* et le *Datura metel* et qui forment des cals après leur mise en culture sont caractérisées par un faible taux de production d'alcaloïdes tropaniques, c'est pourquoi nous avons éliminé toutes les lignées callogènes.

Sur l'ensemble des racines transformées obtenues et pour les quatre espèces de *Datura* étudiées, nous avons retenu 13 lignées racinaires jugées performantes. Sur ces

13 lignées, nous avons sélectionné la meilleure lignée de chaque espèce étudiée en se basant sur des critères de croissance (longueur moyenne de croissance, vitesse moyenne de croissance et importance de la ramification des chevelus racinaires). Les longueurs moyennes enregistrées pour les lignées sélectionnées après 12 jours de culture ont varié de 11,83 cm à 12,83 cm. Quant aux vitesses de croissances elles ont varié de 0,98 cm/jour à 1,07 cm/jour. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par **Amdoun et al. (2006)**, qui ont obtenu des longueurs moyennes de croissance après 12 jours de culture, pour trois lignées racinaires issues de la transformation du *Datura tatula*, de 11,22 cm, 11,40 cm et 19, 20 cm respectivement pour les lignées LIG3, LIG2 et LIG1.

Néanmoins, selon **Amdoun et al. (2006)**, la sélection et la caractérisation des lignées racinaires en se basant seulement sur les critères de croissance restent insuffisantes. Elles doivent intégrer d'autres paramètres, à savoir, la teneur en alcaloïdes tropaniques, la biomasse, la réponse à l'élicitation, l'étude morphologique et la consommation en nutriments.

III Culture sur milieu liquide

1. Effet des milieux MS et B5

Selon **Sauerwein et Shimomura (1991)**, les chevelus racinaires induits sur pousses de *Hyoscyamus albus* par la souche MAFF03-01724 de l'*Agrobacterium rhizogenes* évalués pour leur croissance et leur contenu alcaloïdique sur les milieux ½ MS, MS et B5 ont révélé que le milieu ½ MS est le plus intéressant du point de vue production d'alcaloïdes, suivi du milieu B5 et enfin le milieu MS entier. Cependant, la croissance sur le milieu ½ MS est la plus faible. La croissance la plus rapide est enregistrée dans le milieu WP (Woody Plant) contenant 8% de saccharose, alors que la production des alcaloïdes tropaniques dans ce dernier est relativement basse.

Au contraire, et selon **Amdoun et al. (2006)**, c'est le milieu MS qui donne les meilleurs résultats par rapport au milieu B5 concernant la cinétique de croissance des lignées racinaires de *Datura tatula* issues de la transformation génétique avec la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Les résultats de notre étude rejoignent ceux obtenus par **Sauerwein et Shimomura (1991)**, puisque les milieux entiers (B5 et MS) ont donné les biomasses les plus élevées, par contre les teneurs en alcaloïdes les plus intéressantes sont obtenues sur les milieux dilués (1/2 MS, ¼ MS, 1/2 B5 et ¼ B5). Aussi, les biomasses obtenues sur milieux B5 pour l'ensemble des lignées étudiées sont plus importantes que celles obtenues sur milieu MS.

Cette différence des résultats obtenus entre les deux milieux MS et B5 peut être expliquée par la différence de la composition de la fraction minérale des deux milieux, puisque la nature de la source d'azote dans le milieu MS est le NH_4NO_3 et le KNO_3 , alors que dans le milieu B5 c'est le KNO_3 et le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en plus, la concentration du KNO_3 est plus importante dans le milieu B5. Les concentrations de l'acide nicotinique, pyridoxine HCl et Thiamine HCl (vitamines) sont plus importantes dans le milieu B5.

2. Effet des concentrations en Azote

Les facteurs nutritifs comme l'azote sont des paramètres importants influençant la production de la biomasse et des alcaloïdes (Berlin *et al.*, 1985). La production des alcaloïdes tropaniques et la croissance des chevelus racinaires de la belladone (*Atropa belladonna*) sont influencées par la composition du milieu de culture (Aoki *et al.*, 1997). Selon Dupraz *et al.*, (1993), dans les racines transformées du *Datura quercifolia* le contenu alcaloïdique est diminué par des milieux fortement concentrés. La dilution des milieux de culture et la réduction des concentrations en azote augmentent les teneurs en alcaloïdes des cultures de chevelus racinaires des *Solanaceae* (Payne *et al.*, 1987 ; Parr *et al.*, 1990). La concentration en azote et le rapport carbone/azote du milieu de culture influence souvent la synthèse des alcaloïdes (Payne *et al.*, 1987 ; Sugimoto *et al.*, 1988).

Le milieu B5 ordinaire contient 25 mM d'azote. Contrairement aux effets positifs de l'augmentation de la concentration de l'azote dans le milieu B5 sur la biomasse où nous avons enregistré les meilleurs résultats avec la concentration de 75 mM, l'augmentation de la concentration de l'azote dans le milieu B5 a fait chuter les teneurs en hyoscyamines des lignées étudiées. Nos résultats corroborent ceux de Berlin *et al.* (1985), Dupraz *et al.* (1993), Payne *et al.*, 1987 et Parr *et al.* (1990).

3.Effet des concentrations en Calcium

Des cultures de chevelus racinaires du *Datura stramonium* ont été établies après l'infection des sections de tige avec la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*, et cultivées dans le milieu B5 contenant différentes concentrations en calcium afin d'étudier le rapport entre l'activité d'une peroxydase Ca^{2+} -dépendante et l'accumulation de hyoscyamine. Bien que les concentrations en calcium (0,25 mM et 0,5 mM) ; en-dessous de celle présente dans le milieu B5 (1,0 mM) ; n'aient pas affecté la croissance du chevelu racinaire. Les faibles concentrations en calcium ont réduit les capacités de synthèse de l'hyoscyamine des lignées racinaires (Pinol *et al.*, 1999). Cette perte de production en hyoscyamine est généralement concourante avec la perte d'activité de la Putrescine : SAM *N*-methyltransférase (PMT), cette perte d'activité de la PMT est confirmée par l'analyse « Northern blot » réalisée sur toute la fraction d'ARNm en utilisant l'ADNc correspondant à la PMT du tabac comme sonde (Pinol *et al.*, 1999). Selon Robins *et al.* (1991), il semblerait que la synthèse de la PMT cesse ou diminue en réponse à n'importe quel stress qui peut induire un changement du métabolisme de polyamine.

Dans notre travail, nous avons utilisé des concentrations en calcium (5mM, 10mM et 15mM) supérieures à celle présente dans le milieu B5, et nous avons obtenu un maximum de biomasse avec la concentration de 10 mM pour les quatre lignées testées.

Concernant les teneurs en hyoscyamine des lignées sélectionnées, nous avons enregistré une augmentation de la teneur en hyoscyamine par rapport au milieu B5 entier. Cette augmentation peut être expliquée par une augmentation de l'activité de la PMT. Néanmoins, la teneur en hyoscyamine la plus importante des lignées DT10 et DS18 est obtenue avec la concentration de 5 mM de calcium dans le milieu B5, ces teneurs diminuent avec l'augmentation de la concentration du calcium dans le milieu. Par contre, pour la lignée DI3, la teneur en hyoscyamine augmente avec l'augmentation de la concentration en calcium pour passer de 1,16 mg/g pour la concentration de 5 mM en calcium à 3,12 mg/g pour la concentration de 15 mM en calcium dans le milieu B5. Ceci serait dû à un effet génotypique.

IV Elicitation de la biomasse et du contenu alcaloïdique

Un model théorique a été proposé pour démontrer que des récepteurs de la sécheresse puissent être localisés dans la membrane. Afin de vérifier ceci, des composés, tel que l'acide acétylsalicylique (aspirine), ont été examinés (**Larqué-Saavedra, 1979**). Cependant, les essais biologiques conduits ont montré que l'aspirine affecte l'ouverture stomacale (**Larqué-Saavedra, 1979**). Cet effet inattendu a été suivi d'une série d'autres analyses qui ont fourni la base fondamentale pour considérer que les salicylates affectent la physiologie et la bioproduktivité de la plante (**Hayat et Ahmad, 2006**).

Dans une étude réalisée en 1996 il a été signalé que l'application de l'acide salicylique (AS) sur de jeunes pousses de soja affecte de manière significative la taille de la racine (**Gutierrez-Coronado et al, 1998**). D'autres travaux ont reproduit des résultats semblables avec *Tagetes erecta* en utilisant de très faibles concentrations en AS (**Sandoval-Yepiz, 2004**). Ce même auteur a obtenu respectivement pour le témoin et les traitements avec les concentrations de 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M d'AS, les poids secs des racines de *Tagetes erecta* suivants : 0,5g, 1g, 1,4g et 1,2g. Le groupe homogène le plus important est celui où la plante est traitée avec 10^{-8} M d'AS.

Les résultats de notre expérimentation de l'effet de l'acides salicylique sur la biomasse des chevelus racinaires (meilleurs résultats avec 10^{-8} M d'AS) rejoignent ceux de **Sandoval-Yepiz (2004)** obtenus en traitant des racines de plantes entières (*Tagetes erecta*) non transformées par l'agrobactérie.

Quant aux deux autres éliciteurs, l'AAS et l'AJ, c'est toujours la concentration 10^{-8} M qui a permis l'obtention des meilleurs résultats concernant la biomasse des chevelus racinaires.

Par ailleurs, les acides salicylique, acétylsalicylique et jasmonique sont utilisés pour l'élicitation des alcaloïdes tropaniques des chevelus racinaires (**Pitta-Alvarez et al. , 2000 ; Spollansky et al. , 2000 ; Zabetakis et al. , 1999 ; Zayed et Wink, 2004**). Dans la plupart des travaux, les chevelus racinaires sont exposés aux agents éliciteurs après une période de cultures sans élicitation correspondant à la phase exponentielle de croissance (varie de 7 à 19 jours) et pendant une durée de 24 à 72 heures (**Pitta-Alvarez et al. , 2000 ; Spollansky et al. , 2000 ; Zabetakis et al. , 1999 ; Zayed et Wink, 2004**). Les teneurs en alcaloïdes tropaniques les plus intéressantes sont obtenues avec des concentrations de l'éliciteur (AS) de l'ordre de 25mg/l (correspond à environ $0,5 \cdot 10^{-3}$ M), elles atteignent 1200% la teneur en alcaloïdes du témoin (**Zayed et Wink, 2004**).

Dans notre travail, les chevelus racinaires issus de la transformation de l'espèce *Datura tatula* par *Agrobacterium rhizogenes* (souche A4) ont été exposés aux éliciteurs étudiés pendant toute la période de culture (12 jours) mais à des concentrations plus faibles. Même si l'effet de l'élicitation est hautement significatif, notre résultat le plus intéressant correspond à une amélioration d'environ 260% par rapport au témoin enregistrée avec 10^{-6} M de l'AS chez la lignée DT10. Néanmoins, cela reste loin d'être égale aux 1200% obtenus par **Spollansky et al. (2000)**. A la concentration de 10^{-4} M de l'AS et l'AAS, la croissance des racines transformées est fortement inhibée. Cependant, pour l'AJ c'est la concentration de 10^{-4} M qui entraîne une augmentation d'environ 230%.

V Perméabilisation des chevelus racinaires

Selon **Boitel-Conti et al. (1995)**, les effets du tween20 en tant qu'agent de perméabilisation du chevelu racinaire issu de la transformation des *Datura* pour libérer les alcaloïdes tropaniques a été étudié. Pour diverses concentrations de tween20, les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine accumulées dans le milieu de culture et la viabilité des racines transformées ont été mesurés. La viabilité du chevelu racinaire est préservée après 24 heures de traitement avec du tween20 à 2% ; alors que, l'accroissement de la biomasse s'anulle. **Boitel-Conti et al. (1995)** ont obtenu un maximum de perméabilisation des chevelus racinaires après un contact de 20 heures avec le tween20. A ce moment, une concentration en hyoscyamine supérieure à 25 mg/l a été détectée dans la solution nutritive.

Les résultats de notre travail sur la perméabilisation des chevelus racinaires de *Datura tatula* avec le tween20 sont cohérents avec ceux obtenus par **Boitel-Conti et al. (1995)**.

Ainsi, dans notre cas, le meilleur résultat a été obtenu en traitant les lignées racinaires avec du tween20 à 1% et pendant 24 heures. Dans ces conditions, une concentration en hyoscyamine dans la solution nutritive de 33,678 mg/l a été enregistrée.

Selon **Lee et al. (1998)**, le traitement avec 5 mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit une libération passagère des alcaloïdes tropaniques par les racines transformées, dans le milieu de culture, sans affecter leur viabilité. Ce résultat n'est pas vérifié dans notre essai de perméabilisation des racines transformées de *Datura tatula* avec de l'H₂O₂, puisque nous avons enregistré une différence significative de la biomasse en faveur du témoin comparativement au traitement avec 5 mM d'H₂O₂.

Par ailleurs, dans notre essai de production d'alcaloïdes tropaniques en système de culture semi-continu, une chute de la concentration en hyoscyamine dans le milieu de culture après le premier traitement de perméabilisation a été observée. **Charlos et al. (1990)**, notent que suite à des traitements de perméabilisation, le rétablissement de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'accroissement de la biomasse ne sont pas toujours obtenus. Ainsi, la possibilité d'arranger une culture en continue ou en semi-continue pour la production de métabolites secondaires semble être limitée par les techniques de perméabilisation. Selon **Boitel-Conti et al. (1995)**, plusieurs de ces techniques ont été déjà décrites mais aucune d'entre-elles n'a donné un résultat complètement positif.

Conclusion

Les cultures cellulaires sont considérées comme une alternative aux procédés agricoles pour produire des substances chimiques actives. Cependant, certains facteurs influencent leur rendement. Plusieurs métabolites secondaires sont obtenus par extraction directe à partir de plantes cultivées. Les cultures organisées, et particulièrement les cultures de racines, peuvent apporter une contribution significative à la production de ces métabolites secondaires. Les racines neoplasiques produites suite à l'infection par *Agrobacterium rhizogenes* sont caractérisées par un taux de croissance élevé, une stabilité génétique et un développement continu dans des milieux de cultures sans hormones. Les cultures de chevelus racinaires offrent la promesse d'améliorer la production et la productivité des métabolites secondaires utilisés en pharmacologie (Srivastava et Srivastava, 2007).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, notre travail a porté sur la transformation génétique de quatre espèces du genre *Datura* par l'*Agrobacterium rhizogenes* et à l'optimisation de la production des alcaloïdes tropaniques.

Les résultats obtenus montrent que *Datura ferox* et *D. tatula* présentent non seulement des taux de germination les plus intéressants mais aussi une meilleure réactivité vis-à-vis de la transformation par l'*Agrobacterium rhizogenes*.

Concernant l'optimisation de la composition de la fraction minérale du milieu de culture, les milieux entiers (MS et B5) donnent les meilleures biomasses et les milieux dilués ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ B5 et $\frac{3}{4}$ B4) donnent les teneurs en hyoscyamine les plus intéressantes. La teneur en hyoscyamine la plus importante est obtenue dans le milieu $\frac{1}{2}$ B5 avec la lignée DT10. De même, les concentrations 75 mM d'azote et 10 mM de calcium dans le milieu de culture B5 donnent les biomasses les plus intéressantes.

La culture des quatre lignées sélectionnées dans les différents milieux de culture (entiers, dilués et avec différentes concentrations d'azotes ou de calcium) montre que la lignée DT10 issue de la transformation de *D. tatula* est la plus performante.

A propos de l'optimisation de l'élicitation de la biomasse et du contenu alcaloïdique, la concentration 10^{-8} M des acides salicylique (AS), acétylsalicylique (AAS) et jasmonique (AJ) donne les meilleurs poids secs. Les concentrations 10^{-4} M pour l'AJ et 10^{-6} M pour l'AS et l'AAS, donnent les teneurs en hyoscyamine les plus élevées respectivement de 5,585 mg/g M.S., 6,195 mg/g M.S. et 5,118 mg/g M.S.

La corrélation entre le poids sec et la teneur en alcaloïdes de l'ensemble des paramètres étudiés est négative sauf pour la concentration en calcium.

Les différentes concentrations des deux agents de perméabilisation étudiés affectent la viabilité des chevelus racinaires, et celle qui donne la meilleure teneur en hyoscyamine dans la solution nutritive est 1% de Tween20.

L'essai de production d'alcaloïdes en système de culture continu et en utilisant la concentration de 1% de Tween20 comme agent de perméabilisation montre que la teneur en hyoscyamine chute avec le temps, pour passer de plus de 33 mg/l à la première perméabilisation à une teneur inférieure à 1 mg/l à la cinquième perméabilisation.

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

- Combiner l'élicitation de la production des alcaloïdes avec la perméabilisation des chevelus racinaires,
- Etudier la consommation en nutriments des lignées jugées performantes,

Déterminer l'âge optimal pour la production d'alcaloïdes à partir des lignées sélectionnées.

Références bibliographiques

- Abhyankar G.**, Reddy V.D., Giri C.C., Rao K.V., Lakshmi V.V.S., Prabhakar S., Vairamani M., Thippeswamy B.S., Bhattacharya P.S., 2005. Amplified fragment length polymorphism and metabolic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. photochemistry, n.66, p.p.: 2441 - 2457.
- Adabio, 2004.** Pomme de terre (Solanacées). Fiche technique en agriculture biologique. ACTA.
- Adzet T., Diego J., Iglesias J., 1979.** Contribution à l'étude de quelques taxes de *Datura*. Plant. Med. et Phyt., vol. 13, n. 4, p.p. : 292 - 296.
- Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Amroun S., Khelifi-Slaoui M., 2006.** Production de chevelus racinaires par transformation génétique *in vitro* de deux espèces de *Datura*. Biotechnologie végétale. Ed. Khelifi. Alger, vol. 0, p.p. : 83 - 85.
- Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroun S., Khelifi L., 2005.** Ressources génétiques des *Datura* en algérie. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi, p.p. : 212 - 213.
- Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Hadjimi G., Amroune S. Khelifi L., 2007.** Etude des propriétés de croissance et du contenu en hyoscyamine d'une culture de chevelus racinaires et de suspensions cellulaire de *Datura stramonium* L. Biotechnologies végétales, n°1, p.p. : 15 - 18.
- Aoki T., Matsumoto H., Asako Y., Matsunaga Y., Shimomura K., 1997.** Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Plant Cell Rep. n. 16, p.p. : 282 – 286.
- Benhizia Z., 1989.** Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium* L. Th. magistère. INA, Alger, 68 P.
- Berlin J., Beier H., Fecker L., Noe W., Sasse F., Schiel O., Wray V., 1985.** Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures. In: Neumann K.H., Barz W., Reinhard E. (Eds.), Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Springer, Berlin, p.p. : 272 – 280.
- Bhatt A.B., Saratbabu G.B., 1988.** Notes on the distribution of two exotics in western India. Acta Bot. Indica. n. 16, p.p.: 117 - 118.
- Bhat S.V. Nagasampagi B.A., Sivakumar M., 2005.** Chemistry of Natural Products. Ed. Narosa, New Delhi, India, p. 237.
- Bianchini F., Corbetta F., 1975.** Atlas des plantes médicinales. Ed. Fernand Nathan, Paris, 120 P.
- Bianchini F., Pantano A.C., 1986.** Guide vert des plantes et des fleurs. Ed. Solar, 125P.

- Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J.C., Ducrocq C., Sangwan-Norreel B.S., 1995.** Permeabilization of *Datura innoxia* hairy root for releas of stored tropane alkaloids. *Planta Med.*, vol. 61, p.p. : 287 – 289.
- Bouzar H. , 1983.** A servey of Agrobacterium strains associated with Georgia pecan trees and an immunological stady of the bacterium. Thèse Master of Science. Oregon state university. USA. 67 P.
- Brachet A., Mateus L., Cherkaoui S., Christen P., Gauvrit J.Y., Lanteri P., Veuthey J.L., 1999.** Analysis of tropane alkaloids, *Analisis*, vol. 27, p. 772.
- Bruneton J., 2005. **Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux.** Ed. Lavoisier, 3^{ème} édition, 618 P.
- Buitelaar R.N., Langenhoff A.A.N., Heidstra R., Tramper J., 1991.** Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two liquid phase bioreactors. *Enzyme Microbiol. Technol.*, vol. 13, p.p. : 487 – 580.
- Carvaiho E.B., Curtis W.R., 1998.** Characterization of fluid-flow resistance in root cultures with a convective flow tubuiar bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 60, p.p. : 375 – 384.
- Casse F., Breitler J.C., 2001.** OGM : description, méthodes d'obtention, domaines d'application. Ed. France agricole, Paris, 166 P.
- Cecchini T., 1976.** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. De Vecchi, 327 P.
- Charlos D.J., Simon J.E., Wood K.V., Heinstei P., 1990.** Permeabilization of *Datra sp* hairy roots. *Journal of nature product*, n. 53, p.p. : 157 – 160.
- Chilton M.D., 1983.** L'introduction de gènes étrangers dans les plantes. Pour la science, vol. 70. p.p. : 89 - 99.
- Chriqui D., 1998.** Biotechnologies végétales : Génie génétique. Laboratoire CEMV – Université P. & M. Curie, Paris VI, 84 P.
- Cieri U.R., Bertrand R., Choi K.K., Gagnon J., Krol P., Latzo P., Lau D., Melendez J., Pyramides G., Sen S., Steible D., Weigand J., 2003.** Determination of atropine (hyoscyamine) sulfate in commercial products by liquid chromatography with UV absorbance and fluorescence detection : Multilaboratory study. *Journal of AOAC international* vol. 86, n. 6, p.p. : 1128 – 1134.
- Cordell A.G., Quinn-Bettie L.M., Fransworth N.R., 2001.** The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother*, vol. 15, p.p. : 183 – 205.
- Crété P., 2006.** La transgénèse végétale. Université de la méditerranée, p.p. 1-19.
- Csapody V., 1961.** Magyarország kultúrflórájá. Budapest, 92 P.
- Dambri M., 1998.** Évaluation de la composition alcaloïdique des plantes de *Datura innoxia* Mill. et *Datura tatula* L. poussant à l'état sauvage. *Mem. Ing. Sc. Agr. Blida*, 81 P.
- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA Paris. 383P.
- Dewick P.M., 2001.** Medicinal Natural Products. Ed. Wiley, 291 P.
- Dhakulkar S., Ganapathi T.R. Bhargava S. Bapat V.A., 2005.** Induction of hairy roots in *Gmilina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy root. *Plant science*, n. 169, p.p. : 812-818.

- Dilorio A.A., Cheetham R.D., Weathers P.J., 1992.** Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor : Reactor performance and evaluation. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 37, p.p. : 457 – 511.
- Dräger B., 2002.** Analysis of tropane and related alkaloids. Journal of Chromatography (Review), Ed. Elsevier, n. 978, p.p. : 1 – 35.
- Ducroq C., 1994.** Genetic transformation in medicinal plant : *Datura innoxia* Mill., by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* and contribution to the study of secondary metabolites. Th. doctorat de 3^{ème} cycle en physiologie végétale approfondie, Paris, 72 P.
- Dupraz J.M., Christen P., Kapetanidis I., 1993.** Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. Planta Medica, n. 60, p.p. : 158 – 162.
- Durand-Tardif M., Broglie R., Slightom J., Tepfer D., 1985.** Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*, organ and phenotype specificity. J. Mol. Biol., vol. 186, p.p. : 557 – 564.
- Facchini P.J., 2001.** Alkaloid biosynthesis in plants : Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, p.p. : 29 – 66.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil, I.K., 1968.** Plant tissue culture media. In Vitro, n. 12, p. 473.
- Gelvin S.B., 1990.** Crown gall disease and hairy root disease. Plant Physiology, vol. 92, p.p. : 281 - 285.
- Giri A., Narasu M.L., 2000.** Transgenic hairy roots : recent trends and applications. Biotechnology Advances, vol. 18, p.p. : 1 – 22.
- Gontier E., Clément A., Tran T.L.M., Gravot A., Lièvre K., Guckert A., Bourgaud F., 2000.** Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization : a promising technique for plant secondary metabolite production. Plant Science, n. 163, p.p. : 723 – 732.
- Goullé J.P., Pepin G., Dumestre-Toulet V., Lacroix C., 2004.** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. Annales de Toxicologie Analytique, vol. 1, n. 16, 34 P.
- Gutiérrez-Coronado M., Trejo C.L., Larqué-Saavedra A., 1998.** Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. Plant. Physiol. Biochem., n. 36, p.p. : 563-565.
- Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C., 1986.** Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, vol. 5, p.p. : 111–115.
- Hartmann T., Witte L., 1995.** Alkaloids : Chemical and biological perspectives. Ed. S.W. Pelletier, p. 155.
- Hayat S., Ahmad A., 2006.** Salicylic acid : A plant hormone. Springer edition, 401 P.
- Hesse M., 2002.** Alkaloids, nature's curse or blessing ? Verlag helvetica chimica acta and wiley, p. 239.

- 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. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 33, p.p. : 132 – 139.
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514P.
- Hooykaas P.J.J., Hoficer M., Den Dulk-Ras H., Schilperoort R.A., 1984.** A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a nopaline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants. Plasmid, vol. 11, p.p. : 195 – 205.
- Houmani Z., 1999.** Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d’alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Th. Doctorat, INA, Alger, 124 P.
- Houmani Z., Cosson L., 2000.** Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. Ethnopharmacology, Ed. Erga, p.p. : 205 - 219.
- Houmani Z., Cosson L., Corbineau F., Com D., 1994.** Etude de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine d’une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. Acta. Bot. Gallica. vol. 141, n. 1, p.p. : 61 - 66.
- Kado C.I., 1998.** *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer. Genet. Eng., vol. 20, p.p. : 309 – 326.
- Khelifi-Slaoui M., Rezine R., Amroun S., Amdoun R., Khelifi L., 2005.** Embryons somatiques et bourgeons néoformés induit sur explants issus de vitrosemis de *Datura stramonium* L. d’origine algérienne. Actes du séminaire international sur l’amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi, p.p. : 114-118.
- Kim Y.J., Weathers P.J., Wyslouzil B.E., 2002 ¹.** The growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas phase reactors. Biotechnol. Bioeng., vol. 80, p.p. : 454 – 464.
- Kim Y.J., Wyslouzil B.E., Weathers R.J., 2002 ².** Invited review : secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. In Vitro Cellular & Developmental Biology, vol. 38, p.p. : 1 – 10.
- Kim Y.J., Wyslouzil B.E., Weathers R.J., 2003.** Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems. Biotechnol. Bioeng., vol. 83, p.p. : 428 – 443.
- Kino-Oka M., Hitaka Y., Taya M., Tone S., 1999.** High density culture of red beet hairy roots by considering medium flow conditions in a bioreactor. Chem. Eng. Sci., vol. 54, p.p. : 3179 – 3186.
- Kondo O., Honda H., Taya M., Kobayashi T., 1989.** Comparison of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 32, p.p. : 291 – 294.
- Ladraa N., 2006.** Induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp.* Mem. Ing. Sc. Agr. INA, 61 P.
- Lahners K., Byrne M.C., Chilton M.D., 1984.** T-DNA fragments of hairy root plasmid pRi8196 are distantly related to octopine and nopaline Ti plasmid T-DNA. Plasmid, vol. 11, p.p. : 130-140.

- Lai E.M., Kado C.I., 2000**, The Ti-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. Trends microbiology, vol. 8, p.p. : 361 – 369.
- Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N., Tepfer D., 1988**. Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbres fruitiers. 8ième colloque sur les recherches fruitières- Bordeaux Ed. INRA-CTIFL, p.p. : 73 - 84.
- Lapostolle F., Flesch F., 2006**. Mise au point : Particularités des nouvelles drogues. Réanimation, n. 15 p.p. : 412–417.
- Larqué-Saavedra A., 1979**. Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. Plant physiology, vol. 93, n. 4, p.p. : 371-375.
- Lebon C., 1971**. *Datura stramonium* L., *Datura tatula* L., étude comparée sur les plants botaniques, chimiques et pharmacodynamique. Th. doct. Paris, 120 P.
- Lee K.T., Yamakawa T., Kodama T., Shimomura K., 1998**. Effects of chemicals on alkaloids production by transformed roots of *Belladonna*. Phytochem., n°49, p.p. : 2343-2347.
- Lee O.S., Kang Y.M., Jung H.Y., Min J.Y., 2005**. Enhanced production of tropane alkaloids in *Scopolia parviflora* by introducing the PMT gene. In vitro cellular & developmental biology, vol. 41, n. 2, p.p. : 167 – 172.
- Mauro N.M., 2006**. Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier – GRENOBLE 1, 186P.
- McKelvey S.A., Gehrig J.A., Hollar K.A., Curtis W.R., 1993**. Growth of plant root cultures in liquid and gas dispersed reactor environments. Biotechnol. Prog., vol. 9, p.p. : 317 – 322.
- Minh T.T.L., Mignard B., Vinter E., Ayala O., Hông P.V.C., Tuyên B.C., Dechaux C., Lanoue A., Boitel-Conti M., Bourgaud F., Gontier E., 2004**. Etude de la production d'alkaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* mill. cultivé en hydroponie ; évaluation d'un procédé générique de production de métabolites végétaux a usage thérapeutique et/ou cosmétique. Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E « Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement », Nancy, p.p. : 322 – 330.
- Moyanoa E., Fornaleb S., Palazona R.M., Cusidoa M., Bonfilla M., Mralesa C., Pinola M.T., 1999**. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants. Phytochemistry, vol. 52, n. 7, p.p. : 1287-1292.
- Mukundan U., Rai A., Dawda H., Ratnaparkhi S., Bhide V., 1998**. Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures. Plant Tissue Culture and Molecular Biology Applications and Prospects, New Delhi House, p.p. : 302 – 333.
- Murashige T., Skoog F., 1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol., n°15, p.p. : 473 - 497.
- Palazon J., Pinol M.T., Cusido R.M., Morales C., Bonfill M., 1997**. Application of transformed root technology to the production of bioactive metabolites. Recent Res. Devel. in Plant Physiol, n. 1, p.p. : 125 - 143.
- Paris R.R., Moysse H., 1971**. Les solanacées médicinales : Matière médicale (matière première d'origine végétale). Ed. Masson et Cie, 6^{ème} édition, Paris.

- Parr A.J., Payne J., Eagles J., Chapman B.T., Robins R.J., Rhodes J.C., 1990.** Variation in tropane alkaloid accumulation within the *Solanaceae* and strategies for its exploitation. *Phytochemistry*, n. 29, p.p. : 2545 – 2550.
- Payne J., Hamill J.D., Robins R.J., Rhodes J.C., 1987.** Production of hyoscyamine by 'hairy root cultures' of *Datura stramonium*. *Planta Medica*, n. 53, p.p. : 474 – 478.
- Pelikan W., 1986.** L'Homme et les plantes médicinales. Tome I, Centre triades, Paris, p.p. : 193 - 196.
- Pinol M.T., Palazon J., Cusido R.S., Ribo M., 1999.** Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Science*, n. 141, p.p. : 41–49.
- Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Giulietti A.M., 2000.** The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 26.
- Poletti A., 1988.** Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Neistlé S.A. Paris, 222 P.
- Primrose S., Twyman R., Old R., 2003.** Principes de génie génétique. 6^{ème} édition, Ed. De Boeck Université, 400 P.
- Quezel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris, 1170 P.
- Ramadan M .F., Zayed R., El-Shamy H., 2007.** Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants. **Food Chemistry**, vol. 103, n. 3, p.p. : 885 - 890.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., 2000.** Biologie végétale. Ed. De Boeck Université, Paris, 944 P.
- Reischman-Berman O., Kigel J., Rubin B., 1989.** Short soaking in water inhibits germination *Datura ferox* L. and *D. stramonium* L. seeds. *Weed research*, n°29, p.p. : 357 - 363.
- Rhodes M.J.C., Robins R.J., Hamill J.D., Parr A.J., Hilton M.G., Walton N.J., 1990.** Properties of transformed root cultures. *Secondary Products from Plant Tissue Culture : Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, vol. 30, p.p. : 201 - 225.
- Roberts F.M., Wink M. (1998).** Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal application. Ed. New York, p.p. : 1 - 7.
- Robins R.J., Walton N.J., Hamill J.D., Parr A.J., Rhodes M.J.C., 1991.** Strategies for the genetic manipulation of alkaloid-producing pathways in plants. *Planta Med.*, n. 57, p.p. : 27 – 35.
- Rolard B., 2002.** Pollution chimique et radioactivité : les plantes au secours de l'Homme. *In* : <http://www.persso.club-internet.fr/phyto2000/pollution.html>
- Sandoval-Yepiz M.R., 2004.** Reguladores de crecimiento XXIII : Efecto del ácido salicílico en la biomasa del cempazúchitl (*Tagetes erecta*). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario, Conkal, Yucatán, México.

- Santavy F., 1970.** In the alkaloids. R.H.F. Mansk academic press, Ed. New York, n. 12, p. 333.
- Sauerwein M., Shimomura K., 1991.** Alkaloid production in hairy roots of *hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochemistry, vol. 30, no. 10, p.p. : 3277 - 3280.
- Schauenberg P., Paris F., 1997.** Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 396 P.
- Schmulling T., Schell J., Spena A., 1988.** Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBOJ, vol. 7, p.p. : 2621 – 2629.
- Scriban R., 1999.** Biotechnologie. Ed. Techniques et documentation. Paris. 1042 P.
- Shaw C.H., Watson M.D., Carter G.H., 1984.** The right hand copy of the nopaline Ti-plasmid 25 pb repeat is required for tumor formation. Nucl. Acids Res., vol. 12, p.p. : 6031 – 6071.
- Shimada N., Toyoda-Yamamoto A., Nagamine J., 1990.** Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, vol. 87, p.p. : 6684 – 6691.
- Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} édition, Ed. De Boeck Université, 945 P.
- Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D. 1986.** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. J. Biol. Chem., vol. 261, p.p. : 108 – 121.
- Spollansky C.T., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., 2000.** Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Electronic Journal of Biotechnology, n.1, by Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Srivastava S., Srivastava A.K., 2007.** Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology, vol. 27, p.p. 29 – 43.
- Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P., 1985.** Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, vol. 318, p.p. : 624 – 632.
- Steck T.R., 1997.** Ti-pladmid type affect T-DNA processing in *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS Microbiol. Lett., vol. 147, p.p. : 121 – 125.
- Sugimoto Y., Sugimura Y., Yamada Y., 1988.** Effects of culture conditions on bisbenzylisoquinoline alkaloid production in cultured roots of *Stephania cepharantha*. Agric. Biol. Chem., n. 52, p.p. : 1495 – 1498.
- Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., 1989.** Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. J. Chem. Eng. Japan, vol. 22, p.p. : 84 – 92.
- Tepfer D., 1984.** Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes* : Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell, vol. 37, p.p. : 959 – 967.

- Tescione L.D., Ramakrishan D., Curtis W.R., 1997.** The role of liquid mixing and gas-phase dispersion in a submerged, sparged root reactor. *Enzyme Microbiol. Tech.*, vol. 20, p.p. : 207 – 219.
- Thurzova L., 1981.** Les plantes-santé qui poussent autour de nous. Bordas, p.p. : 88 -89.
- Tikhomiroff C., 2001.** Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Th. maître es sciences appliquées, Génie chimique, Université de Montréal, Ecole polytechnique, 235 P.
- Tikhomiroff C., 2002.** Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *Agrobacterium tumefaciens*.
- Tinland B., 1996.** The integration of the T-DNA into plant genomes. *Trends plant science*, vol. 1, p.p. : 179 – 262.
- Tinland B., Koukolikova-Nicola Z., Hall M.N., Hohn B., 1992.** The T-DNA linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signal. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, vol. 89, p.p. : 7442 – 7447.
- Toivonen L., 1993.** Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.*, vol. 9, p.p. : 12-20.
- Tranchant J., Arpinaud P., Prevote A., Serpinet J., Vergnol A. et Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition, Ed. Masson, p. 700.
- Veena V., Taylor C.G., 2007.** *Agrobacterium rhizogenes* : recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 43, p.p. : 383 - 403.
- Verdrager J., 1978.** Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Le Datura. Ed. Maloine S.A. Paris.
- Vincent J.M., 1970.** Manual for the practical study of the root nodule bacteria. Ed. IBP. 164 P.
- Volka J., Stodola J., Severa F., 1983.** Plantes médicinales. Ed. Grûnd, 319 P.
- Weathers P.J., Giles, K.J., 1988.** Regeneration of plants using nutrient mist culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, vol. 24, p.p. : 727 – 732.
- Weathers P.J., Wyslouzil B.E, Whipple M., 1997.** Laboratory-scale studies of nutrient mist reactors for culturing hairy roots. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, p.p. : 191 – 200.
- Weathers P.J., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K., Kim Y.J., Yigit E., 1999.** The biological response of hairy roots to O₂ levels in bioreactors. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, vol. 35, p.p. : 286 – 289.
- Wei-Ying C., 2003.** Gene transfer by *Agrobacterium*. <http://www.ppws.vt.edu> .
- Whitney P.J., 1992.** Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, vol. 14, p.p. : 13 – 7.
- Wilson P.D.G., Hilton M.G., Robins R.J., Rhodes M.J.C., 1987.** Fermentation studies of transformed root cultures, Elsevier, p.p. 38 – 51.

Yu S., Doran R.M., 1994. Oxygen requirements and mass transfer in hairy-root culture. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 44, p.p. : 880 – 887.

Zabetakis I., Edwards R., O`Hagan D., 1999. Elicitation of tropane alkaloids biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, n. 50, p.p. : 53 - 56.

Zambryski P., Depicker A., Kruger H., Goodman H., 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens* : analysis of the boundaries of T-DNA .*J. Mol. Appl. Genet.*

Zayed R., Winka M., 2004. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (*Solanaceae*). *Zeitschrift für Naturforschung*, p.p. : 863 - 867.

Annexes

Annexe 1

Germination des graines de *Datura*

Khi-deux

$$\chi^2 = \sum \left(\frac{O_i - C_i}{C_i} \right)^2$$

Avec : O_i = Effectif observé

C_i = Effectif calculé

	Graines germées	Graines non germées	Total
<i>Datura stramonium</i>	63	20	83
<i>D. tatula</i>	77	6	83
<i>D. innoxia</i>	58	25	83
<i>D. ferox</i>	81	2	83
Total	279	53	332

$\chi^2 = 32,57$ (calculé).

χ^2 (dll3) = 7,81 ; χ^2 (dll1) = 3,84 (théoriques).

Induction des chevelus racinaires

	Explants induits	Explants non induits	Total
<i>Datura stramonium</i>	21	19	40
<i>D. tatula</i>	23	17	40
<i>D. innoxia</i>	6	34	40
<i>D. ferox</i>	11	29	40
Total	61	99	160

$\chi^2 = 20,85$ (calculé).

Temps moyen d'apparition de la première racine

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification (p)
Inter-groupes	1705,475	3	568,492	27,231	0,000
Intra-groupes	1189,968	57	20,877		
Total	2895,443	60			

Test de Tukey				
Lignées	N	Sous-ensembles homogènes pour $\alpha = 0,05$		
		A	B	C
DF11	11	11,727		
DI3	6		17,500	
DT10	23		18,000	
DS18	21			26,286

Nombre moyen de racine par explant

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification (p)
Inter-groupes	35,319	3	11,773	3,741	0,012
Intra-groupes	490,925	156	3,147		
Total	526,244	159			

Test de Tukey

Lignées	N	Sous-ensembles homogènes pour $\alpha = 0,05$	
		B	A
DI3	40	0,375	
DS18	40	1,100	1,100
DF11	40		1,425
DT10	40		1,525

Annexe 2

Effet du milieu M5**Sur la biomasse**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	1,391E-02	3	4,638E-03	85,225	0,000
Milieux (B)	1,033E-02	2	5,164E-03	94,889	0,000
A*B	3,870E-03	6	6,450E-04	11,852	0,000
Erreur	1,306E-03	24	5,442E-05		
Total	7,117E-02	35			

Sur le contenu alcaloïdique

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	6,101	2	3,050	312,304	0,000
Milieux (B)	0,356	2	0,178	18,215	0,000
A*B	2,363	4	0,591	60,475	0,000
Erreur	0,176	18	9,767E-03		
Total	8,996	26			

Effet du milieu B5**Sur la biomasse**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	3,394E-02	3	1,131E-02	883,424	0,000
Milieux (B)	6,515E-03	2	3,258E-03	254,388	0,000
A*B	2,679E-03	6	4,465E-04	34,871	0,000
Erreur	3,073E-04	24	1,281E-05		
Total	0,138	35			

Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp :

Sur le contenu alcaloïdique

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	6,186	2	3,093	118,143	0,000
Milieux (B)	4,153	2	2,077	79,326	0,000
A*B	4,520	4	1,130	43,163	0,000
Erreur	0,471	18	2,618E-02		
Total	15,330	26			

Effet de la concentration en azote

Sur la biomasse

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	0,117	3	3,891E-02	1341,559	0,000
Concentrations (B)	2,861E-03	2	1,430E-03	49,322	0,000
A*B	3,690E-03	6	6,151E-04	21,209	0,000
Erreur	6,960E-04	24	2,900E-05		
Total	0,428	35			

Sur le contenu alcaloïdique

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	0,441	2	0,221	19,193	0,000
Milieux (B)	0,595	2	0,297	25,872	0,000
A*B	1,095	4	0,274	23,823	0,000
Erreur	0,207	18	1,149E-02		
Total	2,338	26			

Effet de la concentration en calcium**Sur la biomasse**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	7,111E-02	3	2,370E-02	1424,580	0,000
Concentrations (B)	1,669E-03	2	8,347E-04	50,165	0,000
A*B	4,612E-03	6	7,687E-04	46,196	0,000
Erreur	3,993E-04	24	1,664E-05		
Total	0,354	35			

Sur le contenu alcaloïdique

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA2)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Lignées (A)	3,696	2	1,848	92,242	0,000
Milieux (B)	,824	2	,412	20,572	0,000
A*B	5,292	4	1,323	66,035	0,000
Erreur	,361	18	2,004E-02		
Total	10,174	26			

Annexe 3

Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp :

Elicitation

Poids frais

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1,733	12	0,173	26,377	0,000
Intra-groupes	0,145	26	6,569E-03		
Total	1,877	38			

Test de Tukey

Eliciteurs	N	Sous-ensembles homogènes pour $\alpha = 0,05$							
		H	G	F	E	D	C	B	A
AS4	3	0,005							
AAS4	3	0,005							
AS6	3		0,241						
AJ4	3		0,352	0,352					
T	3		0,448	0,448	0,448				
AAS6	3		0,474	0,474	0,474	0,474			
AS10	3			0,483	0,483	0,483			
AJ6	3				0,644	0,644	0,644		
AAS10	3				0,660	0,660	0,660		
AJ10	3					0,691	0,691	0,691	
AJ8	3						0,877	0,877	0,877
AS8	3							0,905	0,905
AAS8	3								0,992

Poids sec

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	dcl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4,052E-03	10	4,052E-04	48,095	0,000
Intra-groupes	1,853E-04	22	8,424E-06		
Total	4,237E-03	32			

Test de Tukey

Eliciteurs	N	Sous-ensembles homogènes pour $\alpha = 0,05$							
		G	F	E	D	C	B	A	
SA6	3	0,014							
JA4	3	0,016	0,016						
SAA6	3		0,024	0,024					
T	3		0,025	0,025					
SA10	3			0,026	0,026				
JA6	3			0,030	0,030	0,030			
SAA10	3				0,033	0,033			
JA10	3					0,036	0,036		
SA8	3						0,044	0,044	
JA8	3							0,045	
SAA8	3							0,049	

Teneur en alcaloïdes

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	dcl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	58,383	10	5,838	82,841	0,000
Intra-groupes	1,550	22	7,048E-02		
Total	59,933	32			

Test de Tukey						
Eliciteurs	N	Sous-ensembles homogènes pour $\alpha = 0,05$				
		E	D	C	B	A
AS10	3	2,331				
AJ10	3	2,388				
T	3	2,409				
AAS10	3	2,435				
AJ8	3	2,878	2,878			
AS8	3		3,341	3,341		
AAS8	3		3,505	3,505		
AJ6	3			3,815		
AAS6	3				5,118	
AJ4	3				5,585	5,585
AS6	3					6,195

Annexe 4

Perméabilisation**Poids frais**

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	42,327	10	4,233	118,854	0,000
Intra-groupes	0,392	22	3,561E-02		
Total	42,719	32			

Test de Tukey

Perméabilisation	N	Sous-ensemble pour $\alpha = 0.05$				
		E	D	C	B	A
D_T20_2	3	0,183				
D_T20_1	3	0,209				
D_T20_0,5	3	0,264				
D_H ₂ O ₂ _10	3	0,838				
D_H ₂ O ₂ _5	3		2,022			
1_T20_2	3		2,336	2,336		
1_T20_1	3			2,777		
1_H ₂ O ₂ _10	3			2,845		
1_T20_0,5	3			3,079	3,079	
1_H ₂ O ₂ _5	3				3,698	3,698
T	3					4,197

Poids sec

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	0,199	10	1,994E-02	64,541	0,000
Intra-groupes	3,399E-03	22	3,090E-04		
Total	0,203	32			

Test de Tukey						
Perméabilisation	N	Sous-ensemble pour $\alpha = 0.05$				
		E	D	C	B	A
D_T20_2	3	0,008				
D_T20_1	3	0,011				
D_t20_0,5	3	0,019				
D_H ₂ O ₂ _10	3		0,097			
D_H ₂ O ₂ _5	3		0,162	0,162		
1_T20_2	3			0,191	0,191	
1_T20_1	3			0,203	0,203	
1_H ₂ O ₂ _10	3			0,209	0,209	
1_T20_0,5	3			0,218	0,218	
1_H ₂ O ₂ _5	3				0,237	0,237
T	3					0,291

Teneur en alcaloïdes

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	4354,955	10	435,496	2329,131	0,000
Intra-groupes	4,114	22	à,187		
Total	4359,069	32			

Test de Tukey						
Perméabilisation	N	Sous-ensemble pour $\alpha = 0.05$				
		E	D	C	B	A
T	3	0,000				
D_t20_0,5	3	0,000				
D_T20_1	3	0,000				
D_T20_2	3	0,000				
D_H ₂ O ₂ _5	3	0,111				
D_H ₂ O ₂ _10	3	0,254				
1_H ₂ O ₂ _5	3	0,704	0,704			
1_H ₂ O ₂ _10	3		1,591			
1_T20_2	3			11,018		
1_T20_0,5	3				26,160	
1_T20_1	3					33,678

Annexe 5

Bioréacteur

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA1)

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2203,248	4	550,812	2091,034	0,000
Intra-groupes	2,634	10	0,263		
Total	2205,882	14			

Test de Tukey

Jour	N	Sous-ensemble pour $\alpha = 0.05$			
		D	C	B	A
14 ^h ms	3	0,901			
21 ^h ms	3	1,311			
28 ^h ms	3		7,669		
35 ^h ms	3			13,089	
42 ^h ms	3				33,885