

*Production d'alcaloïdes in vitro à partir de  
tissus de Datura stramonium L. et effet  
sur la croissance mycélienne de Fusarium  
oxysporum f.sp. albedinis (Killian et Maire)  
W. L. Gordon.*

**Présenté par : Hadjimi Ghania**

Directeur de thèse: Mme. KHELIFI-SLAOUI M. Professeur ENSA.

Co-directeur: M. KHELIFI L. Professeur ENSA

Année 2011

Président: M. **BOUZNAD** Z. Professeur ENSA Examineurs: M. KEDAD A. Chargé de cours ENSA.  
M. AMDOUN R. Maître de recherche INRF.



# Table des matières

Remerciements . .	5
Résumé . .	6
Summary . .	7
ص خ لم . .	8
Introduction . .	9
Synthèse bibliographique . .	11
I. Le <i>Datura</i> . .	11
1. Généralités sur le <i>Datura stramonium</i> . .	11
2. Propriétés biologiques du <i>Datura</i> . .	14
II. Les alcaloïdes tropaniques . .	17
1. Généralités . .	17
2. Production <i>in vitro</i> . .	21
III. Le <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (F.o.a) . .	24
1. Généralité sur le <i>F.o.a</i> . .	24
2. Stratégies de lutte contre le <i>F.o.a</i> . .	26
Matériels et méthodes . .	29
I. Etude de la biomasse et du contenu alcaloïdique des tissus de <i>Datura</i> . .	29
1. Objectif du travail . .	29
2. Callogenèse . .	29
3. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires . .	33
4. Extraction et dosage de l'hyoscyamine et de la scopolamine . .	36
5. Analyse statistique . .	37
II. Effet des alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne du <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> .(F.o.a) . .	38
1. Objectif du travail . .	38
2. Matériel fongique . .	38
3. Purification et conservation des souches de <i>F.o.a</i> . .	38
4. Préparation des solutions d'alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) . .	38
5. Repiquage des souches du <i>F.o.a</i> . .	39
6. Evaluation de la croissance mycélienne radiale du <i>F.o.a</i> . .	39
7. Analyse statistique . .	40
Résultats et interprétations . .	41
I. Callogenèse . .	41
1. Production des vitro-semis chez <i>D. tatula</i> et <i>D. stramonium</i> . .	41
2. Production des cals . .	41
II. Propriétés de croissances et contenus en hyoscyamine de cultures de chevelus racinaires de <i>D. stramonium</i> et <i>D. tatula</i> et de suspensions cellulaires de <i>D. tatula</i> . .	47
1. Cultures de chevelus racinaires de <i>D. stramonium</i> et <i>D. tatula</i> en milieu liquide avec ou sans hormones de croissance . .	47
2. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de <i>D. tatula</i> en culture en cuvé. . .	49

3. Cultures de chevelus racinaires H <sup>-</sup> de <i>D. stramonium</i> en modes cuvé et semi continu . .	51
III. Activités <i>in vitro</i> des alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne radiale de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . .	53
1. Taux de croissance mycélienne . .	53
2. Taux d'inhibition . .	55
Discussion . .	60
I. Callogenèse induite par hormones et par souches bactériennes. . .	60
1. Production des vitro-semis . .	60
2. Induction des cals . .	60
II. Propriétés de croissances et du contenu en hyoscyamine de cultures de chevelus racinaires de <i>D. stramonium</i> et <i>D. tatula</i> et de suspensions cellulaires de <i>D. tatula</i> . .	62
1. Cultures de chevelus racinaires de <i>D. stramonium</i> et <i>D. tatula</i> en milieu liquide avec ou sans hormones de croissance . .	62
2. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de <i>D. tatula</i> . .	63
3. Cultures de chevelus racinaires H <sup>-</sup> de <i>D. stramonium</i> en modes de culture cuvé et semi continu (Biomasses et rendements en hyoscyamine) . .	64
III. Activités <i>in vitro</i> des deux types d'alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne radiale de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> . .	64
Conclusion . .	66
Références bibliographiques . .	69
Annexes . .	86

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier, ma directrice de thèse, Mme Khelifi-Slaoui M, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'El Harrach (Alger) pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la direction de mon mémoire, sa disponibilité, son aide, ses conseils, le temps passé sur ce travail et les corrections apportées à mon manuscrit. Je la remercie tout particulièrement, pour ses grandes qualités humaines.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Khelifi L, Professeur à l'ENSA et directeur de laboratoire (LRGB) pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et m'avoir ainsi permis de réaliser ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Monsieur **Bouznad Z**, professeur à l'ENSA, pour l'honneur qu'il me fait, en acceptant la présidence de ce jury.

Je remercie Monsieur Kedad A, chargé de cours à l'ENSA, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche de mycologie, de m'avoir fourni les souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Je remercie Monsieur Amdoun R, Maître de recherche à l'INRF d'Alger, pour avoir également accepté de participer à ce jury, pour son aide, ces orientations et ces précieux conseils.

Je remercie Madame Krimi, Maître de conférences à l'université Saad dahleb (Blida) de m'avoir fourni les souches d'*Agrobacterium tuméfaciens*.

Je remercie également, tous les membres de laboratoire LRGB, avec qui j'ai passé ces années de mémoire. Je pense notamment à l'ingénieur de labo Djamila Zaoui, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et la patience dont elle a fait preuve.

Au même titre, je remercie Samia et Radia, ingénieurs de laboratoire d'analyse du sol, à Ami Mouloud et à Fatima technicienne de laboratoire de mycologie de l'ENSA.

Mes remerciements vont aussi à Fatima Silem, à Saliha Chihat et à toute personne qui a participé de près ou de loin à la finalisation de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

Mes remerciements bien sûr à toute ma famille (parents, frères et sœurs, oncles et tantes, cousins et cousines) pour leur aide et leur soutien tout au long de ces années de travail.

## Résumé

Notre travail a porté sur la production *in vitro* d'alcaloïdes tropaniques à partir de différents tissus de *D. stramonium* et *D. tatula* (cals, chevelus racinaires et suspensions cellulaires issues de cals). L'effet *in vitro* de l'extrait brut d'alcaloïdes (issus de chevelus racinaires de *D. stramonium*) en parallèle avec celui de solutions pures (scopolamine et atropine) sur la croissance mycélienne radiale de deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, ont été également étudiés.

Chez *D. stramonium* et *D. tatula*, la Callogenèse est induite par hormones sur différents explants (feuilles, hypocotyles et racines) et par souches d'*A. tumefaciens* (C58, E2x et E17) sur hypocotyles de *D. tatula*. Les résultats montrent que, les souches bactériennes sont les plus performantes pour l'induction de cals à fortes biomasses avec des niveaux en hyoscyamine et scopolamine élevés. La souche E17 est la plus performante des trois souches testées. De plus, les chevelus racinaires H<sup>-</sup> sont les plus performants en termes de biomasse, de production spécifique et de productivité en hyoscyamine. Les chevelus racinaires H<sup>+</sup> dédifférenciés au cours de la culture sous l'influence des hormones perdent essentiellement ces caractéristiques.

Chez *D. stramonium*, le mode de culture en semi continu permet de doubler et de quadruplé la biomasse pour les mêmes durées de cultures (24 jours) et (30 jours) respectivement et de tripler les rendements en hyoscyamine des chevelus racinaires par rapport au mode cuvé quelle que soit la durée de culture.

Quant à l'activité antifongique, ce sont les solutions pures qui se sont révélées efficaces sur les deux souches testées (I et II) et surtout la scopolamine, avec respectivement des taux d'inhibitions de 43% et 39% à 2.5 mg/ml de scopolamine.

**Mots clés:** Activité antifongique, Alcaloïdes tropaniques, Cals, Chevelus racinaires, *D. stramonium*, *D. tatula*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, Suspensions cellulaires.

## Summary

Our work has focused on the *in vitro* production of tropane alkaloids from different tissues of *D. stramonium* and *D. tatula* (callus, hairy roots and cell suspensions from callus). The *in vitro* effect of the crude extract of alkaloids (from hairy root of *D. stramonium*) in parallel with that of pure solutions (atropine and scopolamine) on radial mycelial growth of two strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* are also studied.

In *D. stramonium* and *D. tatula*, the callus are induced by hormones on different explants (leaves, hypocotyls and roots) and by *A. tumefaciens* strains (C58, E17 and E2x) on hypocotyls of *D. tatula*. The results show that bacterial strains are most effective for callus induction at high biomass with a high levels of hyoscyamine and scopolamine. Strain E17 is the most powerful of the three strains tested. In addition, hairy roots H<sup>-</sup> are more efficient in terms of biomass, specific production and productivity of hyoscyamine. The hairy roots H<sup>+</sup> dedifferentiated in culture under the influence of hormones essentially lose these characteristics. In *D. stramonium*, the method of fed-batch culture can double and quadruple the biomass for the same period of culture (24 days) and (30 days) respectively, and triple the yields of hyoscyamine of hairy roots compared to the batch culture whatever the duration of cultures.

As for the antifungal activity, they are the pure solutions, that have proved effective on two strains (I and II) tested and especially scopolamine, with inhibition rates of 43% and 39% with 2.5 mg/ml.

**Keywords:** Antifungal activity, Tropane alkaloids, Callus, Hairy roots, *D. stramonium*, *D. tatula*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, cell suspensions.

## ص خ لم

تركز عملنا في المختبر على إنتاج الفلويدات التروبانية من أنسجة مختلفة للداتورا سترامونيوم و الداتورا ناتولا (كالوسات، جذور مشجرة و خلايا معلقة). درست أيضا في المختبر تأثير مستخلصات الفلويدات الخامة (الناتجة عن الجذور المشجرة للداتورا سترامونيوم) بالتوازي مع المحاليل النقية (سكوبولامين والأثروبين) على النمو المشجعي الشعاعي لسلاطين من فطر الفوزاريوم (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*).

في الداتورا سترامونيوم و الداتورا ناتولا، التكلس حفز بواسطة الهرمونات على أعضاء مختلفة (أوراق، سيقان وجذور) وبواسطة سلالات الأفروبيكتيريوم (E17, E2x et C58) على سيقان الداتورا ناتولا. أظهرت النتائج أن السلالات البكتيرية هي الأكثر فعالية لاستحداث الكالوسات ذات الكتل الحيوية الكبيرة والمستويات العالية من الهيوسيامين والسكوبولامين. سلالة E17 هي أقوى السلالات الثلاث التي تم اختبارها.

وبالإضافة إلى ذلك، الجذور المشجرة H هي الأكثر فعالية من حيث الكتلة الحيوية، الإنتاج المحدد والإنتاجية للهيوسيامين. الجذور المشجرة القاعدة للتمايز (*dédifférenciés*) خلال الزراعة تحت تأثير الهرمونات تفقد أساسا هذه الخصائص. في الداتورا سترامونيوم، النمط الزراعي النصف المستمر يسمح بزيادة الكتلة الحيوية لنفس الفترات الزراعية (24 يوما) و (30 يوما) بضعفين وأربعة أضعاف على التوالي، وزيادة مردود الهيوسيامين بثلاثة أضعاف مقارنة بالنمط المغلق. مهمما كانت الفترة الزراعية.

أما بالنسبة للنشاط المضاد فطري، المحاليل النقية خاصة السكوبولامين هي التي أثبتت فعاليتها على كل من السلالتين (I و II) اللتين تم اختبارهما مع معدلات تثبيت 43% و 39% ل 2.5 ملغ/مل من السكوبولامين على التوالي. **كلمات البحث:** نشاط ضد فطري، فلويدات تروبانية، كالوسات، جذور مشجرة، داتورا سترامونيوم، داتورا ناتولا، *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*، خلايا معلقة.

---

# Introduction

Les plantes représentent une source pratiquement illimitée de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites secondaires végétaux sont d'intérêt majeur à cause de leurs différentes fonctions et de la gamme impressionnante de leurs activités biologiques (L'Ecuyer-Coelho, 2000).

Parmi les métabolites secondaires végétaux, les alcaloïdes tiennent une place importante. Plus de 27 000 alcaloïdes sont structuralement caractérisés, dont environ 21 000 à partir de plantes (Dewick, 2009). Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores (insectes, mollusques et vertébrés), les pathogènes (virus, bactéries et champignons) et les plantes compétitives (Wink, 1993 ; Wink, 1998). Ces alcaloïdes peuvent également être intéressants et importants dans la médecine comme agents pharmaceutiques (Wink, 2008) et dans l'agriculture comme fertilisants biologiques et agents de contrôle dans la protection des plantes (Aniszewski, 2007). Certains alcaloïdes, sont des antibiotiques, mais leurs propriétés peuvent s'étendre à la toxicité envers les animaux (Wink, 2008).

Les alcaloïdes tropaniques sont parmi les familles d'alcaloïdes les plus importantes. Ces substances sont isolées à partir de différentes familles de plantes, telles que les *Solanaceae*, *Erythroxulaceae*, *Convolvulaceae*, *Proteaceae*, *Rhizophoraceae* et *Euphorbiaceae*. Dans les *Solanaceae*, ces alcaloïdes sont présents chez différents genres tels que : *Duboisia*, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Scopolia* et *Datura* (Häkkinen, 2008). Ce dernier figure parmi les plantes possédant des propriétés thérapeutiques importantes qui sont dues à leurs teneurs élevées en scopolamine, hyoscyamine et atropine (Benhizia, 1989 ; Boullard, 2001). De point de vue pharmacologique, ces substances montrent une activité anti-muscarinique (inhibition parasymphatique), qui se traduit au niveau périphérique par des effets antispasmodiques sur les systèmes gastro-intestinal et génito-urinaire (Christen et al., 2007). Elles sont employées, par ailleurs, dans la thérapie humaine et vétérinaire pour les traitements de différentes indications apparentées (Alexander et al., 2008).

Actuellement, il est possible de produire synthétiquement les alcaloïdes tropaniques (scopolamine, hyoscyamine et atropine), mais il est plus économique de les extraire directement à partir de plantes tels que *Datura* spp. (Schmelzer et al., 2008). Cependant les facteurs écophysologiques peuvent influencer le contenu en alcaloïdes des espèces de *Datura* (Loyola Vargas, 1999), tels que les infestations, les maladies, et l'application des pesticides. Une alternative à leur extraction directe à partir de plantes, consiste à les faire produire par des cultures cellulaires *in vitro* (Sasson, 1991 ; Iranbakhsh et al., 2007 ; Wang, 2008). Ce mode de cultures permet de produire des métabolites sous des conditions contrôlées et reproductibles indépendantes des variations géographiques et saisonnières et des facteurs environnementaux (Wang, 2008).

Différentes stratégies utilisant des systèmes *in vitro*, sont étudiées dans le but d'améliorer la production de composés végétaux secondaires tels que les alcaloïdes tropaniques. Bien que les cultures de cellules indifférenciées (cals et suspensions cellulaires) sont utilisées pour la production des alcaloïdes, de nombreux travaux ont mis en évidence la performance des chevelus racinaires (tissus différenciés) (Bourgoud et al.,

2001 ; Amdoun et *al.*, 2007 ; Benrekia, 2008 ; Amdoun, 2009 ; Belabbassiet Benouaret, 2009 ; Harfi, 2009 ; Amdoun, 2010).

Le présent travail a pour but d'étudier d'une part la biomasse et le contenu en alcaloïdes de différents tissus (chevelus racinaires, cals et suspensions cellulaires) chez deux variétés de *Datura* cultivées *in vitro* (*stramonium* ou *eustramonium* et *tatula*) et d'autre part, l'effet des alcaloïdes issus de chevelus racinaires ainsi que les solutions pures (atropine et scopolamine) sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (*F.o.a*). Ce dernier est à l'origine du bayoud, une grave maladie qui a détruit plus de 15 millions de palmier dattier au Maroc et environ 3 millions d'arbres en Algérie. Il touche à l'heure actuelle 32 zones de

Plantations de palmiers dattiers du Sud algérien et atteint les variétés de bonne qualité dattière, y compris la deglet noir, à tous les âges, et constitue une menace réelle pour les palmeraies (Benkhalifa, 2006).

---

# Synthèse bibliographique

## I. Le Datura

### 1. Généralités sur le *Datura stramonium*

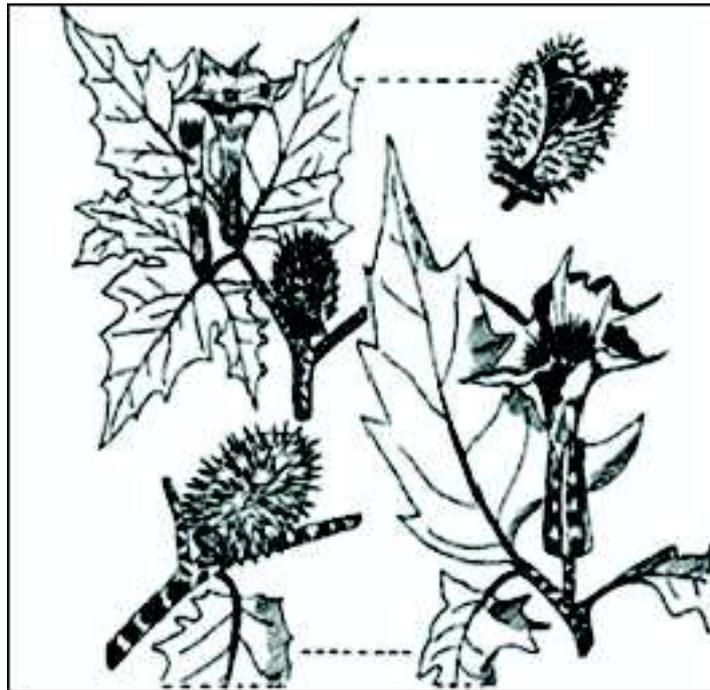
---

Le datura stramoine, *Datura stramonium* L., est une plante annuelle diploïde ( $2n = 2x = 24$ ) de la famille des *Solanaceae* (Schmelzer et al., 2008) connue depuis l'antiquité et utilisée pour ses propriétés pharmacologiques mais aussi pour ses propriétés toxiques, surtout hallucinogènes. Appelé 'chedjret el djinna ou djahanama' en Algérie (Trabut, 1935). Il est également connu ailleurs sous divers appellations: pomme épineuse, herbe aux sorciers, endormie, herbe ou pomme du diable ou chasse-taupe (Bianchini et Corbetta, 1975), Thornapple ou Jimson weed pour les Anglo-Saxons (Mountain, 1987 ; Schmelzer et al., 2008). Le mot *Datura* est dérivé du nom arabe « *tatorah* » ou du nom indien '*Dhatura*' (Mountain, 1987).

#### 1.1. Caractéristiques de la plante

Le *Datura stramonium* est une plante vigoureuse mesurant 1 à 2 mètre de haut (Daniel, 2006), à tige robuste, creuse, simple, droite (Nelson et al., 2007), ronde, rigide et ramifiée en tous sens (Fluck, 1977). Les feuilles sont alternes, simples, ovales, dentées, glabres et portées sur des petits pétioles (Mountain, 1987). A l'état frais, les feuilles dégagent quand on les écrase une odeur nettement désagréable (Masurel, 2007).

Les fleurs de couleur blanches rosées ou violacées, possèdent une corolle en cornet, plissée, évasée à son sommet en cinq lobes (figure 1) (Boullard, 2001). Elles se ferment pendant la journée et s'ouvrent le soir (Schmelzer et al., 2008). Le fruit est une capsule ovale, épineuse, à 4 valves qui s'ouvrent à maturité pour libérer de nombreuses graines brun-noires (Plan, 1988 ; Nelson et al., 2007). La plante fleurit en été et ses fruits arrivent à maturité au cours de l'automne (Masurel, 2007). La racine est très longue, épaisse et blanchâtre, donnant de nombreuses fibres (Board, 2004).



**Figure 1:** Feuilles, fleurs et capsules du *Datura stramonium*: en haut. Capsules, feuilles et fleurs du *D. tatula*: en bas (G x 1.5) (Boullard, 2001).

L'origine de *Datura* est probablement mexicaine (Valnet, 1983 ; Boullard, 2001), mais sa distribution est aujourd'hui mondiale, il pousse en Amérique, en Europe, en Asie et en Afrique du Nord (Verdrager, 1978 ; Iserin, 1997). En Algérie, il est cosmopolite, on le retrouve du littoral jusqu'au Sahara central (Quezel et Santa, 1962), où il pousse comme mauvaise herbe et sur des terrains incultes (Houmani et al., 1994). Il est souvent rencontré en adventice dans des cultures maraîchères et céréalières (Bruneton, 2005), ce qui représente un réel problème pour l'agriculture. Il est également facilement cultivé (Board, 2004), il pousse bien dans les endroits ouverts et ensoleillés (Board, 2004) et dans les sols légers, riches en matière organique et bien drainés (Board, 2004). Il tolère tous les types de sols mais préfère les sols argileux ou limoneux (Schmelzer et al., 2008).

Selon la nouvelle classification, il existe quatre variétés de *Datura stramonium*: *Datura stramonium* L. var. *stramonium*, *D. stramonium* var. *tatula* (L.) Torr., *D. stramonium* var. *inermis* (Juss. ex Jacq.) Schinz & Thell. et *D. Stramonium* var. *godronii* (Danert.) Geerinck & Walravens. (Bercove et al., 2006). La variété *tatula* du *D. stramonium*, diffère de la variété *stramonium* par la teinte violette de ses tiges, de ses pétioles, de ses nervures foliaires et par la couleur violet-pourpre de ses fleurs. Mais sa composition chimique étant comparable (Boullard, 2001).

## 1.2. Composition chimique

Toute la plante est violemment vénéneuse (Jouzier, 2005). Elle renferme des alcaloïdes de nature tropanique dont la teneur oscille entre 0.2 et 0.6% de la plante sèche (Gaillard et al., 2001 ; Sandberg, 2001 ; Goullé, 2004). Les deux principaux sont l'hyoscyamine et la scopolamine, répartis en 1/3 de scopolamine et 2/3 d'hyoscyamine ou atropine (Gaillard et al., 2001 ; Sandberg, 2001 ; Arouko et al., 2003 ; Daniel, 2006 ; Harlay et al., 2008). Ces alcaloïdes sont localisés dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fleurs et graines), mais avec des concentrations diverses. Les feuilles ont une

teneur de 0.3 à 0.4% en alcaloïdes totaux au stade floraison, les graines de 0.3 à 0.6 %, les fleurs : 0.32% pour le calice et 0.02% dans la corolle et les racines : 0.3% (Gaillard et al., 2001 ; Arouko et al., 2003). En plus des principaux alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine), d'autres alcaloïdes mineurs sont identifiés dans les espèces de *Datura* (Alexander et al., 2008). Chez *D. stramonium*, plus de 70 alcaloïdes dans les différentes parties de la plante (Schmelzer et al., 2008) et huit alcaloïdes dans les graines, dont le 6-hydroxyatropine et le 6hydroxyapoatropine qui sont détectés pour la première fois dans les graines de cette espèce (El Bazaoui et al., 2009).

Les alcaloïdes de *Datura* sont formés dans les racines et sont transportés aux feuilles, aux fleurs et finalement aux fruits (Schmelzer et al., 2008). Ils apparaissent quelques heures après la germination des graines (Milcent et Chau, 2003).

La proportion de l'hyoscyamine par rapport à la scopolamine chez *D. stramonium* est influencée par le stade de développement de la plante. Chez les plantes jeunes, la scopolamine est le principal alcaloïde, tandis que l'hyoscyamine devient généralement l'alcaloïde dominant lorsque la formation de la fleur commence (Benhizia, 1989; Houmani et al., 1994 ; Schmelzer et al., 2008). L'hyoscyamine est synthétisée au niveau des racines et époxydée en scopolamine dans les feuilles jeunes, ce qui explique la forte teneur de celles-ci en scopolamine alors que les feuilles adultes sont plus riches en hyoscyamine (Michel, 2001).

Les facteurs environnementaux peuvent également influencer les variations de la teneur alcaloïdique de *D. stramonium* tels que: la distribution géographique (Houmani, 1999), l'éclairement (Cosson et al., 1966), la température de l'air (Benhizia, 1989 ; Houmani et al., 1994), le stress hydrique (Felidj et Houmani, 2007), les virus (Duarte et al., 2008), les insectes herbivores et la santé de la plante (Shonle et Bergelson, 2000).

En plus des alcaloïdes tropaniques, le *D. stramonium* contient, des flavanoïdes, Withanolides, coumarines et tanins (Iserin, 1997). Dans les feuilles, Banso et Adeyemo (2006) identifient en plus les saponines et les glycosides. Les feuilles contiennent également 17 à 20% de cendre et sont riches en nitrate de potassium, elles contiennent en outre des traces des huiles volatiles, gomme, résine, amidon et d'autres substances. Les constituants des graines sont pratiquement les mêmes que ceux des feuilles, mais elles contiennent en plus environ 25% des huiles fixes (Board, 2004).

### 1.3. Multiplication, plantation et récolte de *Datura stramonium*

Le *Datura stramonium* se cultive généralement à partir de graines semées soit directement en champs soit en pépinières. Un trempage des graines pendant la nuit améliore la germination. Il faut 7-8 kg de graines à l'hectare. La graine commence à germer au bout d'environ 2 semaines et la germination est achevée au bout d'un mois. Si les graines sont semées en pépinières, les plants sont repiqués lorsqu'ils font 8-12 cm de haut. L'espacement normal est de 70-100 cm (Schmelzer et al., 2008). Selon Marwat et al. (2005), la température de 30°C ainsi que le terreau de feuilles constituent les meilleures conditions pour la germination des graines de *D. stramonium*. Par ailleurs, la meilleure période de récolter le *Datura* est de 8 semaines après le semis, car la teneur en alcaloïdes atteint alors son maximum, il est conseillé aussi de récolter les feuilles en début de matinée ou en fin d'après midi (Schmelzer et al., 2008).

La germination des graines de *Datura* peut se faire également *in vitro*. Les meilleures germinations sont obtenues avec les graines scarifiées et non trempées dans l'eau (Rezine, 2004 ; Khelifi-Slaoui et al., 2005).

La multiplication *in vitro* est une autre méthode de multiplication de *Datura*. La régénération peut se faire soit directement à partir de morceaux de la plante mère tels que: les feuilles, tiges, noeuds, racines, hypocotyles (**Lindsay et Yeoman, 1983 ; Saïbi, 2006**), soit à partir de cals organogènes (**Kurian, 2007**). Par ailleurs, elle peut se produire par culture d'anthers (**Dunwell et Sunderland, 1976**).

## **2. Propriétés biologiques du *Datura***

---

### **2.1. Propriétés pharmacologiques et toxiques**

#### **2.1.1. Propriétés pharmacologiques**

Les principes actifs biologiques de *Datura* responsables des effets pharmacologiques sont principalement l'hyoscyamine (ou son racémique l'atropine) et la scopolamine ou hyoscine (**Ivancheva et al., 2006**). Ces derniers sont employés actuellement dans la thérapie humaine et vétérinaire (**Alexander et al., 2008**) grâce à leurs propriétés parasympholytiques, ils agissent en se liant aux récepteurs muscariniques de l'acétylcholine dans le système nerveux central et périphérique (**Quetin-leclercq, 2002 ; Brown et Taylor, 2006 ; Ivancheva et al., 2006 ; Schmelzer et al., 2008 ; Adams et al., 2009**).

L'atropine et l'hyoscyamine ont les mêmes activités pharmacologiques. L'hyoscyamine est plus active que l'atropine (Puderssell, 2006 ; **Schmelzer et al., 2008**), son activité biologique est (2 à 2.5 fois) plus élevée que celle de l'atropine (Puderssell, 2006), mais c'est cette dernière qui est habituellement préparée et utilisée en thérapie (Bruneton, 1987 ; **Schmelzer et al., 2008**). Elle augmente la fréquence cardiaque (tachycardie), provoque un relâchement et une inhibition motrice des muscles lisses, diminue les sécrétions (salivaires, gastrique, sudorale, pancréatique, bronchique et lacrymale), induit une dilatation des pupilles (mydriase) avec arrêt de l'accommodation (cycloplégie) (Moulin et coquerel, 2002 ; **Schmelzer et al., 2008 ; Adams et al., 2009**). Cette dernière propriété étant mise à profit en ophtalmologie pour faciliter l'examen de l'œil (Gryniewicz et Gadzikowska, 2008).

L'atropine a également une action antispasmodique qui est utile pour soulager les symptômes de divers troubles gastro-intestinaux, dont les spasmes, les ulcères peptiques, les syndromes d'irritabilité intestinale, la pancréatite, les coliques et les inflammations de la vésicule (Gryniewicz et Gadzikowska, 2008 ; **Schmelzer et al., 2008**). Elle est également utile pour soulager certaines affections cardiaques et empêcher l'apparition de certains symptômes de la maladie de Parkinson (**Schmelzer et al., 2008**). De plus, elle est utilisée comme antidote spécifique dans les intoxications aiguës par les insecticides organophosphorés et carbamates ou par les médicaments parasymphicomimétiques ou cholinomimétiques (Bruneton, 1995). Aux doses appliquées à l'usage clinique, l'atropine n'a qu'une légère action sur le système nerveux central (SNC), et ses effets périphériques sont dépendants de la dose administrée (Brust, 2007). Elle est utilisée sous forme de sulfate d'atropine et d'atropine N-oxyde (**Ginestes et al., 2002**).

La scopolamine est un parasympholytique, comme l'atropine, mais en revanche, au niveau central elle a une action dépressive, sédative, hypnotique, amnésiante, potentialisatrice des neuroleptiques et antiparkinsonienne (Bruneton, 1995). La scopolamine est mieux préférée que l'hyoscyamine pour son activité physiologique plus élevée et ses effets secondaires moindres (Häkkinen et al., 2005 ; Palazón et al., 2008 ;

Cardillo et al., 2008). On estime que la demande du monde en cet alcaloïde est environ 10 fois plus importante que pour l'hyoscyamine et sa forme racémique l'atropine (Palazón et al., 2008). Elle est utilisée sous forme d'oxyde bromhydrate ou de scopolamine oxyde (Génoscolamine, Scopoderme) (Ginestes et al., 2002). Il existe plusieurs marques commerciales pour l'hyoscyamine et l'atropine sur le marché mondial (Schmelzer et al., 2008): l'Atropinal par exemple, est basé sur l'atropine, ce médicament contient du sulfate d'atropine, le Buscopane est basé sur la scopolamine, alors que le Bellasanol contient l'hyoscyamine (Aniszewski, 2007).

Les *Datura* possèdent également des propriétés antimicrobiennes et antiparasitaires qui peuvent être utilisées contre différentes maladies infectieuses chez l'Homme et les animaux. Selon Sharma et Patel (2009), les extraits acétoniques de *D. stramonium* (scopolamine et atropine) ont une activité antibactérienne contre les bactéries gram négatives *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus* qui provoquent le choléra. En outre Bayoud et al. (2007), mentionnent que les extraits éthanoliques et les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *D. stramonium* ont des propriétés antimicrobiennes contre: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Uma Reddy et al. (2009) rapportent également que les extraits éthanoliques de *D. stramonium* (4, 6, et 8 mg/0.2 ml) ont une activité antimicrobienne et une inhibition du taux de croissance de: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Fusarium spp.*

Le *D. stramonium* peut être également utilisé pour le traitement des mycoses chez l'Homme et les animaux tels que les aspergilloses et les candidoses. Les résultats *in vitro* de Saadabi (2006) montrent que les extraits de *D. stramonium* provoquent un effet toxique sur certaines espèces d'*Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*) et *Candida albicans*.

L'activité anticancéreuse du *Datura* est également évaluée *in vitro*. Selon Ahmad et al. (2009), les extraits aqueux de *D. stramonium* peuvent être utilisés pour le traitement de différents types de cancers, les différents extraits (1 mg/ml pour 24 et 40 h) ont un effet cytotoxique sur différentes cellules cancéreuses *in vitro* de la tête, du: sein cou et poumon.

### 2.1.2. Toxicité

En plus de leur intérêt pharmaceutique, ces substances, à de fortes doses exercent des effets toxiques sur les humains et les animaux.

Chez les humains, l'intoxication avec l'hyoscyamine, l'atropine et la scopolamine ainsi que le matériel végétal des *Solanaceae* contenant ce type d'alcaloïde est dû au blocage parasymphatique (Eick, 2008). Des doses toxiques d'atropine provoquent une excitation du SNC caractérisé par une agitation, un delirium, ou des hallucinations suivies par le coma et une insuffisance respiratoire. En revanche, de faibles doses de scopolamine provoquent l'euphorie, une somnolence, une amnésie et un sommeil sans mouvement oculaire rapide, probablement, en raison de la capacité de cette substance à traverser plus facilement la barrière hémato-encéphalique (Brust, 2007). A plus fortes doses, les effets sont voisins de ceux constatés avec des doses toxiques d'atropine, comme la stimulation centrale avec agitation, hallucinations ou délire (Goullé, 2004). L'intoxication avec l'hyoscyamine est comparable à celle de l'atropine (Reichl et al., 2004).

Chez l'adulte, les doses toxiques sont de 5 mg d'atropine et de 4 mg de scopolamine (Bruneton, 2005). Chez l'enfant la dose toxique est évaluée à 0.1 mg/kg pour l'atropine et la scopolamine (soit de 2 à 5g de graines) (Bruneton, 2005 ; Goullé, 2004). Ces intoxications sont rarement directement mortelles, mais leur pouvoir létal est très variable d'un individu à

l'autre (**Brust, 2007**). Chez l'adulte, la dose létale d'atropine est supérieure ou égale à 10 mg (**Reichl et al., 2004 ; Bruneton, 2005**), celle de la scopolamine est supérieure à 2 à 4 mg (**Goullé, 2004**).

Chez les animaux, les porcs sont parmi les espèces les plus sensibles à l'intoxication par le *Datura*, suivis par les bovins, chevaux, et poulets. Par contre, les moutons et les lapins sont plus résistants à la présence d'atropine dans les aliments, parce qu'ils synthétisent l'enzyme atropine estérase qui désactive les alcaloïdes (**Piva et Piva, 2006**). Selon ces auteurs, les symptômes cliniques sont partiellement semblables pour les différentes espèces, ils sont caractérisés par: une réduction de la consommation, de croissance, de motilité gastro-intestinale et de l'activité sécrétoire; sécheresse extrême de la bouche; augmentation de la respiration et la fréquence cardiaque, dilatation des pupilles, etc.

## **2.2. Propriétés biopesticides**

En plus de son rôle dans la pharmacologie humaine et vétérinaire, le *Datura* trouve plusieurs autres applications dans de multiples domaines tels que la lutte et l'agriculture biologiques.

Dans le cadre de la lutte biologique, les *Datura* peuvent être utilisés comme moyen alternatif pour lutter contre plusieurs ravageurs tels que les insectes et les nématodes ainsi que les pathogènes grâce à leur activité biopesticide.

Actuellement, des essais *in vitro*, montrent l'effet bio insecticide des extraits de *Datura* contre les insectes phytophages et ceux des denrées. **Ramya et al. (2008)** rapportent que les extraits aqueux de *Datura metel* montrent un effet larvicide contre *Helicoverpa armigera* (noctuelle de la tomate ou chenille du cotonnier). Alors que les extraits de *D. metel* provoquent un effet toxique sur les insectes des denrées: *Tribolium castaneum* Herbst. (**Singhvi et al., 2001**) et *Tribolium confusum* (**Singhvi et al., 2002**).

Par ailleurs, il a été démontré que les extraits organiques (acétone et pét-éther) de feuilles de *D. alba* ont une activité insecticide contre le trogodermite des graines (*Trogoderma granarium*) affectant les graines de stockage de blé (**Dwivedi et Shekhawat, 2004**). Les doses élevées des extraits chloroformiques de feuilles (les alcaloïdes) de *D. alba* sont également toxiques sur les aphides et les fourmis noires (**Kuganathan et al., 2008**).

En Afrique, en Inde, aux Philippines et en Amérique du Sud, les extraits de *D. metel* sont utilisés comme amendements organiques nématicides dans les sols cultivés (**Cayrol et al., 1992**). Actuellement, des essais *in vitro* montrent que les extraits aqueux de *D. alba* présentent une activité larvicide contre le nématode à galles des racines, *Meloidogyne javanica* (**Abid, 1996**) et le nématode des citrus, *Tylenchulus semipenetrans* (**Ahmed et al., 2004**).

En outre, des essais *in vitro* montrent que les extraits aqueux de feuilles de *Datura stramonium* sont responsables d'une activité antifongique envers différents champignons phytopathogènes tels que : *Alternaria alternata* (**Türküsay et Ongur, 1989 ; Anand et Bhaskaran, 2009**), *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Drechslera sorokiniana* (**Türküsay et Ongur, 1989**), *Botrytis ricini* (**Mehtab et al., 2002**), *Colletotrichum capsici* (**Sinha et al., 2004 ; Anand et Bhaskaran, 2009**), *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumuni* (**Sharma et Trivedi, 2002**). De même les extraits aqueux et organiques ont un effet toxique sur différentes espèces d'*Aspergillus* qui sont isolées à partir desorgho, maïs et paddy (**Satish et al., 2007**) et *Fusarium mangiferae* (**Usha et al., 2009**).

Par ailleurs, les extraits *in vitro* aqueux et organiques de feuilles de *D. metel* ont un effet antifongique contre *Rhizoctonia solani* et même un effet bactéricide contre la bactérie

*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, causant la brûlure bactérienne du riz (Kagale et al., 2004). De même les extraits aqueux de feuilles de *D. alba* (à concentration de 3%) ont un effet inhibiteur sur la croissance *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, agent causal de la brûlure bactérienne du cotonnier (Khan et al., 2000).

Les *Datura* possèdent en outre une activité allélopathique contre les plantes compétitives. Des essais *in vitro* montrent que les alcaloïdes issus des graines de *D. stramonium* (hyoscyamine et scopolamine) inhibent la croissance des semis du tournesol *Helianthus annuus* L. (Levitt et Lovett, 1984), ainsi que la germination et l'élongation racinaire de *Linum usitatissimum* L. (Lovett et al., 2006) ; celles du riz et de sa mauvaise herbe *Echinochloa colonum* L. (Sondhia et Swain, 2002) et la germination de semis précoce des deux céréales (blé et orge) (Lovett et Potts, 1987). Les extraits aqueux de *Datura* inhibent également la germination et la longueur racinaire du maïs (Šćepanović et al., 2008).

Par ailleurs, l'allélopathie de *Datura* pourrait être utilisée pour lutter contre les mauvaises herbes du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Javaid et al. (2008), affirment que les extraits aqueux et organiques (méthanol et hexane) des racines et parties aériennes de *D. metel* L. entraînent une inhibition de la germination des graines, une réduction de la croissance des racines et des parties aériennes et de la biomasse des plants de *Phalaris minor* Retz.

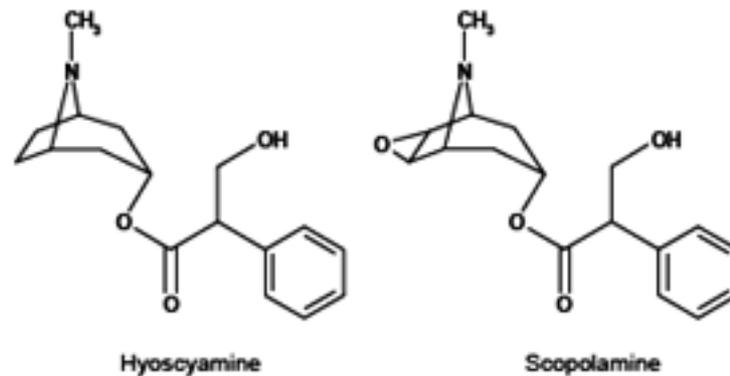
## II. Les alcaloïdes tropaniques

### 1. Généralités

#### 1.1. Structure

Le terme d'alcaloïdes tropaniques désigne un groupe de plus de 200 composés, connus surtout pour leur présence dans les plantes de la famille des *Solanaceae* comprenant plus de 100 genres et 3000 espèces végétales. Ils ont en commun une structure bicyclique, caractérisée par un cycle pyrrolidine et un cycle pipéridine partageant un seul atome d'azote et deux atomes de carbone. L'atome d'azote à l'extrémité de la molécule, typique des composés comme les alcaloïdes est généralement méthylé. Les alcaloïdes tropaniques naturels les plus importants sont la (-)hyoscyamine et la (-)scopolamine (Alexander et al., 2008).

L'atropine (DLhyoscyamine) et la scopolamine sont des esters d'alcools tropaniques (tropanol et scopanol, respectivement) et de l'acide tropique (Broadley, 1996 ; Christen et al., 2007 ; Alexander et al., 2008). L'hyoscyamine de formule brute  $C_{17}H_{23}NO_3$ , qui est une base lévogyre se transforme facilement en DLhyoscyamine (Atropine) forme racémique dont la formule brute est identique. La scopolamine ( $C_{17}H_{21}NO_4$ ) dont la structure est très voisine de l'atropine et de l'hyoscyamine possède en plus de ces deux molécules un atome d'oxygène sur le noyau tropane (Goullé, 2004) (figure 2).



**Figure 2:** Structure chimique des alcaloïdes tropaniques hyoscyamine et scopolamine (Palazón et al., 2008).

## 1.2. Biosynthèse

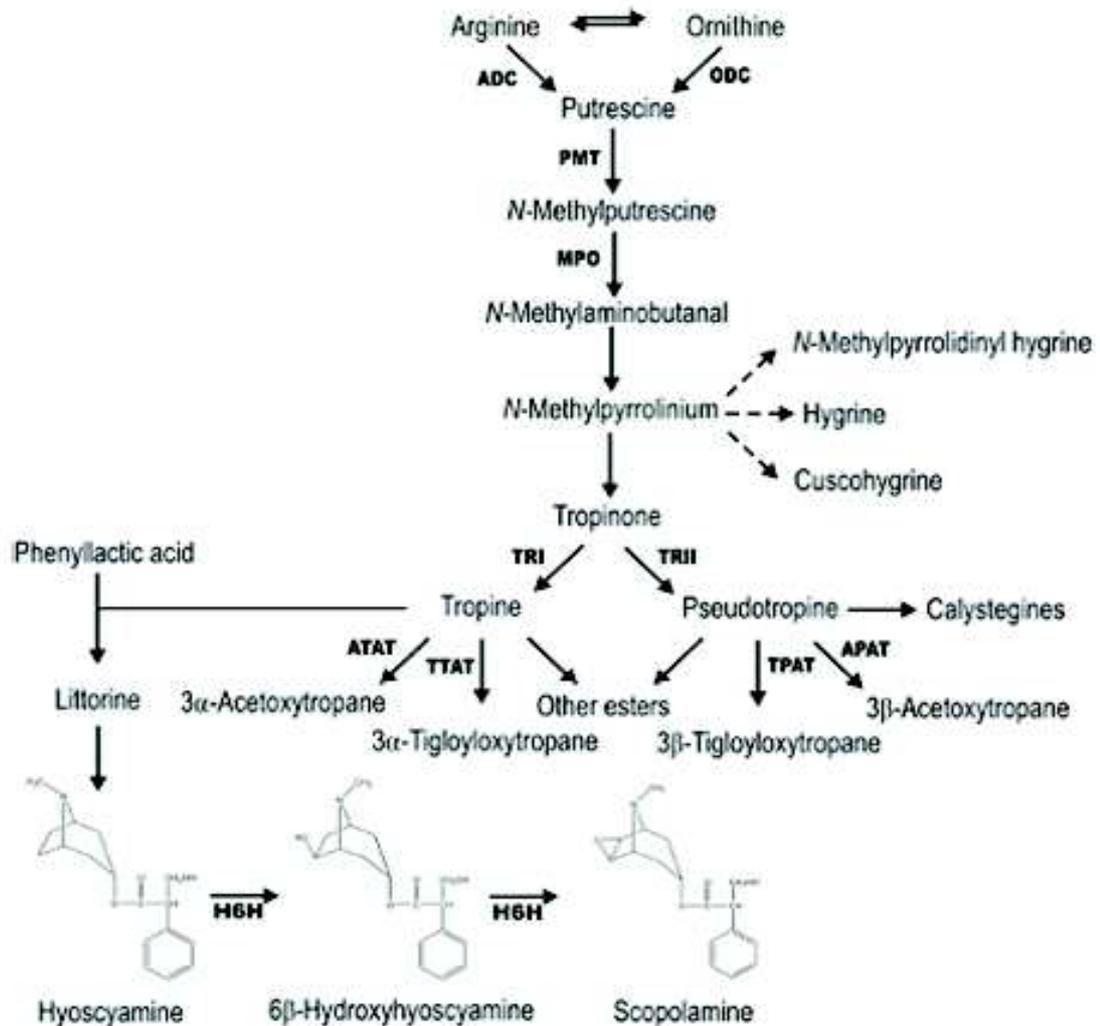
La biosynthèse des alcaloïdes tropaniques débute avec les acides aminés, ornithine et arginine (Häkkinen, 2008) (figure 3), ces derniers sont impliqués dans la biosynthèse de la putrescine. La décarboxylation de l'ornithine donne la putrescine directement, tandis que l'arginine doit être transformée en agmatine pour produire la putrescine (Palazón et al., 2008).

La N-méthylation de putrescine catalysée par l'enzyme N-méthyltransférase (PMT) est la première étape de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Herbert, 2003). Cet enzyme catalyse le transfert de groupement méthyle de S-adenosyl-L-méthionine au groupement amine de la putrescine (Kutchan, 1995). La désamination oxydative de la N-méthyl putrescine conduit au 4-méthyl-aminobutanal qui est ensuite cyclisé en cation N-méthyl pyrrolinium (Bruneton, 1995). Ce dernier est attaqué par un anion formé à partir de l'acide acétique pour former le composé (hygrine-1' acide carboxylique). Ce composé est à l'origine de la biosynthèse de l'hyoscyamine via l'hygrine, un alcaloïde et la tropinone (Milcent et Chau, 2003).

Deux tropinone réductases (TR) sont isolées et caractérisées à partir de cultures des racines de plusieurs espèces (Richter et al., 2005). TR-I produit la tropine (3 $\alpha$ -hydroxytropane) (Grynkiewicz et Gadzikowska., 2008) qui est ensuite estérifiée avec l'acide tropique (acide phényllactique) pour former la littorine (R phényllactate de tropanol) (Robins, 1998). Tandis que TR-II catalyse la formation de pseudotropine (3 $\beta$ -hydroxytropane) (Grynkiewicz et Gadzikowska., 2008) qui est ensuite convertie rapidement en calystegine (Palazón et al., 2008).

L'acide phényllactique est un dérivé de la phénylalanine par l'intermédiaire de l'acide phénylpyruvique (Robins, 1998). Des études de marquage isotopique sur les cultures de chevelus racinaires transformées de *D. stramonium* ont démontré que la littorine est le précurseur direct de la biosynthèse de l'hyoscyamine par un réarrangement intramoléculaire (Duran-patron et al., 2000). L'hyoscyamine est convertie en scopolamine dans deux étapes catalysées par l'enzyme hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase (H<sub>6</sub>H) (Zhang, 2004 ; Häkkinen et al., 2005). Cet enzyme catalyse l'hydroxylation de l'hyoscyamine en 6 $\beta$ -hydroxyhyoscyamine et l'époxydation de ce dernier en scopolamine (Cardillo et al., 2008) (figure 3).

Les alcaloïdes sont formés dans la racine puis transportés par le xylème vers les parties aériennes de la plante où ils s'accumulent en quantités différentes dans les feuilles, fleurs et fruits (Harborne, 1999).



**Figure 3:** Voies biosynthétiques des alcaloïdes tropaniques

- **ADC**, arginine décarboxylase;
- **ODC**, ornithine decarboxylase;
- **PMT**, putrescine N-méthyltransferase;
- **MPO**, N-méthylputrescine oxydase;
- **TRI**, tropinone reductase I;
- **TRII**, tropinone reductase II;
- **ATAT**, acetyl-CoA:tropine acyl transferase;
- **TTAT**, tigloyl-CoA:tropine acyl transferase;
- **TPAT**, tigloyl-CoA:pseudotropine acyl transferase;
- **APAT**, acetyl-CoA: pseudotropine acyl transferase;
- **H6H**, hyoscyamine-6β-hydroxylase (Häkkinen, 2008).

### **1.3. Extraction et analyse**

Les alcaloïdes sont rarement libres dans la plante mais ils sont plutôt sous formes de glucosides ou de sels d'acide malique, tartrique, ou citrique (**Milcent et Chau, 2003**), leur extraction est basée sur la différence de leur solubilité en milieu acide et alcalin (**Harlay et al., 2008**).

Ils sont séparés des autres constituants du végétal qui possèdent les mêmes solubilités quelque soit le pH. Après avoir pulvérisé la poudre végétale, elle est mise en contact avec des liquides d'extractions, il existe trois types d'extractions : par les solvants organiques non polaires ; les solvants organiques polaires ou par l'eau acide (**Harlay et al., 2008**).

La solubilité des alcaloïdes est fonction du pH : Les alcaloïdes bases sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (alcool, éther, chloroforme, etc). Par contre, les sels d'alcaloïdes sont solubles dans l'eau mais insolubles dans les solvants organiques (**Harlay et al., 2008 ; Guggisberg et Hesse, 2001**).

La solubilité dans l'eau est importante pour l'utilisation thérapeutique des alcaloïdes (**Guggisberg et Hesse, 2001**). Pour les alcaloïdes tropaniques, la solubilité dans l'eau permet une extraction sélective avec une solution aqueuse acide, à l'exclusion des composés lipophiles et fournit ainsi aux extraits peu de contaminants (**Dräger, 2002**). 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 (**Dräger, 2002**).

Les techniques d'extractions utilisées pour avoir des échantillons représentatifs pour l'analyse incluent l'extraction: liquide-liquide avec un solvant non miscible et l'extraction en phase solide (**Dräger, 2002 ; Alexander et al., 2008**).

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 miscibles avec l'eau. Les solutions alcalines sont préjudiciables pour les alcaloïdes esters tels que l'hyoscyamine et la scopolamine, qui sont hydrolysés dans des conditions de base (**Dräger, 2002**).

L'extraction à grande échelle de l'hyoscyamine et de la scopolamine par fluide supercritique (SFE) avec CO<sub>2</sub> modifiée par l'addition du méthanol s'avère une alternative intéressante pour les méthodes d'extraction classiques, parce qu'elle est polyvalente, reproductible et permet de récupérer le dissolvant organique (**Brachet et al., 1999**).

L'extraction est cruciale pour obtenir des données qualitatives et quantitatives fiables, et doit être adaptée à la matrice et les composés étudiés (**Dräger, 2002**). Principalement la chromatographie en phase gazeuse (CPG), et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sont souvent utilisées pour l'identification des alcaloïdes tropaniques, hyoscyamine et scopolamine (**Papadoyannis, 1999 ; Dräger, 2002**).

La chromatographie en phase gazeuse repose sur l'adsorption ou le partage d'un mélange en deux phases non miscibles. La phase mobile est un gaz. La phase stationnaire est un solide (chromatographie d'adsorption) ou un liquide (chromatographie de partage). Les solutés à séparer doivent pouvoir être entraînés au sein de la phase mobile. Elle nécessite d'opérer dans des colonnes spéciales, portées à haute température afin de maintenir les molécules sous forme gazeuse pendant leur séparation. La séparation des molécules à analyser peut résulter d'un partage entre le support solide lui-même et le gaz : c'est la chromatographie gaz / solide. Le plus souvent, les séparations sont dues à un

partage des molécules à analyser entre le gaz qui circule et une phase liquide qui imprègne le support inerte: c'est la chromatographie gaz / liquide. Les molécules sortent de la colonne séparément, celles qui ont le moins d'affinité pour le support, les premières. Leur détection à la sortie de la colonne s'effectue par un appareillage qui diffère des dispositifs utilisés en chromatographie liquide parce que l'état de vapeur requiert d'utiliser des propriétés physiques plus sensibles (**Aurrousseau, 2009b**).

La chromatographie liquide à haute performance repose sur la séparation de composés dans un liquide (phase mobile) qui progresse dans une colonne contenant un matériau de fine granulométrie appelé phase stationnaire.

La séparation s'opère suivant les interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire (**Aurrousseau, 2009a**). Une phase mobile, liquide, dont la composition sera fonction du type de phase stationnaire utilisée et de la résolution recherchée, est soigneusement filtrée et dégazée. Cette phase est poussée par l'intermédiaire d'une pompe à débit constant au niveau d'un système d'injection. Après dépôt d'un volume défini d'échantillon à analyser, la phase mobile entraîne ce dernier sur une phase stationnaire de nature et de dimensions connues adéquate avec la phase mobile. Les différents composants seront séparés par interactions phase mobile / phase stationnaire / échantillon. Ils sont ensuite détectés.

Des traitements des données ; enregistrements et chromatogrammes, intégrations des données et traitements informatiques, permettront d'évaluer la séparation, d'identifier et de quantifier les divers composants (**Aurrousseau, 2009a**).

De nos jours, ces techniques simples sont utilisées en relation avec des appareils de détection et de reconnaissance des molécules plus puissants (Spectrométrie de Masse, Résonance Magnétique Nucléaire, entre autres...) (**Aurrousseau, 2009a**).

## 2. Production *in vitro*

---

La recherche sur la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est considérablement facilitée par le développement des techniques de cultures *in vitro*. Celles-ci constituent une source alternative pour la production des métabolites secondaires valables. Elles peuvent être divisées en deux classes principales, les cultures de tissus différenciées ou d'organes comme les pousses ou embryons et les cultures de cellules indifférenciées, comme les suspensions cellulaires issues de cals (**Eckhart et Wink, 2004 ; Häkkinen, 2008**).

### 2.1. Culture de tissus indifférenciés (cals et suspensions cellulaires)

#### 2.1.1. Cals

Pour que les explants (entre-nœuds, fragments de feuilles ou de racines, etc) de plante forment un cal (masse cellulaire indifférenciée), il est essentiel que le milieu nutritif contienne les bonnes proportions d'hormones végétales (auxines et cytokinines) (**Dodds et Roberts, 1995 ; Primrose, 2004 ; Rai, 2007**). Ce processus est une dédifférenciation (**Jha et Ghosh, 2005**). Le rapport de l'auxine et de cytokinine dans le milieu peut mener au développement des pousses, des racines ou des embryons somatiques desquels les plantes entières peuvent plus tard être produites (**Dodds et Roberts, 1995**). Des cultures de cals peuvent également être employées pour lancer des suspensions cellulaires (**Dodds et Roberts, 1995 ; Jha et Ghosh, 2005**).

Des travaux de production d'alcaloïdes à partir de divers explants de *Datura* sont menés avec succès par cultures de cals. D'après **Lindsey et Yeomen (1983)**, les cals obtenus sur fragments d'entre nœuds du *D. stramonium*, *D. innoxia* et *D. oloranta* contiennent de la scopolamine et de l'hyoscyamine dont les teneurs sont variables en fonction de l'apparence des cals. Selon ces auteurs, la teneur en alcaloïdes diminue parallèlement avec la diminution de la teneur en chlorophylle. En outre, **Hashimoto et al. (1986)**, signalent que les cals issus de racines de *D. innoxia* cultivés sur milieu MS, sont riches en hyoscyamine et ne contiennent pas de la scopolamine. **Herouart et al. (1991)** montrent aussi que les cals issus de feuilles de pleins champs de *D. innoxia* ont des teneurs élevées en scopolamine et en hyoscyamine. De même, **Iranbakhsh et al. (2006)** affirment la présence d'atropine et de scopolamine dans les cals semi hyalins issus des parties basales de feuilles du *D. stramonium* cultivés sous serre et sous une photopériode de 16h. Par ailleurs, **Raoufa et al. (2008)** montrent que la meilleure teneur en scopolamine chez *D. metel* est obtenue surtout dans les racines, que dans les feuilles et les tiges. Par contre l'hyoscyamine est obtenue uniquement dans les cals issus de racines et les teneurs de l'hyoscyamine et de la scopolamine sont faibles par rapport à la plante intacte.

Les cals peuvent être obtenus naturellement suite à une blessure de tissus ou par une infection par *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Rhizobium tumefaciens* ou *R. radiobacter*). Cette dernière est une bactérie de sol gram négative qui a une propriété de transférer dans le génome de cellules végétales une partie de son ADN dit T-DNA (Transferred-DNA) (**Gallais et al., 2006**). Ce dernier porte un certain nombre de gènes dont des gènes de synthèse d'hormones végétales comme l'auxine et la cytokinine ou les oncogènes (onc gènes) qui vont permettre la prolifération cellulaire et aider à la formation des tumeurs, et les gènes de synthèse des opines, petites molécules résultant de la condensation d'un sucre ou d'un acide  $\alpha$ -cétonique et d'un acide aminé. Ces composés sont des sources de carbone et d'azote pour les bactéries et ne sont catabolisés que par elles (**Umber, 2004**).

Chez *Agrobacterium tumefaciens* ; ce sont les trois gènes (*tms1*, *tms2* et *tmr*), appelés oncogènes qui sont à l'origine de surproduction des phytohormones dans la cellule végétale transformée (**Gelvin, 1990**). Les deux gènes *tms1* et *tms2* codent pour les enzymes impliquées dans la production d'une auxine AIA (acide indole acétique) à partir du tryptophane, tandis que le gène *tmr* code pour une isopentenyl transferase, qui catalyse la synthèse d'une cytokinine (l'isopentényl adénosine 5'-monophosphate) à partir du diméthylallyl-pyrophosphate et de l'adénosine 5'-monophosphate (AMP) (**Gelvin, 1990**).

### **2.1.2. Suspensions cellulaires**

Pour une large part, l'établissement des suspensions cellulaires est réussi par transfert des cals friables sur un milieu nutritif liquide approprié tout en assurant une agitation orbitale servant à la fois pour l'aération et la dispersion des cellules (**El Hamdouni et al., 1999**). Les cellules en suspension ont un taux de croissance plus grand que les cals car elles se trouvent immergées dans un milieu favorisant l'absorption de substances nutritives (**Alejo, 1992**).

Chez le *Datura*, des protocoles d'établissement des suspensions cellulaires à partir de cals sont mis au point et étudiés par plusieurs auteurs et ceci dans le but d'améliorer la production d'alcaloïdes. Chez *D. stramonium*, les alcaloïdes tropaniques peuvent être biosynthétisés dans des cultures de cellules en suspensions dans des flacons agitateurs et bioréacteurs (**Schmelzer et al., 2008**). Selon **Demeyer et al. (1992)**, des cals sont produits à partir de feuilles, de tiges et de racines de cinq variétés de *D. stramonium* et mis en cultures sur milieu B5 (**Gamborg et al., 1968**) ou MS (**Murashige et**

**Skoog, 1962**) additionné de régulateurs de croissance. La plus forte teneur en alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine) est obtenue avec des cals de feuilles de *D. stramonium* L. var. *chalybea* W.D.J Kock produits dans l'obscurité sur un milieu MS avec 0.1 mg/ml de BAP et de 0.1 mg/ml de 2.4 D. En outre **Ballica et al. (1993)** montrent que la production totale d'alcaloïdes tropaniques dans une culture de cellules en présence de la phénylalanine et de l'ornithine est 5 fois plus élevée que celle de la culture témoin. Par ailleurs, **Iranbakhsh et al. (2007)** sur des suspensions cellulaires issues de cals de feuilles dans le milieu MS contenant 0.5 mg/l de Kinetine et 2 mg/l d'ANA, l'addition de 30 et 40 g/l de glucose et 20 à 40 g/l de saccharose conduit à un niveau plus élevé de la production d'alcaloïdes et de la biomasse. Par contre l'augmentation de la concentration du nitrate entraîne la réduction de la teneur en alcaloïdes. Il montre aussi que la meilleure concentration en nitrate de potassium pour la production des alcaloïdes tropaniques et la biomasse est de l'ordre de 9.4 mM et 3.76 mM respectivement et celle en chlorure de calcium pour la croissance et la production des alcaloïdes est de l'ordre de 7.92 mM. Quant à la meilleure température, elle est de 20° C pour la production des alcaloïdes et de 25° C pour celle de la biomasse.

**Gontier (1993)** montre que les cellules cultivées en suspension croissent bien mais produisent moins d'alcaloïdes que les plantes entières. En outre après 4 ans d'étude sur le contenu alcaloïdique, la teneur en hyoscyamine et en scopolamine diminue progressivement. Cependant, les suspensions cellulaires initiées à partir de cals de *D. innoxia*, peuvent malgré tout restaurer partiellement leurs capacités biosynthétiques par un changement des conditions de cultures (**Gontier et al. , 1995**).

## 2.2. Tissus différenciés (Chevelus racinaires)

Le chevelu racinaire transformé par *Agrobacterium rhizogenes* (*syn. Rhizobium rhizogenes*) représente une alternative intéressante aux cultures de cellules pour la production des métabolites secondaires végétaux (**Bourgoud et al. , 2001**). Son phénotype est caractérisé par une croissance rapide et indépendante d'hormones, une stabilité génétique, une ramification latérale et l'absence du géotropisme (**Jha et Ghosh. , 2005 ; Guillon et al. , 2006 ; Palazón et al., 2008**). En plus, les métabolites secondaires produits par les racines transformées sont identiques à ceux habituellement synthétisés dans les racines de la plante intacte, avec des rendements semblables ou plus grands (**Roberts. , 1998 ; Flores et al. , 1999 ; Giri et Narasu, 2000 ; Evans et al., 2003 ; Palazón et al. , 2008**).

La biologie de l'infection par *A. rhizogenes* est très similaire à celle d'*A. tumefaciens* (**Semal, 1989 ; Christy, 1997**). Les souches virulentes d'*A. rhizogenes* contiennent un plasmide appelé Ri (Root-inducing) dont une partie appelé T-DNA est intégré à l'ADN dans la plante infectée (**Tikhounirouff, 2001 ; Jha et Ghosh , 2005**). La lignée A4 d'*A. rhizogenes* (souche agropine) contient deux T-DNA, nommés Ri-TR-DNA (right TDNA) et RiTLDNA (left T-DNA) (**White et al., 1985 ; Slightom et al., 1986 ; Christy, 1997**). Le RiTRDNA, qui est responsable de la production d'auxines et de cytokinines est très proche du T-DNA d'*A. tumefaciens*. Les gènes *rol* (root locus) *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* responsables de l'apparition des chevelus racinaires et de leurs phénotypes sont portés par le TLDNA (**White et al. , 1985 ; Slightom et al. , 1986 ; Zárata et Yeoman, 2001 ; Jha et Ghosh , 2005 ; Tao et Li, 2006**).

Ainsi, **Flores et Medina-Bolivar (1995)**, rapportent que les chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus* transformés par *A. rhizogenes* montrent des niveaux de biosynthèse d'hyoscyamine égaux ou plus importants que les racines de la plante entière et ils maintiennent la même capacité biosynthétique durant plus de 12 ans. De plus les chevelus racinaires cultivés *in vitro* ont la capacité d'accumuler des métabolites secondaires qui

sont normalement accumulées uniquement dans les parties aériennes de la plante intacte (Kim et al., 2002). Les chevelus racinaires peuvent également produire de nouveaux composés qui ne peuvent pas être synthétisés par les racines non transformées (Hu et Du, 2006). Comme exemple: les chevelus racinaires transformés de *Scutellaria baicalensis* Georgi accumulent des glucosides conjugués de flavonoïdes au lieu du glucose conjugué accumulé dans les racines non transformées (Nishikawa et al., 1997).

Le genre *Datura* est largement étudié pour la production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires. D'après Payne et al. (1987), chez les chevelus racinaires de *D. stramonium*, l'hyoscyamine est une composante majeure de la fraction d'alcaloïdes et il représente au moins 0.3% de la matière sèche, comparable aux plantes de *D. stramonium* cultivées en pot à partir desquelles les cultures sont lancées. Par ailleurs, l'étude de Christen et al. (1989) montre que le rendement des alcaloïdes (scopolamine et hyoscyamine) (0.68% du poids sec) obtenu avec les chevelus racinaires de *D. candida* est de 1.6 et 2.6 fois respectivement la quantité trouvée dans les parties aériennes et dans les racines de la plante mère.

En outre, Saenz-Carbonell et Loyola-Vargas (1996) en étudiant l'effet de différents composants du milieu B5 sur l'accumulation des alcaloïdes tropaniques dans les chevelus racinaires de *D. stramonium* constatent que la source d'azote (N), l'absence du phosphore, le calcium (Ca), le cobalt (Co) et l'augmentation de la teneur en saccharose dans le milieu augmentent le niveau des alcaloïdes dans les chevelus racinaires de *D. stramonium*. Ainsi, l'utilisation de l'ammonium comme source d'azote provoque l'excrétion des alcaloïdes dans le milieu. Par contre, l'addition de différentes auxines empêche l'accumulation des alcaloïdes, mais l'addition de l'acide abscissique (ABA) ne change pas la teneur en alcaloïde des cultures.

Pavlov et al. (2009), montrent que chez les chevelus racinaires de *D. stramonium* L, les meilleures concentrations testées sont : 1.10 g/l KNO<sub>3</sub>, 0.17 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 40 g/l de saccharose, pour les diploïdes et de 1.10 g/l KNO<sub>3</sub>, 0.17 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 50 g/l de saccharose, pour les tétraploïdes. Par ailleurs, pour Sikuli et Demeyer (1996), le rendement le plus élevé en biomasse est trouvé avec NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et K<sup>+</sup>, par contre le rendement de l'hyoscyamine est plus élevé dans le milieu de culture où SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et K<sup>+</sup> sont dominants.

### **III. Le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (F.o.a)**

#### **1. Généralité sur le *F.o.a***

---

Les *Fusaria* sont des champignons telluriques comportant certaines espèces pouvant causer des flétrissements ou des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées. Chez le palmier dattier, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon (= *F.o.a*) est l'agent causal de la maladie du bayoud qui sévit dans les oasis marocaines et celles du sud ouest algérien ( Nasraoui et Lepoivre, 2003 ). L'espèce *F.o.a* est un champignon anamorphique rattaché au genre téléomorphique *Gibberella* Sacc. Celui-ci appartient à la famille *Nectriaceae*, à l'ordre *Hypocreales*, à la classe *Sordariomycetes* (= "Pyrenomycètes"), au phylum *Ascomycota* et au règne *Fungi* (Eriksson et Winka, 1997 ; Eriksson, 2006). L'anamorphe *F.o.a* est classé dans le groupe

---

artificiel des deutéromycètes parmi la famille des tuberculariceae et l'ordre des moniliales (Djerbi, 1983 ; Sedra, 2006).

### 1.1. Morphologie, biologie et épidémiologie de *F.o.a*

Le *F.o.a* présente un mycélium hyalin et cloisonné. Il se reproduit exclusivement par voie asexuée ; le téléomorphe de cette espèce n'est pas encore connue. La reproduction asexuée se réalise par des microphialides et des macrophialides qui produisent respectivement des microconidies et des macroconidies. Les microphialides, en forme de bouteille, sont implantées perpendiculairement sur le mycélium et produisent d'une manière endogène des microconidies nombreuses, généralement unicellulaires, parfois bicellulaires, hyalines, globuleuses ou allongées et dont les dimensions sont variables (3-15 x 3-5 µm). Les macrophialides, beaucoup plus grandes que les microphialides, forment des macroconidies qui sont falciformes, peu nombreuses, présentant trois cloisons parfois 4 à 5 et mesurant

20-35 x 3-5 µm. Dans les cultures âgées et dans le sol, le *F.o.a* différencie sur le mycélium ou sur les macroconidies des chlamydozores qui sont sphériques, intercalaires ou terminales et dont le diamètre varie de 6 à 20 µm. (Djerbi, 1983 ; Sedra, 2006).

Les chlamydozoresse conservent dans le sol et sur des débris végétaux pendant plusieurs années en l'absence de l'hôte. Lorsque les conditions sont favorables, les chlamydozores germent pour donner un mycelium. Celui-ci pénètre directement par les racines du palmier et se localise dans les faisceaux ligneux. Sa progression est ascendante et se réalise d'abord par les filaments mycéliens qui produisent des microconidies. Ces dernières sont entraînées par la sève jusqu'au niveau des cloisons transversales des vaisseaux où elles sont arrêtées. Là, elles germent et donnent des filaments mycéliens qui traversent la cloison et qui forment des microconidies. Celles-ci sont entraînées par la sève jusqu'à la prochaine cloison transversale où elles sont arrêtées et ainsi de suite. Après la mort du palmier dattier, le mycélium forme des chlamydozores qui se conservent dans les tissus malades (fibres du sclérenchyme, faisceaux conducteurs et parenchymes ligneux des racines, du stipe et des rachis). Le *F.o.a* peut également survivre dans les porteurs sains tels que le henné, la luzerne ou le trèfle (Fernandez et al., 1995).

En général, les conditions favorables à une croissance rapide du palmier dattier favorisent aussi le développement de la maladie. La température de croissance optimale du pathogène se situe entre 21° et 27.5°C. Cette croissance reste importante entre 18°C et 32°C, mais elle s'arrête à 7°C et à 37°C (Bounaga, 1975).

La dissémination du *F.o.a* se réalise par les rejets, les particules du sol, les porteurs sains contaminés provenant de zones infectées, les morceaux de rachis infectés, et par l'eau d'irrigation (Sedra, 2003). Les semences et les fruits ne semblent pas intervenir dans la dissémination de ce pathogène (Louvet, 1993 ; Sedra, 2003).

### 1.2. Symptômes causés par le *F.o.a*

Les premiers symptômes de la fusariose du palmier dattier apparaissent sur une ou plusieurs palmes de la couronne moyenne. Leurs folioles prennent un aspect plombé, se dessèchent progressivement de bas en haut et se replient vers le rachis (aspect de plume mouillée). Le dessèchement se poursuit de l'autre côté, en progressant cette fois de haut en bas en sens inverse ; la palme complètement desséchée prend alors une couleur blanchâtre d'où le nom arabe de "bayoud" (du mot arabe "abiad" qui signifie blanc et qui se réfère au blanchiment des palmes des arbres malades) donné à la maladie (Djerbi, 1990). Une

longue nécrose brune longitudinale parcourt le rachis de la palme atteinte. Elle correspond au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis. Rapidement, d'autres palmes, souvent proches des premières présentent à leur tour les mêmes symptômes. A un stade avancé de la maladie, les palmes atteintes meurent et restent pendantes le long du stipe. La maladie progresse vers les palmes du centre pour atteindre le coeur de l'arbre qui meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal.

L'évolution de la maladie est plus ou moins rapide, de quelques mois à plusieurs années. Une coupe longitudinale du stipe d'un palmier malade montre une coloration brun rougeâtre des tissus conducteurs.

### **1.3. Isolement, diagnostique et identification du *F.o.a***

Le *F.o.a* peut être isolé soit à partir des rachis infectés du palmier dattier, des porteurs sains sur un milieu PDA (200 g de pomme de terre, 20 g de glucose, 20 g d'agar-agar, 1000 ml d'eau distillée), soit à partir du sol sur un milieu sélectif. Les souches de *F.o.a* isolées à partir du rachis de palmes infectées présentent un thalle de couleur rose saumon, un mycélium frisé et une agressivité élevée. Par contre, celles provenant du sol, des racines du palmier dattier ou de porteurs sains (luzerne, henné et trèfle) présentent une morphologie variable et un pouvoir pathogène faible ou nul (**Sedra, 2003 ; Sedra, 2006**).

La fusariose du palmier dattier peut être diagnostiquée d'après les symptômes externes et internes quand ces derniers sont bien caractéristiques ce qui n'est pas toujours le cas. Lorsque des symptômes typiques sont observés dans une région où la maladie n'a pas encore été signalée, il est indispensable d'identifier avec certitude l'agent causal. Cette identification peut être réalisée par inoculation à de jeunes plantes sensibles (test de pathogénécité). Actuellement des techniques d'analyse génétique moderne sont explorées pour une identification rapide et précise du pathogène sans le recours à des inoculations artificielles (Fernandez et *al.*, 1995). Parmi ces techniques on peut citer: le test de compatibilité végétative (Tantaoui et Boissoni, 1991), la PCR (Fernandez et *al.*, 1998), la RAPD (Freeman et Maymon, 2000), la RFLP de l'ADN mitochondrial (Tantaoui et Fernandez, 1993) et les empreintes génétiques (Fernandez et *al.*, 1995).

## **2. Stratégies de lutte contre le *F.o.a***

---

Il n'existe actuellement aucun moyen réellement efficace pour contrôler totalement la fusariose du palmier dattier. Parmi les moyens de lutte entrepris contre le Bayoud, il y'a: les mesures prophylactiques; la lutte chimique et la lutte génétique. Les moyens de lutte physique (solarisation) et biologique sont généralement restés au stade de l'expérimentation.

### **2.1. Mesures prophylactiques**

Ce sont des moyens de lutte préventifs indispensables. Elles consistent à surveiller de manière stricte le mouvement de tout échange de matériels (végétal, machine ou outil de travail) au sein d'une même palmeraie et entre palmeraies distinctes. Ce moyen de lutte permet de limiter la propagation de la maladie dans une même palmeraie et éviter sa propagation vers de nouvelles palmeraies (**Quintin, 2001**).

### **2.2. Lutte chimique**

Elle s'avère difficile en raison du coût élevé des traitements et des risques encourus. Elle a été envisagée dans le cas de l'éradication de nouveaux foyers dans une zone saine (**Bounaga et Djerbi, 1990**) par des fumigants comme le bromure de méthyle et la chloropicrine. Cette éradication semble donner de bons résultats (**Zaid, 2002**) mais elle présente des risques de pollution de la nappe phréatique.

### 2.3. Lutte génétique

Elle consiste en la sélection de palmiers de haute qualité dattière et résistants au Bayoud soit parmi les populations naturelles (1ère voie) soit parmi celles issues de croisements contrôlés (2ème voie) (**Djerbi, 1991**) :

- la première voie à court terme consiste à identifier parmi les populations locales de palmier dattier les individus de haute qualité se trouvant en foyer de Bayoud.

- la deuxième voie à moyen et long terme consiste à créer de nouveaux clones de palmier dattier, résistants au Bayoud et de haute qualité par des croisements contrôlés.

L'implantation massive de génotypes résistants au Bayoud et de haute qualité dattière nécessite la maîtrise complète des méthodes de régénération du palmier dattier par culture *in vitro*. Pour ce faire deux voies sont suivies à savoir l'organogénèse et l'embryogénèse somatique (**Djerbi, 1991 ; Boufis, 2008 ; Djillali, 2008**). La technologie d'isolement de protoplastes à partir de la variété deglet nour (sensible) et de la variété takarboucht (résistante) peut constituer également le point de départ pour l'obtention d'hybrides somatiques alliant qualité dattière et résistance au bayoud (**Abed et al., 2006 ; Chabane et Bouguedoura, 2006; Chabane, 2007**).

### 2.4. Lutte biologique

L'utilisation des antagonistes (champignons et bactéries) ou de produits naturels (extraits végétaux et autres) connaît un regain d'intérêt grandissant en raison des risques potentiels de la lutte chimique sur l'environnement.

Des résultats prometteurs sont obtenus surtout par l'inhibition de la croissance du pathogène ou par l'induction des réactions de défense du palmier dattier vis-à-vis de son bio-agresseur.

#### 2.4.1. Effet des microorganismes antagonistes

**El Hassni et al. (2007)** montrent que les bactéries comme *Bacillus pumilus* W1, *Rhizobium* W2, *Bacillus cereus* X16 induisent une inhibition élevée de la croissance mycélienne et de la sporulation du *F.o.a*. Ainsi, l'application de ces antagonistes bactériens dans des jeunes plantes de palmier dattier déclenche des réactions de défense avec l'accumulation des dérivés d'acides hydroxycinnamiques non constitutifs tels que le dérivé sinapique I2, connu pour son rôle important dans la résistance du palmier dattier au *F.o.a*. **Bessedik (2006)** et **Bensaid (2006)** rapportent que le *Bacillus* spet *Pseudomonas fluorescens* respectivement inhibent également la croissance mycélienne du *F.o.a*.

En outre, **Jaiti et al. (2007)** affirment que le complexe d'Aoufous (mélange de spores appartenant à plusieurs genres de champignons endomycorhiziens avec une prédominance des genres *Glomus* et *Sclerocystis*) est le plus efficace pour la réduction de la sévérité de la maladie du Bayoud comparé aux autres champignons endomycorhiziens utilisés (*Glomus monosporus*, *Glomus deserticola* et *Glomus clarum*). L'effet protecteur de ces champignons est corrélé à l'induction amplifiée de nombreuses réactions de défense

impliquant les peroxydases et les polyphénoloxydases. Par ailleurs, l'espèce *Trichoderma harzianum* semble exercer *in vitro* un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de quatre isolats du *F.o.a* (Kadri, 2008).

## **2.4.2. Effet des produits naturels**

### **Extraits végétaux**

Jaiti et *al.* (2004) et Jaiti et *al.* (2009), montrent que le traitement des plantes de palmier par l'acide jasmonique induit de nombreuses réactions de défense contre le *F.o.a*, notamment l'accumulation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la peroxydation des lipides membranaires et l'activation des peroxydases (PO) et des polyphénoloxydases (PPO). Ces réactions de défense sont plus rapides et plus importantes chez les plantes préalablement traitées par l'acide jasmonique comparées aux plantes témoins.

De même, les travaux de Gaceb-Terrak et *al.* (2008) rapportent que les acides phénoliques (extraits des palmiers) connus pour leur implication dans les stratégies de défense des plantes contre les agents pathogènes entraînent une forte action inhibitrice sur la croissance du *F.o.a* durant les premiers jours après la mise en culture. Bounnit et *al.* (2008) affirment également que l'innoculation par *F.o.a* des jeunes plants de palmiers prétraités par un produit stéfinia extrait de graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) conduit à une augmentation des activités peroxydasiques par rapport au témoin. Par contre, l'application de stéfinia *in vitro* n'a montré aucune action inhibitrice sur la croissance mycélienne du *F.o.a*.

Par ailleurs, Boulenouar et *al.* (2009) en étudiant quatre plantes toxiques du Sahara algérien, *Citrullus colocynthis* L.Schard., *Calotropis procera* Ait., *Nerium oleander* L., *Pergularia tomentosa* L., montrent que l'effet inhibiteur le plus important sur le *F.o.a* est observé avec l'extrait hexanique de *Pergularia tomentosa* L.

En outre, Kadri (2008) signale que les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* Desf. ainsi que les extraits bruts et les fractions saponosides et gluconosides de *Citrullus colocynthis* L. semblent exercer un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de quatre isolats de *F.o.a*. Ces deux plantes ont une activité antimicrobienne.

De plus selon Sharma et Trivedi (2002) et Uma Reddy et *al.* (2009), des extraits aqueux ou alcooliques de *Datura stramonium* inhibent le taux de croissance de *Fusarium* sp.

### **Autres**

D'autres produits naturels sont également évalués *in vitro*. El Hassni et *al.* (2004), mentionnent que 1 mg/ml de chitosane (extrait dérivé de la carapace de certains crustacés) réduit la croissance du *F.o.a* sur le milieu PDA solide et cause des changements morphologiques dans le mycélium, alors que la croissance mycélienne est totalement empêchée dans un milieu liquide. Par ailleurs, une fois injecté dans les racines, le chitosane élicite l'activité peroxydase (PO) et l'activité de la polyphénoloxydase (PPO). Concernant les composés phénoliques, le chitosane à 1 mg/ml entraîne une accumulation des dérivés d'acides hydroxycinnamiques non-constitutifs, connus pour leurs importances dans la résistance de palmier dattier au bayoud.

---

# Matériels et méthodes

Notre expérimentation a été réalisée au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies (LRGB) et au laboratoire de mycologie de l'école nationale supérieure agronomique, El Harrach, Alger.

## I. Etude de la biomasse et du contenu alcaloïdique des tissus de *Datura*

### 1. Objectif du travail

---

Cette partie de travail comporte 3 étapes:

- Tout d'abord l'étude de l'influence de la Callogenèse induite de deux façons : par hormones (ANA/BAP) et par souches bactériennes (C58, E2x et E17) sur la biomasse sèche et le contenu alcaloïdique des cals obtenus sur différents explants de deux variétés de *Datura*: *tatula* et *stramonium* (*eu-stramonium*).

- Ensuite l'étude de l'effet du milieu (avec ou sans hormones de croissance) et du mode de culture (cuvé et semi continu) sur les propriétés de croissance et du contenu alcaloïdique de cultures de chevelus racinaires établies à partir des lignées performantes sélectionnées et caractérisées obtenues par transformation de *D. stramonium* et *D. tatula* par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*.

- Enfin l'étude des propriétés de croissance et du contenu alcaloïdique de suspensions cellulaires établies à partir des cals obtenus sur hypocotyles de *D. tatula* par la souche E17.

### 2. Callogenèse

---

#### 2.1. Production des vitro-semis chez *D. stramonium* et *D. tatula*

##### 2.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de vitro-semis issus de graines prélevées sur des fruits récoltés à maturité à partir de plants de *D. stramonium* variétés *stramonium* et *tatula*, originaires de Blida.

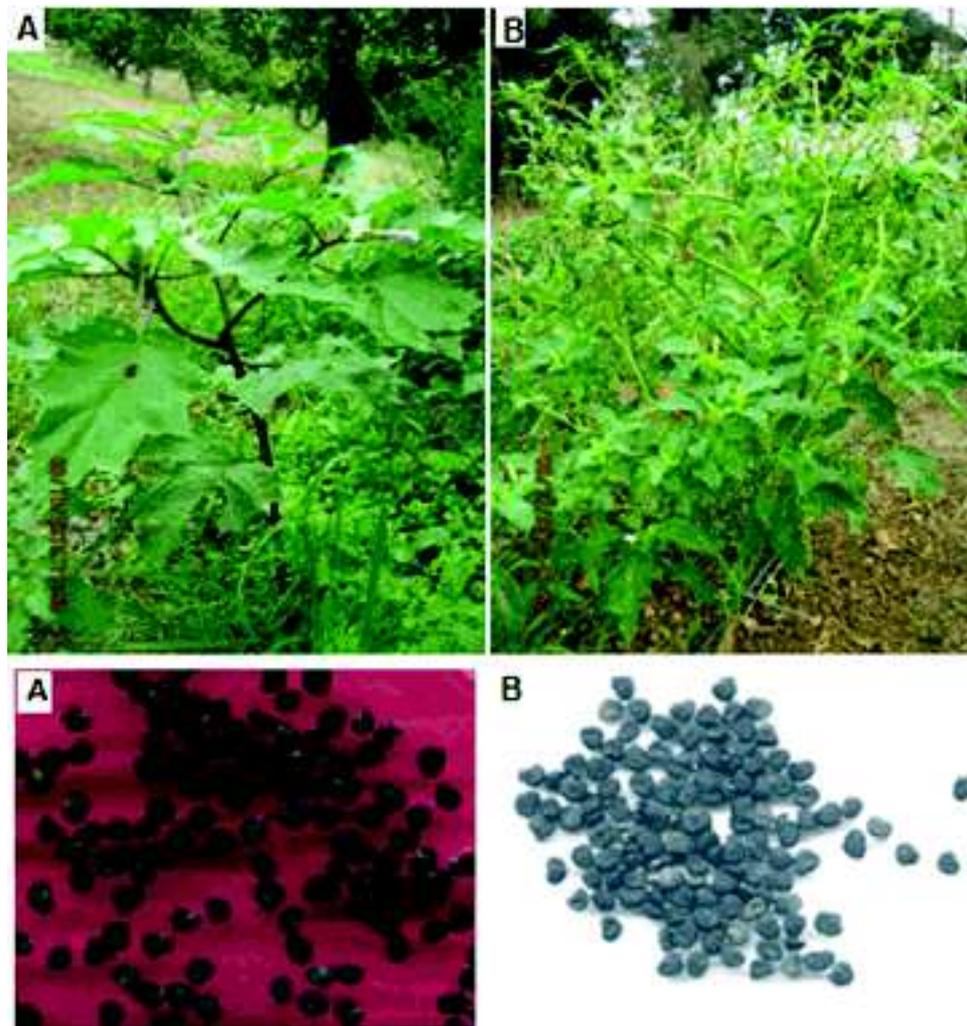


Figure 4: Plants ( $G \times 0.05$ ) et graines ( $G \times 1$ ) de *D. tatula* (A) et de *D. stramonium* (B).

### 2.1.2. Scarification et mise en germination des graines

Les graines sont scarifiées entre deux feuilles de papier verre (point 80) pour éliminer les téguments, elles sont ensuite désinfectées par passage à l'éthanol (70%) pendant 30 secondes suivis d'un trempage à l'eau de javel (12°) pendant 10 min puis de 3 rinçages à l'eau distillée stérile et enfin séchage sur du papier filtre stérile (Khelifi-Slaoui et al., 2005).

Les graines scarifiées et désinfectées sont ensuite ensemencées, sous la hotte stérile dans des tubes à essai contenant environ 15 ml de milieu de germination MS (Murashige et Skoog, 1962) (annexe 1.a) additionné de 20 g/l de saccharose et de 7 g/l d'agar préalablement stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les tubes ensemencés sont bouchés par du coton hydrophile et recouverts de papier aluminium puis placés dans une chambre de culture à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  sous une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité (Khelifi-Slaoui et al., 2005).

### 2.1.3. Paramètres mesurés

Deux paramètres sont considérés: le pourcentage de contamination, et le pourcentage de germination qui représente le nombre de graines où la racine a percé par rapport au nombre total de graines mises en culture (100 graines pour *D. tatula* et 50 graines pour *D. stramonium*). Ces paramètres sont estimés après 1 mois de mise en culture.

## 2.2. Induction des cals

### 2.2.1. Induction par hormones chez *D. stramonium* et *D. tatula*

Une induction de Callogenèse sur différents explants (fragments d'environ 0.5 cm de feuilles, hypocotyles et de racines) issus de vitro-semis âgés de 02 mois de *D. stramonium* et *D. tatula* est réalisée sur milieu MS additionné de 0.02 mg/l d'ANA et de 0.2 mg/l BAP selon les travaux de **Saïbi (2006)**. Les explants témoins sont ensemencés sur le milieu sans hormones.

Ce traitement contient 40 répétitions (10 boites de pétri contenant chacune 4 explants).

La culture est conduite à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  et sous une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

Les cals sont séparées du milieu de culture puis séchés pendant 48 heures à  $60^\circ\text{C}$ , ils sont ensuite pesés pour déterminer la biomasse sèche.

### 2.2.2. Induction par souches d'*Agrobacterium tumefaciens* chez *D. tatula*

Le même protocole adopté par **Amdoun et al . (2006)** pour l'infection et la co-culture est utilisé pour l'induction des cals.

#### 2.2.2.1. Souches bactériennes et matériel végétal

Deux types de matériel ont servi à cette étape : Les vitros-semis de *D. tatula* obtenus et trois souches pathogènes d'*A. tumefaciens*. Les souches E17 et E2x isolées des tumeurs de l'*Eucalyptus occidentalis* par **Krimi (2006)** , et la souche de référence C58 (**Wood et al ., 2001**) .

Selon **Krimi (2006)** les souches isolées (E17 et E2x) ont des caractéristiques culturelles et biochimiques similaires à celles des souches de la biovar 1 d' *A. tumefaciens* et sont sensibles à l'agrocine 84. Ainsi, l'ADN extrait à partir de ces souches virulentes a donné un signal d'amplification correspondant à un fragment 247 pb situé dans la région de virulence de type nopaline plasmide Ti.

Concernant la souche de référence C58, le génome de cette dernière a été séquencé en 2001 par deux équipes différentes (**Wood et al ., 2001 ; Goodner et al ., 2001**). Ce génome de 5.67 Mpb comprend: un chromosome circulaire de 2.84 Mpb, un chromosome linéaire de 2.07 Mpb, un méga-plasmide pTIC58 (Ti pour « tumor inducing ») de 214 kpb et un deuxième méga-plasmide (pATC58) de 542 kpb. Le plasmide Ti de la souche *A. tumefaciens* C58 (pTIC58) est de type nopaline-agrocinopine dû aux gènes *noc* et *acc* respectivement ( **Hayman et Farrand, 1988 ; Kim et Farrand, 1998 ; Labbarre, 2006**).

#### 2.2.2.2. Etapes du processus d'infection

La production des cals à partir de l'infection par *A. tumefaciens* passe en générale par trois étapes: Culture et activation de l'agrobactérie, inoculation de la plante et enfin l'isolement des cals induits.

### **Culture et activation de l'agrobactérie en suspension**

Les souches d'*A. tumefaciens* (E17, C58, E2x) conservées dans l'obscurité dans le milieu de culture YEM (*yeast extrait mannitol*) (Vincent, 1970) (annexe 1.b) solide de pH 7 à une température de - 4°C sont cultivées dans l'obscurité sur un milieu YEM neuf solidifié avec 15 g/l d'agar et à une température de 26 ± 1°C pendant 48h à 72 h (figure 5). Pour infecter les explants, les souches activées sont suspendues dans 50 ml de milieu YEM liquide 72 heures avant l'infection. Les flacons contenant les souches bactériennes sont ensuite déposés dans l'obscurité dans l'incubateur- agitateur à 80 rpm, et à une température de 26 ± 1°C.



**Figure 5:** Souches activées d'*A. tumefaciens*. A: E17, B: E2x, C: C58 (G X 0.5).

### **Inoculation et co-culture par *A. tumefaciens***

Les inoculations sont effectuées par la co-culture en milieu MS solide du matériel végétal avec les différentes souches bactériennes. Des fragments d'hypocotyles d'environ 1cm de longueur prélevés sur des vitro-semis âgés de deux mois sont déposés verticalement sur le milieu MS solide additionné de 250 mg/l de céfotaxime pour éliminer les bactéries. Ils sont ensuite infectés par dépôt d'une goutte de la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue au niveau de la section basale. Les explants témoins sont ensemencés sur les mêmes milieux sans traitement bactérien. La co-culture se fait dans l'obscurité à une température de 26 ± 1°C et sous photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. Des repiquages successifs sur milieu avec céfotaxime sont nécessaires jusqu'à l'élimination complète de la bactérie et la formation des cals.

Ce traitement est répété 40 fois (10 boîtes de pétri contenant chacune 4 explants).

Les cals qui se développent sur le site d'infection des explants d'hypocotyles sont excisés et stérilisés dans une solution contenant 500 mg de céfotaxime durant une heure afin d'éliminer les bactéries. Après trois rinçages à l'eau distillée stérilisée, les cals sont fractionnés et multipliés sur le milieu MS sans hormones contenant 250 mg/l de cefotaxime. La concentration de la cefotaxime est réduite graduellement jusqu'à une culture sans antibiotique.

Les cals sont séparées du milieu de culture. Ils sont ensuite séchés pendant 48 heures à 60°C, puis pesés pour déterminer la biomasse sèche.

### **2.2.3. Protocole expérimental pour l'obtention de cals**

Le protocole expérimental que nous avons adopté est le suivant (figure 6):

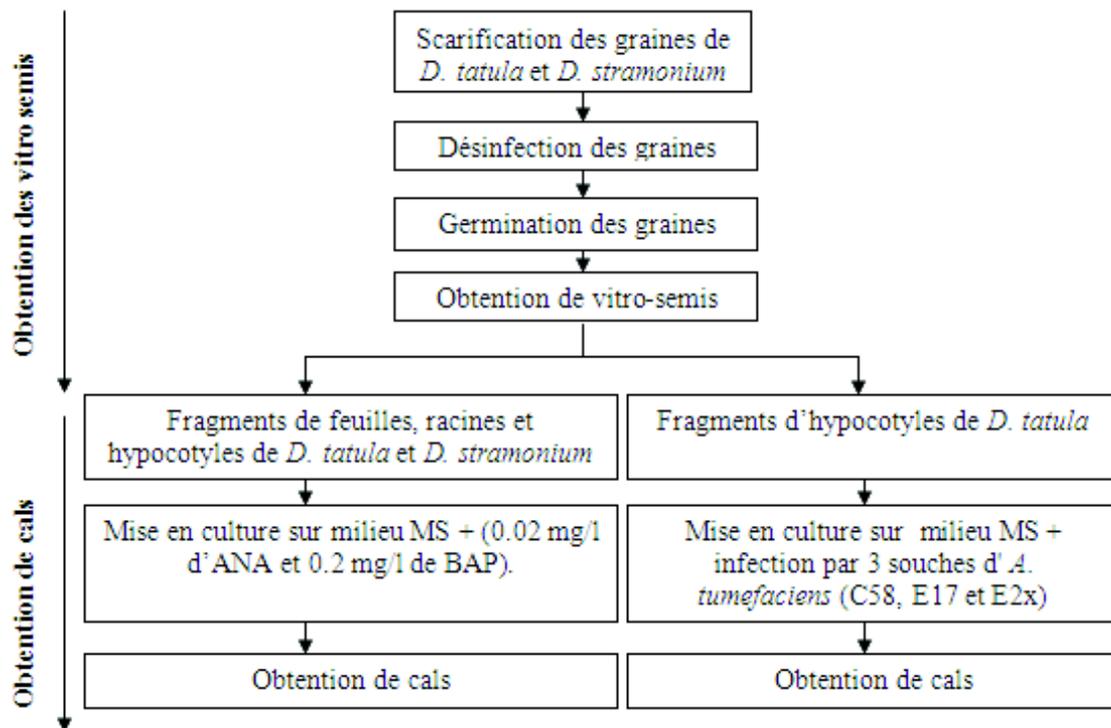


Figure 6: Protocole expérimental pour l'obtention de cals

#### 2.2.4. Observations et paramètres mesurés

Plusieurs paramètres sont considérés:

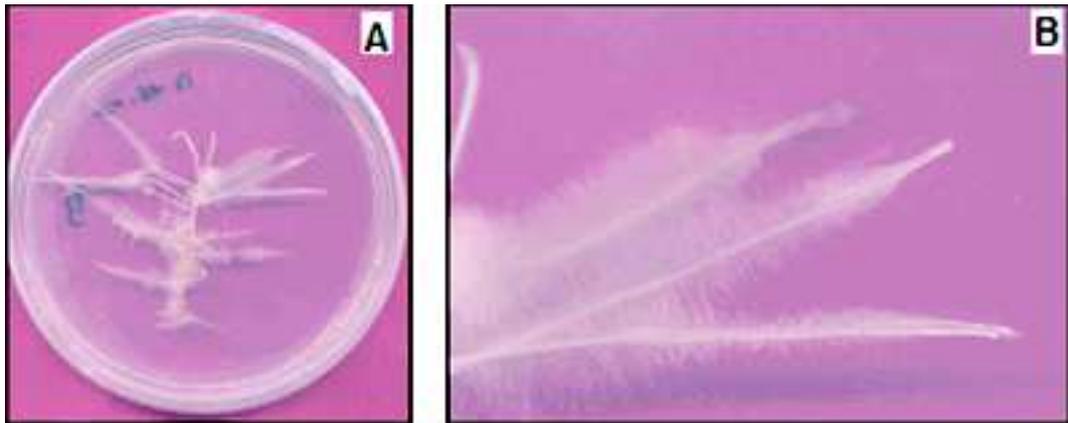
- La surface moyenne des cals de *D. tatula* en (mm<sup>2</sup>) qui représente la somme totale de toutes les surfaces des cals par rapport au nombre total d'explants introduits.
- Couleur, texture et consistance des cals (Aspect des cals) de *D. tatula* et *D. stramonium*.
- Biomasse sèche moyenne de la matière sèche par cal (g MS/cal) issue de différents explants de *D. tatula* et *D. stramonium*. Elle est déterminée par pesée à poids constant après séchage dans l'étuve à 60° C pendant 48 heures.
- La teneur en alcaloïdes (Hyoscyamine et scopolamine) des cals en mg/g MS.

### 3. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires

#### 3.1. Chevelus racinaires

##### 3.1.1. Matériel végétal

Les cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* sont établies à partir des lignées performantes, sélectionnées et caractérisées par une croissance rapide (figure 7). Elles sont obtenues par transformation de ces deux variétés de *Datura* par la souche A4 d'*A. rhizogenes* selon le protocole adopté par Amdoun et al . (2006). La transformation de chevelus racinaires de *D. stramonium* et de celui de *D. tatula* a été effectué respectivement par Zarouri (2006) et Ladraa (2007).



**Figure 7:** Lignée performante de chevelus racinaires de *D. stramonium* après 7 jours de mise en culture. A (G X 0.5), B (G X 2).

### 3.1.2. Mise en culture

Deux modes de cultures, cuvée et semi continu sont étudiés. Le premier est une culture pour une durée déterminée sans renouvellement du milieu de culture, le deuxième consiste à renouveler le milieu de culture à intervalles déterminés.

#### Mode cuvée

Environ 100 mg de poids frais de pointes de racines de 3 cm sont mis dans des erlens contenant 20 ml de milieu B5 liquide (**Gamborg et al ., 1968**) (**annexe 1.c**) avec ou sans hormones de croissance. La culture de chevelus racinaires dans le milieu sans hormones sera codée chevelus racinaires H<sup>-</sup> alors que la culture dans le même milieu contenant les hormones (0.02 mg/l d'ANA + 0.2 mg/l de BAP) sera codée chevelus racinaires H<sup>+</sup>. Ces essais sont menés en culture en cuvée en absence du lumière sur un agitateur rotatif réglé à 80 rpm, à une température de 26 ± 1°C (**Amdoun et al ., 2007**).

Trois répétitions sont retenues pour chaque type de milieu.

#### Mode semi continu

Pour étudier l'effet du mode semi continu concernant les chevelus racinaires H<sup>-</sup>, 20 ml du milieu B5 frais sont renouvelés aux 10<sup>ème</sup> et au 24<sup>ème</sup> jours.

Trois répétitions sont retenues pour chaque intervalle.

## 3.2. Suspensions cellulaires des cals induits par la souche E17

### 3.2.1. Matériel végétal

Les suspensions cellulaires sont initiées à partir de cals friables induits sur hypocotyles de *D. tatula* par la souche E17.

### 3.2.2. Mise en culture

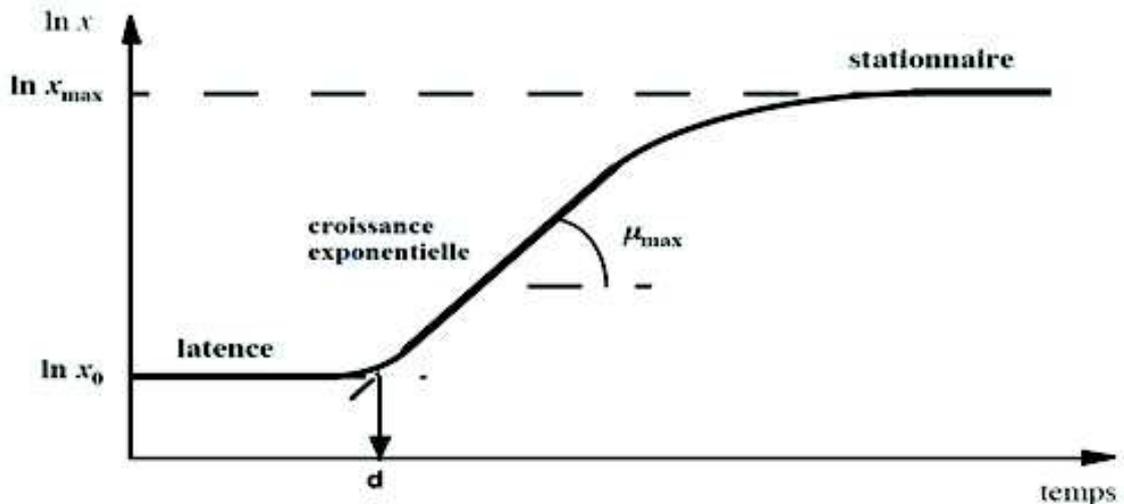
Environ 100 mg de poids frais de cals sont mis dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 20 ml de milieu liquide B5 additionné de 0.02 mg/l d'ANA et 0.2 mg/l de BAP (3 répétitions sont effectuées). Les suspensions sont menées en culture en cuvée sur un agitateur rotatif

réglé à 80 rpm pendant 30 jours dans l'obscurité à une température de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (Amdoun et al., 2007).

Les suspensions cellulaires sont récupérées du milieu de culture par filtration à l'aide d'un papier filtre. Elles sont ensuite séchées pendant 48 heures à  $40^\circ\text{C}$ , puis pesées pour déterminer leurs poids secs.

### 3.3. Paramètres mesurés

- Les paramètres mesurés pour évaluer la croissance des cultures de chevelus racinaires et des suspensions cellulaires sont calculés selon la figure 8, qui décrit la cinétique de croissance des cultures de bactéries avec les trois phases caractérisant en générale toutes les cinétiques de croissance.



**Figure 8:** Cinétique de croissance des cultures de bactéries et paramètres caractérisant ses trois phases, avec  $\mu_{\max}$ : le taux de croissance maximum,  $d$ : le temps de latence et  $x_i$  ( $X_0$ ) et  $x_f$  ( $X_{\max}$ ): les biomasses initiales et finales (Augustin, 2005).

Le taux de croissance  $\mu$  de la biomasse sèche (exprimé en  $\mu/\text{j}$ ) correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe  $\ln X = f(t)$ . Il est calculé d'après la formule suivante :

$\mu = (\ln X_f - \ln X_i) / \Delta t$  où :  $X_i$  est la biomasse initiale,  $X_f$  est la biomasse finale,  $\Delta t$  est la durée de la phase de croissance.

- La durée de la phase de latence ( $d$ ) pendant laquelle le taux de croissance des cultures est nul ( $\ln X$  est constant).
- Le temps de dédoublement ( $td$ ) en ( $td$  j) qui correspond au nombre de jours nécessaires pour que la biomasse double son poids durant la phase de croissance. Il est calculé selon la formule  $td = \ln 2 / \mu$  ou  $0.69/\mu$ .
- Les biomasses sèches initiale et finale en (g MS/l) correspondent respectivement au poids sec initial et le poids final de la matière sèche par litre de milieu de culture. La matière sèche est obtenue après séchage de la matière fraîche dans l'étuve à  $40^\circ\text{C}$  pendant 48 heures.
  - Concernant le contenu en hyoscyamine, les paramètres retenus sont:
- La production spécifique en hyoscyamine qui correspond à la teneur en hyoscyamine produite par gramme de matière sèche (mg/g MS)

- La productivité en masse de l'hyoscyamine formée par litre de culture par jour (mg/l/j).
- Le rendement en hyoscyamine exprimé en (mg/l).

### 3.4. Protocole expérimental pour les cultures de chevelus racinaires et les suspensions cellulaires

Le protocole expérimental que nous avons adopté est le suivant (figure 9) :

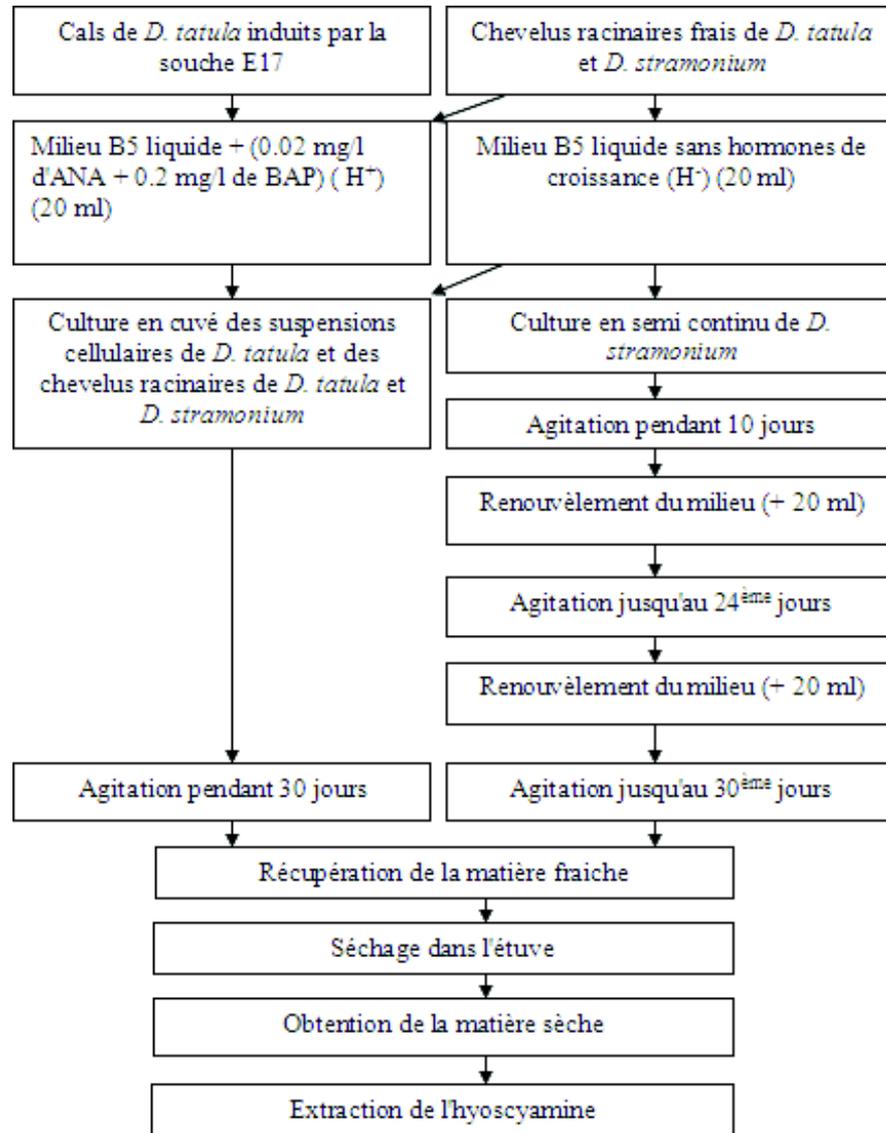


Figure 9: Protocole expérimental pour les cultures de chevelus racinaires et les suspensions cellulaires

## 4. Extraction et dosage de l'hyoscyamine et de la scopolamine

Pour les cals, nous avons fait l'extraction de l'hyoscyamine plus la scopolamine et pour les chevelus racinaires et les suspensions cellulaires, nous n'avons fait que l'extraction de l'hyoscyamine.

Le protocole utilisé pour l'extraction est celui d'**Amdoun et al . (2007 ; 2009)**, qui est basé sur le principe que les alcaloïdes sont sous forme de sels dans une solution acide et sous forme organique dans une solution basique.

Les calcs induits par hormones ou par souches bactériennes ou les chevelus racinaires sont séchés, puis broyés dans une solution d'HCl (0.1 N). Après 10 min d'agitation sur un agitateur, le surnageant est alcalinisé par une solution d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) jusqu'au pH 10. La solution aqueuse est ensuite filtrée à l'aide du papier filtre puis épuisée 2 fois par du chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) à volumes égaux (v/v). Après agitation pendant 10 min, le mélange est introduit dans une ampoule à décanter pour récupérer la phase organique. Cette dernière étape est reprise avec la phase aqueuse. Les phases organiques (CHCl<sub>3</sub>) obtenues sont ensuite rassemblées puis séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Après une double filtration, la solution de CHCl<sub>3</sub> est évaporée dans un bain marie. Le résidu final obtenu de chaque traitement est repris dans 5 ml de dichlorométhane (CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>) puis filtré, le filtrat est ensuite analysé par GC-MS selon le protocole de **Kartel et al . (2003)**.

Le spectromètre de masse, Hewlett-Packard (HP) 5970.A est couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP 5890.A. équipé d'une colonne capillaire HP-1 de longueur de 30 m, de diamètre interne de 0.25 mm, d'épaisseur du film de 0.25 µm. Un (01) µl de l'extrait des alcaloïdes totaux est injecté et analysé dans les conditions opératoires suivantes :

- Température de l'injecteur en splitless mode: 280°C.
- Programmation de température de 125° C pour 1 min, elle est ensuite augmentée à raison de 10°C/min jusqu'à 250°C pour 5 min.
- Gaz vecteur : Hélium à 1 ml/min.

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 (C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>.HCL) et Atropine (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>). 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.

## 5. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) et le test LSD (LSD test : Least Significant Differences) sont appliquées pour l'étude de la biomasse et du contenu alcaloïdique des calcs et des cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* et des cultures de suspensions cellulaires de *D. tatula* . Les moyennes suivies de la même lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes et les barres sur les graphes représentent les écarts types.

\* (5%), \*\* (1%), \*\*\* (0.1%) représentant le niveau de signification : significatif, hautement significatif et très hautement significatif respectivement.

## II. Effet des alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.(F.o.a)

### 1. Objectif du travail

---

Dans le cadre de recherches sur les procédés de lutte biologique basés sur des nouvelles molécules extraites naturellement d'une part et suite à l'utilisation des substances synthétiques qui ont des effets secondaires et nuisibles pour les plantes d'autre part, nous avons opté pour l'exploitation *in vitro* de l'effet des alcaloïdes extraits à partir de *Datura stramonium* (extrait brut) et des solutions pures de scopolamine et de l'atropine (forme racémique de l'hyoscyamine) sur la croissance mycélienne radiale de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (F.o.a).

### 2. Matériel fongique

---

Deux souches de F.o.a (SI et SII) sont isolées à partir de rachis de palmier dattier infectés puis conservées sur le milieu PDA (200 g de pomme de terre, 20 g de glucose, 20 g d'agar-agar, 1000 ml d'eau distillée). Elles nous ont été fournies par le laboratoire de mycologie de l'ENSA (**tableau 1**).

Souches	Code de la souche	Variété	Age du palmier	Jardin de l'échantillonnage	Localité
I	TA02H	Hmira	09 ans	Romani	Talmine
II	INRA02G	Tegaza	09 ans	INRA Adrar	Timmy

### 3. Purification et conservation des souches de F.o.a

---

Une suspension de spores ( $10^2$  à  $10^3$  spores/ml) est préalablement préparée par des dilutions successives dans de l'eau distillée stérile à partir d'une culture de F.o.a âgée de 15 jours.

Un demi millilitre (0.5 ml) de cette suspension est versé dans des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé (Eau distillée + agar) à 2%. Les cultures sont ensuite mises à incuber pendant 48 heures à la température ambiante de laboratoire et sous une lumière continue, puis elles sont observées avec une loupe binoculaire afin de repérer les spores en voie de germination. Ces dernières sont prélevées à l'aide d'une aiguillée très fine et chacune est repiquée aseptiquement dans des boîtes de pétris contenant le milieu PDA. Les cultures monospores sont ensuite mises à incuber pendant 7 jours à la température ambiante (18-25°C) et sous une lumière continue. Les souches une fois purifiées sont conservées à une température de 4°C dans des tubes inclinés contenant un milieu PDA.

### 4. Préparation des solutions d'alcaloïdes (solutions pures et extrait brut)

---

---

Des solutions mères (10 mg/ml pour les solutions pures et  $25 \cdot 10^{-3}$  mg/ml pour l'extrait brut (hyoscyamine + scopolamine) des chevelus racinaires de *D. stramonium* H<sup>-</sup>) sont préparées comme suit:

500 mg de solutions pures d'atropine (forme racémique de l'hyoscyamine) ou de scopolamine (alcaloïdes standards de la marque *Fluka*) et 5 mg d'extrait brut obtenu lors de la partie précédente à partir de chevelus racinaires de *D. stramonium* H<sup>-</sup> sont solubilisés dans 50 ml et 200 ml respectivement de solvant constitué de 99% d'eau distillée et 1% d'éthanol à 95°.

Les solutions mères, sont stérilisées par microfiltration après dissolution totale des extraits à l'aide d'un filtre seringue stérile (0.2 µm). Elles sont ensuite diluées progressivement dans le milieu PDA en surfusion dans des flacons.

Les différentes dilutions utilisées sont: 1/2, 1/20, 1/200 pour l'extrait brut et 1/4, 1/10, 1/100 pour l'atropine et la scopolamine. Donc les différentes concentrations testées sont :

0 (= témoin),  $125 \cdot 10^{-4}$ ,  $125 \cdot 10^{-5}$ ,  $125 \cdot 10^{-6}$  mg/ml pour l'extrait brut et 0 (= témoin), 2.5, 1, 0.1 mg/ml pour les solutions pures.

Le choix de ces trois dilutions est dû à la faible quantité des extraits, et nous avons choisi la méthode de dilution la plus facile pour éviter les problèmes des contaminations.

Chaque flacon contenant le mélange d'alcaloïdes et PDA, est homogénéisé par agitation manuelle puis son contenu est versé dans des boîtes de pétri identifiées. Le mélange est laissé au repos jusqu'à solidification et refroidissement.

Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais sans addition d'alcaloïdes.

Trois répétitions sont effectuées pour chaque dilution.

## 5. Repiquage des souches du *F.o.a*

---

Après solidification, des disques mycéliens de 4 mm de diamètre sont prélevés sur culture monospore âgée de 15 jours pour les souches cultivées sur le milieu contenant l'extrait brut et de 30 jours pour celles cultivées sur le milieu contenant la scopolamine ou l'atropine. Chaque disque est déposé au centre d'une boîte.

Après ensemencement, les boîtes de pétri (témoins et essais) sont mises à incuber à une température ambiante de laboratoire (18-25°C) sous une lumière blanche continue jusqu'à ce que le mycélium du témoin ou d'essai couvre toute la boîte.

Au cours de cette expérimentation, trois répétitions sont retenues pour chaque dilution et pour chaque souche.

## 6. Evaluation de la croissance mycélienne radiale du *F.o.a*

---

La croissance mycélienne est mesurée quotidiennement pendant toute la période d'incubation en calculant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires tracés sur le fond de chaque boîte de pétri. Ces mesures sont arrêtées lorsque l'une des colonies mycéliennes couvre l'ensemble de la boîte.

Pour l'estimation de la croissance mycélienne radiale (CM), la technique utilisée est celle indiquée par **Rapilly (1968)** qui consiste à mesurer soit la croissance linéaire (L) soit la croissance diamétrale (D) des colonies du pathogène.

La croissance diamétrale (mm) =  $D = (D_c - d)$  Où  $D_c$  = Diamètre de la colonie (mm) ;  $d$  = diamètre initial de l'explantât (mm).

La croissance linéaire (mm) =  $L = (D_c - d) / 2$ .

La croissance mycélienne (CM) permet de calculer le pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante (**Douhou et al., 2004 ; Serghat, 2004 ; Raman et al., 2004 ; Attrassi et al., 2005 ; Shafique et Shafique, 2008**) :

$I \% = (CM_t - CM_{tr} / CM_t) \times 100$  où  $I \%$  = Pourcentage d'inhibition,  $CM_t$  = Croissance mycélienne (estimé par D ou par L) du témoin,  $CM_{tr}$  = Croissance mycélienne du traité en mm.

La vitesse moyenne de la croissance mycélienne permet également de calculer le pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante (**Hassikou et al., 2003**) :

$I \% = (V_0 - V) / V_0 \times 100$  où  $V$  = La vitesse de l'essai avec l'alcaloïde (mm/jrs) ;  $V_0$  = La vitesse du témoin (mm/jrs).  $I \%$  = pourcentage d'inhibition à la dose x d'alcaloïde.

La vitesse de croissance mycélienne est définie selon la formule suivante:

Vitesse de croissance mycélienne = (croissance linéaire ou diamétrale) / nombre de jours

D'après **Hmouni et al. (2003)** et **Kpemissi (2007)**, le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante:

$I (\%) = (D_0 - D_c / D_0) \times 100$  où  $D_0$  = diamètre moyen des colonies témoins et  $D_c$  = diamètre moyen des colonies traitées (**Hmouni et al., 2003 ; Kpemissi, 2007**).

Selon **Kpemissi (2007)**, l'extrait est dit:

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible;
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible;
- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50 %, la souche est dite limite.
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25 %, la souche est dite peu sensible ou résistante.

## **7. Analyse statistique**

---

L'analyse statistique des résultats est effectuée à l'aide du logiciel statgraphics. Elle a porté sur la comparaison des différents traitements grâce à une analyse de la variance (ANOVA) et le test LSD. Les résultats obtenus sont, par la suite, représentés sous forme de graphiques grâce au logiciel excel.

---

# Résultats et interprétations

## I. Callogenèse

### 1. Production des vitro-semis chez *D. tatula* et *D. stramonium*

---

Les pourcentages de germination de *D. tatula* et *D. stramonium* obtenus après 1 mois de culture sont respectivement de 97% et de 96%. Aucune contamination n'a été enregistrée au cours de la germination et le développement des vitro-semis (**figure 10**). Les hypocotyles de ces derniers sont destinés à l'induction des cals par hormones ou par souches d'*Agrobacterium tumefaciens*.

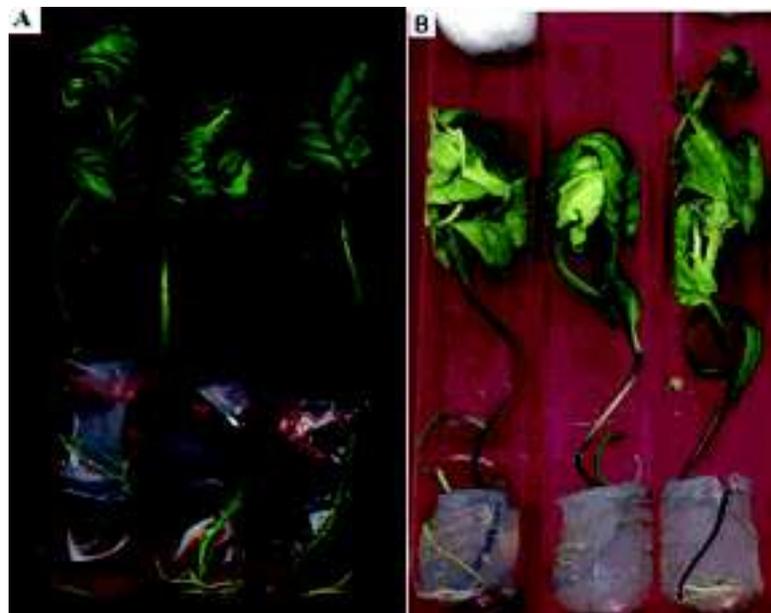


Figure 10: Vitro-semis de *D. stramonium* (a) et *D. tatula* (b) (G x 0.5).

### 2. Production des cals

---

#### 2.1. Induction par hormones chez *D. tatula* et *D. stramonium*

L'utilisation de la combinaison hormonale 0.02 mg/l d'ANA et 0.2 mg/l de BAP, induit la formation de cals sur les fragments de tiges, de racines et de feuilles chez *D. tatula* et *D. stramonium*.

Après 7 jours de mise en culture, les fragments d'hypocotyles et de racines présentent un début de Callogenèse. Alors que les fragments de feuilles ne sont qu'à leur début de gonflement. Ce n'est qu'après 2 semaines de mise en culture qu'un développement d'amas cellulaires est observé sur les extrémités et la surface des fragments de feuilles.

Sur les feuilles, le début de la Callogenèse se manifeste par l'apparition de points blancs au niveau des zones d'excisions. Alors que dans le cas des hypocotyles et des racines, le gonflement important de l'organe est suivi d'une déchirure des assises externes sous l'influence des divisions cellulaires plus internes et qui sont à l'origine du cal formé.

Après 5 semaines de culture, le milieu testé induit, chez les hypocotyles et les racines, une Callogenèse importante avec une disparition presque de tout l'explant, alors que les explants de feuilles présentent une Callogenèse plus tardive.

### 2.1.1. Nature des cals chez *D. tatula* et *D. stramonium*

La nature des cals formés est différente selon l'explant et l'espèce. Dans le cas de *D. tatula*, les cals issus de feuilles et d'hypocotyles ont une couleur vert-blanchâtre; un aspect nodulaire plus ou moins dût. Alors que les cals issus des racines sont de couleur légèrement brune et ont un aspect nodulaire et une consistance dure (tableau 2).

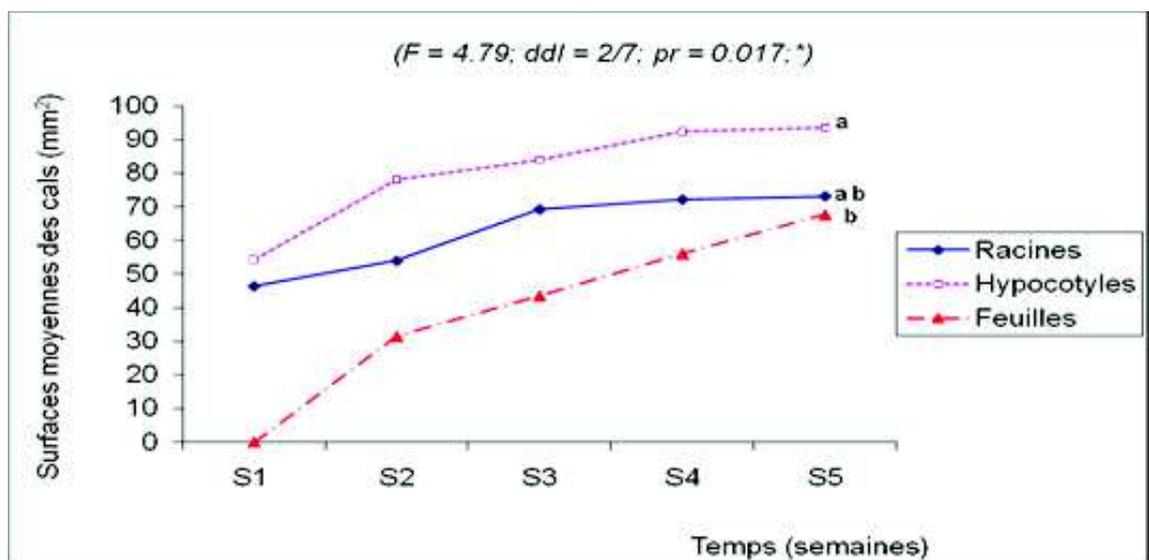
Dans le cas de *D. stramonium*, les cals issus d'hypocotyles et de feuilles sont dûrs, de couleur verte et présentent un aspect nodulaire. Alors que les cals issus de racines sont dûrs et de couleur légèrement brune avec un aspect nodulaire (tableau 2).

### 2.1.2. Surfaces moyennes des cals de *D. tatula*

Nous n'avons suivi l'évolution de la surface moyenne des cals en fonction du temps que pour *D. tatula*.

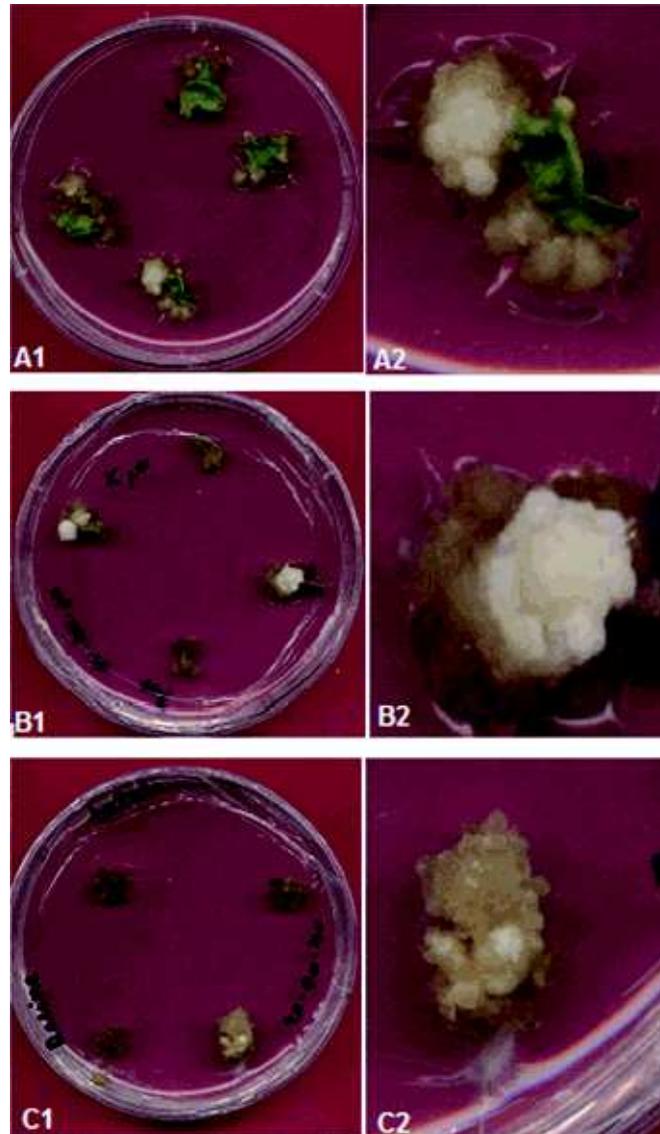
La figure 11 montre une évolution progressive de la surface moyenne des cals de *D. tatula* en fonction du temps. Les meilleures surfaces sont obtenues avec les cals d'hypocotyles.

L'analyse de la variance réalisée après 5 semaines de culture, révèle une différence hautement significative entre les surfaces moyennes des cals de différents types d'explants de *D. tatula* (annexe 2.a). En effet selon le test LSD, les fragments d'hypocotyles expriment le développement de cals le plus important avec une surface moyenne de  $93.63 \text{ mm}^2$  (groupe a) par rapport aux fragments de racines avec  $73.1 \text{ mm}^2$  (ab) et de feuilles avec  $67.7 \text{ mm}^2$  (groupe b).



**Figure 11 :** Evolution de la surface moyenne des cals des différents explants de *D. tatula* en fonction du temps.

La figure 12 illustre l'aspect des cals obtenus sur les différents explants de *D. tatula*.



**Figure 12:** Cals induits par hormones sur différents explants de *D. tatula* après 5 semaines de culture.

- **A:** Cals induits sur fragments de feuilles,
- **A1 (G x 0.66), A2 (G x 2.56).**
- **B:** Cals induits sur fragments d'hypocotyles,
- **B1 (G x 0.66), B2 (G x 4.66).**
- **C:** Cals induits sur fragments de racines,
- **C1 (G x 0.66), C2 (G x 3.08).**

### 2.1.3. Biomasses sèches et contenus en scopolamine et hyoscyamine

Le **tableau 2** montre que les biomasses sèches moyennes des cals induits par hormones selon les différents explants (feuilles, hypocotyles ou racines) sont nettement supérieures

chez *D. tatula* par rapport à celles de *D. stramonium*. L'analyse de la variance sur la biomasse sèche des cals induits révèle une différence très hautement significative à la 5<sup>ème</sup> semaine de culture (**annexe 2.c**).

Le test LSD montre que chez *D. tatula* sont les cals induits sur les hypocotyles (a) qui présentent les biomasses les plus importantes, suivis de ceux induits sur les racines (ab) et les feuilles (b), Alors que les faibles biomasses sont obtenues sur les explants d'hypocotyles, de racines et de feuilles de *D. stramonium* (c). Ces derniers présentent des biomasses très proches (**annexe 2.c**).

D'après le **tableau 2**, les cals induits par hormones sur les racines chez les deux variétés de *D. stramonium* présentent les meilleures teneurs en hyoscyamine et scopolamine par rapport aux feuilles et aux hypocotyles. L'analyse de la variance sur le contenu en alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine) des cals à la 5<sup>ème</sup> semaine de culture montre une différence très hautement significative (**annexe 2.e**). Selon le test LSD, ce sont les racines de *D. tatula* qui présentent le contenu le plus élevé en H&S (groupe a), suivis de ceux des racines de *D. stramonium* et de ceux d'hypocotyles de *D. tatula*(ab). Alors que les cals induits sur les feuilles de *D. tatula* et ceux d'hypocotyles (b) et de feuilles(c) de *D. stramonium* présentent les faibles teneurs en H&S.

**Tableau 2 : Biomasses et contenus en alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine : H&S) des cals induits par hormones (0.02 mg d'ANA et 0.2 mg de BAP) sur différents explant chez deux variétés de *D. stramonium* après 5 semaines de culture. Les chiffres en gras représentent les résultats les plus élevés.**

Variété de <i>Datura</i>	Cals induits sur explants de	Biomasses sèches (g MS/cal)	H&S (mg/g MS)	Aspects des cals
<i>D. stramonium</i>	Feuilles	0.02 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.57 ± 0.042 <sup>c</sup>	Dûr; vert
	Hypocotyles	0.04 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.94 ± 0.259 <sup>b</sup>	Dûr; vert
	Racines	0.02 ± 0.006 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.119 <sup>ab</sup>	Dûr; légèrement brun
<i>D. tatula</i>	Feuilles	0.10 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.225 <sup>b</sup>	Dûr; vert-blanc
	Hypocotyles	0.12 ± 0.016 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.139 <sup>ab</sup>	Dûr; vert-blanc
	Racines	0.11 ± 0.012 <sup>ab</sup>	1.35 ± 0.050 <sup>a</sup>	Dûr; légèrement brun

## 2.2. Induction par souches d'*A. tumefaciens* chez *D. tatula*

Après 7 jours de mise en culture, on observe un gonflement des fragments d'hypocotyles de *D. tatula* et dans certains cas un début de Callogenèse (prolifération de cellules) quelle que soit la souche testée (**figure 13**). Cette prolifération cellulaire débute au niveau des zones de l'infection de l'organe.



**Figure 13:** Réactivité des cals induits sur *D. tatula* par différentes souches d'*A. tumefaciens* après 7 jours de co-culture (G x 4.33).

- **A:** Cal formé sur explant induit par la souche E2x,
- **B:** Cal formé sur explant induit par la souche E17,
- **C:** Cal formé sur explant induit par la souche C58.

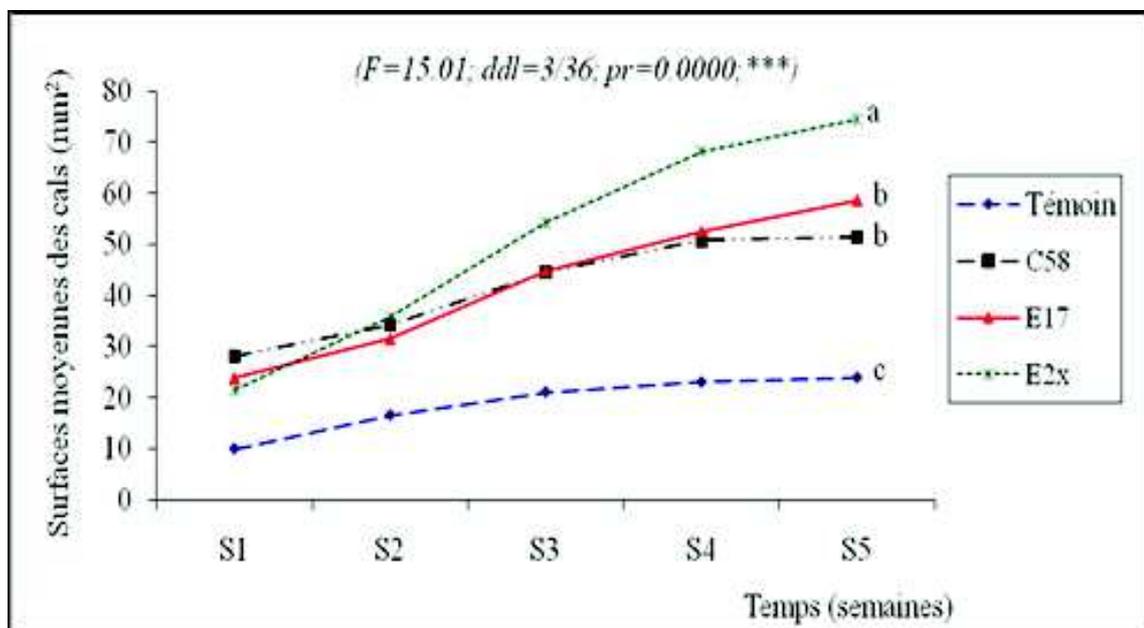
### 2.2.1. Nature des cals

Les cals obtenus présentent un aspect d'ûr blanchâtre et ceci pour les trois souches d'*A. tumefaciens* testées, ainsi que pour le témoin (**tableau 3**).

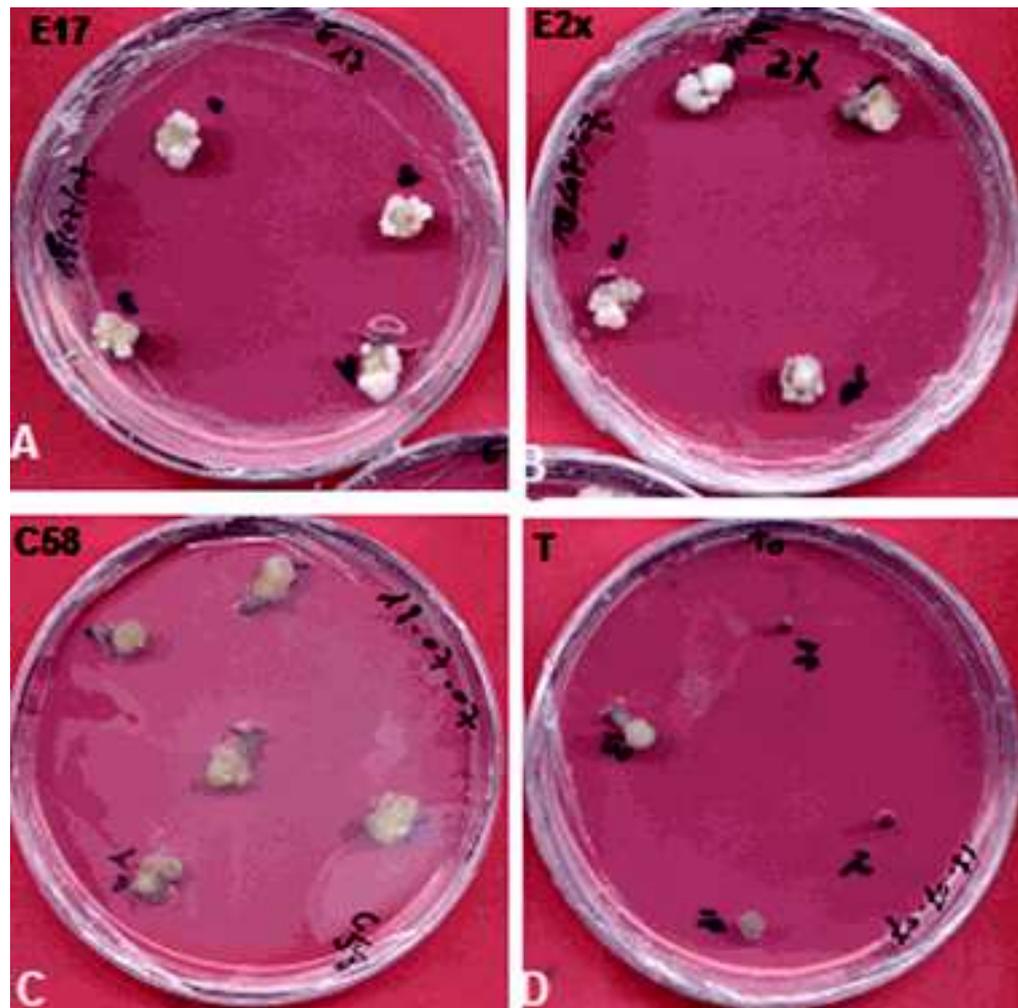
### 2.2.2. Surfaces moyennes des cals

La **figure 14** montre une évolution en fonction du temps de la surface moyenne des cals pour toutes les souches testées.

L'analyse de la variance réalisée après 5 semaines de culture, révèle une différence très hautement significative entre les surfaces moyennes des cals induits par les différentes souches bactériennes (**annexe 2.b**). Effectivement, le test LSD révèle l'existence de 3 groupes homogènes: les cals induits par la souche E2x présentent les meilleures surfaces moyennes avec  $74.5 \text{ mm}^2$  (groupe a), suivis de ceux induits par la souche E17 et C58 (groupe b) avec respectivement  $58.7 \text{ mm}^2$  et  $51.4 \text{ mm}^2$ . Alors que les faibles surfaces sont obtenues sur les témoins avec  $23.9 \text{ mm}^2$  (groupe c) (**figure 15**).



**Figure 14:** Evolution de la surface moyenne des cals induits par les différentes souches d'*A. tumefaciens* en fonction du temps.



**Figure 15:** Cals induits sur *D. tatula* par différentes souches d'*A. tumefaciens* après 5 semaines de culture.

- **A:** Cals induits par la souche E17,
- **B:** Cals induit par la souche E2x.
- **C:** Cals induits par la souche C58.
- **D:** Témoin (**G x 0.66**).

### 2.2.3. Biomasses sèches et contenus en scopolamine et hyoscyamine

Chez *D. tatula* ce sont les cals induits par souches bactériennes qui présentent les biomasses les plus importantes. L'analyse de la variance sur la biomasse des cals induits montre une différence très hautement significative à la 5<sup>ème</sup> semaine de culture (**annexe 2.d**), avec en tête la souche E17 (groupe a) suivie de E2x et C85 (groupe b et c) respectivement. La biomasse des cals induits par la souche E17 est environ trois fois plus élevée que celle du témoin et d'hypocotyles induits par hormones (groupe d) (**tableau 3**).

Quant aux contenus en alcaloïdes, ce sont les cals induits par la souche E17 d'*A. tumefaciens* qui montrent les meilleures teneurs par rapport à ceux induits par les souches E2x et C58.

L'analyse de la variance sur le contenu en alcaloïdes (hyoscyamine et scopolamine) des cals à la 5<sup>ème</sup> semaine de culture montre une différence très hautement significative (**annexe 2.f**). En effet les cals induits par la souche E17 (groupe a) présentent presque le double du contenu en alcaloïdes par rapport aux témoins et aux hypocotyles induits par hormones (groupe d) (**tableau 3**).

Dans l'ensemble, les contenus en alcaloïdes les plus élevés sont enregistrés, pour les cals induits par souches bactériennes.

**Tableau 3: Biomasses et contenus en alcaloïdes (hyoscyamine + scopolamine : H&S) des cals induits par hormones et par souches bactériennes sur hypocotyles de *D. tatula*, après 5 semaines de culture. Les chiffres en gras représentent les résultats les plus élevés.**

Type d'induction		Biomasse (g MS/cal)	H&S (mg/g MS)	Aspect des cals
Souches bactériennes	C58	0.20 ± 0.036 <sup>c</sup>	1.28 ± 0.020b <sup>c</sup>	Dûr blanchâtre
	E17	0.31 ± 0.042 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.031 <sup>a</sup>	Dûr blanchâtre
	E2x	0.25 ± 0.011 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.025 <sup>b</sup>	Dûr blanchâtre
	Témoin	0.13 ± 0.012 <sup>d</sup>	1.12 ± 0.015 <sup>d</sup>	Dûr blanchâtre
Hormones	Hypocotyles	0.12 ± 0.016 <sup>d</sup>	1.19 ± 0.139 <sup>cd</sup>	Dûr; vert-blanc

## II. Propriétés de croissances et contenus en hyoscyamine de cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* et de suspensions cellulaires de *D. tatula*

### 1. Cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* en milieu liquide avec ou sans hormones de croissance

#### 1.1. Paramètres de croissances

##### Biomasses sèches finales

D'après le tableau 4, on observe que la biomasse sèche finale (g MS/l) la plus élevée est celle des chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. tatula* (sans hormones de croissance), elle est de 9.52 ± 0.32 g/l. On note une perte de biomasse d'environ 52% lorsque la lignée est cultivée dans un milieu contenant des hormones de croissance (chevelus racinaire H<sup>+</sup>). Par ailleurs, la biomasse sèche finale de chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. stramonium* est de 7.92 ± 0.96 g/l. On note également une perte de biomasse d'environ 41% pour les chevelus racinaire H<sup>+</sup>.

L'analyse de la variance des différents types de culture de chevelus racinaires étudiés révèle un effet très hautement significatif (**annexe 3.a**). Le test LSD révèle l'existence de 3 groupes homogènes avec une supériorité de culture de chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. tatula* (groupe a) et *D. stramonium* (groupe b) par rapport à celles H<sup>+</sup> (groupe c) de ces deux variétés de *Datura*.

## **Taux de croissance et temps de dédoublement**

Les chevelus racinaires H<sup>+</sup> de *D. tatula* et *D. stramonium* forment beaucoup de cals (**figure 16 B**), c'est ce qui pourrait ralentir la croissance des racines (élongation, ramification). En effet, les chevelus racinaires H<sup>-</sup> ne forment pas de cals (**figure 16 A**), ils présentent les meilleurs taux de croissance  $\mu = 0.21/\text{jet } 0.19/\text{j}$  et les meilleurs temps de dédoublement  $td = 3.29 \text{ et } 3.6$  jours; respectivement chez *D. tatula* et *D. stramonium*.

Alors que les mêmes lignées cultivées dans le même milieu avec des hormones (chevelus racinaire H<sup>+</sup>) présentent chez *D. tatula* un taux de croissance  $\mu = 0.15/\text{j}$  et un temps de dédoublement  $td = 4.6$  jours, soit une perte d'environ 28% sur le taux de croissance et un retard d'un jour et demi pour le temps de dédoublement. Par ailleurs elles présentent chez *D. stramonium* un taux de croissance et un temps de dédoublement très proches de ceux de *D. tatula*, soit une perte d'environ 21% sur le taux de croissance et un retard d'un jour pour le temps de dédoublement (**tableau 4**).

## **1.2. Contenus en hyoscyamine**

### **1.2.1. Productions spécifiques en hyoscyamine**

D'après le tableau 4, ce sont les chevelus racinaires H<sup>-</sup> (n'ayant pas formés de cals ou non différenciés) de *D. tatula* et *D. stramonium* qui sont les plus performants avec respectivement 6.2 mg/g MS et 5.8 mg/g MS. Alors que, les chevelus racinaires H<sup>+</sup> (différenciés sous l'influence des hormones) produisent chez *D. tatula* 2.1 mg/g MS soit une réduction d'environ 66% par rapport aux chevelus racinaires H<sup>-</sup>. Ils produisent en outre, 1.55 mg/g MS chez *D. stramonium* soit une réduction d'environ 73% par rapport aux chevelus racinaires H<sup>-</sup>.

L'analyse de la variance montre que la production spécifique en hyoscyamine des différents types de cultures est statistiquement très hautement significative (**annexe 3.c**). En effet, le test LSD révèle que les cultures H<sup>-</sup> de *D. tatula* et *D. stramonium* (groupe a) sont les plus riches en hyoscyamine par rapport à celles H<sup>+</sup> de *D. tatula* (groupe b) et *D. stramonium* (groupe c).

### **1.2.2. Productivités en hyoscyamine**

L'analyse de la variance de la productivité en hyoscyamine des cultures de chevelus racinaires révèle un effet très hautement significatif (**annexe 3.e**). Le test LSD révèle que les chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. tatula* (groupe a) et ceux de *D. stramonium* (groupe b) sont les plus productifs en hyoscyamine avec respectivement 1.97 mg/l/jour et 1.53 g/l/jour (**tableau 4**). Pour ce paramètre, on note une perte d'environ 84% de productivité pour les mêmes

lignées dédifférenciées sous l'effet des hormones (chevelus racinaires H<sup>+</sup>) (groupe c). En effet la productivité de ces derniers est de 0.32 mg/l/jour et 0.24 mg/l/jour pour *D. tatula* et *D. stramonium* respectivement.

**Tableau 4 : Paramètres de croissance et contenus en hyoscyamine des différentes cultures de chevelus racinaires de *D. tatula* et *D. stramonium* sur milieu B5 liquide après 30 jours de culture en cuvée.**

Cultures de chevelus racinaires		Propriétés de croissance				Contenus en hyoscyamine	
		Biomasses sèches finales (g MS/l)	Phases de latence (d)	Taux de croissance (μ/j)	Temps de dédoublement (td j)	Productions spécifiques (mg/gMS)	Productivités (mg/l/j)
<i>D. stramonium</i>	H <sup>-</sup>	7.92 <sup>b</sup> ± 0.96	0	0.19	3.6	5.8 <sup>a</sup> ± 0.21	1.53 <sup>b</sup> ± 0.19
	H <sup>+</sup>	4.66 <sup>c</sup> ± 0.65	0	0.15	4.6	1.55 <sup>c</sup> ± 0.13	0.24 <sup>c</sup> ± 0.03
<i>D. tatula</i>	H <sup>-</sup>	9.52 <sup>a</sup> ± 0.32	0	0.21	3.29	6.2 <sup>a</sup> ± 0.51	1.97 <sup>a</sup> ± 0.023
	H <sup>+</sup>	4.56 <sup>c</sup> ± 0.22	0	0.15	4.6	2.1 <sup>b</sup> ± 0,10	0.32 <sup>c</sup> ± 0.031

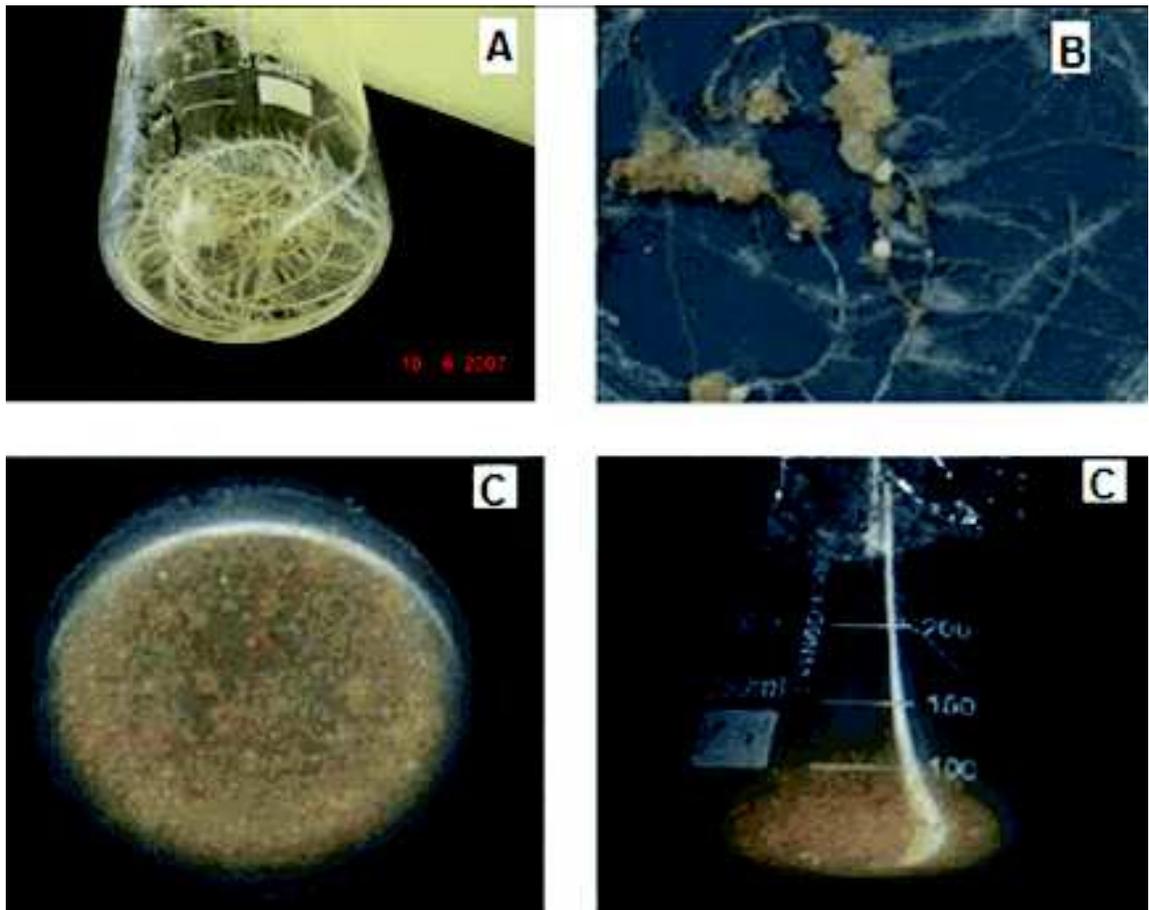
## 2. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de *D. tatula* en culture en cuvée.

### 2.1. Paramètres de croissance

#### 2.1.1. Biomasses sèches finales

L'analyse de la variance de la biomasse sèche finale sur les différents types de culture de *D. tatula* (**tableau 5**) montre un effet très hautement significatif (**annexe 3.b**). La biomasse de la suspension cellulaire E17, cultivée en présence d'hormones de croissance, qui est statistiquement égale aux chevelus racinaires H<sup>+</sup> (4.48 g/l) (groupe b) est plus faible par rapport aux chevelus racinaires H<sup>-</sup> (9.52g/l) (groupe a).

La **figure 16** illustre les aspects généraux des cultures de chevelus racinaires (H<sup>-</sup> et H<sup>+</sup>) et de suspensions cellulaires en milieu liquide après 10 jours de culture.



**Figure 16** : Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires en milieu liquide.

- A: Aspect général de la culture en cuvé de chevelus racinaires  $H^-$  au 10<sup>ème</sup> jour de culture (**G x 0.6**).
- B : formation de cals de chevelus racinaires  $H^+$  (**G x 3**).
- C: aspect général de la suspension cellulaire E17 (**G x 1**).

### 2.1.2. Taux de croissance et temps de dédoublement

Chez *D. tatula*, on observe d'après le **tableau 5** que la suspension cellulaire E17 présente des caractéristiques de croissance beaucoup moins performantes que les chevelus racinaires  $H^-$ . En effet non seulement la suspension présente une faible biomasse par rapport aux chevelus racinaire  $H^-$ , mais un faible taux de croissance  $\mu$  de 0.13/j, un temps de latence de 2 jours et un temps de dédoublement  $td$  long soit, 5.31 jours.

## 2.2. Contenus en hyoscyamine

### 2.2.1. Productions spécifiques en hyoscyamine

L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif de la production spécifique en hyoscyamine entre les différentes cultures de *D. tatula* (**annexe 3.d**). Le test LSD montre que le contenu en hyoscyamine de la suspension cellulaire E17 (3.1 mg/g MS, groupe b)

est moins élevé que celui de cultures des chevelus racinaires H<sup>-</sup> (6.2 mg/g MS groupe a) et plus élevé que celui de H<sup>+</sup> (2.1 mg/g MS, groupe c).

### 2.2.2. Productivités en hyoscyamine

L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif de la productivité en hyoscyamine entre les différents types de culture de *D. tatula* (**tableau 5**) (**annexe 3.f**). En effet, la productivité de la suspension cellulaire E17 (groupe b) qui est de 0.46 mg/g MS est plus élevée que celle des cultures des chevelus racinaires H<sup>+</sup> (0.32 mg/l/j, groupe c) et inférieure à celle des chevelus racinaires H<sup>-</sup> (1.97 mg/l/j, groupe a).

**Tableau 5 : Paramètres de croissance et contenus en hyoscyamine des différentes cultures de *D. tatula* sur milieu B5 liquide après 30 jours de culture en cuvé.**

Cultures	Biomasses sèches finales (g MS/l)	Phases de latence (d)	Taux de croissance ( $\mu$ /j)	Temps de dédoublement (td j)	Productions spécifiques (mg/gMS)	Productivités (mg/l/j)
Suspensions E17	4.48 <sup>b</sup> ± 0.21	2	0.13	5.31	3.1 <sup>b</sup> ± 0.21	0.46 <sup>b</sup> ± 0.011
Chevelus racinaires H <sup>-</sup>	<b>9.52 <sup>a</sup> ± 0.32</b>	0	0.21	3.29	<b>6.2 <sup>a</sup> ± 0.51</b>	<b>1.97 <sup>a</sup> ± 0.023</b>
Chevelus racinaires H <sup>+</sup>	4.56 <sup>b</sup> ± 0.22	0	0.15	4.6	2.1 <sup>c</sup> ± 0.10	0.32 <sup>c</sup> ± 0.031

## 3. Cultures de chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. stramonium* en modes cuvé et semi continu

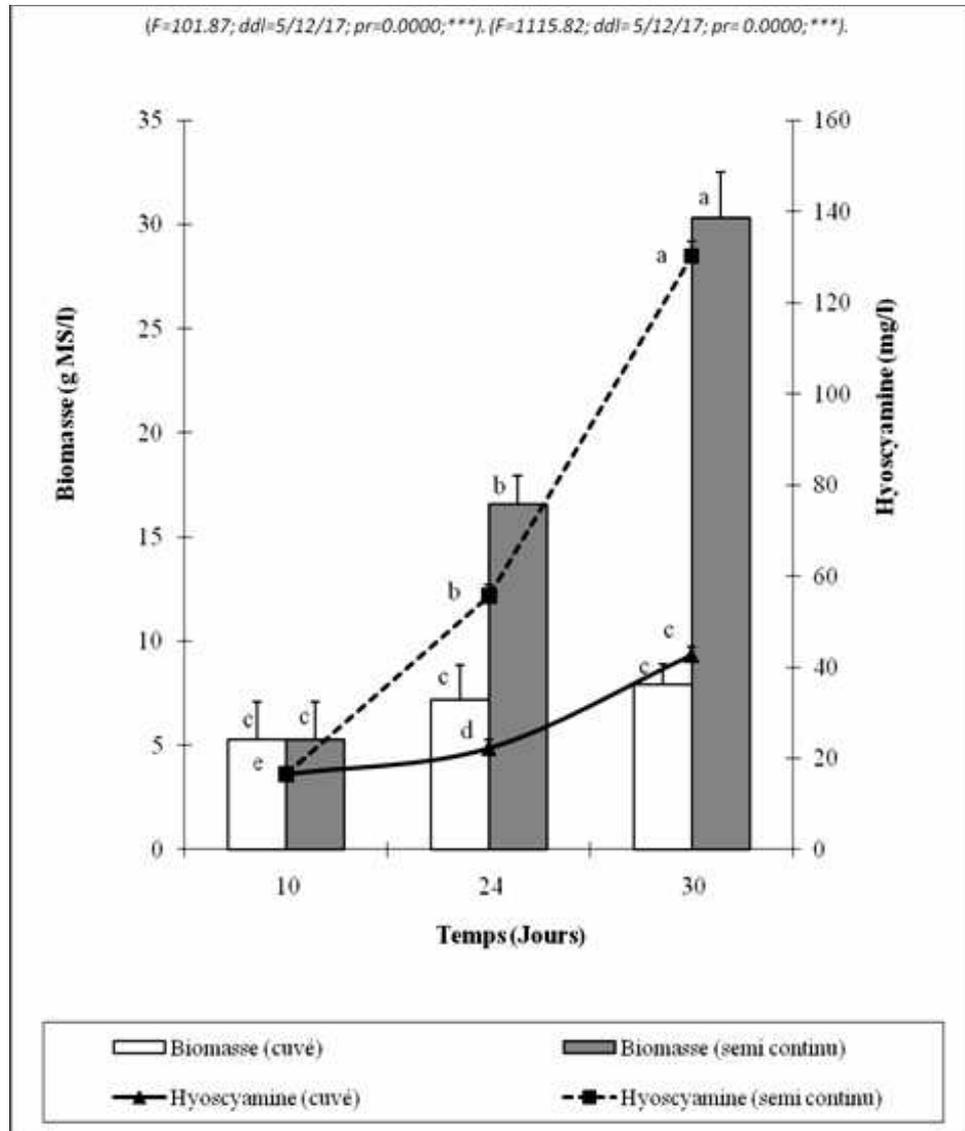
### 3.1. Biomasses sèches

Le mode semi continu favorise largement la croissance par rapport au mode de culture en cuvé. L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du mode de culture sur la biomasse (**annexe 3.g**). Le test LSD montre que la biomasse enregistrée au 24<sup>ème</sup> jour de culture en mode semi continu (16.59 ± 1.35 g/l, groupe b) est deux fois plus élevée que celle de la culture en cuvé pour la même durée de culture (7.18 ± 1.66 g/l, groupe c) et elle est 4 fois plus importante (30.33 ± 0.96 g/l, groupe a) que celle de la culture en cuvé après 30 jours de culture (7.92 ± 0.96 g/l, groupe c) (**figure 17**).

### 3.2. Rendements en hyoscyamine.

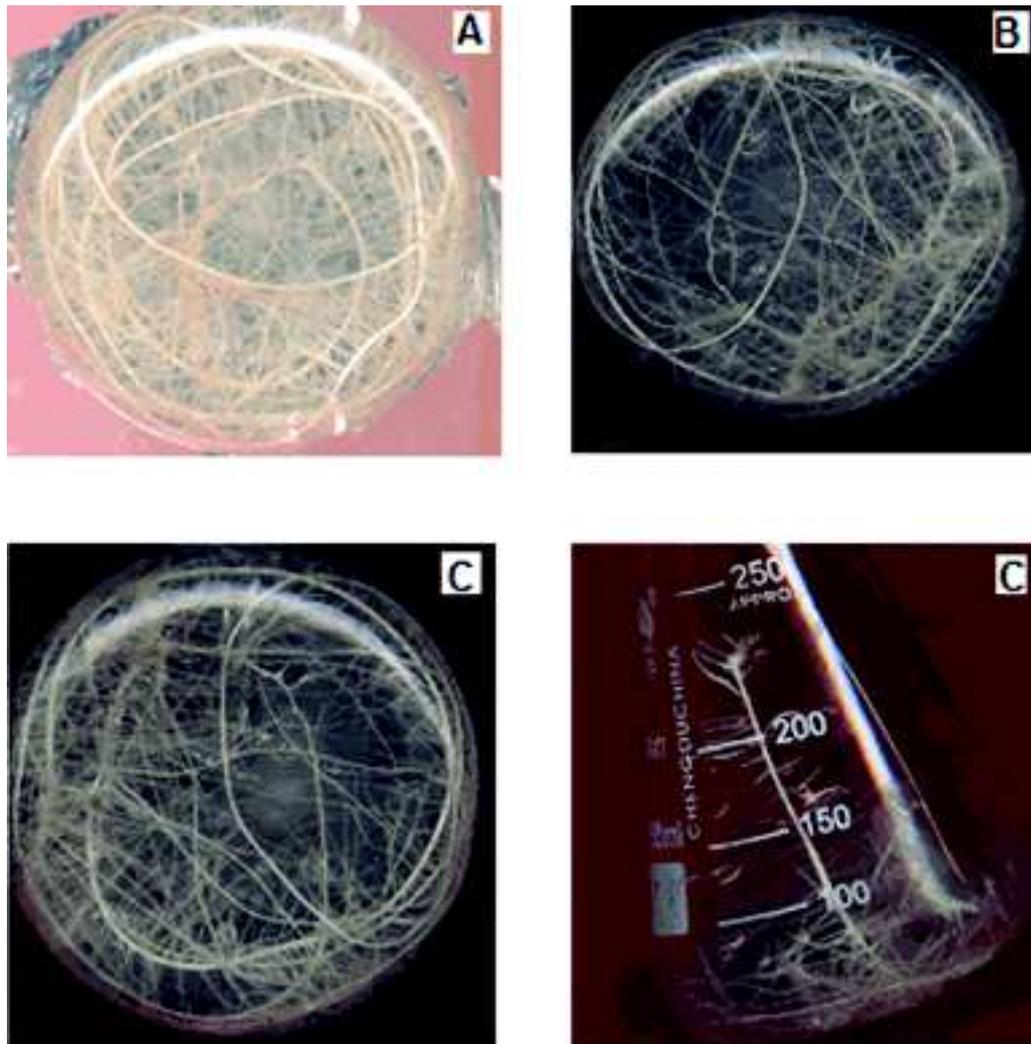
L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du mode de culture en ce qui concerne le rendement en hyoscyamine (**annexe.3.h**). Pour ce paramètre, on observe d'après la **figure 17** que la culture en cuvé passe de 16.53 ± 1.66 mg/l au 10<sup>ème</sup> jour de culture (groupe e) à 22.27 ± 1.96 mg/l au 24<sup>ème</sup> jour de culture (groupe d), et atteint 42.69 ± 1.86 mg/l au 30<sup>ème</sup> jour de culture (groupe c).

Quant aux mode semi continu, on remarque, d'après la **figure 17**, que le rendement au 24<sup>ème</sup> jour atteint  $55.63 \pm 2.38$  mg/l (groupe b), il passe au 30<sup>ème</sup> jour de culture à  $130 \pm 3.2$  mg/l (groupe a) et permet un gain d'environ 67% par rapport au rendement en hyoscyamine obtenu avec une culture en cuvée.



**Figure 17:** Evolutions des Biomasses et des contenus en hyoscyamine des chevelus racinaires  $H^-$  cultivés en mode cuvée et en mode semi continu, en fonction du temps de culture (*D. stramonium*).

La **figure 18** illustre les aspects généraux des cultures de chevelus racinaires  $H^-$  en mode cuvée et semi continu au 24<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jour de culture chez le *D. stramonium*.



**Figure 18:** Cultures de chevelus racinaires *H* en mode cuvée et semi continu.

- A: Culture en semi continu de chevelus racinaires au 24<sup>ème</sup> jour de culture (vue d'en bas de l'eren).
- B: culture en cuvée de chevelus au 24<sup>ème</sup> jour de culture (vue d'en bas de l'eren).
- C: Aspect général de culture en cuvée de chevelus racinaires au 30<sup>ème</sup> jour de culture (G x 1).

### III. Activités *in vitro* des alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne radiale de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

#### 1. Taux de croissance mycélienne

La mesure des diamètres des colonies est faite après la fin d'incubation pour chaque concentration. La durée d'incubation correspond à 9 jours pour l'extrait brut et à 12 jours pour les solutions pures (scopolamine et atropine).

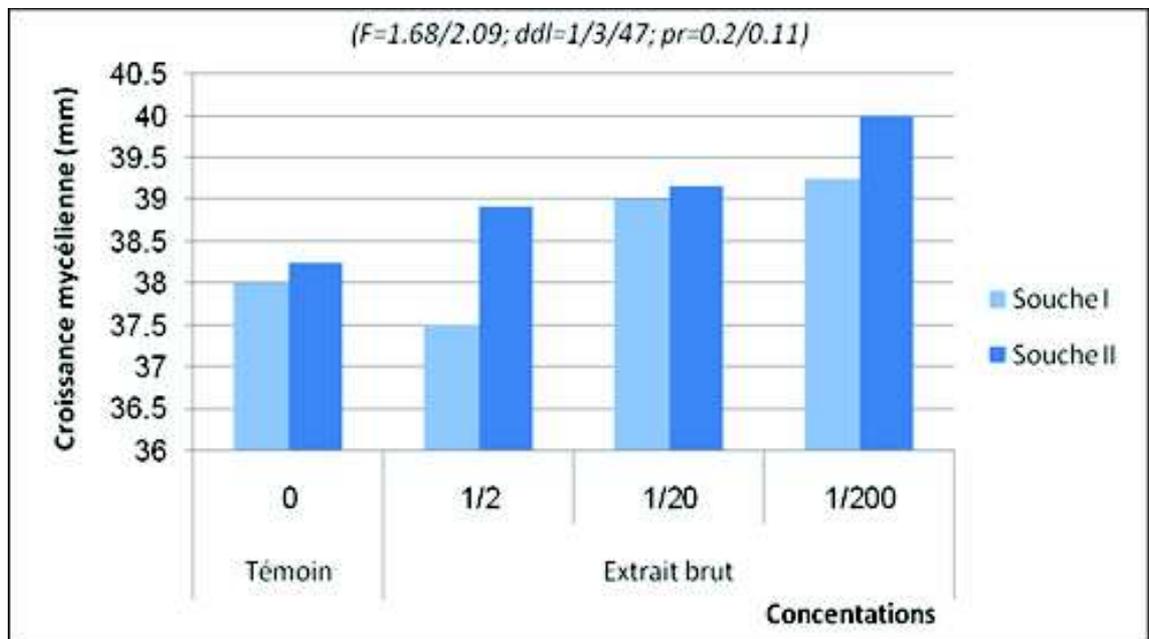
Pour l'extrait brut, la figure 19 montre que les croissances mycéliennes obtenues à des concentrations de 1/2, 1/20 et 1/200 correspondantes respectivement à  $125 \times 10^{-4}$ ,  $125 \times 10^{-5}$  et  $125 \times 10^{-6}$  mg/ml sont respectivement: 37.5, 39 et 39.25 mm pour la souche I et 38.9, 39.16 et 40 mm pour la souche II. Ces croissances sont proches de celles obtenues chez les témoins (sans extrait).

En effet, l'analyse de la variance à deux facteurs réalisée après 9 jours d'incubation ne révèle aucun effet significatif des facteurs souches et concentrations de l'extrait brut utilisés dans le milieu de culture sur la croissance mycélienne (**annexe 4.a**).

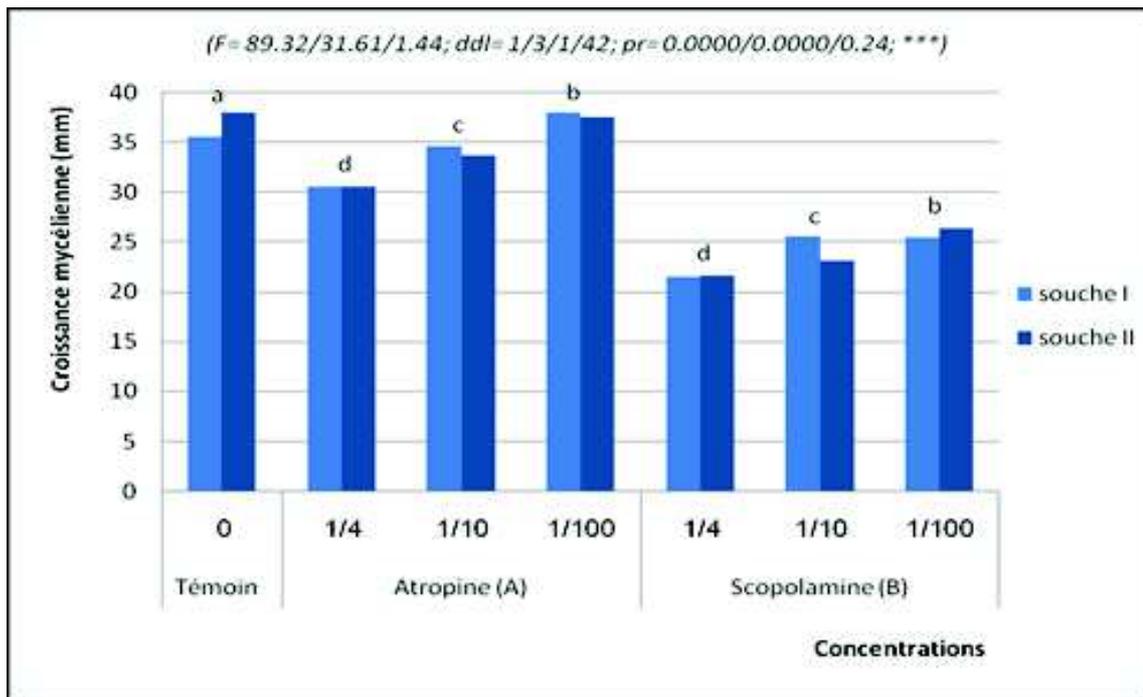
Quant aux solutions pures (scopolamine et atropine), l'analyse de la variance de la croissance mycélienne par rapport aux facteurs concentrations et solutions pures a fait ressortir des effets très hautement significatifs. En revanche, par rapport au facteur souche, l'effet n'est pas statistiquement significatif (**annexe 4.b**).

Effectivement, le test LSD révèle l'existence de 4 groupes homogènes: Le témoin (sans alcaloïdes) présente les meilleurs taux de croissances (groupe a), suivis des concentrations 1/100 (groupe b) et 1/10 (groupe c). Alors que les faibles taux de croissances sont obtenus avec la concentration 1/4 (groupe d) (**annexe 4.b**) (**figure 20**).

Dans l'ensemble, pour toutes les concentrations testées, l'atropine présente les meilleurs taux de croissances mycéliennes (groupe A) par rapport à la scopolamine (groupe B).



**Figure 19 :** Taux de croissances mycéliennes de *F.o.a* obtenus en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut et selon la souche testée.



**Figure 20 :** Taux de croissances mycéliennes de *F.o.a* obtenus en fonction des différentes concentrations de scopolamine et d'atropine et selon la souche testée.

## 2. Taux d'inhibition

Avec l'extrait brut, il n'y a pas eu d'inhibition significative de la croissance mycélienne quelque soit la dilution et la souche utilisée (**figure 19**). L'extrait brut est testé avec des concentrations très faibles (faible quantité récupérée) par rapport aux solutions pures (scopolamine et atropine). Au contraire, il ya eu une légère augmentation de la croissance mycélienne.

Par ailleurs, et contrairement à l'extrait brut, la croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* est inhibée par les solutions pures et le maximum d'inhibition après 12 jours d'incubation est obtenu avec la scopolamine à une concentration de 1/4 (= 2.5 mg/ml ) avec des taux de 43% pour la souche II et 39.35% pour la souche I. L'inhibition est moins importante à des concentrations de 1/10 (= 1 mg/ml ) et 1/100 (= 0.1 mg/ml ) avec respectivement: 29% et 28% pour la souche I et 39% et 30% pour la souche II (**figure 20**).

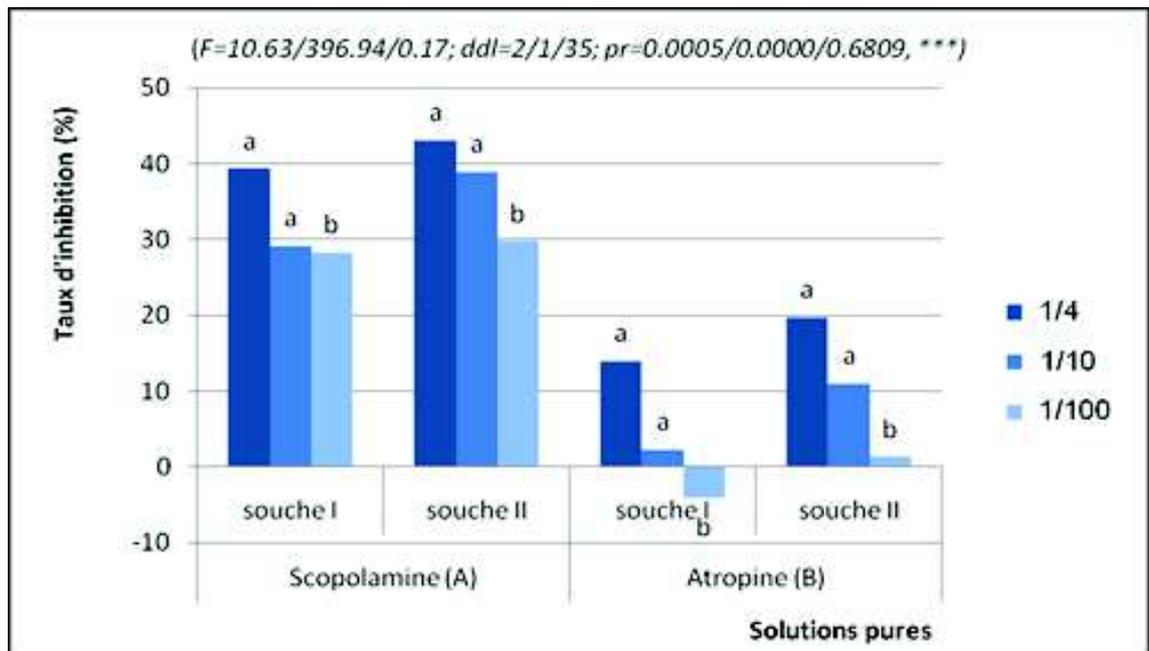
Quant à l'atropine, l'inhibition est moins importante par rapport à la scopolamine, le maximum d'inhibition est également obtenu à une concentration de 1/4 avec des taux respectifs de 14% et 19,7% pour les souches I et II. Par contre à une concentration de 1/100, l'atropine semble stimuler la croissance mycélienne de la souche I, ce qui donne pour cette dernière un taux d'inhibition négatif (**figure 20**).

L'analyse de la variance à trois facteurs réalisée après 12 jours d'incubations, ne montre aucun effet significatif des souches testées sur les pourcentages d'inhibitions, mais des effets très hautement significatifs pour les deux facteurs solutions pures et concentrations utilisés (**annexe 4 c**). Le test LSD au seuil 5% de l'effet des concentrations utilisées sur le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne fait ressortir 2 groupes homogènes. Le groupe (a) comporte les concentrations 1/4 et 1/10 qui se caractérisent par des taux d'inhibition les plus élevés de la croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* et le groupe (b) renferme uniquement la concentration 1/100 (**figure 21**).

L'effet inhibiteur des solutions pures (scopolamine et atropine) est proportionnel à la concentration. Plus celle-ci augmente plus la croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* est inhibée.

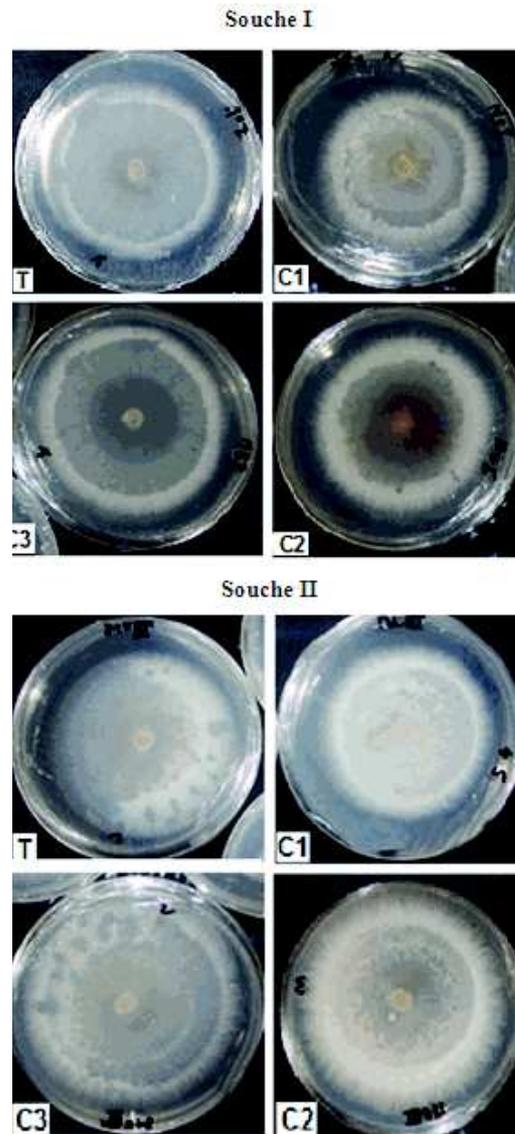
En outre, parmi les deux extraits testés, la scopolamine s'est montrée la plus inhibitrice à l'égard de la croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* pour toutes les concentrations testées (groupe A).

Selon les résultats obtenus, les taux d'inhibitions de la scopolamine sont compris entre 25 à 50%, la scopolamine est donc moyennement fongitoxique sur la croissance mycélienne et moyennement active sur les deux souches de *F.o.a*. Quant à l'atropine, les taux d'inhibitions sont inférieurs à 25%, donc elle est peu active sur les souches testées. Ces dernières sont donc limitées à la scopolamine et peu sensibles ou résistantes à l'atropine.

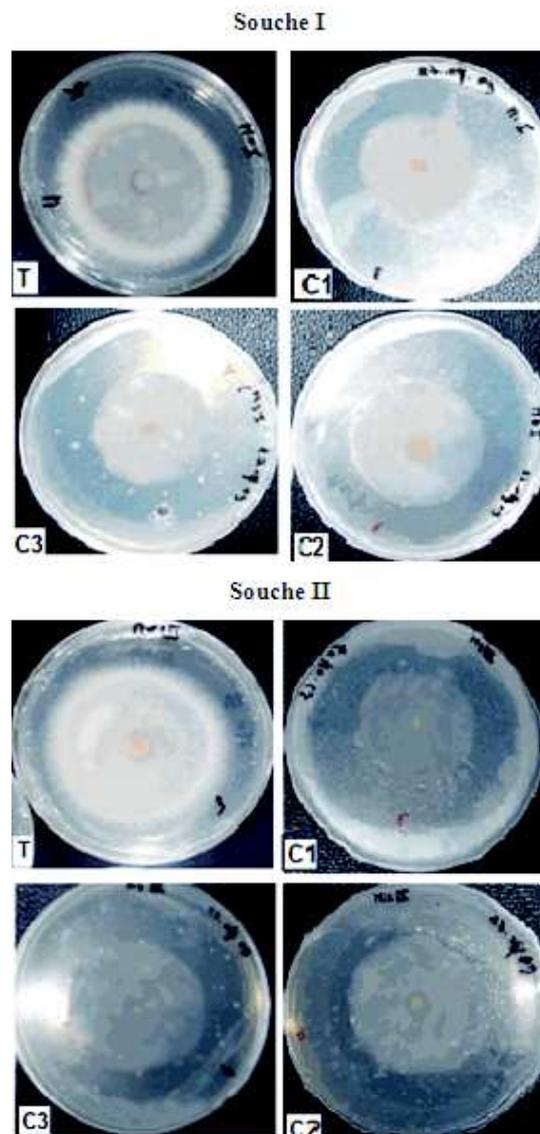


**Figure 21 :** Taux d'inhibitions provoqués en fonctions des différentes concentrations d'atropine et de scopolamine sur la croissance mycélienne de deux souches de *F.o.a*.

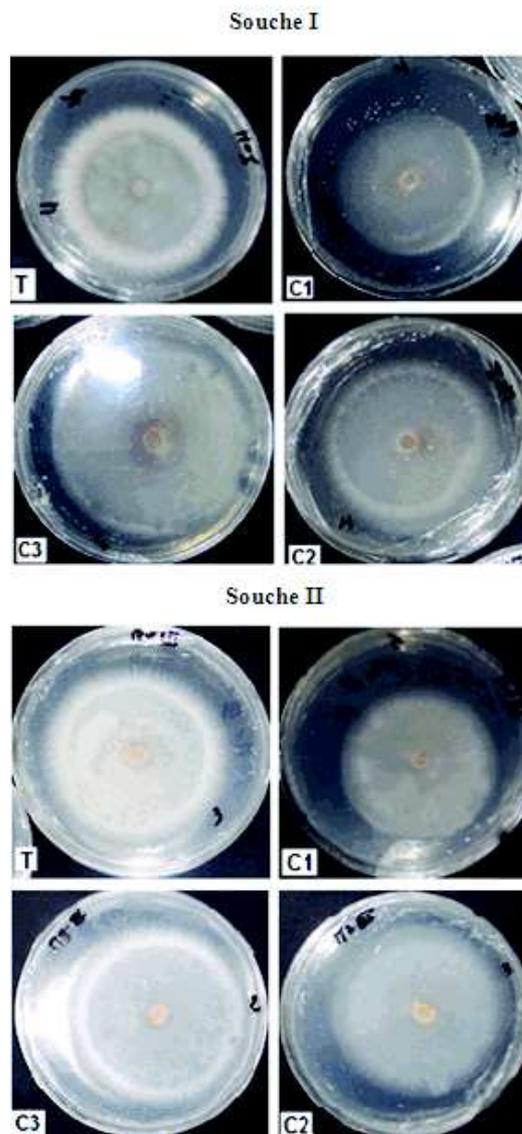
Les figures 22 , 23 et 24 illustrent respectivement: l'effet des concentrations de l'extrait brut, de scopolamine et de l'atropine sur la croissance mycélienne des deux souches (I et II) de *F.o.a*.



**Figure 22:** Croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* selon les différentes concentrations de l'extrait brut: T=Témoin, C1= 1/2, C2= 1/20, C3=1/200 (G x 0.5).



**Figure 23:** Croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* selon les différentes concentrations de scopolamine. T=Témoin, C1= 1/4, C2= 1/10, C3=1/100 (G x 0.5).



**Figure 24:** Croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a* selon les différentes concentrations d'atropine. T=Témoin, C1= 1/4, C2= 1/10, C3=1/100 (G x 0.5).

# Discussion

## I. Callogenèse induite par hormones et par souches bactériennes.

### 1. Production des vitro-semis

---

Les taux de germination des graines de *D. tatula* et *D. stramonium* obtenus dans notre étude sont de 97% et 96% respectivement. Ces résultats rejoignent ceux de nombreux auteurs, qui ont obtenu des pourcentages de germination semblables : 89.80% (**Ladraa, 2007**) pour *D. tatula* et 91.66% (**Rezine, 2004**) et 96.49% (**Saibi, 2006**) pour *D. stramonium*.

Par ailleurs aucune contamination n'est enregistrée au cours du développement des vitro-semis, cela confirme l'efficacité des protocoles de scarification et de désinfection des graines de ces espèces utilisés par **Khelifi-Slaoui et al . (2005)**.

### 2. Induction des cals

---

#### 2.1. Induction par hormones chez *D. stramonium* et *D. tatula*

Dans notre étude, l'effet de la concentration en auxine et en cytokinine (ANA et BAP) sur l'induction de la Callogenèse à partir de différents types d'explants de *D. tatula* et *D. stramonium* montre que les hypocotyles, les feuilles et les racines manifestent une réponse variable quant à leur aptitude à la callogenèse et pour leur réponse morphogénétique (aspect, couleur et texture).

Plusieurs travaux montrent également que l'utilisation des concentrations élevées en cytokinine et des concentrations faibles en auxine assure le déclenchement ou l'induction de cals à partir de différents explants chez différentes espèces de *Datura* : **Figueirido et Esquibel (1991)** ; **Demeyer et al . (1992)** ; **Dessouky et al . (2001)** ; **Saibi (2006)** ; **Zayed et al . (2006)** ; **Raoufa et al . (2008)**.

Concernant la surface des cals, nos résultats rejoignent ceux de **Saibi ( 2006)** qui a obtenu les meilleures surfaces moyennes de cals sur les fragments d'hypocotyles suivies des fragments de racines et de feuilles de *D. stramonium* sur le milieu MS additionné de 0.02 mg/l d'ANA et 0.2 mg/l de BAP.

##### 2.1.1. Biomasses sèches

Selon **Demeyer et al . (1992)**, la plus forte biomasse (poids frais) des cals induits par hormones sur le milieu MS additionné de 0.1mg/l de 2,4 D et 0.5 mg/l de BAP est enregistrée chez *D. tatula* par rapport aux autres variétés (*D. Chalybea*, *D. godronii*, *D. inermis*, *D. stramonium*). Ceci concorde avec nos résultats où les cals sont induits dans les mêmes conditions, c'est en effet la variété *D. tatula* qui présente la plus forte biomasse sèche des cals induits par hormones par rapport à *D. stramonium*.

Dans notre étude, Chez *D. tatula* et *D. stramonium*, ce sont les cals d'hypocotyles qui présentent les valeurs les plus élevées de la biomasse sèche (g MS/l) par rapport à ceux de racines et de feuilles. Ceci diffère des résultats de Raoufa et al. (2008) qui montre que les valeurs les plus élevées de poids secs moyens des cals (g) de *D. metel* sur un milieu contenant 1 mg/l d'ANA et 3 mg/l de BA sont enregistrées à la fin de la 5ème semaine de mise en culture sous une photopériode de 16 h de lumière avec les explants de racines, suivis de ceux d'hypocotyles, de tiges et de feuilles avec respectivement 0.33, 0.23, 0.12 g et 0.04 g.

Nos résultats se contrastent également avec ceux de Dessouky et al. (2001) qui montre sur un milieu contenant 1 mg/l d'ANA et 2 mg/l de BAP et sous des conditions de lumière, que les cals de feuilles de *D. stramonium* présentent les valeurs les plus élevées de la biomasse sèche (g MS/l) par rapport à ceux de tiges et de racines.

### 2.1.2. Contenus en alcaloïdes

**Raoufa et al. (2008)** montre que les teneurs les plus élevées du contenu en alcaloïdes (H&S) chez *D. metel* sont obtenues à partir de cals issus de tiges, suivis de ceux issus de racines et de feuilles avec respectivement 56, 30.5 et 22.8 mg/g MS. Ceci diffère également de nos résultats où ce sont les cals induits par hormones à partir de racines avec 1.35 et 1.15 mg/g MS chez *D. Tatula* et *D. Stramonium* respectivement qui présentent les meilleurs résultats par rapport aux feuilles et aux hypocotyles dont les teneurs sont respectivement: 1.19 et 0.93 mg/g MS chez *D. Tatula* et 0.94 et 0.57 mg/g MS chez *D. Stramonium*.

## 2.2. Induction par souche d'*Agrobacterium tumefaciens* chez *D. tatula*

### 2.2.1. Biomasses sèches

Par rapport à l'induction des cals par hormones, toutes les souches E17, E2x et C58 sont les plus efficaces pour l'obtention de cals avec des biomasses sèches importantes. Toutefois, les cals induits par la souche E17 présentent la plus forte biomasse, suivis par ceux des souches E2x et C58. Ceci peut être expliqué selon **Nester et al. (1984)** par le fait que le T-DNA du plasmide Ti de l'*A. tumefaciens* provoque une hyperauxinie entraînant une hyperplasie et l'hypertrophie des cellules conduisant à la multiplication des cellules tumorales.

### 2.2.2. Contenus en alcaloïdes

Selon **Cosson et Kuntzmann-Cougoul (1979)**, les tumeurs de crown gal induites par les souches B6 et T37 d'*A. tumefaciens* chez *D. metel* et *D. tatula* présentent un taux alcaloïdique (Hyoscyamine + scopolamine) par rapport aux tiges saines 5 à 10 fois plus élevés pour la souche B6 et 2 fois plus pour la souche T37. Dans notre cas, ce sont uniquement les cals induits par la souche E17 sur explants d'hypocotyles qui donnent un taux alcaloïdique deux fois plus élevé que le taux du témoin.

Par ailleurs, la morphologie tumorale est déterminée selon la synthèse différentielle d'auxines et/ou des cytokinines qui diffère d'une souche à une autre (**Petit et al. , 1983**). On peut avoir des teratomes (excroissances spontanées) ou des tumeurs mal organisées (**Petit et al ., 1983**). Ce qui pourrait expliquer les réponses des souches utilisées.

## II. Propriétés de croissances et du contenu en hyoscyamine de cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* et de suspensions cellulaires de *D. tatula*

### 1. Cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* en milieu liquide avec ou sans hormones de croissance

---

#### 1.1. Paramètres de croissances

Dans notre étude, les paramètres de croissance (biomasse sèche finale et taux de croissance) des différentes cultures de chevelus racinaires ( $H^-$  et  $H^+$ ) sont meilleurs chez *D. tatula* que chez *D. stramonium*. Donc, ces paramètres dépendent de l'espèce étudiée. Ceci rejoint les résultats de **Lanoué (2004)**, qui montre que les paramètres de croissance sont meilleurs chez les cultures de chevelus racinaires  $H^-$  de *D. innoxia* que chez ceux de *D. candida* × *D. aurea*.

Alors que les performances des chevelus racinaires induits par transformation génétique suivis d'une différenciation en cals (chevelus racinaire  $H^+$ ) sont réduites par rapport au chevelus racinaire  $H^-$ . Chez *D. stramonium* et *D. tatula* on note sur ces types de chevelus respectivement des pertes de 41% et 52% sur la biomasse sèche, des pertes de 21% et 28% sur le taux de croissance et un retard d'un jour et d'un jour et demi pour le temps de dédoublement.

Concernant la biomasse sèche, les cultures en cuvé des chevelus racinaires  $H^-$  de *D. tatula* et *D. stramonium* ont permis d'obtenir après 10 jours de culture des biomasses sèches respectives de 9.52 et 7.92 g MS/là partir d'une concentration initiale de 0.01 g MS/l. Ces valeurs sont compatibles avec celles obtenues par **Chang (2005)** pour une culture en cuvé de chevelus racinaires de *Gynostemma pentaphyllum*. Cet auteur montre qu'après 49 jours de culture sur milieu MS sans hormones de croissance, la biomasse sèche de chevelus racinaires de *G. pentaphyllum* qui est de 7.3g/l augmente d'environ 120 fois par rapport à l'inoculum.

Par ailleurs, selon **Palazón et al. (1995)**, le taux de croissance des chevelus racinaires transformées de *D. stramonium* (en milieu MS liquide sans régulateurs de croissance) est supérieur à celui des cals transformés excisés de ces chevelus et cultivés séparément en milieu MS solide avec régulateurs de croissance.

#### 1.2. Contenus en hyoscyamine

Dans notre étude, les contenus en hyoscyamine dépendent de l'espèce de *Datura*. Pour toutes les cultures de chevelus racinaires étudiées, *D. tatula* présente le contenu et la productivité en hyoscyamine les plus élevés par rapport à *D. stramonium*. Ceci rejoint les résultats de **Lanoué (2004)**, qui mentionne que la production (4.3mg/ gMS) et la productivité (= rendement) en l'hyoscyamine de *D. innoxia* (2.1 mg/l/j) sont plus élevés que celles du *D. candida* × *D. aurea* (1 mg/l/j).

Chez *D. tatula* et *D. stramonium*, les teneurs en hyoscyamine dépendent également des milieux de cultures., les chevelus racinaires H<sup>-</sup> (non différenciés) sont les plus performants par rapport aux chevelus racinaires H<sup>+</sup> (différenciés). Ces derniers présentent des pertes de 73% et 66% sur la production spécifique et de 84% sur la productivité respectivement pour *D. stramonium* et *D. tatula*. Ces résultats rejoignent ceux rapportés par **Zolala et al. (2007)** qui signalent une diminution de la teneur en hyoscyamine lorsque les chevelus racinaires d'*Hyoscyamus muticus* forment des cals sous l'effet des hormones. De même, **Palazón et al. (1995)** montre que la production en hyoscyamine est également plus élevée dans les chevelus racinaires transformés de *D. stramonium* (en milieu liquide MS sans régulateurs de croissance) que dans les cals transformés.

## 2. Cultures de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de *D. tatula*

### 2.1. Paramètres de croissances

Selon nos résultats, la biomasse sèche et le taux de croissance des chevelus racinaires H<sup>-</sup> de *D. tatula* sont environ deux fois plus élevés que ceux des suspensions cellulaires E17 (avec 0.02 mg/l ANA et 0.2 mg/l BAP). Ceci rejoint le résultat de **Krolicka (2001)** qui montre que le taux de croissance des cultures de chevelus racinaires d'*Ammi majus* sur milieu MS sans régulateurs de croissance est d'environ trente fois plus élevé que celui de la suspension cellulaire sur milieu MS avec 0.5 mg/l GA3 et 1.0 mg/l. KIN

En effet, selon **Giri et Narasu (2000)** le système des chevelus racinaires est très performant, ce type de structure morphogénétique dépasse les suspensions cellulaires en croissance.

### 2.2. Contenus en hyoscyamine

Dans des études *in vitro*, il a été démontré que la production en hyoscyamine est plus élevée dans les structures différenciées que dans les cellules non différenciées (**Lindsey et Yeoman, 1983**). De même, dans notre étude, les chevelus racinaires H<sup>-</sup> chez *D. tatula* dépassent les suspensions cellulaires en production spécifique avec 6.2 contre 3.1 mg/g MS et en productivité avec 1.97 contre 0.46 mg/l/j.

Par ailleurs, la suspension cellulaire E17 est plus riche en hyoscyamine que la culture de chevelus racinaires H<sup>+</sup> (ayant formés des cals). En effet, sa production est 3.1 mg/g de MS contre 2.1 mg/g pour les chevelus racinaires H<sup>+</sup>. La supériorité des tumeurs (teneur en alcaloïdes) où les tissus sont transformés par *A. tumefaciens* pourrait être expliquée par une dérégulation physiologique (**Cosson et Kuntzman-Cougoul, 1979**). Deux hypothèses sont avancées : la dérégulation peut simplement provoquer au niveau de la tumeur un appel important de métabolites nécessaires à la biosynthèse des alcaloïdes, ou bien la transformation tumorale induirait directement une exaltation de la biosynthèse des alcaloïdes de la même façon qu'elle induit la biosynthèse de guanidines substituées (**Goldmann, 1977 ; Cosson et Aaron, 1978 in Cosson et Kuntzmann-Cougoul, 1979**).

De plus, la faible teneur en alcaloïdes des chevelus racinaires  $H^+$  pourrait être due à la présence de calcs. En effet, dans la sélection des lignées performantes, on choisit toujours les souches non calogènes (Amdoun et al, 2007).

### 3. Cultures de chevelus racinaires $H^-$ de *D. stramonium* en modes de culture cuvé et semi continu (Biomasses et rendements en hyoscyamine)

---

Dans les deux modes de cultures des chevelus racinaires (cuvé et semi continu) étudiés, le rendement en hyoscyamine augmente avec l'augmentation de la biomasse au cours du temps, les meilleurs résultats sont obtenus au 30<sup>ème</sup> jour de culture. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Chang (2005). Selon ce dernier, la biomasse (g/l) et la productivité (mg/l) de gypenoside (saponine) des chevelus racinairestransformés de *Gynostemma pentaphyllum* en culture en cuvé mesurées tous les 5 à 7 jours augmentent en fonction du temps jusqu'au 49<sup>ème</sup> jour de culture.

Par ailleurs, la biomasse et le rendement en hyoscyamine sont meilleurs en mode semi continu qu' en mode cuvé. Le mode semi continu permet un gain appréciable sur la biomasse et le rendement en hyoscyamine. Les gains en biomasses pour la même durée de culture (24 jours) et (30 jours) ont respectivement doublé et quadruplé, alors qu'ils ont presque triplé pour les rendements en hyoscyamine. Ceci peut probablement être expliqué par le fait que la croissance des cultures en semi continu est maintenue en phase exponentielle pendant de longues périodes de temps.

Selon Baiza (1998), il ya une relation inverse entre la biomasse sèche et le contenu en alcaloïdes des chevelus racinaires de *D. stramonium*. Ceci rejoint les études de Kinsara et Seif El Nasar (1994) sur les suspensions cellulaires de *D. inoxia*, mais contraste avec nos résultats et ceux de Amdoun et al. (2007) qui montrent une corrélation positive entre la biomasse sèche et le contenu en alcaloïdes des différentes cultures de chevelus racinaires étudiées.

## III. Activités *in vitro* des deux types d'alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne radiale de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

L'extrait brut d'alcaloïdes est testé à différentes concentrations de 1/2 ( $=125 \times 10^{-4}$  mg/ml), 1/20 ( $=125 \times 10^{-5}$  mg/ml) et 1/200 ( $=125 \times 10^{-6}$  mg/ml). Ces dernières sont très faibles (vue la faible quantité disponible en hyoscyamine) par rapport aux solutions pures utilisées. C'est pourquoi, l'extrait brut ne montre aucun effet inhibiteur sur la croissance mycélienne des deux souches de *F.o.a.* Au contraire il a amélioré légèrement la croissance mycélienne. Cette activité est due probablement aux composés chimiques contenus dans cet extrait notamment les alcaloïdes tropaniques (scopolamine et hyoscyamine). Ces dernières

---

constituent à faibles doses une source de carbone et d'azote qui sont nécessaires à la croissance mycéliennes des champignons.

En outre, des essais *in vitro* montrent que les extraits aqueux de feuilles de *D. stramonium* (6 ml de l'extrait/100 ml de PDA) entraînent une inhibition de l'ordre de 72.33% de la croissance radiale de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumuni* (Sharma et Trivedi, 2002). Uma Reddy et al. (2009) rapportent également que les extraits alcooliques de *D. stramonium* (4, 6, et 8 mg/0.2ml) ont une activité antifongique et une inhibition du taux de croissance de *Fusarium* sp avec respectivement 7, 8 et 8.5 mm de zones d'inhibitions. Par ailleurs, Iranbakhsh et al. (2010) montrent que les extraits méthanoliques des cals issus de différents explants de *D. stramonium* ont un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Fusarium semitectum*.

Pour les solutions pures d'alcaloïdes tropaniques, Abdel-Motaal et al. (2009) en étudiant l'activité antifongique d'hyoscyamine et de scopolamine extraites d'*Hyoscyamus muticus* montrent que 40 souches fongiques (y compris [Fusarium oxysporum](#) ; [Aspergillus fumigatus](#) ; [A nidulans](#) ; [A . Aspergillus oryzae](#) ; [A. terreus](#) ; [Botrytis cinerea](#) ; [Alternaria alternata](#) ..... ) sont tolérantes à la scopolamine et sensibles à l'hyoscyamine. Dans une autre étude, ces auteurs (Abdel-Motaal et al., 2010) rapportent également que l'activité antifongique de l'hyoscyamine est différente de celle de la scopolamine contre deux majeurs pathogènes du riz : *Magnaporthe oryzae* et *Rhizoctonia solani*. La concentration minimale inhibitrice de l'hyoscyamine (CMI) est de 1 mg/ml pour les deux champignons. Une concentration très élevée de scopolamine (1000 mg/ml) retarde également ou inhibe la germination des conidies de *M. oryzae*. Dans ces deux études, l'activité inhibitrice de l'hyoscyamine est plus importante que celle de la scopolamine vis-à-vis de plusieurs souches fongiques. Ceci diffère de notre étude qui confirme la supériorité d'inhibition de la scopolamine par rapport à l'atropine (forme racémique de l'hyoscyamine) vis-à-vis de *F.o.a*. En outre, les concentrations inhibitrices de 1 mg/ml et plus sont en accord avec celles que nous avons utilisées pour les solutions pures (1mg/l et 2.5 mg/ml).

## Conclusion

La culture de tissus ou de cellules végétaux représente une intéressante voie de production des métabolites secondaires. A cet effet, et dans le cadre de produire des métabolites secondaires par voie biotechnologique, notre travail a porté sur la production *in vitro* des alcaloïdes tropaniques à partir de différents tissus de *D. stramonium* et *D. tatula*: cals, chevelus racinaires et suspensions cellulaires issus des cals induits par la souche E17. Pour ce faire 3 différentes parties ont été étudiées.

- Durant la première partie, l'étude menée concernant l'induction des cals par hormones sur différents explants de *D. stramonium* et *D. tatula* et par souches bactériennes (E2x, E17 et C58) sur hypocotyles de *D. tatula*, nous a révélé que:
- Chez *D. tatula*, les cals induits par hormones sur les fragments d'hypocotyles présentent les meilleures surfaces moyennes par rapport aux fragments de feuilles et de racines.
- En outre, les biomasses sèches moyennes des cals induits selon les différents explants (feuilles, hypocotyles ou racines) sont nettement supérieures chez *D. tatula* par rapport à celles de *D. stramonium*.

Chez *D. tatula*, les cals induits par hormones sur les fragments d'hypocotyles présentent les meilleures biomasses sèches moyennes par rapport aux fragments de racines et de feuilles. Par contre, chez *D. stramonium*, on ne note pas de différence significative concernant les biomasses des cals induits par hormones selon les différents explants (feuilles, hypocotyles et racines).

Par ailleurs, chez *D. tatula*, ce sont les cals induits par souches bactériennes qui présentent les biomasses les plus importantes par rapport aux témoins et aux cals induits par hormones sur les fragments d'hypocotyles, avec en tête les cals induits par la souche E17 suivis de ceux induits par E2x et par C58

- Quant aux contenus en alcaloïdes (scopolamine et hyoscyamine), chez *D. tatula*, les teneurs les plus élevées sont enregistrées, dans l'ensemble, pour les cals induits par souches bactériennes par rapport à ceux induits par hormones. Le meilleur résultat est enregistré avec les cals induits par la souche E17 suivi de ceux induits par les souches E2x et par C58. Les cals induits par la souche E17 présentent presque le double du contenu alcaloïdique des cals par rapport au témoin.
- Chez *D. stramonium* et *D. tatula*, les cals induits par hormones à partir des racines présentent les meilleurs résultats par rapport aux feuilles et aux hypocotyles. Parmi les cals induits par hormones, ce sont les cals issus de racines de *D. tatula* qui présentent le contenu le plus élevé en hyoscyamine et scopolamine.
  - - Durant la deuxième partie concernant les propriétés de croissances et des contenus en hyoscyamine de cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* et de suspensions cellulaires de *D. tatula*, nos résultats montrent que:

Le système des chevelus racinaires (H<sup>-</sup>) est très performant, il dépasse les suspensions cellulaires en croissance, en production spécifique et en productivité.

- Les performances des chevelus racinaires induits par transformation génétique suivis d'une dédifférenciation en cals (chevelus racinaires  $H^+$ ) sont réduites. Chez *D. stramonium* et *D. tatula* respectivement, on note sur ces structures des pertes de 41% et 52% sur la biomasse, de 21% et 28% sur le taux de croissance, un retard d'un jour et d'un jour et demi pour le temps de dédoublement et des pertes sur les contenus en hyoscyamine de 73% et 66% pour la production spécifique et de 84% pour la productivité.
- Le mode semi continu permet un gain appréciable sur la biomasse et le rendement en hyoscyamine. Les gains en biomasses pour les mêmes durées de cultures (24 jours) et (30 jours) ont respectivement doublé (16.59 g/l) et quadruplé (30.33 g/l), alors qu'ils ont presque triplé pour les rendements en hyoscyamine (130 mg/l).

Pour les deux modes de cultures étudiés, le rendement en hyoscyamine augmente avec l'augmentation de la biomasse au cours du temps et les meilleurs résultats sont obtenus au 30<sup>ème</sup> jour de culture avec 130 mg/l et 42.69 mg/l pour les modes semi continu et cuvé respectivement.

- Aussi bien chez *D. stramonium* que chez *D. tatula*, ce sont les chevelus racinaires (quelque soit le mode de culture) qui permettent d'obtenir les meilleures productions en hyoscyamine par rapport aux cals.
  - Lors de la troisième partie de ce travail, une étude est menée afin d'évaluer l'effet antifongique *in vitro* basé sur l'inhibition de la croissance mycélienne radiale; par un extrait brut d'alcaloïdes (scopolamine et hyoscyamine) obtenu à partir des chevelus racinaires de *D. stramonium*  $H^-$  et des solutions pures (atropine et scopolamine); de deux souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis* (agent pathogène responsable de la fusariose vasculaire du palmier dattier, grave maladie connue sous le nom du bayoud).

Les résultats montrent que l'extrait brut présente des taux d'inhibitions négatifs à cause des faibles concentrations testées ( $125 \times 10^{-4}$ ,  $125 \times 10^{-5}$ ,  $1.25 \times 10^{-6}$  mg/ml). Alors que les solutions pures avec des concentrations plus élevées (2.5, 1 et 0.1 mg/ml) de scopolamine et d'atropine affectent l'aspect de la colonie fongique et causent une diminution et / ou une inhibition de la croissance mycélienne qui est variable selon les concentrations testées. La concentration de 2.5 mg/ml de scopolamine ou d'atropine entraîne le plus grand pourcentage d'inhibition (pour la scopolamine: 43.1% pour la souche II et 39.4% pour la souche I et pour l'atropine 19.7% et 14% pour les souches II et I respectivement) suivie des concentrations 1 et 0.1 mg/ml respectivement pour les deux souches testées.

Parmi les solutions pures testées, la scopolamine présente les plus grands pourcentages d'inhibitions avec toutes les concentrations testées par rapport à l'atropine (forme racémique de l'hyoscyamine).

A l'instar de ces résultats, nous pensons que la scopolamine et l'atropine possèdent une aptitude pour éliminer le *F.o.a* et peuvent donc avoir des intérêts pratiques en lutte biologique contre le bayoud.

Au terme de ce travail, il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de l'efficacité des alcaloïdes de *Datura* en utilisant des extraits bruts non dilués et de déterminer leur effet sur la croissance mycélienne et la germination des spores de *F.o.a*.

Il serait également intéressant de refaire de nouveaux tests antifongiques sur d'autres champignons phytopathogènes.

Enfin, les résultats obtenus lors de ce travail mériteraient d'être complétés par une étude *in vivo* afin de se rapprocher des conditions naturelles où plusieurs facteurs entrent en jeu tels que :

- la température, l'humidité et le pH du sol qui sont différents de ceux du laboratoire ;
- la présence d'autres microorganismes dans le sol qui pourraient interagir avec les souches expérimentées, les pesticides et le milieu.

# Références bibliographiques

- Abdel-Motaal F.F., Nassar M.S.M et El-Zayat S.A., 2009.** Responses of fungi to tropane alkaloids produced by a medicinal plant *Hyoscyamus muticus* (Egyptian Henbane). *Folia Microbiologica (Praha)*, 54 (3), pp.207-212 .
- Abdel-Motaal F.F., El-Zayat S.A., Kosaka Y., El-Sayed M.A., Kashima R., Maeda Y., Nassar M.S.M et Ito S., 2010.** Antifungal activities of hyoscyamine and scopolamine against two major rice pathogens: *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Plant Pathology*, 76 (2), pp.102-111.(Résumé).
- Abed F., Yatta D., Khelafi H., Yakhou M.S., Amara B et Djellal L., 2006.** Optimisation de la technique d'obtention de suspensions cellulaires et de protoplastes en vue d'une hybridation somatique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In **Abed F.** Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud, Alger.
- Abid M., 1996.** Studies on the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with botanical toxicants. Ph.D thesis, University of Karachi, Karachi, 345 p.
- Adams H.R., 2009.** Cholinergic pharmacology; Autonomic drugs. In **Riviere J.E et Papich M.G (eds)**. Veterinary, pharmacology and therapeutics. 9<sup>th</sup> Ed. Wiley-Blackwell, Iowa, pp.157-179.
- Ahmad I.M., Abdalla M.Y., Mustafa N.H., Qnais E.Y et Abdulla F.A., 2009.** *Datura* aqueous leaf extract enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress on different human cancer cells. *Jordan Journal of Biological Science*, 2 (1), pp.9-14.
- Ahmed M.S., Mukhtar T et Ahmed R., 2004.** Some studies on the control of nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by leaf extracts of three plants and their effects on plant growth variables. *Asian Journal of Plant Science*, 2 (5), pp.544-548.
- Alejo N.O., 1992.** Mise en place de culture *in vitro*. In **Rosell C.H et Villalobos A.V.M (eds)**. Fondements théoriques et pratiques de la culture des tissus végétaux. Ed. FAO, Rome, pp.33-37.
- Alexander J., Benford D., Cockburn A., Cravedi J.P., Dogliotti E., Domenico A.D., Fernández-Cruz M.L., Fürst P., Fink-Gremmels J., Galli C.L., Grandjean P., Gzyl J., Heinemeyer G., Johansson N., Mutti A., Schlatter J., Van Leeuwen R., Van Peteghem C et Verger P., 2008.** Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *European Food Safety Authority (EFSA) Journal*, 691, pp.1-55.
- Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Amroun S et Khelifi-Slaoui M., 2006.** Production de chevelus racinaires par transformation génétique *in vitro* de deux espèces de *Datura* . *Biotechnologies végétales*, 0, pp.83-85.
- Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Hadjimi G., Amroune S., Khelifi L et Krimi Z., 2007.** Etude des propriétés de croissance et du contenu en hyoscyamine d'une culture

de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de *Datura stramonium* L. *Biotechnologies végétales*, 1, pp.15-18.

**Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.H, Thi D.V., Assaf-Ducrocq C et Gontier E., 2009.** Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. Tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Science* , 177 (2), pp.81-87.

**Amdoun R., 2010.** Optimisation de la production par voie biotechnologique des alcaloïdes tropaniques à partir de chevelus racinaires de *Datura stramonium* L.: Approche par modélisation mathématique. Thèse de Doctorat, ENSA, Alger, 77p.

**Anand T et Bhaskaran R., 2009** .Exploitation of plant products and bioagents for ecofriendly management of Chilli fruit root disease. *Journal of Plant Protection Research*. 49 (2), pp.195-203.

**Aniszewski T., 2007.** Alkaloids-Secrets of life, Alkaloid chemistry, biological role. 1<sup>st</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam, 316 p.

**Arouko H., Matray M.D., Bragança C., Mpaka J.P., Chinello L., Castaing F., Bartou C et Poisot P., 2003.** L'intoxication volontaire par ingestion de *Datura stramonium*. Une autre cause d'hospitalisation des jeunes en quête de sensations fortes. *Annales de médecine interne* , 154 (1), pp.46- 50.

**Attrassi K., Selmaoui K., Ouazzani Touhami A., Badoc A et Douira A., 2005** . Agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'Azoxytrobin. **Bulletin** [de la Société de Pharmacie de Bordeaux](#) , 144, pp.47-62.

**Augustin J.C., 2005.** Modélisation de la dynamique de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon, 25 p.

**Aurousseau F., 2009a.** Techniques d'analyse. Aspect théorique de la chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.) (High Performance Liquid Chromatography). Document technique-Association CIBAC. In <https://iutcv.univ-paris12.fr/cibac/Annexes/HPLC.pdf>.

**Aurousseau F., 2009b.** Techniques d'analyse. Aspect théorique de la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) (GC: *Gas Chromatography*). Document technique-Association CIBAC. In <https://iutcv.univ-paris12.fr/cibac/Annexes/CPG.pdf> .

**Baiza A. M. , Quiroz A. , Ruiz J. A. , Maldonado-Mendoza I et Loyola-Vargas V. M. , 1998** .Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 2, pp.123-130.

**Ballica R., Ryu D.D.Y et Kado C.I., 1993.** Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures: Elicitor and precursor effects. [Biotechnology and Bioengineering](#) , 41 (11 ) , pp.1075-1081.

**Banso A et Adeyemo S., 2006.** Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritianum*, *Bacopa monniera* and *Datura stramonium*. *Biokemestri*, 18 (1), pp.39-44.

- Bayoud B., Djilani S.E., Legseir B., Ouahrani M.R et Djilani A., 2007.** Antibacterial activity of ethanol extracts and total alkaloids of *Datura stramonium* and *Rufa graveolens*. *ICFAI Journal of Life Sciences*, 1 (1), pp.78-81.
- Belabbassi O et Benouaret R., 2009.** Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires de quelques provenances locales de *Datura stramonium* L. Mémoire d'ingénieur, ENSA, Alger, 58p.
- Benhizia Z., 1989.** Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium* L. Thèse de magister, INA, Alger, 68 p.
- Benkhalifa A., 2006.** La production de dattes deglet nour menacée. In **Bennaceur C.** Déjà 32 communes d'Algérie touchées par le bayoud. Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud, le soir d'Algérie, Actualité dimanche, 18 juin, p5.
- Benrekia F., 2008.** Induction de chevelus racinaires par l'*Agrobactérium rhizogenes* chez *Datura stramonium* L.var. *tatula*. Mémoire d'ingénieur. INA, Alger, 34p.
- Bensaid F., Toua D et Benchabane M., 2006.** Effets antagonistes de *Pseudomonas fluorescens* dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. In **Abed F.** Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud, Alger.
- Bercove S., Zayed R et Doncheva T., 2006.** Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 77, pp.179-182.
- Bessedik F. , Amrani S et Moussaoui B., 2006.** Dénombrement de la microflore des sols des palmeraies algériennes, isolement et caractérisation de bactéries antagonistes au *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent du bayoud. Cas de deux palmeraies à In Salah. In **Abed F.** Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud, Alger.
- Bianchini F et Corbetta F., 1975.** Atlas des plantes médicinales, Ed. Fernand Nathan, Paris, 243 p.
- Board N., 2004 .** Hand book on herbs cultivation and processing, Ed.Asia Pacific Business Press Inc,New Delhi, 400 p.
- Boufis N., 2008.** Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmiers dattiers (variété Degla Beida) en vue de la résistance contre le Bayoud. Mémoire de magister, INA, Alger, 86 p.
- Boulenouar N., Marouf A et Cheriti., 2009 .**Effect of some poisonous plants extracts on *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Journal of Biological Sciences*, 9 (6), pp.594-600.
- Boullard B., 2001.** Plantes médicinales du monde: réalités et croyances. Ed. ESTEM, Paris, 636 p.
- Bounaga N., 1975.** Germination de microconidies et macroconidies de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord*, 66, pp.39-44.
- Bounaga N et Djerbi M., 1990.**Pathologie du palmier dattier. Les systèmes agricoles oasiens. *Options Méditerranéennes*, A (11), pp.127-132.

- Bounnit T., Martinez C., Jay-Allemand C et El Hadrami I ., 2008** . Application de stifenia au pathosystème palmier dattier - *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Actes des XIèmes journées scientifiques du réseau "Biotechnologies Végétales: amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence Universitaire de la Francophonie, Juin-Juillet, 2008, Agrocampus Rennes, Rennes, France.
- Bourgoud F., Gravot A., Milesi S et Gontier E., 2001.** Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* , [161\(5\)](#) , pp.839-851.
- Brachet A., Mateus L., Cherkaoui S., Christen P., Gauvrit J.Y., Lantéri P et Veuthey J.L., 1999.** Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analisis*, 27, pp.772-778.
- Broadley K.J., 1996** .Autonomic pharmacology. 1<sup>st</sup> Ed. Taylor and Francis, London, 612 p.
- Brown J.H et Taylor P., 2006.** Muscarinic receptor agonists and antagonists. In **Brunton L.L, Lazo J.S et Parker K.L (eds)**. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York, p.183-200.
- Bruneton J., 1987.** Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Ed. Lavoisier, Paris, 585 p.
- Bruneton J., 1995.** Pharmacognosy, Phytochemistry medicinal plants. Ed. Lavoisier, Paris, 915 p.
- Bruneton J., 2005** . Plantes toxiques: Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. 3<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier, Paris, 618 p.
- Brust J.C.M et Garcia-Larrea L., 2007** . Aspects neurologiques de l'addiction, 3<sup>ème</sup> Ed. Elsevier Masson, Issey-les Molineaux, 563 p.
- Cardillo A . B., Talou J.R et Giulietti A.M., 2008.** Expression of *Brugmansia candida* Hyoscyamine 6 beta-Hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst. *Microbial Cell* \_ [Factories](#) ,7 (1), p.17.
- Cayrol J.C., Caporalino C.D et Mattei E.P., 1992.** La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. Le [Courrier de la Cellule Environnement de l'INRA](#), [17](#) , pp.31-44.
- Chabane D et Bouguedoura N., 2006.** Contribution à la lutte contre le Bayoud par les biotechnologies: Production de protoplastes de la variété Deglet Nour (sensible) et de la variété Takerbucht (résistante) en vue de leur fusion et la production d'hybrides somatiques. In **Abed F**. Conférence régionale: Mutagenèse induite et biotechnologies d'appui pour la protection du palmier dattier contre le bayoud, Alger.
- Chabane D., 2007.** Amélioration du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. par fusion de protoplastes de deux cultivars Deglet nour sensible et Takerboucht résistant au Bayoud. Thèse de Doctorat, USTHB, Alger, 109 p.
- Chang C.K., Chang K.S., Lin Y.C., Liu S.Y et Chen C.Y., 2005.** Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnology*, 27, pp.1165-1169.

- Christen P., Roberts M.F., Phillipson J.D et Evans W.C., 1989** . High-yield production of tropane alkaloids by hairy-root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* , 8 (2).(Résumé).
- Christen P., Bieri S et Veuthey J.L., 2007**.Analysis of tropane alkaloid in biological matrices. *In Fattorusso E et Tagliatela-Scafati O (eds)*. Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. Ed. Wiley-Vich, Weinheim, pp.341-368.
- Christy M.C., 1997**. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated transformation. In **Doran P.M (ed)**. Hairy root culture and applications. Ed. Harwood academic publishers, Amsterdam, pp.99-111.
- Cieri U.R., Bertrand R., Choi K.K., Gagnon J., Krol P., Latzo P., Lau D., Melendez J., Pyramides G., Sen S., Steible D et 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*, 86 (6), pp.1128-1134.
- Cosson L et Kuntzmann-Cougoul N., 1979** .La régulation du métabolisme des alcaloïdes tropaniques (hyoscyamine + scopolamine) chez *Duboisia myoporoides* et les *Datura* cultivés en conditions contrôlées. *Herba Hangarica*,18 (3), pp.135-141.
- Cosson L., Chouard P et Paris R.R., 1966**. Influence de l'éclairement sur la variation ontogénique des alcaloïdes de *Datura tatula*, 29 (1), pp.19-25.
- Daniel M., 2006** . Medicinal plants: Chemistry and proprieties. Ed. Science publishers, Enfield, New Hampshire, 276 p.
- Demeyer K., Vanhaste F., Van De Velde H et Dejaegere R., 1992**.Introductory study for the optimization of growth and alkaloid production by cell culture of *Datura stramonium* L. *Acta Horticulture (International symposium on medicinal and aromatic plants )* , 306, pp.210-218.
- Dessouky M.M., Taha H. S et El-Bahr M. K., 2001**.Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. *Arab Journal of Biotechnology* , 4 (2), pp.271-278.
- Dewick P. M., 2009**. Medicinal natural products: A Biosynthetic approach. 3<sup>rd</sup> Ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 509 p.
- Djerbi M., 1983**. Diseases of the date palm. FAO Regional Project for Palm and Dates Research Centre in the Near East and North Africa, 106 p.
- Djerbi M., 1990**. Méthodes de diagnostic du bayoud. *Bulletin OEPP/EPPO* , 20, pp.607-613.
- Djerbi M., 1991**. Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Voies de propagation des clons résistants au bayoud et de haute qualité dattière. *Options Méditerranéennes*, 14, pp.31-38.
- Djillali Z., 2008**. Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le Bayoud. Mémoire de magister, INA, Alger, 98 p.
- Dodds J.H et Roberts L.W., 1995**.Experiments in plant tissue culture, 3<sup>rd</sup> Ed. Cambridge university press, New York, 280 p.

- Douhou N., Yamni K., Badoc A et Douira A., 2004.** Activité antifongique d'extraits de *Thymelea lythroides* sur trois champignons pathogènes du riz. **Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux** , 143, pp.31-38.
- Dräger B., 2002.** Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography* , 978 (1-2) , pp.1-35.
- Duarte L.M.L., Salatino M.L.F., Salatino A., Negri G et Barradas M.M., 2008.** Effect of *Potato virus X* on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. *Summa Phytopathologica*, 34 (1), p.65-67.
- Dunwell J.M et Sunderland N., 1976.** Pollen ultra structure in anther cultures of *Datura innoxia*. *Journal of Cell Science*, 32, pp.493-501.
- Duran-Patron R., O'Hagan D., Hamilton J.T.G et Wong C.W., 2000.** Biosynthetic studies on tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 53, pp.777-784.
- Dwivedi S.C et Shekhawat N.B., 2004.** Repellent Effect of some indigenous plant extracts against *Trogoderma granarium* (Everts). **Asian Journal of Experimental Sciences** , 18 (1-2), pp.47-51.
- Eckhart W et Wink M., 2004.** Biotechnology potential of hairy root culture. Recent progress in medicinal plants. *Biotechnology and Genetic Engineering*, 4, pp.441-453.
- Eick E., 2008.** *Solanaceae and Convolvulaceae: secondary metabolites: biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (A Handbook)*. Ed. Springer, Berlin, 637 p.
- El Bazaoui A., Stambouli H., Bellimam M.A et Soulaymani A., 2009.** Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du *Datura stramonium* L. par CPG/SM et CL/SM. *Annales de Toxicologie Analytique* , 21 (4), pp.18-188.
- El Hamdouni E., Lamarti A et Badoc A., 1999.** La régénération *in vitro* du fraisier (*Fragaria X Ananassa duch*): Les possibilités offertes par la culture *in vitro*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 138, pp.49-74.
- El Hassni M., El Hadrami A., Daayf F, Ait Barka E et El Hadrami I. , 2004.** Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* and elicitor of defense reactions in date palm roots. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, pp.195-204.
- El Hassni M., El Hadrami A., Daayf F., Cherif M., Ait Barka E et El Hadrami I. , 2007 .** Biological control of Bayoud disease in date palm: selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany*, 59 (2), pp.224-234.
- Eriksson O.E et Winka K., 1997.** Supraordinal taxa of *Ascomycota*. *Myconet*, 1, pp.1-16.
- Eriksson O.E., 2006.** Outline of *Ascomycota*. *Myconet*, 12, pp.1-82.
- Evans D.E., Coleman J.O.D et Kearns A., 2003.** Plant cell culture. Ed. BIOS Scientific Publishers, 194 p.
- Felidj M et Houmani Z., 2007.** Domestication de *Datura stramonium* sous stress hydrique pour l'optimisation de la production en alcaloïdes d'intérêt thérapeutique. *Revue des régions arides*, 2, pp.780-786.

- Fernandez D., Lourd M., Ouinten M., Tantaoui A et Geige J.P., 1995.** Le bayoud de palmier dattier. Une maladie qui menace la phoeniciculture. *Phytoma - La défense des végétaux*, 469.
- Fernandez D., Ouinten M., Tantaoui A., Geiger J.P., Daboussi M.J.E et Langin T., 1998 .** *Fot 1* insertions in the *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2), pp.633-636.
- Figueiredo S.F.L et Esquibel M.A., 1991.** Calogenese, organogenese e micropropagação de *Datura insigne* Barb. Rodr. *Revista Brasileira de Fisiologia vegetal*, 3 (2), pp.63-68.
- Flores H.E et Medina-Bolivar F., 1995.** Root culture and plant natural products: « unearthing » the hidden half of plant metabolism. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1 (2), pp.59-74.
- Flores L.H.E., Vivanco J.M et Loyola-Vargas V.M., 1999 .** Radical biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science** , 4, pp.220-226.
- Fluck H., 1977.** Petit guide panoramique des herbes médicinales. Ed. Délachaux et Niestlé, Paris, 275 p.
- Freeman S et Maymon M., 2000 .** Reliable detection of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, causal agent of Bayoud disease of date palm, using molecular techniques. *Phytoparasitica*, 28 (4), pp.341-348.
- Gaceb-Terrak R., Touam D et Rahmania F., 2008.** Action des acides phénols du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) sur la croissance du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Revue des régions arides*, 3 (21), pp.1219-1223.
- Gaillard Y., Cheze M et Pepin G., 2001.** Main toxic plants responsible for human deaths. *Annales de Biologie Clinique*, 59 (6) . pp.764-765.
- Gallais A et Ricroch A., 2006.** Plantes transgéniques: faits et enjeux. Ed. Quae, Versailles, 284 p.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A et Vasil, I.K., 1968.** Plant tissue culture media. *In vitro*, 12, 473 p.
- Gelvin S.B., 1990 .** Crown gall disease and Hairy root Disease. *Plant Physiology*, 92, pp.281-285.
- Ginestes J et Coumel P., 2002.** L'intervalle QT. Ed. Springer, Paris, 302 p.
- Giri A et Narasu M.L., 2000.** Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*, 18 (1), pp.1-22.
- Goldmann A., 1977.** Octopine and nopaline dehydrogenases in crown-gall tumors. [Plant Science Letters](#) , 10 (1), pp.49-58.
- Gontier E., 1993.** Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé *in vitro*. Impact physiologique de l'immobilisation des cellules au sein d'une matrice d'alginate de calcium. Thèse de doctorat, Université **de Picardie Jules - Verne** , Amiens, 208 p. (Résumé).
- Gontier E., Boitel-Conti M., Laberche J.C., Barbotin J.N et Sangwan-Noreel B.S., 1995.** Evolution of tropane alkaloid level in a *Datura innoxia* Mill. Cell suspension during successive numerous subcultures; partial restoration of the biosynthetic

potentialities. *Revue de cytologie et de biologie végétales, Le Botaniste*, 18 (3-4), pp.91-99.

- Goodner B ., Hinkle G ., Gattung S ., Miller N ., [Blanchard M .](#) ., [Qurollo B .](#) ., [Goldman BS .](#) ., [Cao Y .](#) ., [Askenazi M .](#) ., [Halling C .](#) ., [Mullin L .](#) ., [Houmiel K .](#) ., [Gordon J .](#) ., [Vaudin M .](#) ., [Iartchouk O .](#) ., [Epp A .](#) ., [Liu F .](#) ., [Wollam C .](#) ., [Allinger M .](#) ., [Doughty D .](#) ., [Scott C .](#) ., [Lappas C .](#) ., [Markelz B .](#) ., [Flanagan C .](#) ., [Crowell C .](#) ., [Gurson J .](#) ., [Lomo C .](#) ., [Sear C .](#) ., [Strub G .](#) ., [Cielo C .](#) et [Slater S .](#) ., 2001.** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, pp.2323-2328. (Résumé).
- Goullé J.P., Pepin G., Dumestre-Toulet V et Lacroix C., 2004.** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes: belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, 16 (1), pp.22-35.
- Gryniewicz G et Gadzikowska M., 2008.** Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacological reports*, 60, pp.439-463.
- Guggisberg G et Hesse M ., 2001.** Alkaloids. In **Meyers R.A (ed)**. Encyclopedia of physical science and technology, Organic chemistry. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press, London, pp.477-493.
- Guillon S., Tremouillaux -Guiller J., Pati K.P., Rideau M et Gantet P., 2006.** Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, pp.341-346.
- Häkkinen S.T., Moyano E., Cusido R.M, Palazon J, Pinol M.T et Oksman-Caldentey K.M., 2005.** Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6b-hydroxylase. *Journal of Experimental Botany*, 56 (420), pp.2611-2618.
- Häkkinen S.T., 2008.** A functional genomics approach to the study of alkaloid biosynthesis and metabolism in *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* cell cultures. Doctoral thesis, Helsinki University of Technology, Espoo, 90 p.
- [Harborne J.B.](#) ., [Baxter H](#) et [Moss G.P.](#) ., 1999.** Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants. 2<sup>nd</sup> Ed. Taylor & Francis, London, 976 p.
- Harfi B., 2009.** Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp: Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Thèse de Magister, INA. Alger, 109P.
- [Harlay A.](#) ., [Huard A](#) et [Ridoux L.](#) ., 2008 .** Guide du préparateur en pharmacie. 3<sup>ème</sup> Ed. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux, 1358 p.
- Hashimoto T et Yukimoune Y., 1986.** Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *Journal of Plant Physiology*, 124, pp.61-75.
- Hassikou R., Hassikou K., Ouazzani Touhami A., Badoc A et Douira A., 2003.** Efficacité *in vitro* et *in vivo* de quelques fongicides sur *Curvularia lunata*. [Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux](#) ., 142, pp.45-60.

- Hayman G.T et Farrand S.K., 1988.** Characterization and mapping of the agrocinnopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *Journal of Bacteriology*, 170, pp.1759-1767.
- Herbert R.B., 2003.** The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural product reports*, 20 (5), pp.494-508.
- Herouart D., Gontier E., Sangwan R.S et Sangwan-Norreel B.S., 1991.** Analysis of the potential use of androgenic *Datura innoxia* for the development of cell cultures producing high amounts of tropane alkaloids. *Journal of Experimental Botany*, 42 (8), pp.1073-1076.
- Hmouni A., Oihabi L., Badoc A et Douira A., 2003.** Etude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région de Gharb (Maroc). *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142 (1-4), pp.79-100.
- Houmani Z., Cosson L., Corbineau F et Com D., 1994.** Etude de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. *Acta Botanica Gallica*, 141 (1), pp.61-66.
- Houmani Z., 1999.** Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Thèse de doctorat, INA, Alger, 124 p.
- Hu Z.B et Du M., 2006.** Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (2), pp.121-127.
- Iranbakhsh A., Oshaghi M et Majd A., 2006.** Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium* L. (*Solanaceae*). structure and ultra structure of biosynthesizing cells. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48 (1), pp.13-18.
- Iranbakhsh A., Oshagi M.A et Ebadi M., 2007.** Growth and production of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of Ecological Sciences*, 10 (8), pp.1236-1242.
- Iranbakhsh A., Ebadi M et Bayat M., 2010.** The inhibitory effects of plant methanolic extract of *Datura stramonium* Land leaf explant callus against bacteria and fungi. *Global Veterinaria*, 4 (2), pp.149-155.
- Iserin P., 1997.** Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins. Ed. Larousse-Bordas, Paris, 336 p.
- Ivancheva S., Nikolova M et Tsvetkova R., 2006.** Pharmacological activities and biologically active compounds of Bulgarian medicinal plants. *Phytochemistry: Advances in Research*, pp.87-103.
- Jaiti F., Dihazi A., El Hadrami A., El Hassni M et El Hadrami I., 2004.** Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defense reaction against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, pp.325-331.
- Jaiti F., Meddich A et El Hadrami I., 2007.** Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm against bayoud disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71, pp.166-173.

- Jaiti F., Verdeil J.L et El Hadrami I., 2009.** Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* , 74 (1), pp.84-90.
- Javaid A., Shafique S et Shafique S., 2008.** Herbicidal activity of *Datura metel* L. against *Phalaris minor* Retz. *Pakistan Journal of Weed Science Research* , 14 (3-4), pp.209-220.
- Jha T.B et Ghosh B., 2005.** Plant tissue culture: basic and applied. 1<sup>st</sup> Ed. Universities Press, New Delhi, 206 p.
- Jouzier É., 2005** . Solanacées médicinales et philatélie. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* , 144, pp.311-332.
- Kadri Y ., 2008** . Caractérisation de la variabilité biologique et pathologique de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W.L.Gordon et essais de méthodes de lutte «*in vitro*». Mémoire de magister, INA, Alger, 76 p.
- Kagale S., Marimuthu T., Thayumanavan B., Nandakumar R et Samiyappan R., 2004.** Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, pp.91-100.
- Kartal M., Kurucu S., Altun L., Ceyhan T., Sayar E., Cevheroglu S et Yetkin Y., 2003.** Quantitative analysis of l-hyoscyamine in *Hyoscyamus reticulatus* L. by GC-MS, *Turkish Journal of Chemistry* , 27, pp.565-569.
- Khan M.A., Rashid A et Chohan R.A., 2000.** Biological control of bacterial blight of cotton using some plant extracts. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* , 37 (3-4).
- Khelifi-Slaoui M., Rezine R., Amroun S., Amdoun R et Khelifi L., 2005.** Embryons somatiques et bourgeons néoformés induits sur explants issus de vitro semis de *Datura stramonium* L. d'origine algérienne. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales, Alger, pp.114-118.
- Kim H et Farrand S.K., 1998.** Opine catabolic loci from *Agrobacterium* plasmids confer chemotaxis to their cognate substrates. *American Phytopathological Society*, 11 (2), pp.43-131.
- Kim Y., Wyslouzil B.E et Weathers P.J., 2002** .Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* , 38, pp.1-10.
- Kinsara A.M et Seif EL Nasr M.M., 1994.** *Organization and alkaloid production in tissue culture of Datura innoxia* Mill.. *Journal Science*, 6 (1), pp.5-15.
- Kpemissi E.A. , 2007.** Les *Anacardiaceae* du Togo: Etude botanique, écologique et propriétés antifongiques. Thèse de doctorat, Université de Reims (France), Université de Lomé (Togo), 182 p.
- Krimi Z., Raio A., Petit A., Nesme X et Dessaux Y., 2006.** *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology*, 116 (3), pp.237-246.

- Krolicka A., Staniszewska I., Bielawski K., Malinski E., Szafranek J et Lojkowska E., 2001.** Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. [\*Plant Science\*](#) , 160 (2), pp.259-264.
- Kuganathan N., Saminathan S et Muttukrishna S., 2008.** Toxicity of *Datura alba* leaf extract to aphids and ants. *The Internet Journal of Toxicology*,5 (2).
- Kurian A., Sankar M.A., 2007.** Medicinal plants. Ed. New India publishing agency, New Delhi, 356 p.
- Kutchan T.M., 1995 .**Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering.*The Plant Cell*, 7,pp.1059-1070.
- L'Ecuyer-Coelho H., 2000.** Développement d'un procédé pour la culture à haut concentration de cellules végétales. Mémoire de **maîtrise** ès sciences appliquées, Université de Montréal, Ecole polytechnique, Montréal, 177 p.
- Labarre M., 2006.** Les hémoglobines tronquées de *Agrobacterium tumefaciens*C58. Mémoire de maîtrise en biochimie, Université Laval, Québec, 135 p.
- Ladraa N. , 2006.** Induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* spp. Mémoire d'ingénieur, INA, Alger, 61 p.
- Lanoue A., Boitel-Conti M., Dechaux C., Laberche J.C., Christen P et Sangwan-Norreel B., 2004.** Comparison of growth properties, alkaloid production and water uptake of two selected *Datura* hairy root lines. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 46, pp.185-192.
- Levitt J et Lovett J.V., 1984.** Activity of allelochemicals of *Datura stramonium* L. (Thorn-apple) in contrasting soil types. *Plant and Soil*, 79 (2), pp.181-189.
- Lindsey K et Yeoman M.M., 1983.** The Relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. [\*Journal of Experimental Botany\*](#) , [34 \(8\)](#) ), pp.1055-1065.
- Louvet J., 1993 .** Que devons nous faire pour lutter contre le bayoud. In [Riedacker A ., Groupe d'étude de l'arbre \(France\) ., Sahara et Sahel Observatory \(eds\).](#) Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Ed. John Libbey Eurotext, Paris, pp.337-346.
- Lovett J.V et Potts W.C., 1987.** Primary effects of allelochemicals of *Datura stramonium* L. [\*Plant and Soil\*](#) , [98 \(1\)](#), pp. 137-144.
- Lovett J.V. , Levitt J et Duffield A.M. , 2006 .** Allelopathic potential of *Datura stramonium* L. (Thorn apple). *Weed Research*, 21 (3-4), pp.165-170 .
- Loyola Vargas V.M., 1999.** Genetic transformation of *Datura* species. In Bajaj Y.P (ed) . Transgenic medicinal plants. Ed. Springer, Berlin, pp.103-116.
- Marwat S.K., Ur Rehman F et Khan S., 2005.** Germination of seeds of *Datura stramonium* L. under different conditions (Temperature & soil). *Gomal University Journal of Research*, 21, pp.45-49.
- Masurel T.C.E., 2007.** Contribution à l'étude de la contamination de l'ensilage de maïs par des adventices toxiques: conséquences pratiques chez les bovins. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire, Toulouse, 108 p.

- Mehtab Y., Raof M.A et Rana K., 2002**. Bioefficacy of plant products against *Botrytis ricini* (Godfrey). In **Babu B.S., Varaprasad K.S., Anitha K., Chandurkar P.S., Chakrabarty S.K., Prasada-Rao-R.D.V.J., Raof M.A. Yasmeen M., Kausar R ( eds )**. National Seminar on Resources management in plant protection during twenty first century, Hyderabad, India, 14-15 November 2002, II, pp.100-103.
- Michel B., 2001**. Intoxication des animaux domestiques par les plantes de la famille des solanacées. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon, 83 p.
- Milcent R et Chau F., 2003**. Bases fondamentales de la chimie organique hétérocyclique. Ed. Diffusion Presse Sciences, Les Ulis, 845 p.
- Moulin M et Coquerel A., 2002**. Pharmacologie. Ed. Masson, Paris, 845 p.
- Mountain W.L., 1987**. Jimsonweed, *Datura stramonium* L. *Solanaceae. Regulatory Horticulture*, 13 (1).
- Murashige T et Skoog F., 1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, pp.473-497.
- Nasraoui B et Lepoivre P., 2003**. Les champignons phytopathogènes. In **Lepoivre P (ed)**. [Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes](#) et fondements des stratégies de lutte. 1<sup>ère</sup> Ed. De Boeck Université, Bruxelles, [pp.111](#) -427.
- Nelson L., Shih R.D., Balick M.J et Lampe K.F., 2007**. Handbook of poisonous and injurious plants. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer, New York, 340 p.
- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M et Yanofsky M.F., 1984**. Crown Gall: A Molecular and Physiological Analysis. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, pp.387-413.
- Nishikawa K et Ishimaru K., 1997**. Flavonoids in root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Journal of Plant Physiology*, 151, pp.633-636.
- Quintin, 2001**. Biodiversité du palmier dattier. In [www.agromzab.multimania.com](http://www.agromzab.multimania.com) .
- Palazón J., Altabella T., Cusidó R.M., Ribó M et Piñol M.T., 1995**. Growth and tropane alkaloid production in *Agrobacterium* transformed roots and derived callus of *Datura*. *Biologia Plantarum*, 37 (2), pp.161-168.
- Palazón J., Navarro-Ocaña A., Hernandez-Vazquez L et Mirjalili M.H., 2008**. Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules*, 13, pp.1722-1742.
- Papadoyannis I.N., 1999**. Determination of *Datura* alkaloids by using chromatographic techniques. *Journal of Natural Toxins* , 3 (4 ) , pp.310-316.
- Pavlov A.I., Georgiev V.G., Marchev A.S et Berkov S.H., 2009**. Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. [World Journal of Microbiology and Biotechnology](#) . (Résumé).
- Payne J., Hamill J.D., Robins R.J et Rhodes M.J., 1987**. Production of Hyoscyamine by 'Hairy Root' Cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica*, 53 (5), pp.474-478. (Résumé).

- Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G et Guyon P., 1983.** Further extension of opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics*, 190, pp.204-214.
- Piva G et Piva A., 2006.** Anti-nutritional factors of *Datura* in feedstuffs. *Natural Toxins*, 3 (4), pp.238-241.
- Plan G., 1988.** Plantes de santé. Ed. Nathan, Paris, 176 p.
- Primrose S.B., Twyman R.M et Old R.W., 2004.** Principes de Génie génétique. 6<sup>ème</sup> Ed. De Boeck, Bruxelles, 400 p.
- Pudersell K., 2006.** Tropane alkaloid production and riboflavine excretion in the field and tissue cultures of henbane (*Hyoscyamus niger*). *Dissertation Medicinæ Universitatis Tartuensis*, Tartu University, Tartu, 89 p.
- Quetin-Le Clercq J., 2002.** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 57 , pp. 11-20.
- Quezel P et Santa S., 1962.** Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris, 1170 p.
- Rai R., 2007.** Genetics and plant breeding: Introduction to plant biotechnology, national research centre on plant biotechnology. In, [nsdl.niscair.res.in/.../123456789/668/1/revised+introduction+to+plant+biotechnology.pdf](http://nsdl.niscair.res.in/.../123456789/668/1/revised+introduction+to+plant+biotechnology.pdf)
- Rajesh et Sharma G.L., 2002.** Studies on antimycotic properties of *Datura metel*. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(2-3), pp.193-197.
- Raman M.D.S., Sultana N et Anwar M.N., 2004.** *In vitro* antimicrobial activity of holarriifine–24ol isolated from the stem bark of *Holarrhena antidysenterica*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 6 (4), pp.698-700.
- Ramya S. , Rajasekaran C. , Sundararajan G., Alaguchamy N et Jayakumararaj R., 2008.** Antifeedant activity of leaf aqueous extracts of selected medicinal plants on VI instar larva of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Ethnobotanical Leaflets*, 12, pp.938-943.
- Raoufa A., El-Wakil H., Abou Gabal A et Khelifa H.D ., 2008 .** Production of scopolamine and hyoscyamine in calli and regenerate cultures of *Datura metel* (L). *Journal of Applied Sciences Research* , 4 (12), pp.1858-1866.
- Rapilly F ., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Épiphyties*, 19, 102 p.
- Reichl F.X., 2004 .** Guide pratique de toxicologie. 1<sup>ère</sup> Ed. De Boeck, Bruxelles, 368 p.
- Rezine., 2004 .** Contribution à l'étude de la germination *in vitro* de graines de *Datura stramonium* L. et l'initiation de la callogenèse à partir de différents types d'explants. Mémoire d'ingénieur, INA, Alger, 49 p.
- Richter U., Rothe G., Fabian A.K., Rahfeld B et Dräger B., 2005.** Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 56, pp.645-652.
- Roberts F.M. , 1998.** Production of alkaloids in plant cell culture. In **Roberts F.M et Wink M (eds)**. Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal application. Ed.Plenum press, New York, pp.159-194.

- Robins R.J., 1998.** The biosynthesis of alkaloids in root cultures. In **Roberts F.M et Wink M (eds)**. Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal application. Ed. Plenum press, New York, pp.199-218.
- Saadabi A.M.A., 2006.** Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine. *Asian Journal of Plant Sciences* , 5(5), pp.907-909.
- Saenz-Carbonell L et Loyola-Vargas V.M., 1996.** *Datura stramonium* hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg's B<sub>5</sub> medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 61 (3), pp.321-337.
- Saibi L., 2005.** Callogenèse induite sur différents types d'explants prélevés sur des vitro-semis de *Datura stramonium* L. Mémoire d'ingénieur, INA, Alger, 66 p.
- Sandberg F et Corrigan D., 2001.** Natural remedies: their origins and uses. Ed. Taylor and Francis, New York, 169 p.
- Sasson A., 1991.** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. *CIHEAM - Option Mediterranean – Serie Séminaires* ,14, pp.59-74.
- Satish S., Mohana D.C., Ranhavendra M.P et Raveesha K.A., 2007.** Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *Journal of Agricultural Technology*,3 (1), pp.109-119.
- Šepanovi M., Novak N., Bari K. ; Ostoji Z., Galzina N et Gorši M., 2008.** Allelopathic effect of two weed species, *Abutilon theophrasti* Med. and *Datura stramonium* L. on germination and early growth of corn. [\*Agronomy journal\*, 69 \(6\), pp.459-472.](#)
- Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A., Arroo R., Bosch C.H., De Ruijter A., Simmonds M.S.J., 2008.** Plant Resources of Tropical Africa 11(1) – Medicinal Plants 1. Ed. Backhuys Publishers, Wageningen, 791 p.
- Sedra M.H., 2003 .** Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord. Ed. FAO, SNEA, Tunis, 125 p.
- ##### # # # 2006. ### ##### ### ##### ##### ##### ##### ##### #####**  
**##### ##### ##### ##### ##### # ##### # ##### #####. #####**  
**##### ##### ##### ##### 77 #.**
- Semal J., 1989.** Traité de pathologie végétale. Ed. Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, 621 p.
- Serghat S., Mouria A., Ouazani Touhami A et Badoc A., 2004.** Effet de quelques fongicides sur le développement *in vitro* de *Pyricularia grisea* et *Helminthosporium oryzae*. **Bulletin** [\*de la Société de Pharmacie de Bordeaux\*](#) , 143, pp.7-18.
- Shafique S et Shafique S., 2008 .** Antifungal activity of n-hexane extracts of *Datura metel* against *Ascochyta rabiei*. *Mycopathology*, 6 (1-2), pp.31-35.
- Sharma N et Trivedi P.C., 2002.** Screening of leaf extracts of some plants for their nematocidal and fungicidal properties against *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum*. **Asian Journal** – [\*of\*](#) – **Experimental** – [\*Sciences\*](#) , 16, pp.21-28.

- Sharma A et Patel V.K., 2009.** *In vitro* screening of the antibacterial activity and identification of bioactive compounds from plants against selected *Vibrio* spp. pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 33, pp.137-144.
- Shonle I et Bergelson J., 2000.** Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution*, 54, pp.778-788.
- Sikuli N.N et Demeyer K., 1996.** Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by "hairy roots" of *Datura*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47 (3), pp.261-267.
- Singhvi P.M., Lohra Y et Panwar M., 2001.** Effect of certain plant extracts on oviposition of rust-red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. infesting stored jowar. *Journal of Applied Zoological Researches*, 12 (1), pp.67-70.
- Singhvi P.M., Lohra Y., Panwar M et Sablok T., 2002.** Efficacy of plant extracts against development of *Tribolium confusum* (Jac du Val.) infesting stored *Sorghum*. *Journal of Applied Zoological Researches*, 13 (1), pp.114-118.
- Sinha A.K., Verma K.P., Agarwal K.C., Toorray N. K et Thakur M. P., 2004.** Antifungal activities of different plant extracts against *Colletotrichum capsici*. *Advances in Plant Sciences*, 17 (1), pp.337-338.
- Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L et Tepfer D., 1986.** Nucleotide Sequence Analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *Journal of Biological Chemistry*, 261(1), pp.18-121.
- Sondhia S et Swain D., 2002.** Allelopathic effects of *Datura stramonium* L. on rice and *Echinochloa colonum*. *Allelopathy Journal*, 10 (2), pp.133-140.
- Tantaoui A et Boissoni C . , 1991.** Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et de *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du Palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopathologia Mediteranea*, 30, pp.155-163.
- Tantaoui A et Fernandez D., 1993.** Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). *Phytopathologia Mediteranea*, 32, pp.235-244.
- Tao J et Li L., 2006.** Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogènes*. *South African Journal of Botany*, 72, pp.211-216.
- Tikhomiroff C., 2001.** Etude des métabolismes primaire et secondaire de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées (M.S.C.A.), Université de Montréal. Ecole polytechnique, Montréal, 235 p.
- Trabut L., 1935.** Flore du nord de l'Afrique: répertoire des noms indigènes des plantes spontanées cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. Ed. La Typo litho et Jules carbonel, Alger, 353 p.
- Türküsay H et Ongur E., 1998.** Bazı bitki ekstraktları *in vitro* antifungal etkileri üzerine araştırmalar (= Studies on antifungal effects of some plant extracts *in vitro*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, pp.267-271. (Résumé).

**Uma Reddy B., 2009.** Antimicrobial activity of *Datura stramonium* L. and *Tylophora indica* (Burm.f.) Merr. *Pharmacology online*, 1, pp.1293-1300.

**Umber M., 2004.** Etude de l'oncogène *ORF8* d'*Agrobacterium*. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg I), Strasbourg, 143 p.

**Usha K., Singh B., Praseetha P., Deepa N., Agarwal D. K., Agarwal R et Nagaraja A., 2009.** Antifungal activity of *Datura stramonium*, *Calotropis gigantea* and *Azadirachta indica* against *Fusarium mangiferae* and floral malformation in mango. *European Journal of Plant Pathology*, 124 ( 4 ), pp.637-657.

**Valnet J., 1983.** Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. 5<sup>ème</sup> Ed. Maloine S.A, Paris, 727 p.

**Verdrager J., 1978.** Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Le *Datura*. Ed. Maloine S.A, Paris, pp.96-97.

**Vincent J.M., 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Program. Handbook, 15. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 164 p.

**Wang Y., 2008.** Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochemistry Reviews*, 7, pp.395-406.

**White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P et Nester E.W., 1985.** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology*, 164 (1), pp.33-44.

**Wink M., 1993.** Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. In **Cordell A.C (ed)**. Alkaloids. Chemistry and pharmacology. Ed. Academic Press Inc, California, 34, pp.1-118.

**Wink M., 1998.** Chemical ecology of alkaloids. In **Roberts M. F et Wink M (eds)**. Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications, Ed. Plenum, New York, pp.265-300.

**Wink M., 2008.** Ecological roles of alkaloids. In **Fattorusso E et Tagliabatella-Scafati O (eds)**. Modern alkaloids, structure, isolation, synthesis and biology. Ed. Wiley-Vich, Weinheim, pp.3-24.

**Wood D.W., Setubal J.C., Kaul R., Monks DE., Kitajima J.P., Okura V.K., Zhou Y., Chen L., Wood G.E., Almeida N.F Jr., Woo L., Chen Y., Paulsen I.T., Eisen J.A., Karp P.D., Bovee D. Sr., Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Kutayavin T., Levy R., Li M.J., McClelland E., Palmieri A., Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu. Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao Z.Y., Dolan M., Chumley F., Tingey S.V., Tomb J.F., Gordon M.P., Olson M.V et Nester E.W., 2001.** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, pp.2317-2323. (Résumé).

- 
- Zaid A., De Wet P.F., Djerbi M et Oihabi A., 2002** . Diseases and pests of date palms in date palm cultivation. In **Zaid A et Arias-Jimenez E (eds)**. Date palm cultivation. Ed. FAO, Plant Production and Protection Papers, 156, pp.227-281.
- Zárate R et Yeoman M.M., 2001**. Application of recombinant DNA technology to studies on plant secondary metabolism. In [geb.unigiessen.de/geb/volltexte/2006/3039/pdf/FestschriftNeumann](http://geb.unigiessen.de/geb/volltexte/2006/3039/pdf/FestschriftNeumann).
- Zarouri B., 2006**. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* sur explants de *Datura stramonium* L. en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes. Mémoire d'ingénieur, INA, Alger, 46 p.
- Zayed R., Wink M et El Shamy H., 2006**. *In vitro* organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia*. *Biosciences*, 61 (78), pp.560-564.
- Zhang L., Ding R., Chai Y., Bonfill M., Moyano E., Oksman-Caldentey K.M., Xu T., Pi Y., Wang Z., Zhang H., Kai G., Liao Z., Sun X et Tang K., 2004**. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)*, 101 (17), pp.6786-6791.
- Zolala J., Farsi M., Gordan H. R et Mahmoodnia M., 2007**. Producing a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Agriculture, Science and Technology* ,9, pp.327-339.

# Annexes

· Annexe 1: Composition chimique des milieux de cultures

**A. Milieu Murashige et Skoog (1962)**

Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> K NO <sub>3</sub> Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1650 1900 440 370 170
Microéléments	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O Zn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O KI Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O Co Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	6.20 22.30 8.60 0.83 0.25 0.025 0.025
	Fe SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	27.85 37.25
Vitamines	Glycine Acide nicotinique Pyridoxine HCl Myo inositol Thiamine HCl	2.00 0.50 0.50 100 0.1

**B. Milieu YEM (Vincent, 1970)**

Formule chimique	Concentration (mg/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> . 7(H <sub>2</sub> O)	500 200
NaCl	100
Extrait de levure	400
Mannitol Agar	10000 15

Composition chimique	Concentration (mg/l)
<b>Macroéléments</b>	
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150
<b>Microéléments</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
KI	0.75
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0125
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25
FeSO <sub>4</sub> .7(H <sub>2</sub> O)	27.85
<b>Vitamines</b>	
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

*C. Milieu B5 (Gamborg et al., 1968)*

Annexe 2: Callogénèse induite par hormones et par souches bactériennes

**Surfaces (cm) des cals induits par hormones sur différents explants de *D. tatula***

Tableau de l'analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	0.41978	2	0.20989	4.79	0.0166
Intra-groupes	1.18269	27	0.0438033		
Total (Corr.)	1.60247	29			

Test LSD Méthode: 95.0 %

**Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium* L. et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon.**

Explants	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Feuilles	10	0.677	X
Racines	10	0.786	XX
Hypocotyles	10	0.964	X

Surfaces des cals induits par souches bactériennes (cm) sur différents explants de *D. tatula*

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1.34105	3	0.447016	15.01	0.0000
Intra-groupes	1.07179	36	0.0297719		
Total (Corr.)	2.41284	39			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Souches	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
0	10	0.239	X
C58	10	0.514	X
E17	10	0.587	X
E2x	10	0.745	X

A. Biomasses sèches des cals induits par hormones sur différents explants chez deux variétés de *D stramonium*

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	3.13304E8	5	6.26607E7	48.31	0.0000
Intra-groupes	1.55663E7	12	1.29719E6		
Total (Corr.)	3.2887E8	17			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Datura	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Dat stra R	3	2350.0	X
Dat stra F	3	2375.0	X
Dat stra H	3	3825.0	X
Dat tat F	3	9625.0	X
Dat tat R	3	10775.0	XX
Dat tat H	3	12500.0	X

B. Biomasses sèches des cals induits par hormones et par souches bactériennes sur hypocotyles de *D. tatula*

Tableau de l'analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	7.51764E8	4	1.87941E8	26.12	0.0000
Intra-groupes	7.19488E7	10	7.19488E6		
Total (Corr.)	8.23713E8	14			

Test LSD Méthode: 95.0 %

Niveau	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Dat tat H	3	12500.0	X
Témoin	3	13000.0	X
C58 H tat	3	20000.0	X
E2X H tat	3	25200.0	X
E17 H tat	3	30900.0	X

C. Contenus en alcaloïdes (H&S) des cals induits par hormones sur différents explants chez deux variétés de *D. stramonium*

Tableau de l'analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1.11504E10	5	2.23009E9	8.62	0.0011
Intra-groupes	3.10533E9	12	2.58778E8		
Total (Corr.)	1.42558E10	17			

Test LSD Méthode: 95.0 %

Datura	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Dat stra F	3	56666.7	X
Dat tat F	3	93333.3	X
Dat stra H	3	94000.0	X
Dat stra R	3	115333.	XX
Dat tat H	3	118667.	XX
Dat tat R	3	134667.	X

D. Contenus en alcaloïdes (H&S) des cals induits par hormones et par souches bactériennes sur hypocotyles de *D. tatula*

Tableau de l'analyse de la variance.

**Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium* L. et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon.**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	2.4465	4	6.11624	142.61	0.0000
Intra-groupes	4.28887	10	4.28887		
Total (Corr.)	2.489380	14			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Niveau	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Témoin	3	112000.	X
Dat tat H	3	118667.	XX
C58 H tat	3	128000.	XX
E2X H tat	3	137700.	X
E17 H tat	3	222700.	X

Annexe 3: Cultures de chevelus racinaires de *D. stramonium* et *D. tatula* et de suspensions cellulaires de *D. tatula*

A. Biomasses sèches finales des cultures de chevelus racinaires de *D. tatula* et *D. stramonium* milieu liquide avec ou sans hormones de croissance

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	54.5313	3	18.1771	48.64	0.0000
Intra-groupes	2.9898	8	0.373725		
Total (Corr.)	57.5211	11			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> de <i>D. tatula</i>	3	4.56	X
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> <i>D. stramonium</i>	3	4.66	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de <i>D. stramonium</i>	3	7.92	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de <i>D. tatula</i>	3	9.52	X

B. Biomasses sèches finales de différents types de cultures de *D. tatula*

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	50.0096	2	25.0048	384.89	0.0000
Intra-groupes	0.3898	6	0.0649667		
Total (Corr.)	50.3994	8			

Test LSD Méthode: 95.0 %

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Suspensions E17	3	4.48	X
Chevelu racinaire H <sup>+</sup>	3	4.56	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup>	3	9.52	X

**Productions spécifiques en hyoscyamine des cultures de chevelus racinaires de *D. tatula* et *D. stramonium***

Tableau de l'analyse de la variance

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	52.9856	3	17.6619	213.37	0.0000
Intra-groupes	0.6622	8	0.082775		
Total (Corr.)	53.6478	11			

Test LSD Méthode: 95.0 %

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> de <i>D. stramonium</i>	3	1.55	X
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> de <i>D. tatula</i>	3	2.1	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de <i>D. stramonium</i>	3	5.8	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de <i>D. tatula</i>	3	6.2	X

C. Productions spécifiques en hyoscyamine de différents types de cultures de *D. tatula*

Tableau de l'analyse de la variance

**Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium* L. et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon.**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	27.42	2	13.71	130.90	0.0000
Intra-groupes	0.6284	6	0.104733		
Total (Corr.)	28.0484	8			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Chevelu racinaire H <sup>-</sup>	3	2.1	X
Suspensions E17	3	3.1	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup>	3	6.2	X

**Productivités en hyoscyamine des cultures de chevelus racinaire de *D. tatula* et *D. stramonium***

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	6.92083	3	2.30694	242.69	0.0000
Intra-groupes	0.0760467	8	0.00950583		
Total (Corr.)	6.99687	11			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> D. stramonium	3	0.24	X
Chevelu racinaire H <sup>+</sup> de D. tatula	3	0.32	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de D. stramonium	3	1.57333	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup> de D. tatula	3	1.97	X

**D. Productivités en hyoscyamine de différents types de culture de *D. tatula***

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	5.0222	2	2.5111	4676.16	0.0000
Intra-groupes	0.003222	6	0.000537		
Total (Corr.)	5.02542	8			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Chevelu racinaire H <sup>+</sup>	3	0.32	X
Suspensions E17	3	0.46	X
Chevelu racinaire H <sup>-</sup>	3	1.97	X

E. Biomasses sèches finales des cultures de chevelus racinaires H<sup>-</sup> en mode de culture cuvé et semi continu

**Tableau de l'analyse de la variance**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	1463.08	5	292.616	101.87	0.0000
Intra-groupes	34.4679	12	2.87232		
Total (Corr.)	1497.55	17			

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture en	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Cuvé 10 jours	3	5.27	X
Semi continu 10 jours	3	5.27	X
Cuvé 24 jours	3	7.18	X
Cuvé 30 jours	3	7.89	X
Semi continu 24 jours	3	16.59	X
Semi continu 30 jours	3	30.33	X

Rendements en hyoscyamine des cultures de chevelus racinaires H<sup>-</sup> en mode de culture cuvé et semi continu

**Tableau de l'analyse de la variance**

**Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium* L. et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) W. L. Gordon.**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	28430.4	5	5686.09	1115.82	0.0000
Intra-groupes	61.1509	12	5.09591		
Total (Corr.)	28491.6		17		

**Test LSD Méthode: 95.0 %**

Culture en	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Cuvé 10 Jours	3	16.53	X
Semi Continu 10 Jours	3	16.53	X
Cuvé 24 Jours	3	22.27	X
Cuvé 30 Jours	3	42.69	X
Semi Continu 24 Jours	3	55.78	X
Semi Continu 30 Jours	3	130.147	X

- Annexe 4. Activités *in vitro* des alcaloïdes (solutions pures et extrait brut) sur la croissance mycélienne radiale de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

**Taux de croissance mycélienne radiale des souches de *F. o.a* sur milieu PDA + l'extrait brut**

**Tableau de l'analyse de la variance pour CM (mm) - Somme des carrés de type III**

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Effets principaux					
A:Souche	5.00521	1	5.00521	1.68	0.2021
B:Concentration	18.724	3	6.24132	2.09	0.1153
Résidu	128.266	43	2.98292		
Total (Corrigé)	151.995	47			

**Test LSD pour CM (mm) par Souche Méthode: 95.0 %**

Souche	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
I	24	38.4375	0.352546	X
II	24	39.0833	0.352546	X

**Test LSD pour CM (mm) par concentration Méthode: 95.0 % LSD**

Concentration	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
0	12	38.125	0.498575	X
1	12	38.2083	0.498575	XX
2	12	39.0833	0.498575	XX
3	12	39.625	0.498575	X

**Taux de croissance mycélienne radiale des souches de *F. o.a* sur milieu PDA + l'atropine ou la scopolamine**

Tableau de l'analyse de la variance pour CM (mm) - Somme des carrés de type III

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Effets principaux					
A:Souche	11.1169	1	11.1169	1.44	0.2373
B:Alcaloïde	690.842	1	690.842	89.32	0.0000
C:Concentration	733.517	3	244.506	31.61	0.0000
Résidu	324.854	42	7.73461		
Total (corrigé)	1760.33	47			

**Test LSD pour CM (mm) par souche Méthode: 95.0 %**

Souche	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
I	24	30.4167	0.567693	X
II	24	31.3792	0.567693	X

**Test LSD pour CM (mm) par alcaloïde Méthode: 95.0 % LSD**

Alcaloïde	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
Scopolamine	24	27.1042	0.567693	X
Atropine	24	34.6917	0.567693	X

**Test LSD pour CM (mm) par concentration Méthode: 95.0 %**

Concentration	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
1	12	26.0417	0.802839	X
2	12	29.2167	0.802839	X
3	12	31.5833	0.802839	X
0	12	36.75	0.802839	X

**Taux d'inhibition de la croissance mycélienne radiale des souches de *F. o.a* sur milieu PDA + l'atropine ou la scopolamine**

Tableau de l'analyse de la variance pour I (%). Somme des carrés de type III

**Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium* L. et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albiginis* (Killian et Maire) W. L. Gordon.**

---

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Effets principaux					
A: Souche	0.0103429	1	0.0103429	3.92	0.0566
B: Alcaloïde	0.779512	1	0.779512	295.63	0.0000
C: Concentration	0.06814	2	0.03407	12.92	0.0001
Residu	0.0817414	31	0.00263682		
Total (corrige)	0.939737	35			

**Test LSD pour I (%) par souche Méthode: 95.0 %**

Souche	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
1	18	0.183422	0.0121033	X
2	18	0.217322	0.0121033	X

**Test LSD pour pourcentage d'inhibition par extrait Méthode: 95.0 %**

Alcaloïde	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
Atropine	18	0.0532222	0.0121033	X
Scopolamine	18	0.347522	0.0121033	X

**Test LSD pour I (%) par concentration Méthode: 95.0 %**

Concentration	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Groupe homogène
3	12	0.140392	0.0148235	X
2	12	0.218492	0.0148235	X
1	12	0.242233	0.0148235	X